



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

**ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA INTERAÇÃO ENTRE
FLAVONÓIDES E ALBUMINA SÉRICA BOVINA (ASB)**

ALESSANDRA MEDEIROS RIBEIRO

Sob a Orientação do Professor
Dr. José Carlos Netto Ferreira

e Co-orientação do Professor
Dr. Darí Cesarin Sobrinho

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

Seropédica, RJ
Março de 2010

572.66

R484e

T

Ribeiro, Alessandra Medeiros, 1977-
Estudo espectroscópico da interação
entre flavonóides e albumina sérica bovina
(ASB) / Alessandra Medeiros Ribeiro - 2010.
200 f. : il.

Orientador: José Carlos Netto Ferreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-
Graduação em Química.
Bibliografia: f. 153-159.

1. Albumina - Teses. 2. Flavonóides -
Teses. 3. Espectroscopia de fluorescência
- Teses. 4. Dicroísmo circular - Teses. I.
Ferreira, José Carlos Netto, 1947-. II.
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Curso de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

Bibliotecário: _____

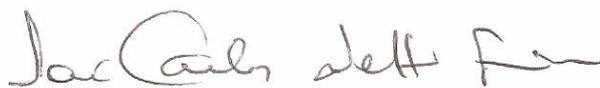
Data: ___/___/___

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

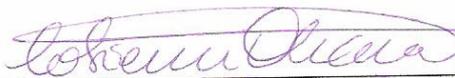
ALESSANDRA MEDEIROS RIBEIRO

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

TESE APROVADA EM 19/03/2010



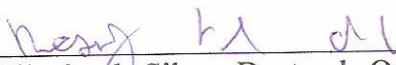
Dr. José Carlos Netto Ferreira - Depto. de Química/ICE/UFRRJ
(Orientador)



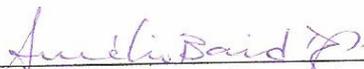
Dra. Laura Tiemi Okano - Depto. de Química/FFCLRP/USP



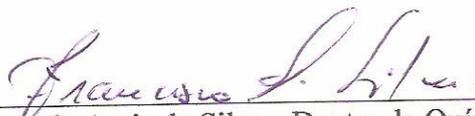
Dra. Nanci Camara de Lucas Garden - Depto. de Química Orgânica/IQ/UFRRJ



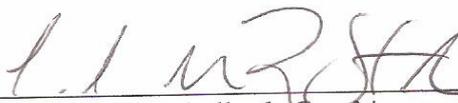
Dra. Rosaly Silveira da Silva - Depto. de Química Orgânica/IQ/UFF
(Suplente)



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



Dr. Francisco de Assis da Silva - Depto. de Química/ICE/UFRRJ



Dr. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna - Depto. de Química/ICE/UFRRJ
(Suplente)

DEDICATÓRIA

“O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.” (Fernando Pessoa)

Aos meus pais, Maria José Medeiros Ribeiro e Carlos Roberto Ribeiro, por toda a dedicação e carinho.

“A medida da vida não é a sua duração, mas a sua doação.” (Peter Marshal)

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar possível o início e o término desta tese com muita determinação e dedicação, tornando possível mais uma conquista.

Ao Prof. e orientador José Carlos Netto Ferreira e ao Prof. e co-orientador Darí Cesarin Sobrinho pela orientação, ensinamentos, estímulos e amizade.

À Prof^a. Laura Tiemi Okano, do Depto. de Química/ FFCLRP/ USP-RP da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto (USP-RP), por permitir a realização de análises de espectroscopia de fluorescência e de dicroísmo circular, ambas com variação de temperatura, nas dependências do seu Laboratório de Fotoquímica e de Processos Fotofísicos em Biopolímeros, pela inestimável ajuda, cordialidade e amizade.

Ao Prof. Mario Geraldo de Carvalho, aos seus alunos de doutorado Renata Duarte Fernandes e Marcelo Francisco de Araújo e, a sua ex-aluna de doutorado Virginia Cláudia da Silva, todos do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFRRJ, pela doação de biflavonóides (agatisflavona, 7"-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona), possibilitando a realização de um trabalho em parceria.

Ao Coordenador e Prof. do PPGQ/ ICE/ UFRRJ, Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna, ao seu aluno de doutorado Daniel Rosa da Silva e ao seu aluno de iniciação científica Bruno Benedito Spolidoro, pelo auxílio nos cálculos teóricos (modelagem molecular) das interações entre ASB e flavonóides.

À Prof^a. Cristina Maria Quintella por permitir a realização de análises de fotólise por pulso de laser de nanossegundo de tioflavona, *S,S*-dióxidotioflavona e tiocromanona, no LabLaser/ IQ/ UFBA, devido ao projeto PROCAD UFBA/ UFRRJ.

À colega Ada Ruth Bertoti, ex-doutoranda do LabLaser/ IQ/ UFBA, pela ajuda nas análises de fotólise por pulso de laser de nanossegundo de tioflavona, *S,S*-dióxidotioflavona e tiocromanona.

A todos os colegas do LabLaser/ IQ/ UFBA pela ajuda, alegria e amizade.

Aos meus pais, Carlos Roberto Ribeiro e Maria José Medeiros Ribeiro, pelo apoio, incentivo, dedicação e compreensão em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Carlos Roberto Medeiros Ribeiro e Juliana Medeiros Ribeiro, pela paciência e amizade.

Ao meu namorado, Rogério Mota do Nascimento, pelo companheirismo, carinho, amizade, apoio, estímulo e, sobretudo, paciência nos momentos que mais necessitei.

Aos meus sobrinhos, Manuella Siqueira Ribeiro e Miguel Angelo Siqueira Ribeiro, por existirem, tornando minha vida mais alegre com doces sorrisos.

A minha madrinha, Maria Ângela Medeiros, pelo apoio, acolhendo-me em sua casa em alguns momentos desta tese, e por acreditar no meu potencial.

Aos meus futuros sogra e sogro, Ilza Mota do Nascimento e Clóvis do Nascimento, respectivamente, pela estadia em sua casa na fase final desta tese, dando-me total apoio e atenção.

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

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

A todos os amigos que, apesar de não nomeados, de uma forma ou de outra, sempre torceram por mim.

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

À CAPES pelo apoio financeiro concedido e pelo auxílio através do projeto PROCAD UFBA/ UFRRJ.

RESUMO

RIBEIRO, Alessandra Medeiros. **Estudo espectroscópico da interação entre flavonóides e albumina sérica bovina (ASB)**. 2010. 200p Tese (Doutorado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Estudos espectroscópicos para diversos flavonóides comerciais (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e quercetina (QUE)), flavonóides naturais (biflavonóides como agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)) e tiocromanona (TCR), foram realizados em diferentes solventes (acetonitrila (ACN), etanol (ETOH), ciclohexano (CEX), diclorometano (DCM) e água milli-Q (AD)). A irradiação de TFA, SDF e TCR, em acetonitrila, por fotólise por pulso de laser de nanossegundo, levou à formação de seus respectivos estados excitados triplete. Por espectroscopia de fluorescência, verificou-se que os flavonóides comerciais e naturais, e a tiocromanona não apresentam emissão de fluorescência. Por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) para QUE, ATF, OMA, AMF e DOF, nestes solventes, percebeu-se que os espectros em presença de solventes polares, como AD, foram bem diferentes dos espectros em DCM, principalmente, para ATF, e os espectros em solução de tampão PBS (pH = 7,4) foram semelhantes aos em AD, exceto para DOF, apresentando mudanças substanciais. A interação entre ASB e os flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) em solução tamponada (PBS, pH = 7,4) foi estudada por espectroscopia no ultravioleta/visível, espectroscopia de emissão de fluorescência, dicroísmo circular e modelagem molecular sendo diretamente dependente da concentração adicionada de flavonóides e muito pouco dependente com a variação da temperatura. No UV-Vis ocorreu deslocamento para o azul das bandas de absorção próximas a 208 nm (correspondente a ASB, referente às transições $n\pi^*$ da estrutura α -hélice da albumina) e 280 nm (correspondente ao triptofano da ASB), em função do aumento de concentração dos flavonóides. Na espectroscopia de fluorescência (T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C) houve deslocamento para o azul na emissão da proteína com o aumento da concentração dos flavonóides, sugerindo que o cromóforo da ASB está em um ambiente mais hidrofóbico em relação àquele quando para ASB livre. Neste caso, observou-se supressão da fluorescência de ASB (resíduos de triptofano), como consequência de um processo de supressão estática como demonstrado pelos altos valores observados para k_q ($\cong 10^{13}$ a 10^{14} L/mol.s). A distância entre os resíduos de triptofano e os flavonóides (r) foi menor que 7 nm, um indicativo da grande probabilidade de ocorrer transferência de energia entre ASB e flavonóides, de acordo com a teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster (Teoria de Förster). No dicroísmo circular (T = 25°C, 37°C e 42°C) foi verificada uma diminuição do % de α -hélice da ASB em 208 nm e 222 nm (regiões de transição $n\pi^*$ da estrutura secundária α -hélice da ASB no espectro de absorção UV), devido ao aumento de concentração dos flavonóides. Esses efeitos podem ser atribuídos à formação de um complexo flavonóide-ASB que pode estar induzindo variações conformacionais na ASB. Por modelagem molecular, através do programa *docking*, percebeu-se que as regiões principais para a ligação dos flavonóides com os sítios de ligação da ASB estão localizadas em cavidades hidrofóbicas nos subdomínios IB e IIA (consistentes com os sítios I e II) e os resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) de ASB estão nesses subdomínios, respectivamente. Existe uma grande cavidade hidrofóbica presente no subdomínio IIA, onde os flavonóides podem se ligar com o resíduo de triptofano Trp-237 (melhor sítio de ligação), formando o complexo flavonóide-ASB.

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

ABSTRACT

RIBEIRO, Alessandra Medeiros. **Spectroscopic study of the interaction between flavonoids and bovine serum albumin (BSA)**. 2010. 200p. Tesis (Doctor Science in Chemistry, Organic Chemistry) Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Spectroscopic studies for several commercial flavonoids (flavone (FVA), *alpha*-naphthoflavone (α -NAF), *beta*-naphthoflavone (β -NAF), thioflavone (TFA), *S,S*-dioxithioflavone (SDF), flavanone (FNA) and quercetin (QUE)), natural flavonoids (biflavonoids such as agatisflavone (ATF), 7''-O-methylagatisflavone (OMA), amentoflavone (AMF) and (DOF)) and thiochromanone (TCR) were performed in different solvents (acetonitrile (ACN), ethanol (ETOH), cyclohexane (CEX), dichloromethane (DCM) and milli-Q water (AD)). Irradiation of TFA, SDF and TCR in acetonitrile, employing the nanosecond laser flash photolysis, lead to the formation of their corresponding triplet excited state. Fluorescence emission spectroscopy studies showed that commercial and natural flavonoids and thiochromanone are not fluorescent. UV/visible spectroscopy studies for QUE, ATF, OMA, AMF and DOF, in the same previous solvents, revealed that for these flavonoids the ground-state absorption spectrum in polar solvents, such as water or PBS (pH=7.4), is completely different than the obtained in dichloromethane. This difference is more pronounced for ATF. For DOF the absorption spectrum in water shows remarkable variations when compared to that in PBS. The interaction between BSA and the flavonoids QUE, ATF, OMA, AMF and DOF in PBS solution, pH = 7.4, was studied by UV/visible spectroscopy, fluorescence emission spectroscopy, circular dichroism and molecular modelling. From these studies it was clearly demonstrated that the interaction observed was directly dependent on the flavonoid concentration and almost independent on temperature variation. The ground state absorption spectrum for BSA showed a hypsochromic effect on the absorption band around 208 nm, corresponding to the $n\pi^*$ transition of the BSA α -helix structure, as a function of flavonoid concentration. Similar behavior was observed for the absorption at 280 nm, corresponding to the tryptophan absorption in BSA. The fluorescence emission spectrum for BSA in the presence of QUE, ATF, OMA, AMF and DOF, in PBS, at T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C and 42°C, shows a blue-shift on the protein emission as a function of flavonoid concentration. These results suggest that the BSA chromophore is in a more hydrophobic environment when compared with that sensed by the protein in the absence of the flavonoid. In this case, quenching of BSA fluorescence (tryptophan residues) was clearly observed with the high values obtained for the quenching rate constant k_q ($\cong 10^{13}$ to 10^{14} L/mol.s) indicating a static quenching process. The distance (r) observed for the tryptophan residues and the flavonoids was smaller than 7 nm, which indicates that there is a reasonable probability for a non-radiative energy transfer process between tryptophan and the flavonoids, based on the Förster theory for energy transfer. Circular dichroism results at T = 25°C, 37°C and 42°C revealed a significant decrease on the α -helix percentage for BSA at 208 nm and 222 nm, corresponding to the $n\pi^*$ transition for the secondary structure of BSA, as a function of flavonoid concentration. These effects can be attributed to the formation of a complex BSA/flavonoid which can induce conformational variations on the BSA structure. Molecular modelling indicates that the main regions for the interaction between flavonoids and ASB are located in hydrophobic cavities on the sub-domains IB and IIA, which contain tryptophan residues (Trp-158 and Trp-237). A large hydrophobic cavity containing the Trp-237 is present in the sub-domain IIA, which is responsible for the formation of the complex flavonoid-BSA through a strong interaction flavonoid-tryptophan.

Key words: Spectroscopy. Flavonoids. Bovine serum albumin (BSA).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Subclasses de flavonóides [Trueba (2003)].....	5
Tabela 2. Concentração de flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF), após a adição de alíquotas de uma solução de QUE de $1,01 \times 10^{-3}$ mol/L, de ATF e de AMF de $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, de OMA de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L e de DOF de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASB $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C.....	41
Tabela 3. Concentração de flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF), após a adição de alíquotas de uma solução de QUE de $1,01 \times 10^{-3}$ mol/L, de ATF e de AMF de $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, de OMA de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L e de DOF de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASB $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L, para T = 25°C, 37°C e 42°C.....	42
Tabela 4. Caracterização do estado excitado triplete de tiocromanona (TCR): constantes de velocidade de transferência de energia triplete-triplete para <i>trans</i> - β -caroteno em acetonitrila.....	53
Tabela 5. Reatividade do estado excitado triplete de tiocromanona (TCR): constantes de velocidade de supressão do estado excitado triplete de tiocromanona por doadores de hidrogênio em acetonitrila.....	56
Tabela 6. Reatividade do estado excitado triplete de tiocromanona (TCR): constantes de velocidade de supressão do estado excitado triplete de tiocromanona por doadores de elétron em acetonitrila.....	61
Tabela 7. Índice de refração (nD) [Weast (1971)] para os solventes (cicloexano (CEX), diclorometano (DCM), etanol (ETOH), acetonitrila (ACN) e água milli-Q (AD)).....	63
Tabela 8. Densidade ótica (OD) para os compostos (flavona (FVA), <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e tiocromanona (TCR)) em CEX, ETOH, ACN e AD.....	63
Tabela 9. Densidade ótica (OD) para os compostos (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''- <i>O</i> -metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF), diidroochnaflavona (DOF) e naftaleno (NAF) (referência)) em DCM, ETOH, ACN e AD.....	67
Tabela 10. 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) por quercetina.....	92
Tabela 11. 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) por agatisflavona.....	93
Tabela 12. 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) por 7''- <i>O</i> -metilagatisflavona.....	94
Tabela 13. 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) por amentoflavona.....	94
Tabela 14. 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) por diidroochnaflavona.....	95
Tabela 15. Valores de K_a obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelos flavonóides.....	98
Tabela 16. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina.....	99
Tabela 17. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona.....	100

Tabela 18. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona.....	101
Tabela 19. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona.....	101
Tabela 20. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochnaflavona.....	102
Tabela 21. Valores de K_b e n obtidos a partir de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por QUE, ATF, OMA, AMF e DOF.....	105
Tabela 22. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da quercetina (QUE). $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	110
Tabela 23. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da agatisflavona (ATF). $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	113
Tabela 24. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da 7''-O-metilagatisflavona (OMA). $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	116
Tabela 25. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da amentoflavona (AMF). $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	119
Tabela 26. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da diidrochnaflavona (DOF). $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	122
Tabela 27. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de quercetina (QUE), $T = 25^\circ\text{C}$, 37°C e 42°C . Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 0$; 4,04; 8,08; 16,20 e 32,30 ($\times 10^{-6}$) mol/L.....	136
Tabela 28. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de agatisflavona (ATF), $T = 25^\circ\text{C}$, 37°C e 42°C . Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0$; 4,00; 8,00; 16,00 e 32,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L.....	137
Tabela 29. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $T = 25^\circ\text{C}$, 37°C e 42°C . Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 0$; 4,12; 8,24; 16,50 e 33,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L.....	138
Tabela 30. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de amentoflavona (AMF), $T = 25^\circ\text{C}$, 37°C e 42°C . Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0$; 4,00; 8,00; 16,00 e 32,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L.....	139
Tabela 31. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de diidrochnaflavona (DOF), $T = 25^\circ\text{C}$, 37°C e 42°C . Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0$; 4,20; 8,40; 16,80 e 33,60 ($\times 10^{-6}$) mol/L.....	140
Tabela 32. Interação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com o resíduo de triptofano 158 (Trp-158) da ASB por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	141

Tabela 33. Interação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com o resíduo de triptofano 237 (Trp-237) da ASB por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	142
Tabela 34. Interação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com o resíduo de tirosina 434 (Tyr-434) da ASB por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	142
Tabela A.1. Peso molecular (da literatura [www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html]) e ponto de fusão (medido e da literatura [www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html]) dos flavonóides e da tiocromanona (TCR).....	160
Tabela A.2. Solubilidade dos flavonóides e da tiocromanona (TCR) em diversos solventes.....	160

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides e seu sistema de numeração [Trueba (2003) e Thavasi <i>et al.</i> (2006)].....	4
Figura 2. Dímeros de Flavonóides [Simões <i>et al.</i> (2001), Chari <i>et al.</i> (1977), Dora e Edwards (1991), Suzart (2007) e Suzart <i>et al.</i> (2007)].....	10
Figura 3. Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.....	12
Figura 4. Estrutura do tipo α -hélice.....	13
Figura 5. Estrutura do tipo folha- β	14
Figura 6. Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.....	14
Figura 7. 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)].....	18
Figura 8. Esquema do sistema de fotólise por pulso de laser para a absorção de transientes em modo de transmissão.....	21
Figura 9. Exemplo das informações fornecidas pelo computador após processamento do decaimento obtido pela excitação por laser de um precursor.....	22
Figura 10. Gráfico de decaimento de um transiente gerado pela excitação com laser de nanossegundo para um determinado precursor.....	23
Figura 11. Representação semi-logarítmica para o decaimento de um transiente gerado pela excitação com laser de nanossegundo para um determinado precursor.....	23
Figura 12. Espectro de absorção triplete-triplete para 4,5-diaza-9-fluorenona em acetonitrila.....	24
Figura 13. Espectro de absorção para o ânion radical gerado pela reação entre o estado excitado triplete de xantona e trietilamina, em acetonitrila.....	25
Figura 14. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão do estado excitado triplete de xantona por 1-metilnaftaleno, em acetonitrila, pelo processo de transferência de energia colisional.....	26
Figura 15. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão do estado excitado triplete de xantona por trietilamina, em acetonitrila, pelo processo de transferência de elétron.....	27
Figura 16. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão do estado excitado triplete de dibenzossuberona por 4-fenilfenol, em Acetonitrila, pelo processo de transferência de hidrogênio.....	28
Figura 17. Esquema dos componentes da espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível.....	29
Figura 18. Esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular.....	31
Figura 19. 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].....	32
Figura 20. Estrutura dos flavonóides comerciais (flavona (FVA), <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), flavanona (FNA) e quercetina (QUE)), do flavonóide sintetizado (<i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF) e da tiocromanona (TCR)).....	39
Figura 21. Estrutura dos flavonóides naturais, biflavonóides (agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidroochnaflavona (DOF)).....	40
Figura 22. Estrutura da albumina sérica bovina (ASB) determinada por analogia com a estrutura da albumina sérica humana (ASH) do PDB e seus domínios e subdomínios.....	40

Figura 23. Espectrofotômetro de ultravioleta (UV-Vis) Mini UV Shimadzu, modelo 1240.....	43
Figura 24. Sistema de fotólise por pulso de laser (laser Nd-YAG modelo mLPF112) para a absorção de transientes em modo de transmissão.....	44
Figura 25. Espectrofluorímetro F-4500 Hitachi acoplado a um banho termostatizador de temperatura.....	45
Figura 26. Espectropolarímetro J-180 Jasco, com sistema de controle interno de temperatura Jasco PTC-423S acoplado ao equipamento.....	46
Figura 27. Decaimento cinético para o transiente gerado na excitação de tioflavona (TFA) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), monitorado a 310 nm.....	49
Figura 28. Espectro de absorção triplete-triplete para tioflavona (TFA) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), obtido 100 ns após o pulso do laser.....	49
Figura 29. Decaimento cinético para o transiente gerado na excitação de <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), monitorado a 430 nm.....	50
Figura 30. Espectro de absorção triplete-triplete para <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), registrado 100 ns após o pulso do laser.....	50
Figura 31. Decaimento cinético para o transiente gerado na excitação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), monitorado a 440 nm.....	51
Figura 32. Espectro de absorção triplete-triplete para tiocromanona (TCR) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), registrado a 250 ns após o pulso do laser.....	51
Figura 33. Supressor por transferência de energia.....	53
Figura 34. Gráfico de Stern-Volmer para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com <i>trans</i> - β -caroteno (supressor por transferência de energia).....	53
Figura 35. Supressores por transferência de hidrogênio.....	55
Figura 36. Gráfico de Stern-Volmer para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com fenóis (supressores por transferência de hidrogênio).....	55
Figura 37. Radical cetila derivado da tiocromanona (TCR).....	57
Figura 38. Gráfico de Hammett para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com fenóis substituídos.....	59
Figura 39. Espectro de absorção para o transiente de tiocromanona (TCR) gerado após excitação por laser, na presença de $1,4 \times 10^{-3}$ mol/L de 4-metoxifenol, em acetonitrila, registrado 13 μ s após o pulso do laser.....	60
Figura 40. Supressores por transferência de elétron.....	60
Figura 41. Gráfico de Stern-Volmer para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com trietilamina (supressor por transferência de elétron).....	61
Figura 42. Ânion radical derivado da tiocromanona (TCR).....	62
Figura 43. Espectro de absorção no UV-Vis da referência (naftaleno (NAF)) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{NAF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	64
Figura 44. Espectro de absorção no UV-Vis de quercetina (QUE) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	65
Figura 45. Espectro de absorção no UV-Vis de agatisflavona (ATF) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	65
Figura 46. Espectro de absorção no UV-Vis de 7''- <i>O</i> -metilagatisflavona (OMA) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	66

Figura 47. Espectro de absorção no UV-Vis de amentoflavona (AMF) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	66
Figura 48. Espectro de absorção no UV-Vis de diidroochnaflavona (DOF) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	67
Figura 49. Espectro de absorção no UV-Vis de albumina sérica bovina (ASB) [Cahill e Padera (1980), www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].....	68
Figura 50. Espectro de absorção no UV-Vis de triptofano e de tirosina [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].....	69
Figura 51. Estrutura de fenilalanina, tirosina e triptofano [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].....	69
Figura 52. 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. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.....	71
Figura 53. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70; 3,03$ e $3,37 (x 10^{-5})$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.....	72
Figura 54. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66; 3,00$ e $3,33 (x 10^{-5})$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.....	73
Figura 55. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7'-O-metilagatisflavona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74; 3,09$ e $3,43 (x 10^{-5})$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.....	74
Figura 56. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66; 3,00$ e $3,33 (x 10^{-5})$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.....	75
Figura 57. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidroochnaflavona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80; 3,15$ e $3,50 (x 10^{-5})$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.....	76
Figura 58. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5})$ mol/L, a $T = 22^{\circ}C$	78
Figura 59. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5})$ mol/L, a $T = 27^{\circ}C$	78
Figura 60. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5})$ mol/L, a $T = 32^{\circ}C$	79

- Figura 61.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 37°C.....79
- Figura 62.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 42°C.....80
- Figura 63.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 22°C.....80
- Figura 64.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 27°C.....81
- Figura 65.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 32°C.....81
- Figura 66.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 37°C.....82
- Figura 67.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 42°C.....82
- Figura 68.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 22°C.....83
- Figura 69.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 27°C.....83
- Figura 70.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 32°C.....84
- Figura 71.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 37°C.....84
- Figura 72.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 42°C.....85

Figura 73. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 22°C.....	85
Figura 74. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 27°C.....	86
Figura 75. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 32°C.....	86
Figura 76. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 37°C.....	87
Figura 77. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 42°C.....	87
Figura 78. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 22°C.....	88
Figura 79. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 27°C.....	88
Figura 80. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 32°C.....	89
Figura 81. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 37°C.....	89
Figura 82. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5})$ mol/L, a T = 42°C.....	90
Figura 83. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina.....	92
Figura 84. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona.....	93
Figura 85. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona.....	93
Figura 86. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona.....	94

Figura 87. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochnaflavona.....	95
Figura 88. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina (QUE).....	96
Figura 89. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona (ATF).....	96
Figura 90. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona (OMA).....	97
Figura 91. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona (AMF).....	97
Figura 92. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochnaflavona (DOF).....	98
Figura 93. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina (QUE).....	99
Figura 94. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona (ATF).....	100
Figura 95. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona (OMA).....	100
Figura 96. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona (AMF).....	101
Figura 97. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochnaflavona (DOF).....	102
Figura 98. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina (QUE).....	103
Figura 99. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona (ATF).....	104
Figura 100. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona (OMA).....	104
Figura 101. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona (AMF).....	104
Figura 102. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochnaflavona (DOF).....	105
Figura 103. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 22°C) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	108
Figura 104. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 27°C) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	108
Figura 105. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 32°C) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	109
Figura 106. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 37°C) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	109
Figura 107. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 42°C) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	110

Figura 108. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	111
Figura 109. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	111
Figura 110. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	112
Figura 111. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	112
Figura 112. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	113
Figura 113. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de 7''-O-metilagatisflavona. $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	114
Figura 114. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de 7''-O-metilagatisflavona. $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	114
Figura 115. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de 7''-O-metilagatisflavona. $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	115
Figura 116. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de 7''-O-metilagatisflavona. $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	115
Figura 117. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de 7''-O-metilagatisflavona. $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	116
Figura 118. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	117
Figura 119. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	117
Figura 120. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	118
Figura 121. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	118
Figura 122. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	119
Figura 123. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochnaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	120

Figura 124. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 27^{\circ}C$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochnaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	120
Figura 125. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 32^{\circ}C$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochnaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	121
Figura 126. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 37^{\circ}C$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochnaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	121
Figura 127. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 42^{\circ}C$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochnaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.....	122
Figura 128. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C, 37^{\circ}C$ e $42^{\circ}C$	124
Figura 129. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$ e $32,30$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 25^{\circ}C$	124
Figura 130. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 0$ e $8,08$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 37^{\circ}C$	125
Figura 131. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 0$ e $8,08$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 42^{\circ}C$	126
Figura 132. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de quercetina (QUE), na proporção 1:8 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 8,08 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C, 37^{\circ}C$ e $42^{\circ}C$	126
Figura 133. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 4,00; 8,00; 16,00$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 25^{\circ}C$	127
Figura 134. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0$ e $8,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 37^{\circ}C$	127
Figura 135. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0$ e $8,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 42^{\circ}C$	128
Figura 136. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de agatisflavona (ATF), na proporção 1:8 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 8,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C, 37^{\circ}C$ e $42^{\circ}C$	128
Figura 137. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 4,12; 8,24; 16,50$ e $33,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 25^{\circ}C$	129
Figura 138. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), nas	

proporções 1:0 e 1:8 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 0$ e $8,24 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 37^{\circ}C$	129
Figura 139. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 0$ e $8,24 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 42^{\circ}C$	130
Figura 140. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), na proporção 1:8 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 8,24 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C, 37^{\circ}C$ e $42^{\circ}C$	130
Figura 141. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 4,00; 8,00; 16,00$ e $32,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C$	131
Figura 142. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0$ e $8,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 37^{\circ}C$	131
Figura 143. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0$ e $8,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 42^{\circ}C$	132
Figura 144. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de amentoflavona (AMF), na proporção 1:8 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 8,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C, 37^{\circ}C$ e $42^{\circ}C$	132
Figura 145. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 4,20; 8,40; 16,80$ e $33,60 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C$	133
Figura 146. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0$ e $8,40 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 37^{\circ}C$	133
Figura 147. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0$ e $8,40 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 42^{\circ}C$	134
Figura 148. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diidrochnaflavona (DOF), na proporção 1:8 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 8,40 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}C, 37^{\circ}C$ e $42^{\circ}C$	134
Figura 149. Modelo de ligação entre quercetina (QUE) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por <i>dockagem</i> em torno de 10 \AA	142
Figura 150. Modelo de ligação entre quercetina (QUE) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por <i>dockagem</i> em torno de 10 \AA	143
Figura 151. Modelo de ligação entre agatisflavona (ATF) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por <i>dockagem</i> em torno de 10 \AA	143
Figura 152. Modelo de ligação entre agatisflavona (ATF) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por <i>dockagem</i> em torno de 10 \AA	144

