

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DISSERTAÇÃO**

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA INTERAÇÃO**

**ENTRE CHALCONA E SEUS DERIVADOS**

**FLUORADOS COM ALBUMINA SÉRICA BOVINA**

**(ASB)**

**Leonardo Santos de Barros**

**2011**



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

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA INTERAÇÃO ENTRE  
CHALCONA E SEUS DERIVADOS FLUORADOS COM ALBUMINA  
SÉRICA BOVINA (ASB)**

**LEONARDO SANTOS DE BARROS**

*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  
Setembro de 2011

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

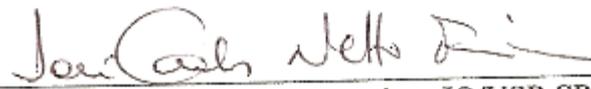
**LEONARDO SANTOS DE BARROS**

Tese 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.

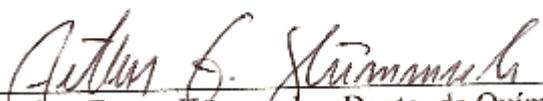
TESE APROVADA EM 14/09/2011

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Francisco de Assis da Silva - Depto. de Química/ICE/UFRRJ  
(Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira - Depto. de Química/ICE/UFRRJ

  
\_\_\_\_\_  
Dr. José Carlos Netto Ferreira - IQ/USP-SP

\_\_\_\_\_  
Dra. Nanci Camara de Lucas Garden - IQ/UFRRJ  
(Suplente)

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Arthur Eugen Kümmerle - Depto. de Química/ICE/UFRRJ  
(Suplente)

## DEDICATÓRIA

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar. É melhor tentar ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder. Prefiro ser feliz embora louco que em conformidade viver.”  
(Martin Luther King)

Aos meus pais, Creuza Santos de Barros e Antônio Carlos de Barros.

“O choro pode durar uma noite, mas a alegria vem pela manhã.” (Livro de Salmos)

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de alcançar mais um objetivo.

Ao Prof. e orientador Francisco Assis da Silva e ao Prof. e co-orientador Darí Cesarin Sobrinho pelos ensinamentos, paciência, cooperação e dedicação.

Ao Prof. Darí Cesarin Sobrinho, do Depto. de Química/ ICE/ UFRRJ, pela doação da chalcona e seus derivados fluorados que permitiram a realização deste trabalho, bem como seus estagiários Otávio Augusto e Edgar Shaeffer que me auxiliaram nos experimentos.

Ao coordenador do PPGQ/ ICE/ UFRRJ Prof. Mario Geraldo de Carvalho, pela aquisição do espectropolarímetro que possibilitou a realização dos estudos de UV-Vis, Fluorescência e Dicroísmo circular nas dependências da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Aos meus pais, Antônio Carlos de Barros e Creuza Santos de Barros, pelo incentivo, paciência, apoio, amizade e amor.

Aos meus irmãos, Leandro Santos de Barros e Lenize Santos de Barros, pela amizade.

Às minhas sobrinhas, Larissa de Barros e Letícia de Barros, presente de Deus na minha vida.

Ao pastor da igreja que congrego Jorge Luiz, pelos aconselhamentos, que me faz refletir e buscar um cristianismo pautado na Graça de Deus.

A todos os professores da Escola Bíblica Dominical, seus ensinamentos têm feito às escamas dos meus olhos caírem, pois a compreensão da palavra de Deus esta mais nítida.

A todos os membros da igreja Pentecostal Shekinah, minha família em Cristo, por fazer parte da minha vida.

Aos companheiros do grupo de Louvor.

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

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

A todos os amigos, não nomeados, mas que torcem por mim.

## RESUMO

A interação entre ASB e as chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) em solução tamponada (PBS, pH = 7,4) foi estudada por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência, dicroísmo circular (DC). Os resultados dos estudos obtidos para as constantes de supressão  $k_q$  ( $\cong 10^{12}$  a  $10^{13}$  L/mol.s) e os valores calculados pela teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster ( $r \cong 2$  a  $4$  nm) menores que  $7$  nm, indicam a ocorrência de uma forte interação chalconas-ASB que independe da temperatura, sugerindo nesse caso um mecanismo estático para o processo de supressão.

O deslocamento batocrômico, observado tanto nos estudos de UV-Vis, quanto nos experimentos de supressão de fluorescência para a interação chalcona-ASB, indicam que o cromóforo da ASB está em um ambiente menos hidrofóbico (mais hidrofílico) em relação àquele quando para ASB livre. Os valores de  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$  positivos, em todos os casos, exceto para a CH ( $\Delta H^0$  negativo), demonstrou que o processo de interação das chalconas com a ASB foi endotérmico, e que o tipo de interação é hidrofóbico. No caso em especial para a chalcona (CH), em que o valor de  $\Delta H^0$  é ligeiramente negativo, e demonstra que a interação entre a ASB e a chalcona (CH) tem um maior caráter hidrofílico. Neste caso, deve estar operando também interações eletrostáticas, tipo ligação de hidrogênio. Os valores de  $\Delta G^0$  negativos ( $\Delta G^0 \cong -28$  a  $-21$  kJ/mol) demonstraram a espontaneidade de ligação das chalconas com a ASB. Consequentemente, a principal interação é o contato hidrofóbico, mas a interação eletrostática também não pode ser excluída.

A análise quanto ao número e a posição dos átomos de flúor como substituintes sobre o anel (A) da chalcona apresenta uma melhor correlação com a quantidade de átomos presentes. Um aumento no grau de substituição indica um maior caráter hidrofóbico para a complexação. Isto pode ser confirmado por altos valores tanto de  $\Delta H^0$  e de  $\Delta S^0$  para os compostos mais substituídos.

No dicroísmo circular foi verificada uma diminuição do % de  $\alpha$ -hélice da ASB em  $208$  nm e  $222$  nm, devido ao aumento de concentração das chalconas. Esses efeitos podem ser atribuídos à formação de um complexo chalconas/ASB que pode estar induzindo variações conformacionais na ASB.

**Palavras-chave:** Espectroscopia. Chalconas. Albumina sérica bovina (ASB).

## ABSTRACT

The interaction between BSA and chalcones (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F, CH2356F) in buffer solutions (PBS, pH = 7.4) was studied by UV/Vis and fluorescence spectroscopy and circular dichroism. The obtained results to quencher constants ( $K_q$ ) ( $k_q \cong 10^{12}$  a  $10^{13}$  L/mol.s) and calculated by Förster theory no radioactive energy transference ( $r \approx 2$  a  $4$  nm), slower than  $7.0\text{nm}$ , demonstrate the occurrence of a strong interaction between chalcone-BSA that is temperature independent suggesting that if a static mechanism for the suppression process.

The displacement bathochromic, observed in both studies, UV-Vis and fluorescence quenching experiments for the interaction chalcone-BSA, indicate that the chromophore in the BSA is in a less hydrophobic ambient (more hydrophilic) compared to that free to BSA.

The positive values to  $\Delta H^0$  and  $\Delta S^0$  in all cases, unless to CH ( $\Delta H^0$  negative) showed that the interaction process chalcone-BSA is endothermic and hydrophobic. To CH, with  $\Delta H^0$  slightly negative is indicated, possibility, one character more hydrophilic to interaction. In this case, must be operated too electrostatic interactions as hydrogen bonds. The negative values to  $\Delta G^0$  ( $\approx -28$  to  $-21$   $\text{Kj.mol}^{-1}$ ) demonstrate a spontaneous interactions protein-compounds. Concluding, the principal interaction is the hydrophobic contact, but the electrostatic influence must be considered.

The analysis about the number and positions of the fluorinated atoms as substituting on (A) ring of the chalcone, the best correlation was with the quantitative of atoms presents. An increase of the substitution grade is indicated one better hydrophobic character to the formed complex. It can be confirmed by high values obtained of  $\Delta H^0$  and  $\Delta S^0$  by compounds with more substitutions.

In the circular dichroism was observed a diminution on the percentage of  $\alpha$ -helix conformation of the protein between  $208$  and  $222\text{nm}$  with increase of chalcone concentration. These effects can be attributed to the complex formation protein-compound, that induce conformations changes on BSA.

**Key-word:** Spectroscopy, Bovine Serum Albumin; Chalcone.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos estudados neste trabalho. 2
- Tabela 2.** Temperatura utilizada na absorção de UV-VIS de ASB na presença da chalcona (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F). 24
- Tabela 3.** Concentração final das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), após a adição de alíquotas de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, em 3 mL da solução de ASB  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, para  $T = 298$  K. 24
- Tabela 4.** Temperaturas utilizadas na espectroscopia de emissão de fluorescência de ASB na presença da chalcona (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F). 24
- Tabela 5.** Concentração final das chalconas (CH, CH3F, CH23F, e CH2356F), após a adição de alíquotas de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L diluída na proporção (1:3), em 3 mL da solução de ASB  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, para  $T = 288$  K,  $293$  K e  $298$  K. 25
- Tabela 6.** Concentração final das chalconas (CH4F, CH25F e CH35F), após a adição de alíquotas de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L diluída na proporção (1:3), em 3 mL da solução de ASB  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, para  $T = 288$  K,  $293$  K e  $298$  K. 25
- Tabela 7.** Temperaturas utilizadas na espectroscopia de dicroísmo circular de ASB na presença da chalcona (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F). 25
- Tabela 8.** Concentração da chalcona (CH) e seus derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) após a adição de alíquotas de uma solução das CHs ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), em 3 mL da solução de ASB ( $1,00 \times 10^{-6}$  mol/L), para  $T=288$  K,  $293$  K e  $298$  K. 26
- Tabela 9.** Valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) em diferentes temperaturas ( $288$  K,  $293$  K e  $298$  K). 33
- Tabela 10.** Valores de  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) em diferentes temperaturas ( $288$  K,  $293$  K e  $298$  K). 34
- Tabela 11.** Valores de  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta G^0$  (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F). 36
- Tabela 12.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados pela supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para as chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F). 36
- Tabela 13.** Valores de número e ordem de ligação ( $n$  e  $kb$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F). 39
- Tabela 14.** Valores de  $J$ ,  $R_0$ ,  $E$  e  $r$  calculados para a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K,  $293$  K e  $298$  K) e o espectro de absorção UV-Vis das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F)  $C_{ASB} = C_{CHs} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 44
- Tabela 15.** %  $\alpha$ -Hélice calculado em  $208$  nm e em  $222$  nm para ASB ( $pH = 7,4$ ) em chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F),  $T = 288$  K,  $293$  K e  $298$  K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CHs,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CHs} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$  e  $32,30$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L. 48
- Tabela 16.** MRE calculado em  $208$ nm e em  $222$  nm para ASB ( $pH = 7,4$ ) em chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F),  $T = 288$  K,  $293$  K e  $298$  K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CHs,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CHs} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$  e  $32,30$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L. 99

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.	8
<b>Figura 2.</b> Estrutura do tipo $\alpha$ -hélice.	9
<b>Figura 3.</b> Estrutura do tipo folha- $\beta$ .	9
<b>Figura 4.</b> Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.	10
<b>Figura 5.</b> Estrutura da albumina.	10
<b>Figura 6.</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)].	13
<b>Figura 7.</b> Estrutura da albumina sérica bovina (ASB) determinada por analogia com estrutura da albumina sérica humana (ASH) do PDB e seus domínios e subdomínios [Ribeiro (2010)].	13
<b>Figura 8.</b> Esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular.	16
<b>Figura 9.</b> Esquema da luz elipticamente polarizada gerada por dicroísmo circular. E é a magnitude dos vetores elétricos da luz circularizada para a direita e para a esquerda, a é o eixo maior enquanto que b é o eixo menor [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].	18
<b>Figura 10.</b> Espectros de absorção no UV-Vis de água milli-Q (AD), solução tampão de PBS (pH = 7,4) e solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.	27
<b>Figura 11.</b> Estrutura de fenilalanina, tirosina e triptofano [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].	28
<b>Figura 12.</b> Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{CH} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; e 2,70$ ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L.	28
<b>Figura 13.</b> Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) da solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, a T = 288 K, 293 K, 298 K.	29
<b>Figura 14.</b> Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) de água milli-Q (AD), solução tampão de PBS (pH = 7,4) e solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.	30
<b>Figura 15.</b> Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{CH} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67$ e ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a T = 298 K.	30
<b>Figura 16.</b> Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) pela chalcona (CH).	32
<b>Figura 17.</b> Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) pela chalcona (CH).	34
<b>Figura 18.</b> Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) pela chalcona (CH).	35
<b>Figura 19.</b> Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$ nm) pela chalcona (CH).	39
<b>Figura 20.</b> Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 288 K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH). $C_{ASB} = C_{CH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.	42
<b>Figura 21.</b> Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 293 K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH). $C_{ASB} = C_{CH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.	42

- Figura 22.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH).  $C_{ASB} = C_{CH} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 43
- Figura 23.** Espectros de dicroísmo circular de ASB (pH = 7,4),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L, a  $T = 288$  K, 293 K e 298 K. 45
- Figura 24.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K. 46
- Figura 25.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K. 46
- Figura 26.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 47
- Figura 27.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH3F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36;$  e  $2,70$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L. 59
- Figura 28.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH3F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67$  e ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 59
- Figura 29.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH3F). 60
- Figura 30.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH3F). 60
- Figura 31.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH3F). 61
- Figura 32.** Gráfico de  $\text{Log}(F_0-F)/F$  versus  $\text{log}[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH3F). 61
- Figura 33.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH3F).  $C_{ASB} = C_{CH3F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 62
- Figura 34.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH3F).  $C_{ASB} = C_{CH3F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 62
- Figura 35.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH3F).  $C_{ASB} = C_{CH3F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 63
- Figura 36.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH3F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH3F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K. 63
- Figura 37.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH3F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH3F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K. 64
- Figura 38.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH3F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH3F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 64
- Figura 39.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH4F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36$  e  $2,70$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L. 65

- Figura 40.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH4F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0$ ; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38 e 3,84 ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 65
- Figura 41.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F). 66
- Figura 42.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F). 66
- Figura 43** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F). 67
- Figura 44.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F). 67
- Figura 45.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH4F).  $C_{ASB} = C_{CH4F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 68
- Figura 46.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH4F).  $C_{ASB} = C_{CH4F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 68
- Figura 47.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH4F).  $C_{ASB} = C_{CH4F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 69
- Figura 48.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB: CH4F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K. 69
- Figura 49.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH4F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K. 70
- Figura 50.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB: CH4F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 70
- Figura 51.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH35F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0$ ; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36 e 2,70 ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L. 71
- Figura 52.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH35F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0$ ; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38 e 3,84 ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 71
- Figura 53.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F). 72
- Figura 54.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F). 72
- Figura 55.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F). 73
- Figura 56.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F). 73
- Figura 57.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH35F)  $C_{ASB} = C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 74
- Figura 58.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH35F)  $C_{ASB} = C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 74

- Figura 59.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH35F)  $C_{ASB} = C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 75
- Figura 60.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH35F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K. 75
- Figura 61.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH35F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K. 76
- Figura 62.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH35F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 76
- Figura 63.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH23F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0$ ; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02 e 2,36 ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L. 77
- Figura 64.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH23F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0$ ; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67 e ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 77
- Figura 65.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F). 78
- Figura 66.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F). 78
- Figura 67.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F). 79
- Figura 68.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F). 79
- Figura 69.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH23F)  $C_{ASB} = C_{CH23F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 80
- Figura 70.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH23F)  $C_{ASB} = C_{CH23F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 80
- Figura 71.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH23F)  $C_{ASB} = C_{CH23F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 81
- Figura 72.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH23F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH23F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K. 81
- Figura 73.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH23F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH23F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K. 82
- Figura 74.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH23F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH23F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0$ ; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 82
- Figura 75.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH25F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0$ ; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36 e 2,70 ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L. 83

- Figura 76.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH25F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38$  e  $3,84$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 83
- Figura 77.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F). 84
- Figura 78.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F). 84
- Figura 79.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F). 85
- Figura 80.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F). 85
- Figura 81.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH25F)  $C_{ASB} = C_{CH25F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 86
- Figura 82.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH25F)  $C_{ASB} = C_{CH25F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 86
- Figura 83.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH25F)  $C_{ASB} = C_{CH25F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 87
- Figura 84.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH25F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH25F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K. 87
- Figura 85.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH25F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH25F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K. 88
- Figura 86.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH25F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH25F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 88
- Figura 87.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH2356F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36$  e  $2,70$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L. 89
- Figura 88.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona CH2356F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; e 0,60$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K. 89
- Figura 89.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F). 90
- Figura 90.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F). 90
- Figura 91.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F). 91
- Figura 92.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F). 91
- Figura 93.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH2356F)  $C_{ASB} = C_{CH2356F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 92
- Figura 94.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH2356F)  $C_{ASB} = C_{CH2356F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 92

- Figura 95.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH2356F)  $C_{ASB} = C_{CH2356F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 93
- Figura 96.** Espectros de dicroísmo circular pra ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH2356F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH2356F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (x 10^{-6})$  mol/L, a  $T = 288$  K. 93
- Figura 97.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH2356F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH2356F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (x 10^{-6})$  mol/L, a  $T = 293$  K. 94
- Figura 98.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH2356F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH2356F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (x 10^{-6})$  mol/L, a  $T = 298$  K. 94
- Figura 99.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH) em etanol (ETOH)  $C_{CH} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 95
- Figura 100.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH3F) em etanol (ETOH)  $C_{CH3F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 95
- Figura 101.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH4F) em etanol (ETOH)  $C_{CH4F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 96
- Figura 102.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH35F) em etanol (ETOH)  $C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 96
- Figura 103.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH23F) em etanol (ETOH)  $C_{CH23F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 97
- Figura 104.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH25F) em etanol (ETOH)  $C_{CH25F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 97
- Figura 105.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH2356F) em etanol (ETOH)  $C_{CH2356F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L. 98

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada.	17
<b>Equação 2.</b> Equação para determinar o coeficiente de extinção molar [Pace <i>et al.</i> (1995)].	17
<b>Equação 3.</b> Equação para determinar o dicroísmo circular molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e <a href="http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf">www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf</a> ].	18
<b>Equação 4.</b> Equação para determinar a elipticidade [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e <a href="http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf">www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf</a> ].	18
<b>Equação 5.</b> Equação para determinar a elipticidade molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e <a href="http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf">www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf</a> ].	19
<b>Equação 6.</b> Equação para a determinação de $K_{SV}$ , e consequentemente, $k_q$ .	32
<b>Equação 7.</b> Equação para determinar os valores de $K_a$ .	33
<b>Equação 8.</b> Equações para a obtenção dos valores de $\Delta H^0$ , $\Delta S^0$ e $\Delta G^0$ .	35
<b>Equação 9.</b> Equação para determinar dos valores de $K_b$ e $n$ .	38
<b>Equação 10.</b> Equação para o cálculo da integral de sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência de ASB e os espectros de absorção UV/visível [Shi <i>et al.</i> (2007)] das chalconas.	40
<b>Equação 11.</b> Equação para o cálculo da distância crítica entre a ASB e as chalconas, quando sua eficiência de transferência é 50% [Epps <i>et al.</i> (1998) e Yue <i>et al.</i> (2008)].	41
<b>Equação 12.</b> Equações para o cálculo da distância entre o triptofano da ASB e as chalcona [Sklar <i>et al.</i> (1977) e Yue <i>et al.</i> (2008)].	41
<b>Equação 13.</b> Equação para calcular os valores de MRE [Khan <i>et al.</i> (2002)].	47
<b>Equação 14.</b> Equações para calcular os valores de % de $\alpha$ -hélice da ASB.	48

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AD	Água milli-Q
ASB	Albumina sérica bovina
ASH	Albumina sérica humana
BSA	Bovine serum albumin
HSA	Human serum albumin
CH	Chalcona
CH3F	3-Fluorchalcona
CH4F	4-Fluorchalcona
CH35F	3,5-Difluorchalcona
CH23F	2,3-Difluorchalcona
CH25F	2,5-Difluorchalcona
CH2356F	2,3,5,6-Tetrafluorchalcona
DC	Dicroísmo circular
ETOH	Etanol
MRE	Elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual
PBS	Phosphate buffer solution
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta/visível

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
<b>2.1 Chalconas</b>	3
2.1.1 O Efeito do Substituente	5
<b>2.2 Albuminas</b>	7
2.2.1 Albumina sérica bovina (ASB) e albumina sérica humana (ASH)	11
2.2.2 Interação entre compostos bioativos e albuminas (ASB e ASH)	14
<b>2.3 Descrição da Técnica de Dicroísmo circular (DC)</b>	16
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	20
<b>3.1 Materiais</b>	20
3.1.1 Aparelhos	20
3.1.2 Vidraria	20
3.1.3 Reagentes	20
<b>3.2 Métodos</b>	21
3.2.1 Sínteses	21
3.2.2 Soluções	21
3.2.3 Estudos espectroscópicos na região do ultravioleta/visível (UV-Vis)	22
3.2.4 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência	22
3.2.5 Estudos espectroscópicos de dicroísmo circular	23
3.2.6 Condições de análises	24
3.2.6.1 Ultravioleta/Visível	24
3.2.6.2 Fluorescência	24
3.2.6.3 Dicroísmo	25
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	27
<b>4.1 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis)</b>	27
<b>4.2 Espectroscopia de fluorescência</b>	29
<b>4.3 Cálculo do raio de Förster</b>	40
<b>4.4 Dicroísmo circular (DC)</b>	45
<b>5 CONCLUSÕES</b>	50
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	52
<b>7 ANEXO</b>	57

## 1 INTRODUÇÃO

Benzilidenoacetofenonas (1,3-difenilpropen-3-ona) são conhecidas como chalconas, produtos naturais encontrados em plantas das espécies *Pyracantha coccinea* [Bilia *et al.* (1994)], *Paratocarpus Venenosa zoll* [Hano *et al.* (1995)], e *Bidens pilosa* [Sashida *et al.* (1991)], entre outras. A importância desta classe de compostos se justifica pela grande diversidade de processos na qual ela toma parte. Na natureza atuam como precursores na biossíntese de flavonas [Chawla *et al.* (1984), Shih *et al.* (2008)] flavanonas [Matsushima *et al.* (1980), Sean *et al.* (2010)] flavonóides [Chawla *et al.* (1978), Wang *et al.* (2010)] e cromononas [Miquel *et al.* (1964), Bhandari *et al.* (1992)] que desempenham atividade biológica essencial na proteção de plantas contra doenças e parasitas. Na indústria possuem aplicações tais como fotoestabilizadores de polímeros [Gunder *et al.* (1968), Budde *et al.* (1992) e Trager *et al.* (2008)], na utilização geral como filtro solar em loções bronzeadoras [Fischer *et al.* (1970), Lee *et al.* (2008)], em fotografia a cores [Schellenberg *et al.* (1961)], em resinas sensíveis à irradiação [Kawaki *et al.* (1989) e Rezaie *et al.* (2011)], como catalisadores para fotopolimerização [Okuma *et al.* (1989) e Schuetz *et al.* (2005)], padrão cromatográfico para sistemas de eluentes e colunas em cromatografia líquida de alta eficiência [Walczak *et al.* (1991), Azzaoui *et al.* (1995) e Regos *et al.* (2011)], em células coletoras de energia solar [Chudgar *et al.* (1989) e Warpeha *et al.* (2008)] e conversor de frequências de luz para a faixa de cor verde e azul. [Karaki-Doy *et al.* (1995)].

Compostos derivados de chalconas apresentam grande valor farmacêutico como antibióticos [Bowden *et al.* (1990) e Lee *et al.* (2010)], antimitóticos e citotóxicos [Alias *et al.* (1995) e Kamal *et al.* (2010)], antitumorais [Iwata *et al.* (1995), Kamal *et al.* (2010)] e antimalárico [Li *et al.* (1995)], e ainda potencial de modulação de resistência a multidrogas [Bois *et al.* (1998)].

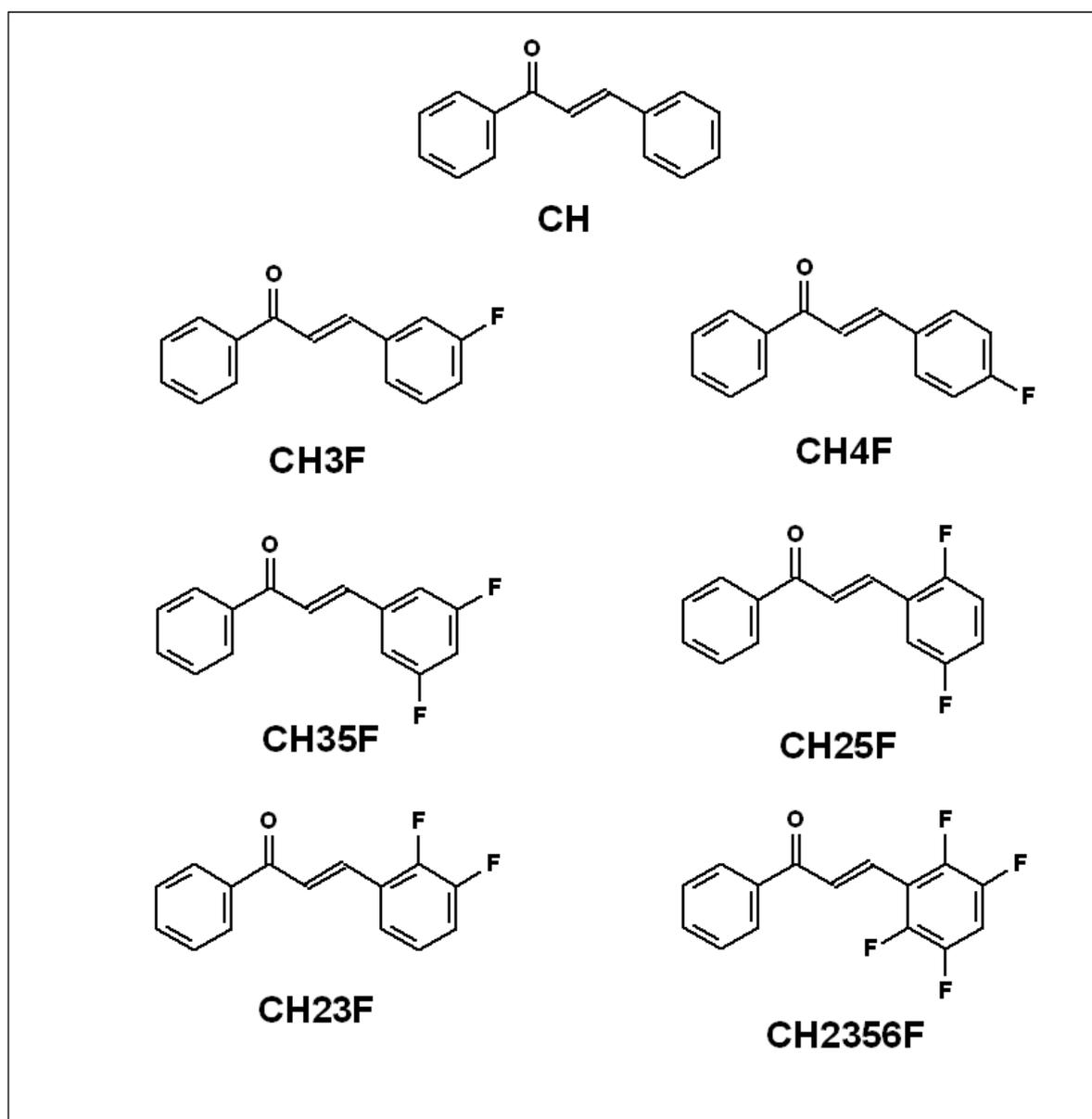
As interações de albumina sérica humana (ASH) e de albumina sérica bovina (ASB) vêm sendo estudadas na literatura com várias moléculas (quinonas, cumarinas, psoralenos, flavonóides, ácidos, etc.) por diversas técnicas. As técnicas de análise mais utilizadas são: espectroscopia de fluorescência [Xu *et 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)], 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)].

A interação de ASH com diversos flavonóides tem sido extensamente estudada, podendo-se citar como exemplo: alpinetina [He *et al.* (2005)], camferol [Kanakakis *et al.* (2006)], delfinidina [Kanakakis *et al.* (2006)], icariína [Zhang *et al.* (2008)], isoflavonas (genisteína e daldzeína) [Mahesha *et al.* (2006)], hesperetina [Xie *et al.* (2005)], 3-hidroxi-flavona [Sytnik e Litvinyuk (1996)], 7-hidroxi-flavona [Banerjee *et al.* (2008)], morina [Xie *et al.* (2006)], nevadensina [Li *et al.* (2007)], nobiletina [Yue *et al.* (2008)], puerarina [Li *et al.* (2008)], quercetina [Sengupta (2002), Zsila *et al.* (2003) e Kanakakis *et al.* (2006)] e rutina [Pastukhov *et al.* (2007)].

Na literatura, existe somente um relato de estudo da interação entre ASB e uma chalcona, empregando a molécula licochalcona [Monti *et al.* (2009)], sendo assim decidiu-se estudar a interação da chalcona (CH) e de seus derivados fluorados apresentando diferentes graus de substituição de átomos de hidrogênio por átomos de flúor sobre o anel A (Tabela 1) com albumina sérica bovina (ASB) (*bovine serum albumin* (BSA)), empregando-se diversas técnicas de análise, espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência e dicroísmo circular (DC) de modo a obter informações referentes a

parâmetros termodinâmicos  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$ , da constante de supressão de Stern-Volmer (k<sub>sv</sub>), do raio de Förster (R), da constante de ligação (K<sub>b</sub>) e do número de sítios de ligação (n), bem como os valores de % elipticidade relativo a albumina sérica bovina.

**Tabela 1.** Estruturas químicas e a simbologia usada na representação dos compostos estudados neste trabalho.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Chalconas

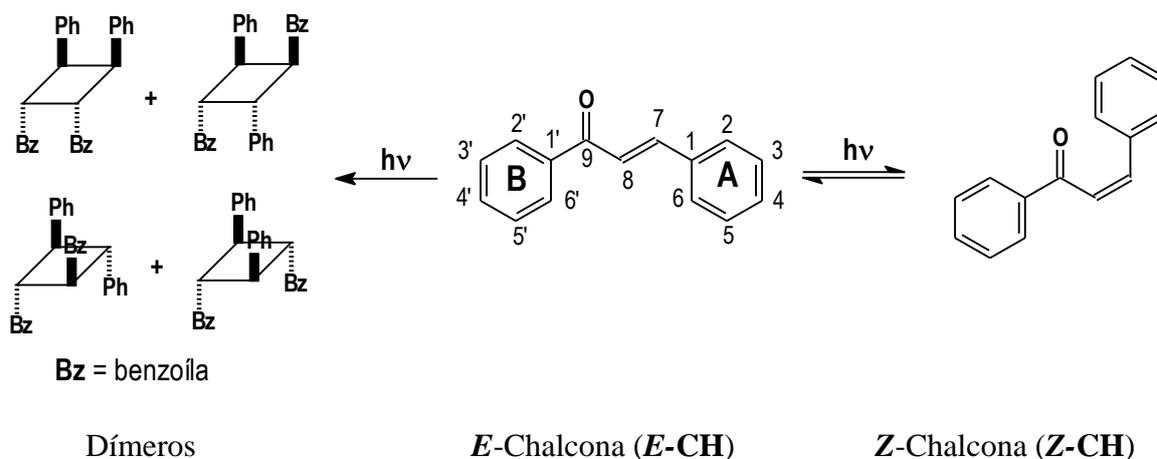
Quimicamente, as chalconas podem ser definidas como cetonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas onde tanto a carbonila quanto a porção olefínica estão ligadas à grupamentos aromáticos. Apresentando um amplo espectro de atividade biológica, as chalconas são alvo de vários estudos de isolamento, identificação e investigação de propriedades biológicas. As chalconas têm apresentado atividade antinociceptiva e antipirética [Satyanarayana *et al.* (1994)].

Chalconas fluoradas também produzem inibição da polimerização da tubulina tornando assim um antimitótico muito eficiente como consequência comprometem a formação de tumores [Lawrence *et al.* (2006)]. Muito evidente também é o alto poder leishmanicida de chalconas fluoradas [Boeck *et al.* (2006)]. São inibidores da produção de óxido nítrico que tem um metabolismo cálcio-dependente [Rojas *et al.* (2002)] consequentemente chalconas fluoradas agem com antiartrítico [Rojas, *et al.* (2003)].

As chalconas são compostos pertencentes a classe dos flavonóides que tem atraído grandes interesses devido a apresentarem grande atividades biológicas. A pesquisa de novos fármacos tendo flavonóides como princípio ativo vem crescendo nos últimos anos, uma vez que estes apresentam uma ampla variedade de propriedades farmacológicas que atuam sobre sistemas biológicos, tais como: a capacidade antioxidativa, atividade antiinflamatória e de efeito vasodilatador; ação antialérgica; atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica; antiplaquetária, bem como ações antimicrobianas e antivirais. Sabe-se também que os flavonóides podem inibir vários estágios dos processos que estão diretamente relacionados com o início da arterosclerose, como a ativação de leucócitos, adesão, agregação e secreção de plaquetas, além de atividades hipolipidêmicas e aumento da atividade de receptores de LDL (lipoproteína de baixa densidade - colesterol ruim), assim como, de outras doenças.[Ribeiro (2010)]

Sob o ponto de vista da sua fotoquímica, flavonóides estão envolvidos em reações de fotossensibilização e de transferência de energia em plantas. Estudos fotoquímicos em flavonas mostraram que a dimerização é a sua principal fotorreação, a qual ocorre via estado excitado triplete, apresentando um rendimento quântico de cruzamento entre sistemas próximo da unidade, o qual é específico para flavonas. [Cesarin-Sobrinho *et al.* (2002)].

Nos compostos  $\alpha,\beta$ -insaturados, tendo as chalconas como principal representante, o processo de fotoisomerização *Z/E* ou *E/Z* desempenha um papel relativamente importante na etapa de dissipação da energia do estado excitado. Estudos dos processos de fotoisomerização ou fotodimerização para chalcona (**CH**) e derivados em soluções homogêneas, no estado sólido, assim como em micelas ou cristais líquidos, têm sido publicados na literatura e estão representados pelo esquema 1.1 [Chapman *et al.* (1967), de Mayo *et al.* (1971), Baldwin *et al.* (1987) e Cesarin-Sobrinho *et al.* (2002)].



Esquema 1.1

A fotofísica e a fotoquímica de  $\alpha,\beta$ -enonas são muito sensíveis à sua estrutura (acíclica ou cíclica), aos substituintes, à polaridade e à viscosidade do solvente e também ao estado de agregação. De um modo geral, as  $\alpha,\beta$ -enonas acíclicas apresentam baixos rendimentos quânticos de fluorescência ou de fosforescência, apresentando normalmente decaimento do estado excitado através de processos não radiativos como isomerização e dimerização [2+2], que ocorrem preferencialmente por mecanismos envolvendo um estado ( $\pi-\pi^*$ ) [Sashida *et al.* (1991)], devido ao seu elevado rendimento de cruzamento entre sistemas (CES), possível neste caso como resultado de uma rotação em torno da ligação C=C, [Bonneau *et al.* (1980), Schuster *et al.* (1991) e Yamauchi *et al.* (1988)].