Figura 153. Modelo de ligação entre 7'- <i>O</i> -metilagatisflavona (OMA) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	144
Figura 154. Modelo de ligação entre 7'- <i>O</i> -metilagatisflavona (OMA) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	145
Figura 155. Modelo de ligação entre amentoflavona (AMF) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	145
Figura 156. Modelo de ligação entre amentoflavona (AMF) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	146
Figura 157. Modelo de ligação entre diidrochnaflavona (DOF) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	146
Figura 158. Modelo de ligação entre diidrochnaflavona (DOF) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por <i>dockagem</i> em torno de 10 Å.....	147
Figura A.1. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavona (FVA), $\lambda = 253$ nm e $\epsilon = 25.033$ L/cm.mol.....	171
Figura A.2. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavona (FVA), $\lambda = 293$ nm e $\epsilon = 26.119$ L/cm.mol.....	171
Figura A.3. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), $\lambda = 232,5$ nm e $\epsilon = 24.570$ L/cm.mol.....	172
Figura A.4. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), $\lambda = 285,5$ nm e $\epsilon = 22.608$ L/cm.mol.....	172
Figura A.5. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), $\lambda = 235$ nm e $\epsilon = 44.506$ L/cm.mol.....	173
Figura A.6. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), $\lambda = 283,5$ nm e $\epsilon = 33.873$ L/cm.mol.....	173
Figura A.7. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tioflavona (TFA), $\lambda = 273$ nm e $\epsilon = 39.187$ L/cm.mol.....	174
Figura A.8. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tioflavona (TFA), $\lambda = 347$ nm e $\epsilon = 17.982$ L/cm.mol.....	174
Figura A.9. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF), $\lambda = 236$ nm e $\epsilon = 19.284$ L/cm.mol.....	175
Figura A.10. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF), $\lambda = 312,5$ nm e $\epsilon = 18.842$ L/cm.mol.....	175
Figura A.11. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavanona (FNA), $\lambda = 251$ nm e $\epsilon = 16.305$ L/cm.mol.....	176
Figura A.12. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavanona (FNA), $\lambda = 319,5$ nm e $\epsilon = 7.341,8$ L/cm.mol.....	176
Figura A.13. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tiocromanona (TCR), $\lambda = 247,5$ nm e $\epsilon = 14.657$ L/cm.mol.....	177
Figura A.14. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tiocromanona (TCR), $\lambda = 299$ nm e $\epsilon = 4.425,4$ L/cm.mol.....	177
Figura A.A.1. Espectro no infravermelho para flavona (FVA).....	178
Figura A.A.2. Espectro no infravermelho para <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF).....	179
Figura A.A.3. Espectro no infravermelho para <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF).....	179
Figura A.A.4. Espectro no infravermelho para tioflavona (TFA).....	180
Figura A.A.5. Espectro no infravermelho para <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF).....	180
Figura A.A.6. Espectro no infravermelho para flavanona (FNA).....	181

Figura A.A.7. Espectro no infravermelho para tiocromanona (TCR).....	181
Figura A.B.1. Espectro de RMN ^1H da flavona (FVA).....	182
Figura A.B.2. Espectro de RMN ^{13}C da flavona (FVA).....	183
Figura A.B.3. Espectro de RMN ^1H da <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF).....	184
Figura A.B.4. Espectro de RMN ^{13}C da <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF).....	185
Figura A.B.5. Espectro de RMN ^1H da <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF).....	186
Figura A.B.6. Espectro de RMN ^{13}C da <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF).....	187
Figura A.B.7. Espectro de RMN ^1H da tioflavona (TFA).....	188
Figura A.B.8. Espectro de RMN ^{13}C da tioflavona (TFA).....	189
Figura A.B.9. Espectro de RMN ^1H da <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF).....	190
Figura A.B.10. Espectro de RMN ^{13}C da <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF).....	191
Figura A.B.11. Espectro de RMN ^1H da flavanona (FNA).....	192
Figura A.B.12. Espectro de RMN ^{13}C da flavanona (FNA).....	193
Figura A.B.13. Espectro de RMN ^1H da tiocromanona (TCR).....	194
Figura A.B.14. Espectro de RMN ^{13}C da tiocromanona (TCR).....	195
Figura A.C.1. Espectro de massas da flavona (FVA).....	196
Figura A.C.2. Espectro de massas da <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF).....	196
Figura A.C.3. Espectro de massas da <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF).....	197
Figura A.C.4. Espectro de massas da tioflavona (TFA).....	197
Figura A.C.5. Espectro de massas da <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF).....	198
Figura A.C.6. Espectro de massas da flavanona (FNA).....	198
Figura A.C.7. Espectro de massas da tiocromanona (TCR).....	199

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação que representa a relação entre o tempo de vida e a constante de velocidade observada experimentalmente.....	25
Equação 2. Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada.....	31
Equação 3. Equação para determinar o coeficiente de extinção molar [Pace <i>et al.</i> (1995)].....	31
Equação 4. Equação para determinar o dicróismo circular molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].....	32
Equação 5. Equação para determinar a elipticidade [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].....	32
Equação 6. Equação para determinar a elipticidade molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].....	33
Equação 7. Equação de Rahm-Weller.....	52
Equação 8. Equação de Stern-Volmer para a determinação das constantes de velocidade de supressão (k_q) [Stern e Volmer (1919)].....	52
Equação 9. Equação de Hammett.....	57
Equação 10. Equação para a determinação de K_{SV} , e conseqüentemente, k_q	91
Equação 11. Equação para determinar os valores de K_a	95
Equação 12. Equações para a obtenção dos valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0	99
Equação 13. Equação para determinar dos valores de K_b e n	103
Equação 14. 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)] dos flavonóides.....	106
Equação 15. Equação para o cálculo da distância crítica entre a ASB e os flavonóides, quando sua eficiência de transferência é 50% [Epps <i>et al.</i> (1998) e Yue <i>et al.</i> (2008)].....	107
Equação 16. Equações para o cálculo da distância entre o triptofano da ASB e os flavonóides [Sklar <i>et al.</i> (1977) e Yue <i>et al.</i> (2008)].....	107
Equação 17. Equação para calcular os valores de MRE [Khan <i>et al.</i> (2002)].....	135
Equação 18. Equações para calcular os valores de % de α -hélice da ASB.....	135
Equação A.1. Equação para calcular a concentração na cubeta.....	166

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Cinética das reações fotoquímicas.....	25
Esquema 2. Supressão do triplete de xantona por transferência de energia, em acetonitrila.....	26
Esquema 3. Supressão do triplete de xantona por transferência de elétron, em acetonitrila.....	27
Esquema 4. Supressão do triplete de dibenzossuberona por transferência de hidrogênio, em acetonitrila.....	28

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AD	gua milli-Q
AMF	Amentoflavona
ASB	Albumina sérica bovina
ASH	Albumina sérica humana
ATF	Agatisflavona
α -NAF	<i>Alfa</i> -naftoflavona
BSA	Bovine serum albumin
β -NAF	<i>Beta</i> -naftoflavona
CEX	Cicloexano
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DC	Dicrosimo circular
DCM	Diclorometano
DOF	Diidroochnaflavona
ETOH	Etanol
FNA	Flavanona
FPL	Fotólise por pulso de laser de nanossegundo
FTIR	Espectroscopia no infravermelho
FVA	Flavona
HSA	Human serum albumin
MRE	Elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual
NAF	Naftaleno (referência)
OMA	7''- <i>O</i> -Metilagatisflavona
PBS	Phosphate buffer solution
QUE	Quercetina
RMN ¹ H e ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono
SDF	<i>S,S</i> -Dióxidotioflavona
TCR	Tiocromanona
TFA	Tioflavona
UV-Vis	Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Flavonóides	4
3.1.1 Biflavonóides.....	8
3.2 Albuminas	11
3.2.1 Albumina sérica bovina (ASB) e albumina sérica humana (ASH).....	15
3.2.2 Interação entre fármacos e albuminas (ASB e ASH).....	18
3.3 Descrição das Técnicas Empregadas neste Trabalho	20
3.3.1 Fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL).....	20
3.3.2 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis).....	28
3.3.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência.....	29
3.3.4 Dicroísmo circular (DC).....	30
3.3.5 Modelagem molecular (MM).....	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Materiais	35
4.1.1 Flavonóides e tiocromanona.....	35
4.1.2 Albumina.....	35
4.1.2.1 Solução buffer de fosfato (PBS).....	35
4.2 Métodos	36
4.2.1 Equipamentos e técnicas de análise.....	36
4.3 Parte Experimental	37
4.3.1 Flavonóides, tiocromanona e albumina sérica bovina (ASB).....	37
4.3.1.1 Flavonóides comerciais (flavona (FVA), <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e quercetina (QUE)), flavonóides naturais (agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidroochnaflavona (DOF)) e tiocromanona (TCR).....	38
4.3.1.2 Albumina sérica bovina (ASB).....	40
4.3.1.3 Interação entre flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidroochnaflavona (DOF)) e albumina sérica bovina (ASB).....	40
4.3.2 Técnicas de análise.....	42
4.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho (FTIR).....	42
4.3.2.2 Ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C).....	42
4.3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	42
4.3.2.4 Espectrometria de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis).....	42
4.3.2.5 Fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL).....	43
4.3.2.6 Espectroscopia de emissão de fluorescência.....	44
4.3.2.7 Dicroísmo circular (DC).....	46
4.3.2.8 Modelagem molecular (MM).....	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48

5.1 Flavona (FVA), Alfa-naftoflavona (α-NAF), Beta-naftoflavona (β-NAF), Tioflavona (TFA), S,S-Dióxidotioflavona (SDF), Flavanona (FNA) e Tiocromanona (TCR).....	48
5.1.1 Fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL).....	48
5.1.2 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência.....	62
5.2 Interação entre Quercetina (QUE), Agatisflavona (ATF), 7''-O-Metilagatisflavona (OMA), Amentoflavona (AMF) e Diidroochnaflavona (DOF), e Solventes (Acetonitrila (ACN), Diclorometano (DCM), Etanol (ETOH) e Água milli-Q (AD)).....	63
5.2.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência.....	63
5.3 Interação entre Quercetina (QUE), Agatisflavona (ATF), 7''-O-Metilagatisflavona (OMA), Amentoflavona (AMF) e Diidroochnaflavona (DOF), e Albumina Sérica Bovina (ASB).....	67
5.3.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis).....	67
5.3.2 Espectroscopia de fluorescência.....	76
5.3.3 Dicroísmo circular (DC).....	123
5.3.4 Modelagem molecular (MM).....	140
6 CONCLUSÕES.....	148
7 SUGESTÕES FUTURAS.....	152
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153
ANEXO A.....	160
A.1 Flavonóides (flavona (FVA), alfa-naftoflavona (α-NAF), beta-naftoflavona (β-NAF), tioflavona (TFA), S,S-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR).....	160
A.1.1 Peso molecular e ponto de fusão.....	160
A.1.2 Teste de solubilidade.....	160
A.1.3 Caracterização.....	162
A.1.3.1 Flavona (FVA).....	162
A.1.3.2 Alfa-naftoflavona (α -NAF).....	163
A.1.3.3 Beta-naftoflavona (β -NAF).....	163
A.1.3.4 Tioflavona (TFA).....	164
A.1.3.5 S,S-Dióxidotioflavona (SDF).....	164
A.1.3.6 Flavanona (FNA).....	165
A.1.3.7 Tiocromanona (TCR).....	165
A.1.4 Determinação do coeficiente de absorção molar (coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar) (ϵ) para os flavonóides (flavona (FVA), alfa-naftoflavona (α -NAF), beta-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), S,S-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR).....	166
A.1.4.1 Cálculo da concentração de flavona (FVA) na cubeta.....	166
A.1.4.2 Cálculo da concentração de alfa-naftoflavona (α -NAF) na cubeta.....	167
A.1.4.3 Cálculo da concentração de beta-naftoflavona (β -NAF) na cubeta.....	167
A.1.4.4 Cálculo da concentração de tioflavona (TFA) na cubeta.....	168
A.1.4.5 Cálculo da concentração de S,S-dióxidotioflavona (SDF) na cubeta.....	168
A.1.4.6 Cálculo da concentração de flavanona (FNA) na cubeta.....	169

A.1.4.7 Cálculo da concentração de tiocromanona (TCR) na cubeta.....	169
A.1.4.8 Construção de gráficos de absorvância (A) x concentração (C) para a determinação do coeficiente de absorção molar (coeficiente de extinção molar ou absorvidade molar) (ϵ) para os flavonóides (flavona (FVA), <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF) e flavanona (FNA)) e a tiocromanona (TCR).....	170
Anexo A.A Espectros no infravermelho para os flavonóides (flavona (FVA), <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR).....	178
Anexo A.B Espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos flavonóides (flavona (FVA), <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR).....	182
Anexo A.C Espectros de massas dos flavonóides (flavona (FVA), <i>alfa</i> -naftoflavona (α -NAF), <i>beta</i> -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), <i>S,S</i> -dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR).....	196
Anexo A.D Artigo publicado no JBCS sobre a tiocromanona (TCR).....	200

1 INTRODUÇÃO

Buscando melhorar o seu dia-a-dia, o homem vem utilizando diversos flavonóides, tanto fornecidos pela natureza, os flavonóides naturais, como criados através da ciência, os flavonóides sintéticos (comerciais). A pesquisa de novos fármacos tendo flavonóides como princípio ativo (farmacóforo) 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 arteriosclerose, 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.

Flavonóides desempenham um papel proeminente na busca de produtos naturais fisiologicamente ativos, sendo que alguns milhares de compostos pertencentes a esta família já foram identificados a partir de plantas. 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 característico para flavonas. O espectro de absorção triplete-triplete para flavonas apresenta bandas na região de 360 e de 650 nm, e o tempo de vida destes tipos de triplete pode sofrer alteração de acordo com mudanças na polaridade do solvente. Estes tripletes apresentam um caráter $\pi\pi^*$ e são suprimidos por supressores de triplete típicos, assim como são reativos frente a espécies doadoras de hidrogênio.

Com as novas tendências de aplicação dos flavonóides na prevenção de diferentes enfermidades, como tumores e doenças ligadas aos processos oxidativos na célula, torna-se cada vez mais frequente o estudo desses compostos e de seus derivados, como por exemplo, os formados através de reações de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras. Essas transformações podem formar muitas vezes flavonóides com maior atividade biológica.

Os flavonóides protegem o organismo do dano produzido por agentes oxidantes como os raios ultravioleta, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, estresse, dentre outros. O organismo humano não produz essas substâncias químicas protetoras, cabendo ao homem obtê-las por meio da alimentação. Consumidos em grandes proporções dentro de uma dieta humana regular (23 a 1000 mg/dia), os flavonóides são encontrados em vegetais, legumes, frutas, chás de ervas, vinhos, mel, cerveja, entre outros produtos de consumo cotidiano. Assim, uma concentração farmacologicamente significativa destas substâncias está presente em fluidos e tecidos do corpo humano, pois, com o aumento do interesse sobre a medicina tradicional nas últimas décadas, diferentes formulações farmacêuticas vêm sendo elaboradas, nas quais os flavonóides são o princípio ativo, o que implica em um aumento significativo na sua dosagem intercorpórea, extrapolando a dosagem diária máxima recomendada de 1 g de flavonóides. Portanto, o conhecimento da interação de flavonóides com as células e os tecidos dos seres vivos é de grande importância.

Dessa forma, mais pesquisas são necessárias para detectar e caracterizar cada vez mais os flavonóides, identificar a rota metabólica no ser humano com exatidão, bem como elucidar os mecanismos de ação em relação à manutenção de saúde e prevenção de doenças para, em

um futuro próximo, poder intervir de maneira mais segura e eficaz, bloqueando ou minimizando o desenvolvimento de doenças.

Para isso, a interação entre albuminas e fármacos está sendo muito estudada, onde, geralmente, utiliza-se albumina sérica humana (ASH) (também conhecida como soro-albumina humana (SAH), em português, ou *human serum albumin* (HSA), em inglês) ou albumina sérica bovina (ASB) (também conhecida como soro-albumina bovina (SAB), em português, ou *bovine serum albumin* (BSA), em inglês). A ASB tem um custo menor, cerca de cinco vezes mais barata que a ASH, porém de estrutura semelhante e de resultados tão parecidos e promissores quanto os da ASH. A única diferença é que a ASB apresenta 2 resíduos de triptofano, e a ASH apresenta apenas um resíduo deste amino ácido.

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 de absorção 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)], delphinidina [Kanakakis *et al.* (2006)], icariína [Zhang *et al.* (2008)], isoflavonas (genisteína e daldzeína) [Mahesha *et al.* (2006)], hesperetina [Xie *et al.* (2005)], 3-hidroxiflavona [Sytnik e Litvinyuk (1996)], 7-hidroxiflavona [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 e Sengupta (2002), Zsila *et al.* (2003) e Kanakakis *et al.* (2006)] e rutina [Pastukhov *et al.* (2007)].

Por outro lado, a interação de ASB com diferentes moléculas também tem sido descrita na literatura: berbamina [Cheng *et al.* (2009)], colchicina [Hu *et al.* (2005)], efonidipina [Wang *et al.* (2008)], fluorbiprofeno [Vayá *et al.* (2008)], gatifloxacino [Guo *et al.* (2004)], glicirrizinato de monoamônio [Hu *et al.* (2004)], N-n-hexil-N'-(p-aminobenzeno-sulfonato de sódio) tiouréia [Cui *et al.* (2003)], 1-hexilcarbamoil-5-fluoruracil [Hu *et al.* (2005)], hidrocloreto de doxepina [Kandagal *et al.* (2006)], hidrocloreto de gemcitabina [Kandagal *et al.* (2006)], hidrocloreto de levamisol [Yan *et al.* (2009)], hidrocloreto de trazodona [Ashoka *et al.* (2006)], indanodiona [Stan *et al.* (2009)], licochalcona [Monti *et al.* (2009)], magnolol [Liu *et al.* (2003)], tetraciclinas [Khan *et al.* (2002) e Bi *et al.* (2005)], tinidazol [Shi *et al.* (2007)], triarilmetanos [Baptista e Indig (1998)]. Porém, na literatura, existe somente um relato de estudo da interação entre ASB e flavonóides, empregando a molécula licochalcona [Monti *et al.* (2009)].

Na literatura, não existem estudos de interação de biflavonóides (produtos naturais) com ASH ou ASB, uma vez que todas ou quase todas as moléculas estudadas com estas albuminas são produtos sintéticos comerciais. Porém, os estudos de interação entre flavonóides comerciais (descritos acima) e ASH ou ASB têm sido de grande relevância. Sendo assim, os processos de interação destes flavonóides com albumina sérica (ASH ou ASB) podem ser considerados viáveis e podem ser vistos como uma grande iniciativa para o melhoramento da vida cotidiana, no que diz respeito à qualidade de vida, proporcionando resultados bastante satisfatórios, no campo da fotoquímica e da fotofísica, quando relacionadas à fisiologia e à bioquímica dos seres vivos.

2 OBJETIVOS

- Sob o ponto de vista fotofísico e fotoquímico, este trabalho teve como objetivo estudar o comportamento de flavonóides (sintéticos comerciais e naturais) e de tiocromanona, em diferentes ambientes.
- Estudar o comportamento de flavonóides sintéticos comerciais, como flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) (sintetizada a partir da tioflavona) e do composto comercial tiocromanona (TCR), frente a solventes com diferentes polaridades (acetonitrila (ACN), cicloexano (CEX), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD)), empregando-se as seguintes técnicas de análise: fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL), espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) em temperatura ambiente.
- Avaliar o comportamento de um flavonóide sintético comercial quercetina (QUE) e de quatro biflavonóides (produtos naturais), como agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF), frente a diversos meios (em solventes com diferentes polaridades (acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD)), por técnicas de espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) em temperatura ambiente.
- Como não existem estudos com biflavonóides (produtos naturais) e ASH ou ASB, uma vez que todas ou quase todas as moléculas estudadas na literatura são produtos sintéticos comerciais, decidiu-se estudar também as interações entre albumina sérica bovina (ASB) em solução tamponada com PBS (pH = 7,4), uma albumina sérica de mais baixo custo que a ASH, e biflavonóides, como agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF), e também, com o flavonóide sintético comercial quercetina (QUE), utilizando-se diversas técnicas de análise, tais como espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) em temperaturas variadas (T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C), dicroísmo circular (DC) em temperaturas diferentes (T = 25°C, 37°C e 42°C) e modelagem molecular (MM).
- Verificar se os processos de interação de flavonóides com albumina sérica bovina (ASB) podem ser viáveis e vistos como incentivadores de novas pesquisas sobre este assunto, buscando-se melhorar a qualidade de vida do ser humano no seu dia-a-dia, uma vez que a ingestão diária de alimentos, bebidas e fármacos que contêm flavonóides se dá continuamente.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Flavonóides

Os flavonóides compreendem um grupo de compostos polifenólicos amplamente distribuídos nos vegetais (frutas, polén, raízes e caules) [Di Carlo *et al.* (1999), Pietta (2000), Andlauer *et al.* (1998) e De Aguiar *et al.* (2007)], assim como no chá preto, no café, na cerveja, no vinho tinto e em outros. São os responsáveis pelo aspecto colorido das folhas, flores e frutos, podendo estar presentes em outras partes das plantas [Beecher (2003) e Volp *et al.* (2008)]. Podem aparecer desde simples moléculas fenólicas (de baixo peso molecular) até compostos muito polimerizados com peso molecular superior a 30.000 Da [Trueba (2003)].

A estrutura básica dos flavonóides consiste num núcleo flavano (esqueleto hidrocarbonado), constituído por quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C₆-C₃-C₆ (difeníl-propano)) [Di Carlo *et al.* (1999)], sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) fundido ao anel A (Figura 1). Os anéis A e B são hidroxilados e podem conter substituintes metoxílicos [Hermann *et al.* (2001)]. Existem 13 subclasses de flavonóides (Figura 1 e Tabela 1) com um total de mais de 8.000 compostos [Trueba (2003) e Thavasi *et al.* (2006)]. Portanto, os flavonóides são derivados de benzo- γ pirona de origem vegetal [Yokozawa *et al.* (1997) e Burda *et al.* (2001)], podendo haver facilmente interconversão entre eles. Os flavonóides são biossintetizados pela combinação dos ácidos chiquímico e acilpolimalonato. Um derivado do ácido cinâmico (fenilpropano), sintetizado a partir do ácido chiquímico, age como precursor na síntese de um intermediário ao qual são adicionados três resíduos de acetato com posterior ciclização da estrutura [Di Carlo *et al.* (1999) e Degáspari *et al.* (2004)]. As subseqüentes hidrólises e reduções produzem diferentes formas de flavonóides [Pietta (2000) e De Aguiar *et al.* (2007)]. Esse grande número de compostos surge da ampla variação de combinações de grupos metila e hidroxila como substituintes na estrutura química básica dos flavonóides [Hodek *et al.* (2002) e Volp *et al.* (2008)].

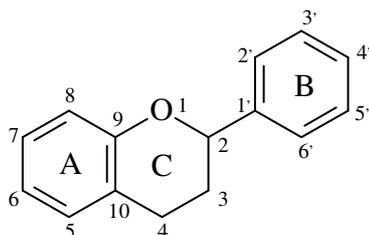
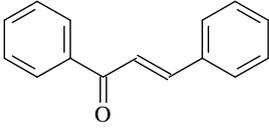
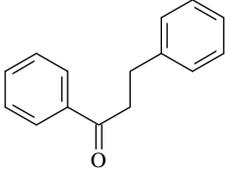
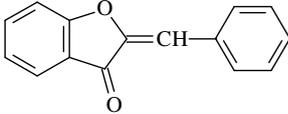
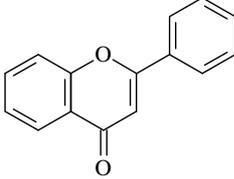
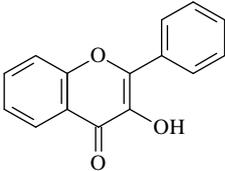
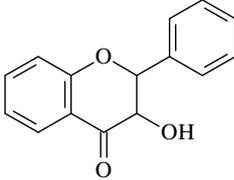
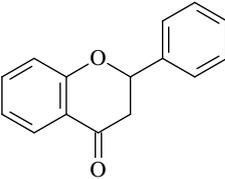
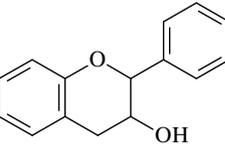
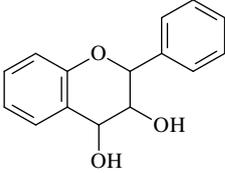
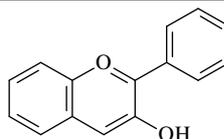
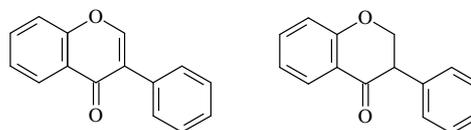
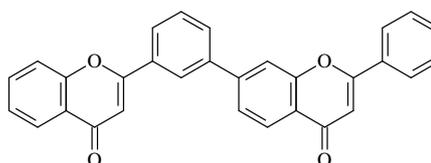
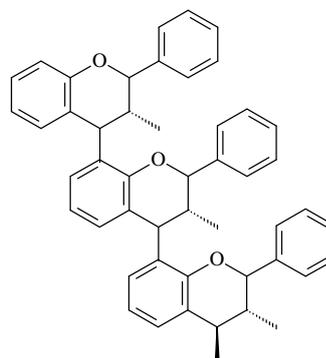


Figura 1. Estrutura básica dos flavonóides e seu sistema de numeração [Trueba (2003) e Thavasi *et al.* (2006)].

Tabela 1. Subclasses de flavonóides [Trueba (2003)].

Flavonóide	Estrutura básica
Chalcona	
Diidrochalcona	
Aurona	
Flavona	
Flavonol	
Diidroflavonol	
Flavanona	
Flavanol	
Flavanodiol ou Leucoantocianidina	

Antocianidina**Isoflavonóide****Biflavonóide****Proantocianidina ou
Tanino condensado**

As várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e no modelo de substituição da cadeia heterocíclica C [Di Carlo *et al.* (1999), Pietta (2000), Peterson *et al.* (1998) e De Aguiar *et al.* (2007)]. Diante da importância da descoberta de novos fármacos (contendo flavonóides) para o tratamento e prevenção de diferentes enfermidades, como tumores e doenças ligadas aos processos oxidativos na célula, torna-se cada vez mais frequente o estudo desses compostos e suas transformações. A explicação para a existência de uma grande diversidade estrutural dos flavonóides é dada pelas modificações químicas catalisadas por enzimas que tais compostos podem sofrer, tais como: hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, entre outras [Koes *et al.* (1994), Müzell (2006) e De Aguiar *et al.* (2007)], com estas reações podendo ocorrer com quase todas as classes de flavonóides. Já a sulfatação e prenilação são mais restritas a certos grupos de flavonóides [Heller *et al.* (1988)]. As transformações enzimáticas ocorridas em flavonóides atraem tanto pesquisadores quanto as indústrias farmacêutica e de alimentos (setor de nutracêuticos) [Manach *et al.* (2004) e Volp *et al.* (2008)]. Muitos microrganismos são capazes de metabolizar flavonóides, tendo sido encontradas diversas estruturas modificadas [Gugler *et al.* (1975) e De Aguiar *et al.* (2007)].

A maioria dos flavonóides absorvidos no intestino é transportada ao fígado ligada à albumina, através da veia porta. No fígado, os flavonóides e seus metabólitos sofrem metilações e hidroxilações. O intestino delgado é o principal órgão envolvido na glicosilação e na metilação dos flavonóides, enquanto que o fígado apresenta uma importância na sulfatação e nas metilações adicionais. Contudo, a glicosilação *in vivo* pode ocorrer tanto no intestino delgado quanto no fígado [Müzell (2006)]. Algumas bactérias são capazes de romper as ligações heterocíclicas e degradar os flavonóides a ácidos fenólicos que podem ser absorvidos, conjugados e excretados, ou metabolizados química ou enzimaticamente [Peterson *et al.* (1998) e De Aguiar *et al.* (2007)]. O metabolismo desses compostos pode influenciar sua biodisponibilidade e absorção através do intestino delgado

[De Aguiar *et al.* (2007)]. Sugere-se que a completa degradação de flavonóides ocorre mediante clivagem do anel pirano (anel C) pela ação de enzimas, produzidas por microrganismos intestinais, gerando os ácidos fenilacético, fenilpropionico e outros subprodutos inertes [Gugler *et al.* (1975) e De Aguiar *et al.* (2007)].

Os flavonóides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural e sua síntese não ocorre na espécie humana. Entretanto, tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. Conseqüentemente, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana [Peterson *et al.* (1998)]. Diversos ensaios *in vivo* e *in vitro* vêm comprovando e determinando a ampla variedade de atividades biológicas dos compostos flavonoídicos. Flavonóides (principalmente flavonas) possuem propriedades antioxidantes [Burda *et al.* (2001) e Park *et al.* (2006)], antiinflamatórias [Park *et al.* (2006)], antitrombóticas (por exemplo, contra artereosclerose) [Park *et al.* (2006)], antimicrobianas, antivirais [Chen *et al.* (2006) e Lameira *et al.* (2006)], antialérgicas (contra doenças respiratórias) [Chen *et al.* (2006)], antiulcerogênicas, antiplaquetárias, anti-hepatotóxicas, antitumorais [Chen *et al.* (2006) e Park *et al.* (2006)], antiasmáticas, anti-HIV [Lameira *et al.* (2006)], reguladoras de crescimento em plantas, controladoras da respiração e fotossíntese, de morfogênese e de determinação sexual [Chapman e Hall (1982) e Smith *et al.* (1986)], e inibidoras de enzimas como a transcriptase reversa, proteína quinase C, tirosina quinase C, calmodulina, ornitina descarboxilase, hexoquinase, aldose redutase, fosfolipase C e topoisomerase II [Trueba (2003), Degáspari *et al.* (2004) e Lopes *et al.* (2007)]. A química de biflavonóides também demonstra a importância do seu potencial farmacológico e o poder destas substâncias como marcadores quimiotaxonômicos [Suzart *et al.* (2007)].

Suas propriedades biológicas estão relacionadas com a atividade antioxidante [Thavasi *et al.* (2006)] que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais) [Mamede *et al.* (2004) e Volp *et al.* (2008)]. Com isso, dentre todas as propriedades biológicas, a de maior interesse tem sido aquela relacionada aos seus efeitos antioxidantes, os quais têm sido alvo de inúmeros estudos principalmente de corte clínico e nutricional, tendo em conta que doses farmacológicas de antioxidantes dietéticos comumente recomendados em todo o mundo, como é o caso das combinações vitamínicas (vitamina E mais vitamina C e β -caroteno), não produzem os efeitos esperados ou resultam em danos. Por esta razão, para se conseguir uma melhor ação antioxidante, prefere-se incluir na dieta uma mistura de flavonóides e taninos [Trueba (2003)]. Além disso, a presença de açúcares no flavonóide reduz a atividade oxidante [Kuskoski *et al.* (2004) e Volp *et al.* (2008)].

Em pesquisas epidemiológicas, alguns flavonóides apresentam-se associados à proteção contra doenças do envelhecimento. Isto pode ser justificado devido à sua ação antioxidante. A formação de radicais livres pelo oxigênio é supostamente a chave para o desenvolvimento de câncer e doenças coronárias, e a ação antioxidante dos flavonóides está ligada à proteção da membrana celular para que estas doenças não ocorram. Radicais livres podem atacar biomoléculas, dentre as quais destacam-se os lipídios, as proteínas ou DNA propriamente dito, os quais podem ser preservados pela ação dos antioxidantes [Degáspari *et al.* (2004)]. Após muitos avanços nessa linha de pesquisa, pode-se afirmar que novos estudos toxicológicos e farmacológicos devem ser realizados, uma vez que a ampla diversidade estrutural desses compostos e sua capacidade de interação com outras substâncias nos levam a imaginar que novas descobertas ainda podem e devem ser realizadas.

3.1.1 Biflavonóides

A família Ochnaceae pertence à ordem Theales [Dahlgren (1980)] e compreende cerca de 28 gêneros e 400 espécies de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil, ocorrem aproximadamente 9 gêneros com 105 espécies [Barroso (1986) e Joly (1988)]. São plantas essencialmente arbóreas ou arbustivas, raramente ervas. As espécies espalhadas pelo país recebem designações específicas como Angelim (*Ouratea vaccinoides*), Caju Bravo (*Ouratea floribunda* e *Ouratea salicifolia*) e Coração de Bugre (*Ouratea parviflora*). *Ouratea floribunda* e *Ouratea castanaefolia* são empregadas em ornamentação urbana. No Nordeste, as espécies desse gênero são conhecidas como batiputá [Barroso (1986), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)]. O que bem caracteriza as espécies são as flores geralmente vistosas e freqüentemente de coloração amarela. As sementes de algumas espécies dessa família, principalmente o Batiputá, produzem um tipo de “manteiga” que fornece um óleo adocicado e aromático que se torna rançoso com facilidade, além de ser usado em conservas e temperos, este óleo já teve indicação popular como anti-reumático, útil na cura de paralisias, erisipela, feridas do útero e outras ulcerações [Barroso (1986)], adstringentes, tônicas, estomáquicas, vermífugas [Braga (1960)], além do tratamento de distúrbios gástricos e reumatismo [Mbing *et al.* (2003)]. Esta biodiversidade é pouco conhecida quando se trata do estudo de seus componentes químicos e atividade biológica, entre outras [Dos Santos (2009)].

As espécies da família Ochnaceae, são pouco conhecidas do ponto de vista químico e biológico. Estudos químicos demonstram que são capazes de biossintetizar terpenos, flavonóides e biflavonóides, sendo mais bem representada pelos gêneros *Ouratea*, *Ochna*, *Lophira* e *Luxemburgia* [Tih *et al.* (1989), Messanga *et al.* (2002), Likhitwitayawuid *et al.* (2001) e Tih *et al.* (1992)]. A frequência e a diversidade estrutural de biflavonóides em espécies desses gêneros permitem que sejam utilizados como marcadores taxonômicos [Suzart (2007), Suzart *et al.* (2007) e Dos Santos (2009)].

Em 1929, foi isolada a primeira biflavona, a gíngentina, do Ginkgo Biloba [Lin *et al.* (1997)]. Desde então, mais de mil biflavonóides foram isolados de plantas, e uma variedade de atividades biológicas tem sido relacionada a esta classe de substâncias [Lin *et al.* (1999), Suzart (2007), Suzart *et al.* (2007) e Dos Santos (2009)].

Além das considerações acima, o que é mais frequente na mídia e no meio científico sobre os trabalhos relacionados à química de produtos naturais é o aproveitamento da química das espécies vegetais fornecedoras de produtos com propriedades úteis na indústria farmacêutica, podendo as substâncias serem usadas como medicamentos ou como parte deles. O grande número de substâncias naturais usadas na indústria farmacêutica justifica o crescente investimento na descoberta das propriedades dessas substâncias [Dos Santos (2009)]

As justificativas mais frequentes para a realização de estudo químico em plantas estão na expectativa de se descobrir substâncias naturais biologicamente ativas e contribuir para o melhor entendimento e uso da biodiversidade. A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas. A grande variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teria se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses vegetais e para a adaptação às condições ambientais [Montanari *et al.* (2001) e Bolzani (2001) e Dos Santos (2009)].

A química de produtos naturais está inserida no contexto da biodiversidade, pois além do conhecimento dos constituintes químicos relacionados às espécies em estudo, gera também informações para o entendimento de outras áreas de conhecimento como ecologia química, quimiotaxonomia, etnofarmacologia, genética, farmacologia, bioquímica, etc. [Da Silva (2006)].

Os critérios morfológicos utilizados na identificação das espécies vegetais podem ser acrescidos de informações relacionadas com seus possíveis constituintes químicos, detectados pelo estudo fitoquímico de espécies de diferentes famílias. Essas estreitas relações, denominadas quimiotaxonômicas, permitem inclusive se fazer previsões sobre a composição química de uma determinada espécie vegetal e aumentam as chances de se encontrar substâncias específicas que podem ocorrer dentro de uma família ou gênero. Sob este aspecto, merecem destaque os estudos de rotas biossintéticas e enzimas envolvidas nos processos de produção dos metabólitos especiais, além de estudos em ecologia química no entendimento das interações dessas substâncias com o meio ambiente [Da Silva (2006) e Dos Santos (2009)].

Os profissionais da área de química de produtos naturais sempre deram maior atenção ao estudo das substâncias micromoleculares, mas ultimamente têm produzido trabalhos com estruturas mais complexas, não se limitando às substâncias elaboradas via processos do metabolismo especial. O avanço tecnológico tem permitido o aperfeiçoamento da ligação entre os trabalhos de química de produtos naturais, bioquímica e farmacologia. A evidência disso pode ser confirmada pelo grande número de títulos de divulgações científicas nesta área como: *Phytochem.*, *Biochem. System. Ecol.*, *J. Nat. Canc. Inst.*, *J. Med. Biol. Res.*, etc. [Suzart (2007), Suzart *et al.* (2007) e Dos Santos (2009)].

Além da contribuição para o conhecimento fitoquímico das espécies vegetais de diferentes famílias, é importante identificar o componente (substância) majoritário na espécie estudada. Isso revela a fonte dessa substância e fornece material para avaliar as possíveis atividades biológicas e utilizá-la na preparação de derivados que, às vezes, podem potencializar suas atividades [Dos Santos (2009)].

Os biflavonóides constituem uma classe de flavonóides diméricos, diferenciando-se de outros oligômeros como as proantocianidinas, devido à origem biogenética das unidades flavanoídicas constituintes. A maioria dos representantes dessa classe de produtos naturais é formada pelos dímeros flavona-flavona, flavona-flavanona, flavanona-flavanona além de ocorrerem, mais raramente, os dímeros de chalconas e de isoflavonas. Quando as duas unidades são iguais, constituem os bisflavonóides e quando as duas unidades são diferentes, os biflavonóides [Suzart *et al.* (2007), Fernandes (2008) e Dos Santos (2009)]. As ligações entre as unidades flavonoídicas podem ser C-C ou C-O-C envolvendo os anéis A, B ou C dos monômeros (Figura 2) [Suzart *et al.* (2007) e Dos Santos (2009)]. Raramente ocorre alteração no padrão de oxigenação dos precursores, sendo garantida a oxigenação em 5, 7 e 4' e raramente uma oxidação adicional em 3'. Podem ocorrer oxidações nas posições 6, 8 ou 3' e quando isso acontece é certamente proveniente da outra unidade ligada nessa posição via C-O-C [Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)].

Utiliza-se a numeração dos biflavonóides atribuindo números ordinários para os anéis A e C e primados (') para o anel B de um dos monômeros. Para a segunda unidade, empregam-se números ordinários duplamente primados (') para os núcleos A e C e números ordinários triplamente primados (''') para o núcleo B. De acordo com os átomos de carbono envolvidos na ligação entre as unidades, os dímeros são classificados em grupos de biflavonóides (Figura 2) [Simões *et al.* (2001), Chari *et al.* (1977), Dora e Edwards (1991) e Suzart *et al.* (2007)], além dos dímeros de chalconas: C-3→O-C-4''' (luxenchalconas) [De Carvalho *et al.* (2004)] e C-3'→C3''' (brackeninas) [Drewes *et al.* (1984)] e dos dímeros de isoflavonas C-2→C-2'' (hexaspermonas) [Moreira *et al.* (1994)], sem destacar os dímeros com duas ligações entre as unidades. Certos grupos hidroxila podem apresentar-se metilados, originando os respectivos éteres metílicos que, às vezes, recebem nomes especiais [Moreira *et al.* (1999), Felício *et al.* (1995), Velandia *et al.* (2002), Daniel *et al.* (2005), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)].

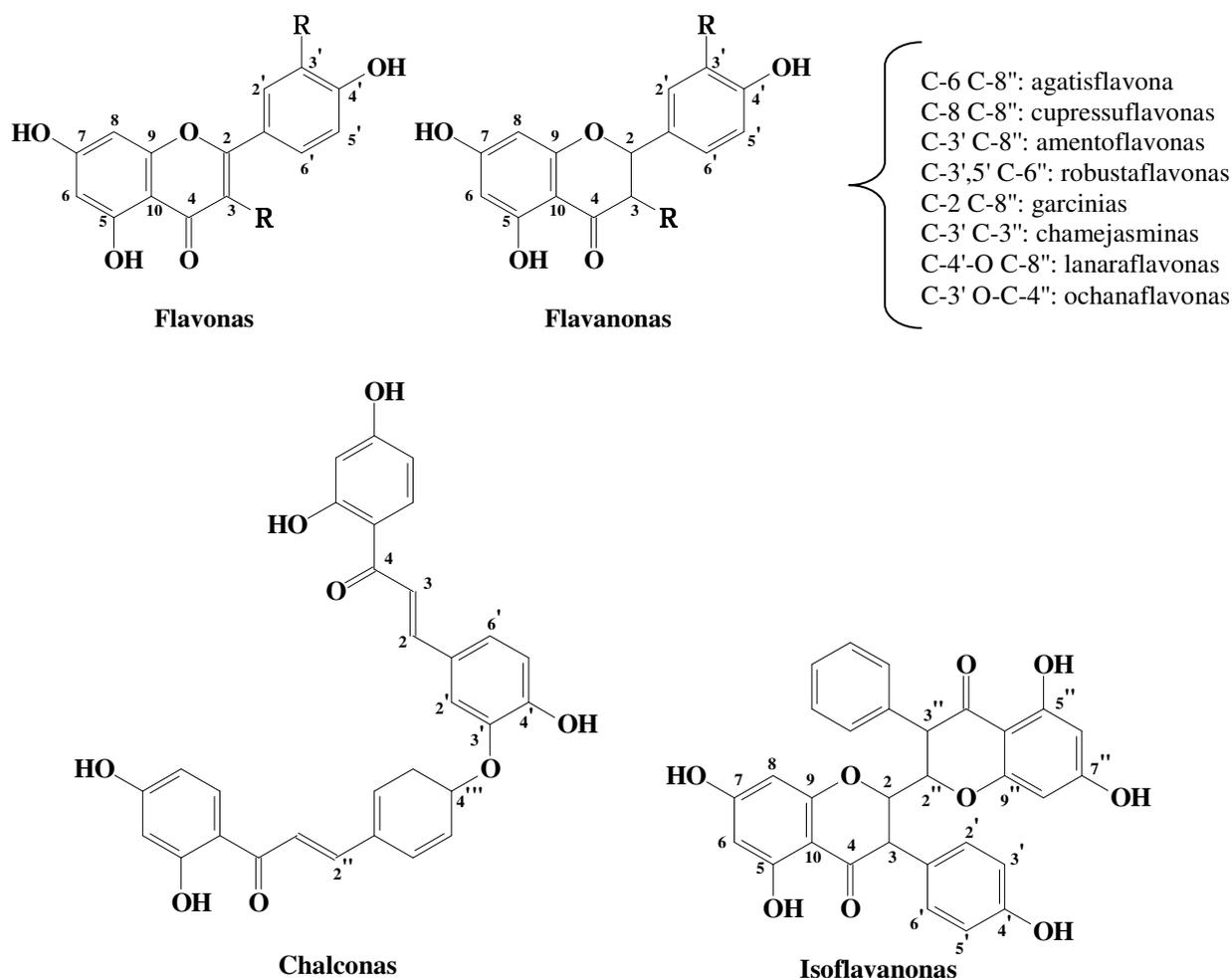


Figura 2. Dímeros de Flavonóides [Simões *et al.* (2001), Chari *et al.* (1977), Dora e Edwards (1991), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)].

Nos casos dos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia*, além de alguns monômeros, tem-se detectado com frequência a presença de bi- ou bisflavonóides, destacando-se as hexaspermonas, amentoflavonas, agatisflavonas e robustaflavona, lanaraflavonas em *Ouratea*. Em *Luxemburgia* tem-se detectado os biflavonóides derivados de chalconas, luxenchalcona (C-3'→O-C-4''') e ochnaflavona ou oquinaflavona (também C-3'→O-C-4'''), que podem ter como precursor a luxenchalcona. Isso permite perceber a diferença entre esses gêneros sendo que *Luxemburgia* é próximo ao gênero *Ochna* e metaboliza com frequência os dímeros de chalconas [Pegnyemb *et al.* (2001)]. Por outro lado, *Ouratea* tem tendência em metabolizar com mais frequência os dímeros de flavonas. A ocorrência de biflavonóides nos gêneros *Ouratea* e *Luxemburgia* permite destacar a importância da química dos mesmos como potencial farmacológico e considerar as substâncias dessa classe como marcadores quimiotaxonômicos [Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)].

Além dos flavonóides e biflavonóides, esses gêneros são bioprodutores de outras classes de metabólitos como triterpenos, diterpenos, depsídeos, ésteres graxos e triglicerídeos [Velandia *et al.* (2002), Felício *et al.* (2004), De Carvalho *et al.* (2000), De Carvalho *et al.* (2002) e Velandia *et al.* (1998)]. Entre essas classes de substâncias, os biflavonóides recebem destaque na literatura devido à frequência e abundância com que são encontrados nesses gêneros e cuja diversidade estrutural é devida, principalmente, aos diferentes padrões de ligações entre seus monômeros [Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)].

Na literatura existem vários estudos farmacológicos, tanto com frações de extratos brutos como com biflavonóides naturais e seus derivados isolados de espécies do gênero *Ouratea* e *Luxemburgia*. Estes estudos mostraram que os biflavonóides 7''-O-metilagatisflavona (de *O. hexasperma*), a amentoflavona (de *O. semisserrata*) e o derivado acetilado da amentoflavona apresentaram atividade inibitória da DNA topoisomerase humana tipo I, potente atividade sobre a inibição do crescimento de células de carcinoma de Ehrlich, porém apenas a agatisflavona apresentou atividade sobre a inibição da DNA topoisomerase humana tipo II- α e inibição de 42% do crescimento de células de leucemia humana K56225,26. As biflavonas 6 \rightarrow 6''-begenkwanina e a 7,7''-O-dimetilagatisflavona isoladas de *O. spectabilis* apresentaram atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase de cristalino bovino. O aumento da atividade dessa enzima está relacionado com a patogênese da maioria das complicações da diabetes, como cataratas, retinopatia, neuropatia [Felício *et al.* (1995), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)]. O extrato hidroetanólico e a fração acetato de etila de *O. semisserrata* apresentaram efeito vasodilatador endotélio-dependente e atividade antihipertensiva *in vitro*, inibindo a conversão da enzima angiotensina I(ACE) [Cortes *et al.* (2002), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)]. O extrato aquoso de *Ouratea sp.*, contendo proantocianidina, mostrou atividade antitumoral contra o carcinossarcoma de Walker 256 e sarcoma 180 em ratos [Sampaio e De Oliveira (1975), De Oliveira *et al.* (1972), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)]. O óleo extraído do extrato hexânico dos frutos de *Ouratea parviflora* apresentou atividade antibacteriana e antifúngica [Marcol *et al.* (1988), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)]. Os biflavonóides isolados de *O. spectabilis*, *O. multiflora* e *O. parviflora* mostraram inibição da produção de aflatoxina por *Aspergillus flavus* [González *et al.* (2001), Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)].

Apesar dessas espécies não serem tão conhecidas na medicina popular, a frequência das biflavonas é indicativa de ótimas perspectivas para se tornarem constituintes de medicamentos [Suzart (2007) e Suzart *et al.* (2007)], uma vez que apresentam diversas propriedades farmacológicas, sendo de grande interesse a descoberta das suas atividades biológicas e da rota metabólica dessas substâncias nos seres vivos, bem como os mecanismos de ação envolvidos, no que diz respeito à manutenção da saúde e à prevenção de doenças, visando poder intervir de maneira mais segura, bloqueando ou minimizando, o desenvolvimento de várias doenças.

3.2 Albuminas

Em animais superiores, as proteínas são os compostos orgânicos mais abundantes, representando cerca de 50 % do peso seco dos tecidos. Do ponto de vista funcional, seu papel é fundamental, não existindo processo biológico que não dependa da presença ou da atividade deste tipo de biomolécula. As proteínas desempenham inúmeras funções distintas, como por exemplo: enzimas, hormônios, proteínas transportadoras, anticorpos e receptores de muitas células. Todas as proteínas contêm carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio e muitas possuem enxofre. Há variações na composição de diferentes proteínas, porém a quantidade de nitrogênio representa, em média, 16 % da massa total da molécula. Dessa forma pode-se calcular a quantidade aproximada de proteína em uma amostra medindo-se a sua quantidade de nitrogênio. 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 3 [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

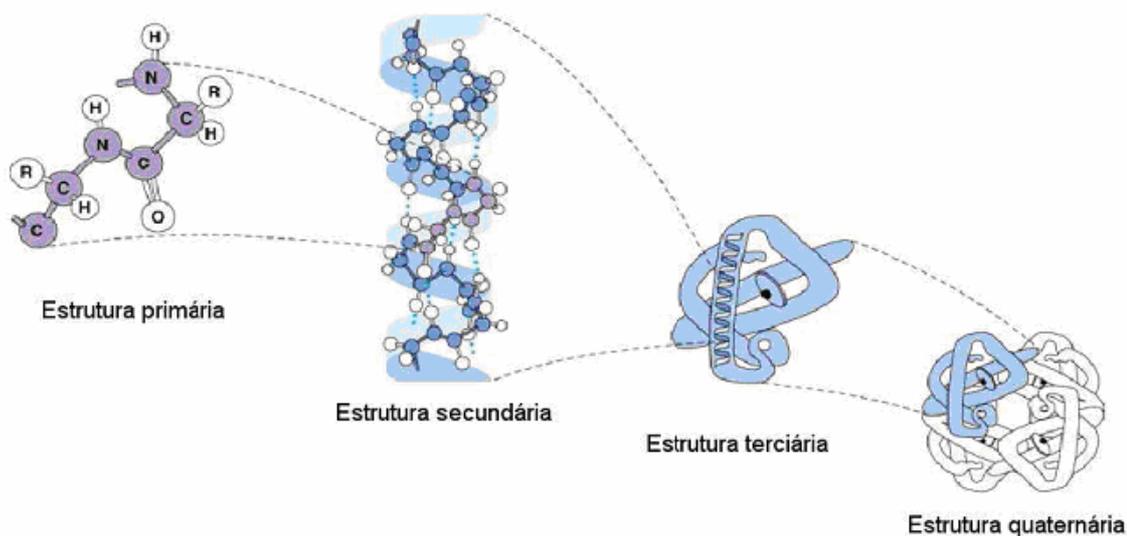


Figura 3. Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.

- Estrutura primária (Figura 3): 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 3): 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) α -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 4; e b) folha- β : as cadeias de peptídeos se unem formando filas paralelas que se estabilizam de maneira intermolecular mediante pontes de hidrogênio, Figura 5 [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

- Estrutura terciária (Figura 3): 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 6 [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

- Estrutura quaternária (Figura 3): 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)].

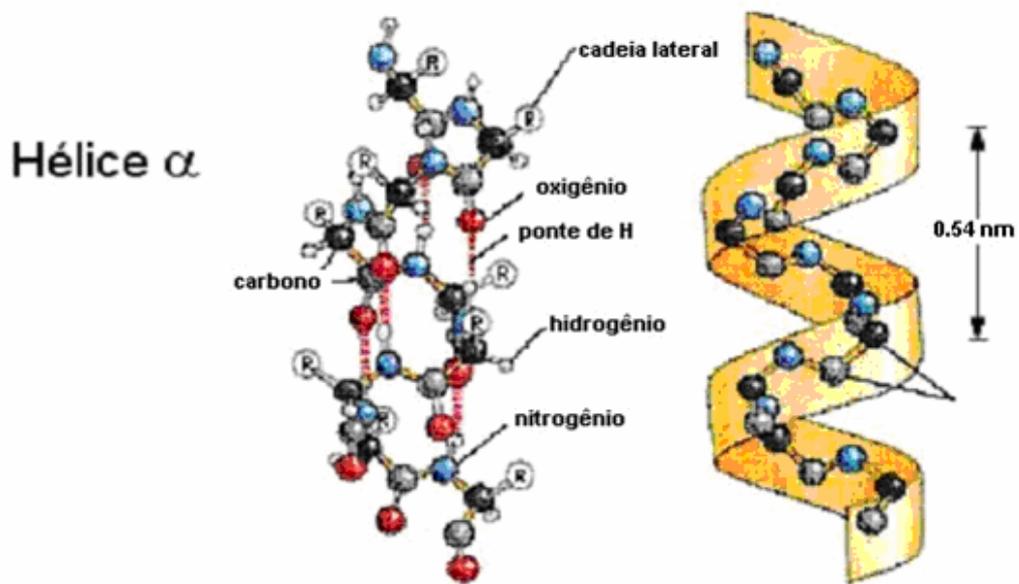


Figura 4. Estrutura do tipo α -hélice.

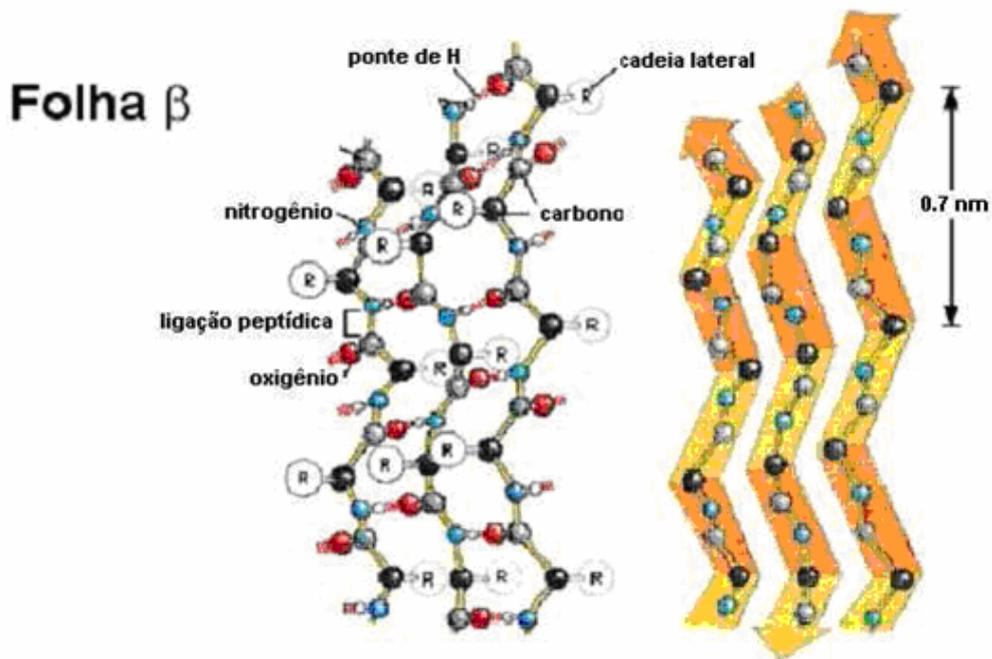


Figura 5. Estrutura do tipo folha- β .

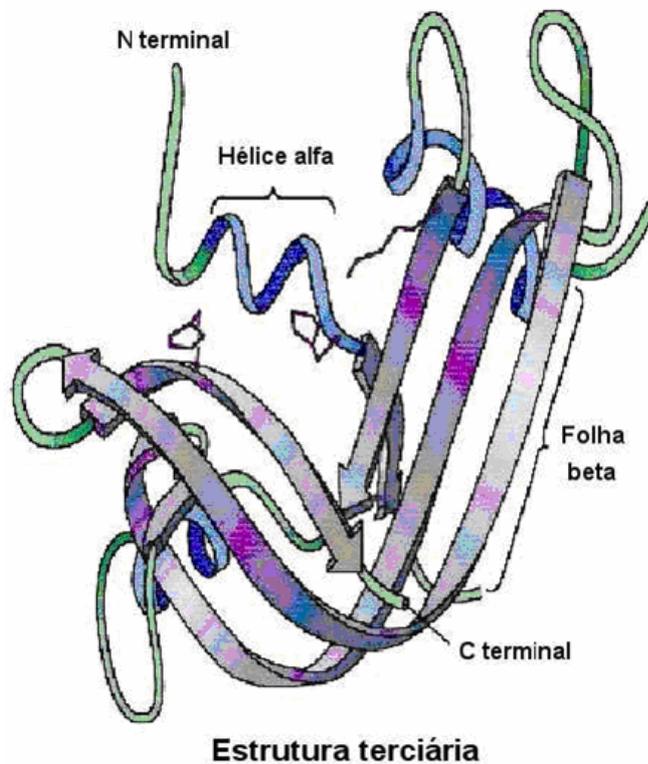


Figura 6. Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.

A albumina é uma proteína de alto valor biológico, presente na clara do ovo, no leite e no sangue. É frequentemente usada por praticantes de musculação que querem aumentar sua massa muscular. No sangue é a principal proteína, que se encontra em grande abundância no plasma, e é sintetizada no fígado. A albumina é usada principalmente em tratamentos relacionados com queimaduras e hemorragias graves. Uma pessoa com queimaduras de

terceiro grau em 30 a 50% do seu corpo necessitaria de 600 gramas de albumina. É necessário de 10 a 15 litros de sangue armazenado para extrair-se essa quantidade de albumina. 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. A albumina tem carga elétrica negativa. A membrana basal do glomérulo renal também está carregada negativamente, o que impede a filtração glomerular da albumina para a urina. Na síndrome nefrótica, esta propriedade é menor e perde-se grande quantidade de albumina pela urina [Lehninger *et al.* (1993), Stryer (1995) e Dose (1982)].

Nos mamíferos, a albumina é sintetizada inicialmente como prealbumina pelo fígado. Após a remoção do peptídeo final, tem-se a proalbumina que será modificada pela remoção de seis resíduos de propeptídeo do novo terminal N (uma das terminações da cadeia em uma molécula de peptídeo). A albumina enviada para a circulação sanguínea possui uma meia-vida de 19 dias. Como a albumina é sintetizada no fígado, a diminuição de sua quantidade no plasma pode ser produto de uma doença hepática, mas também pode ser o resultado de uma doença renal que permita que a albumina escape pela urina. Sua diminuição pode também estar relacionada à desnutrição ou a uma dieta pobre em proteínas. 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 funções da albumina são: manutenção da pressão osmótica, transporte de hormônios tireoideais, transporte de hormônios lipossolúveis, transporte de ácidos graxos livres, transporte de bilirrubina não conjugada, transporte de fármacos e fármacos, aumento da libido, união competitiva com íons de cálcio e controle do pH. O excesso de albumina ocasiona diversas doenças, como problemas renais e hepáticos. Além disso, o consumo excessivo de albumina provoca ganho de peso, sendo um aumento em massa muscular sem acúmulo de gorduras, e também é responsável pelo fator anti-catabólico, ou seja, bloqueia a perda de músculos. Os problemas causados pelo excesso de albumina são: cirrose hepática (por diminuição de síntese hepática), desnutrição, síndrome nefrótica (por aumento na sua excreção) e transtornos intestinais (perda na absorção de amino ácidos durante a digestão e perda por diarreias). As enfermidades genéticas que provocam hipoalbuminemia são muito raras. Algumas pessoas utilizam alta dose de albumina para realizar treinos de força (musculação, artes marciais e outros). Uma alta dose desta proteína pode causar flatulências.

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).

3.2.1 Albumina sérica bovina (ASB) e albumina sérica humana (ASH)

Albuminas séricas (ASs (em português) ou SAs (em inglês, serum albumins)) são proteínas de maior solubilidade, constituintes do sistema circulatório e têm muitas funções fisiológicas, incluindo a 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 e zinco), etc.) [He e Carter (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 (fármacos) e ASs é um fator determinante e importante para a farmacodinâmica e farmacocinética do fármaco, dependendo da concentração de fármaco administrada, podendo afetar a distribuição e a eliminação do fármaco [Petitpas et al. (2001), He et al. (2005), Cui et al. (2007), Yue et al. (2008) e Stan et al. (2009)].

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. Como a albumina sérica é a mais abundante proteína no sistema circulatório, ela contribui em 80% para a manutenção da pressão osmótica do sangue [He e Carter (1992), Sugio et al. (1999), Cui et al. (2008) e Yue et al. (2008)]. É também um dos principais responsáveis pela manutenção do pH do sangue [Sugio et al. (1999) e Tang et al. (2006)].

A albumina sérica humana (ASH) é a proteína em maior quantidade no plasma sanguíneo humano (aproximadamente 60% da proteína total) [He e Carter (1992), Sugio et al. (1999), Peters (1996), Tang et al. (2006), Cui et al. (2008), Shaw e Pal (2008), Li et al. (2009) e Stan et al. (2009)], pode se ligar reversivelmente a diversos ligantes [He et al. (2006) e Li et al. (2008)], e é de estrutura bem conhecida [Kandagal et al. (2006)]. 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 α -hélice [He e Carter (1992), He et al. (2006) e Stan et al. (2009)] e pode se ligar e transportar fármacos pouco solúveis em água (hidrofóbicos) [Li et al. (2008) e Takehara et al. (2009)]. A ASH é capaz de se ligar a um grande número de fármacos, resultando no aumento de solubilidade do fármaco no plasma, diminuindo a sua toxicidade, e/ou protegendo contra a oxidação da ligação do ligante (fármaco). É a proteína de maior solubilidade no sistema circulatório, transporta alta concentração de fármaco e tem muitas funções fisiológicas [Li et al. (2008) e Yue et al. (2008)]. A capacidade das proteínas se ligarem a 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 α -hélice semelhantes (I, II e III) [[Sugio et al. (1999), Petitpas et al. (2001), Falini et al. (2006), Li et al. (2007), Shaw e Pal (2008) e Yue et al. (2008)]. Cada domínio subdivide-se em dois subdomínios, A e B [Falini et al. (2006)], que contém seis e quatro α -hélices, respectivamente [Petitpas et al. (2001) e He et al. (2005)]. Análises cristalográficas da estrutura revelam que os sítios de ligação com o fármaco 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 e Pal (2008) e Li et al. (2009)], os quais são consistentes com os sítios I e II, respectivamente [Cui et al. (2007) e Li et al. (2009)]. Uma grande cavidade hidrofóbica (um resíduo de triptofano) está presente no subdomínio IIA [Cui et al. (2007) e Li et al. (2009)]. A geometria da bolsa em IIA é completamente diferente do encontrado para IIIA [Kandagal et al. (2006)]. O sítio I, também é conhecido como o sítio de ligação da warfarina, e é formado por uma bolsa no subdomínio IIA e contém somente um triptofano de ASH (Trp-214) neste subdomínio [Krangh-Hansen et al. (2002), Kandagal et al. (2006), Stan et al. (2009) e Takehara et al. (2009)]. O sítio II está localizado no subdomínio IIIA e é conhecido como o sítio de ligação da benzodiazepina [Krangh-Hansen et al. (2002) e Stan et al. (2009)]. Dentre esses sítios, o sítio I parece ser mais versátil, porque ele pode se ligar com alta afinidade, a 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 e Pal (2008) e Li *et al.* (2009)], contendo 17 pares de dissulfeto, uma cisteína livre [He e Carter (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 e Carter (1992), Li *et al.* (2007), Shaw e Pal (2008) e Takehara *et al.* (2009)]. Na ASH, os domínios I, II e III contêm os resíduos de 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) é um polipeptídeo, que tem o formato de um coração, liga-se de forma reversível a um grande número de ligantes, 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 ASH [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).