Nas chalconas ambos os grupos fenila interagem com o grupo carboníla através das ligações  $\sigma$  e  $\pi$ . Tais interações favorecem a deslocalização dos elétrons  $\pi$ , e o grupo carbonílico perde parte de suas propriedades características, fazendo com que as chalconas sejam moléculas com um considerável momento de dipolo (2,9 D, em benzeno). O baixo rendimento quântico de fluorescência observado a partir desse estado ( $n-\pi^*$ ) [Bilia *et al.* (1994)], é devido a uma conversão interna rápida para  $S_0$  ou a um cruzamento entre sistemas eficiente para os estados ( $n-\pi^*$ ) ou, ( $\pi-\pi^*$ ) [Sashida *et al.* (1991)] que são muito próximos em energia ao estado excitado  $S_1$  [Sashida *et al.* (1991)]. Foi também sugerido que o estado ( $\pi-\pi^*$ ) fosse estabilizado pela rotação ao redor da ligação C=C. Assim, uma pequena rotação do ângulo  $\phi$  deste estado pode levar a um cruzamento com a superfície de potencial do estado ( $n-\pi^*$ ) [Sashida *et al.* (1991)], apresentando um mínimo de energia na geometria próxima a  $\phi=90^\circ$ . Próximo ao mínimo *twisted* ( $\pi-\pi^*$ ), o sistema pode cruzar com o estado  $S_0$ , criando um canal de cruzamento entre sistemas, levando à isomerização da ligação dupla [Sashida *et al.* (1991)]. Além do mais, esse modelo proposto por Becker prevê um processo eficiente de fotoisomerização a partir de um estado, ( $\pi-\pi^*$ ) para a excitação acima de 300 nm, e a ausência de um processo de isomerização conformacional *s-cis/s-trans* no estado excitado  $T_1$  de energia mais baixa.

### 2.1.1 O Efeito do Substituinte.

É bem conhecido o fato de que substituintes retiradores de elétrons aumentam a fotorreatividade de cetonas aromáticas. Por exemplo, 4-carbometoxibenzofenona é 50% mais reativa do que benzofenona frente à reação de abstração intermolecular de hidrogênio [Wagner *et al.* (1985)], enquanto que, a fotorreatividade de chalconas fluoradas no estado sólido levando a formação de produtos de fotocicloadição, é fortemente influenciada pela posição bem como pelo número de átomos de flúor presente como substituinte [Cesarin-Sobrinho *et al.* (2002)].

O aumento na fotorreatividade de cetonas aromáticas como uma conseqüência da substituição de átomos de hidrogênio por flúor foi claramente demonstrada por Scaiano e colaboradores [Boate *et al.* (1989)], no estudo da fotoquímica, em solução homogênea, de decafluorbenzofenona, pentafluorbenzofenona e pentafluoracetofenona. O estado triplete destas cetonas é muito mais reativo frente à reação de supressão envolvendo transferência de elétron e/ou de hidrogênio do que as cetonas correspondentes não fluoradas. No caso de 2-propanol, onde a reatividade pode ser totalmente acompanhada pela abstração de hidrogênio, decafluorbenzofenona é 35 vezes mais reativa do que benzofenona. Decafluorbenzofenona exibe uma correlação excelente entre constantes de velocidade de supressão envolvendo transferência de elétron e o potencial de oxidação do supressor. Uma vez que a mudança na polaridade do solvente acarreta somente um pequeno efeito sobre estas constantes de velocidade, este processo de supressão deve envolver uma transferência parcial de elétron [Boate *et al.* (1989)].

A grande diferença na constante de velocidade entre decafluorbenzofenona e benzofenona foi atribuída ao aumento no efeito indutivo devido às substituições por átomos de flúor, os quais aumentam o grau de polarização de carga do estado ( $n-\pi^*$ ) nas cetonas polifluoradas [Sashida *et al.* (1991)].

Foi observado um aumento da reatividade triplete frente à reação de fotorredução de alquilfenilcetonas com a substituição por átomos de flúor na posição  $\alpha$ , quando comparada com acetofenona [Wagner *et al.* (1986)]. Esse aumento da reatividade atinge um valor máximo com a substituição por dois átomos de flúor e, quando da presença de três átomos de flúor, ocorre uma mudança no estado excitado de menor energia que, de caráter ( $n-\pi^*$ ), passa para ( $\pi-\pi^*$ ), tornando assim a  $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoracetofenona não reativa frente à reação de abstração de hidrogênio [Sashida *et al.* (1991)].

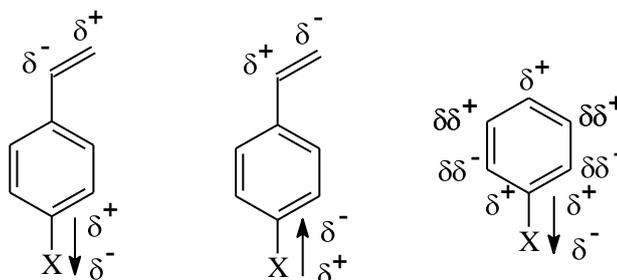
Estudos teóricos [Leska *et al.* (1973)], visando a identificação dos efeitos dos substituintes em chalconas apontam no sentido de que a densidade de carga sobre o oxigênio carbonílico aumenta com a introdução de substituintes doadores de elétrons e diminui com grupos retiradores, e que esses efeitos são mais fortes quando a substituição ocorre no anel **A** (Esquema 1.1). No caso do carbono 7 de chalcona ( $C_\beta$ ) verificou-se que este é pouco afetado pela presença de substituintes no anel **A** ou **B**. A densidade de carga sobre o carbono 9 ( $C=O$ ) depende de os substituintes estarem sobre o anel **A** ou **B**. Estando um substituinte no anel **A**, grupos doadores de elétrons aumentam a densidade eletrônica enquanto que grupos retiradores diminuem a sua densidade eletrônica. A situação oposta ocorre para substituintes presentes no anel **B**. No caso do carbono 1, substituintes doadores sobre o anel **A** diminuem a densidade de carga enquanto que grupos retiradores provocam um aumento, sendo que substituintes no anel **B** exercem efeitos opostos àqueles observados no caso do anel **A**.

Estudo da influência de substituintes polares sobre o deslocamento químico dos carbonos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de uma série de chalconas substituídas revelaram que os efeitos são transferidos de diferentes maneiras dependendo da posição do grupo substituinte [Solániová *et al.* (1976)]. Assim, em chalconas substituídas no anel cinamóico (anel **A**), os efeitos são maiores sobre o carbono 8 ( $C_\alpha$ ) do que sobre o carbono 7 ( $C_\beta$ ), enquanto que nas

chalconas contendo substituintes no anel benzóico (anel **B**) o efeito é oposto e o carbono 7 ( $C_\beta$ ) sofre maiores efeitos que o carbono 8 ( $C_\alpha$ ). Em ambos os casos a influência dos substituintes sobre o carbono carbonílico foi pequena. A densidade eletrônica  $\pi$  calculada também confirma que as mudanças na densidade de carga do carbono carbonílico são pouco influenciadas pelos substituintes. Acredita-se que, semelhante ao caso do estireno [Hamer *et al.* (1973)], as mudanças induzidas pelos substituintes na densidade de carga do grupo  $\text{CH}=\text{CH}-\text{C}=\text{O}$  são dominadas por mudanças na densidade de elétrons  $\pi$ , sendo que os resultados da correlação de Hammett confirmam essa hipótese. O fato de que uma boa correlação foi encontrada para  $C_8$ ,  $C_7$  e  $C_1$  para o caso de chalconas contendo substituintes no anel **A**, e nenhuma para chalconas substituídas no anel **B**, confirma a hipótese de que neste grupo de chalconas o efeito de ressonância é normalmente localizado no anel benzóico substituído.

Para obter informações sobre as contribuições de ressonância e o efeito indutivo sobre o deslocamento químico em chalconas, a equação de Swain-Lupton [Swain *et al.* (1968)], ( $\Delta\delta = \delta_0 + fF + rR$ , onde  $\Delta\delta$  é a variação de deslocamento químico,  $\delta_0$  é o deslocamento químico padrão,  $F$  e  $R$  são os parâmetros dos substituintes para os efeitos de campo e ressonância, respectivamente, e  $f$  e  $r$  são os coeficientes da equação) foi aplicada, tendo sido obtida uma boa correlação com os parâmetros  $F$  e  $R$  não somente utilizando deslocamentos químicos, mas também com a densidade de carga  $\pi$  de  $C_8$ ,  $C_7$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_1'$ ,  $C_2'$  e  $C_4'$  para substituintes no anel **A**. Para substituintes no anel **B** foram obtidos bons resultados para  $C_8$ ,  $C_7$ ,  $\text{C}=\text{O}$ ,  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$  e  $C_1'$ . Foi assumido que para a chalcona, assim como para estireno e fenilacetileno, três tipos de efeito de substituintes podem ser transmitidos através das ligações: o indutivo, o mesomérico e o efeito indutivo  $\pi$ . Para chalconas substituídas no anel **A** o efeito indutivo  $\pi$  contribui mais sobre o deslocamento químico de  $C_7$  e o de ressonância pode primariamente afetar a densidade de elétrons  $\pi$  sobre  $C_8$ . A situação oposta ocorre para chalconas substituídas em **B**, onde o efeito indutivo  $\pi$  é maior em  $C_8$  e o de ressonância em  $C_7$ . Assim, o aumento na dependência do efeito de campo e o decréscimo no efeito de ressonância para  $C_8$  confirmam a alta localização da interação por ressonância no grupo benzóico.

No caso do efeito indutivo  $\pi$  o dipolo do substituinte polariza o sistema  $\pi$  da cadeia lateral. O efeito é transmitido através do espaço, mas pode ser modificado pelas propriedades dielétricas da cavidade molecular intermediária, representado pelo grupo aromático. Por exemplo, no caso do estireno a densidade de carga  $\pi$  é aumentada sobre  $C_7$  e diminuída sobre  $C_8$ . Este é o efeito polar mais importante sobre os deslocamentos químicos em cadeias laterais de compostos insaturados [Craik *et al.* (1970)].



Também pode ser observado que, grupos fortemente retiradores de elétrons presentes como substituintes em derivados de chalconas, exercem grande influência sobre a posição do equilíbrio conformacional *s-cis/s-trans*, sendo encontradas mudanças na concentração do equilíbrio conformacional para chalcona e seu derivado pentafluorado no anel B (anel benzílico), que passou de 88,6% e 92,1 % na forma *s-cis* respectivamente para 67,6% e 83,4%

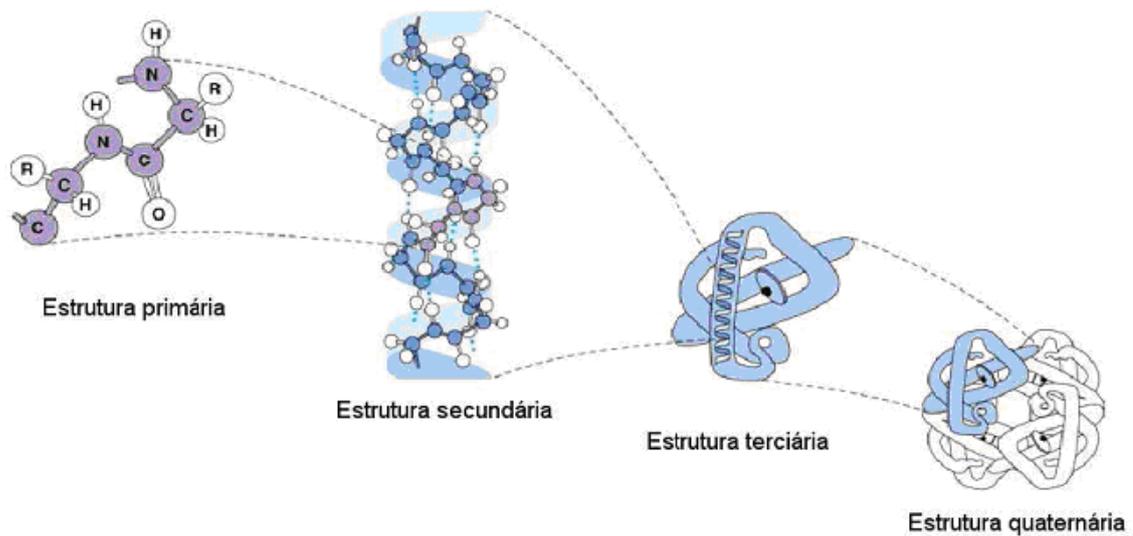
quando os derivados são as chalconas pentafluorada no anel A (anel cinamoílico) e a decafluorada substituída nos anéis A e B (anel cinaomílico e benzílico) respectivamente [Cesarin-Sobrinho *et al.* (2001)].

## 2.2 Albuminas

Em animais superiores, as proteínas são os compostos orgânicos mais abundantes, representando cerca de 50 % do peso seco dos tecidos. As proteínas são moléculas poliméricas de grande tamanho, pertencendo à categoria das macromoléculas, constituídas por um grande número de unidades monoméricas estruturais (os amino ácidos) que formam grandes cadeias. Devido a esse grande tamanho, quando são dispersas em um solvente adequado formam soluções coloidais, que possuem características especiais que as distinguem das soluções de moléculas pequenas. Por meio da hidrólise podemos quebrá-las em seqüências menores de amino ácidos, pois centenas ou milhares de amino ácidos podem participar na formação da grande molécula polimérica de uma proteína. As proteínas são formadas através de ligações peptídicas entre os diversos tipos de amino ácidos e podemos classificá-las em duas grandes 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 1) [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].



**Figura 1.** Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.

Estrutura primária (Figura 1): refere-se ao número e identidade dos amino ácidos que compõem a molécula e ao ordenamento ou seqüência dessas unidades na cadeia polipeptídica. A união peptídica somente permite a formação de estruturas lineares e, por isso, as cadeias não apresentam ramificações [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

Estrutura secundária (Figura 1): à medida que o comprimento das cadeias vai aumentando, e em função das condições físico-químicas do meio, a estrutura secundária é criada, representando a disposição espacial regular, repetitiva, que a cadeia polipeptídica pode adotar, geralmente mantida por ligações de hidrogênio. Sendo assim, pode-se ter: a)  $\alpha$ -hélice: as cadeias de amino ácidos têm vários centros polares e, devido a isto, a fibra enrola-se dando lugar a uma hélice que se estabiliza formando ligações intramoleculares com pontes de hidrogênio, (Figura 2); e b) folha- $\beta$ : as cadeias de peptídeos se unem formando filas paralelas que se estabilizam de maneira intermolecular mediante pontes de hidrogênio, (Figura 3) [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

Estrutura terciária (Figura 1): é a estrutura da maioria das proteínas globulares e aparece a partir das hélices, que voltam a enrolar-se. É uma estrutura tridimensional completa que se forma a partir das forças de atração ou repulsão eletrostática, das pontes de hidrogênio, das forças de van der Waals e das pontes dissulfeto existentes entre os resíduos de amino ácidos que formam as cadeias, (Figura 4) [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

Estrutura quaternária (Figura 1): são estruturas de caráter oligomérico, que são compostas por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária. Aplica-se somente a proteínas constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas e se refere à disposição espacial dessas cadeias e as ligações que se estabelecem entre elas - ligações hidrogênio, atrações eletrostáticas, interações hidrofóbicas, pontes dissulfeto entre cisteínas de cadeias diferentes. Um exemplo deste tipo de estrutura é a hemoglobina, que é composta por quatro subunidades semelhantes à mioglobina [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

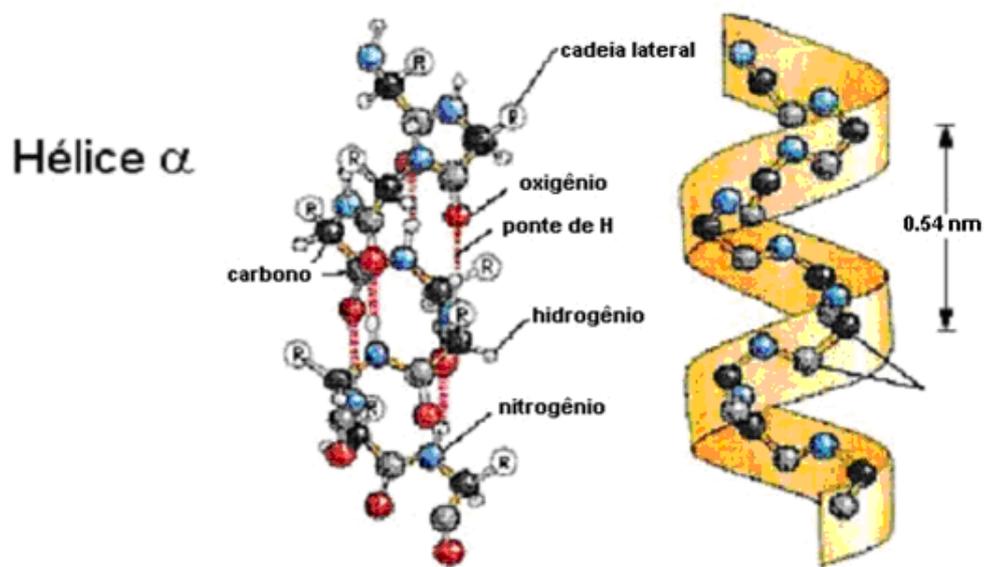


Figura 2. Estrutura do tipo  $\alpha$ -hélice.

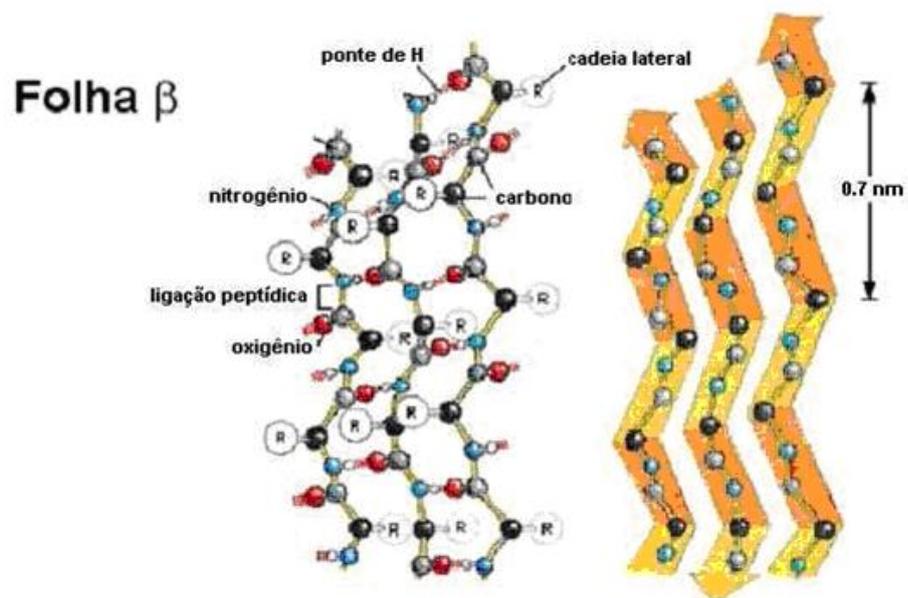
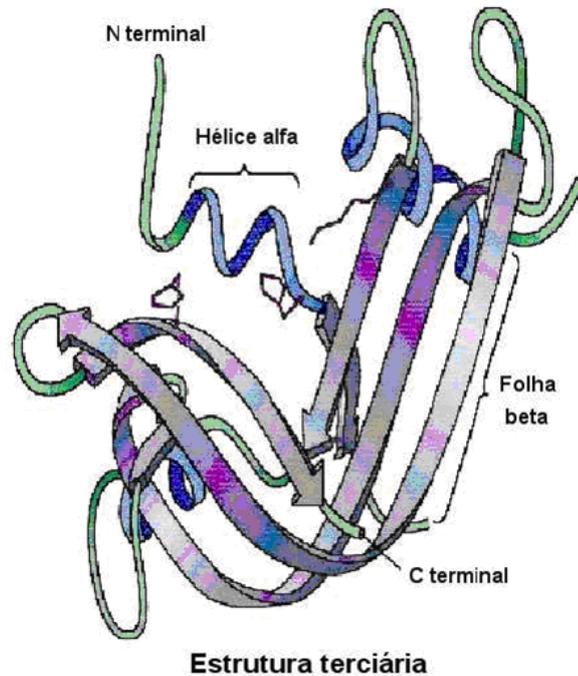
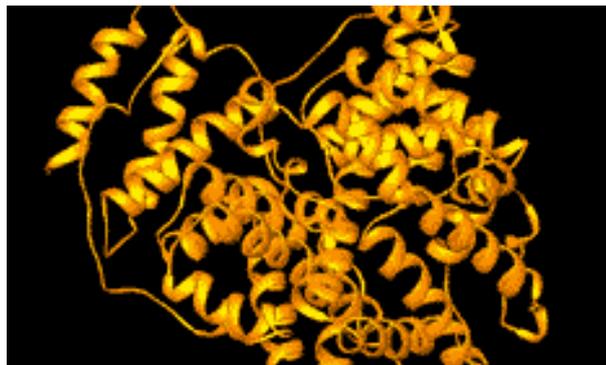


Figura 3. Estrutura do tipo folha- $\beta$ .



**Figura 4.** Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.

A albumina (Figura 5) é uma proteína de alto valor biológico, 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, e é cerca de 50% das proteínas plasmáticas. O resto de proteínas presentes no plasma chama-se globulinas. A albumina é fundamental para a manutenção da pressão osmótica, necessária para a distribuição correta dos líquidos corporais entre o compartimento intravascular e o extravascular, localizado entre os tecidos.



**Figura 5.** Estrutura da albumina.

Existem resultados contraditórios e muitas discussões sobre a determinação da estrutura da albumina, porém com base em experimentos de hidrodinâmica e espalhamento de raios-X, a albumina sérica aproxima-se de um elipsóide de 140 x 40 Angstroms com três domínios homólogos. Albuminas são caracterizadas por conterem um número pequeno de resíduos de triptofano e metionina e um alto número de cistina e amino ácidos carregados, ácidos aspártico e glutâmico, lisina e arginina. O conteúdo de glicina e isoleucina é menor que a média encontrada em proteínas [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

As albuminas, dependendo de sua origem, podem ser classificadas em: soro-albumina ou albumina sérica (é a albumina do soro sanguíneo), ovoalbumina (é a albumina da clara do ovo, proteína majoritária do ovo, que possui propriedades antigênicas resistentes à desnaturação térmica e é termo-estável) e lactoalbumina (é a albumina do leite).

### 2.2.1 Albumina sérica bovina (ASB) e albumina sérica humana (ASH)

A albumina sérica é a proteína mais predominante no plasma sanguíneo, e por isso, é uma das proteínas mais estudadas [Zsila *et al.* (2003) e Takehara *et al.* (2009)]. Muitos pesquisadores têm estudado a estrutura e as propriedades da albumina sérica e suas interações com outras proteínas com o intuito de compreender todas as suas funções no organismo.

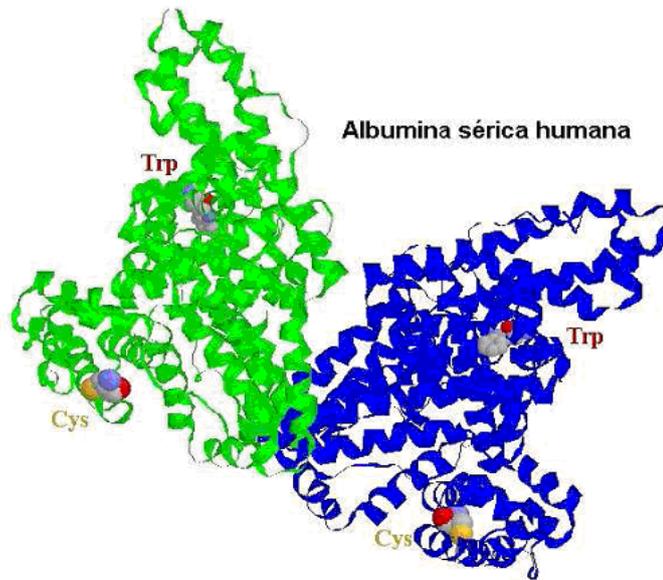
Albuminas séricas (ASs (em português) ou SAs (em inglês, serum albumin)) são proteínas de maior solubilidade, constituintes do sistema circulatório e têm muitas funções fisiológicas, incluindo a manutenção da pressão osmótica [He *et al.* (1992), Sugio *et al.* (1999), Cui *et al.* (2008) e Yue *et al.* (2008)] e controle do pH [Sugio *et al.* (1999) e Tang *et al.* (2006)]. além da sua ação como transportadoras, distribuidoras e metabolizadoras de inúmeros ligantes endógenos e exógenos (por exemplo, fármacos, 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.) resultando no aumento de solubilidade de compostos bioativos no plasma, diminuindo a sua toxicidade, e/ou protegendo contra a oxidação da ligação do ligante (composto bioativo) [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 ligantes (compostos bioativos) e ASs é um fator determinante e importante para a farmacodinâmica e farmacocinética da droga, dependendo da concentração de droga administrada, podendo afetar a distribuição e a eliminação da droga [Petitpas *et al.* (2001), He *et al.* (2005), Cui *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008) e Stan *et al.* (2009)].

A albumina sérica humana (ASH) (Figura 6) é um polipeptídeo simples e não-glicosilado que organiza a estrutura da proteína em forma de coração [Falini *et al.* (2006) e Li *et al.* (2009)] com aproximadamente 67% de  $\alpha$ -hélice [He *et al.* (1992), He *et al.* (2006) e Stan *et al.* (2009)] e pode se ligar e transportar compostos bioativos pouco solúveis em água (hidrofóbicos) [Li *et al.* (2008) e Takehara *et al.* (2009)]. A capacidade das proteínas se ligarem à compostos aromáticos e heterocíclicos, depende amplamente da existência de duas regiões de ligação majoritárias, conhecidas como sítios I e II de Sudlow [Sudlow *et al.* (1975), Petitpas *et al.* (2001) e Stan *et al.* (2009)]. A estrutura da ASH apresenta três domínios  $\alpha$ -hélice semelhantes (I, II e III) [Sugio *et al.* (1999), Petitpas *et al.* (2001), Falini *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Shaw *et al.* (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  $\alpha$ -hélices, 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

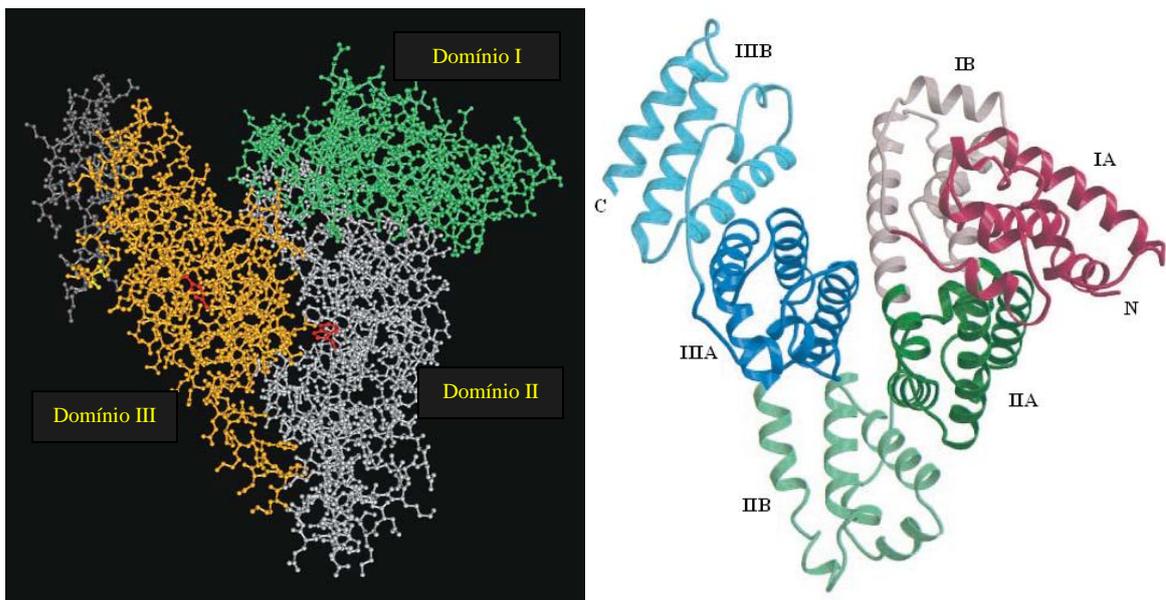
sítio de ligação da benzodiazepina [Kraugh-Hansen *et al.* (2002) e Stan *et al.* (2009)]. Dentre esses sítios, o sítio I parece ser mais versátil, porque ele pode se ligar com alta afinidade, à ligantes que são muito diferentes do ponto de vista químico [Peters (1996) e Stan *et al.* (2009)]. A ASH é um polipeptídeo com 585 resíduos de amino ácidos [Cui *et al.* (2008), Li *et al.* (2008), Shaw *et al.* (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 *et al.* (2008) e Takehara *et al.* (2009)]. Na ASH, os domínios I, II e III contêm os resíduos de amino ácidos 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)]. A concentração de ASH no plasma sanguíneo é de 40 mg/mL (4-5 g/100mL) [Sugio *et al.* (1999)]. 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)].

A albumina sérica bovina (ASB) (Figura 7) é um polipeptídeo, que tem o formato de um coração, liga-se de forma reversível a um grande número de ligante, apresenta 582 resíduos de amino ácidos [Stan *et al.* (2009)], contendo como base de distribuição 17 pares de dissulfeto, uma cisteína livre [Sugio *et al.* (1999)] e dois resíduos de triptofano. A ASB possui uma estrutura muito semelhante à da HSA [Falini *et al.* (2006)]. Ela apresenta três domínios homólogos (I, II e III) ligados entre si [Sugio *et al.* (1999)]. Cada domínio pode ser subdividido em dois subdomínios, A e B. A ASB tem dois resíduos de triptofano, Trp-134 e Trp-212 [Sulkowska (2002) e Kandagal *et al.* (2006)], localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente [Moriyama *et al.* (1996) e Stan *et al.* (2009)]. Na ASB, os domínios I, II e III contêm os resíduos de amino ácidos 1-195, 196-383, 384-582, respectivamente. A albumina sérica bovina (ASB) é a proteína mais abundante no plasma bovino. A ASB é produzida no fígado bovino e a concentração de ASB no plasma bovino é de 35-50 mg/mL. O peso molecular da albumina bovina é de aproximadamente 66 kDa (66.000 g/mol).

Tanto a albumina sérica bovina (ASB) quanto a albumina sérica humana (ASH) possuem apenas um resíduo de cisteína livre, Cys-34. Os outros formam 17 pontes dissulfeto ajudando a manter a estrutura terciária. A Figura 6 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 6.** 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)].



**Figura 7.** Estrutura da albumina sérica bovina (ASB) determinada por analogia com estrutura da albumina sérica humana (ASH) do PDB e seus domínios e subdomínios. [Ribeiro (2010)].

## 2.2.2 Interação entre compostos bioativos e albuminas (ASB e ASH)

As albuminas séricas (ASB e ASH) são proteínas que são abundantes no plasma sanguíneo, seja ele bovino ou humano. Elas apresentam grande solubilidade no sistema circulatório, aumentando a solubilidade aparente de compostos bioativos hidrofóbicos no plasma, além de apresentarem inúmeras funções fisiológicas e modelarem a atuação de fármacos na célula *in vivo* e *in vitro* [Li *et al.* (2008)], e por isso, são extremamente utilizadas para transportar compostos bioativos endógenos e exógenos. A interação do composto bioativo com a albumina influencia a sua distribuição, excreção, metabolismo e interação com o problema alvo, uma vez que, isso vai depender da concentração de composto bioativo administrado [Petitpas *et al.* (2001), He *et al.* (2005), Kandagal *et al.* (2006), Tang *et al.* (2006), Shi *et al.* (2007) e Stan *et al.* (2009)].

Dentre algumas técnicas geralmente utilizadas para detectar a interação entre um composto bioativo e a albumina sérica (ASH ou ASB) 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) [Milot *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) ou a albumina sérica bovina (ASB), 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 reações de interação droga-albumina (ASH e ASB).

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 fluorescência intrínseca da albumina suprimida, a acessibilidade de supressores aos grupos fluoróforos da albumina pode ser estimada. Esta informação pode ajudar a prever o mecanismo de interação da droga 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 termodinâmicos  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  e  $\Delta S^\circ$  podem ser obtidos experimentalmente por estudos de constantes de supressão de Stern-Volmer, Stern-Volmer modificado e van't Hoff, os quais possibilitam ainda a obtenção de outros valores como constantes de ligação ( $K_b$ ) e o número de sítios de ligação ( $n$ ).

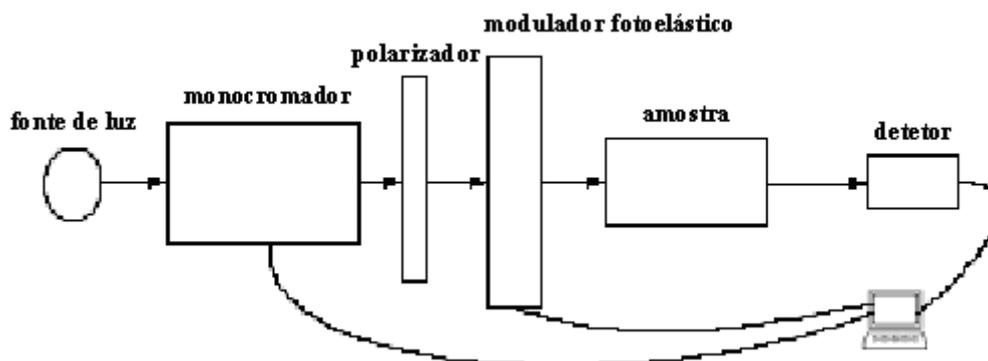
As forças que atuam entre uma molécula pequena e uma macromolécula, incluem, principalmente, ligação hidrogênio, força de van der Waals, força eletrostática, força de interação hidrofóbica e outras. Considerando a dependência da constante de ligação com a temperatura, um processo termodinâmico é responsável 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, fornece a distância média entre o resíduo de triptofano (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)]. A eficiência de transferência de energia ( $E$ ) está relacionada com as distâncias  $R_0$  e  $r$  entre doador e aceptor e é a distância crítica entre o doador (ASB) e o aceptor (composto bioativo), quando sua eficiência de transferência for 50%.

### 2.3 Descrição da Técnica de Dicroísmo circular (DC)

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica sensível para monitorar mudanças conformacionais nas proteínas [Yue *et al.* (2008)] e é 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, macromoléculas, sejam elas ou não de origem biológica, tais como proteínas, carboidratos, dendrímeros, etc., compostos esses que possuem unidades opticamente ativas, ou seja, podem exibir sinal na espectroscopia de dicroísmo circular. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nessa luz incidente. 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:  $DC = A_E - A_D$ . Este fenômeno é rotineiramente utilizado no estudo da estrutura secundária de proteínas. A técnica de DC detecta exatamente a alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, após a luz passar pela amostra [Fasman (1996) e Woody (1995)].

O DC pode ser utilizado para detectar: mudanças conformacionais de macromoléculas; composição de misturas quirais; interação dessas macromoléculas com outras moléculas menores, especialmente aquirais. 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 ótima para o estudo da estrutura secundária de biomoléculas em solução. Este detalhe é importante porque no processo de cristalização pode ocorrer alteração na estrutura da molécula, principalmente em sistemas biológicos. Em solução tem-se uma reprodução muito próxima do que é a realidade dos sistemas biológicos *in vivo*. A (Figura 8) mostra um esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular [Fasman (1996) e Woody (1995)].



**Figura 8.** Esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular.

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, 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). A absorção de luz não-polarizada é descrita pela absorvância (A) e é definida pela Equação 2 [Fasman (1996) e Woody (1995)].