Talvez a propriedade mais interessante da albumina sérica seja a sua capacidade em ligar-se reversivelmente [He *et al.* (2006)] a uma grande variedade de ligantes e fármacos, transportando inúmeras substâncias para diversos órgãos através do sistema circulatório. A albumina é a principal transportadora de ácidos graxos, que são insolúveis no plasma sanguíneo. Também possui muitas outras funções, como sequestrar radicais livres de oxigênio e inativar vários metabólitos lipofílicos tóxicos como a bilirrubina. A albumina tem uma grande afinidade por ácidos graxos, hematina, bilirrubina e por pequenos compostos aromáticos negativamente carregados. A albumina forma ligações covalentes com fosfato piridoxil, cisteína, glutationa e vários metais como cobre, níquel, mercúrio, prata e ouro. No plasma circulante, aproximadamente 30 % dos grupos -SH livres, Cys-34, são oxidados por cisteína e glutationa.

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 7 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)].

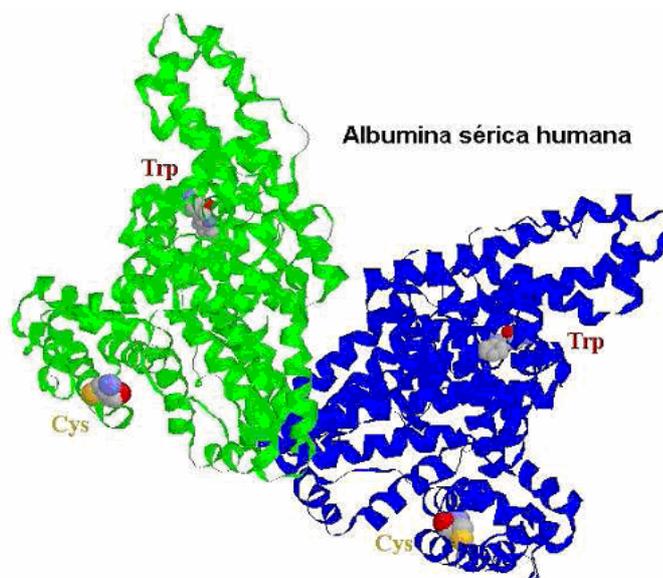


Figura 7. Estrutura quaternária da ASH com os resíduos de cisteína e triptofano em destaque (construída a partir das coordenadas 1BM0, disponíveis no PDB (*Protein Data Bank*)) [Dose (1982)].

Como a albumina é uma proteína transportadora multifuncional, acredita-se que ela possa ser uma transportadora ou reservatório de óxido nítrico, e possa estar relacionada com importantes processos fisiológicos ainda não compreendidos envolvendo o NO. A S-nitrosação *in vivo* dessa proteína é comumente observada e o processo de S-nitrosação *in vitro* por nitrito em meio ácido tem sido utilizado por diversos pesquisadores. Apesar disso, mais recentemente tem sido observado que esse não é um método adequado para muitas proteínas, por causa da desnaturação ácida, que pode ser irreversível, e porque outros grupos funcionais, como aminas, álcoois e aromáticos, são susceptíveis de modificação por nitrito acidificado. Em albumina, sugeriu-se que além de S-nitrosilação da única cisteína da molécula, resíduos de triptofano (um em albumina humana e dois em albumina bovina) também seriam modificados [Dose (1982) e Zhang *et al.* (1996)]. Encontrou-se também que albuminas com grupo -SH bloqueados provocavam dilatação de vasos sanguíneos *in vitro* quando modificadas por nitrito acidificado. Isso sugeriu que a nitrosação de outros sítios poderia ser importante para a distribuição de óxido nítrico no sistema vascular [Zhang *et al.* (1996)]. Para esclarecer a influência dos resíduos de triptofano nesse processo de nitrosação em meio ácido, alguns pesquisadores investigaram o processo em três proteínas: a albumina sérica bovina (ASB), que possui uma cisteína livre e dois resíduos de triptofano, a albumina sérica humana (ASH), com a cisteína livre na mesma posição da cadeia que a ASB, mas com apenas um resíduo de triptofano, e a insulina, que não possui resíduos de triptofano nem de cisteína livre [Zhang *et al.* (1996)].

3.2.2 Interação entre fármacos 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 fármacos 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 fármacos endógenos e exógenos. A interação do fármaco com a albumina influencia a sua distribuição, excreção, metabolismo e interação com o problema alvo, uma vez que, isso vai

dependem da concentração de fármaco administrada [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 fármaco 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 de absorção no ultravioleta (UV) [Baroni *et al.* (2001)], espectroscopia de dicroísmo circular (DC) [Wilting *et al.* (1980)], espectroscopia Raman [Shen *et al.* (2003)], ressonância magnética nuclear (RMN) [Sulkowska *et al.* (2005)], eletroquímica [Hepel (2005) e Wu *et al.* (2004)], reflectância total atenuada - infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) [Millot *et al.* (2001)], modelagem molecular (MM) [Cui *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008) e Monti *et al.* (2009)] e fotólise por pulso de laser [Bueno *et al.* (2009) e Monti *et al.* (2009)]. Sendo assim, a interação entre fármacos 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 fármaco-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 fármaco-proteína, 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 fármaco-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 do fármaco com a albumina sérica.

A interação entre albumina sérica humana (ASH) e fármacos vêm sendo mais estudada do que com ASB. Para isso, foram utilizadas as técnicas de espectroscopia de absorção no ultravioleta, espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, ressonância magnética nuclear, infravermelho com transformada de Fourier por reflectância total atenuada, modelagem molecular e/ou fotólise por pulso de laser. A interação de ASH com as seguintes moléculas já foi relatada na literatura: 8-acetil-7-hidróxicumarina [Li *et al.* (2009)], ácido 5-aminosalicílico [Cui *et al.* (2004)], ácido clorogênico [Kang *et al.* (2004)], ácido felúrico [Kang *et al.* (2004)], ácido glicirretínico [Tang *et al.* (2006)], 1- β -O-acil-glucuronidas [Bueno *et al.* (2009)], alpinetina [He *et al.* (2005)], 5-aminosalicilato de zinco [Cui *et al.* (2004)], 1-benzoil-4-*p*-clorofenil-tiosemicarbazida [Cui *et al.* (2004)], 3-(*p*-bromofenil)-5-metil-tioindantoina [Cui *et al.* (2007)], camferol [Kanakis *et al.* (2006)], carprofeno [Moser *et al.* (2000)], ciprofloxacino [Ahmad *et al.* (2006)], cumarinas [Chen *et al.* (2006)], daunomicina [Tang *et al.* (2005)], daunorubicina [Cui *et al.* (2008)], delfinidina [Kanakis *et al.* (2006)], esculetina [Yue *et al.* (2008)], fluorbiprofeno [Vayá *et al.* (2008)], fluorquinolonas [Zhang *et al.* (2007)], guaiacol [He *et al.* (2006)], hesperetina [Xie *et al.* (2005)], N-*n*-hexil-N'-(*p*-aminobenzeno-sulfonato de sódio) tiouréia [Cui *et al.* (2003)], hidrocloreto de gemcitabina [Kandagal *et al.* (2006)], 3-hidroxiflavona [Sytnik e Litvinyuk (1996)], 7-hidroxiflavona [Banerjee *et al.* (2008)], 2-hidroxi-3-nitro-9-fluorenona [Gao *et al.* (2004)], honokiol [Li *et al.* (2008)], icariína [Zhang *et al.* (2008)], imidacloprid [Qing *et al.* (2009)], indanodiona [Stan *et al.* (2009)], 5-indouridina [Cui *et al.* (2008)], isoflavonas (genisteína e daldzeína) [Mahesha *et al.* (2006)], morina [Xie *et al.* (2006)], nevadensina [Li *et al.* (2007)], nobiletina [Yue *et al.* (2008)], oquiratoxina A [Il'chev *et al.* (2002)], porfirinas [Shaw *et al.* (2008)], psoralenos [Chen *et al.* (2006)], puerarina [Li *et al.* (2008)], quercetina [Sengupta e Sengupta (2002),

Zsila *et al.* (2003) e Kanakis *et al.* (2006)], reína [Li *et al.* (2007)], rodenticida [Tang *et al.* (2005)], rutina [Pastukhov *et al.* (2007)], shikonina [He *et al.* (2005)], sulfasalazina [Zubik *et al.* (2009)], tetraciclina [Bi *et al.* (2005)] e tiopental [Khan *et al.* (2008)].

Dentre as moléculas citadas acima, são flavonóides: alpinetina, camferol, delphinidina, 3-hidroxiflavona, 7-hidroxiflavona, icariína, isoflavonas (genisteína e daldzeína), hesperetina, morina, nevadensina, nobiletina, puerarina, quercetina e rutina.

Como a albumina sérica bovina (ASB) apresenta uma estrutura semelhante à da ASH e é bem mais barata, ela também vem sendo grande fonte de estudo acerca da interação ASB e fármacos, utilizando-se as mesmas técnicas citadas anteriormente. Assim, a interação ASB/fármacos foi estudada para: berbamina [Cheng *et al.* (2009)], colchicina [Hu *et al.* (2005)], efonidipina [Wang *et al.* (2008)], fluorbiprofeno [Vayá *et al.* (2008)], gatifloxacino [Guo *et al.* (2004)], glicirrizinato de monoamônio [Hu *et al.* (2004)], N-n-hexil-N'-(p-aminobenzeno-sulfonato de sódio) tiouréia [Cui *et al.* (2003)], 1-hexilcarbamoil-5-fluoruracil [Hu *et al.* (2005)], hidroclorato de doxepina [Kandagal *et al.* (2006)], hidroclorato de gemcitabina [Kandagal *et al.* (2006)], hidroclorato de levamisol [Yan *et al.* (2009)], hidroclorato de trazodona [Ashoka *et al.* (2006)], indanodiona [Stan *et al.* (2009)], licochalcona [Monti *et al.* (2009)], magnolol [Liu *et al.* (2003)], tetraciclina [Khan *et al.* (2002) e Bi *et al.* (2005)], tinidazol [Shi *et al.* (2007)], triarilmetanos [Baptista e Indig (1998)].

Na literatura existe somente um relato de estudo da interação entre ASB e flavonóides, com a molécula licochalcona [Monti *et al.* (2009)]. Mas, não existem estudos com biflavonóides (produtos naturais) com ASH ou com ASB, uma vez que, todas ou quase todas as moléculas estudadas na literatura com esse fim, são produtos comerciais.

Sendo assim, estudos sobre os mecanismos de interação entre fármacos e albumina sérica, seja ela humana ou bovina, são extremamente importantes para entender a farmacodinâmica e a farmacocinética de um fármaco [Tang *et al.* (2006) e Li *et al.* (2008)], e por isso, vêm se tornando um campo de pesquisa importante em ciência, química e medicina clínica [Tang *et al.* (2006), Cui *et al.* (2007), Cui *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008)].

3.3 Descrição das Técnicas Empregadas neste Trabalho

3.3.1 Fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL)

O desenvolvimento da técnica de fotólise por pulso de laser, em modo de transmissão, no final dos anos 60 [Rabek (1982), Porter (1963), West (1976) e Bensasson (1983)] pode ser visto como uma extensão natural da capacidade da fotólise convencional, a qual foi desenvolvida por Sir George Porter e que deu a ele o Prêmio Nobel de Química em 1967. A grande vantagem do emprego do laser está ligada à duração curta do pulso, o que é comum a todos os lasers, e que forneceu um aumento da resolução temporal de três ordens de grandeza quando comparada à fotólise convencional. Além disso, a natureza monocromática do laser é tal que ele permite a excitação da amostra em condições mais bem definidas. Em 1966, Lindqvist publicou um artigo que é visto como a base de todos os estudos de intermediários de reação de vida curta, incluindo estados excitados, no qual foi demonstrado como um laser de nitrogênio, com pulso de 100 ns, poderia ser usado no estudo do estado tripleto de acridina [Lindqvist (1966)]. Quase que simultaneamente, diversos grupos de pesquisa, de maneira independente, estiveram envolvidos no desenvolvimento desta técnica e a combinação de suas contribuições foi, indubitavelmente, a razão para o desenvolvimento da técnica poderosa e versátil na qual se transformou hoje em dia a fotólise por pulso de laser (FPL).

A partir destes primeiros resultados, diversas técnicas com resolução temporal, baseadas no monitoramento direto da absorção ou da emissão de um intermediário de reação

de tempo de vida curto gerado por via fotoquímica, têm sido extensamente aplicadas, com a escala de tempo cobrindo hoje 15 ordens de grandeza, do segundo ao fentossegundo.

Apesar da primeira aplicação da fotólise por pulso de laser datar de 1966 [Lindqvist (1966)], a base do método permanece a mesma, podendo-se identificar, em qualquer sistema, quatro tipos de componentes: a fonte de excitação utilizada para gerar as espécies transientes (laser pulsado); o feixe de análise (uma lâmpada de xenônio, pulsada ou não); o sistema de detecção (monocromador e fotomultiplicadora para absorção de transientes) ou conjunto de diodos (para emissão de estados excitados singlete ou triplete) e o sistema de aquisição (digitalizador de transientes ou osciloscópio de armazenamento) e processamento. A Figura 8 mostra o esquema de um sistema de fotólise por pulso de laser em modo de transmissão, utilizado no presente trabalho.

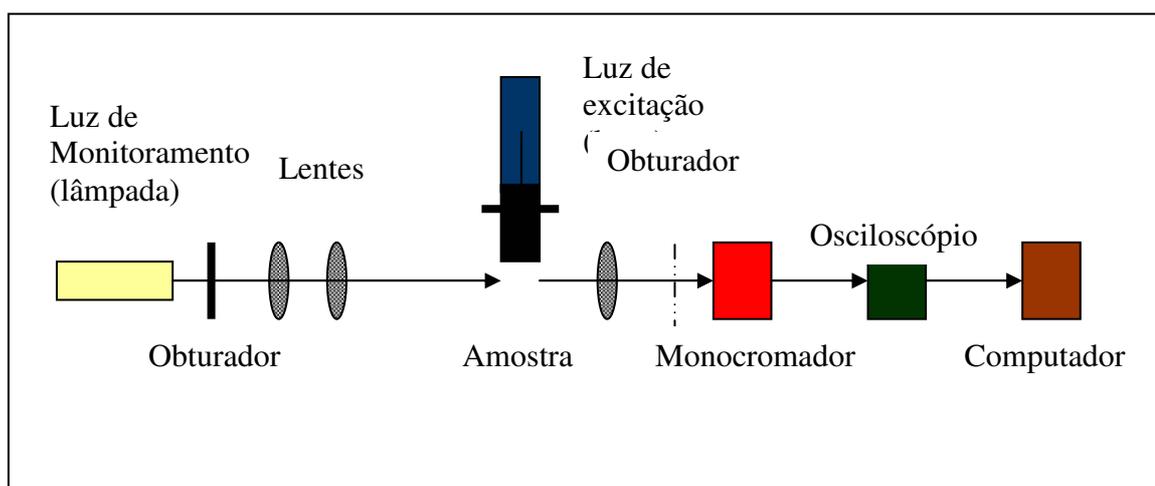


Figura 8. Esquema do sistema de fotólise por pulso de laser para a absorção de transientes em modo de transmissão.

A técnica de fotólise por pulso de laser (FPL) fornece uma medida direta dos tempos de vida das espécies eletronicamente excitadas e se aplica ao estudo mecanístico das reações químicas. Ela consiste no uso de um espectrofotômetro, que apresenta uma resolução temporal muito rápida, acoplado a um sistema de excitação que produz uma alta concentração de espécies de tempo de vida curto (estados eletronicamente excitados ou intermediários reativos) a partir de um precursor fotossensível. Usando um pulso de luz intenso e de curta duração, o sistema é monitorado pela emissão ou absorção de luz no estado excitado ou da espécie química. A utilização de uma lâmpada de monitoramento permite a absorção de um segundo fóton pelo estado excitado triplete, o que fornece informações importantes sobre a sua natureza e reatividade, pois cada estado excitado possui um espectro de absorção característico, como ocorre com as espécies no estado fundamental. Os dados assim obtidos são processados pelo software e um exemplo das informações fornecidas está mostrado na Figura 9.

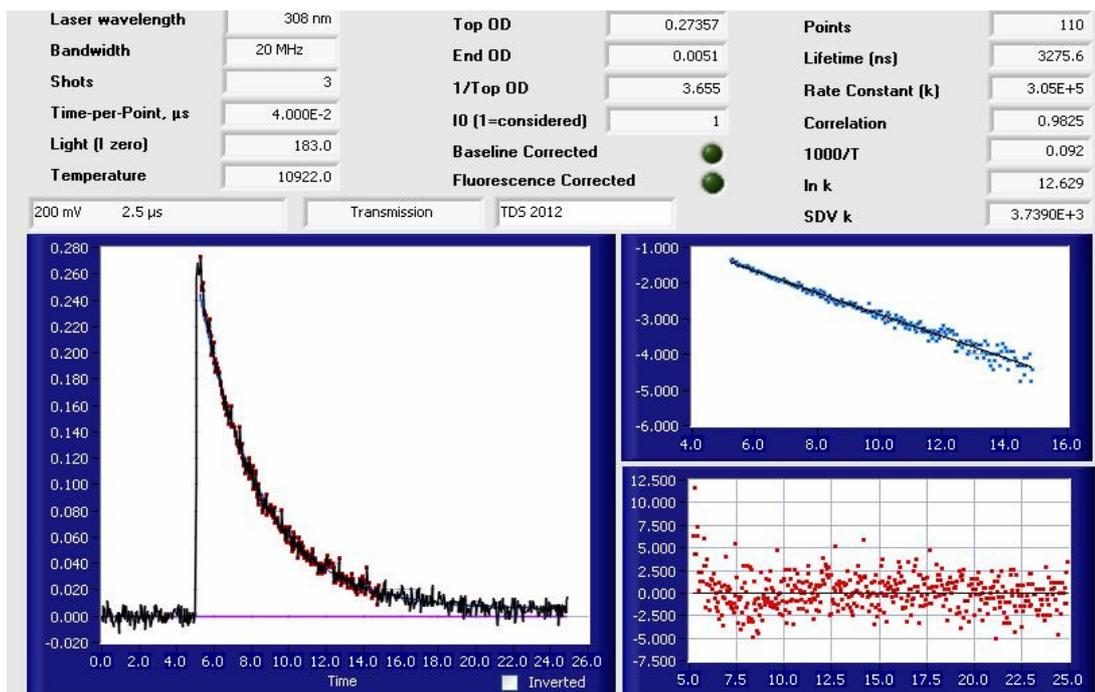


Figura 9. Exemplo das informações fornecidas pelo computador após processamento do decaimento obtido pela excitação por laser de um precursor.

Quando o estado excitado é monitorado pela emissão ou absorção de luz, o decaimento do sinal fornece uma medida direta do tempo de vida da espécie excitada. Assim, os tempos de vida de estados não-luminescentes e dos estados excitados triplete podem ser obtidos diretamente em solução a temperatura ambiente. As constantes de velocidade de reação podem ser medidas diretamente para um sistema contendo um supressor. Da mesma forma, a técnica se aplica a intermediários de reação e, em condições favoráveis, uma seqüência direta de intermediários pode ser monitorada e inter-relacionada. No estudo cinético das reações, seleciona-se o comprimento de onda adequado para a observação da espécie e a escala de tempo pode ser ajustada para selecionar espécies com tempos de vida entre 40 ns e 2 ms. Como resposta do sistema de laser computadorizado, obtém-se um gráfico do decaimento (Figura 10) ou crescimento do sinal do transiente, medido pela variação da densidade ótica (ΔDO), em função do tempo (t).

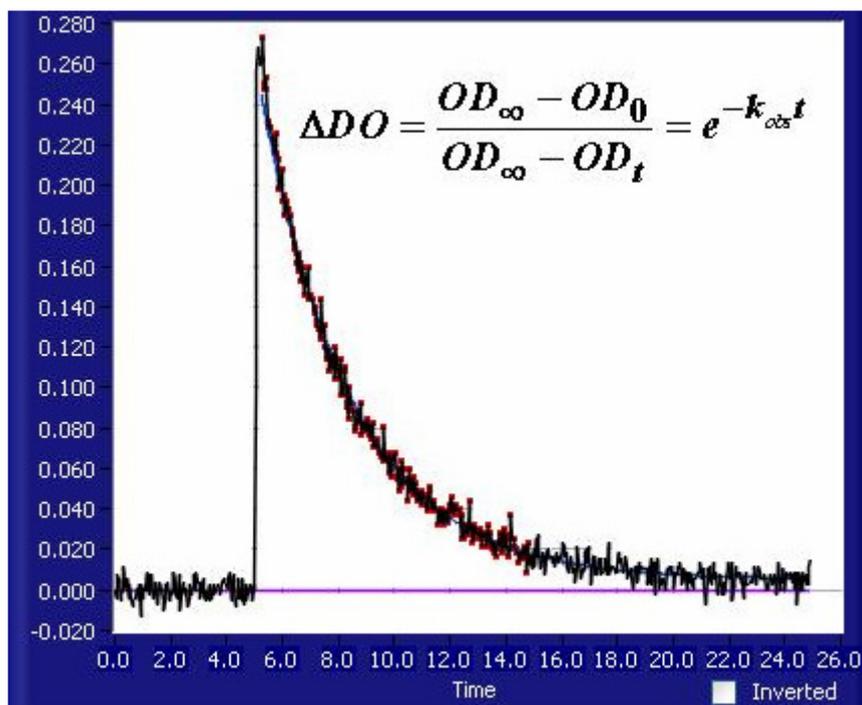


Figura 10. Gráfico de decaimento de um transiente gerado pela excitação com laser de nanossegundo para um determinado precursor.

Para decaimentos de primeira ordem, a representação semi-logarítima informa a constante de velocidade, o tempo de vida do transiente e a densidade ótica no máximo de absorção (Figura 11).

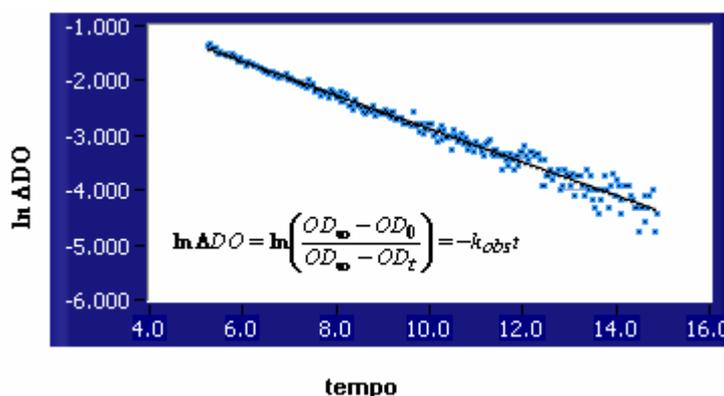


Figura 11. Representação semi-logarítmica para o decaimento de um transiente gerado pela excitação com laser de nanossegundo para um determinado precursor.

O espectro de absorção para um determinado transiente (estado excitado ou intermediário reativo) pode ser obtido pela seleção de intervalos de tempo após o pulso do laser em diferentes comprimentos de onda. O valor médio da diferença de densidade ótica nestes intervalos de tempo *versus* o comprimento de onda fornece o espectro de absorção em intervalos de tempo diferentes. Como a concentração e o coeficiente de extinção molar das espécies absorventes não são conhecidos e apenas a diferença de densidade ótica (ΔDO) pode ser medida, uma absorção negativa significa a formação de um transiente com uma absorvidade molar menor do que a do precursor neste comprimento de onda. A Figura 12 apresenta um espectro de absorção triplete-triplete para 4,5-diaza-9-fluorenona em acetonitrila [Bertoti *et al.* (2005)], enquanto que a Figura 13 apresenta um espectro de absorção para o

ânion radical obtido a partir da reação entre o estado excitado triplete de xantona e trietilamina, em acetonitrila.

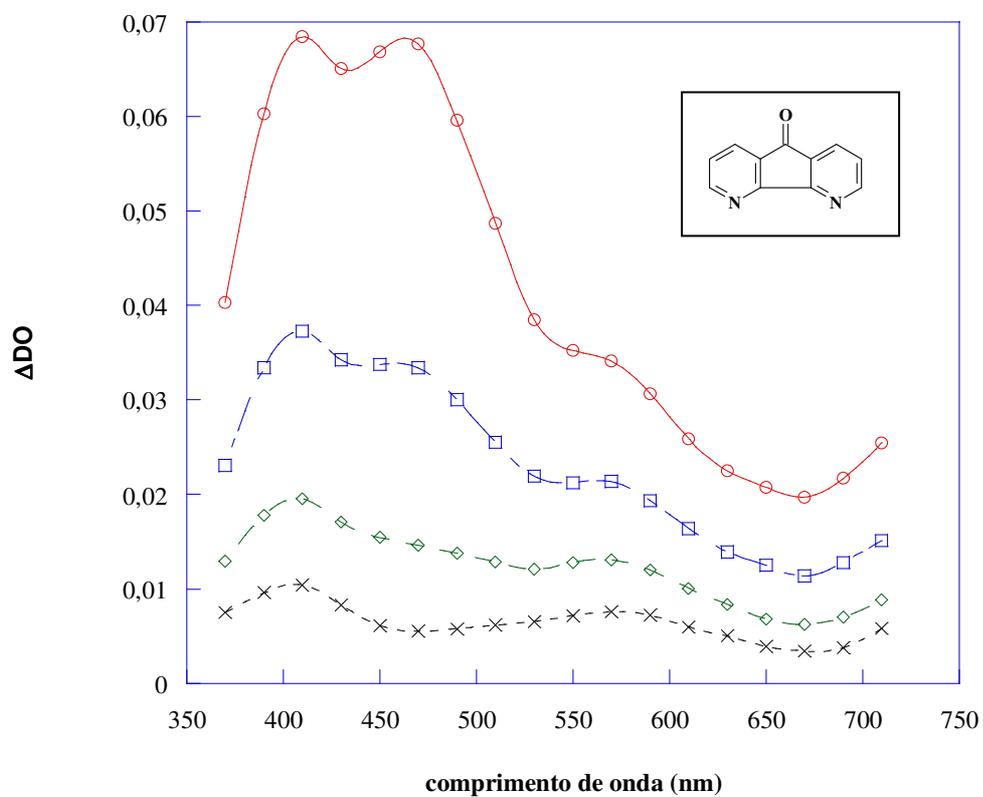


Figura 12. Espectro de absorção triplete-triplete para 4,5-diaza-9-fluorenona em acetonitrila.

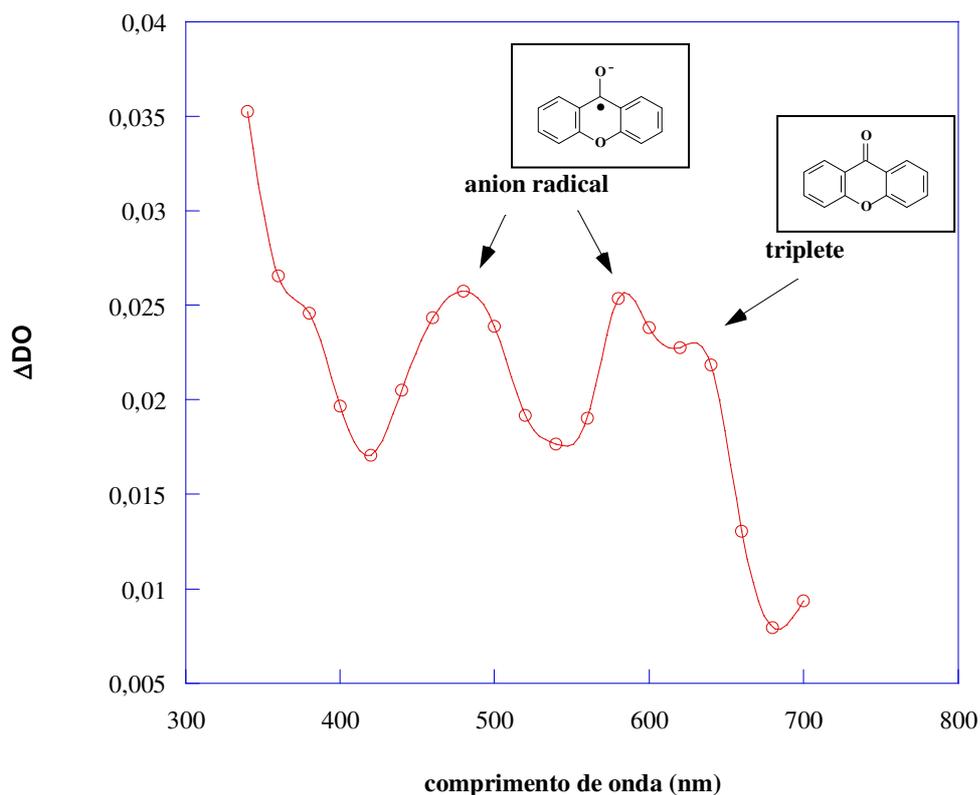
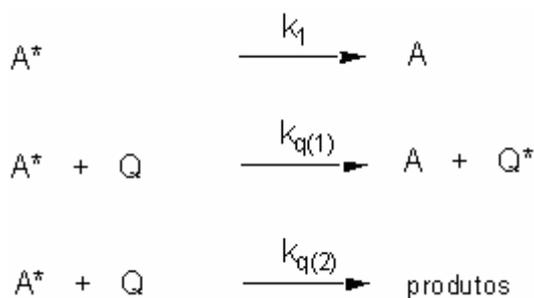


Figura 13. Espectro de absorção para o ânion radical gerado pela reação entre o estado excitado triplete de xantona e trietilamina, em acetonitrila.

A análise de Stern-Volmer para a cinética das reações fotoquímicas considera um mecanismo de reação que envolve a competição entre o decaimento unimolecular da espécie excitada (A^*) e a supressão bimolecular por Q (supressor), a qual pode ocorrer por transferência de energia ou através de uma reação química levando à formação de produtos (Esquema 1).



Esquema 1. Cinética das reações fotoquímicas.

Considerando-se que apenas estes processos ocorrem, o tempo de vida de A^* na ausência e na presença do supressor são dados por τ_1 e τ_2 , respectivamente, sendo diretamente relacionados à constante de velocidade observada experimentalmente (k_{obs}), representada pela Equação 1.

$$k_{obs} = 1 / \tau_2 = k_1 + k_q [Q] = 1 / \tau_1 + k_q [Q]$$

Equação 1. Equação que representa a relação entre o tempo de vida e a constante de velocidade observada experimentalmente.

Como ambos os tempos de vida τ_1 e τ_2 são medidos diretamente pela técnica de fotólise por pulso de laser, e como as concentrações do supressor ($[Q]$) são conhecidas, o coeficiente angular do gráfico de k_{obs} ($1 / \tau_2$) versus $[Q]$ fornece o valor da constante de velocidade do processo bimolecular (k_q), que é a constante de velocidade de supressão. As Figuras 14, 15 e 16 a seguir mostram gráficos de supressão, empregando-se a Equação 1, para a supressão do estado excitado triplete de xantona por 1-metilnaftaleno, em acetonitrila, pelo processo de transferência de energia colisional (Figura 14 e Esquema 2), para a supressão por transferência de elétron do estado excitado de xantona por trietilamina, em acetonitrila (Figura 15 e Esquema 3) e, finalmente, para a supressão por transferência de hidrogênio do estado excitado triplete de dibenzossuberona por 4-fenilfenol, em acetonitrila (Figura 16 e Esquema 4) [Bertoti e Netto-Ferreira (2007)].

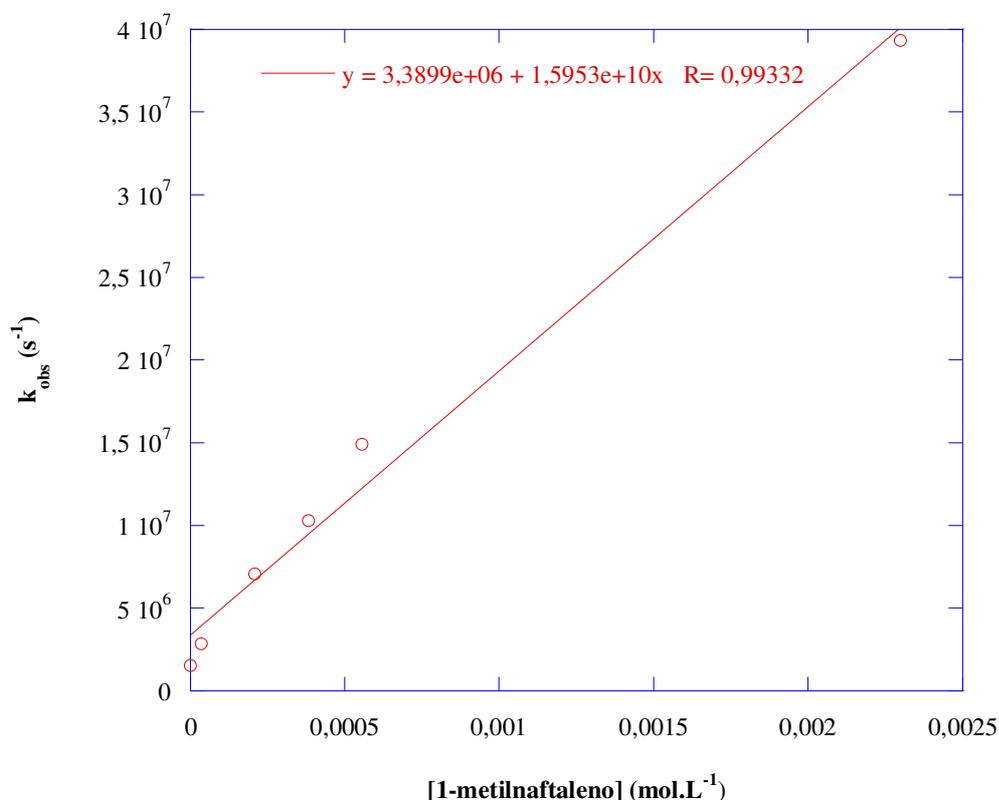
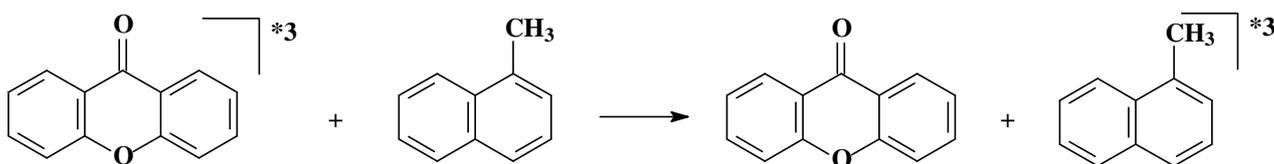


Figura 14. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão do estado excitado triplete de xantona por 1-metilnaftaleno, em acetonitrila, pelo processo de transferência de energia colisional.



Esquema 2. Supressão do triplete de xantona por transferência de energia, em acetonitrila.

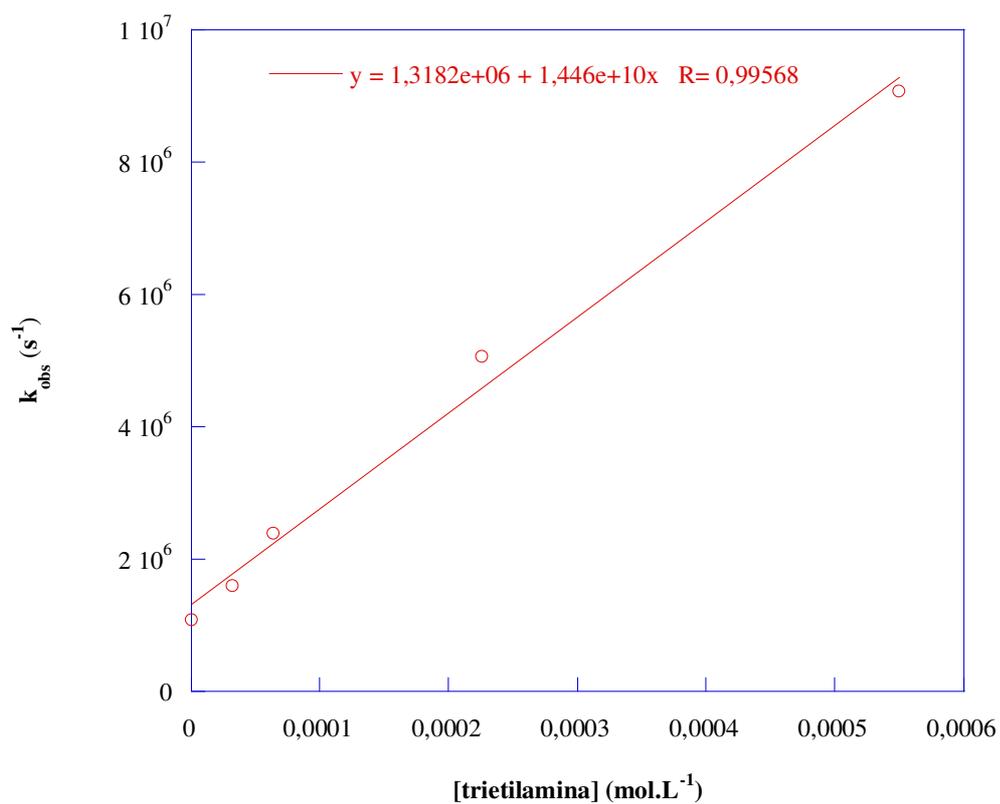
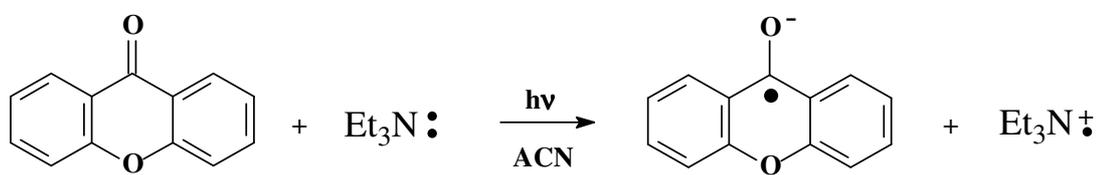


Figura 15. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão do estado excitado triplete de xantona por trietilamina, em acetonitrila, pelo processo de transferência de elétron.



Esquema 3. Supressão do triplete de xantona por transferência de elétron, em acetonitrila.

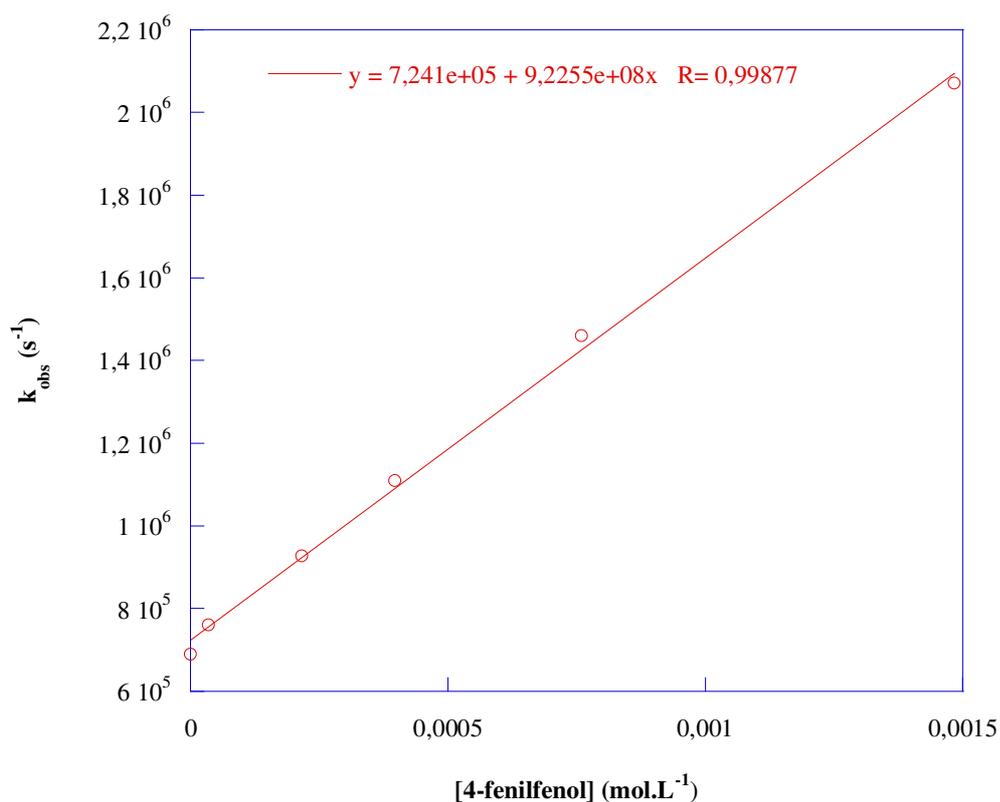
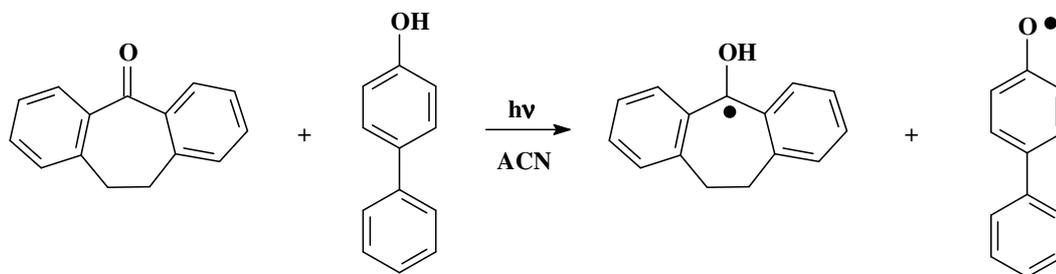


Figura 16. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão do estado excitado triplete de dibenzossuberona por 4-fenilfenol, em acetonitrila, pelo processo de transferência de hidrogênio.



Esquema 4. Supressão do triplete de dibenzossuberona por transferência de hidrogênio, em acetonitrila.

Quando o gráfico de Stern-Volmer não é linear indica que o mecanismo de decaimento cinético é complexo e frequentemente indica a competição de reações fotoquímicas responsáveis por esta não linearidade.

3.3.2 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis)

A absorção molecular na região do ultravioleta e do visível do espectro depende da estrutura eletrônica da molécula. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado. Para muitas das estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta. Na prática, a espectroscopia de absorção no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados [Silverstein *et al.* (1994)].

A absorção de um fóton pode ser relacionada, em muitos casos, à excitação de certos tipos de elétrons ou a elétrons que pertencem a um pequeno grupo de átomos em uma molécula. Quando há na molécula um grupo carbonila (C=O), observa-se normalmente uma absorção em cerca de 290 nm, embora a localização exata dependa da natureza do resto da molécula. Os grupos que têm absorções óticas características são chamados de cromóforos e sua presença é frequentemente responsável pela coloração das substâncias [Atkins e De Paula (2004)].

A absorção em uma dupla ligação C=C excita um elétron π para um orbital π^* antiligante. A atividade do cromóforo se deve então a uma transição $\pi\pi^*$. A sua energia é cerca de 7 eV para uma dupla ligação não-conjugada, o que corresponde à absorção a 180 nm (no ultravioleta). Quando a dupla ligação é parte de uma cadeia conjugada, as energias dos orbitais moleculares aproximam-se mutuamente, e a posição π para π^* ($\pi\pi^*$) desloca-se para os comprimentos de onda maiores; pode estar na região visível do espectro se o sistema conjugado for suficientemente comprido. Um exemplo importante da transição $\pi\pi^*$ é fornecido pelo mecanismo fotoquímico da visão [Atkins e De Paula (2004)].

A transição responsável pela absorção dos compostos com grupo carbonila pode ser atribuída aos pares isolados de elétrons do átomo de oxigênio. O conceito de Lewis de “par isolado” de elétrons corresponde, na teoria dos orbitais moleculares, a um par de elétrons em um orbital confirmado em grande parte em um só átomo e que não está apreciavelmente envolvido na formação de ligação. É este par que proporciona a transição $n\pi^*$. As energias típicas da absorção são da ordem de 4 eV (290 nm). Como as transições $n\pi^*$ são proibidas nas carbonilas, pela simetria, as absorções são fracas [Atkins e De Paula (2004)]. A Figura 17 mostra um esquema dos componentes da espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

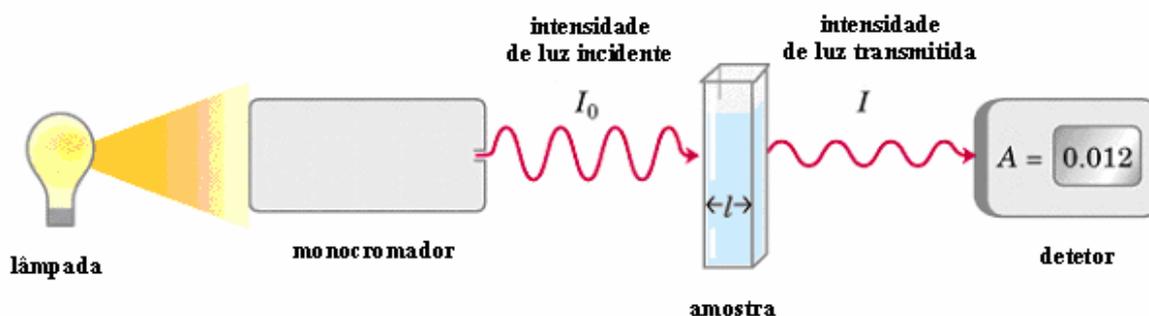


Figura 17. Esquema dos componentes da espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível.

3.3.3 Espectroscopia de emissão de fluorescência

Na fluorescência, a radiação espontaneamente emitida pela amostra cessa imediatamente depois que a radiação excitante é desligada. Na fosforescência, a emissão espontânea persiste durante um tempo dilatado, ou seja, durante intervalos de tempo longos (até horas, mas são mais comuns segundos ou frações de segundos nos casos mais característicos) depois da excitação, com intensidade que vai diminuindo lentamente. A diferença empírica (baseada na observação) sugere que a fluorescência é uma conversão da radiação absorvida em energia reemitida e que a fosforescência envolve o armazenamento da energia em um reservatório de onde lentamente se esvai [Atkins e De Paula (2004)].

A seqüência de etapas envolvidas na fluorescência é: a absorção inicial leva a molécula para um estado eletrônico excitado, estando sujeita a colisões com as moléculas vizinhas a qual vai cedendo energia de forma não-radiativa (decaimento não-radiativo), em

etapas ao longo da seqüência de níveis vibracionais, até atingir o nível de vibração mais baixo do estado eletrônico de menor energia da molécula. Assim, é possível então que as moléculas circundantes não possam receber a grande diferença de energia que levaria a molécula até o estado eletrônico fundamental. Por isso, a molécula excitada pode ter vida suficientemente longa pra sofrer emissão espontânea e emitir o excesso de energia remanescente na forma de radiação. A transição eletrônica para baixo é vertical (de acordo com o princípio de Franck-Condon) e o espectro de fluorescência tem uma estrutura vibracional característica do estado eletrônico inferior [Atkins e De Paula (2004)].

Desde que estejam na região do visível, as transições de absorção e de fluorescência 0-0 serão possivelmente coincidentes. O espectro de absorção provém das transições 0-0, 1-0, 2-0, n-0 e os picos se deslocam para os números de onda sucessivamente maiores, com intensidades governadas pelo princípio de Franck-Condon. O espectro de fluorescência provém de transições para baixo 0-0, 0-1, 0-2, 0-n e os picos se deslocam para os números de onda decrescentes. Os picos de absorbância 0-0 e de fluorescência 0-0 podem não ser exatamente coincidentes, pois o solvente pode ter interações diferentes com o soluto no estado fundamental e nos estados excitados (por exemplo, as estruturas das ligações hidrogênio podem ser diferentes). Como as moléculas do solvente não têm tempo suficiente para se reorganizarem durante a transição, a absorção ocorre em um ambiente característico do soluto solvatado no estado fundamental. A fluorescência ocorre no ambiente característico do estado excitado solvatado [Atkins e De Paula (2004)].

A fluorescência ocorre em frequência mais baixa do que a da radiação incidente, pois a transição radiativa só se dá depois de parte da energia vibracional se ter dispersado no ambiente. As cores alaranjada e verde, muito vivas, dos corantes fluorescentes são manifestação bem comum deste efeito. Os corantes absorvem no ultravioleta e no azul e fluorescem no visível. O mecanismo também sugere que a intensidade da fluorescência depende da capacidade das moléculas do solvente de aceitarem os quanta eletrônicos e vibracionais. Na realidade, um solvente com moléculas que têm níveis de vibração muito espaçados (como por exemplo, a água) pode aceitar um grande quantum de energia eletrônica e deste modo, extinguir a fluorescência [Atkins e De Paula (2004)].

3.3.4 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 óticamente 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 18 mostra um esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular [Fasman (1996) e Woody (1995)].

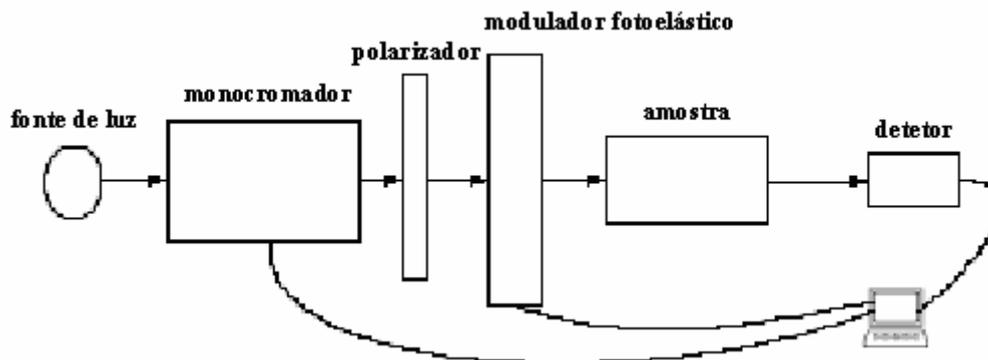


Figura 18. Esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular.

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 absorbância (A) e é definida pela Equação 2 [Fasman (1996) e Woody (1995)].

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

Equação 2. Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada.

Onde: A = absorbância;

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 (ϵ) [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, ϵ_D e ϵ_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 ϵ_E e ϵ_D) [Fasman (1996), Hecht (1998) e Woody (1995)].

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

Equação 3. Equação para determinar o coeficiente de extinção molar [Pace *et al.* (1995)].

Onde: A = absorbância;

c = concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L);
 l = distância que a luz percorre no meio (em cm);
 ϵ = coeficiente de extinção molar (em L/cm.mol).

Todos os instrumentos comerciais de DC medem a variação de absorbância (ΔA) ($\Delta A = A_E - A_D = (\epsilon_E - \epsilon_D).c.l$). Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de DC são calibrados para elipticidade (θ), Equação 5 [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf]. Para eliminar os efeitos do caminho ótico e da concentração, a elipticidade (θ) é expressa na forma de elipticidade molar (θ_m), Equação 6 [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf], que também é representada por MRE (elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual). Dessa forma, o dicroísmo circular (DC) gera luz elipticamente polarizada, Figura 19 [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

$$\Delta\epsilon = \epsilon_E - \epsilon_D = (A_E - A_D)/c.l$$

Equação 4. Equação para determinar o dicroísmo circular molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

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

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

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

A_E = absorbância para a luz circularmente polarizada para a esquerda;

A_D = absorbância 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).

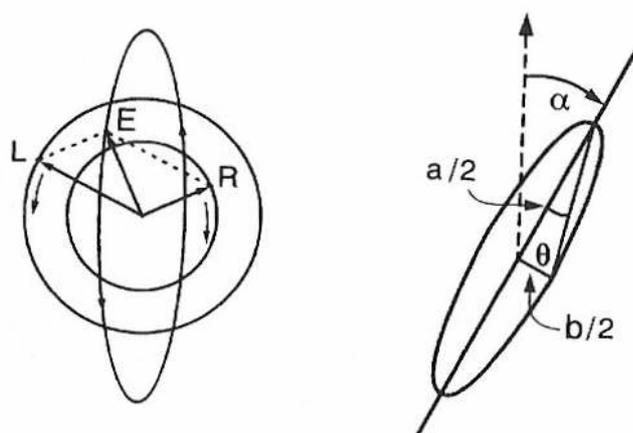


Figura 19. Esquema da luz elipticamente polarizada gerada por dicroísmo circular. E é a magnitude dos vetores elétricos da luz circularizada para a direita e para a esquerda, a é o eixo maior enquanto que b é o eixo menor

[www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

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

Equação 5. Equação para determinar a elipticidade [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

Onde: θ = elipticidade (em deg (graus));
 ΔA = variação de absorbância.

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

Equação 6. Equação para determinar a elipticidade molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf].

Onde: θ_m = elipticidade molar (em deg.cm²/dmol);
 θ = elipticidade (em deg (graus));
 c = concentração da espécie que absorve a luz;
 l = distância que a luz percorre no meio (em cm);
 $\Delta\epsilon$ = dicroísmo circular molar (em 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 elipticidade (θ) em 208 nm e 222 nm indicam a presença de uma estrutura predominantemente em α -hélice, e valores de elipticidade negativos entre 215 nm e 225 nm sugerem a presença de estrutura em folha- β [Johnson (1988), Venyaminov e Yang (1996) e Cordeiro (2005)].

3.3.5 Modelagem molecular (MM)

Modelagem molecular é um termo coletivo que se refere aos métodos teóricos e técnicas computacionais para modelar ou mimetizar o comportamento das moléculas [Carvalho *et al.* (2003)]. As técnicas são usadas nos campos da química, biologia e farmácia computacional e em ciência dos materiais para estudar desde sistemas moleculares oriundos de pequenos sistemas químicos a grandes moléculas biológicas e materiais. A modelagem molecular auxilia na compreensão das interações moleculares envolvidas em um dado processo. Os cálculos mais simples podem ser feitos manualmente, mas inevitavelmente são necessários computadores para realizar cálculos de sistemas de qualquer tamanho.

A disponibilidade de programas computacionais de química e os bancos de dados em rede são, atualmente, ferramentas fundamentais para a descoberta e planejamento de fármacos. Estas informações permitem uma análise rápida da atividade biológica *versus* propriedades físico-químicas de uma série de moléculas de interesse. Novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos pela análise de dados teóricos de estrutura-atividade de forma tridimensional, obtidos por técnicas recentes de modelagem molecular. Face à ampla definição de Química Medicinal, envolvendo a invenção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, assim como o estudo do seu metabolismo, a interpretação do seu modo de ação molecular e a construção das relações entre estrutura e atividade [Wermuth *et al.* (1998)], um estudo por meio da modelagem molecular é importante.

A modelagem molecular, segundo a IUPAC, é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias [Sant'Anna (2002)]. O planejamento de fármacos auxiliado por computador (CADD *Computer-Assisted Drug Design*) é descrito em diversas páginas da Internet e auxilia, com tutoriais, a investigação das interações químicas de um ligante com o seu receptor e a exploração dos fatores estruturais relacionados ao efeito biológico. Como consequência, a elucidação dos mecanismos envolvidos nas ações moleculares dos fármacos pode ser

compreendida pela integração de conhecimentos fundamentais de Química Orgânica, Bioquímica, Biologia Molecular e Farmacologia [Carvalho *et al.* (2003)].

Através da mecânica molecular, a energia é calculada por comparação entre ângulos e distâncias de ligação entre átomos que compõem a molécula, com valores tabelados, pelo emprego de um programa computacional. As equações obtidas por mecânica molecular consideram apenas o núcleo dos átomos e não incluem os elétrons nos cálculos. O programa determina as interações moleculares resultantes do estiramento das ligações, deformações angular, torsional e espacial e calcula a energia da molécula de partida de forma comparativa, com relação ao padrão metano (1 kJ/mol). O processo de mecânica molecular promove a modificação dos ângulos e comprimentos das ligações dos átomos originais e fornece novas conformações com os cálculos de energia correspondentes. O programa reconhece as mudanças que conduzem a estruturas mais estáveis, de menor energia estérica e os cálculos são interrompidos quando as modificações da estrutura mais estável, em relação à molécula original, não resultam em alteração considerável de energia. O objetivo da mecânica molecular é prever a energia associada com uma determinada conformação de uma molécula. Porém, a energia estérica obtida por mecânica molecular não expressa quantidades absolutas, apenas diferenças de energia entre duas ou mais conformações [Patrick (2001)].

A modelagem molecular compreende um número de ferramentas e métodos computacionais e teóricos que tem como objetivo entender e prever o comportamento de sistemas reais, e que são usadas para descrever e prever estruturas moleculares, propriedades do estado de transição, equilíbrio de reações, propriedades termodinâmicas, entre outras. Esses métodos abrangem estudos de minimização da energia de moléculas, análise conformacional, simulações de dinâmica molecular, entre outros, e são aplicáveis a átomos isolados e a biomacromoléculas.

A precisão que se quer nos resultados varia de acordo com o método escolhido para calcular determinada propriedade. Além de fornecer dados estruturais, os cálculos teóricos são usados também com interesse químico e farmacológico, como para computar calores de formação de moléculas, distâncias interatômicas, energias eletrônicas de HOMO e LUMO, energias de ionização, densidades eletrônicas atômicas, cargas atômicas líquidas, ordens de ligação, momentos de dipolo, entre outros.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e metodologias de análise utilizados na realização deste trabalho estão apresentados a seguir.

4.1 Materiais

Além de aparelhos, solventes (todos de grau espectroscópico, UV/HPLC) e vidrarias comuns em laboratório de pesquisa em química, foram utilizados flavonóides (sintéticos comerciais e naturais (biflavonóides)), tiocromanona e albumina sérica bovina (ASB) (todos com grau de pureza de aproximadamente 99 %).

4.1.1 Flavonóides e tiocromanona

Os flavonóides e a tiocromanona utilizados neste trabalho foram:

- Flavona (da Aldrich);
- *alfa*-Naftoflavona (da Aldrich);
- *beta*-Naftoflavona (da Aldrich);
- Tioflavona (da Aldrich);
- Flavanona (da Aldrich);
- *S,S*-Dióxidotioflavona (produto obtido a partir da tioflavona, sintetizada por Eliete S. Lopes da Silva Raposo, ex-aluna de iniciação científica do Prof. José Carlos Netto Ferreira/ Lab. 48A/ ICE/ UFRRJ);
- Quercetina (da Aldrich);
- Agatisflavona (produto natural isolado a partir do extrato metanólico de folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae) doado pelo LQPN/ UFRRJ);
- 7''-O-Metilagatisflavona (produto natural isolado a partir do extrato metanólico de galhos de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae) doado pelo LQPN/ UFRRJ);
- Amentoflavona (produto natural isolado a partir do extrato metanólico de folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae) doado pelo LQPN/ UFRRJ);
- Diidroochnaflavona (produto natural isolado a partir do extrato metanólico de folhas de *Luxemburgia nobilis* (Ochnaceae) doado pelo LQPN/ UFRRJ);
- Tiocromanona (da Aldrich).

Os flavonóides sintéticos comerciais e a tiocromanona foram utilizados conforme comprados e os flavonóides naturais (biflavonóides) foram isolados, purificados e caracterizados pelo LQPN/ UFRRJ. Os biflavonóides também foram usados da mesma forma que recebidos. Os biflavonóides foram doados pelos seguintes alunos de doutorado do Prof. Mario Geraldo de Carvalho/ LQPN/ ICE/ UFRRJ: Renata Duarte Fernandes, Marcelo Francisco de Araújo e Virginia Cláudia da Silva.

4.1.2 Albumina

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

4.1.2.1 Solução buffer de fosfato (PBS)

Pastilhas ou sachês de PBS (da Aldrich) utilizados neste trabalho, com os quais foram preparadas soluções tampão fosfato (PBS) de pH = 7,4.

4.2 Métodos

Foram utilizados equipamentos para a realização das análises envolvendo flavonóides, tiocromanona e/ou albumina sérica bovina.