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

**Equação 1.** Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada.

Onde: A = absorvância;

$I_0$  = intensidade da luz incidente;

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

Segundo a lei de Lambert-Beer (Equação 3) [Pace *et al.* (1995)], pode-se determinar o coeficiente de extinção molar, ou coeficiente de absorção molar, ou absorvidade molar ( $\epsilon$ ) [Pace *et al.* (1995)]. Da mesma forma que se pode definir um coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita ou para a esquerda,  $\epsilon_D$  e  $\epsilon_E$ , respectivamente. O dicroísmo circular molar ( $\Delta\epsilon$ ), Equação 4, é definido como a diferença entre os coeficientes de extinção entre os dois tipos de luz polarizada (o coeficiente de extinção molar para a luz não-polarizada é simplesmente a média aritmética entre  $\epsilon_E$  e  $\epsilon_D$ ) [Fasman (1996), Hecht (1998) e Woody (1995)].

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

**Equação 2.** Equação para determinar o coeficiente de extinção molar [Pace *et al.* (1995)].

Onde: A = absorvância;

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

l = distância que a luz percorre no meio (em cm);

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar (em L/cm.mol).

Todos os instrumentos comerciais de DC medem a variação de absorvância ( $\Delta A$ ) ( $\Delta A = A_E - A_D = (\epsilon_E - \epsilon_D).c.l$ ). Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de DC são calibrados para elipticidade ( $\theta$ ), Equação 5 [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)]. Para eliminar os efeitos do caminho ótico e da concentração, a elipticidade ( $\theta$ ) é expressa na forma de elipticidade molar ( $\theta_m$ ), Equação 6 [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://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, (Figura 9) [[www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)].

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

**Equação 3.** Equação para determinar o dicroísmo circular molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)].

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

$\varepsilon_E$  = coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda (em L/cm.mol);

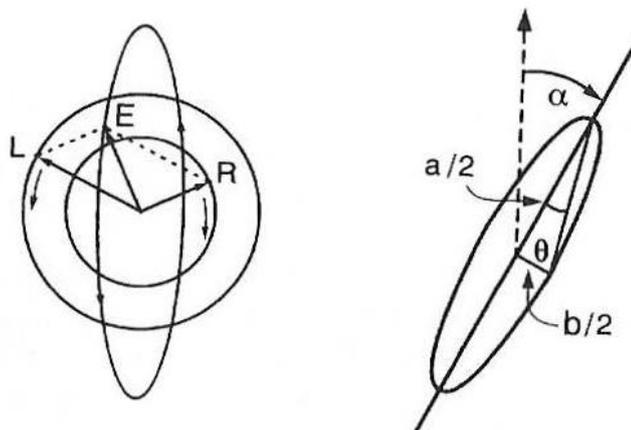
$\varepsilon_D$  = coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita (em L/cm.mol);

$A_E$  = absorvância para a luz circularmente polarizada para a esquerda;

$A_D$  = absorvância para a luz circularmente polarizada para a direita;

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

$l$  = distância que a luz percorre no meio (em cm).



**Figura 9.** Esquema da luz elipticamente polarizada gerada por dicroísmo circular. E é a magnitude dos vetores elétricos da luz circularizada para a direita e para a esquerda, a é o eixo maior enquanto que b é o eixo menor

[[www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.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 4.** Equação para determinar a elipticidade [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)].

Onde:  $\theta$  = elipticidade (em deg (graus));

$\Delta A$  = variação de absorvância.

$$\theta_m = 100\theta/c.l = 3298\Delta\varepsilon$$

**Equação 5.** Equação para determinar a elipticidade molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf)].

Onde:  $\theta_m$  = elipticidade molar (em  $\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$ );  
 $\theta$  = elipticidade (em deg (graus));  
 $c$  = concentração da espécie que absorve a luz;  
 $l$  = distância que a luz percorre no meio (em cm);  
 $\Delta\varepsilon$  = dicroísmo circular molar (em  $\text{L/cm.mol}$ ).

As medidas de dicroísmo circular (DC) permitem analisar o conteúdo da estrutura secundária e terciária de proteínas [Johnson (1988), Venyaminov e Yang (1996) e Cordeiro (2005)]. Para avaliar a estrutura secundária são feitas medidas na região do ultravioleta distante. Valores negativos máximos de elipicidade ( $\theta$ ) em 208 nm e 222 nm indicam a presença de uma estrutura predominantemente em  $\alpha$ -hélice, e valores de elipicidade negativos entre 215 nm e 225 nm sugerem a presença de estrutura em folha- $\beta$  [Johnson (1988), Venyaminov e Yang (1996) e Cordeiro (2005)].

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Aparelhos

Os espectros na região do ultravioleta (UV) foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu modelo Mine 1240, com cela de quartzo de caminho ótico de 1 cm.

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.

#### 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

Acetofenona e benzaldeído foram adquiridos à Carlo Erba e usados como recebidos.

3-Fluorbenzaldeído; 4-fluorbenzaldeído; 3,5-difluorbenzaldeído; 2,3-difluorbenzaldeído; 2,5-difluorbenzaldeído e 2,3,5,6-tetrafluorbenzaldeído; foram adquiridos à Aldrich Chemical e usados como recebidos.

Etanol, acetona, grau espectrofotométrico, hidróxido de potássio e de sódio foram adquiridos ao Vetec.

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

Pastilhas ou 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

Chalcona (CH) e seus derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F CH25F e CH2356F) foram analisados por técnicas de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis), e em albumina sérica bovina (ASB) por técnicas de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência com variação de temperatura ( $\lambda_{exc} = 280$  nm; T = 288 K, 293 K, 298 K) e dicroísmo circular com variação de temperatura (T = 288 K, 293 K e 298 K).

### 3.2.1 Sínteses

Chalcona (CH) foi sintetizada utilizando-se uma simples reação de condensação aldólica em meio básico (método de Koller e Chadwell), cujo procedimento vai descrito a seguir [Kohler *et al.* (1932)].

A um balão de 50 ml provido de agitador magnético e contendo, inicialmente, uma mistura de etanol (10 ml) e hidróxido de potássio aquoso a 10% (16 ml), em banho de gelo, foram adicionados 550 mg (5,18 mmol) de benzaldeído (utilizou-se 10% em excesso do aldeído). Em seguida, adicionou-se gota a gota 559 mg (0,57 ml; 4,66 mmol) de acetofenona, mantendo-se a reação sob agitação por 8 horas e posterior repouso por 24 horas. Após este período foram obtidos cristais amarelos que foram lavados com água gelada e posteriormente recristalizados de uma mistura de EtOH/H<sub>2</sub>O. Os cristais obtidos foram secos a pressão reduzida, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

A síntese dos derivados fluorados foi realizada por um procedimento semelhante ao descrito pelo método de Koller e Chadwell. Em um balão de 50 ml, equipado com agitador magnético, em banho de gelo, contendo 10 ml de EtOH/H<sub>2</sub>O (6:4) e KOH na concentração de 10% molar (conc. 0,0026 g/ml) em relação à da cetona, adicionou-se em uma única porção todo o aldeído (550 mg - 5,2 mmol) e em seguida a metade da massa de cetona (279 mg - 2,33 mmol). Após o início da reação, aproximadamente 1-2 h, adicionou-se o restante da cetona e, sob agitação constante, a reação prosseguiu até a obtenção de um precipitado. A mistura reacional foi então filtrada e o resíduo sólido obtido foi lavado com H<sub>2</sub>O gelada até pH neutro (medido em papel de tornassol) e recristalizado sucessivas vezes de uma mistura de EtOH/H<sub>2</sub>O. Em seguida, os cristais obtidos foram secos sob pressão reduzida e mantidos ao abrigo da luz.

Quando nestas condições a reação ocorria muito lentamente, ou não ocorria, provavelmente devido à baixa concentração de base, esta foi aumentada progressivamente até a reação ter início (mudança na cor da solução, algumas vezes variando de incolor para amarelo claro, ou através da formação de precipitado nas paredes do balão).

### 3.2.2 Soluções

- Soluções de concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L de chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) em etanol (solução 1);
- Solução buffer de fosfato (PBS), uma solução tampão fosfato de pH = 7,4 (1 pastilha solubilizada em 200 mL de água milli-Q ou 1 sachê solubilizado em 1 L de água milli-Q);
- Soluções  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L de albumina sérica bovina (ASB) 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 bovina (ASB) em solução buffer de fosfato (PBS) (tampão fosfato de pH = 7,4) (solução 3).

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

Foram registrados espectros de absorção na região do UV-Vis com varreduras na faixa de 200 nm a 500 nm para água milli-Q, solução tampão de PBS (pH = 7,4) e da ASB em solução tampão de fosfato (pH= 7,4), com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L (Figura 10).

No espectrômetro de ultravioleta, também foram realizadas varreduras na faixa de 200 nm a 400 nm, utilizando-se células de quartzo, com um volume de 3 mL de solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L (branco), de modo a se obter um espectro de absorção UV-Vis de ASB. Aos 3 mL de solução de albumina (ASB), foi efetuada uma titulação com adição de alíquotas de 10  $\mu$ L de uma solução das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-3}$  mol/L, e os espectros de absorção UV-Vis eram registrados ao longo das adições das chalconas (Figuras 12, 27, 39, 51, 63, 75 e 87).

No espectrômetro de ultravioleta, também foram realizadas varreduras na faixa de 200 nm a 400 nm, utilizando-se células de quartzo, com um volume de 3 mL de etanol, em que se adicionou alíquotas de solução etanólica de chalconas até se obter uma concentração final de  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, e os espectros das chalconas foram registrados após a adição da solução de chalcona (Figuras 99, 100, 101, 102, 103, 104 e 105).

### 3.2.4 Estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência

Foram registrados espectros de emissão de fluorescência da ASB ( $\lambda_{ex}=280$ , emissão 300-500 nm) em solução tampão de PBS (pH = 7,4), com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L nas temperaturas de 288 K, 293 K e 298 K (Figura 13).

Foram também registrados espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{ex}=280$ , emissão 300-500 nm) para água milli-Q, solução tampão de PBS (pH = 7,4) e da ASB em solução tampão de fosfato (pH= 7,4), com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L (Figura 14).

Os estudos da interação das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) com a albumina sérica bovina (ASB), 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 bovina (ASB) 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 das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) 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 ASB ( $F_0$ ) (Figuras 15, 28, 40, 52, 64, 76 e 88).

As condições utilizadas para estas análises foram as seguintes: espectro de emissão de fluorescência (varredura de 300 nm a 450 nm), e comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{exc} = 280$  nm), com fendas de emissão a 6,0 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 288 K, 293 K e 298 K.

### 3.2.5 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 ( $T = 288\text{ K}$ ,  $293\text{ K}$  e  $298\text{ K}$ ). A linha de base foi uma solução aquosa de PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ). Os espectros das soluções aquosas de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$  foram subtraídos desta linha de base. Para a realização das análises de dicroísmo circular, foram colocados 3 mL de uma solução de albumina (ASB) tamponada com PBS ( $\text{pH} = 7,4$ ) de  $1,00 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$  em uma célula de quartzo, e medida a sua elipticidade (branco), em diferentes temperaturas ( $T = 288\text{ K}$ ,  $293\text{ K}$  e  $298\text{ K}$ ), (Figura 23) as quais foram suprimidas com a adição de pequenas alíquotas da solução 1 (de  $12\ \mu\text{L}$ ,  $24\ \mu\text{L}$ ,  $48\ \mu\text{L}$  e  $96\ \mu\text{L}$ ) de soluções de chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) com concentração de aproximadamente  $1,00 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ , até se obter uma concentração final de chalconas na célula de quartzo em torno de  $3,00 \times 10^{-5}\text{ mol/L}$ . Após cada uma dessas adições, era feita uma leitura da solução contida na célula de quartzo. (Figuras 24-26, 36-38, 48-50, 60-62, 72-74, 83-85, 96-98).

### 3.2.6 Condições de análises

#### 3.2.6.1 Ultravioleta/Visível

**Tabela 2.** Temperatura utilizada na absorção de UV-VIS de ASB na presença da chalcona (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F CH25F e CH2356F).

pH	T (K)
7,4	295

**Tabela 3.** Concentração final das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), após a adição de alíquotas de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, em 3 mL da solução de ASB  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, para T = 298 K.

Adição de CHs (de 10 $\mu$ L em 10 $\mu$ L)	Concentração de CHs (mol/L)
0 $\mu$ L	0
10 $\mu$ L	$3,40 \times 10^{-6}$
20 $\mu$ L	$6,70 \times 10^{-6}$
30 $\mu$ L	$1,01 \times 10^{-5}$
40 $\mu$ L	$1,35 \times 10^{-5}$
50 $\mu$ L	$1,69 \times 10^{-5}$
60 $\mu$ L	$2,02 \times 10^{-5}$
70 $\mu$ L	$2,36 \times 10^{-5}$
80 $\mu$ L	$2,70 \times 10^{-5}$

#### 3.2.6.2 Fluorescência

**Tabela 4.** Temperaturas utilizadas na espectroscopia de emissão de fluorescência de ASB na presença da chalcona (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F).

pH	T (K)
7,4	288
	293
	298

**Tabela 5.** Concentração final das chalconas (CH, CH3F, CH23F, e CH2356F), após a adição de alíquotas de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L diluída na proporção (1:3), em 3 mL da solução de ASB  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, para T = 288 K, 293 K e 298 K.

Adição de CHs (de 10 $\mu$ L em 10 $\mu$ L)	Concentração de CHs (mol/L)
0 $\mu$ L	0
10 $\mu$ L	$8,50 \times 10^{-7}$
20 $\mu$ L	$1,60 \times 10^{-6}$
30 $\mu$ L	$2,50 \times 10^{-6}$
40 $\mu$ L	$3,30 \times 10^{-6}$
50 $\mu$ L	$4,20 \times 10^{-6}$
60 $\mu$ L	$5,10 \times 10^{-6}$
70 $\mu$ L	$6,00 \times 10^{-6}$
80 $\mu$ L	$6,70 \times 10^{-6}$

**Tabela 6.** Concentração final das chalconas (CH4F, CH25F e CH35F), após a adição de alíquotas de uma solução estoque  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L diluída na proporção (1:3), em 3 mL da solução de ASB  $1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, para T = 288 K, 293 K e 298 K.

Adição de CHs (de 15 $\mu$ L em 15 $\mu$ L)	Concentração de CHs (mol/L)
0 $\mu$ L	0
15 $\mu$ L	$1,20 \times 10^{-6}$
30 $\mu$ L	$2,40 \times 10^{-6}$
45 $\mu$ L	$1,47 \times 10^{-5}$
60 $\mu$ L	$1,96 \times 10^{-5}$
75 $\mu$ L	$2,43 \times 10^{-5}$
90 $\mu$ L	$2,91 \times 10^{-5}$
105 $\mu$ L	$3,33 \times 10^{-5}$
120 $\mu$ L	$3,84 \times 10^{-5}$

### 3.2.6.3 Dicroísmo

**Tabela 7.** Temperaturas utilizadas na espectroscopia de dicroísmo circular de ASB na presença da chalcona (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F).

pH	T (K)
7,4	288
	293
	298

**Tabela 8.** Concentração da chalcona (CH) e seus derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) após a adição de alíquotas de uma solução das CHs ( $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L), em 3 mL da solução de ASB ( $1,00 \times 10^{-6}$  mol/L), para T=288 K, 293 K e 298 K.

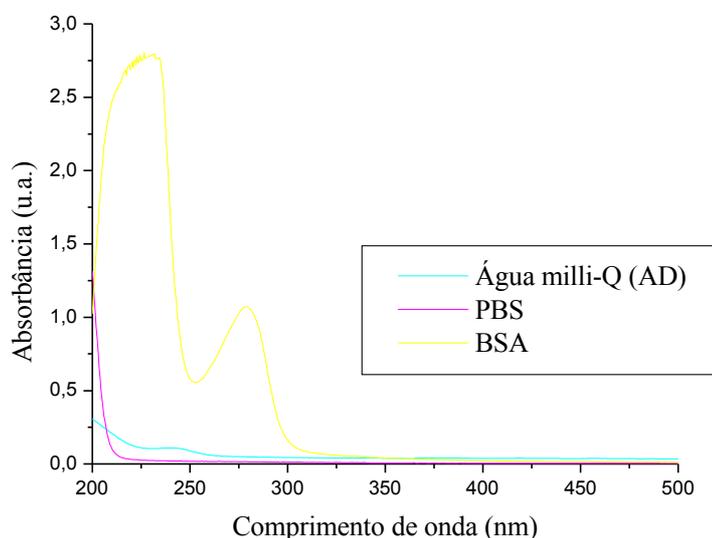
(ASB:chalconas)	Concentração final de chalcona (mol/L)
(1:0)	0
(1:4)	$3,90 \times 10^{-6}$
(1:8)	$7,90 \times 10^{-6}$
(1:16)	$1,57 \times 10^{-5}$
(1:32)	$3,10 \times 10^{-5}$

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão acerca dos estudos fotofísico da interação da chalcona (CH) e seus derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) com albumina sérica bovina (ASB) estão apresentados a seguir.

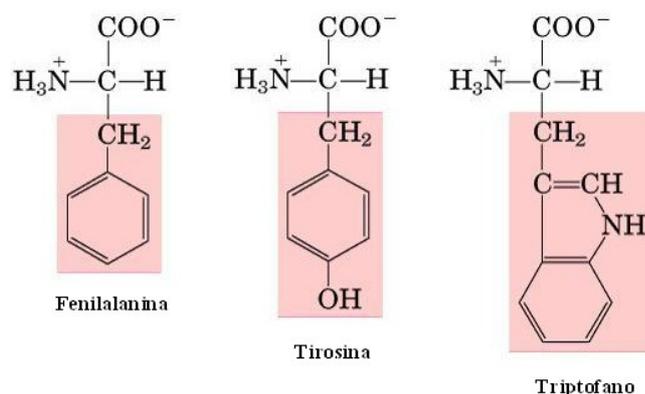
### 4.1 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis)

A albumina sérica bovina (ASB) apresenta uma banda em comprimento de onda maior, em torno de 280 nm, a qual é atribuída principalmente a absorção por parte do triptofano e em menor grau pela tirosina e pela fenilalanina (Figura 10) [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo\_circular.pdf e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf]. A Figura 10 mostra ainda que não há diferenças entre os espectros de absorção UV-Vis, de água milli-Q (AD) e de solução tampão de PBS (pH = 7,4) e que nessa região do espectro UV-Vis (200-500 nm) não apresentam absorções significativas.



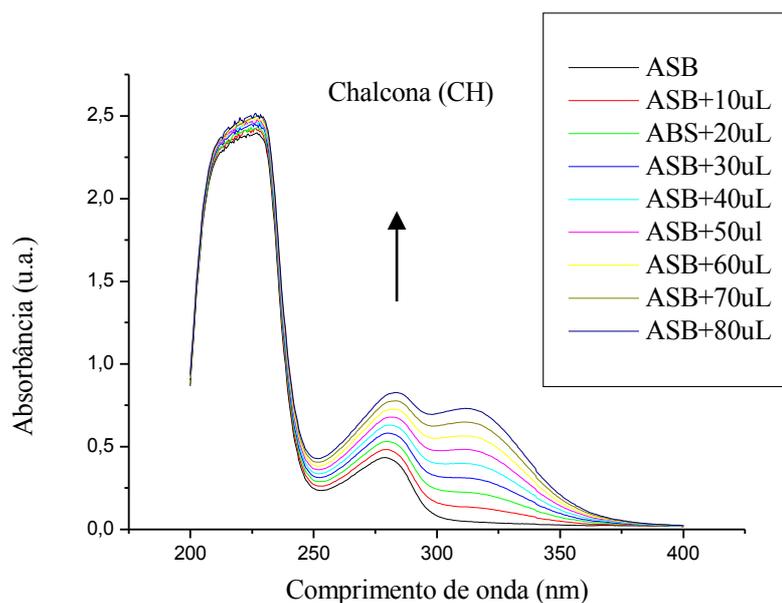
**Figura 10.** Espectros de absorção no UV-Vis de água milli-Q (AD), solução tampão de PBS (pH = 7,4) e solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.

Triptofano, tirosina e fenilalanina (Figura 11) são relativamente não polares, podem participar de interações hidrofóbicas, que são razoavelmente fortes quando os grupos aromáticos (grupos aromáticos ligados à estrutura base do amino ácido) estão reunidos um ao lado do outro. O grupo hidroxila da tirosina pode formar ligações hidrogênio, e isso atua como um grupo funcional importante na atividade de algumas enzimas. A tirosina e o triptofano são mais polares devido ao grupo hidroxila e nitrogênio, [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].



**Figura 11.** Estrutura de fenilalanina, tirosina e triptofano [www2.iq.usp.br/docente/mhgmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

As mudanças na estrutura de ASB, induzidas pela adição de chalconas, foram investigadas através de espectros de absorção UV-Vis. Os resultados obtidos acerca da ASB, e da interação entre ASB e as chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) por absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) na faixa de 200 nm a 400 nm estão apresentados na Figura 12 para CH e no anexo para os demais compostos (Figuras 27, 39, 51, 63, 75 e 87).



**Figura 12.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36;$ e  $2,70 ( \times 10^{-5})$  mol/L.

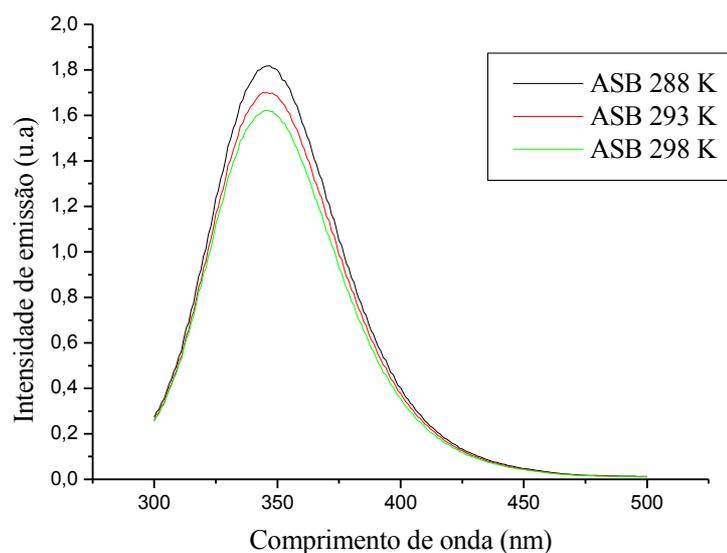
Os resultados dos estudos da interação da chalcona (CH) e seus derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) com ASB mostra um aumento das bandas de absorção com o aumento da concentração de chalcona (Figura 12, 27, 39, 51, 63, 75 e 87) apresentando um deslocamento batocrômico (vermelho) da banda de absorção próxima a 280 nm, característica do triptofano, indicando que houve a formação de um complexo entre as chalconas e a albumina sérica bovina (ASB).

As regiões principais para a ligação dos compostos bioativos com os sítios de ligação da albumina estão localizadas em cavidades hidrofóbicas nos subdomínios IB e IIA, os quais são consistentes com os sítios I e II, respectivamente, e os resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-212) de ASB estão nesses subdomínios, respectivamente. Existe uma grande cavidade hidrofóbica presente no subdomínio IIA, onde muitos compostos bioativos, como por exemplo, as chalconas, podem se ligar formando os complexos chalconas-ASB.

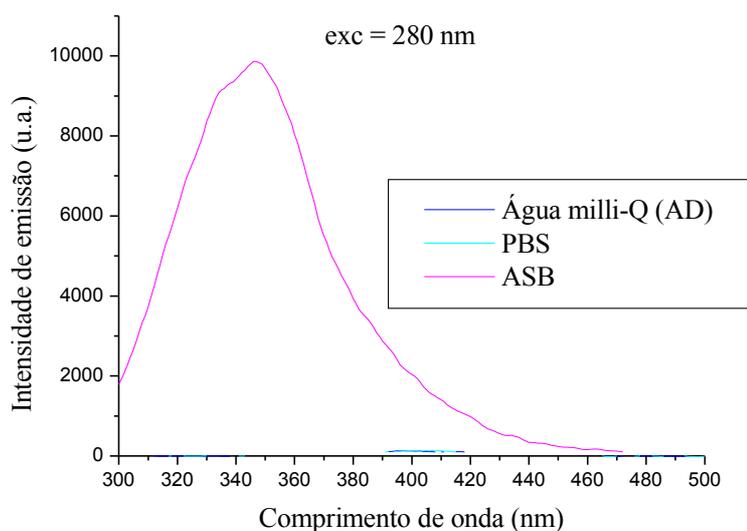
Os espectros de UV-Vis das chalcona (CH) e seus derivados fluorados indicaram uma banda maior em torno de 300 nm, e se encontram no anexo (Figuras: 99-105).

## 4.2 Espectroscopia de fluorescência

A Figura 13 mostra os espectros de emissão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm), em diferentes temperaturas ( $T = 288$  K,  $293$  K e  $298$  K), enquanto que na Figura 14 estão sobrepostos os espectros de emissão de fluorescência para a ASB em solução tampão de fosfato (pH= 7,4), água milli-Q (AD) e solução tampão de PBS (pH = 7,4), sendo que os dois últimos assim como as chalconas não apresentaram emissão de fluorescência entre 310 e 500nm ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) [Cesarin-Sobrinho (2002)], conseqüentemente, o que se observa nessa região, é somente a emissão de fluorescência da albumina sérica bovina (ASB).

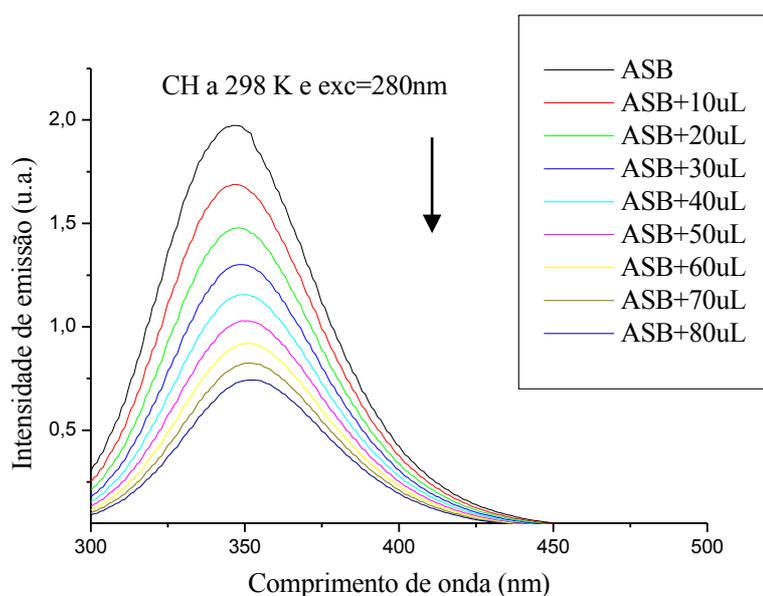


**Figura 13.** Espectro de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) da solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L, a  $T = 288$  K,  $293$  K,  $298$  K.



**Figura 14.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) de água milli-Q (AD), solução tampão de PBS (pH = 7,4) e solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência para a interação entre a chalcona (CH) e seus derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) com ASB em solução de tampão de fosfato (pH= 7,4) na temperatura de 298 K estão apresentados na Figura 15 para CH e no anexo para os demais compostos (Figuras 28, 40, 52, 64, 76 e 88).



**Figura 15.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ ) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  e  $C_{CH} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67$  e ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298 \text{ K}$ .

Nesses estudos, observou-se que a emissão de fluorescência da ASB era suprimida pelas chalconas (com a adição de alíquotas das chalconas). A adição de chalconas levou a uma gradativa diminuição na intensidade de fluorescência máxima de ASB (Figuras 15, 28, 40, 52, 64, 76 e 88) o que indica que a posição de interação entre as chalconas e a ASB está localizada próxima aos resíduos de triptofano [Wei *et al.* (2006) e Cheng *et al.* (2009)]. Como não se observa mudanças consideráveis no comprimento de onda de emissão máxima, isto implica em que a adição das chalconas não deve exercer grande influência na polaridade do microambiente hidrofóbico ao redor do triptofano na ASB [Cheng *et al.* (2009)].

Com o aumento da concentração das chalconas ocorreu um leve deslocamento para o vermelho na emissão da albumina, sugerindo que o composto se ligue à cavidade hidrofóbica da albumina, resultando em uma mudança estrutural da albumina, com um aumento de polaridade ao redor do resíduo de triptofano (ou dos resíduos) e em uma diminuição de hidrofobicidade [Shi *et al.* (2007) e Tang *et al.* (2006)] indicando que a chalcona suprime a fluorescência de ASB durante a complexação.

Existem casos na literatura, onde, com o aumento da concentração do composto bioativo na solução de albumina, ocorre um leve deslocamento para o azul [Zhang *et al.* (2008), Cui *et al.* (2007), He *et al.* (2006), Li *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Li *et al.* (2009) e Ribeiro (2010)], na emissão da proteína (albumina sérica bovina (ASB)), sugerindo que o cromóforo da proteína (ASB) está em um ambiente diferente daquele anterior à adição dos compostos bioativos [Li *et al.* (2009)], ou seja, ASB pura (livre), o cromóforo da ASB está localizado em um ambiente mais hidrofóbico após a adição dos compostos bioativos [Yuan *et al.* (1998), Zhang *et al.* (2008) e Cui *et al.* (2007)], indicando mudança de conformação da albumina [Yue *et al.* (2008)].

A interação entre as chalconas e ASB se dar em ambiente menos hidrofóbico do que o ambiente da ASB livre significa que a interação e a transferência de energia foram fortes. Ao mesmo tempo, os resíduos de triptofano foram levados para um ambiente menos hidrofóbico, tornando a polaridade ao redor do triptofano mais hidrofílica, aumentando a polaridade do ambiente ao redor do ligante (chalconas) [Cui *et al.* (2007), He *et al.* (2006) e Li *et al.* (2009)].

Os mecanismos possíveis para o processo de supressão podem ser *estático* ou *dinâmico*, e sua interpretação pode ser investigada através do espectro de supressão de fluorescência da proteína, e a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer a diferentes temperaturas [Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)], obtendo dessa forma as constantes de supressão de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) e as constantes de velocidade de supressão de fluorescência ( $k_q$ ) para a interação entre ASB e os compostos bioativos (Equação 6 [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)]). Para o tempo de vida de ASB ( $\tau_0$ ), na ausência de supressor, foi utilizado o valor de  $\tau_0 = 10^{-8}$  s [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 dos resíduos de triptofano de ASB pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), a diferentes temperaturas (288 K, 293 K e 298 K), estão mostrados na Figura 16 para CH e no anexo para os demais compostos (Figuras 29, 41, 53, 65, 77 e 89).

Os valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  estão dados na Tabela 9. Todos os valores demonstram que o provável mecanismo de supressão de ASB pela interação com as chalconas é estático, em função dos altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão pelas chalconas ( $k_q \cong 10^{12}$  a  $10^{13}$  L/mol.s), e pouco dependente da temperatura. Estes valores 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 um complexo ASB-chalconas. Os valores de  $K_{SV}$  foram bem parecidos com os da literatura para outras moléculas ( $K_{SV} \cong 10^3$  a  $10^5$  L/mol), e também, com os valores de  $k_q$  da literatura para outras moléculas ( $k_q \cong 10^{11}$  a  $10^{14}$  L/mol.s) [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)].

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

**Equação 6.** Equação para a determinação de  $K_{SV}$ , e conseqüentemente,  $k_q$ .

Onde:  $K_{SV}$  = constante de supressão de Stern-Volmer;

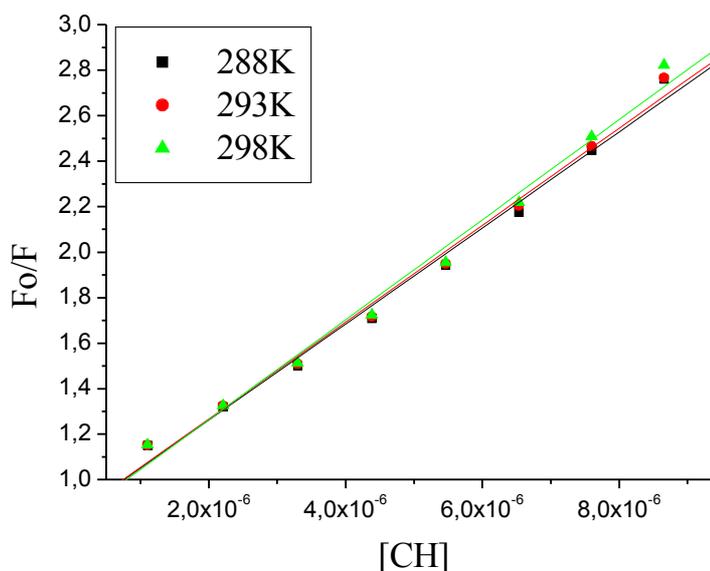
$k_q$  = constante de velocidade de supressão de fluorescência da biomolécula;

$\tau_0$  = tempo de vida de ASB sem supressor;

[Q] = concentração de supressor (chalcona) ou concentração de ligante (chalcona);

$F_0$  = intensidade de emissão de fluorescência sem supressor (ASB pura);

F = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (com chalcona).



**Figura 16.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH).

**Tabela 9.** Valores de  $K_{SV}$  e  $k_q$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) em diferentes temperaturas (288 K, 293 K e 298 K).

T (K)	288		293		298	
	$K_{SV}$ (L/mol)	$k_q$ (L/mol.s)	$K_{SV}$ (L/mol)	$k_q$ (L/mol.s)	$K_{SV}$ (L/mol)	$k_q$ (L/mol.s)
CH	211355	2,11E+13	213205	2,13E+13	219945	2,20E+13
CH3F	23676	2,37E+12	24199	2,42E+12	24182	2,42E+12
CH4F	48851	4,89E+12	49297	4,93E+12	49385	4,94E+12
CH35F	78825	7,88E+12	80336	8,03E+12	82427	8,24E+12
CH23F	116227	1,16E+13	120184	1,20E+13	123566	1,24E+13
CH25F	73936	7,39E+12	74824	7,48E+12	72742	7,27E+12
CH2356F	67041	6,70E+12	67853	6,79E+12	70016	7,00E+12

As constantes de supressão efetivas para as chalconas, ou constantes de ligação de Stern-Volmer modificadas ( $K_a$ ), foram obtidas a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer modificados (Equação 7 [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 17 para CH e no anexo para os demais compostos (Figuras 30, 42, 54, 66, 78, e 90).

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

**Equação 7.** Equação para determinar os valores de  $K_a$ .

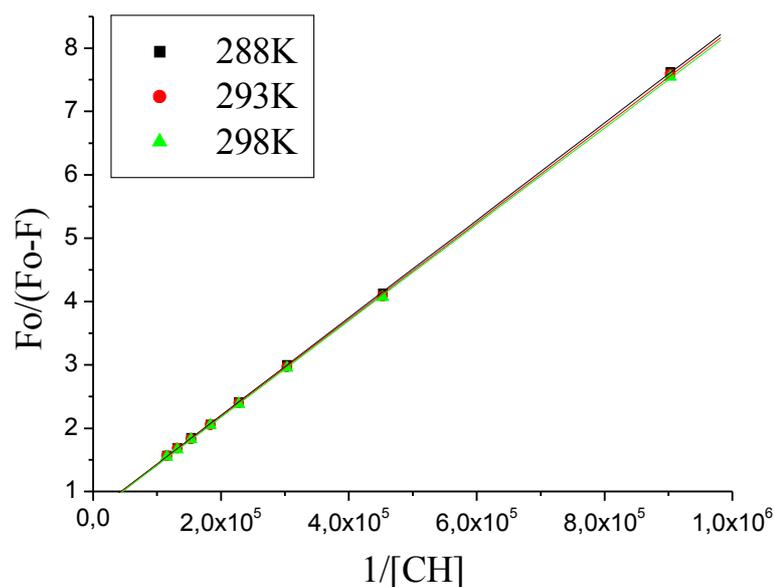
Onde:  $K_a$  = constante de supressão efetiva para os fluoróforos acessíveis, ou constante de ligação de Stern-Volmer modificada;

[Q] = concentração de supressor (chalcona);

$f$  = intensidade de fluorescência máxima fracional da proteína ou fração da fluorescência inicial que é acessível ao supressor (chalcona);

$F_0$  = intensidade de emissão de fluorescência sem supressor (só ASB);

$F$  = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (com chalconas)



**Figura 17.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH).

**Tabela 10.** Valores de  $K_a$  obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) em diferentes temperaturas (288 K, 293 K e 298 K).