4.2.1 Equipamentos e técnicas de análise

Equipamentos utilizados para a realização das técnicas de análise:

- Aparelho Buchi 510 para determinar o ponto de fusão, não corrigido, dos flavonóides e da tiocromanona;
- Espectrofotômetro de infravermelho Nicolet (FTIR), modelo 6700 FT-IR (Thermo Electron Corporation), onde foram obtidos espectros utilizando-se pastilhas de KBr (seco em estufa a 100°C e guardado em dessecador) das amostras sólidas (flavonóides) e da tiocromanona, com as bandas de absorção medidas em centímetros recíprocos (cm^{-1}). O equipamento foi calibrado com filme de poliestireno;
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50,3 MHz) Bruker (RMN ^1H e ^{13}C), modelo AC-200. Para as análises dos núcleos de ^1H e de ^{13}C , os espectros foram obtidos utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna, sendo os deslocamentos químicos dados em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) dadas em Hertz (Hz). O solvente utilizado em todos os espectros foi clorofórmio deuterado;
- Cromatógrafo de fase gasosa acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM), modelo Saturn 2000-Varian, com impacto de elétrons. As condições de análise foram: coluna VF-5ms (30 mm x 0,25 mm x 0,25 mm), temperatura de análise = 150-180 °C/1'-10 °C/min – 290 °C/10', temperatura do injetor = 270 °C, temperatura EM trap = 220 °C, temperatura manifold = 60°C, temperatura trline = 250 °C, e ionização EI (70 eV). As amostras foram solubilizados em diclorometano para que se pudesse realizar as análises por CG-EM;
- Espectrofotômetro de absorção ultravioleta/visível (UV-Vis), Mini UV Shimadzu, modelo 1240, utilizando-se células de quartzo com caminho ótico de 1 cm, e 2 ou 4 faces polidas, dependendo da finalidade. As condições de análise foram: varreduras de 200 nm a 500 nm para solventes com flavonóides (absorbância de aproximadamente 0,1 em 250 nm (mesmo comprimento de onda de excitação do fluorímetro ($\lambda_{\text{exc}} = 250$ nm) para posteriores análises de fluorescência), e de 200 nm a 500 nm (para estudar a interação entre albumina sérica bovina (ASB) e flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)); foram analisadas soluções de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, às quais foram adicionadas várias alíquotas das soluções dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L;
- Laser Nd-YAG Surelite (3° harmônico ($\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm), osciloscópio Tectronix TDS2012, e sistema de detecção da Luzchem (Mini-system model mLPF112). As condições de fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL) foram: $\lambda_{\text{exc}} = 355$ nm, pulso do laser de ~ 4-6 ns e potência ≥ 40 mJ/pulso. Este equipamento foi usado em Salvador no laboratório da Profª. Cristina Maria Quintella; LabLaser/ IQ/ UFBA;
- Espectrofluorímetro PTI (Photon Technology International (Canada)), Luminescence System, modelo LS-100-02. As condições de análise foram: $\lambda_{\text{exc}} = 280$ °C e varredura (faixa de emissão) de 300 nm a 500 nm, com fendas de emissão e excitação de 5,0 nm.

Para a realização das análises de fluorescência foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 4 faces polidas. Equipamento do Lab. 48A/ ICE/ UFRRJ;

- Espectrofluorímetro F-4500 Hitachi. As condições de análise foram: $\lambda_{exc} = 280$ nm, varredura (faixa de emissão) de 300 nm a 500 nm, com fendas de emissão e excitação de 5,0 nm e velocidade de 1200 nm/min. O espectrofluorímetro esteve acoplado a um banho termostaticador de temperatura, que forneceu controle de temperatura para todos os espectros de emissão de fluorescência ($T = 22^{\circ}\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C). Para a realização das análises de fluorescência foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 4 faces polidas. Foram analisadas soluções de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, as quais foram suprimidas com a adição de soluções de flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L. Este equipamento foi utilizado em Ribeirão Preto no laboratório da Prof^a. Laura Tiemi Okano/ FFLCRP/ USP;
- Espectropolarímetro J-180 Jasco, com sistema de controle interno de temperatura Jasco PTC-423S acoplado ao aquecimento. As condições de medida de dicroísmo circular (DC) foram: varredura de 190 nm a 500 nm, com velocidade de 200 nm/min no espectropolarímetro e controle de temperatura ($T = 25^{\circ}\text{C}$, 37°C e 42°C). O sinal final obtido para cada amostra foi resultado de uma média de dois espectros registrados. 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 $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L foram subtraídos desta linha de base. Para a realização das análises de dicroísmo circular foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 2 faces polidas. Foram analisadas soluções de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L, as quais foram suprimidas com a adição de soluções de flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L. Este equipamento foi usado em Ribeirão Preto no laboratório da Prof^a. Laura Tiemi Okano/ FFCLRP/ USP;
- Computador com programas como PDB (*Protein Data Bank* - Banco de Dados de Proteínas) e *docking* para a realização dos cálculos teóricos (modelagem molecular (MM)). Estes cálculos foram feitos no laboratório do Prof. Carlos Mauricio Rabello de Sant'Anna/ ICE/ UFRRJ pelo aluno de doutorado Daniel Rosa da Silva e pelo aluno de iniciação científica Bruno Benedito Spolidoro.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Flavonóides, tiocromanona e albumina sérica bovina (ASB)

Os flavonóides sintéticos comerciais e naturais, tiocromanona e albumina sérica bovina (ASB), utilizados neste trabalho, estão descritos a seguir.

4.3.1.1 Flavonóides comerciais (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e quercetina (QUE)), flavonóides naturais (agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)) e tiocromanona (TCR)

Os flavonóides, sintéticos e comercialmente disponíveis, como flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), flavanona (FNA) e quercetina (QUE), o flavonóide sintetizado, *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) (sintetizada a partir da tioflavona por Eliete S. Lopes da Silva Raposo, ex-aluna de iniciação científica do Prof. José Carlos Netto Ferreira) e o composto comercial tiocromanona (TCR), Figura 20, e os flavonóides naturais (biflavonóides) como agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF), Figura 21, foram estudados no Departamento de Química das seguintes universidades: UFRRJ, UFBA e USP-RP.

Os biflavonóides têm as seguintes nomenclaturas:

- 4',5,7-OH-flavona-(6 \rightarrow 8'')-4''',5'',7''-OH-flavona = agatisflavona (ATF);
- 4',5,7-OH-flavona-(6 \rightarrow 8'')-4''',5''-OH-7''-OMe-flavona = 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA);
- 4',5,7-OH-flavona-(3' \rightarrow 8'')-4''',5'',7''-OH-flavona = amentoflavona (AMF);
- 4',5,7-OH-flavona-(3' \rightarrow O \rightarrow 4''')-5'',7''-OH-flavanona = diidrochnaflavona (DOF).

Estes biflavonóides são produtos naturais isolados pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFRRJ. Agatisflavona (ATF) e amentoflavona (AMF) são produtos naturais que foram isolados a partir do extrato metanólico de folhas de *Ouratea parviflora* (Ochnaceae), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA) é um produto natural que foi isolado a partir do extrato metanólico de galhos de *Ouratea hexasperma* (Ochnaceae) e diidrochnaflavona (DOF) é um produto natural que foi isolado a partir do extrato metanólico de folhas de *Luxemburgia nobilis* (Ochnaceae).

As moléculas flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA), *S,S*-dióxidotioflavona e tiocromanona (TCR) foram analisadas frente a solventes com diferentes polaridades (acetonitrila (ACN), etanol (ETOH), cicloexano (CEX) e água milli-Q (AD)) por técnicas de espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm). Tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) e tiocromanona (TCR) também foram analisadas pela técnica de fotólise por pulso de laser na escala de nanossegundo.

Quercetina (QUE) e os biflavonóides agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF) foram analisados com diferentes solventes (acetonitrila (ACN), etanol (ETOH), diclorometano (DCM) e água milli-Q (AD)) por técnicas de espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm), e, com albumina sérica bovina (ASB) por técnicas de espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência com variação de temperatura ($\lambda_{exc} = 280$ nm; T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C), dicroísmo circular com variação de temperatura (T = 25°C, 37°C e 42°C) e modelagem molecular (cálculo teórico).

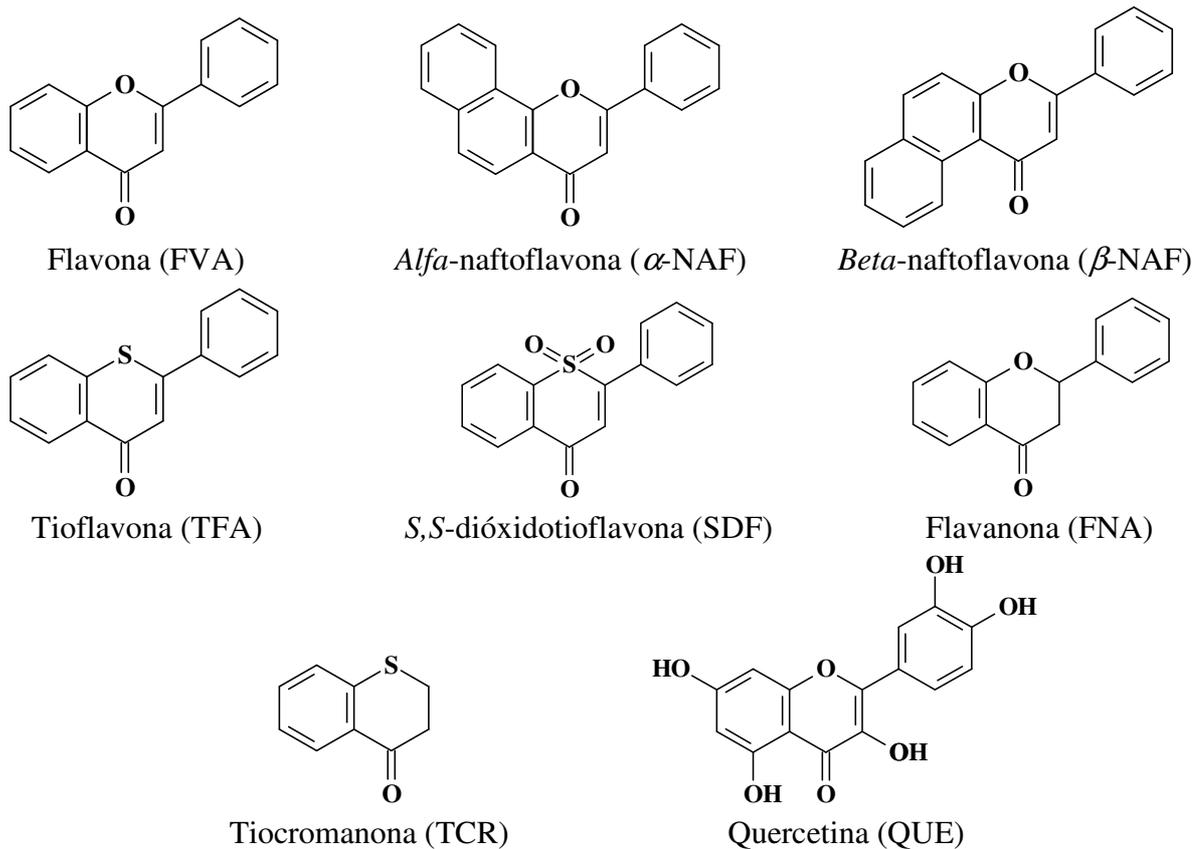
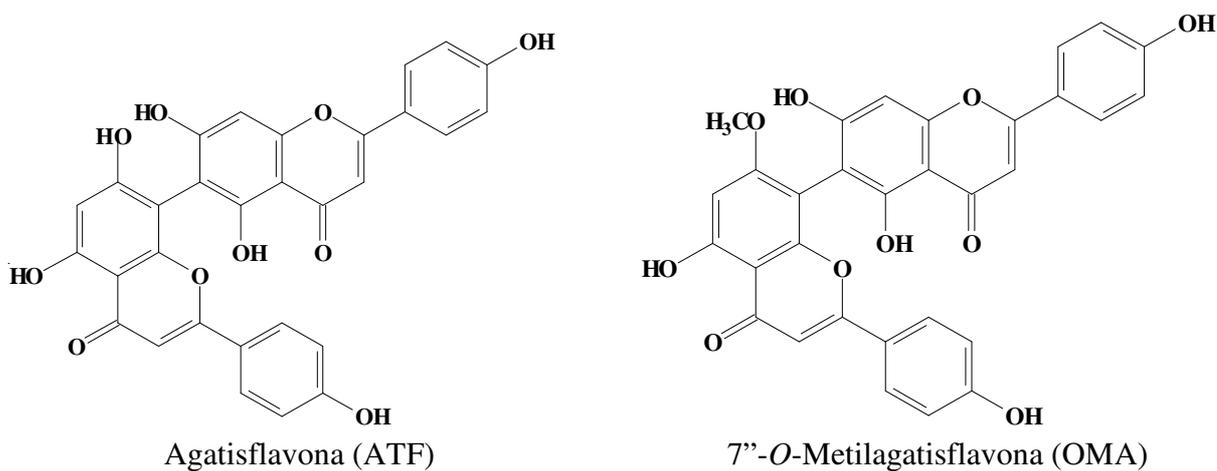


Figura 20. Estrutura dos flavonóides comerciais (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), flavanona (FNA) e quercetina (QUE)), do flavonóide sintetizado (*S,S*-dióxidotioflavona (SDF) e da tiocromanona (TCR).



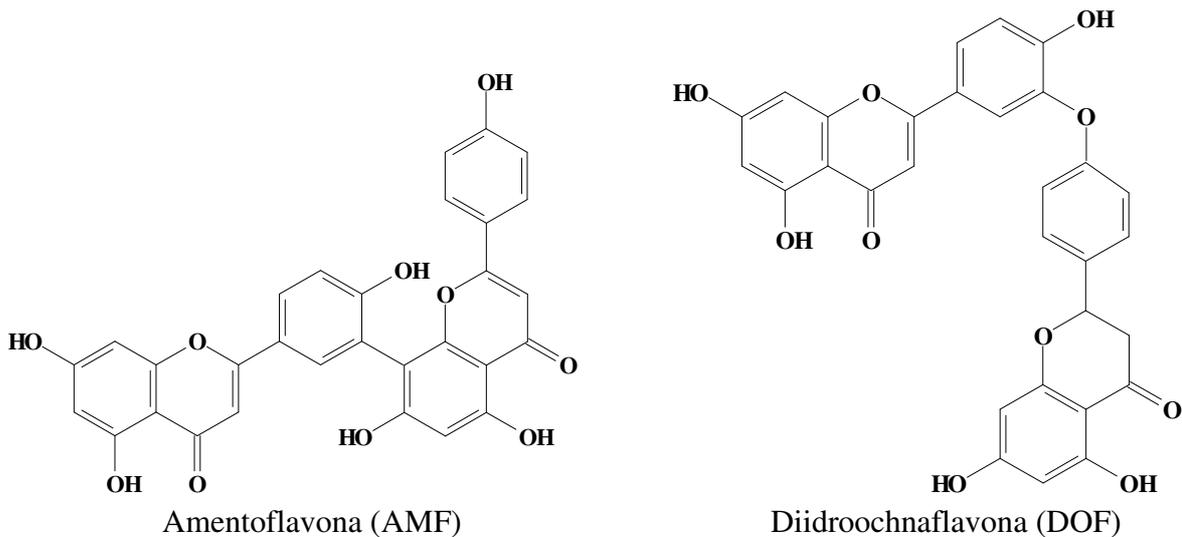


Figura 21. Estrutura dos flavonóides naturais, biflavonóides (agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidroochnaflavona (DOF)).

4.3.1.2 Albumina sérica bovina (ASB)

A proteína utilizada neste trabalho foi a albumina sérica bovina (ASB), a qual está apresentada na Figura 22 com seus domínios (I, II e III) e subdomínios (IA, IB, IIA, IIB, IIIA e IIIB).

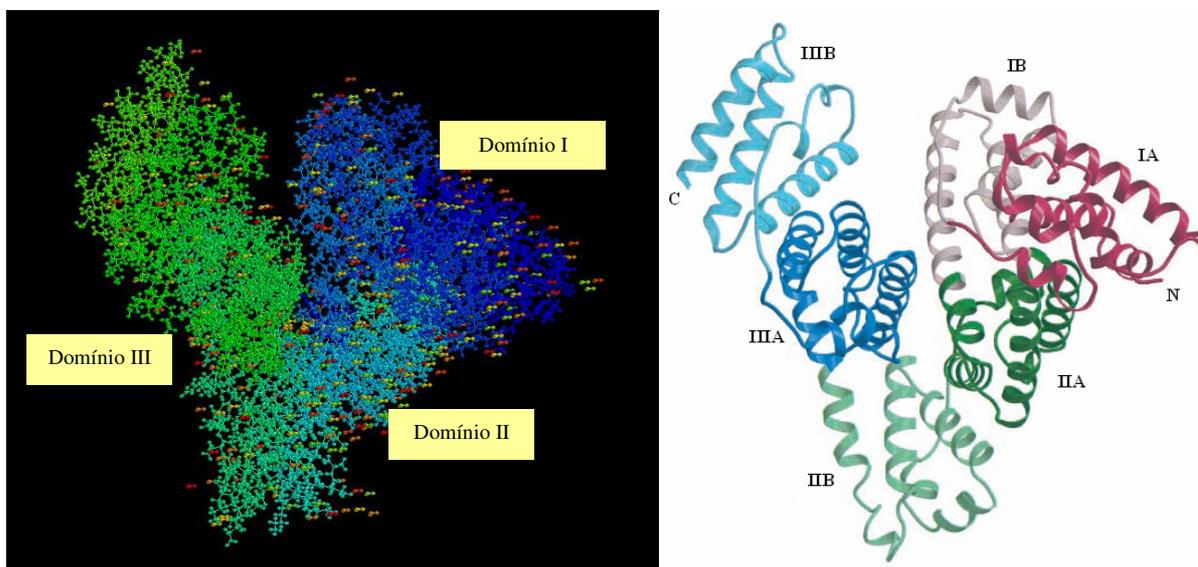


Figura 22. Estrutura da albumina sérica bovina (ASB) determinada por analogia com a estrutura da albumina sérica humana (ASH) do PDB e seus domínios e subdomínios.

4.3.1.3 Interação entre flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidroochnaflavona (DOF)) e albumina sérica bovina (ASB)

Estudos [Zhang *et al.* (2008), Li *et al.* (2007) e Yue *et al.* (2008)] sobre a interação entre alguns flavonóides (como por exemplo, quercetina, rutina, morina, icarina, puerarina, nevadensina e nobiletina) ou outras moléculas e albumina sérica humana (ASH) ou albumina sérica bovina (ASB) mostraram que a existência desta interação a qual é geralmente analisada

por espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular, espectroscopia no infravermelho com reflectância total atenuada (ATR-FTIR), espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e modelagem molecular. Mas, neste trabalho, só foram utilizadas espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de fluorescência, dicroísmo circular e modelagem molecular [Li *et al.* (2008), Vayá *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Yue *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009) e Yan *et al.* (2009)].

Para investigar a interação entre os flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochnaflavona (DOF)) e a albumina sérica bovina (ASB) foram preparadas as seguintes soluções:

- Soluções de concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L de flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochnaflavona (DOF)) 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).

Com as soluções prontas, foi feita uma titulação fluorimétrica, ou seja, utilizando-se a espectroscopia de fluorescência. Em uma célula de quartzo com as 4 faces polidas, contendo 3 mL da solução 2, foram adicionadas pequenas alíquotas da solução 1 (de 10 μ L em 10 μ L) até se obter uma concentração final de flavonóides na célula de quartzo em torno de $3,00 \times 10^{-5}$ mol/L. Após cada adição de 10 μ L (Tabela 2), era feita uma leitura da solução contida na célula de quartzo, tanto por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) como por espectroscopia de fluorescência a diferentes temperaturas (T = 22°C (295K), 27°C (300K), 32°C (305K), 37°C (310K) e 42°C (315K)).

Tabela 2. Concentração de flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF), após a adição de alíquotas de uma solução de QUE de $1,01 \times 10^{-3}$ mol/L, de ATF e de AMF de $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, de OMA de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L e de DOF de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASB $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C.

Volume de flavonóide adicionado (μ L)	Concentração de flavonóide (mol/L)				
	QUE	ATF	OMA	AMF	DOF
0	0	0	0	0	0
10	$3,37 \times 10^{-6}$	$3,33 \times 10^{-6}$	$3,43 \times 10^{-6}$	$3,33 \times 10^{-6}$	$3,50 \times 10^{-6}$
20	$6,74 \times 10^{-6}$	$6,66 \times 10^{-6}$	$6,86 \times 10^{-6}$	$6,66 \times 10^{-6}$	$7,00 \times 10^{-6}$
30	$1,01 \times 10^{-5}$	$9,99 \times 10^{-6}$	$1,03 \times 10^{-5}$	$9,99 \times 10^{-6}$	$1,05 \times 10^{-5}$
40	$1,35 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-5}$	$1,37 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-5}$	$1,40 \times 10^{-5}$
50	$1,69 \times 10^{-5}$	$1,67 \times 10^{-5}$	$1,72 \times 10^{-5}$	$1,67 \times 10^{-5}$	$1,75 \times 10^{-5}$
60	$2,02 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$	$2,06 \times 10^{-5}$	$2,00 \times 10^{-5}$	$2,10 \times 10^{-5}$
70	$2,36 \times 10^{-5}$	$2,33 \times 10^{-5}$	$2,40 \times 10^{-5}$	$2,33 \times 10^{-5}$	$2,45 \times 10^{-5}$
80	$2,70 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-5}$	$2,74 \times 10^{-5}$	$2,66 \times 10^{-5}$	$2,80 \times 10^{-5}$
90	$3,03 \times 10^{-5}$	$3,00 \times 10^{-5}$	$3,09 \times 10^{-5}$	$3,00 \times 10^{-5}$	$3,15 \times 10^{-5}$

Análises por dicroísmo circular também foram realizadas a diferentes temperaturas (T = 25°C (298K), 37°C (310K) e 42°C (315K)). Numa célula de quartzo com as 2 faces polidas, contendo 3 mL da solução 3, foram adicionadas pequenas alíquotas da solução 1 (de 12 μ L, 24 μ L, 48 μ L e 96 μ L), Tabela 3, até se obter uma concentração final de flavonóides na célula

de quartzo em torno de $3,00 \times 10^{-5}$ mol/L. Após cada uma dessas adições, era feita uma leitura da solução contida na célula de quartzo.

Tabela 3. Concentração de flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF), após a adição de alíquotas de uma solução de QUE de $1,01 \times 10^{-3}$ mol/L, de ATF e de AMF de $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, de OMA de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L e de DOF de $1,03 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3 mL da solução de ASB $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L, para T = 25°C, 37°C e 42°C.

Volume de flavonóide adicionado (μ L) (ASB:flavonóide)	Concentração de flavonóide (mol/L)				
	QUE	ATF	OMA	AMF	DOF
0 (1:0)	0	0	0	0	0
12 (1:4)	$4,04 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$	$4,12 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$	$4,20 \times 10^{-6}$
24 (1:8)	$8,08 \times 10^{-6}$	$8,00 \times 10^{-6}$	$8,24 \times 10^{-6}$	$8,00 \times 10^{-6}$	$8,40 \times 10^{-6}$
48 (1:16)	$1,62 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-5}$	$1,60 \times 10^{-5}$	$1,68 \times 10^{-5}$
96 (1:32)	$3,23 \times 10^{-5}$	$3,20 \times 10^{-5}$	$3,30 \times 10^{-5}$	$3,20 \times 10^{-5}$	$3,36 \times 10^{-5}$

4.3.2 Técnicas de análise

Os flavonóides sintéticos comerciais (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e quercetina (QUE)), os flavonóides naturais (agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochonaflavona (DOF)), a tiocromanona (TCR) e a albumina sérica bovina (ASB) foram investigados por diversas técnicas.

4.3.2.1 Espectroscopia no infravermelho (FTIR)

Os espectros obtidos para as amostras de flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e de tiocromanona (TCR) estão mostrados no Anexo A.A.

4.3.2.2 Ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C)

Os espectros das análises de RMN ^1H e ^{13}C dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e da tiocromanona (TCR) estão apresentados no Anexo A.B.

4.3.2.3 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)

Os espectros de massas dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e da tiocromanona (TCR) estão mostrados no Anexo A.C.

4.3.2.4 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis)

Os flavonóides sintéticos comerciais (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e quercetina (QUE)), a tiocromanona (TCR), os flavonóides naturais (biflavonóides (agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochonaflavona (DOF))) e o naftaleno foram analisados por espectroscopia de absorção no

ultravioleta/visível (UV-Vis), utilizando-se células de quartzo com percurso ótico de 1 cm e 2 ou 4 faces polidas, dependendo de ter ou não uma outra análise posterior. As células de quartzo com 4 faces polidas foram usadas quando as amostras tinham que ser analisadas, logo em seguida, por espectroscopia de fluorescência. Nas células de quartzo eram colocados 3 mL de solvente (cicloexano, diclorometano, etanol, acetonitrila ou água milli-Q), utilizados para avaliar o comportamento desses flavonóides em diferentes solventes (com uma variedade de polaridade), e também, como referência para calibrar o equipamento. A escolha entre tais solventes dependia do solvente em que era preparada a solução da amostra a ser analisada. As análises foram feitas com varreduras de: 200 nm a 500 nm (para se obter os espectros em absorbância de aproximadamente 0,1 em 280 nm (o mesmo comprimento de onda de excitação do fluorímetro ($\lambda_{exc} = 280$ nm)), para posteriores análises de fluorescência).



Figura 23. Espectrofotômetro de ultravioleta (UV-Vis) Mini UV Shimadzu, modelo 1240.

No espectrofotômetro de ultravioleta (UV-Vis), Figura 23, também foram realizadas varreduras na faixa de 200 nm a 500 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) era adicionada, de 10 μ L em 10 μ L, uma solução de flavonóide (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochonaflavona (DOF)) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, e os espectros de absorção UV-Vis eram registrados ao longo das adições dos flavonóides. Foram registrados também, espectros de absorção UV-Vis dos flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochonaflavona (DOF)) em 3 mL de solução tampão de PBS (pH = 7,4), assim como, o espectro de absorção UV-Vis da própria solução tampão de PBS (pH = 7,4).

4.3.2.5 Fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL)

Dados cinéticos e espectroscópicos acerca do estado excitado de flavonóides (tais como, tioflavona (TFA) e *S,S*-dióxidotioflavona (SDF)) e tiocromanona (TCR), e dos radicais deles derivados, assim como as constantes de velocidade de reação entre estes transientes foram obtidos empregando-se a técnica de fotólise por pulso de laser de nanossegundo, implementada no Lablaser do PPGQ/ IQ/ UFBA. Esta técnica emprega um laser Nd-YAG Surelite, podendo ser utilizado qualquer de seus harmônicos ($\lambda_{exc} = 266, 355$ ou 532 nm), um osciloscópio Tectronix TDS2012, e um sistema de detecção da Luzchem (Mini-system model mLPF112), Figura 24.

Neste trabalho, foram preparadas soluções das amostras com concentração de aproximadamente $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L ($\sim 0,3$ de absorbância em $\lambda = 355$ nm), contidas em células

de quartzo da Luzchem com caminho ótico de 1 cm e pescoço curto. Estas soluções foram preparadas em acetonitrila, e após medidas suas absorbâncias em espectrofotômetro de ultravioleta no visível, elas foram deaeradas com gás inerte (N_2) por 30 min, antes de se realizar a fotólise. Após deaeradas, as amostras foram analisadas por fotólise por pulso de laser de nanossegundo, utilizando-se o laser Nd-YAG Surelite sob as seguintes condições: $\lambda_{exc} = 355$ nm, pulso do laser (τ) ~ 4-6 ns e potência ≥ 40 mJ/pulso. Dessa forma, foram obtidos dados cinéticos e espectroscópicos acerca do estado excitado de flavonóides (tioflavona (TFA) e *S,S*-dióxidotioflavona (SDF)) e tiocromanona (TCR).

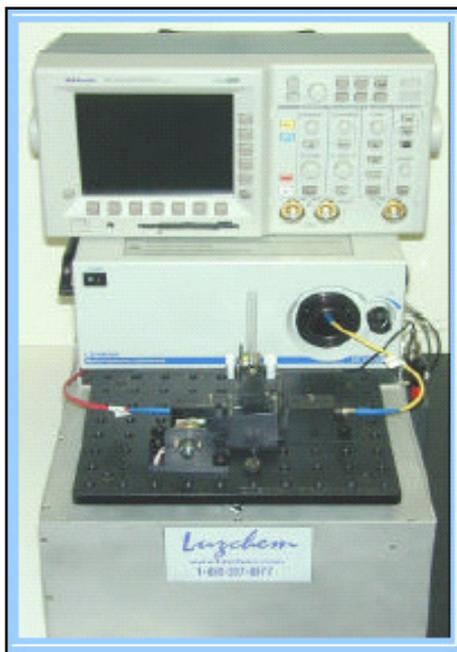


Figura 24. Sistema de fotólise por pulso de laser (laser Nd-YAG modelo mLPF112) para a absorção de transientes em modo de transmissão.

4.3.2.6 Espectroscopia de emissão de fluorescência

O comportamento fotofísico de flavonóides e de tiocromanona foi avaliado por espectroscopia de emissão de fluorescência. Compostos como flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA), tiocromanona (TCR) e naftaleno (referência) foram estudados frente a diversos solventes com diferentes polaridades (acetonitrila (ACN), etanol (ETOH), cicloexano (CEX) e água milli-Q (AD)). Também foram estudados os compostos quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF), diidrochnaflavona (DOF) e naftaleno (NAF) (composto utilizado como referência) frente a solventes com polaridades diferentes (acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD)) por espectroscopia de emissão de fluorescência.

Soluções ($A = 0,1$ no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc} = 280$ nm)) dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)), de tiocromanona (TCR) e de naftaleno (referência) foram preparadas nos seguintes solventes: acetonitrila (ACN), etanol (ETOH), cicloexano (CEX) e água milli-Q (AD). Também foram preparadas soluções ($A = 0,1$ no comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc} = 280$ nm)) dos flavonóides quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF), diidrochnaflavona (DOF), e de naftaleno (NAF) (composto utilizado como referência) em

solventes como acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). Após preparadas todas as soluções, foram medidas suas absorvâncias em cubeta de quartzo com as 4 faces polidas, utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis). Esses valores de absorvância deveriam ser aproximadamente 0,1 em $\lambda = 280$ nm (mesmo comprimento de onda de excitação das espécies). Em seguida, as amostras com valor de absorvância de aproximadamente 0,1 foram analisadas por espectroscopia de fluorescência. As condições utilizadas para esta análise foram as seguintes: espectro de emissão, varredura de 300 nm (limite mais baixo) a 500 nm (limite mais alto), e comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 280 nm.