Composto	Temperatura (K)		
	288	293	298
	Ka(L/mol)	Ka(L/mol)	Ka(L/mol)
CH	86668	86221	85657
CH3F	8599	9169	9909
CH4F	20404	21016	21730
CH35F	21858	29494	37764
CH23F	55813	56895	58034
CH25F	29052	36339	48131
CH2356F	44338	50251	55990

Os valores de  $K_a$  encontrados na presença das chalconas ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$  L/mol) apresentados na Tabela 10, deixam claro que as chalconas se ligam fortemente a ASB, pois os valores de  $K_a$  foram bem parecidos com os da literatura para outras moléculas ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$  L/mol) que apresentam fortes interações entre as moléculas bioativas e albumina [He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Através dos valores de  $K_a$  encontrados para a supressão de ASB foram construídos gráficos de van't Hoff (van't Hoff do Stern-Volmer modificado), (Equação 8) [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)] apresentados na Figura 18 para CH e no anexo para os demais derivados fluorados da chalcona (Figuras 31, 43, 55, 67, 79 e 91), a partir dos quais foram feitas as determinações dos parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia ( $\Delta H^0$ ) e de entropia ( $\Delta S^0$ ) envolvidos

no processo de supressão da ASB e, a partir deles, foram calculados os valores de variação de energia livre de Gibbs ( $\Delta G^0$ ), (Tabela 11). As temperaturas de 288 K, 293 K e 298 K foram escolhidas, pois a albumina sérica bovina (ASB) não apresenta qualquer degradação estrutural nestas temperaturas. Foi também decisivo para a escolha dessa faixa de temperatura o comportamento apresentado nos experimentos de supressão pelas chalconas, pois somente em temperaturas mais baixas, foi possível obter os valores de  $K_a$  com um alto grau de precisão, o que pode ser observado pelos bom valores dos coeficientes de correlação obtidos para os gráficos de van't Hoff (Tabela12).

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} \quad \Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

**Equação 8.** Equações para a obtenção dos valores de  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta G^0$ .

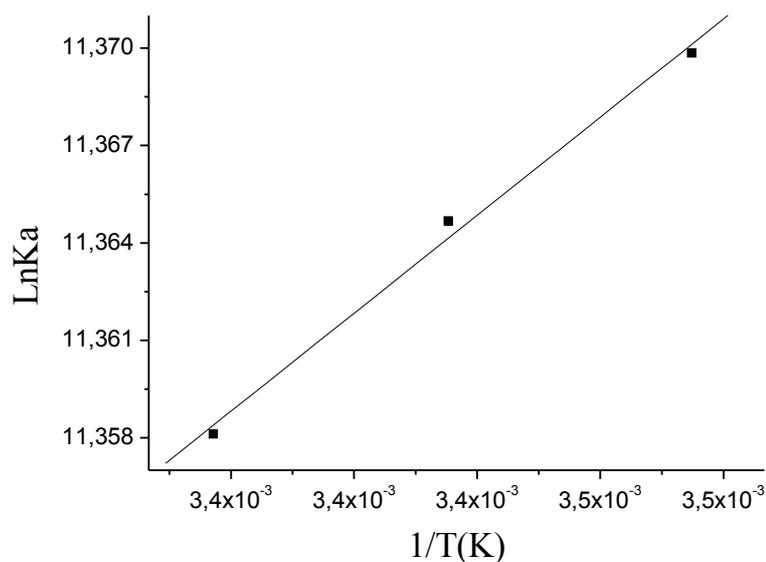
Onde:  $\Delta H^0$  = variação de entalpia;

$\Delta S^0$  = variação de entropia;

$\Delta G^0$  = variação de energia livre de Gibbs;

T = temperatura absoluta (em K);

R = constante dos gases (R = 0,008314 kJ/mol.K).



**Figura 18.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH).

**Tabela 11.** Valores de  $\Delta H^0$ ,  $\Delta S^0$  e  $\Delta G^0$  (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F).

	<b>T (K)</b>	<b><math>\Delta H^0</math> (kJ/mol)</b>	<b><math>\Delta S^0</math> (J/mol.K)</b>	<b><math>\Delta G^0</math> (kJ/mol)</b>
<b>CH</b>	288	-0,83	0,0916	-27,22
	293			-27,68
	298			-28,14
<b>CH3F</b>	288	10,11	0,1104	-21,68
	293			-22,23
	298			-22,79
<b>CH4F</b>	288	4,49	0,0980	-23,75
	293			-24,24
	298			-24,74
<b>CH35F</b>	288	39,03	0,2186	-23,94
	293			-25,03
	298			-26,12
<b>CH23F</b>	288	2,78	0,1005	-26,17
	293			-26,67
	298			-27,17
<b>CH25F</b>	288	35,99	0,2103	-24,58
	293			-25,63
	298			-26,68
<b>CH2356F</b>	288	16,65	0,1468	-25,62
	293			-26,35
	298			-27,09

**Tabela 12.** Valores estatísticos obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados pela supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para as chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F).

<b>Composto</b>	<b>Valores estatísticos</b>			
	<b>R (Coeficiente de correlação)</b>	<b>SD (Desvio Padrão da regressão)</b>	<b>N (Números de pontos)</b>	<b>P (Probabilidade)</b>
<b>CH</b>	0,99693	6,50908E-4	3	0,04988
<b>CH3F</b>	0,9979	0,0065	3	0,04124
<b>CH4F</b>	0,99897	0,00202	3	0,02883
<b>CH35F</b>	0,99897	0,01759	3	0,02892
<b>CH23F</b>	0,99982	5,19339E-4	3	0,01199
<b>CH25F</b>	0,99717	0,02688	3	0,04788
<b>CH2356F</b>	0,99948	0,00534	3	0,02058

Para interação composto bioativo-proteína, valores positivos de  $\Delta S^0$  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. Nos processos de interação compostos bioativos-proteína, valores de  $\Delta S^0$  positivos e de  $\Delta H^0$  negativos indicam que os processos de ligação ocorrem entropicamente. Para interações tipicamente hidrofóbicas, os valores de  $\Delta S^0$  e de  $\Delta H^0$  são positivos, enquanto que valores de  $\Delta S^0$  e de  $\Delta H^0$  negativos, indicam que a ligação 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  $\Delta S^0$  positivo e um pequeno valor de  $\Delta H^0$  negativo [Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Os valores de  $\Delta H^0$  positivos, em todos os casos, exceto para a chalcona (CH), mostraram que o processo de ligação das chalconas com a ASB foi endotérmico (Tabela 12). Os valores de  $\Delta S^0$  positivos evidenciaram que o tipo de interação entre as chalconas e a ASB foi hidrofóbico, e os valores de  $\Delta G^0$  negativos ( $\Delta G^0 \cong -28$  a  $-21$  kJ/mol) demonstraram a espontaneidade de ligação das chalconas com a ASB (Tabela 12). Os valores de  $\Delta S^0$  e de  $\Delta H^0$  positivos, indicam que a interação entre ASB e as chalconas fluoradas foi hidrofóbica (Tabela 12). Não é possível contabilizar parâmetros termodinâmicos de compostos de coordenação chalconas-ASB baseado, simplesmente, em um modelo de força intermolecular. A ligação das chalconas a ASB pode envolver uma interação fortemente hidrofóbica, evidenciada pelos valores positivos de  $\Delta S^0$  (grande contribuição de  $\Delta S^0$ ), tendo pouca contribuição de  $\Delta H^0$ . Consequentemente, a principal interação é o contato hidrofóbico, mas a interação eletrostática também não pode ser excluída.

No caso em especial para a chalcona (CH), em que o valor de  $\Delta H^0$  é ligeiramente negativo, indica que a interação entre ASB e chalcona (CH) tem um maior caráter hidrofílico, enquanto que o valor de  $\Delta S^0$  ainda que positivo, entretanto menor que os valores encontrados para os demais compostos sugerem que, para a chalcona (CH) em relação aos seus derivados fluorados, a interação CH-ASB exerce um papel preponderantemente hidrofílico ao microambiente ao redor do grupo triptofano, e que interações específicas, tais como ligação de hidrogênio possam estar operando nesse caso em especial [Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Essas mudanças no papel exercido pelos fatores entálpico ( $\Delta H^0$ ) e entrópicos ( $\Delta S^0$ ), para as interações entre a ASB e a série de chalcona estudadas (Tabela 12), devem estar correlacionadas aos efeitos eletrônicos gerados pelos átomos de flúor presentes como substituintes no anel cinamoílico, sobre os elétrons  $\pi$  dos sistemas  $\alpha,\beta$ -insaturados das chalconas. A grande eletronegatividade apresentada pelos átomos de flúor diminuem as possibilidades de interações via caminhos eletrostáticos, como as ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo, resultando em valores positivos para os derivados fluorados, enquanto que, se observa valor negativo de  $\Delta H^0$  para a chalcona (CH), sendo nesse último caso, possível a formação de ligações de hidrogênio relativamente forte com a hidroxila da tirosina ou mesmo com o átomo de hidrogênio indólico do triptofano.

Quanto ao número e a posição dos átomos de flúor presentes como substituintes sobre o anel cinamoílico da chalcona (anel A), este apresenta uma melhor correlação com a quantidade de átomos presentes. Um aumento no grau de substituição indica um maior caráter hidrofóbico para a complexação, o que pode ser verificado por altos valores tanto de  $\Delta H^0$  e de  $\Delta S^0$  para os compostos mais substituídos (Tabela 12).

No caso dos valores termodinâmicos de  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$  obtidos para os composto CH3F e CH4F (Tabela 12), indicam que a mudança da posição do átomo de flúor presente como substituinte no anel A da chalcona, passando da posição 3 para 4, ocorre uma diminuição de seu efeito retirador de elétrons por efeito indutivo sobre a nuvem eletrônica  $\pi$  da chalcona [Craik *et al.*(1970)], sendo que na posição 4, pode ainda ocorrer uma interação cruzada (doadora de elétrons) por parte do átomo de flúor contribuindo assim para os menores valores de  $\Delta H^0$  e  $\Delta S^0$  observados para o derivado CH4F quando comparado com a chalcona CH3F.

Para uma supressão estática, os sítios de ligação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula [Cheng *et al.* (2009)]. 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 9 [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 19 para CH e no anexo para os demais derivados fluorados (Figuras 32, 44, 56, 68, 80 e 92). De acordo com os resultados mostrados na Tabela 13, o número de sítios de ligação entre a ASB e as chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), é aproximadamente igual a 1. Isso indica que existe somente uma interação molecular entre as chalconas estudadas e uma molécula de ASB. Essas interações entre as chalconas e a albumina (ASB) são do tipo hidrofílico para a chalcona (CH) e hidrofóbica para os derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F).

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

**Equação 9.** Equação para determinar dos valores de  $K_b$  e  $n$ .

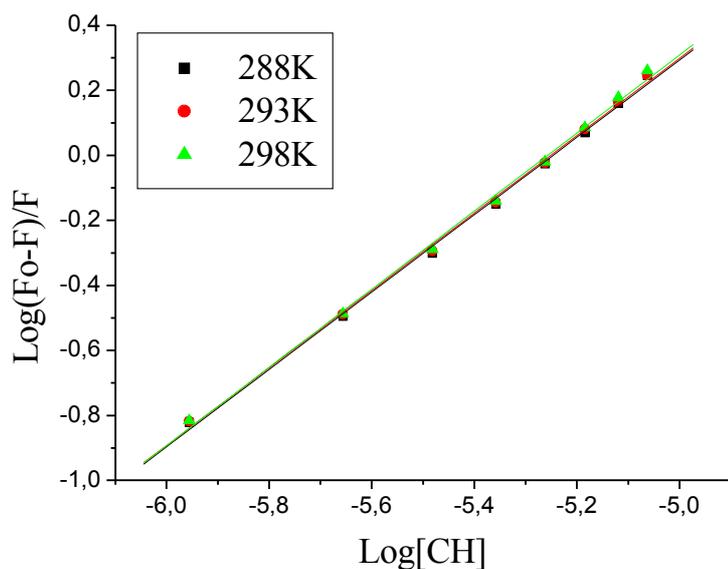
Onde:  $K_b$  = constante de ligação;

$n$  = número de sítios de ligação;

[Q] = concentração de supressor (chalcona);

$F_0$  = intensidade de emissão de fluorescência sem supressor (só ASB);

$F$  = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (com chalconas).



**Figura 19.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH).

Os resultados encontrados para os valores de  $K_b$  e  $n$  mostraram (Tabela 13), 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 ASB pelas chalconas é estático, pois não houve uma relação com o aumento da temperatura.

**Tabela 13.** Valores de número e ordem de ligação ( $n$  e  $kb$ ) obtidos a partir dos gráficos de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F).

	<b>T (K)</b>	<b><i>n</i></b>	<b>kb</b>
<b>CH</b>	288	1,19	1757721
	293	1,19	1806758
	298	1,20	2075678
<b>CH3F</b>	288	1,14	95827
	293	1,14	100285
	298	1,13	88627
<b>CH4F</b>	288	1,13	200456
	293	1,13	196951
	298	1,12	180164
<b>CH35F</b>	288	1,14	390058
	293	1,12	310034
	298	1,10	263432
<b>CH23F</b>	288	1,10	382851
	293	1,11	421871
	298	1,11	435491
<b>CH25F</b>	288	1,11	274031
	293	1,09	221105
	298	1,06	152816

CH2356F	288	1,04	108173
	293	1,03	99099
	298	1,03	100626

### 4.3 Cálculo do raio de Förster

A distância entre o resíduo de triptofano (doador) e a molécula supressora (aceptor) 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)]. A eficiência de transferência de energia (E) está relacionada com as distâncias  $R_0$  e  $r$  entre doador e aceptor [Yue *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)].

O processo de transferência de energia envolvido na interação entre ASB e as chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) foi verificado a partir da sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência da ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) a diferentes temperaturas ( $T = 288$  K,  $293$  K e  $298$  K) e os espectros de absorção UV/visível das chalconas, (Figuras 20-22, 33-35, 45-47, 57-59, 69-71, 81-83 e 93-95). Os valores da integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASB) com o espectro de absorção do aceptor (chalcona) (J) foram calculados de acordo com a Equação 10 [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)]. As sobreposições entre os espectros de emissão de fluorescência do doador (ASB) com os espectros de absorção do aceptor (chalcona) para uma concentração de ASB igual a da chalcona ( $[ASB] = [chalconas] = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L) estão mostradas nas Figuras 20-22.

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

**Equação 10.** Equação para o cálculo da integral de sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência de ASB e os espectros de absorção UV/visível [Shi *et al.* (2007)] das chalconas.

Onde: J = integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASB) com o espectro de absorção do aceptor (chalcona);

$F(\lambda)$  = intensidade de fluorescência do doador (ASB) em um comprimento de onda  $\lambda$ ;

$\epsilon(\lambda)$  = coeficiente de absorção molar, ou absortividade molar do aceptor (chalcona) em um comprimento de onda  $\lambda$  [Pace *et al.* (1995)];

$\lambda$  = comprimento de onda ( $\lambda$  em cm;  $1$  nm =  $1 \times 10^{-7}$  cm;  $1$  cm =  $1 \times 10^7$  nm);

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

A Equação 11 [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 entre o doador (ASB) e o aceptor (chalcona), quando sua eficiência de

transferência é 50% ( $R_0$ ). Para esses cálculos, o fator de orientação espacial do dipolo ou fator de orientação entre a emissão do dipolo do doador (ASB) e a absorção do dipolo do aceptor (chalcona) ( $K^2$ ) é o parâmetro menos certo. 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 aceptor, são rapidamente 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)].

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

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

**Equação 11.** Equação para o cálculo da distância crítica entre a ASB e as chalconas, quando sua eficiência de transferência é 50% [Epps *et al.* (1998) e Yue *et al.* (2008)].

Onde:  $K^2$  = fator de orientação espacial do dipolo ou fator de orientação entre a emissão do dipolo do doador (ASB) e a absorção do dipolo do aceptor (chalcona) (doador e aceptor são livres para assumir qualquer orientação,  $K^2 = 2/3$ );

$N$  = índice de refração do meio;

$\phi$  = rendimento quântico de fluorescência do doador (ASB);

$J$  = integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASB) com o espectro de absorção do aceptor (chalcona);

$R_0$  = distância crítica entre o doador (ASB) e o aceptor (chalcona), quando sua eficiência de transferência é 50%.

Para calcular os valores de eficiência de transferência de energia (Teoria de Förster) entre doador (ASB) e aceptor (chalcona) ( $E$ ) foi usada a Equação 12 [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)]. Como existe uma relação entre  $J$ ,  $E$  e  $R_0$ , pôde-se calcular os valores de distância entre o triptofano do doador (ASB) e o aceptor (chalcona) ou distância de ligação entre doador (ASB) e aceptor (chalcona) ( $r$ ). Os valores de  $J$ ,  $R_0$ ,  $E$  e  $r$  calculados estão apresentados nas Tabelas 14.

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

**Equação 12.** Equações para o cálculo da distância entre o triptofano da ASB e as chalcona [Sklar *et al.* (1977) e Yue *et al.* (2008)].

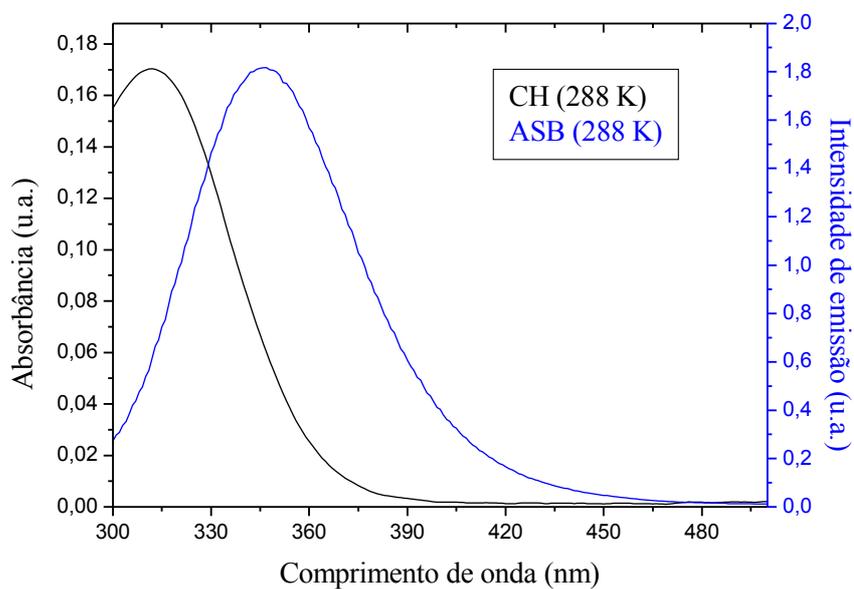
Onde:  $E$  = eficiência de transferência de energia (Teoria de Förster) entre doador (ASB) e aceptor (chalcona);

$F_0$  = intensidade de emissão de fluorescência sem supressor (só ASB);

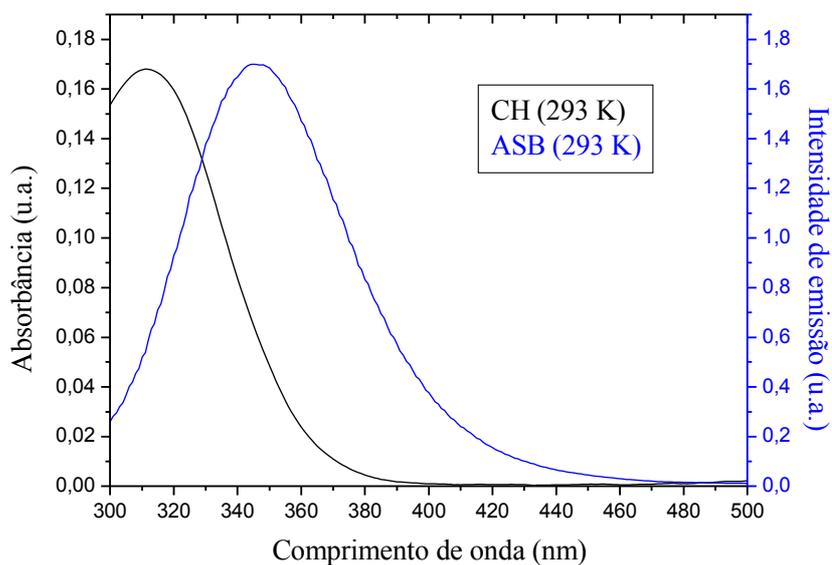
$F$  = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (com chalcona);

$R_0$  = distância crítica entre o doador (ASB) e o aceptor (chalcona), quando sua eficiência de transferência é 50%;

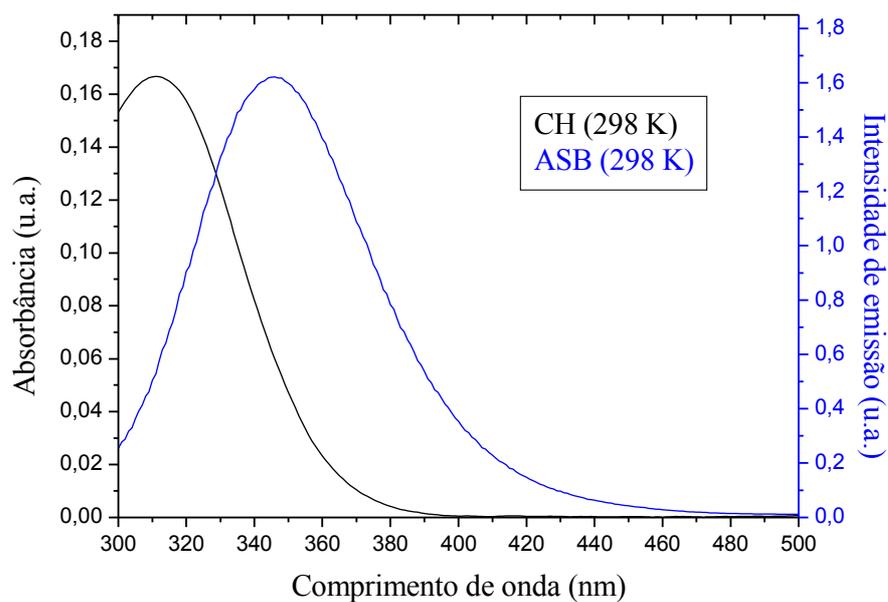
$r$  = distância entre o triptofano do doador (ASB) e o aceptor (chalcona) ou distância de ligação entre doador (ASB) e aceptor (chalcona).



**Figura 20.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 288 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH).  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



**Figura 21.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 293 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH).  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



**Figura 22.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 298 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH).  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .

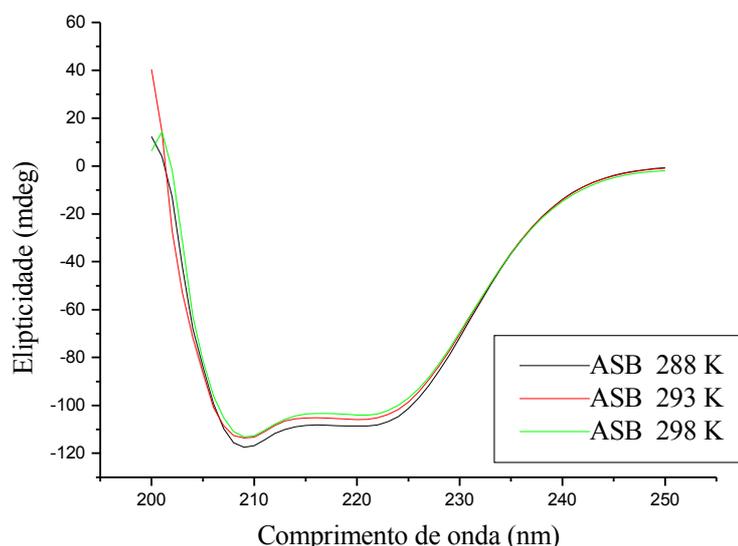
**Tabela 14.** Valores de J, R<sub>0</sub>, E e r calculados para a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e T = 288 K, 293 K e 298 K) e o espectro de absorção UV-Vis das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) C<sub>ASB</sub> = C<sub>CHs</sub> = 1,00 x 10<sup>-5</sup> mol/L.

	<b>T (K)</b>	<b>J (cm<sup>3</sup>.L/mol)</b>	<b>R<sub>0</sub> (nm)</b>	<b>E</b>	<b>r (nm)</b>
<b>CH</b>	288	3,16 x 10 <sup>-14</sup>	3,09	0,59	2,90
	293	3,16 x 10 <sup>-14</sup>	3,09	0,63	2,84
	298	3,15 x 10 <sup>-14</sup>	3,09	0,59	2,90
<b>CH3F</b>	288	0,57 x 10 <sup>-14</sup>	2,96	0,34	3,29
	293	0,58 x 10 <sup>-14</sup>	2,97	0,33	3,33
	298	0,61 x 10 <sup>-14</sup>	2,99	0,28	3,49
<b>CH4F</b>	288	0,91 x 10 <sup>-14</sup>	3,11	0,37	3,44
	293	0,92 x 10 <sup>-14</sup>	3,28	0,39	3,45
	298	0,94 x 10 <sup>-14</sup>	3,22	0,37	3,50
<b>CH35F</b>	288	0,32 x 10 <sup>-14</sup>	2,69	0,26	3,20
	293	0,31 x 10 <sup>-14</sup>	2,67	0,31	3,05
	298	0,31 x 10 <sup>-14</sup>	2,67	0,27	3,15
<b>CH23F</b>	288	0,45x10 <sup>-14</sup>	2,86	0,366	3,13
	293	0,47 x10 <sup>-14</sup>	2,86	0,405	3,09
	298	0,51 x10 <sup>-14</sup>	2,90	0,396	3,12
<b>CH25F</b>	288	0,81x10 <sup>-14</sup>	3,12	0,305	3,61
	293	0,82x10 <sup>-14</sup>	3,15	0,399	3,36
	298	0,84x10 <sup>-14</sup>	3,15	0,395	3,39
<b>CH2356F</b>	288	0,47x10 <sup>-14</sup>	2,87	0,316	3,25
	293	0,47x10 <sup>-14</sup>	2,85	0,290	3,31
	298	0,46x10 <sup>-14</sup>	2,85	0,283	3,32

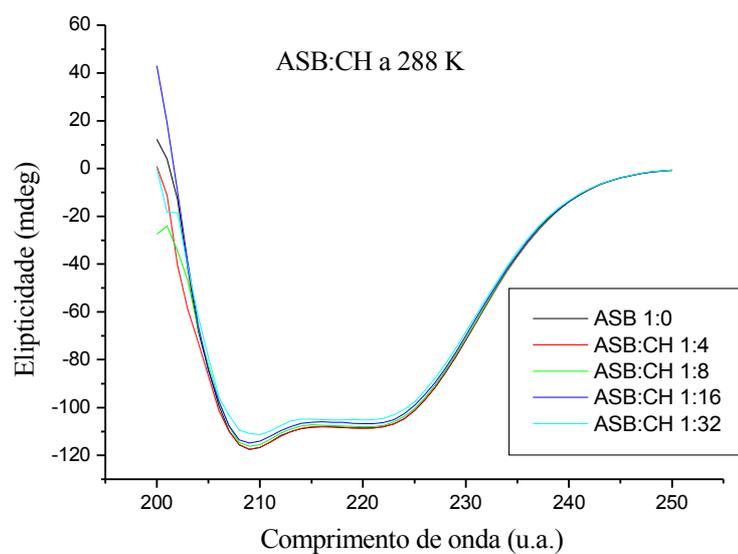
De acordo com as Equações 10-12, e para as condições de ASB ( $K^2 = 2/3$ ,  $N = 1,336$  e  $\phi = 0,15$ ) [Miller (1979) e Cheng et al. (2009)], o valor da distância entre as chalconas e o resíduo de triptofano ( $r \cong 2$  a 3 nm, Tabelas 14) foi menor que 7 nm ( $r < 7$  nm) [He *et al.* (2006) e Yue *et al.* (2008)], para todos os casos de interação entre ASB e chalconas. Isto é um forte indício da possibilidade de ocorrer o fenômeno de transferência de energia entre ASB e chalconas. 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 chalconas e ASB. [Lakowicz (2006) e Cheng *et al.* (2009)].

#### 4.4 Dicroísmo circular (DC)

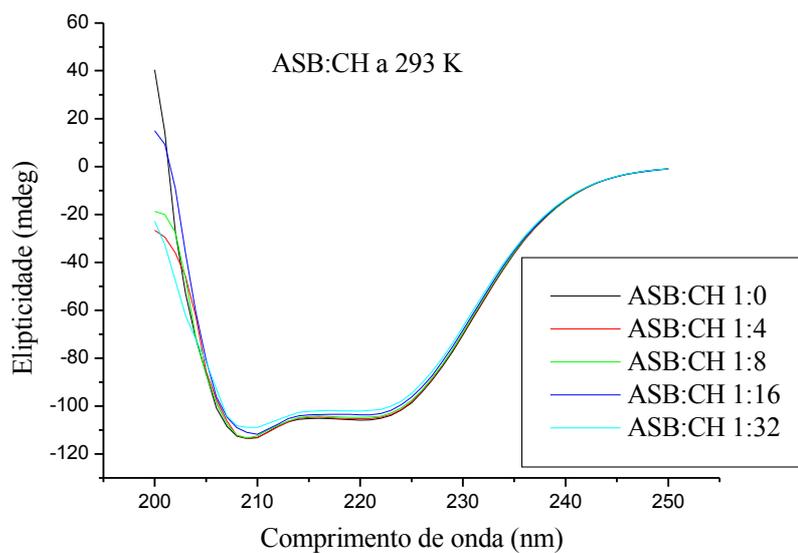
O dicroísmo circular é uma técnica sensível para monitorar mudanças conformacionais em proteínas [Yue *et al.* (2008)] e é geralmente usado para a determinação da estrutura secundária de macromoléculas [Kelly *et al.* (2005) e Cheng *et al.* (2009)]. Espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para avaliar a mudança estrutural de ASB induzida pela adição das chalconas (CH, CH<sub>3</sub>F, CH<sub>4</sub>F, CH<sub>3</sub>5F, CH<sub>2</sub>3F, CH<sub>2</sub>5F e CH<sub>2</sub>356F). Os espectros de dicroísmo circular obtidos para ASB na ausência de chalconas (Figura 23) e na presença chalconas (CH, CH<sub>3</sub>F, CH<sub>4</sub>F, CH<sub>3</sub>5F, CH<sub>2</sub>3F, CH<sub>2</sub>5F, e CH<sub>2</sub>356F) em diferentes temperaturas (T = 288 K, 293 K e 298 K), estão apresentados nas Figuras 24-26 para a chalcona (CH) e no anexo para os demais derivados fluorados (Figuras 36-38, 48-50, 60-62, 72-74, 84-86 e 96-98). Nestes estudos foi observado que a adição de alíquotas das chalconas à albumina sérica bovina influenciou na sua elipticidade. Os espectros de DC de ASB e de ASB:Chalconas (Figuras 24-26, 36-38, 48-50, 60-62, 72-74, 84-86 e 96-98) exibiram duas bandas negativas na região do ultravioleta (UV) de 208 nm e 222 nm, características de estrutura  $\alpha$ -hélice de proteína [Johnson (1988), Venyaminov e Yang (1996), Cordeiro (2005), Navea *et al.* (2006), He *et al.* (2005), Oberg e Uversky (2001), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Li *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Qing *et al.* (2009), Cheng *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)]. Essas bandas são contribuintes para a transição  $n\pi^*$  da ligação da estrutura  $\alpha$ -hélice do peptídeo [Yang e Gao (2002), He *et al.* (2006), Li *et al.* (2007) e Yue *et al.* (2008)]. Os espectros de dicroísmo circular para ASB na presença e na ausência de chalconas foram semelhantes, quanto ao formato, somente apresentando variações de intensidade das bandas, o que significa que a estrutura de ASB foi predominantemente  $\alpha$ -hélice [Yue *et al.* (2008)]. A interação das chalconas com a ASB resultou na diminuição de ambas as bandas, sugerindo a ocorrência de mudanças na estrutura secundária da proteína, o que pode ser indicativo da formação de complexos entre ASB e as chalconas.



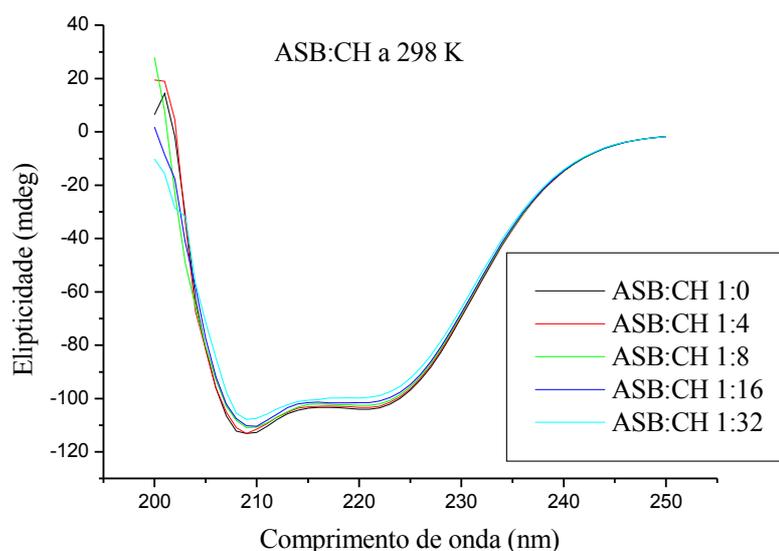
**Figura 23.** Espectros de dicroísmo circular de ASB (pH = 7,4),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L, a T = 288 K, 293 K e 298 K.



**Figura 24.** Espectros de dicroísmo circular para ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) em chalcona (CH), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH,  $C_{\text{ASB}} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{\text{CH}} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K.



**Figura 25.** Espectros de dicroísmo circular para ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) em chalcona (CH), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH,  $C_{\text{ASB}} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{\text{CH}} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K.



**Figura 26.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K.

O comportamento das bandas negativas da albumina, em 208 nm e 222 nm (características de transições  $n\pi^*$  da estrutura secundária  $\alpha$ -hélice de proteínas no ultravioleta), mostrou-se bem parecido frente à variação de temperatura tanto para ASB livre (Figuras 23) quanto para as ASB:CHs (Figuras 24-26, 36-38, 48-50, 60-62, 72-74, 84-86 e 96-98), as curvas dos espectros apresentaram pouca mudanças em  $T = 288$  K, 293 K e 298 K. Dessa forma, a temperatura contribuiu pouquíssimo para essas mudanças espectrais, enquanto, as concentrações das chalconas foram as grandes responsáveis por essas mudanças.

Estimativas acerca do % de  $\alpha$ -hélice para a estrutura secundária de ASB na ausência e na presença das chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) foram feitas usando as Equações 13 e 14 [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 ( $\theta$ ) 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 13 [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  $\alpha$ -hélice de proteína [Stan *et al.* (2009)] e correspondem às transições  $n\pi^*$  que ocorrem na sua estrutura secundária  $\alpha$ -hélice (no caso, albumina sérica bovina (ASB)) [Yang *et al.* (2002) e Yue *et al.* (2008)]. Posteriormente, os valores de  $MRE_{208}$  e  $MRE_{222}$  foram substituídos na Equação 14 [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  $\alpha$ -hélice na estrutura secundária da ASB (%  $\alpha$ -hélice), (Tabelas 15).

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

**Equação 13.** Equação para calcular os valores de MRE [Khan *et al.* (2002)].

Onde: MRE = elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (deg.cm<sup>2</sup>/dmol);

$\theta$  = elipticidade observada (mdeg);

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

l = comprimento ótico da cubeta (1 cm);

C<sub>p</sub> = concentração molar de ASB (1,00x10<sup>-6</sup> mol/L).

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

**Equação 14.** Equações para calcular os valores de % de  $\alpha$ -hélice da ASB.

Onde: MRE<sub>208</sub> = elipticidade residual significativa em 208 nm (deg.cm<sup>2</sup>/dmol);

MRE<sub>222</sub> = elipticidade residual significativa em 222 nm (deg.cm<sup>2</sup>/dmol);

%  $\alpha$ -hélice = percentual de  $\alpha$ -hélice na estrutura da ASB

**Tabela 15.** %  $\alpha$ -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) em chalconas (CH, CH3F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), T = 288 K, 293 K e 298 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CHs, C<sub>ASB</sub> = 1,00 x 10<sup>-6</sup> mol/L e C<sub>CHs</sub> = 0; 4,04; 8,08; 16,20 e 32,30 (x 10<sup>-6</sup>) mol/L.

	T (K)	% $\alpha$ -hel.					
		288		293		298	
		$\theta$ (mdeg)	208	222	208	222	208
CH	1:0	54,70	53,60	52,90	51,88	52,67	51,02
	1:4	54,64	53,55	52,72	51,63	51,92	50,61
	1:8	54,13	53,24	52,59	51,32	50,34	50,13
	1:16	53,51	52,55	50,75	50,76	49,88	49,48
	1:32	51,05	51,53	50,30	49,77	48,69	48,33
CH3F	1:0	55,57	54,56	53,23	52,70	52,84	51,30
	1:4	55,00	54,44	53,63	52,26	52,08	50,80
	1:8	55,19	54,08	52,70	51,79	51,13	50,29
	1:16	53,17	53,20	49,57	49,03	50,21	49,57
	1:32	51,91	52,12	51,18	50,22	48,62	48,42
CH4F	1:0	54,93	53,71	53,28	52,07	52,95	51,95
	1:4	54,59	53,40	52,39	51,76	52,27	51,66
	1:8	54,31	53,21	52,28	51,48	52,68	51,25
	1:16	53,85	52,65	51,66	51,18	51,82	50,76
	1:32	51,142	51,84	49,25	50,13	51,28	49,81

Continua

Tabela 15 continuação

<b>CH35F</b>	1:0	55,18	55,10	55,12	54,43	53,53	53,04
	1:4	54,95	54,76	55,09	54,00	53,21	52,58
	1:8	54,51	54,24	54,41	53,73	52,83	52,25
	1:16	53,51	53,66	53,38	53,04	51,84	51,58
	1:32	52,15	52,75	52,45	51,79	49,98	50,72
<b>CH23F</b>	1:0	54,75	54,29	52,49	51,68	51,95	51,77
	1:4	54,63	53,99	52,07	51,28	51,82	51,31
	1:8	53,79	53,41	52,07	51,28	51,60	50,84
	1:16	52,80	52,76	51,02	50,77	50,828	50,08
	1:32	52,17	51,79	50,28	49,31	49,66	48,79
<b>CH25F</b>	1:0	55,35	54,39	53,87	53,25	53,70	52,24
	1:4	54,62	54,065	54,22	52,71	53,19	51,78
	1:8	54,17	53,51	53,59	52,37	52,98	51,14
	1:16	53,63	52,71	52,38	51,68	51,48	50,55
	1:32	53,05	51,66	51,26	50,36	51,32	49,78
<b>CH2356F</b>	1:0	54,70	53,23	53,20	52,10	54,13	52,81
	1:4	53,72	53,26	52,19	51,75	53,40	52,39
	1:8	53,68	52,89	52,06	51,38	53,27	52,05
	1:16	53,17	52,34	51,56	50,78	51,97	51,63
	1:32	51,32	51,49	51,44	50,03	50,94	50,51

Os resultados obtidos para a variação do %  $\alpha$ -hélice da estrutura secundária da proteína (ASB), mostrados na Tabela 15, apresentam uma diminuição com a presença das chalconas (nas razões molares de ASB:chalconas de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), quando comparados com os resultados na ausência de chalconas (ASB:chalconas na proporção 1:0), indicando que houve interação das chalconas com os resíduos de amino ácidos da cadeia principal polipeptídica de ASB 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 bovina (ASB) e as chalconas, avaliada por dicróismo circular mostrou-se dependente da concentração de chalcona ministrada e muito pouco da temperatura, ocorrendo, de uma maneira geral, diminuição da % de  $\alpha$ -hélice na estrutura da ASB, devido ao aumento de concentração das chalconas.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos espectroscópicos de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-Vis) para a interação entre a albumina sérica bovina (ASB) com a chalcona (CH) e seus derivados fluorados (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), indicaram a formação do complexo chalcona-proteína, que pode ser evidenciado pelo deslocamento batocrômico da banda de absorção em 280 nm, sugerindo uma diminuição da hidrofobicidade na região próximo aos resíduos de triptofano da albumina (banda de absorção bem mais intensa) e da tirosina (banda de absorção mais fraca). A interação das chalconas próximo ao triptofano, indica que o possível sítio de ligação esta localizada nas cavidades hidrofóbicas nos subdomínios IB e IIA, os quais são consistentes com os sítios I (Trp-134) e II (Trp-212), respectivamente, sendo que a cavidade de maior hidrofobicidade se encontra no subdomínio IIA, onde muitos compostos bioativos, como por exemplo, as chalconas, podem se ligar, formando os complexos, complexo bioativo-ASB.

Os resultados dos estudos por espectroscopia de emissão de fluorescência da interação entre ASB e as chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), nas temperaturas de 288 K, 293 K e 298 K, mostraram que ocorreu a supressão da banda de emissão de fluorescência da albumina (ASB) que apresenta um máximo de emissão entre 341 e 346 nm ( $\lambda_{exc} = 280$  nm), indicando que a posição de interação entre as chalconas e a ASB está localizada próxima aos resíduos de triptofano. O leve efeito batocrômico observado com o aumento da concentração das chalconas, na banda de emissão da proteína (ASB), sugere que o cromóforo da proteína (ASB) está em um ambiente diferente daquele anterior à adição das chalconas (ASB livre), sendo levado para um ambiente menos hidrofóbico após a adição de chalconas, como consequência do aumento da polaridade do ambiente ao redor do triptofano, e indicando uma provável formação do complexo ASB-chalcona.

Os altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão de fluorescência ( $k_q$ ) para a interação entre ASB e as chalconas ( $k_q \cong 10^{12}$  a  $10^{13}$  L/mol.s), quando comparados com a constante de velocidade de difusão ( $k_d \cong 5 \times 10^9$  L/mol.s, em água) [He *et al.* (2005)], e das constantes de supressão de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) ( $K_{SV} \cong 10^4$  a  $10^5$  L/mol), apontam sua independência com a temperatura, indicam que o provável processo de supressão de ASB pela interação com as chalconas é estático, com a formação de um complexo ASB-Chalconas, anterior ao processo de transferência de energia.

Os valores de  $K_a$  obtidos a partir dos estudos de Stern-Volmer modificados das chalconas apresentaram valores ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$  L/mol), bem parecidos com os da literatura para outras moléculas ( $K_a \cong 10^4$  a  $10^5$ ) [He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)] indicando a ocorrência de interação forte chalconas-ASB.

Os valores de  $\Delta H^0$  positivos, na maioria dos casos, mostraram que o processo de ligação das chalconas com a ASB foi endotérmico, e os valores de  $\Delta S^0$  também positivos evidenciaram que o tipo de interação entre as chalconas substituídas por flúor e a ASB é hidrofóbico, e os valores de  $\Delta G^0$  negativos ( $\Delta G^0 \cong -28$  a  $-21$  kJ/mol) demonstraram a espontaneidade de ligação das chalconas com a ASB.

O valor de  $\Delta H^0$  negativo para a chalcona CH, indica que a interação nesse caso deve possuir um certo caráter eletrostático, sugerindo algum tipo de interação hidrofílica. O valor positivo para o termo de  $\Delta S^0$  indica ainda a preponderância das interações hidrofóbicas para a relação CH-ASB, e que nesse caso em especial, pode estar ocorrendo a formação de uma ligação de hidrogênio.

O número de sítios de ligação ( $n$ ) foi aproximadamente igual a 1 em todos os casos. Isso indica que existe somente uma interação molecular entre as chalconas estudadas e a molécula de ASB. Os valores de  $K_b$  fortalecem essa afirmação.

Os resultados obtidos para o processo de transferência de energia de Förster, com valores de  $r \cong 2$  a 4 nm ( $r < 7$  nm), sugerem uma alta probabilidade de ocorrer o fenômeno de transferência de energia entre ASB e chalconas, indicando que ocorreu realmente, um processo de supressão estática na interação entre chalconas e ASB.

Os resultados dos estudos por espectroscopia de dicroísmo circular para a interação entre ASB e as chalconas (CH, CH<sub>3</sub>F, CH<sub>4</sub>F, CH<sub>3</sub>5F, CH<sub>2</sub>3F, CH<sub>2</sub>5F e CH<sub>2</sub>356F), nas temperaturas de 288 K, 293 K e 298 K, mostraram que ocorreu uma diminuição da % de  $\alpha$ -hélice da estrutura secundária da proteína (ASB), como consequência apenas do aumento da concentração das chalconas e independente da variação da temperatura. Como pode ser evidenciado pela manutenção da forma dos espectros com variações somente nas intensidade das bandas negativas (208 e 222 nm), indicando a formação de um complexos entre ASB e as chalconas.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alias, Y.; Awang, K.; Hadi, A.; Thoison, O.; Sevent, T.; Pais, M., *J. Nat. Prod.*, **1995**, *58*, 1160.
- Azzaovi, K.; Morin-Allory, L., *Chromatographia*, **1995**, *40*, 690.
- Baldwin, S. W., *Org. Photochem.*, **1987**, *5*, 123.
- Banerjee, A.; Basu, K.; Sengupta, P. K. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2008**, *90*, 33.
- Baroni, S.; Mattu, M.; Vannini, A.; Cipollone, R.; Aime, S.; Ascenzi, P.; Fasano, M. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6214.
- Bhandari, P.; Crombie, L.; Daniels, P.; Holden, I.; Vanbruggen, N.; Whiting, Da.; *J of Chem.* **1992**, *7*, 849.
- Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38731.
- Bilia, A. R.; Morelli, I.; Marsili A., *Tetrahedron*, **1994**, *50*, 5181.
- Boate, D. R.; Johnston, L. J.; Scaiano, J. C., *Can. J. Chem.*, **1989**, *67*, 927.
- Boeck, P.; Falcao, C. A. B.; Leal, P. C.; Yunes, R. A.; Cechinel, V.; Torres-Santos, E. C.; Rossi-Bergmann, B.; *Bioorganic & Medicinal Chem.* **2006**, *14*, 1545.
- Bois, F.; Beney, C.; Boumendjel, A.; Mariotte, A. M.; Conseil, G.; Di Pietro, A., *J. Med. Chem.*, **1998**, *41*, 4161.
- Bonneau, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1980**, *102*, 3816.
- Bowden, K.; Dalpozzo A. D.; Duah, C. K., *J. Chem. Research.*, (s) **1990**, 377.
- Budde, K.; Quella, F.; Mathes, A.; Melchior, W.; Müller, H.; Nuyken, O.; Spiegel, S., *Angew. Makromol. Chem.*, **1992**, *194*, 103.
- Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6891.
- Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J.; *Quim. Nova.* **2001**, *5*, 604-611.
- Cesarin-Sobrinho, D.; Netto-Ferreira, J.; *Quim. Nova.* **2002**, *25*, 62-68.
- Chapman, O. L., *Org. Photochem.*, **1967**, *1*, 23.
- Chawla, H. M.; Chakrabarty, K., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1984**, 1511.
- Chawla, H. M.; Chiber, S. S.; Sharwa, A., *Tetrahedron Lett.*, **1978**, *19*, 2713.
- 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.
- Chudgar, N. K.; Shah, S. N., *Liquid Crystals*, **1989**, *4*, 661.
- 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**.
- Craik, D. J.; Brownlee, R. T. C., *Prog. Phys. Org. Chem.*, **1970**, *14*, 1.
- 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.
- De Mayo, P. de, *Acc. Chem. Res.*, **1971**, *4*, 41.
- Dose, K. *Bioquímica*. EPU/Springer, EDUSP, São Paulo, **1982**.
- 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**.
- Fischer, F.; Schuchardt, W.; Walter, H., *Chem. Abst.*, **1970**, *73*, 7093y.

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.

Gunder, O. A.; Vlasov, V. G.; Koval, L. N.; Krasovitski, B. M., *Chem. Abst.*, **1968**, 69, 36699y.

Hamer, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 59, 96.

Hano, Y.; Itoh, N.; Hanoaka, A.; Yoshimitsu, I.; Nomura, T., *Heterocycles*, **1995**, 41, 191.

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*. 3<sup>rd</sup> Ed., Addison Wesley Longman, Massachusetts, **1998**.

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

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

Iwata, S.; Nishino, T.; Nagata, N.; Satomi, Y.; Nishino, H.; Shibata, S., *Biol. Pharm. Bull.*, **1995**, 18, 1710.

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

Kamal, A.; Dastagiri, D.; Ramajah, M. J.; Reddy, J. S.; Bharathi, E. V.; Srinivas, C.; Pushpavalli, S. N. C. V. L.; Pal, D.; Pal-Bhadra, M.; *Chemmedchem.* **2010**, 5, 1947.

Kanakis, C. D.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G.; Diamantoglou, S.; Riahi, H. A. T. *J. Mol. Struc.* **2006**, 798, 69.

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.

Karaki-Doy, T.; Nakagawa, T.; Kasai, T. Y.; Goto, Y., *J. Electrochem. Soc.*, **1995**, 142, 4257.

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

Kawaki, T.; Kobayashi, M.; Hayashi, K.; Watanabe, M.; Honda, W., *Chem. Abst.*, **1989**, 110, 58274y.

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.

Kohler, E. P.; Chadwell, H. M., in *Org. Synth. Coll.*; John Wiley: New York, **1932**, 1, 78.

Kragh-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.

Lawrence, N. J.; Patterson, R.P., Ooi, L.L., Cook, D., Ducki, S., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* **2006**, 16, 5848.

Lee, G. S.; Kim, E. S.; Cho, S. I.; Kim, J. H.; Choi, G.; Ju, Y. S.; Park, S. H.; Jeong, S. I.; Kim, H. I.; *J. Of Soc. Korean. Biol. Chem.* **2010**, 53, 290.

Lee, X. Z.; Liang, Y. R.; Chen, H.; Lu, J. L.; Liang, H. L.; Huang, F. P.; Mamati, E.; *J. Afric. Biotechnol.* **2008**, 7, 4115.

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

Leska, J.; Zaharadnik, P., *Czechoslov. Chem. Commun.*, **1973**, 3365.

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

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

Li, J.; Ren, C.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yao, X.; Hu, Z. *J. Mol. Struc.* **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.
- Mahesha, H. G.; Singh, S. A.; Srinivasan, N.; Rao, A. G. A. *FEBS J.* **2006**, *273*, 451.
- Matsushima, R.; Hirao, I., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1980**, *53*, 518.
- Miller, J. N. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.* **1979**, *16*, 203.
- 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.
- Miquel, J. F., *Comp. Rend.*, **1964**, *254*, 4479.
- Monti, S.; Manet, I.; Manoli, F.; Ottani, S.; Marconi, G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 805.
- Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K. *Protein Chem.* **1996**, *15*, 265.
- Navea, S.; Tauler, R.; Goormaghtigh, E.; De Juan, A. *Protein* **2006**, *63*, 527.
- Oberg, K. A.; Uversky, V. M. *Pro. Pept. Lett.* **2001**, *8*, 297.
- Okuma, O.; Takenochi, M.; Miyagawa, M., *Chem. Abst.*, **1989**, *110*, 66933c.
- 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.
- Pastukhov, A. V.; Levchenko, L. A.; Sadkov, A. P. *J. Mol. Struct.* **2007**, *842*, 60.
- 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.
- 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.
- Regos, I.; Treutter, D.; *J. of. Chromat.* **2010**, *1217*, 6169.
- Rezaie, R.; Mohammad, H.; Navid, M. S. R. *J. Chin. Chem.* **2011**, *29*, 1226.
- 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**.
- Rojas, J.; Paya, M.; Devesa, I.; *Archives of Pharmacol.* **2003**, *368*, 233.
- Rojas, J.; Paya, M.; Dominguez, J. N.; *Bioorganic & Med. Chem.* **2002**, *12*, 1954.
- Ross, P. D.; Subramanian, S. *Biochem.* **1981**, *20*, 3096.
- Sashida, Y.; Ogawa, K. M.; Kitada, M.; Karikone, H.; Mimaki, Y.; Shimomura, H., *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 709.
- Satyanarayana, M.; Tiwari, P.; Tripathi, B. K.; Srivastava, A. K.; Pratap, R; *Bioorganic & Medicinal Chem.* **2004**, *12*, 889.
- Schellenberg, W. D.; Jakoby, H., *Chem. Abst.*, **1961**, *55*, 7119e.
- Schuetz, S. A.; Bowman, E. A.; Sivernail, C. M.; *J. of. Orga. Chem.* **2005**, *690*, 1017.
- Schuster, D. I.; Dunn, D. A.; Heibel, G. E.; Brown, P. B.; Rao, J. M.; Woning, J.; Bonneau, R., *J. Am. Chem. Soc.*, **1991**, *113*, 6245.
- Sean, W. R.; Hao, C.; Hanxiao, J.; *J. Mol. Cataly.* **2010**, *66*, 263.
- Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *299*, 400.
- 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.

Shih, C.H; Chu, H; Tang, L. K; Sakamoto, W.; Maekewa, M.; Chu, I. K.; Wang, M.; Lo, C.; *J of botany*.**2008**. 228, 1054.

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

Solániová, E.; Toma, S.; Gronowitz, S., *Org. Mag. Res.*, **1976**, *8*, 439.

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

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

Sudlow, G.; Birkett, D. J.; Wade, D. N. *Mol. Pharmacol.* **1975**, *11*, 824.

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

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

Sulkowska, A.; Bojko, B.; Równicka, J.; Rezner, P.; Sułkowski, W. W. *J. Mol. Struct.* **2005**, *744*, 781.

Swain, C. G.; Lupton, E. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1968**, *90*, 4328.

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.

Trager, J.; Hartner, S.; Heinzer, J.; Kim, Hc.; Hampp, N.; *Chem. Physics. Letters.* **2008**. 455, 310.

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.

Wagner, P. J.; Thomas, M. J.; Puchalsk, A. E., *J. Am. Chem. Soc.*, **1986**, *108*, 7739.

Wagner, P. J.; Truman, R. J.; Scaiano, J. C., *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 7093.

Walczak, B.; Dreux, M.; Chretien, J. R., *Chomatographia*, **1991**, *31*, 575;

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

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

Warpeha, K. M.; Gibbons, J., Carol, A.; Slusser, J.; Tree, R.; Durham, W.; Kaufman, L. S.; *Plant. And. Enviroment.* **2008**. *31*, 1770.

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, 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.

Yamauchi, S.; Hirota, N.; Higuchi, J., *J. Phys. Chem.*, **1988**, *92*, 2129.

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. Struc.* **2008**, *888*, 25.

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

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

[www.ioc.fiocruz.br/peptides2008/pdf/dicroismo\\_circular.pdf](http://www.ioc.fiocruz.br/peptides2008/pdf/dicroismo_circular.pdf), visitada em 03/03/2010.

[www.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/](http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/), visitada em 03/03/2010.

[www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf](http://www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf), visitada em 03/03/2010.

## 7 ANEXO

Os espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) em estão mostrados nas Figuras: 27, 39, 51, 63, 75 e 87.

Os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) a T=298 K, em chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) estão mostrados nas Figuras: 28, 40, 52, 64, 76 e 88.

Os gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pelas chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) estão mostrados nas Figuras: 29, 41, 53, 65, 77 e 89.

Os gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) estão mostrados nas Figuras: 30, 42, 54, 66, 78, e 90.

Os gráficos de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) estão mostrados nas Figuras: 31, 43, 55, 67, 79 e 91.

Os gráficos de  $\text{Log}(F_0-F)/F$  versus  $\text{log}[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), estão mostrados nas Figuras: 32, 44, 56, 68, 80 e 92.

A sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e T = 288 K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV das chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), estão mostrados nas Figuras: 33, 45, 57, 69, 81 e 93.

A sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e T = 293 K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV das chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), estão mostrados nas Figuras: 34, 46, 58, 70, 82 e 94.

A sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e T = 298 K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV das chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) estão mostrados nas Figuras: 35, 47, 59, 71, 83 e 95.

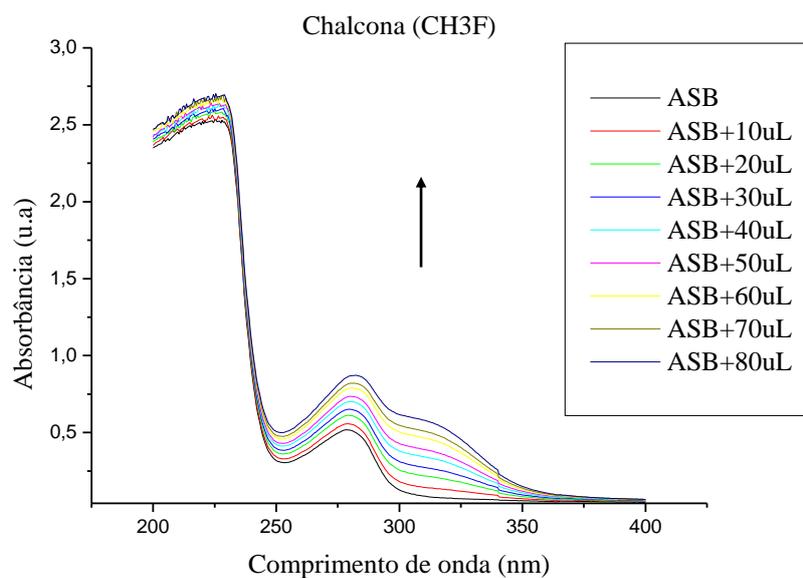
Os espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalconas (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, a T = 288 K estão mostrados nas Figuras: 36, 48, 60, 72, 84 e 96.

Os espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, a T = 293 K, estão mostrados nas Figuras: 37, 49, 61, 73, 85 e 97.

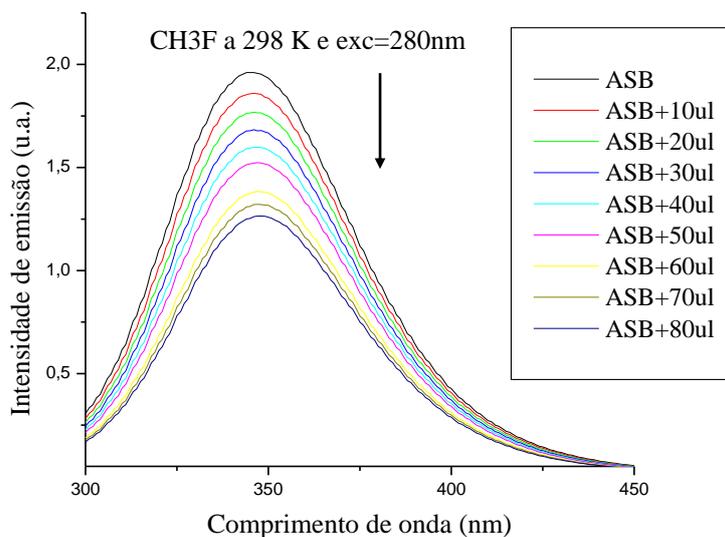
Os espectros de dicroísmo circular ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F) nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32, a T = 298 K, estão mostrados nas Figuras: 38, 50, 62, 74, 86 e 98.

Os espectros de absorção no UV-Vis de chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F, CH2356F) em etanol (ETOH).  $C_{chs} = 1,00 \times 10^{-5}$ . Estão mostrados nas Figuras: 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105.

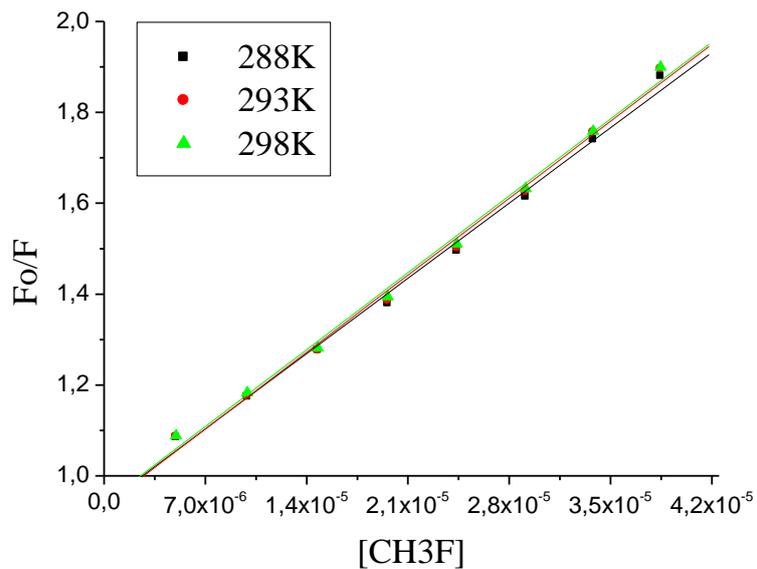
**Tabela 16.** MRE calculado em 208nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) em chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), T = 288 K, 293 K e 298 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CHs,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CHs} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$  e  $32,30$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L.



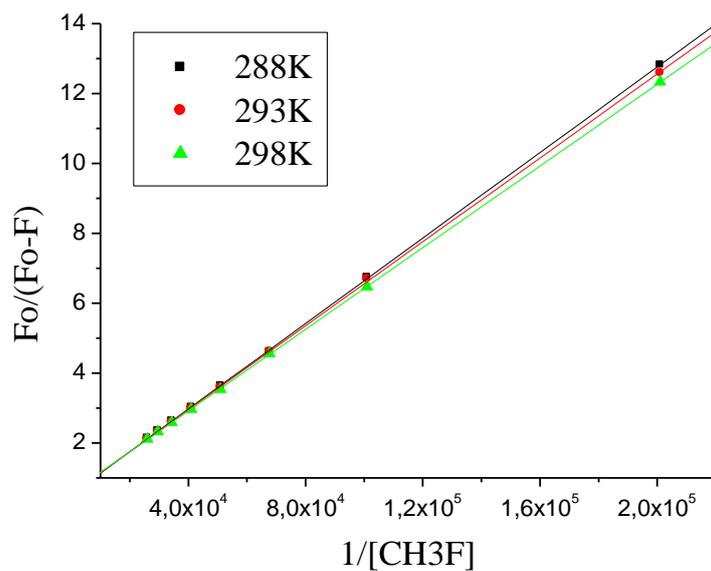
**Figura 27.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH3F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; e 2,70$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L.



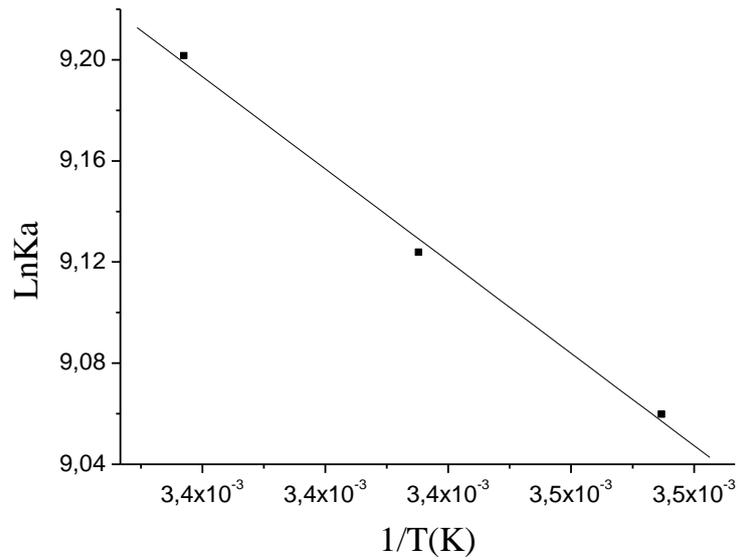
**Figura 28.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH3F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67$  e ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K.



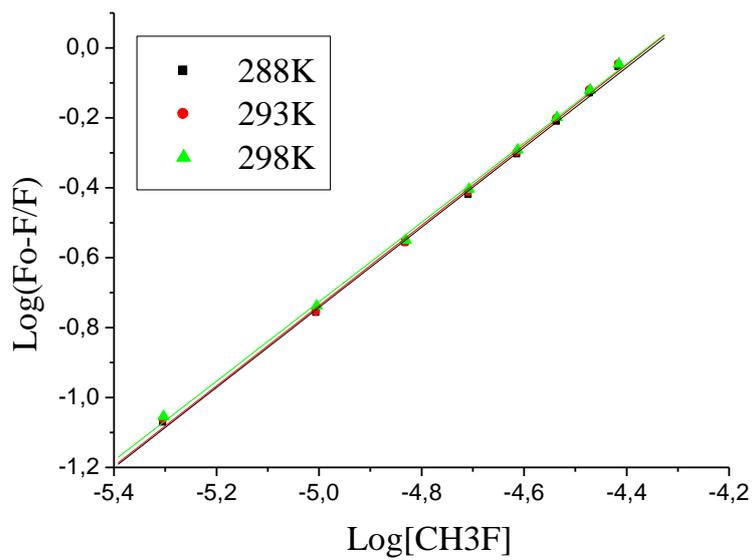
**Figura 29.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH<sub>3</sub>F).



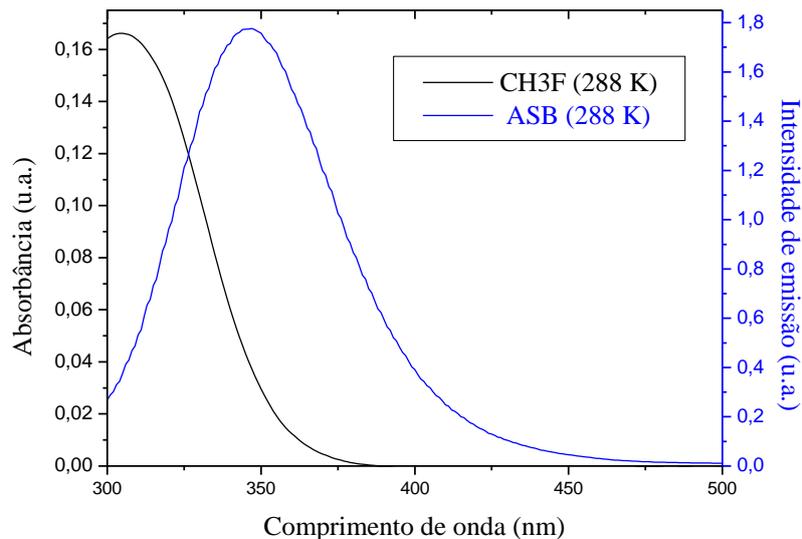
**Figura 30.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH<sub>3</sub>F).



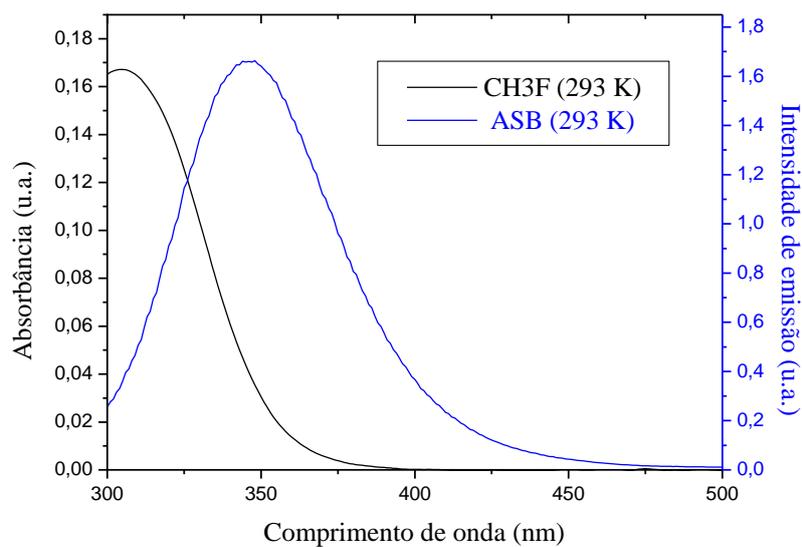
**Figura 31.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH3F).



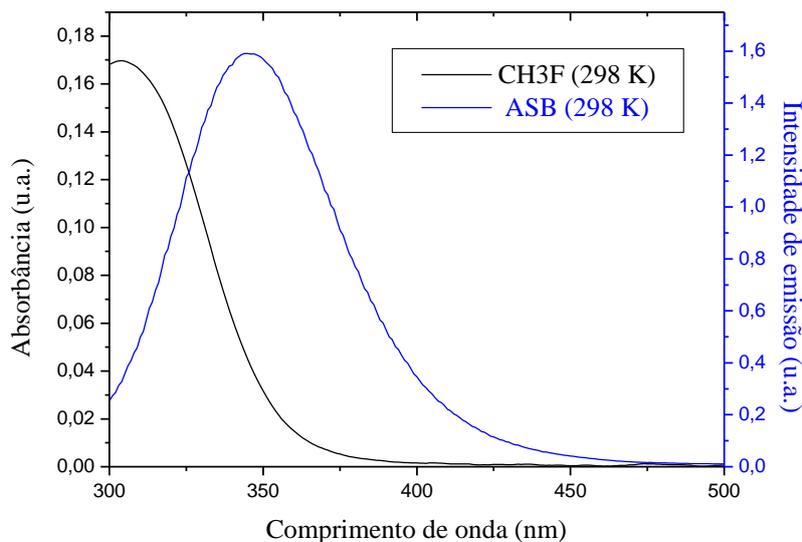
**Figura 32.** Gráfico de  $\text{Log}(F_0-F)/F$  versus  $\text{log}[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH3F).