A interação entre flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)) e albumina sérica bovina (ASB), também foi estudada por espectroscopia de fluorescência. Soluções desses flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, e uma solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L (a qual foi recém preparada para o uso, nos dias das análises), foram preparadas. As condições utilizadas para esta análise foram as seguintes: espectro de emissão, varredura (faixa de emissão) de 300 nm (limite mais baixo) a 500 nm (limite mais alto), e comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 280 nm ($\lambda_{exc} = 280$ nm), com fendas de emissão e excitação de 5,0 nm e velocidade de 1200 nm/min. O espectrofluorímetro (Figura 25) esteve acoplado a um banho termostatizador de temperatura, que forneceu controle de temperatura para todos os espectros de emissão de fluorescência ($T = 22^{\circ}\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C). Para a realização dessas análises de fluorescência foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 4 faces polidas. Nesta célula de quartzo era colocado um volume de 3 mL da solução de albumina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, e medida a sua emissão de fluorescência (leitura do branco), nessas várias temperaturas ($T = 22^{\circ}\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C), de modo a se obter espectros de emissão de fluorescência de ASB em temperaturas diferentes. Aos 3 mL de solução de albumina (ASB) era adicionada, de 10 μL em 10 μL , uma solução de flavonóide (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochnaflavona (DOF)) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, e os espectros de emissão de fluorescência eram registrados ao longo das adições dos flavonóides. Foram registrados também espectros de emissão de fluorescência para os flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochnaflavona (DOF)) em 3 mL de solução tampão de PBS (pH = 7,4), e também o espectro de emissão de fluorescência da solução tampão de PBS.



Figura 25. Espectrofluorímetro F-4500 Hitachi acoplado a um banho termostatizador de temperatura.

4.3.2.7 Dicroísmo circular (DC)

A interação entre os flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)) e a albumina sérica bovina (ASB), também foi estudada por dicroísmo circular, utilizando-se um espectropolarímetro (Figura 26). Foram preparadas soluções desses flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, e uma solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L (a qual foi recém preparada para o uso no dia das análises). As condições utilizadas para esta análise foram: varredura (faixa) de 190 nm a 500 nm, com velocidade de 200 nm/min no espectropolarímetro e controle de temperatura (T = 25°C, 37°C e 42°C). O sinal final obtido para cada amostra foi resultado de uma média de dois espectros registrados. A linha de base foi uma solução aquosa de PBS (pH = 7,4). Os espectros das soluções aquosas de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L foram subtraídos desta linha de base. Para a realização das análises de dicroísmo circular foi utilizada uma célula de quartzo com caminho ótico de 1 cm e 2 faces polidas. Nesta célula de quartzo foram colocados 3 mL de uma solução de albumina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4) de $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L, e medida a sua elipticidade (branco), em diferentes temperaturas (T = 25°C, 37°C e 42°C), de modo a se obter espectros de dicroísmo circular de ASB em temperaturas variadas. Aos 3 mL de solução de albumina (ASB) $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L era adicionada uma solução de flavonóide (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochnaflavona (DOF)) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, de modo a se ter proporções de ASB:flavonóide de 1:0 (3 mL de solução de ASB $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L + 0 μ L de solução de flavonóide $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L), 1:4 (3 mL de solução de ASB $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L + 12 μ L de solução de flavonóide $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L), 1:8 (3 mL de solução de ASB $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L + 24 μ L de solução de flavonóide $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L), 1:16 (3 mL de solução de ASB $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L + 48 μ L de solução de flavonóide $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L) e 1:32 (3 mL de solução de ASB $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L + 96 μ L de solução de flavonóide $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L). Os espectros de dicroísmo circular eram registrados ao longo das adições dos flavonóides. Foram registrados também, espectros de dicroísmo circular dos flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) ou diidrochnaflavona (DOF)) em 3 mL de solução tampão de PBS (pH = 7,4), assim como, o espectro de dicroísmo circular da própria solução tampão de PBS.



Figura 26. Espectropolarímetro J-180 Jasco, com sistema de controle interno de temperatura Jasco PTC-423S acoplado ao equipamento.

4.3.2.8 Modelagem molecular (MM)

A interação entre flavonóides (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochnaflavona (DOF)) e albumina sérica bovina (ASB), também foi estudada por modelagem molecular (cálculo teórico), utilizando-se os programas *docking* e PDB (*Protein Data Bank* - Banco de Dados de Proteínas).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão acerca do comportamento espectroscópico e fotoquímico dos flavonóides comerciais e naturais (biflavonóides), tiocromanona, assim como acerca da interação entre albumina sérica bovina (ASB) e alguns destes flavonóides estão apresentados a seguir.

5.1 Flavona (FVA), *Alfa*-naftoflavona (α -NAF), *Beta*-naftoflavona (β -NAF), Tioflavona (TFA), *S,S*-Dióxidotioflavona (SDF), Flavanona (FNA) e Tiocromanona (TCR)

Os flavonóides flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA), e a tiocromanona (TCR) foram analisados frente a diferentes solventes (Cicloexano (CEX), Diclorometano (DCM), Etanol (ETOH), Acetonitrila (ACN) e Água milli-Q (AD)), por absorção no ultravioleta/visível e emissão de fluorescência, e também por fotólise por pulso de laser de nanossegundo. Os resultados obtidos e a respectiva discussão estão apresentados a seguir.

5.1.1 Fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL)

Os flavonóides comerciais quercetina, morina, rutina, diosmina e hesperidina, compostos hidroxilados, foram analisados por fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL), porém seus resultados não foram muito satisfatórios, uma vez que não foram observados transientes na escala de tempo de análise, visto que não foi possível se observar a formação do estado excitado triplete, devido ao seu tempo de vida (τ) ter sido muito curto, provavelmente por causa da presença de várias hidroxilas fenólicas em suas estruturas. Neste caso, o processo de perda de próton, extremamente rápido no estado excitado, deve ter controlado o tempo de vida do triplete, tornando-o muito curto, conforme previsto.

Na literatura [Christoff et al. (1996)] existem estudos por fotólise por pulso de laser (FPL) que comprovam que flavonóides hidroxilados (mais precisamente, flavonas hidroxiladas) não geram transientes com reatividade na escala de tempo observada. Já flavonas (sem grupos hidroxila) ou flavonas metoxiladas (como é o caso de 3-metoxiflavona ou 7-metoxiflavona) geram transientes reativos sem problema algum, sendo o seu estado excitado triplete perfeitamente observável.

Como não se conseguiu observar o estado excitado triplete para os flavonóides hidroxilados, por fotólise por pulso de laser de nanossegundo, outros flavonóides foram investigados empregando-se esta técnica, principalmente porque alguns flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF) e flavanona (FNA)), já haviam sido estudados por fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL), gerando resultados promissores, encontrados pelo grupo de pesquisa do Prof. José Carlos Netto Ferreira. Assim, foi estudada a reatividade do estado excitado triplete de tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) e de tiocromanona (TRC), frente a reações de transferência de energia, de hidrogênio e de elétron, empregando-se a técnica de fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL), implementada no Lablaser do PPGQ/ IQ/ UFBA.

A tioflavona (TFA) apresentou estado excitado triplete com $\lambda_{\max} = 310$ nm e $\tau = 1,0$ μ s, em acetonitrila, Figuras 27 e 28. O triplete da *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) apresentou $\lambda_{\max} = 430$ nm e $\tau = 0,9$ μ s, em acetonitrila, Figuras 29 e 30. Não foi possível a obtenção de constantes de velocidade de supressão (k_q), por transferência de energia, de hidrogênio e de elétron, tanto para TFA como para SDF, devido ao tempo de vida do triplete de cada uma ter sido muito curto em relação ao da tiocromanona (TCR).

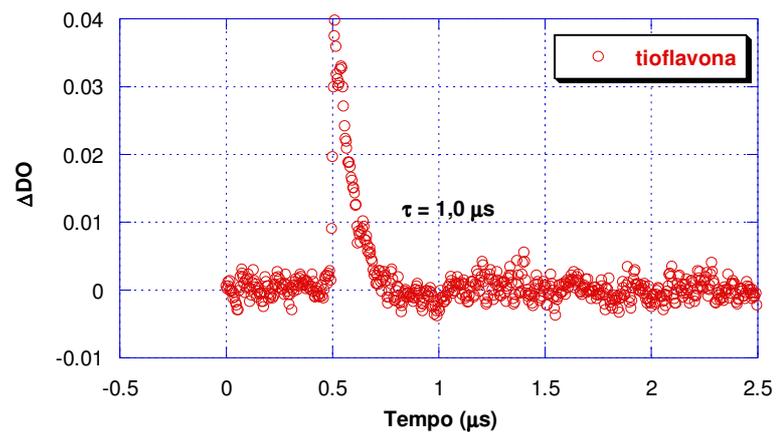


Figura 27. Decaimento cinético para o transiente gerado na excitação de tioflavona (TFA) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), monitorado a 310 nm.

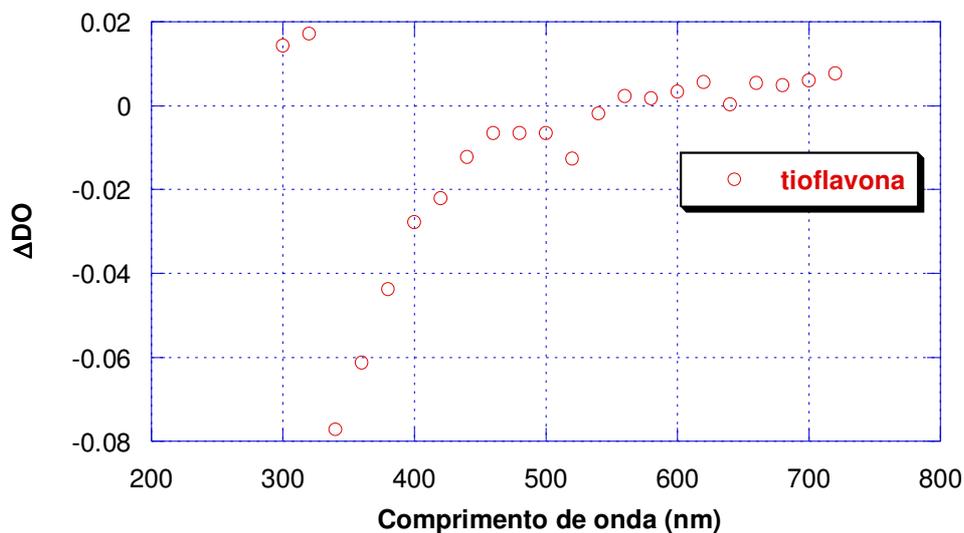


Figura 28. Espectro de absorção triplete-triplete para tioflavona (TFA) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), obtido 100 ns após o pulso do laser.

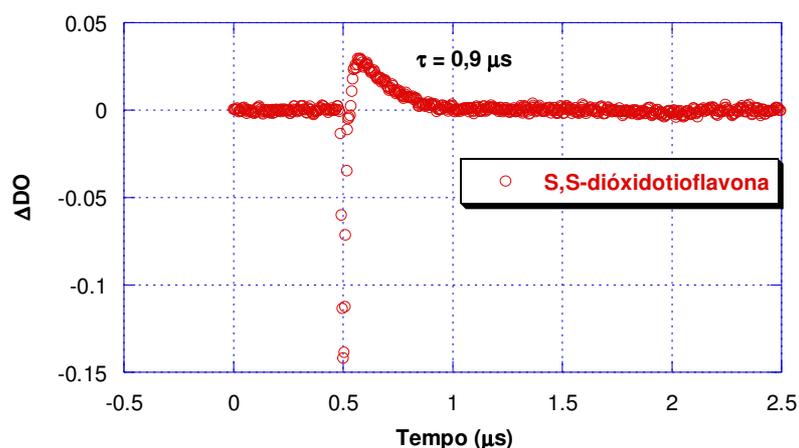


Figura 29. Decaimento cinético para o transiente gerado na excitação de *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), monitorado a 430 nm.

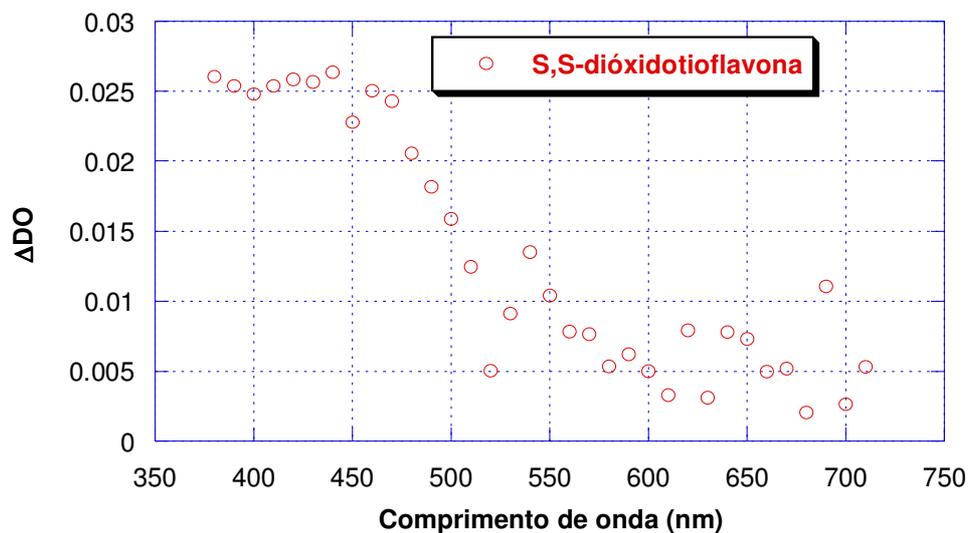


Figura 30. Espectro de absorção triplete-triplete para *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), registrado 100 ns após o pulso do laser.

Os dados cinéticos e espectroscópicos acerca do estado excitado triplete da tiocromanona (TCR) foram obtidos através da utilização da técnica de fotólise por pulso de laser de nanossegundo. O triplete da tiocromanona (TCR) apresentou $\lambda_{\text{max}} = 440$ nm e $\tau = 1,6$ μs , em acetonitrila, Figuras 31 e 32.

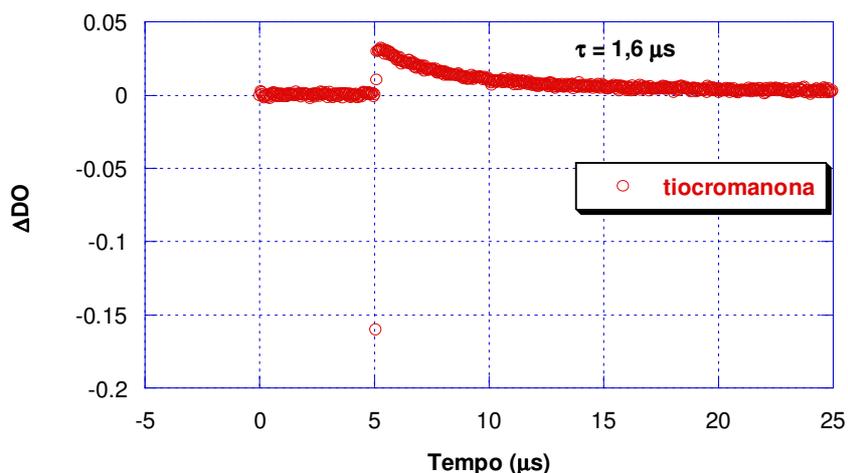


Figura 31. Decaimento cinético para o transiente gerado na excitação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), monitorado a 440 nm.

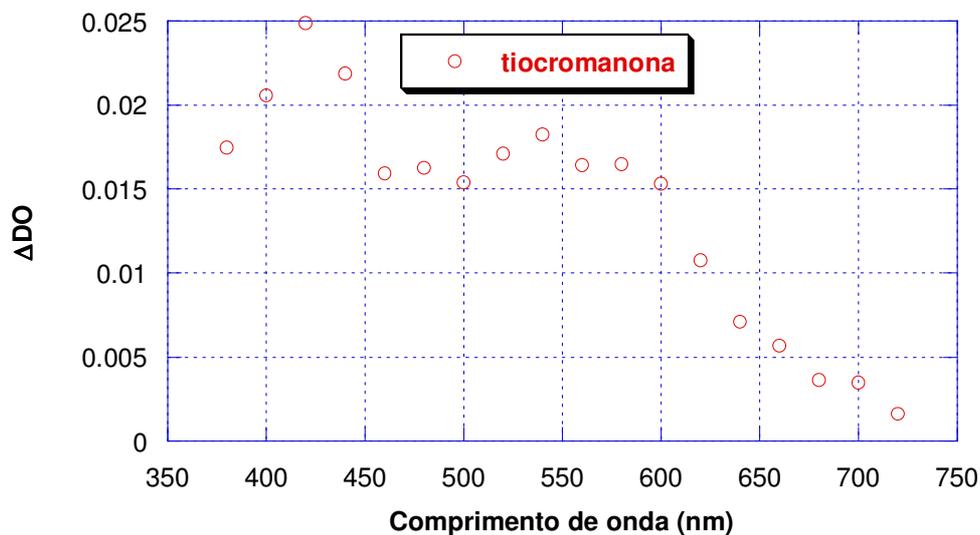
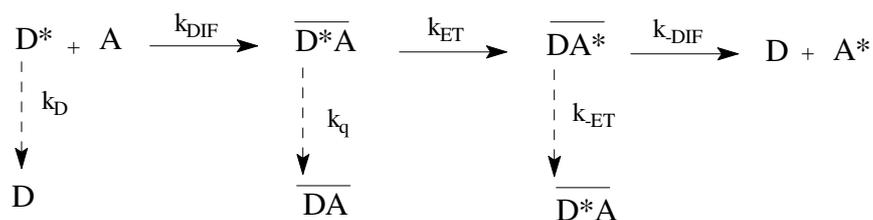


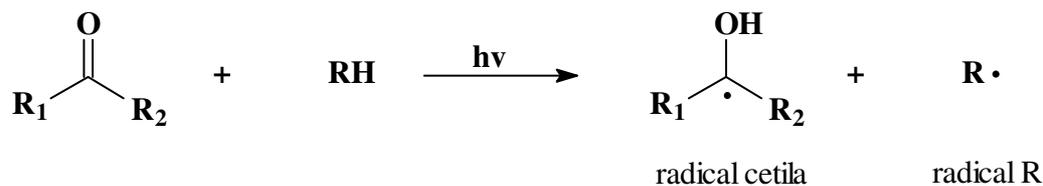
Figura 32. Espectro de absorção triplete-triplete para tiocromanona (TCR) em acetonitrila ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), registrado a 250 ns após o pulso do laser.

O comportamento de tiocromanona (TRC), frente a reações de transferência de energia, de hidrogênio e de elétron, empregando-se a técnica de fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL) está resumido nos esquemas a seguir:

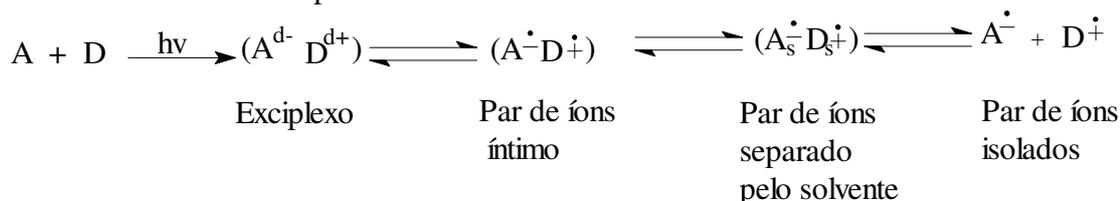
- Supressão de tiocromanona por transferência de energia:



- Supressão de tiocromanona por transferência de hidrogênio:



- Supressão de tiocromanona por transferência de elétron:



Controlada pela equação de Rehm-Weller, Equação 7:

$$\Delta G = E_{1/2}^{\text{OX}}(\text{D}) - E_{1/2}^{\text{RED}}(\text{A}) - \Delta E_{\text{exc}} + \Delta E_{\text{coul}}$$

Equação 7. Equação de Rehm-Weller.

As constantes de velocidade de reação entre os transientes da tiocromanona (TCR) e os supressores (por transferência de energia, de hidrogênio e de elétron) foram obtidas através da construção de gráficos lineares de Stern-Volmer, empregando-se a Equação 8 [Stern e Volmer (1919)]. Os valores dessas constantes de velocidade de supressão (k_q) estão apresentados nas Tabelas 4-6, com os respectivos valores para os erros experimentais.

$$k_{\text{obs}} = k_0 + k_q[\text{supressor}]$$

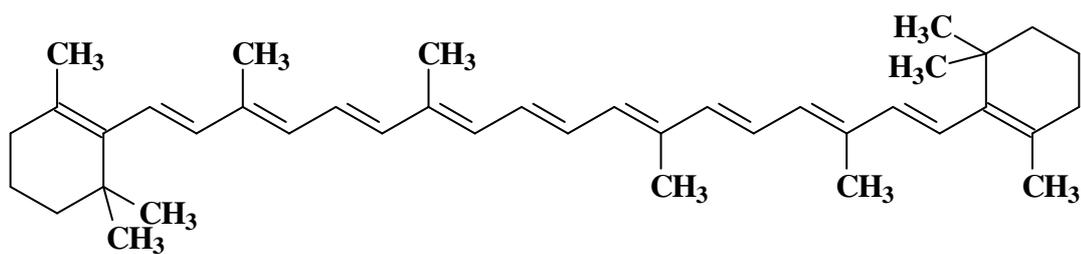
Equação 8. Equação de Stern-Volmer para a determinação das constantes de velocidade de supressão (k_q) [Stern e Volmer (1919)].

Onde: k_{obs} (s^{-1}) = constante de velocidade de reação observada experimentalmente;
 k_0 (s^{-1}) = constante de velocidade de reação na ausência do supressor (coeficiente linear da reta);

k_q ($\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) = constante de velocidade de supressão (coeficiente angular da reta);

$[\text{supressor}]$ ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) = concentração de supressor na célula de quartzo.

Em presença de supressor por transferência de energia (*trans*- β -caroteno, Figura 33), a constante de velocidade de supressão (k_q) para o estado excitado triplete da tiocromanona (TCR) em acetonitrila foi $(1,1 \pm 0,1) \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, valor este igual ao da constante de velocidade de difusão para este solvente, Figura 34 e Tabela 4, isso porque esse processo de transferência de energia triplete-triplete é colisional, ou seja, é controlado por difusão, onde a energia triplete da tiocromanona (TCR) é maior que a energia triplete do *trans*- β -caroteno (supressor). O transiente formado após excitação com laser ($\lambda = 355 \text{ nm}$) foi suprimido por *trans*- β -caroteno, porque ele é um acceptor de energia triplete bem conhecido ($E_T = 19 \text{ kcal mol}^{-1}$; $\phi_{\text{isc}} = 0$) [Bensasson et al. (1976) e Kumar (1983)], para o qual foi obtida a constante de velocidade de reação ($k_q = (1,1 \pm 0,1) \times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), em acetonitrila, de acordo com a Equação 8 [Stern e Volmer (1919)].



trans-β-caroteno

Figura 33. Supressor por transferência de energia.

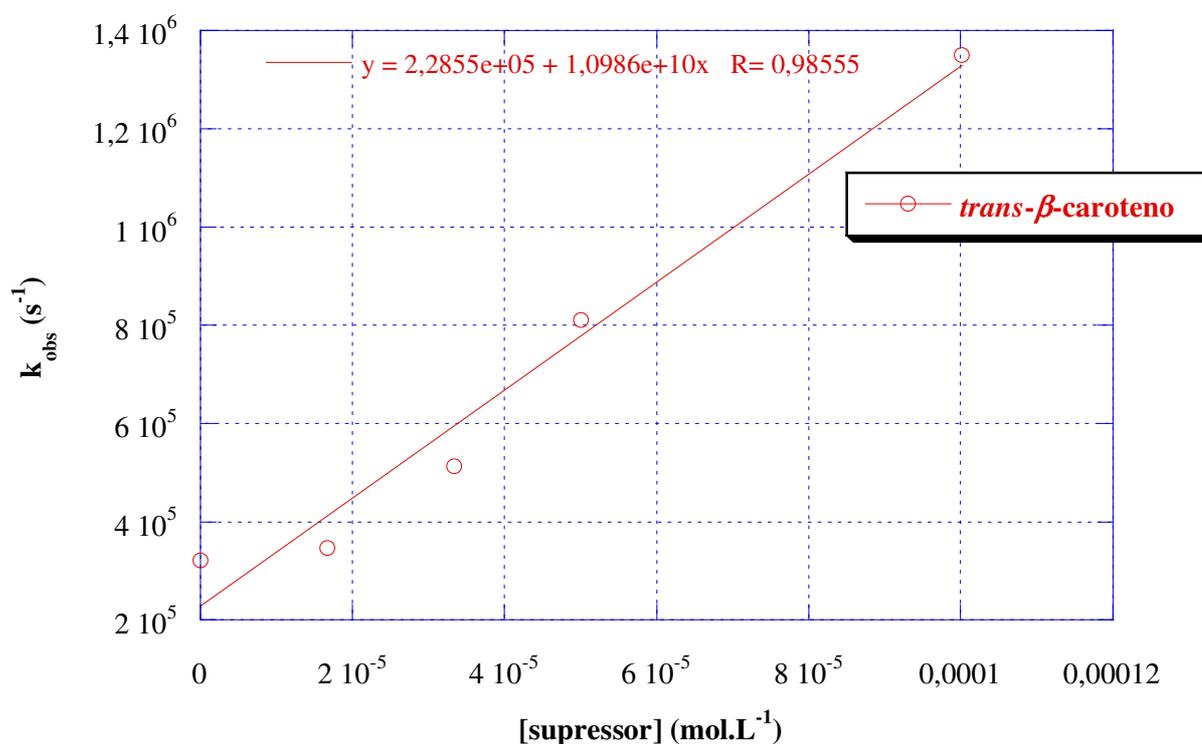
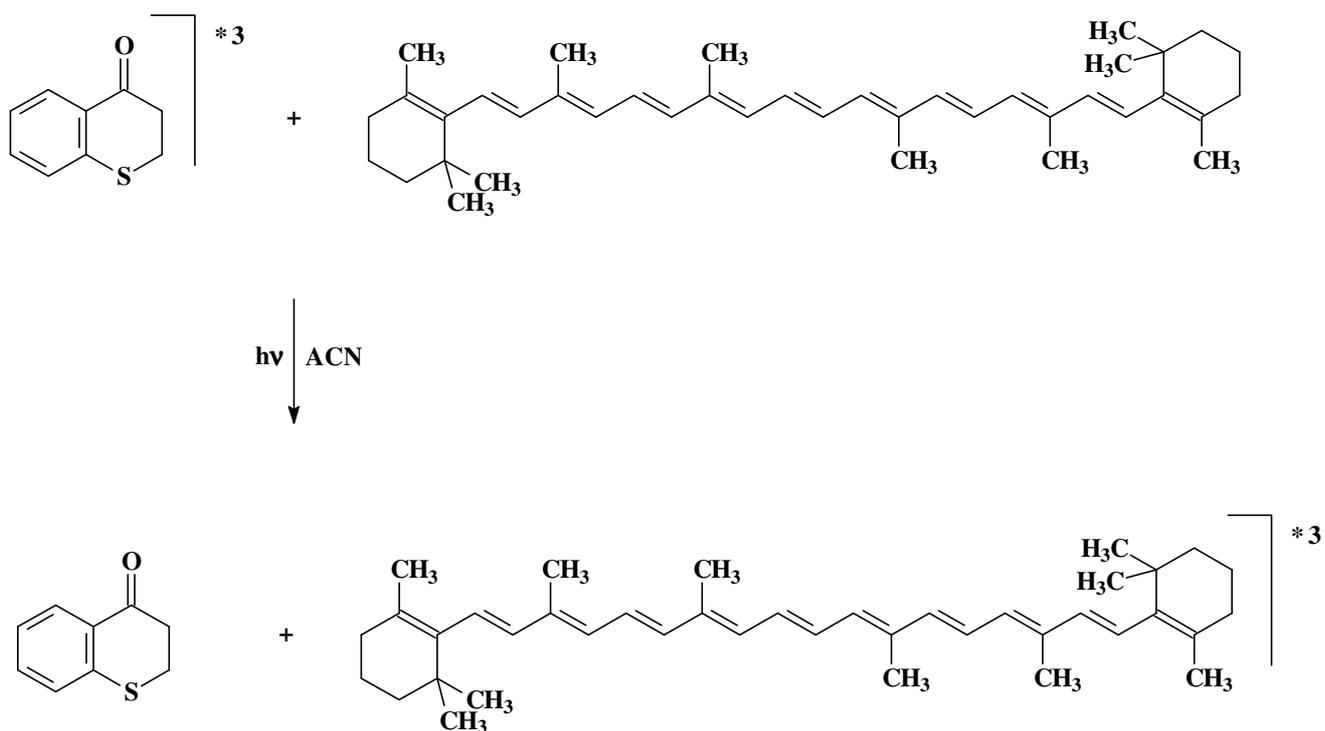


Figura 34. Gráfico de Stern-Volmer para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com *trans-β-caroteno* (supressor por transferência de energia).

Tabela 4. Caracterização do estado excitado triplete de tiocromanona (TCR): constantes de velocidade de transferência de energia triplete-triplete para *trans-β-caroteno* em acetonitrila.

Supressor	k_q (L.mol ⁻¹ s ⁻¹)
<i>trans-β-caroteno</i>	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{10}$

- Mecanismo proposto para a transferência de energia:



As constantes de velocidade de supressão para a tiocromanona (TCR), em presença de doadores de hidrogênio, como indol e fenóis (fenol, 3-clorofenol, 4-clorofenol, 4-fluorfenol, 4-bromofenol, 4-metoxifenol, 4-cianofenol, 4-*terc*-butilfenol, hidroquinona e resorcinol), Figura 35, foram obtidas através da construção de gráficos de Stern-Volmer, Figura 36. Esses valores de k_q estão mostrados na Tabela 5. Nestes casos, observou-se a formação do radical cetila correspondente da tiocromanona (TCR), Figura 37. Dentre as supressões com doadores de hidrogênio, a hidroquinona suprimiu o triplete mais rapidamente (maior valor de constante de velocidade de supressão) e o 4-cianofenol foi o mais lento deles, conforme apresentado na Tabela 5.