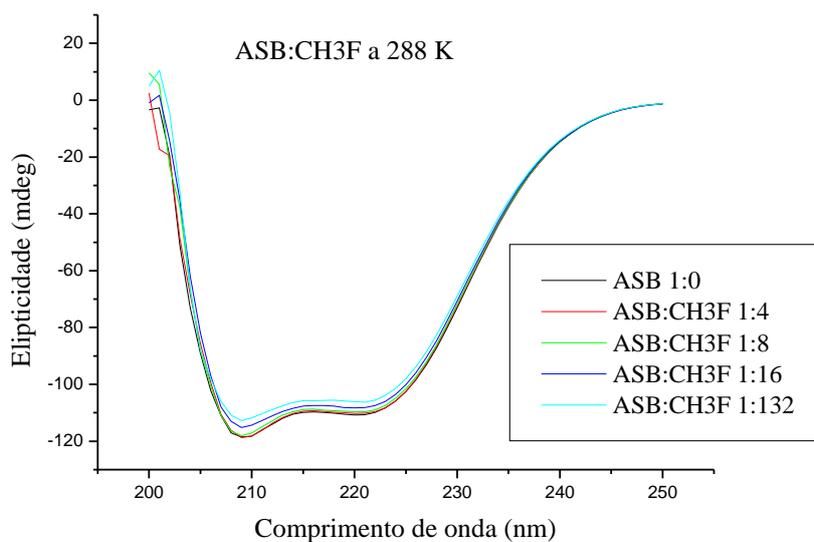
**Figura 33.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 288 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH3F).  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH3F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



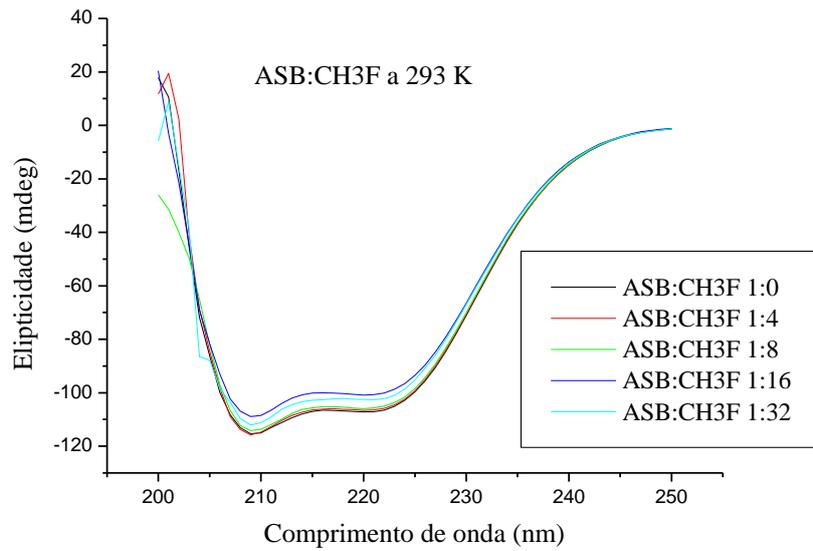
**Figura 34.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 293 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH3F).  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH3F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



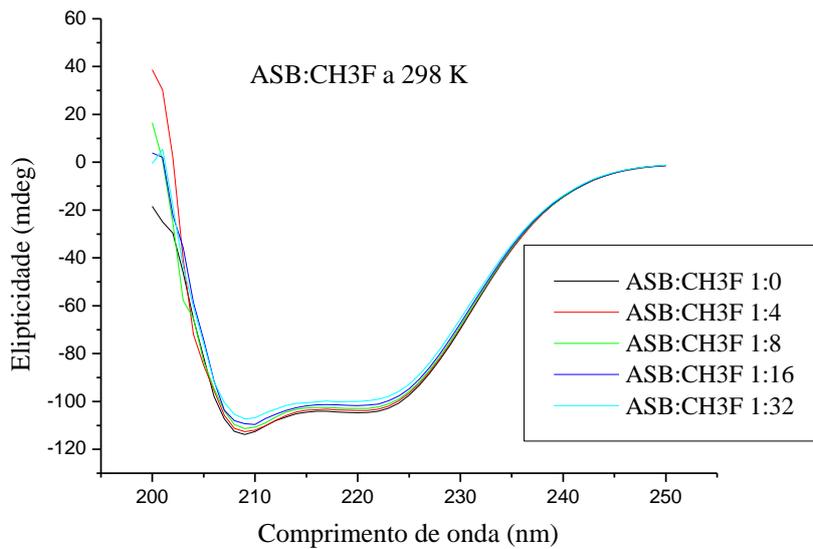
**Figura 35** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 298 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH3F).  $C_{ASB} = C_{CH3F} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



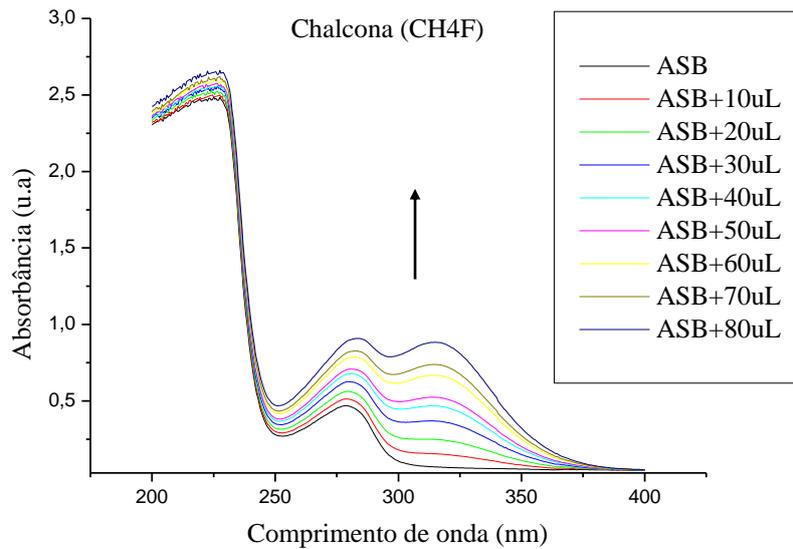
**Figura 36.** Espectros de dicroísmo circular para ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) em chalcona (CH3F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH3F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  e  $C_{CH3F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (\times 10^{-6}) \text{ mol/L}$ , a  $T = 288 \text{ K}$ .



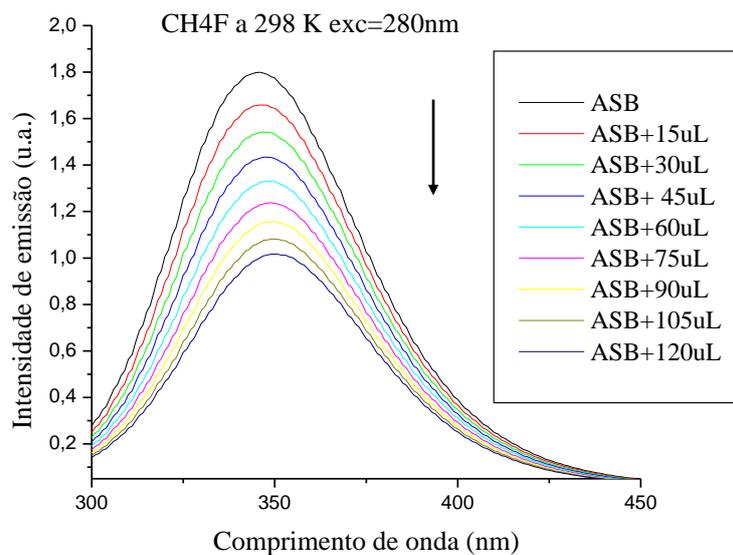
**Figura 37.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH3F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH3F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K.



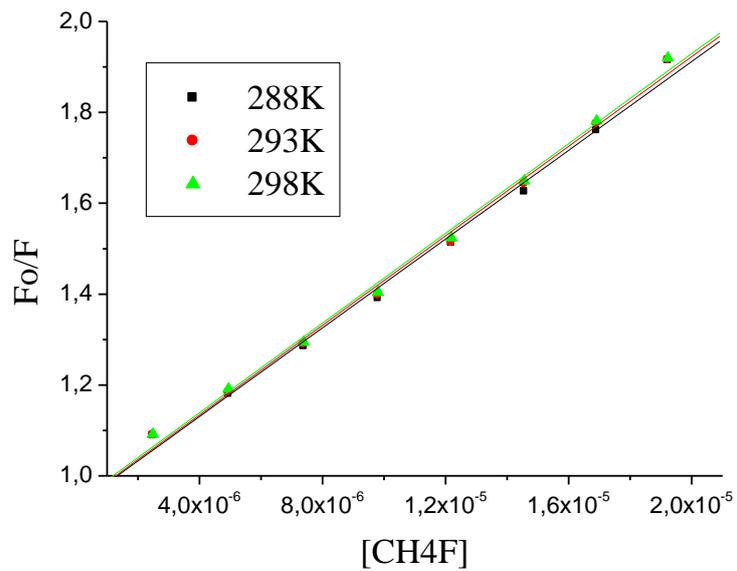
**Figura 38** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH3F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH3F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH3F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K.



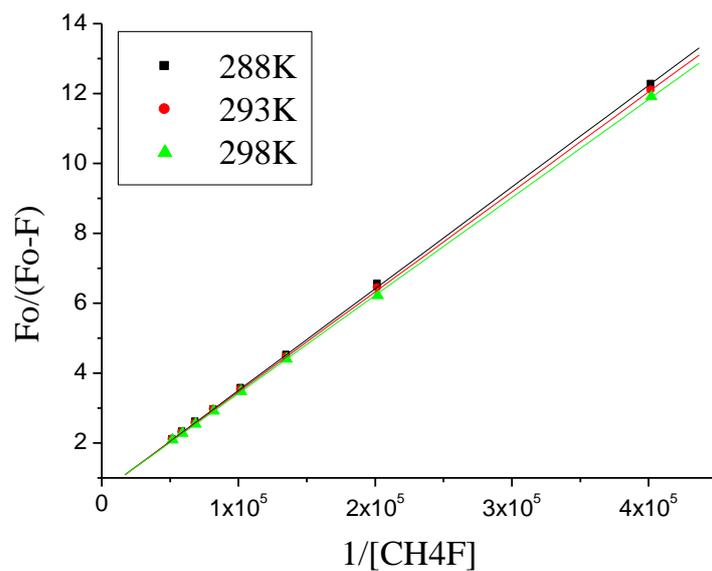
**Figura 39.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH4F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36$  e  $2,70 (x 10^{-5})$  mol/L.



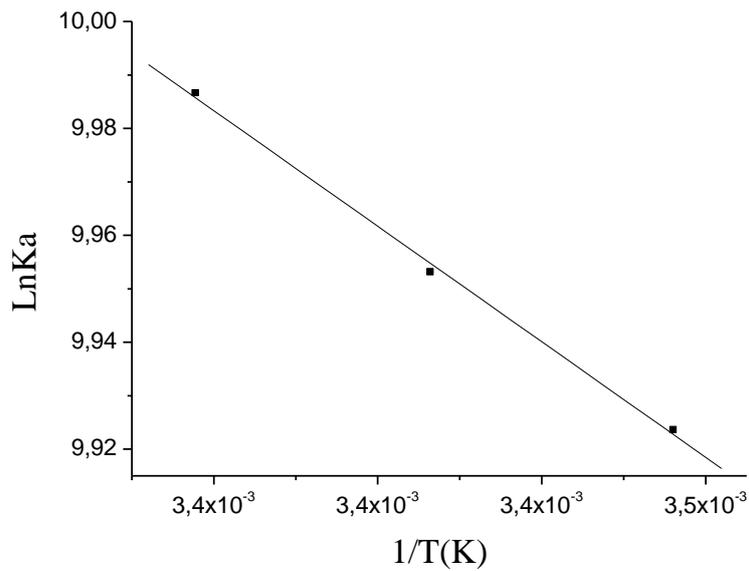
**Figura 40.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH4F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38$  e  $3,84 (x 10^{-5})$  mol/L, a  $T = 298$  K.



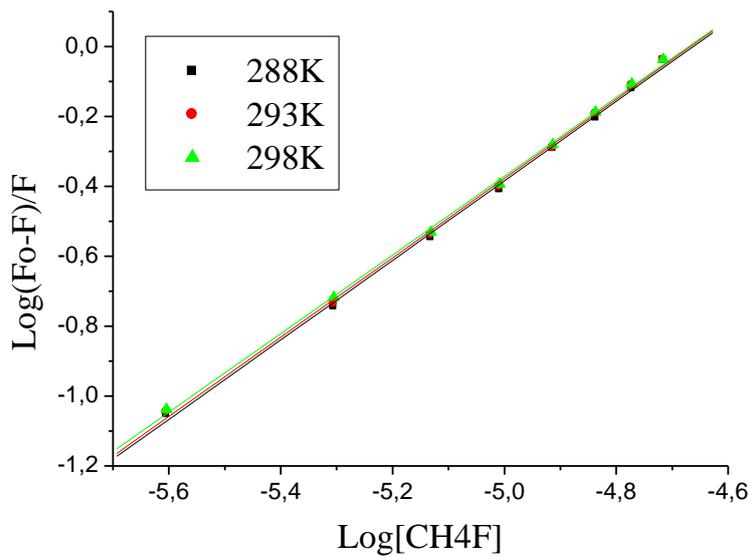
**Figura 41.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F).



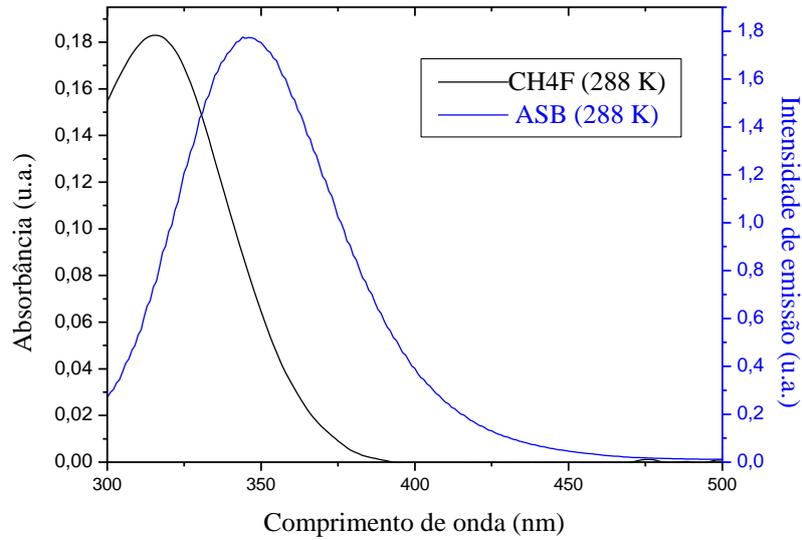
**Figura 42.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F).



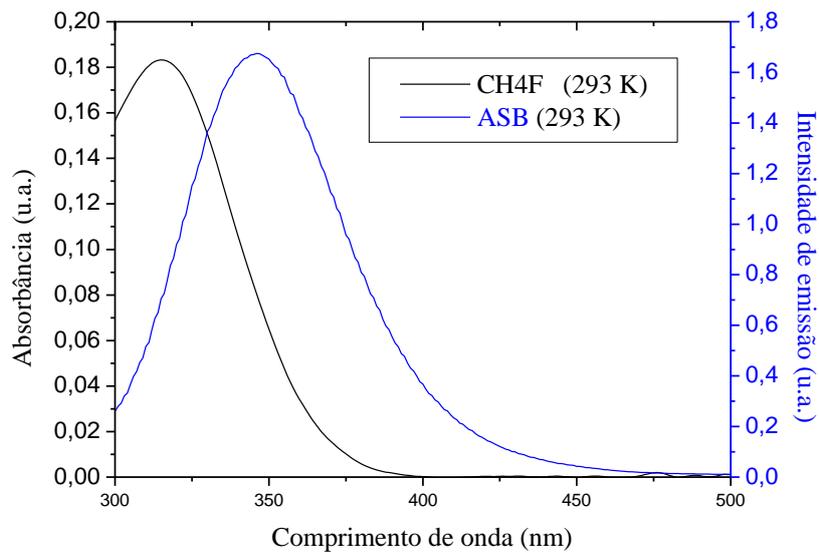
**Figura 43** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F).



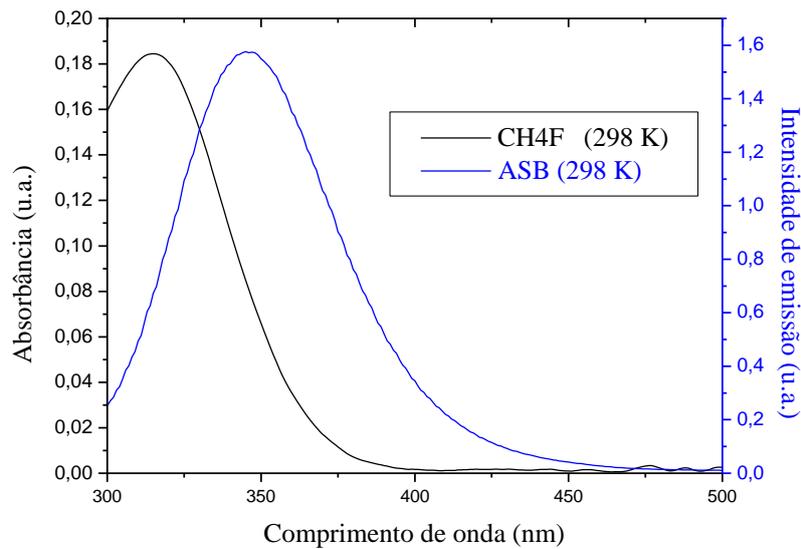
**Figura 44.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH4F).



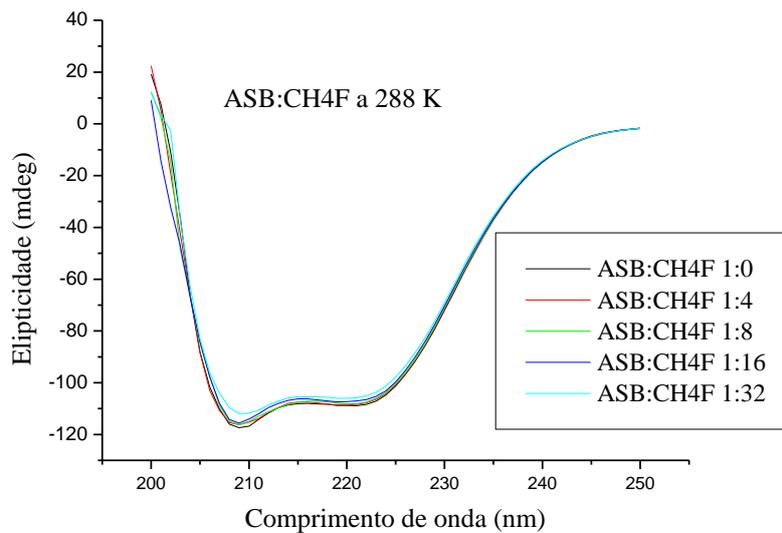
**Figura 45.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 288 \text{ K}$ ) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH4F).  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH4F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



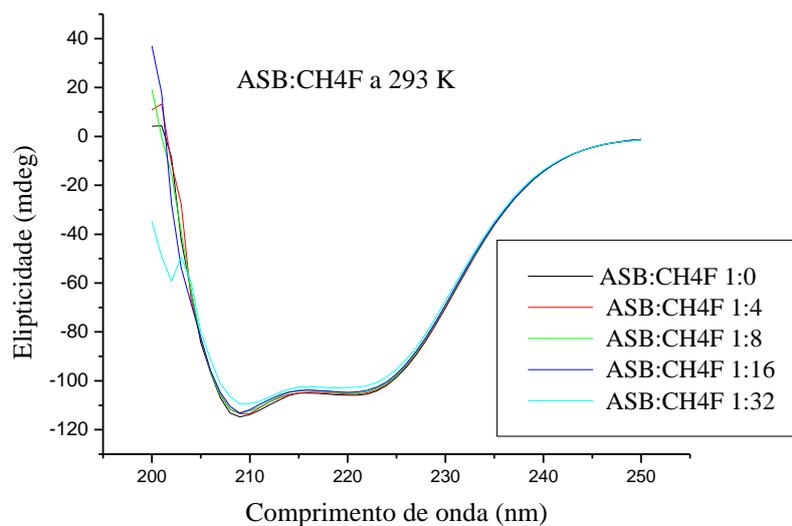
**Figura 46.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 293 \text{ K}$ ) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH4F).  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH4F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



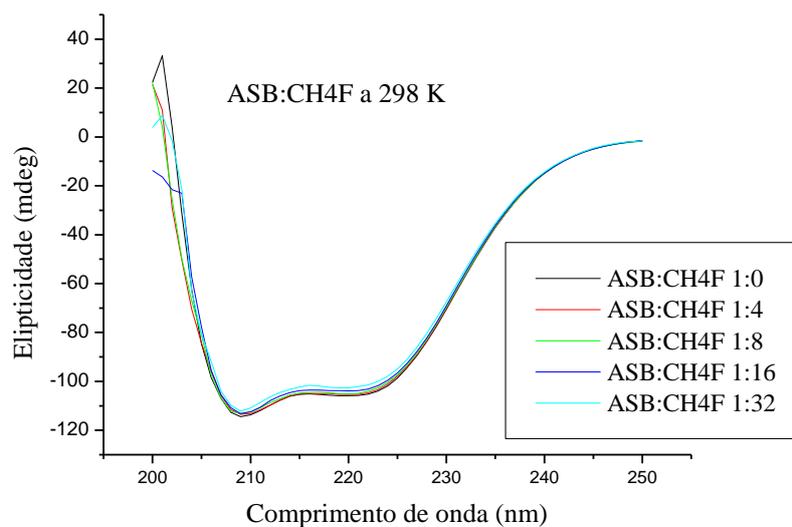
**Figura 47.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH4F).  $C_{ASB} = C_{CH4F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



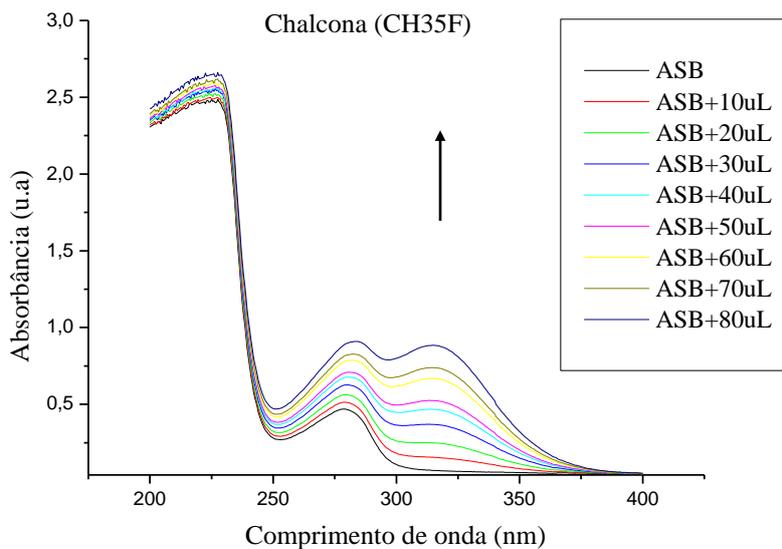
**Figura 48.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB: CH4F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K.



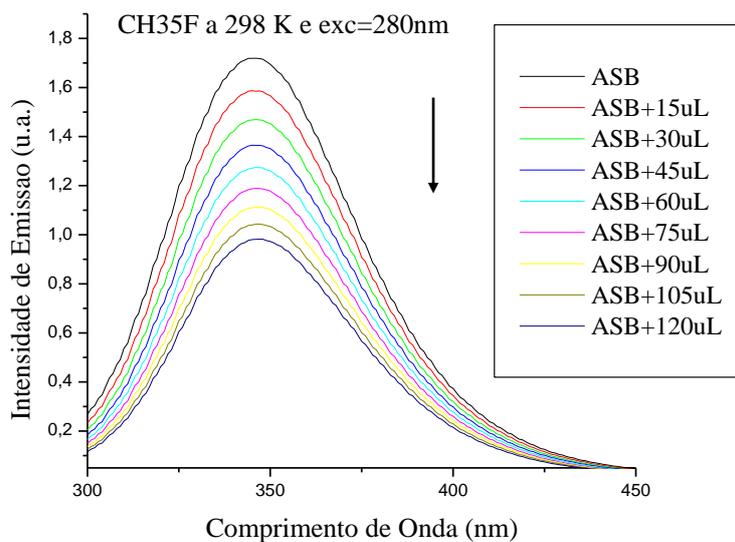
**Figura 49.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH4F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (x 10^{-6})$  mol/L, a  $T = 293$  K.



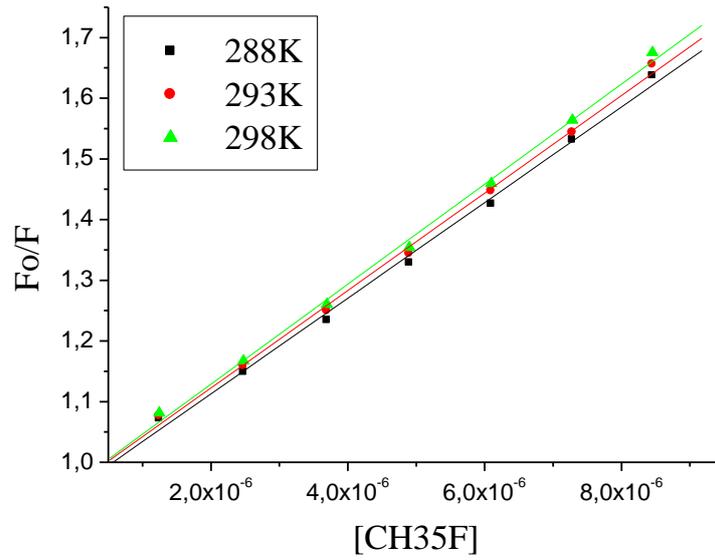
**Figura 50.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB: CH4F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH4F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (x 10^{-6})$  mol/L, a  $T = 298$  K.



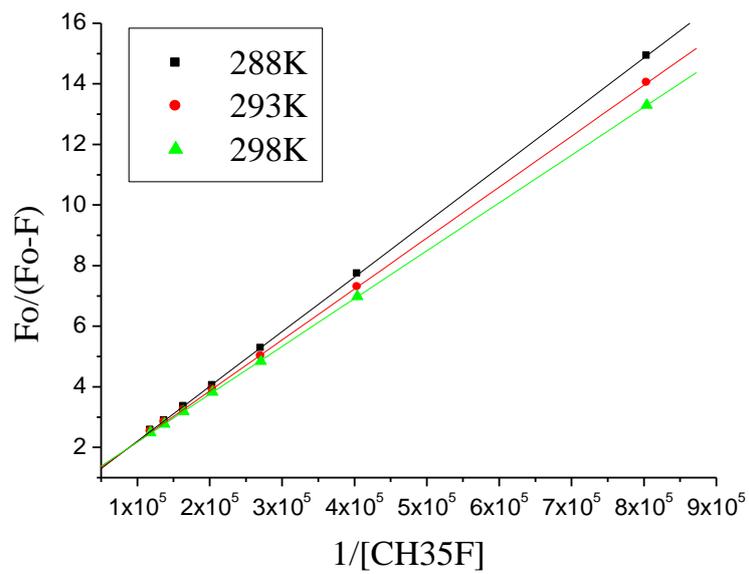
**Figura 51.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH35F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36$  e  $2,70 ( \times 10^{-5})$  mol/L.



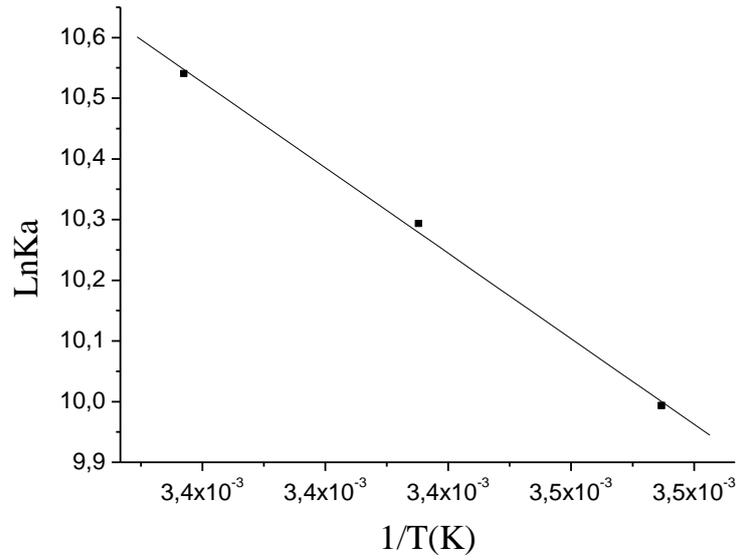
**Figura 52.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH35F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38$  e  $3,84 ( \times 10^{-5})$  mol/L, a  $T = 298$  K.



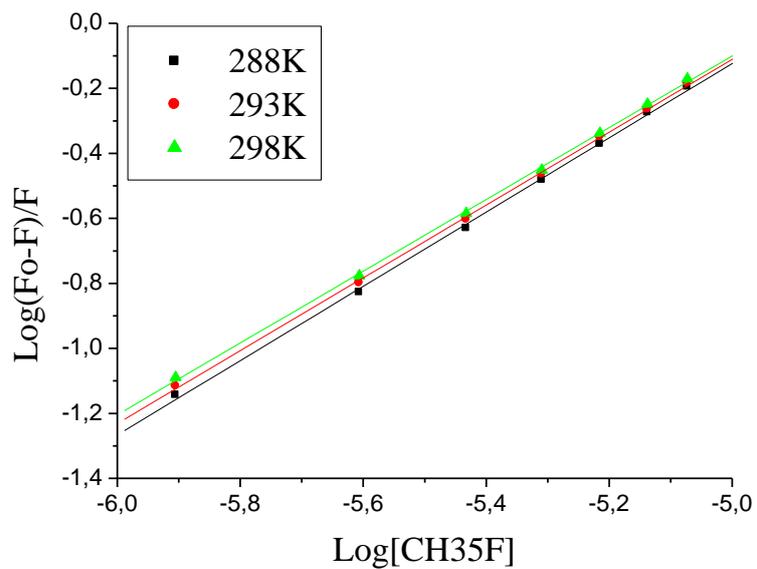
**Figura 53.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F).



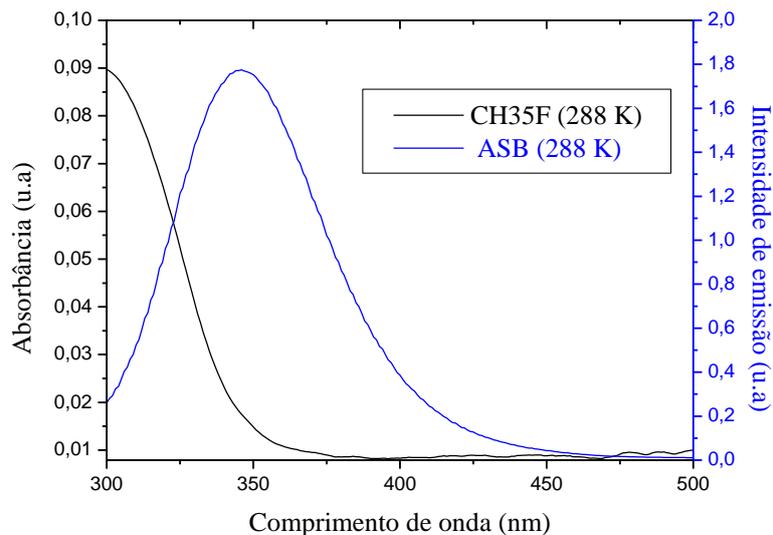
**Figura 54.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F).



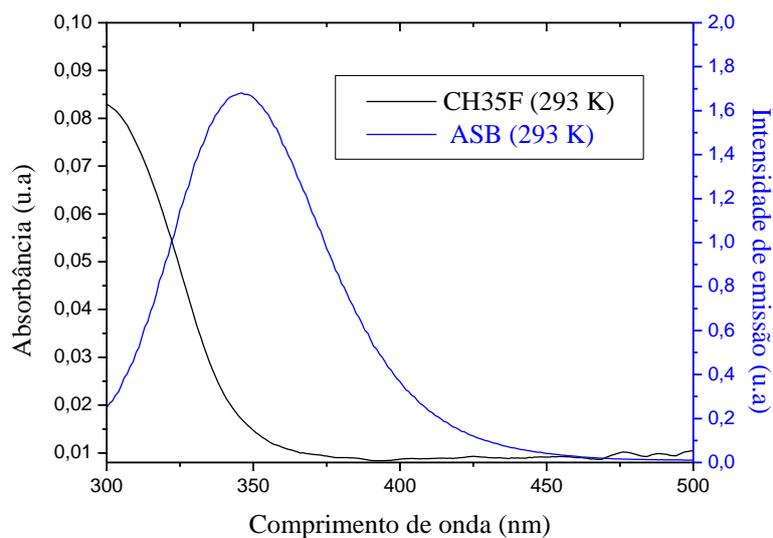
**Figura 55.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F).



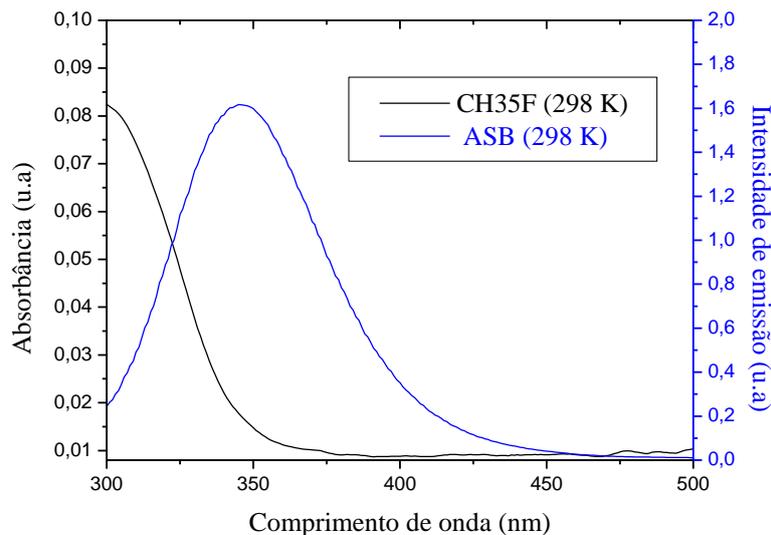
**Figura 56.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH35F).



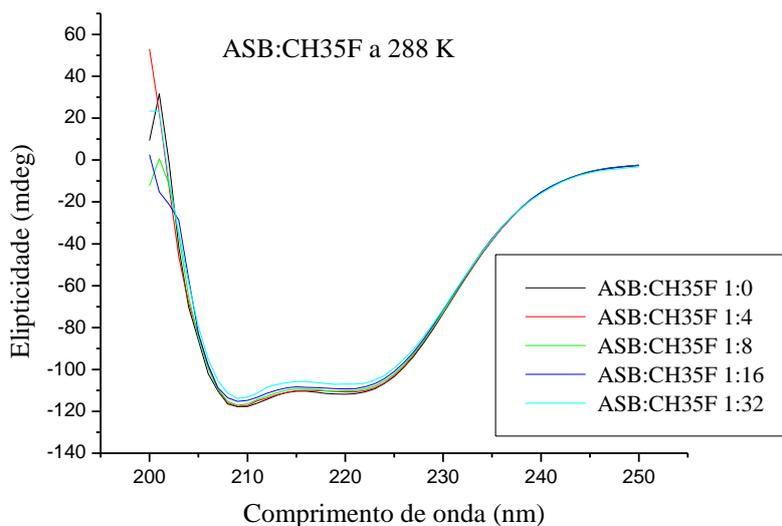
**Figura 57.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH35F)  $C_{ASB} = C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



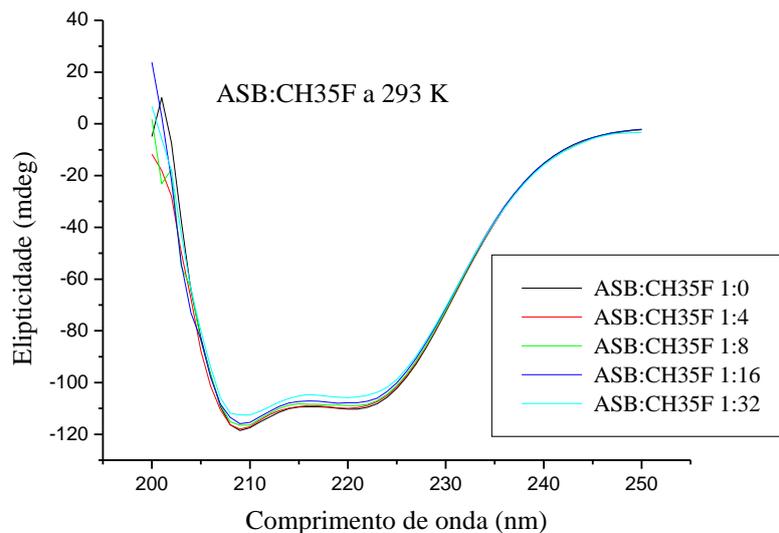
**Figura 58.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH35F)  $C_{ASB} = C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



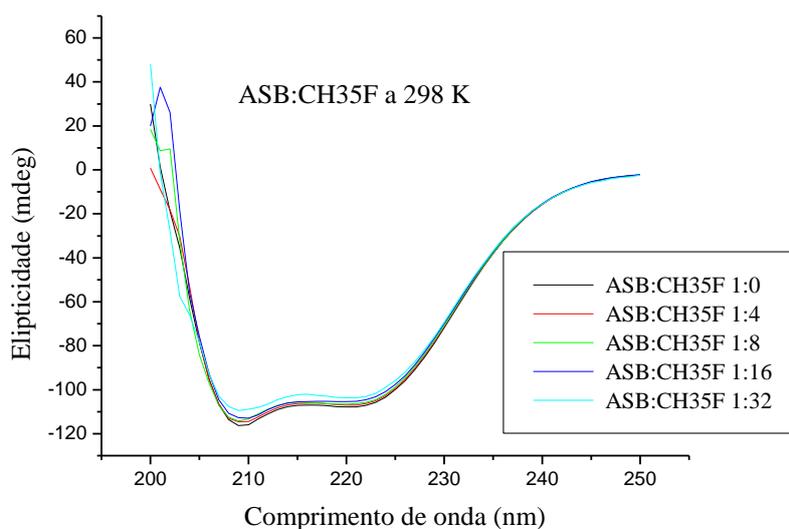
**Figura 59.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH35F)  $C_{ASB} = C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



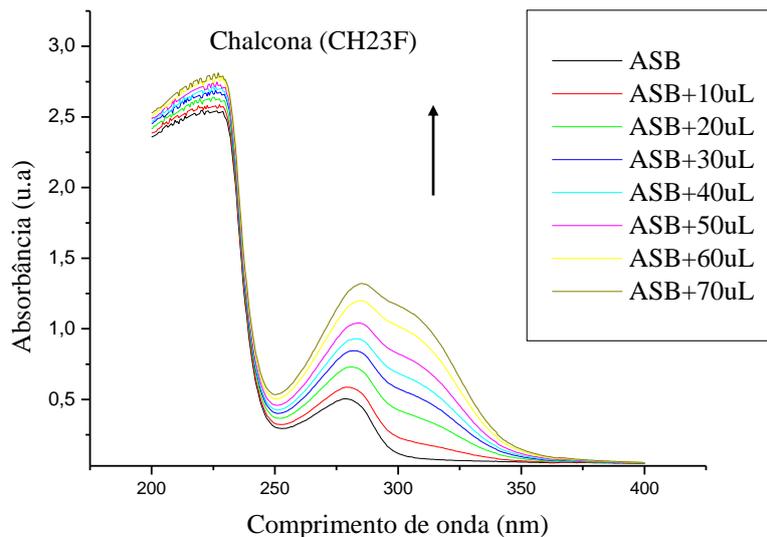
**Figura 60.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH35F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K.



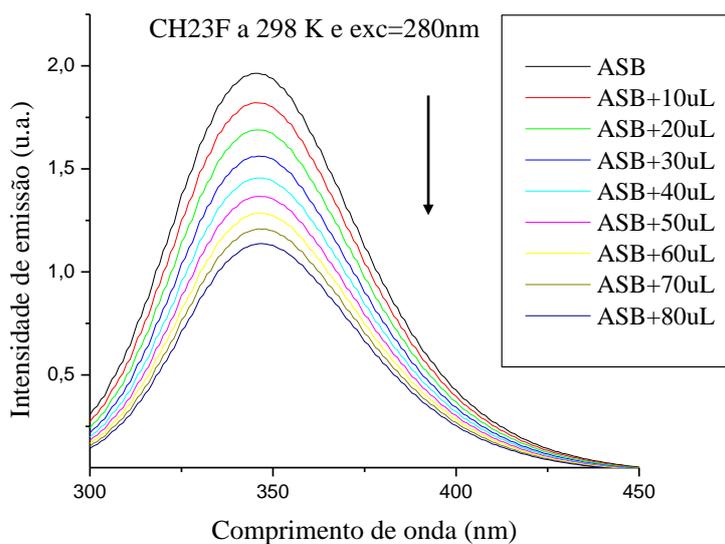
**Figura 61.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH35F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K.



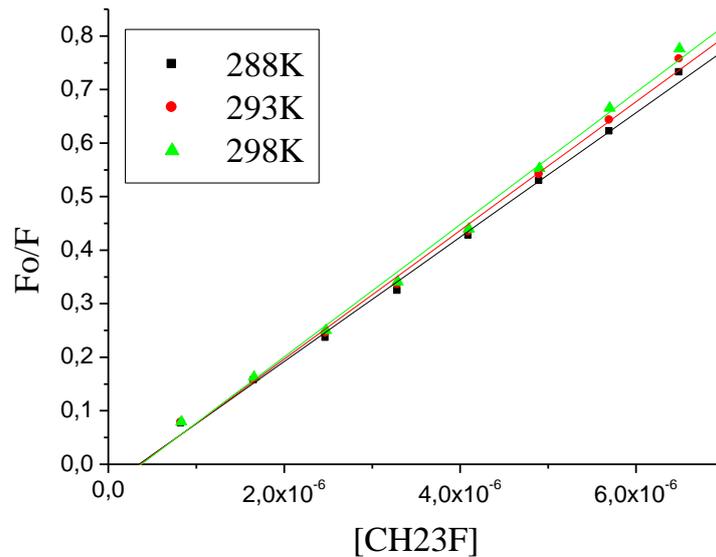
**Figura 62.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH35F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH35F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH35F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K.



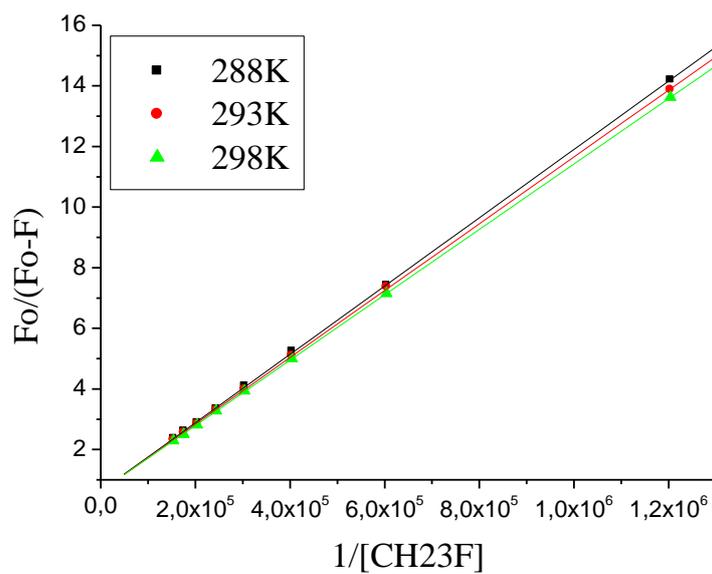
**Figura 63.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH23F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02$  e  $2,36 (x 10^{-5})$  mol/L.



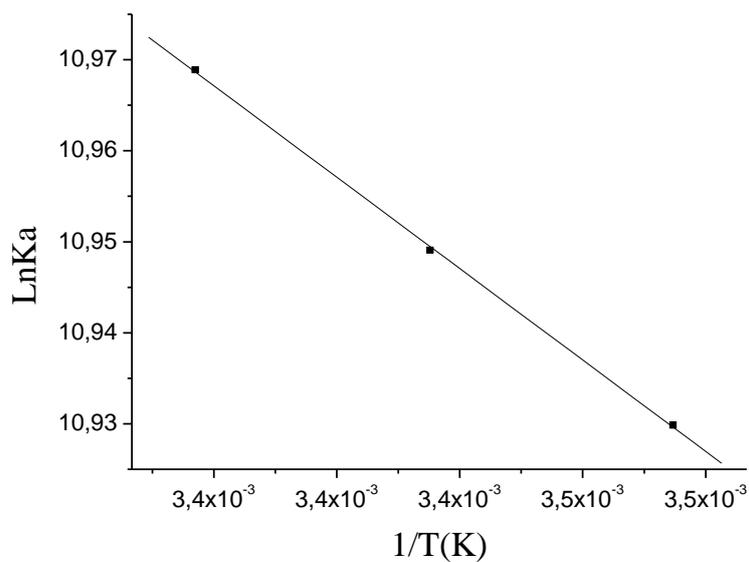
**Figura 64.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH23F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67$  e  $(x 10^{-5})$  mol/L, a  $T = 298$  K.



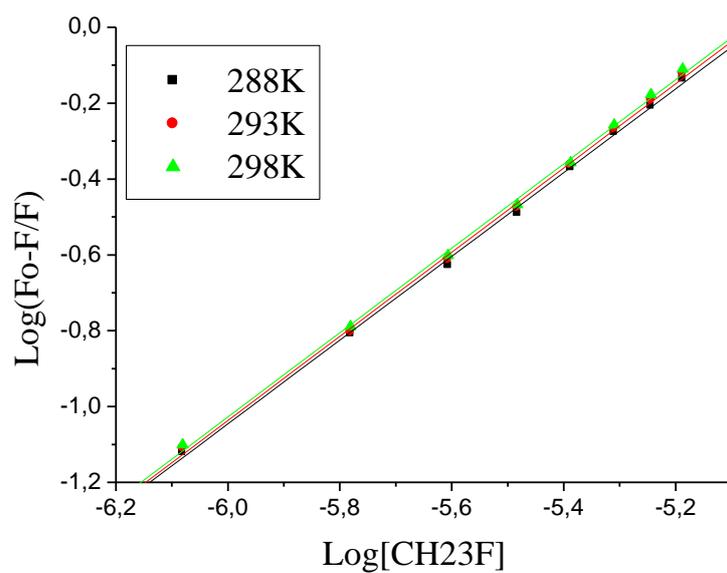
**Figura 65.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F).



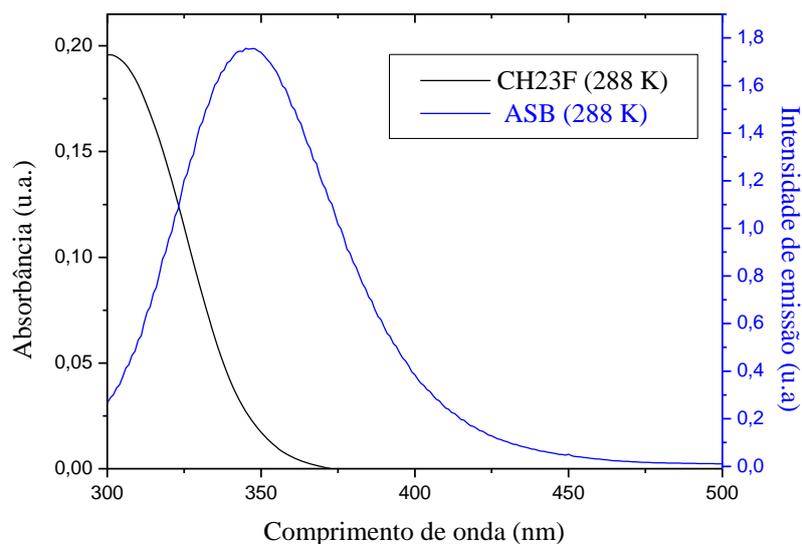
**Figura 66.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F).



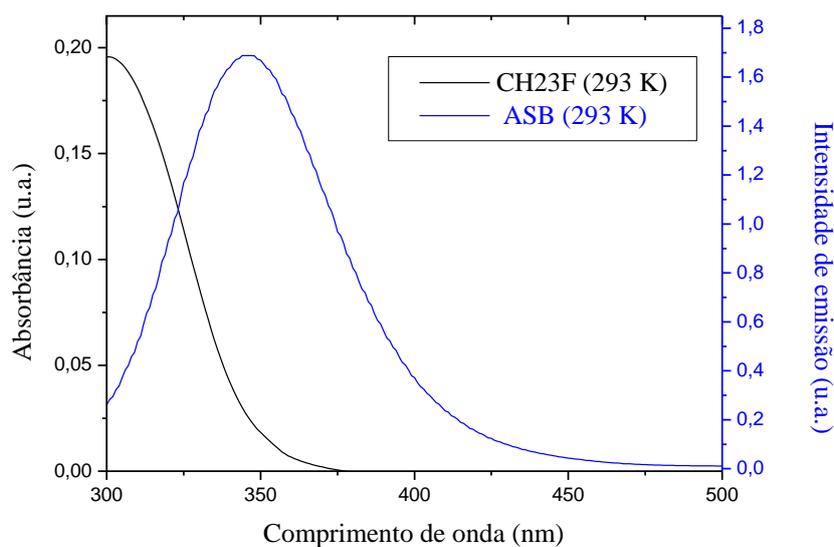
**Figura 67.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F).



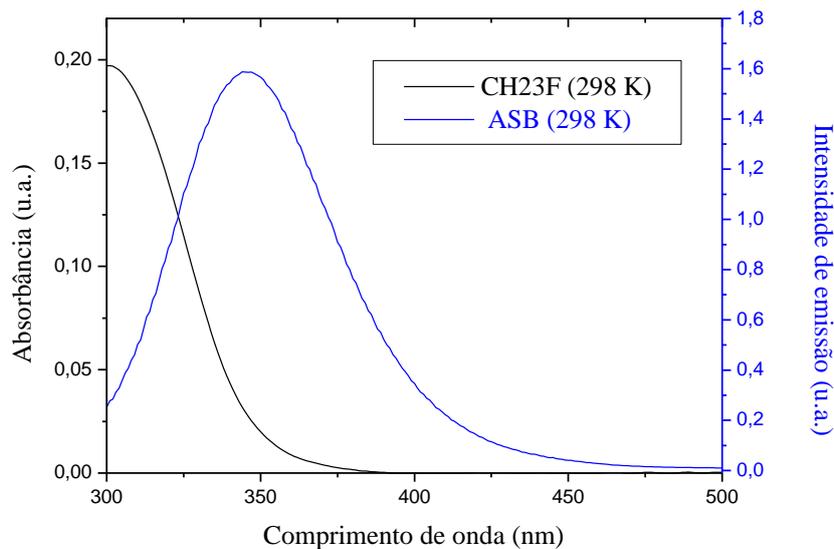
**Figura 68.** Gráfico de  $\log(F_0-F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH23F).



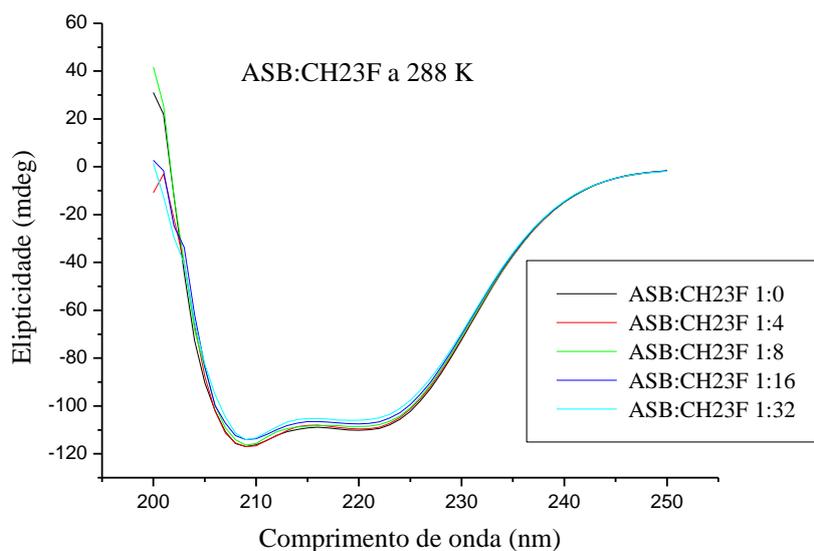
**Figura 69.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH23F)  $C_{ASB} = C_{CH23F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



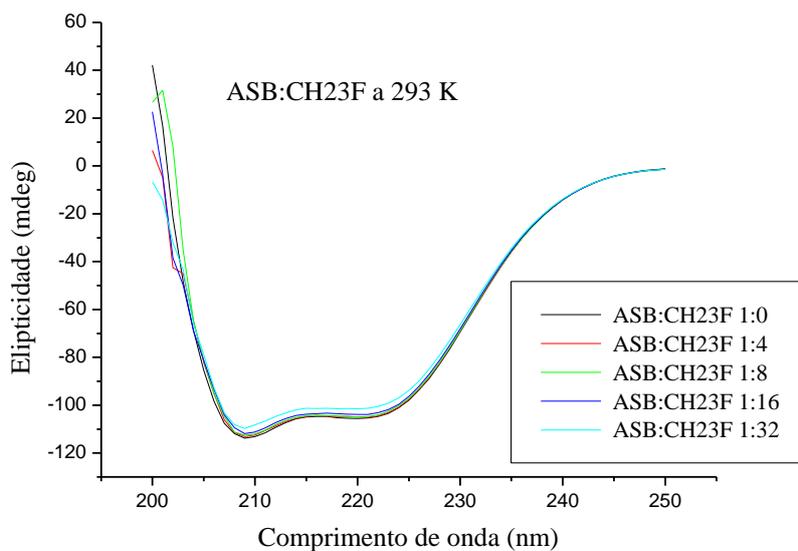
**Figura 70.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH23F)  $C_{ASB} = C_{CH23F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



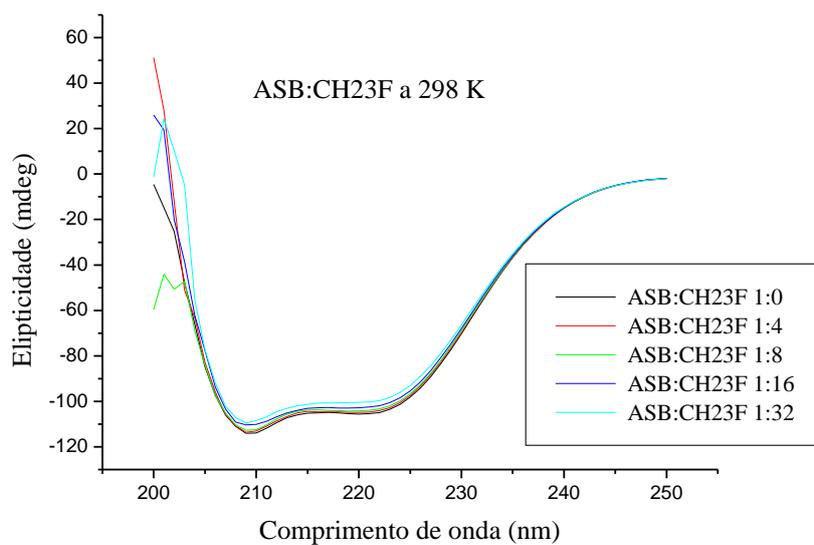
**Figura 71.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH23F)  $C_{ASB} = C_{CH23F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



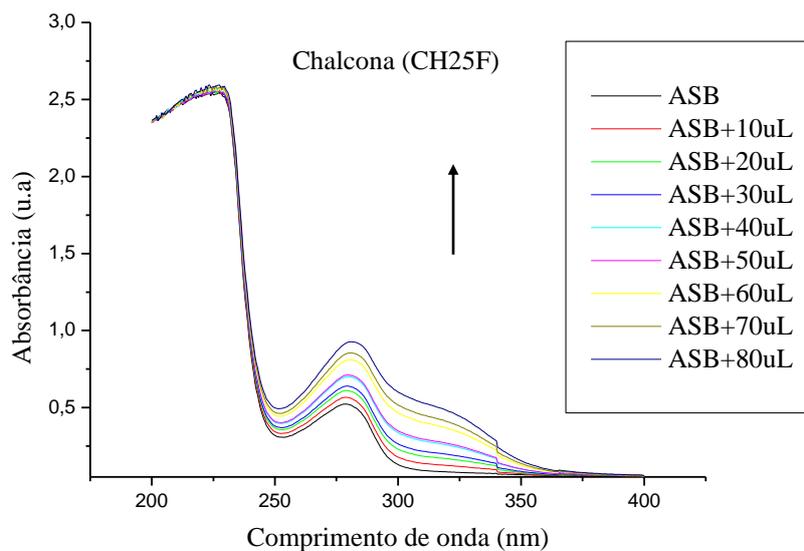
**Figura 72.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH23F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH23F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K.



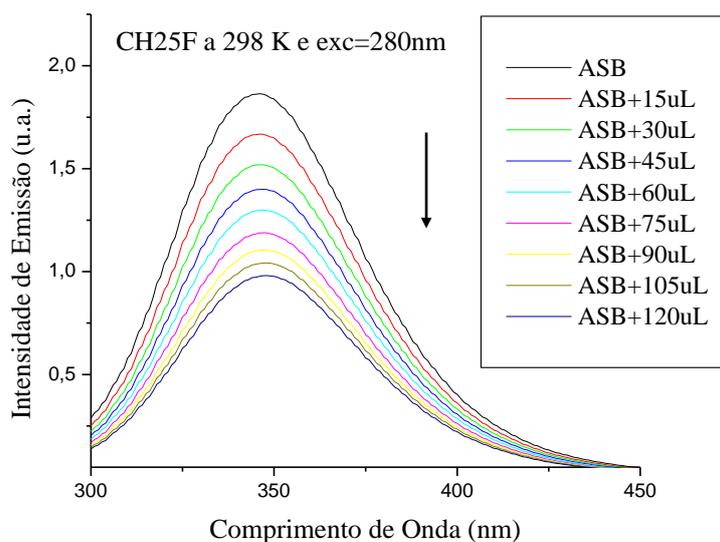
**Figura 73.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH23F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH23F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K.



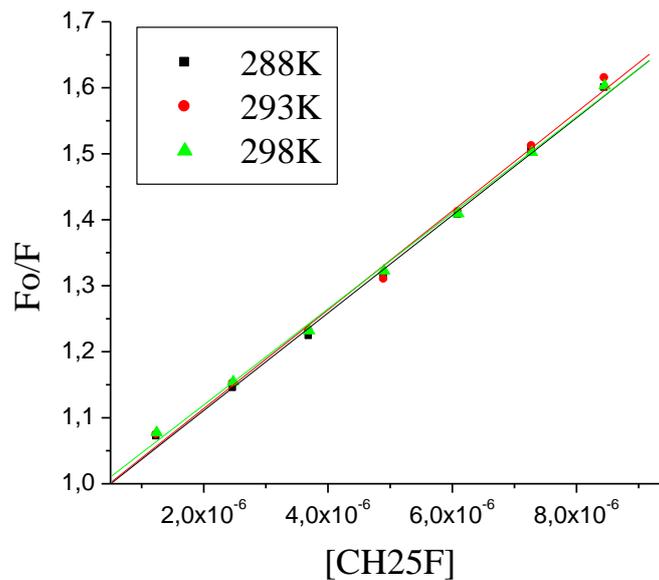
**Figura 74.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH23F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH23F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH23F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K.



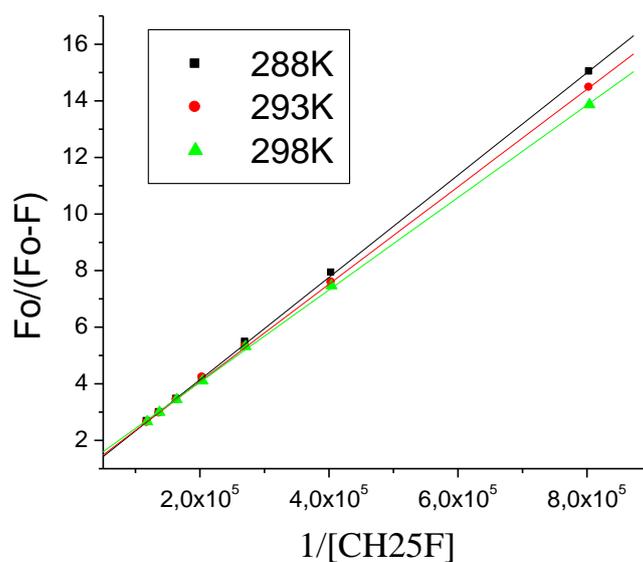
**Figura 75.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH25F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36$  e  $2,70 (x 10^{-5})$  mol/L.



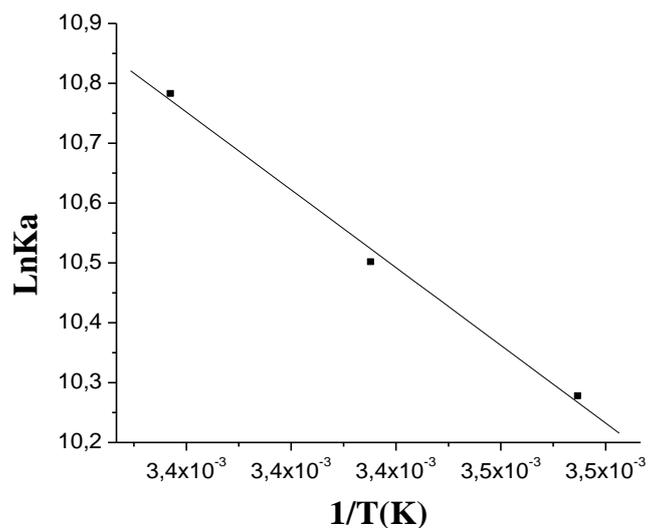
**Figura 76.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH25F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 0,12; 0,24; 1,47; 1,96; 2,43; 2,91; 3,38$  e  $3,84 (x 10^{-5})$  mol/L, a  $T = 298$  K.



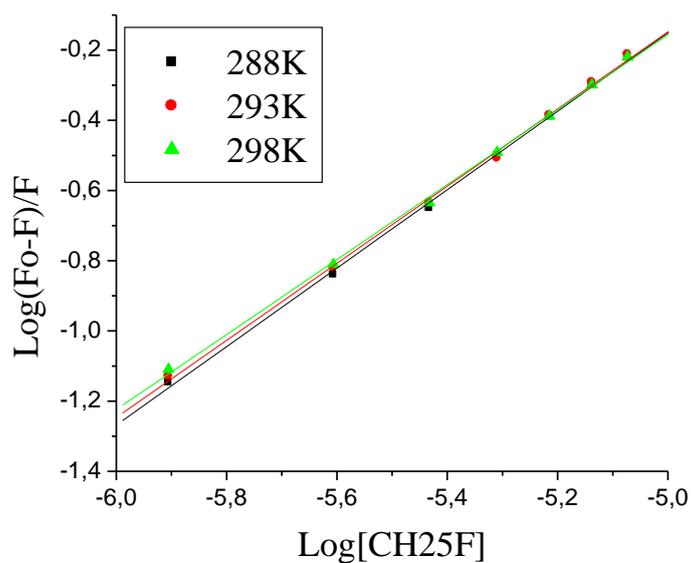
**Figura 77.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F).



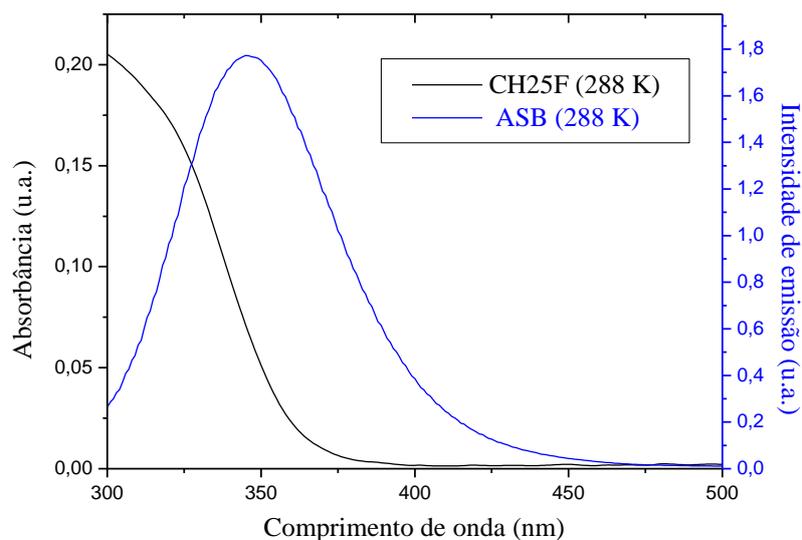
**Figura 78.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F).



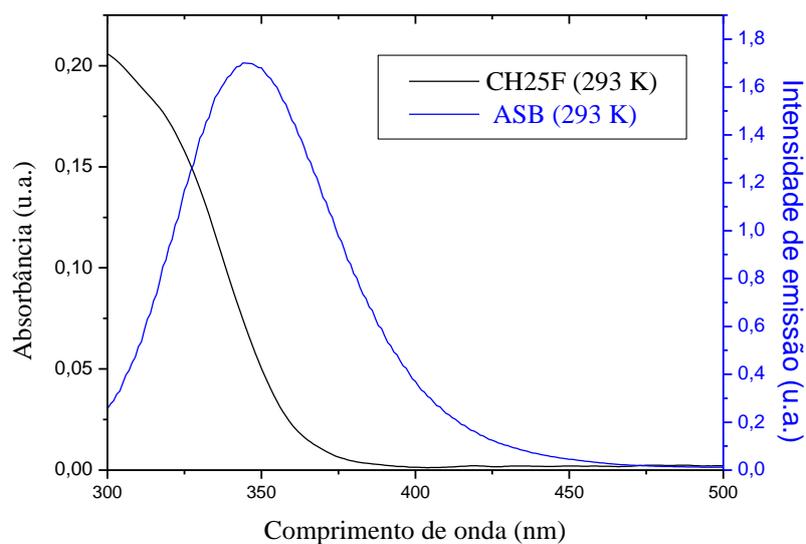
**Figura 79.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F).



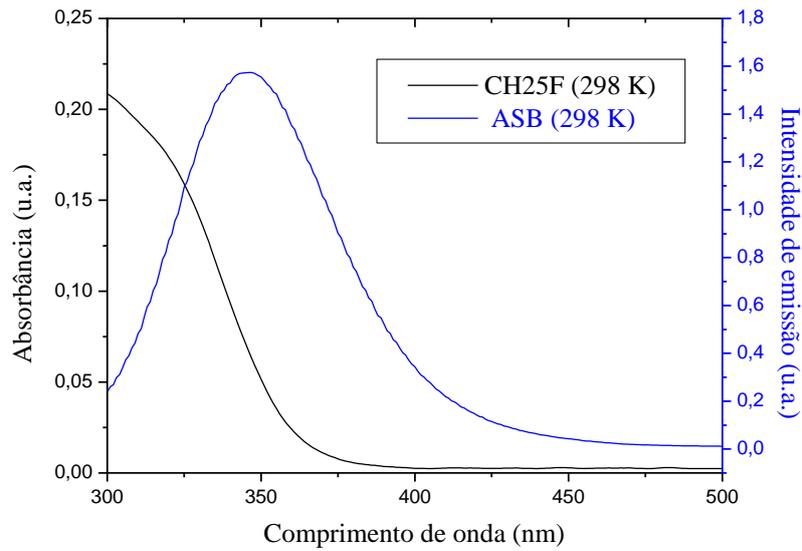
**Figura 80.** Gráfico de  $\log(F_0 - F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH25F).



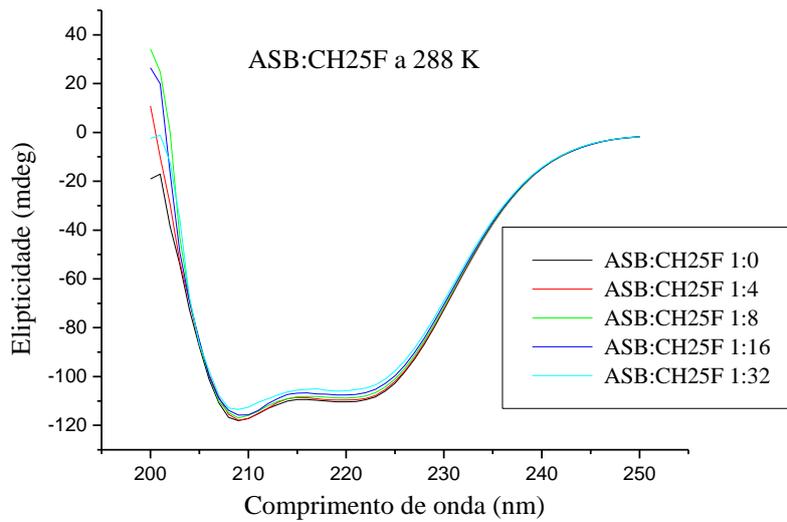
**Figura 81.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 288 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH25F)  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH25F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



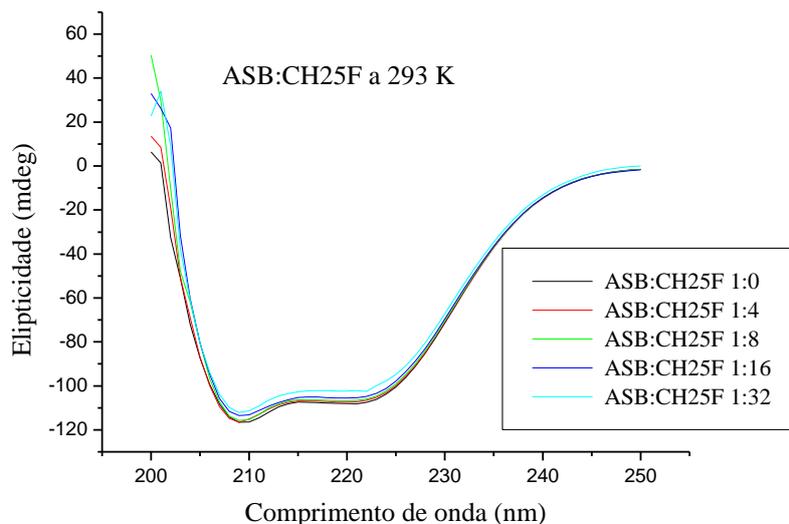
**Figura 82.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 293 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH25F)  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH25F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



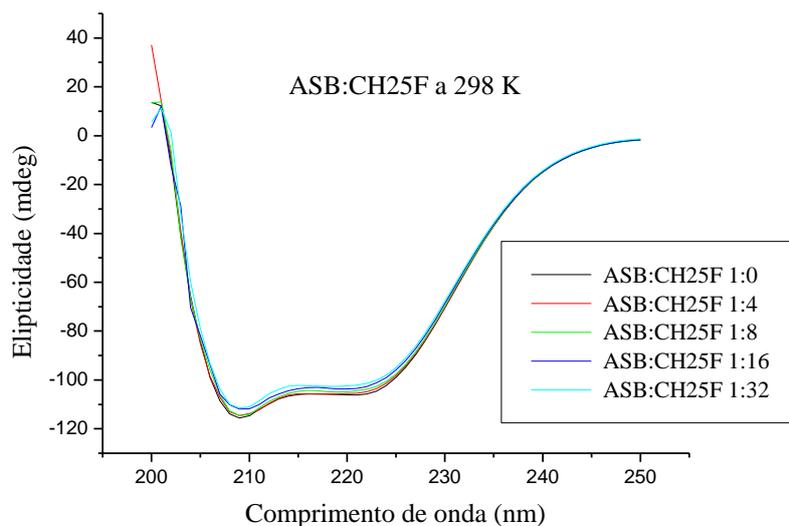
**Figura 83.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 298$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH25F)  $C_{ASB} = C_{CH25F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



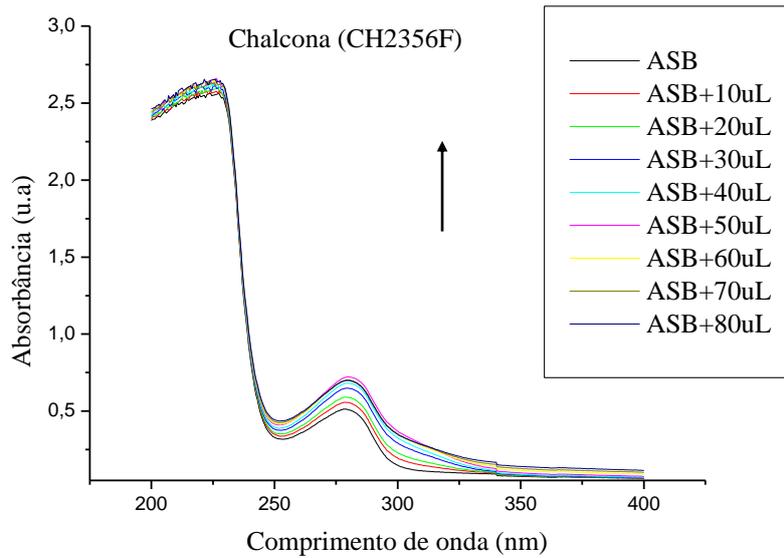
**Figura 84.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH25F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH25F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 288$  K.



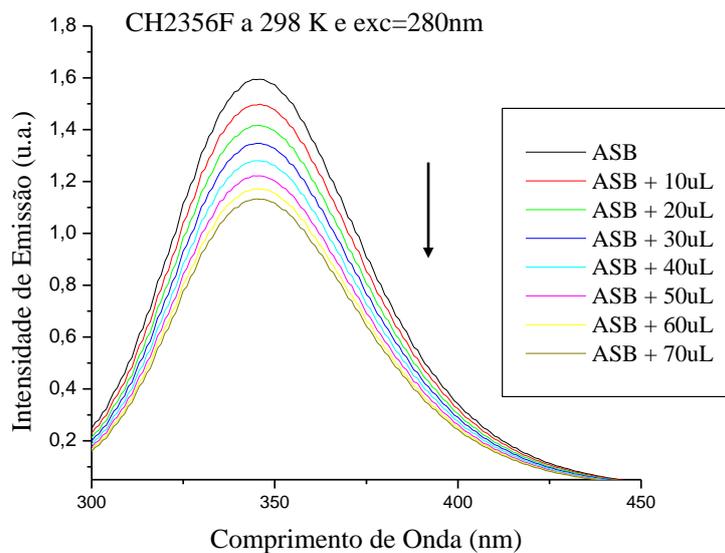
**Figura 85.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH25F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH25F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (x 10^{-6})$  mol/L,  $(x 10^{-6})$  mol/L, a  $T = 293$  K.



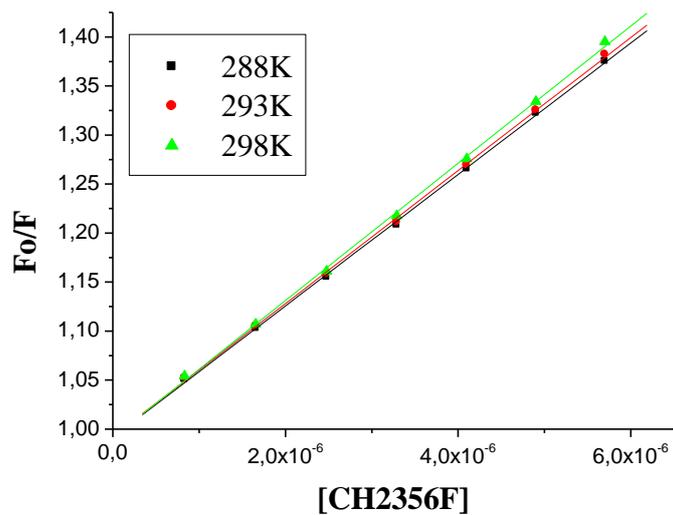
**Figura 86.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH25F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH25F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH25F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00 (x 10^{-6})$  mol/L,  $(x 10^{-6})$  mol/L, a  $T = 298$  K.



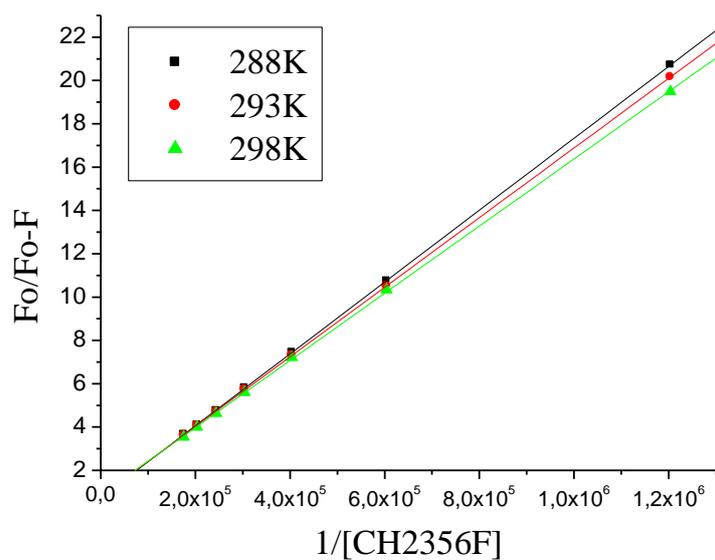
**Figura 87.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona (CH2356F),  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36$  e  $2,70$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L.



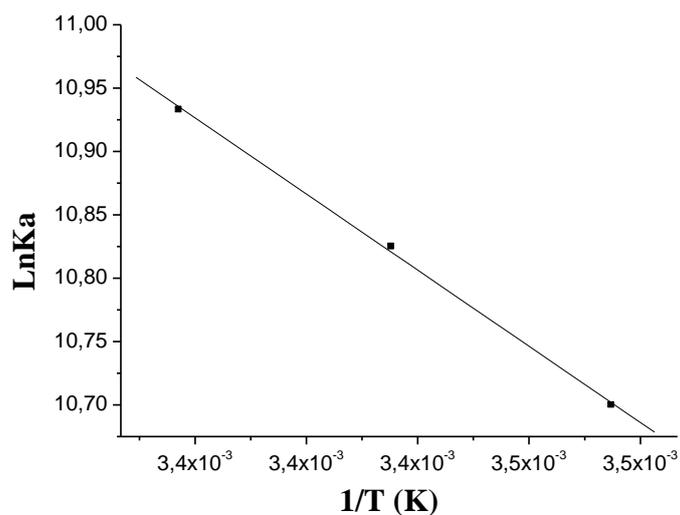
**Figura 88.** Espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) para solução de ASB tamponada com PBS (pH = 7,4) em chalcona CH2356F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; e 0,60$  ( $\times 10^{-5}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K.



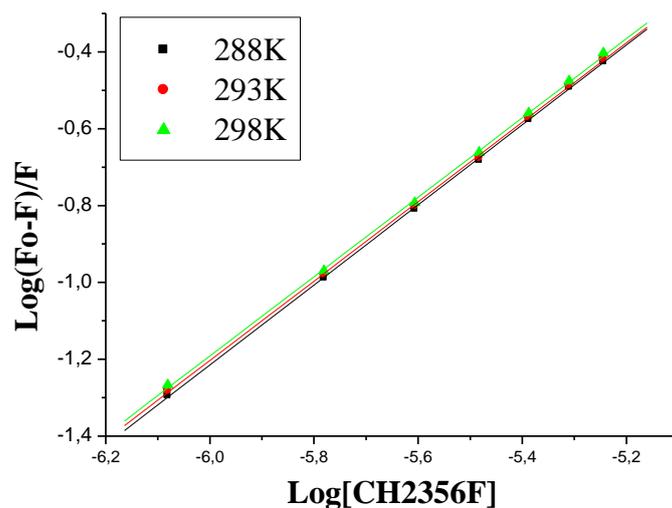
**Figura 89.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F).



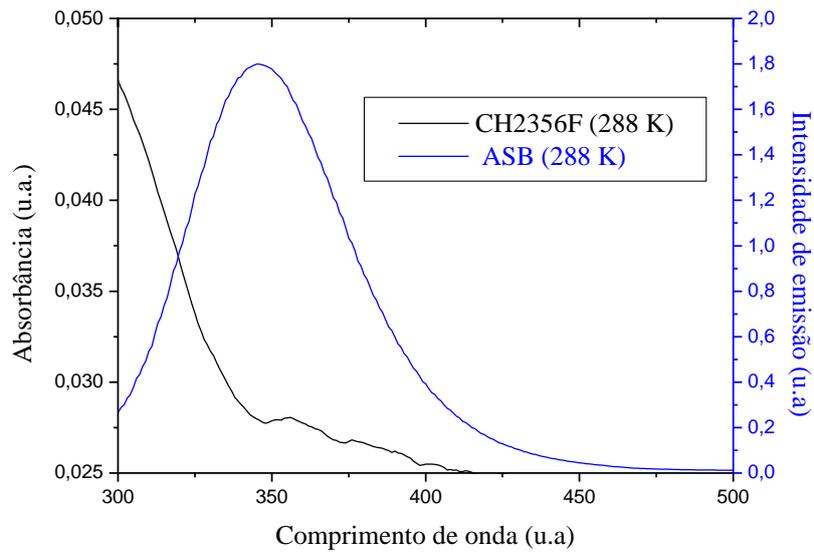
**Figura 90.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F).



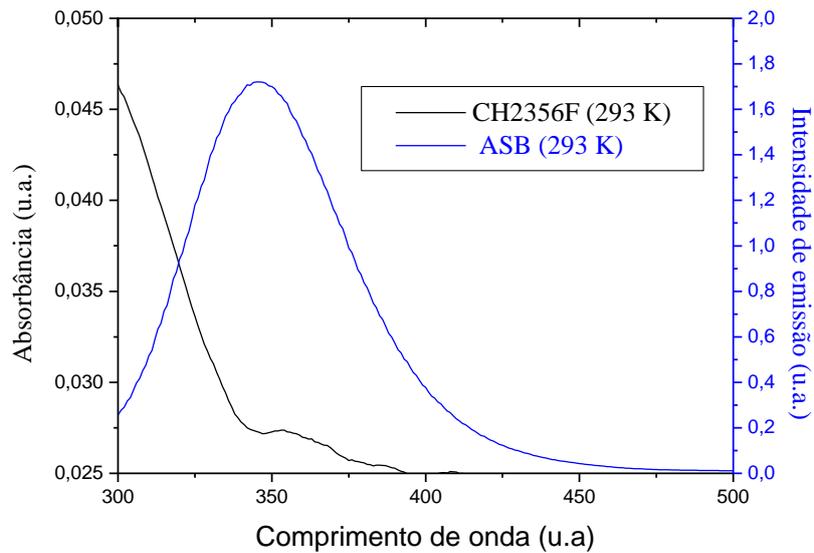
**Figura 91.** Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F).



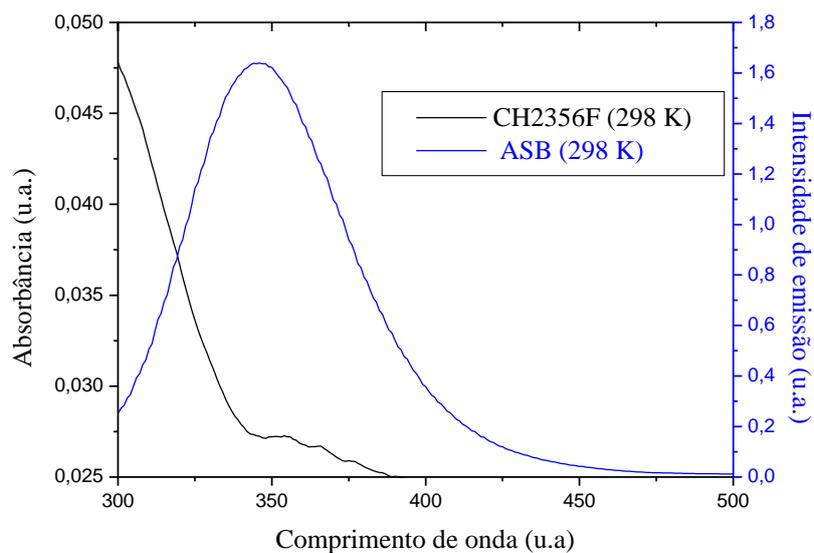
**Figura 92.** Gráfico de  $\log(F_0 - F)/F$  versus  $\log[Q]$  para a supressão de fluorescência de ASB ( $\lambda_{exc} = 280$  nm) pela chalcona (CH2356F).



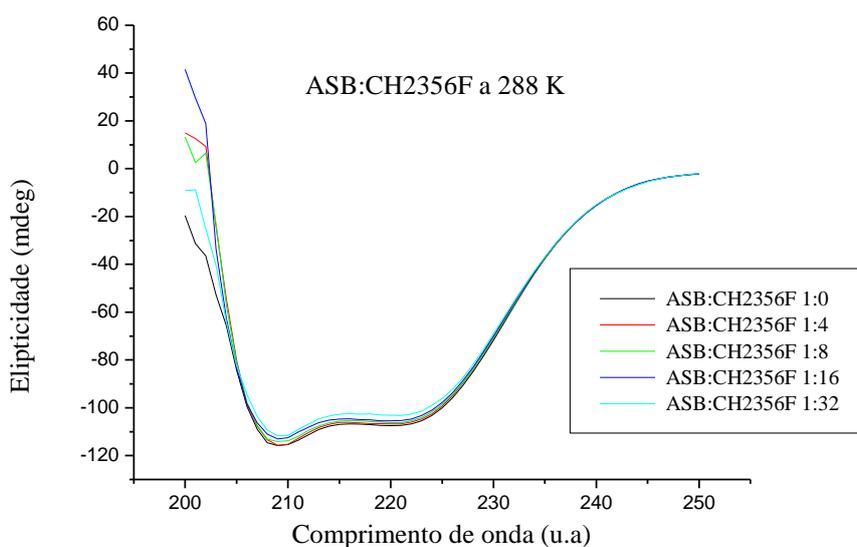
**Figura 93.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 288$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH2356F)  $C_{ASB} = C_{CH2356F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



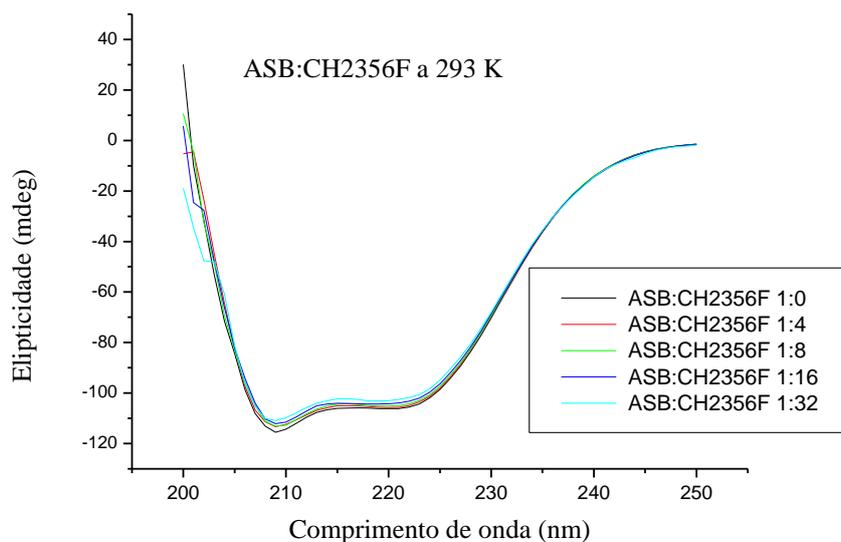
**Figura 94.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{exc} = 280$  nm e  $T = 293$  K) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV da chalcona (CH2356F)  $C_{ASB} = C_{CH2356F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



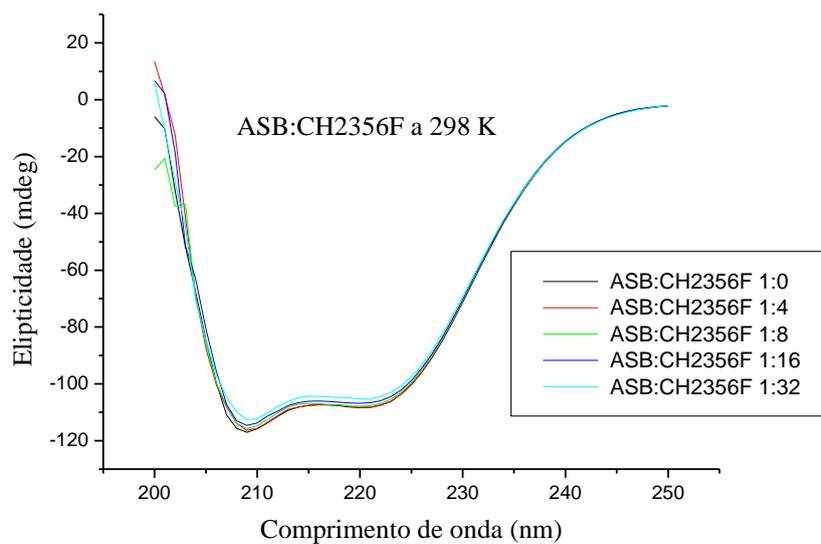
**Figura 95.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$  e  $T = 298 \text{ K}$ ) de ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) e de absorção UV da chalcona (CH2356F)  $C_{\text{ASB}} = C_{\text{CH2356F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



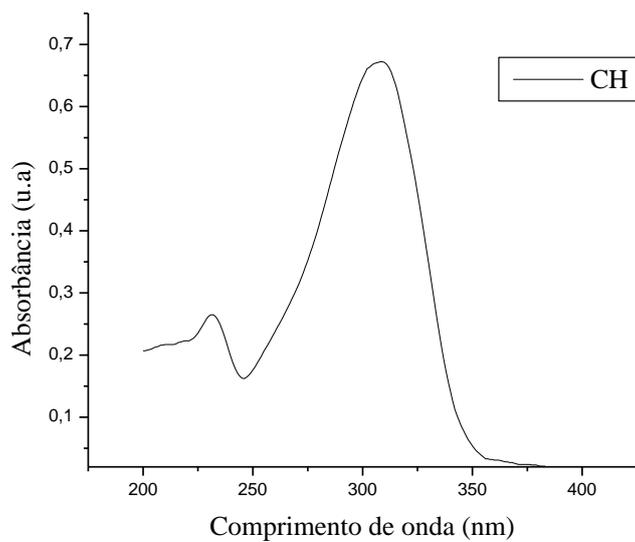
**Figura 96.** Espectros de dicroísmo circular pra ASB ( $\text{pH} = 7,4$ ) em chalcona (CH2356F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH2356F,  $C_{\text{ASB}} = 1,00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  e  $C_{\text{CH2356F}} = 0; 3,9; 7,9; 15,70 \text{ e } 31,00 (x 10^{-6}) \text{ mol/L}$ , a  $T = 288 \text{ K}$ .



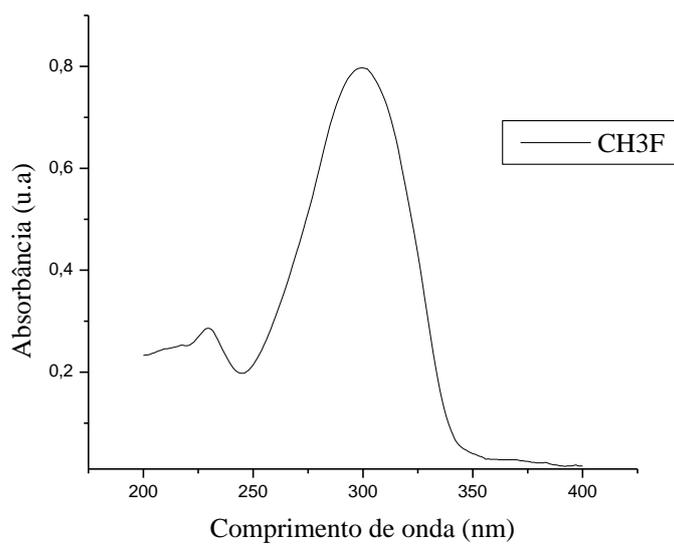
**Figura 97.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH2356F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH2356F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 293$  K.



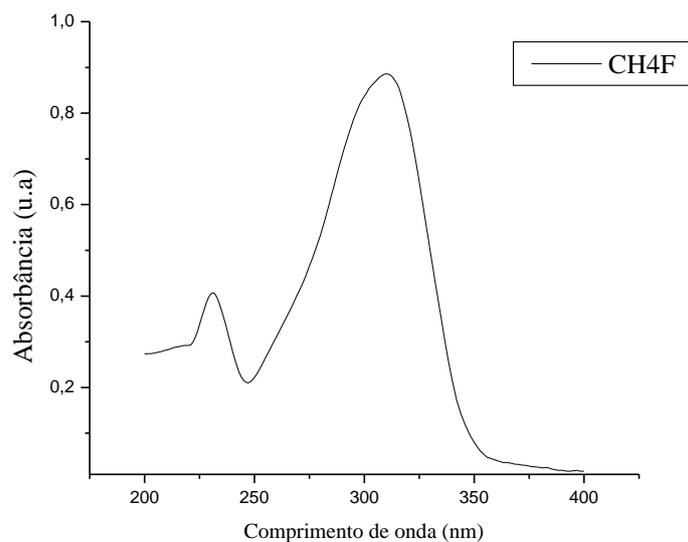
**Figura 98.** Espectros de dicroísmo circular para ASB (pH = 7,4) em chalcona (CH2356F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CH2356F,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CH2356F} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$  e  $31,00$  ( $\times 10^{-6}$ ) mol/L, a  $T = 298$  K.



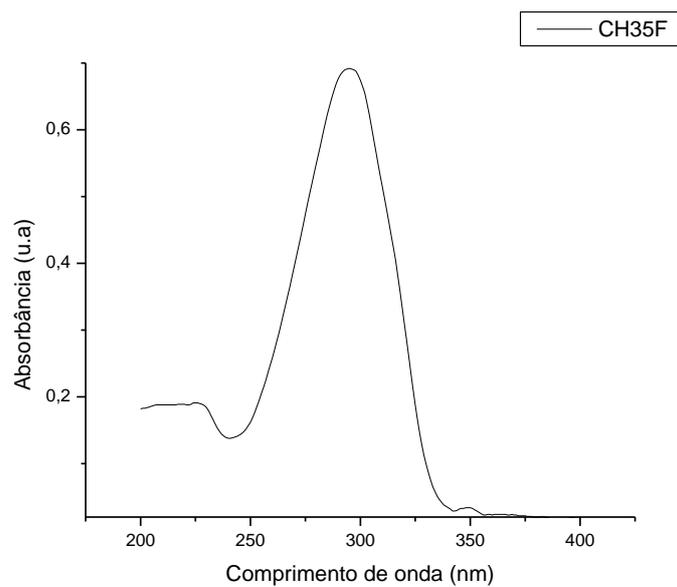
**Figura 99.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH) em etanol (ETOH)  $C_{CH} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



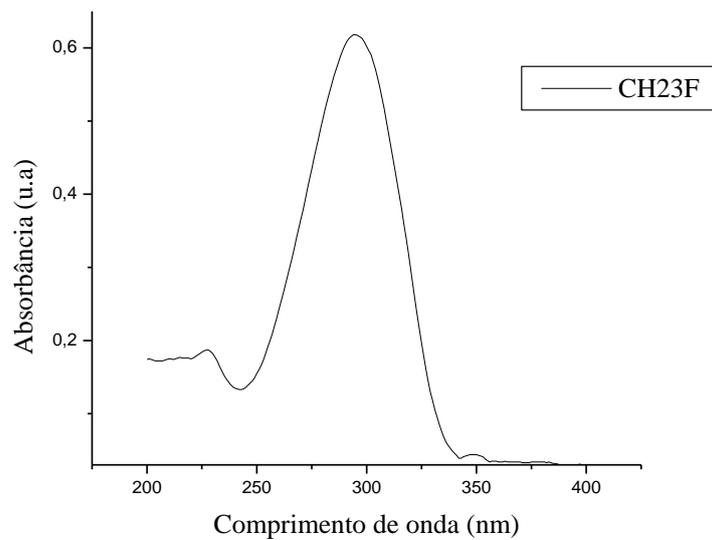
**Figura 100.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH3F) em etanol (ETOH)  $C_{CH3F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



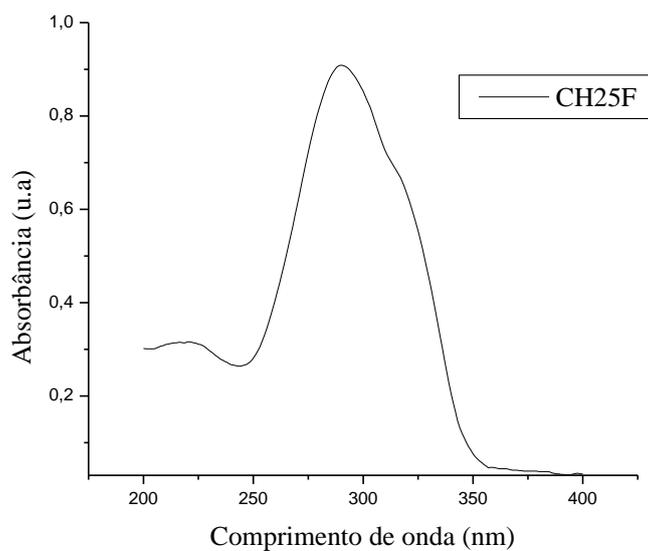
**Figura 101.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH4F) em etanol (ETOH)  
 $C_{CH4F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



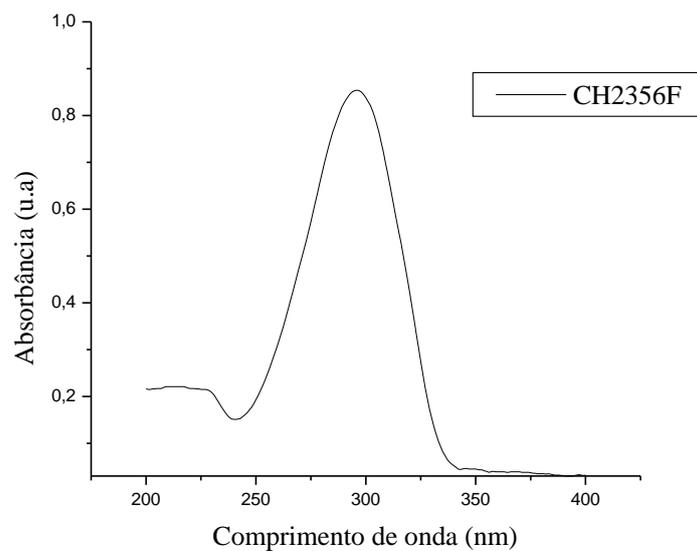
**Figura 102.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH35F) em etanol (ETOH)  
 $C_{CH35F} = 1,00 \times 10^{-5}$  mol/L.



**Figura 103.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH23F) em etanol (ETOH)  
 $C_{\text{CH23F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



**Figura 104.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH25F) em etanol (ETOH)  
 $C_{\text{CH25F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .



**Figura 105.** Espectro de absorção UV-Vis da Chalcona (CH2356F) em etanol (ETOH)  
 $C_{\text{CH2356F}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .

**Tabela 16.** MRE calculado em 208nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) em chalconas (CH, CH3F, CH4F, CH35F, CH23F, CH25F e CH2356F), T = 288 K, 293 K e 298 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:CHs,  $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$  mol/L e  $C_{CHs} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$  e  $32,30 (x 10^{-6})$  mol/L.

	T (K)		$\theta_{208}$ (mdeg)	MRE <sub>208</sub> (deg.cm <sup>2</sup> /dmol)	$\theta_{222}$ (mdeg)	MRE <sub>222</sub> (deg.cm <sup>2</sup> /dmol)
CH	288	1:0	-115,482	-19842,26	-108,47	-18637,45
		1:4	-117,636	-20212,37	-108,648	-18668,04
		1:8	-118,281	-20323,19	-107,825	-18526,63
		1:16	-116,542	-20024,39	-105,232	-18081,09
		1:32	-113,64	-19525,77	-103,732	-17823,36
	293	1:0	-115,482	-19842,26	-108,47	-18637,45
		1:4	-117,636	-20212,37	-108,648	-18668,04
		1:8	-118,281	-20323,19	-107,825	-18526,63
		1:16	-116,542	-20024,39	-105,232	-18081,09
		1:32	-113,64	-19525,77	-103,732	-17823,36
	298	1:0	-115,482	-19842,26	-108,47	-18637,45
		1:4	-117,636	-20212,37	-108,648	-18668,04
		1:8	-118,281	-20323,19	-107,825	-18526,63
		1:16	-116,542	-20024,39	-105,232	-18081,09
		1:32	-113,64	-19525,77	-103,732	-17823,36
CH3F	288	1:0	-115,482	-19842,26	-108,47	-18637,45
		1:4	-117,636	-20212,37	-108,648	-18668,04
		1:8	-118,281	-20323,19	-107,825	-18526,63
		1:16	-116,542	-20024,39	-105,232	-18081,09
		1:32	-113,64	-19525,77	-103,732	-17823,36
	293	1:0	-115,482	-19842,26	-108,47	-18637,45
		1:4	-117,636	-20212,37	-108,648	-18668,04
		1:8	-118,281	-20323,19	-107,825	-18526,63
		1:16	-116,542	-20024,39	-105,232	-18081,09
		1:32	-113,64	-19525,77	-103,732	-17823,36
	298	1:0	-115,482	-19842,26	-108,47	-18637,45
		1:4	-117,636	-20212,37	-108,648	-18668,04
		1:8	-118,281	-20323,19	-107,825	-18526,63
		1:16	-116,542	-20024,39	-105,232	-18081,09
		1:32	-113,64	-19525,77	-103,732	-17823,36

Continuação tabela16

<b>CH4F</b>	288	1:0	-115,992	-19929,89	-108,349	-18616,66
		1:4	-115,419	-19831,44	-107,799	-18522,16
		1:8	-114,951	-19751,03	-107,457	-18294,15
		1:16	-114,181	-19618,72	-106,472	-18294,08
		1:32	-109,598	-18831,27	-105,041	-18048,81
	293	1:0	-113,21	-19451,89	-105,455	-18196,56
		1:4	-111,718	-19195,53	-104,904	-18024,74
		1:8	-111,519	-19159,79	-104,405	-17939,00
		1:16	-110,484	-19044,67	-103,876	-17848,10
		1:32	-106,416	-18284,36	-102,035	-17531,78
	298	1:0	-112,665	-19358,24	-105,248	-18083,84
		1:4	-111,503	-19158,59	-104,73	-17994,84
		1:8	-112,199	-19278,17	104,009	-17870,96
		1:16	-110,753	-19029,72	-103,146	-17722,26
		1:32	-109,847	-18874,05	-101,469	-17434,53
<b>CH35F</b>	288	1:0	-116,423	-20000,39	-110,796	19037,11
		1:4	-116,034	-19937,11	-110,199	-18345,53
		1:8	-115,288	-19808,93	-109,276	-18775,94
		1:16	-113,609	-19520,44	-108,26	-18601,37
		1:32	-111,3	-19123,37	-106,652	-18325,08
	293	1:0	-116,323	-19998,67	-109,606	-18832,64
		1:4	-116,274	-19978,35	-108,852	-18703,09
		1:8	-115,128	-19781,44	-108,383	-18622,50
		1:16	-113,384	-19481,78	-107,163	-18412,88
		1:32	-111,807	-19210,82	-104,965	-18035,22
	298	1:0	-113,634	-19524,47	-107,168	-18413,74
		1:4	-113,094	-19431,95	-106,342	-18271,82
		1:8	-112,453	-19321,82	-105,775	-18174,39
		1:16	-110,779	-19034,19	-104,58	-17969,07
		1:32	-107,652	-18496,07	103,065	-17708,62

Continua

Tabela 16 continuação

<b>CH23F</b>	288	1:0	-115,688	-19877,66	-109,366	-18791,08
		1:4	-115,495	-19844,50	-108,829	-18699,14
		1:8	-114,082	-19601,72	-107,814	-18524,74
		1:16	-112,409	-19314,26	-106,675	-18329,04
		1:32	-111,342	-19130,93	-104,96	-18304,36
	293	1:0	-111,88	-19223,37	-104,76	-18000,00
		1:4	-111,465	-19152,06	-104,508	-17956,70
		1:8	-111,172	-19101,72	-104,052	-17878,35
		1:16	-109,4	-18797,25	-103,161	-17725,26
		1:32	-108,145	-18581,62	-100,586	-17282,82
	298	1:0	-110,975	-19067,87	-104,925	-18028,35
		1:4	-110,752	-19029,55	-104,106	-17887,63
		1:8	-110,376	-18964,95	-103,284	-17746,39
		1:16	-109,057	-18738,32	-103,284	-17746,39
		1:32	-107,099	-18401,89	-99,6698	-17125,40
<b>CH25F</b>	288	1:0	-116,708	-20052,92	-109,543	-18821,82
		1:4	-115,477	-19841,41	-108,957	-18721,13
		1:8	-114,723	-19711,86	-107,989	-18554,81
		1:16	-113,804	-19553,95	-106,588	-18314,09
		1:32	-112,831	-19386,77	-104,723	-17993,64
	293	1:0	-114,211	-19623,88	-107,532	-18476,29
		1:4	-114,808	-19726,46	-106,587	-18313,92
		1:8	-113,745	-19543,81	105,978	18209,28
		1:16	-111,69	-19190,72	-104,77	-18001,72
		1:32	-109,804	-18866,67	-102,439	-17601,20
	298	1:0	-113,922	-19574,23	105,758	18171,48
		1:4	-113,068	-19427,49	-104,86	-18017,18
		1:8	-112,705	-19365,12	-103,804	-17835,74
		1:16	-110,177	-18930,76	102,779	17659,62
		1:32	-109,908	-18884,54	-101,404	-17423,37

continua

Tabela 16 continuação

<b>CH2356F</b>	288	1:0	-115,61	-19864,26	-107,491	-18469,24
		1:4	-113,964	-19581,44	-107,55	-18479,38
		1:8	-113,884	-19567,70	-106,901	-18367,87
		1:16	-113,021	-19419,42	-105,928	-18200,69
		1:32	-109,899	-18882,99	-104,433	-17943,81
	293	1:0	-113,085	-19430,41	-105,507	-18128,35
		1:4	-111,382	-19137,80	-104,888	-18021,99
		1:8	-111,152	-19098,28	-104,238	-17910,31
		1:16	-110,307	-18953,09	-103,181	-17728,69
		1:32	-110,103	-18918,04	-101,845	-17499,14
	298	1:0	-114,657	-19700,52	-106,769	-18345,19
		1:4	-113,41	-19486,25	-106,01	-18214,78
		1:8	-113,194	-19449,14	-105,411	-18111,86
		1:16	-111,009	-19073,71	-104,68	-17986,25
		1:32	-109,262	-18773,54	-102,705	-17646,91