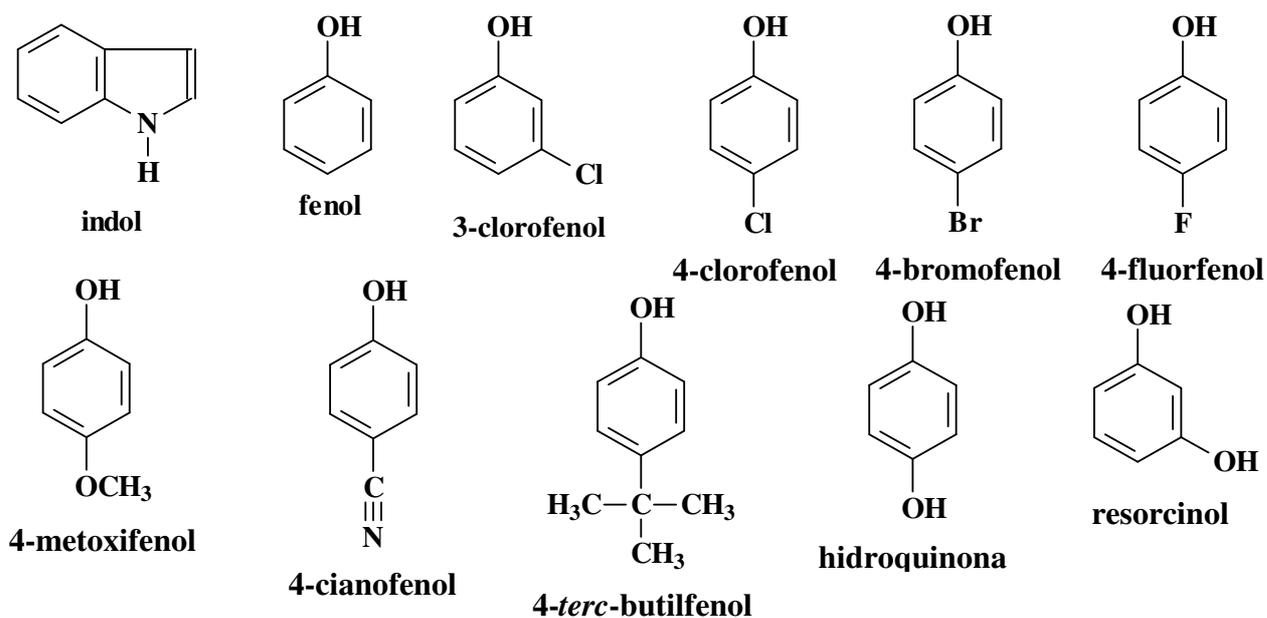


Figura 35. Supressores por transferência de hidrogênio.

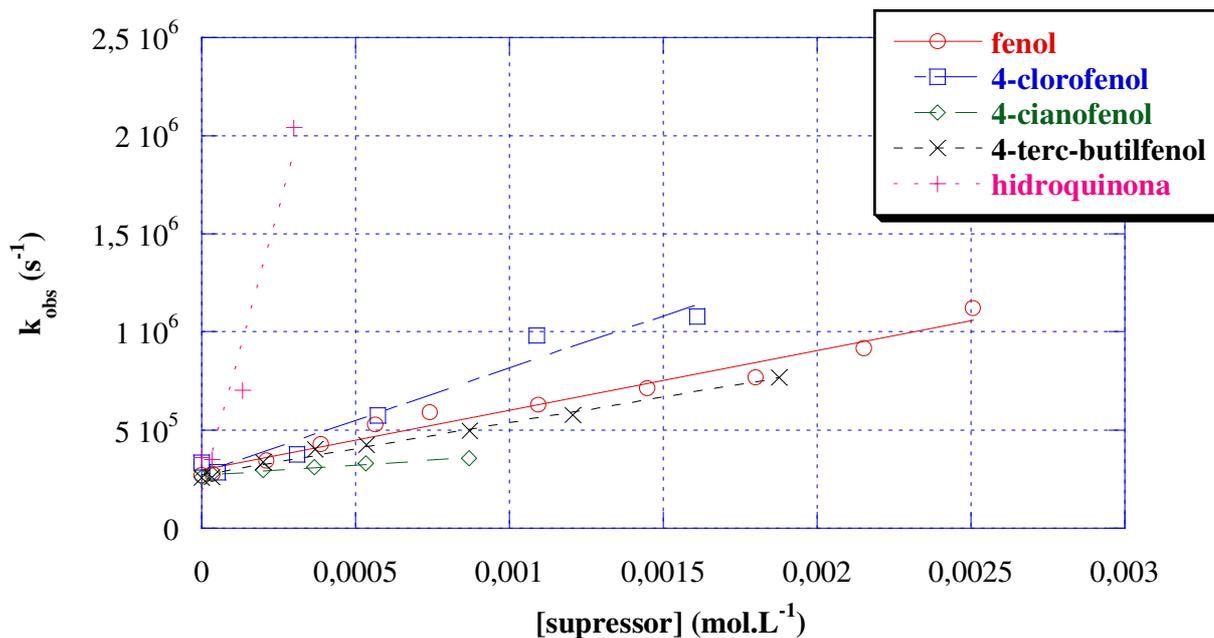
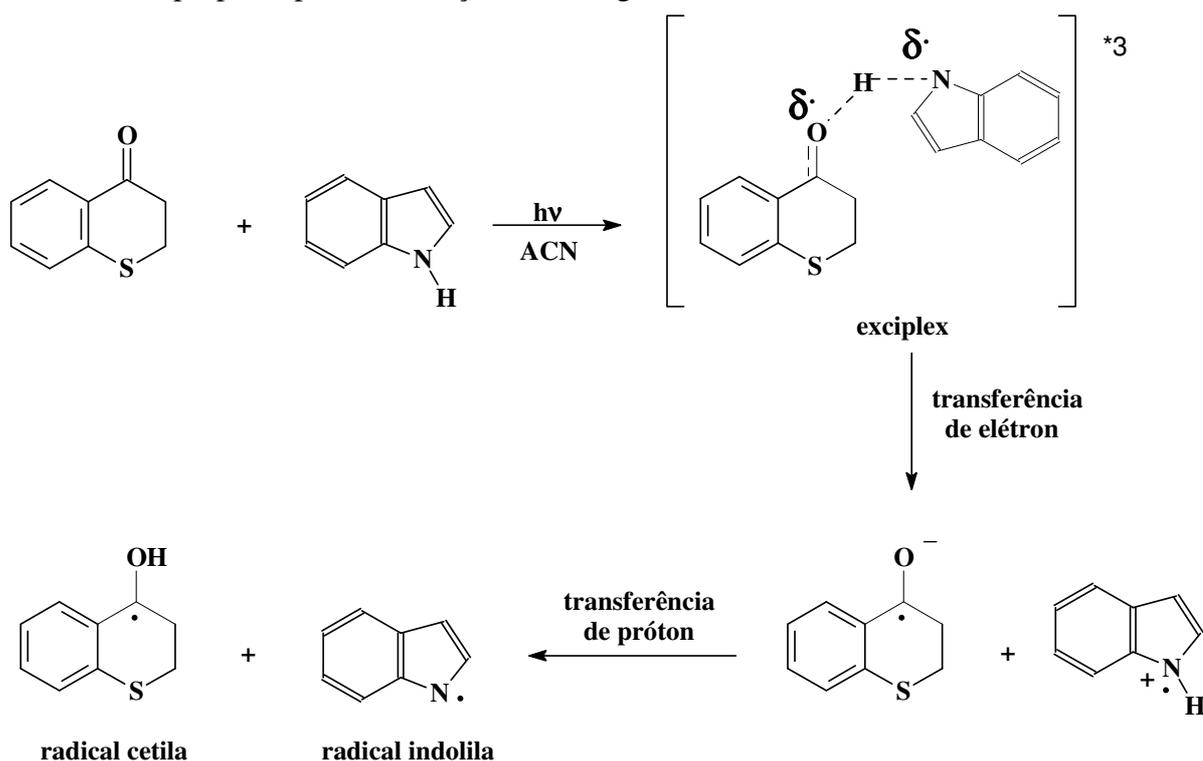


Figura 36. Gráfico de Stern-Volmer para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com fenóis (supressores por transferência de hidrogênio).

Tabela 5. Reatividade do estado excitado triplete de tiocromanona (TCR): constantes de velocidade de supressão do estado excitado triplete de tiocromanona por doadores de hidrogênio em acetonitrila.

Supressor	k_q ($L \cdot mol^{-1} s^{-1}$)
indol	$(4,2 \pm 0,8) \times 10^9$
fenol	$(3,0 \pm 0,2) \times 10^8$
3-clorofenol	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^8$
4-clorofenol	$(5,3 \pm 0,6) \times 10^8$
4-bromofenol	$(1,7 \pm 0,2) \times 10^8$
4-fluorfenol	$(6,1 \pm 0,4) \times 10^8$
4-metoxifenol	$(1,3 \pm 0,2) \times 10^9$
4-cianofenol	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^8$
4- <i>terc</i> -butilfenol	$(2,6 \pm 0,1) \times 10^8$
hidroquinona	$(5,8 \pm 1,0) \times 10^9$
resorcinol	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^9$

- Mecanismo proposto para a abstração de hidrogênio indólico:



- Mecanismo proposto para a abstração de hidrogênio fenólico:

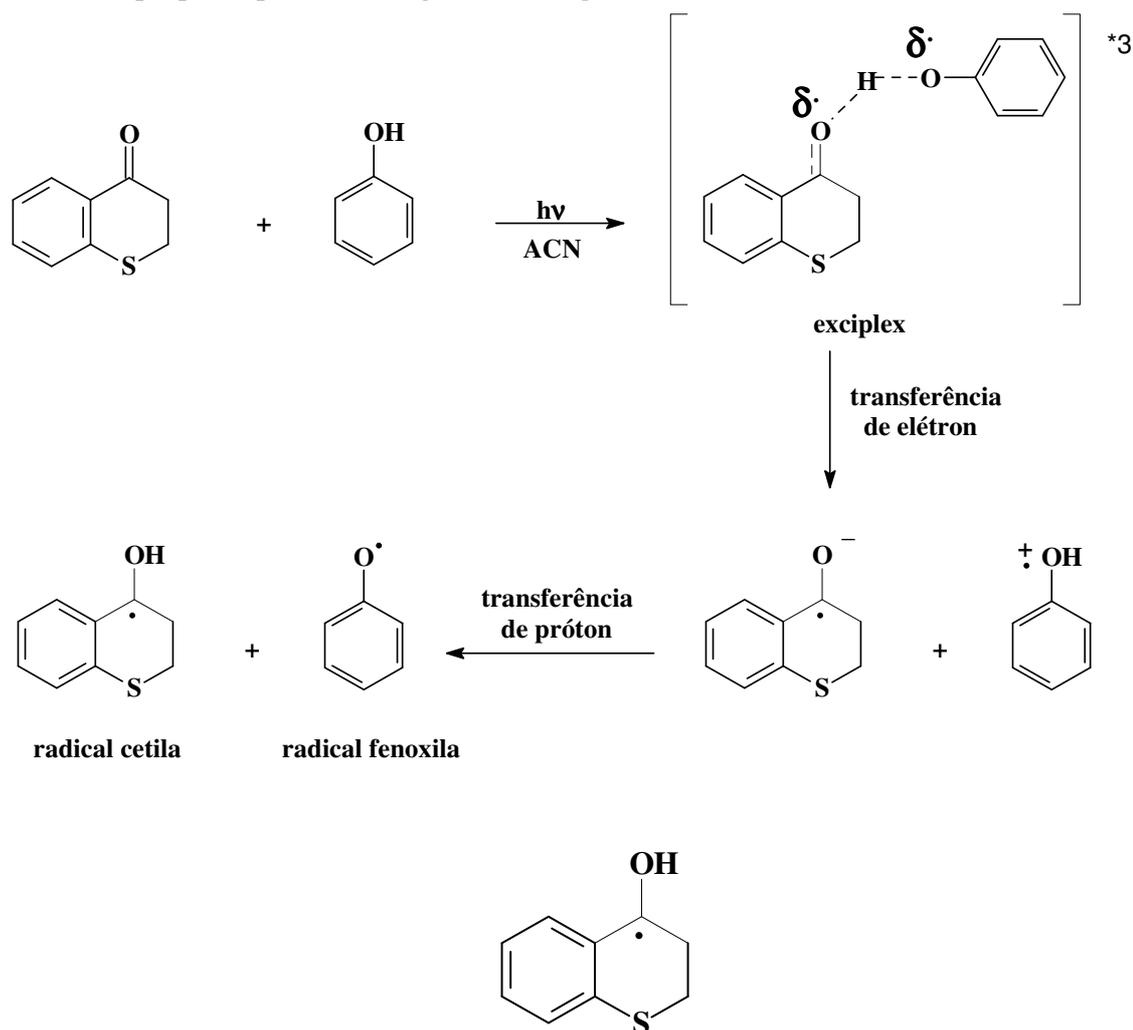


Figura 37. Radical cetila derivado da tiocromanona (TCR).

Um gráfico linear de Hammett foi construído para a supressão com os fenóis substituídos por grupos polares, Figura 38, segundo a equação de Hammett (que exprime uma correlação entre a estrutura dos compostos e a sua reatividade química), Equação 9, empregando-se as constantes de velocidade listadas na Tabela 5, que revelou um valor para a constante de reação (ρ) de $-0,90$ ($\rho = -0,90$; $r = 0,835$), similar aos obtidos para outras cetonas ou α -dicetonas, o que indica que no estado de transição, para a reação de abstração de hidrogênio de fenóis por parte do estado excitado triplete de tiocromanona (TCR), os fenóis apresentaram um caráter de carga positiva, o que é consistente com o mecanismo proposto na literatura para este tipo de supressão, no qual ocorre uma transferência de elétron inicial, seguida de uma transferência rápida de próton, confirmando a natureza eletrofílica do estado excitado triplete $n\pi^*$.

$$\log k_q^X/k_q^H = \sigma^+\rho$$

Equação 9. Equação de Hammett.

Onde: k_q^X = constante de velocidade de supressão empregando o fenol substituído;
 k_q^H = constante de velocidade de supressão empregando o fenol não substituído;

σ^+ = constante de Hammett para cada substituinte (listada na literatura);
 ρ = constante de reação.

Assim, para acenaftenona um valor de $\rho = -1,5$ foi obtido [De Lucas e Netto-Ferreira (1998)], enquanto que foram observados os valores de -1,48; -1,04 e -0,90 para as \square -dicetonas acenaftenoquinona [De Lucas e Netto-Ferreira (1998)], 1,2-aceantrilenodiona [Serra *et al.* (2004)] e 1,2-dicetopraceno [De Lucas *et al.* (2007)], respectivamente.

Em todos os casos citados anteriormente o mecanismo proposto envolve, como intermediário, um exciplexo entre a carbonila triplete e o fenol, o qual é estabilizado por ligação hidrogênio. Uma vez que o triplete protonado é mais facilmente reduzido pelo fenol parcialmente ionizado, a interação por ligação hidrogênio é responsável pela transferência de elétron do fenol para a cetona triplete. Após a formação do exciplexo, o processo de abstração do átomo de hidrogênio ocorre sob a forma de uma transferência de elétron inicial, seguida por uma transferência rápida de próton (um mecanismo de transferência acoplada elétron/próton). É importante notar que a basicidade do estado excitado triplete, assim como, o potencial de redução do grupo carbonila desempenham um papel fundamental na supressão, por parte do mecanismo, envolvendo um exciplexo estabilizado por ligação hidrogênio. Portanto, o aumento da basicidade da carbonila triplete apresentando configuração $\pi\pi^*$, resulta em uma transferência de hidrogênio mais favorável quando comparada ao estado $n\pi^*$.

A equação de Hammett [Hammett (1937) e Hammett (1938)] expressa uma relação quantitativa entre a natureza de um determinado substituinte e a reatividade do centro reacional, com a validade da Equação 9, sendo restrita a substituintes nas posições *meta* e *para* do anel aromático. A constante de reação (ρ) mede a suscetibilidade da reação sob a influência do substituinte. Baseada nos valores de ρ , pode ser obtida a característica do estado de transição com respeito ao desenvolvimento de carga. Para $\rho > 1$, uma carga negativa é formada no estado de transição, enquanto que, quando $\rho < 0$ a reação desenvolve uma carga positiva no estado de transição. Assim, os valores negativos para ρ observados na reação de abstração de hidrogênio de fenóis contendo substituintes polares pelo estado excitado triplete das cetonas citadas acima, estão completamente em acordo com o mecanismo proposto para este tipo de reação, independentemente do caráter do seu estado excitado triplete. Este mecanismo, mostrado anteriormente, envolve uma transferência de electron inicial do fenol à cetona excitada, através de um exciplexo, seguida por uma transferência de proton ultrarrápida, resultando finalmente, na formação do par de radicais cetila/fenoxila [De Lucas e Netto-Ferreira (1998), Silva e Netto-Ferreira (2004), Serra *et al.* (2004), De Lucas *et al.* (2007), Netto-Ferreira *et al.* (2008), Netto-Ferreira *et al.* (2008), Netto-Ferreira *et al.* (2009), De Lucas *et al.* (2009)]. Em apoio a este mecanismo, a Figura 39 mostra um espectro resolvido no tempo (representativo), obtido a partir da irradiação com laser ($\lambda = 355$ nm), de uma solução desoxigenada de tiocromanona ($\sim 1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) na presença de 4-metoxifenol ($1,4 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), em acetonitrila. Neste espectro, as absorções relativas ao estado excitado triplete da tiocromanona foram substituídas por novas absorções na região de 340-440 nm, as quais podem ser associadas a uma mistura do radical cetila (Figura 37), derivado do triplete da tiocromanona, e do radical 4-metoxifenoxila, que apresenta absorção a 405 nm [Shukla *et al.* (1997)] (mecanismo proposto anteriormente). Para todos os fenóis estudados foi observada a formação do par de radicais ariloxila/cetila.

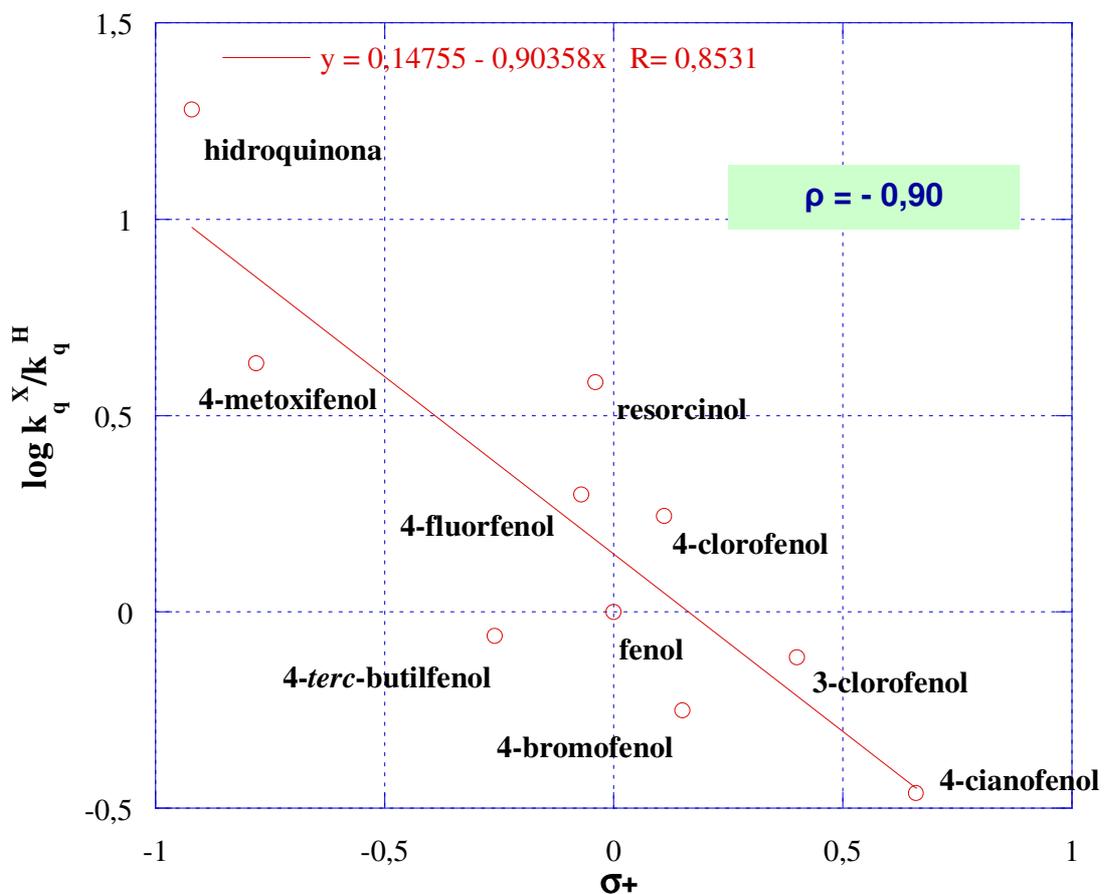


Figura 38. Gráfico de Hammett para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com fenóis substituídos.

Sendo assim, foi demonstrado por irradiação com laser ($\lambda = 355 \text{ nm}$) de tiocromanona, em acetonitrila, a formação e caracterização do seu estado excitado tripleto. Constantes de velocidade absolutas foram medidas para a reação de abstração de hidrogênio fenólico por este tripleto, a partir das quais foi construído um gráfico de Hammett. O valor negativo encontrado para a constante de reação ρ (-0,90) está de acordo com o mecanismo proposto para este tipo de reação, e que envolve uma transferência elétron/próton acoplada.

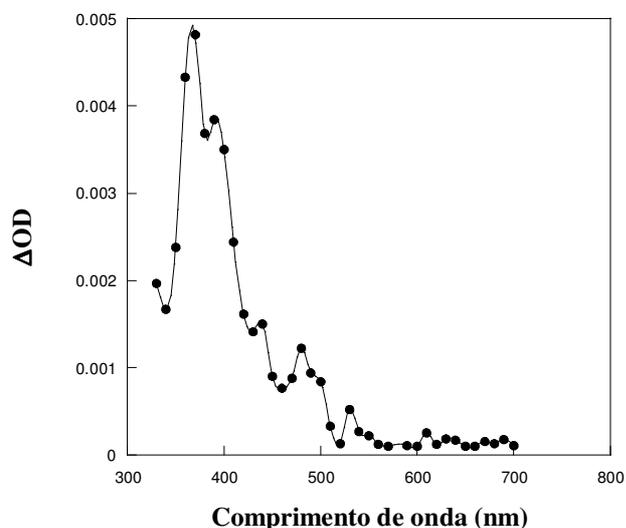
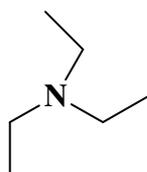
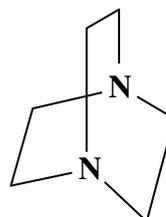


Figura 39. Espectro de absorção para o transiente de tiocromanona (TCR) gerado após excitação por laser, na presença de $1,4 \times 10^{-3}$ mol/L de 4-metoxifenol, em acetonitrila, registrado 13 μ s após o pulso do laser.

Na presença de supressores com capacidade de doar elétron, como trietilamina (Figuras 40 e 41) e 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octano (DABCO) (Figura 40), Tabela 6, percebeu-se a formação do ânion radical correspondente da tiocromanona (TCR), Figura 42. Os valores das constantes de velocidade de supressão para os supressores por transferência de elétron estão apresentados na Tabela 6, indicando que a supressão com a trietilamina foi mais rápida que com o DABCO.



trietilamina



DABCO

Figura 40. Supressores por transferência de elétron.

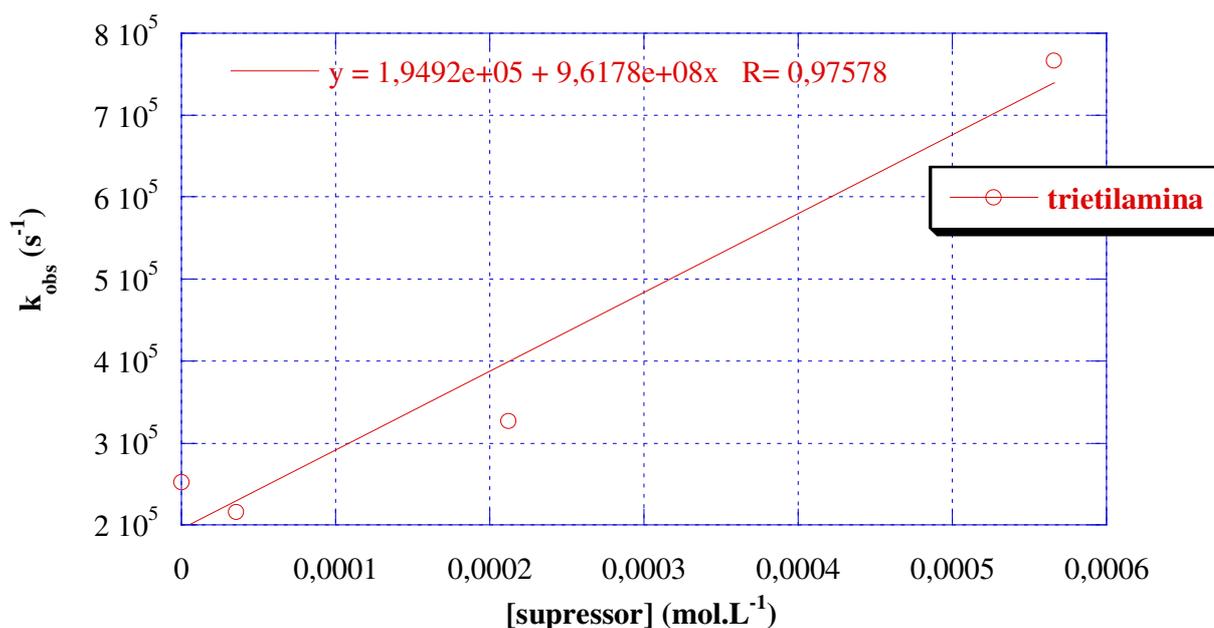
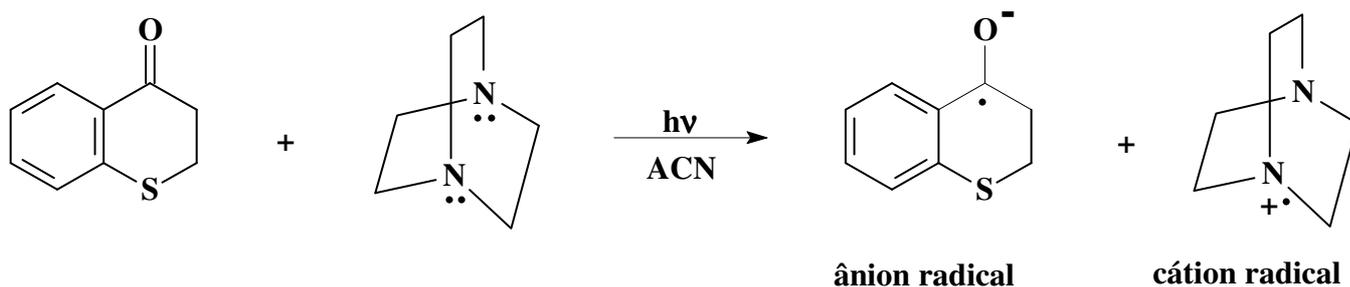
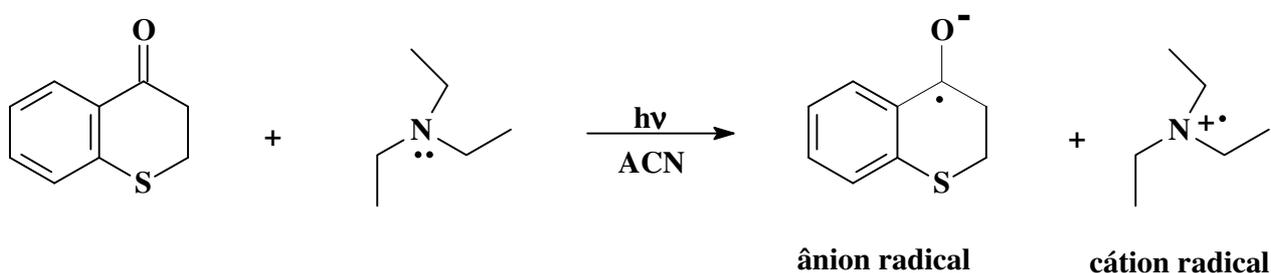


Figura 41. Gráfico de Stern-Volmer para a reação de tiocromanona (TCR) em acetonitrila com trietilamina (supressor por transferência de elétron).

Tabela 6. Reatividade do estado excitado triplete de tiocromanona (TCR): constantes de velocidade de supressão do estado excitado triplete de tiocromanona por doadores de elétron em acetonitrila.

Supressor	k _q (L.mol ⁻¹ s ⁻¹)
Trietilamina	(9,6 ± 1,5) × 10 ⁸
DABCO	(1,3 ± 0,1) × 10 ⁷

- Mecanismo proposto para a transferência de elétron:



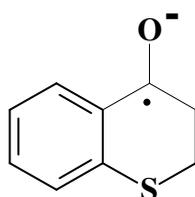


Figura 42. Ânion radical derivado da tiocromanona (TCR).

A irradiação de tioflavona, *S,S*-dióxidotioflavona e tiocromanona, em acetonitrila, por fotólise por pulso de laser de nanossegundo, levou à formação de seus respectivos estados excitados triplete. A partir das constantes de velocidade de supressão obtidas para a tiocromanona foi possível observar que na presença de supressores por transferência de hidrogênio, ocorreu a formação do radical cetila derivado da tiocromanona e, com supressor por transferência de elétron, houve a formação do ânion radical derivado da tiocromanona. As constantes de velocidade de supressão obtidas para a tiocromanona com fenóis variaram de $(1,1 \pm 0,1) \times 10^8$ L/mol.s (4-cianofenol) a $(5,8 \pm 1,0) \times 10^9$ L/mol.s (hidroquinona). Um gráfico de Hammett para a reação do triplete de tiocromanona com uma série de fenóis contendo substituintes polares resultou em uma constante de reação $\rho = -0,90$. Este valor negativo para a constante de reação ρ está plenamente de acordo com um mecanismo envolvendo uma transferência acoplada elétron/próton no processo de transferência de hidrogênio do fenol para a carbonila triplete. E, a constante de velocidade de supressão obtida para a tiocromanona com trietilamina foi de $(9,6 \pm 1,5) \times 10^8$ L/mol.s.

É importante ressaltar que o estudo do comportamento da tiocromanona (TRC) frente a reação de transferência de hidrogênio, através da técnica de fotólise por pulso de laser de nanossegundo (FPL), resultou em um artigo publicado no JBCS, conforme apresentado no Anexo A.D.

5.1.2 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência

Neste trabalho, a concentração estimada das soluções dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)), da tiocromanona (TCR) e do naftaleno (NAF - referência) nos solventes com diferentes polaridades (na seguinte sequência de aumento de polaridade: cicloexano (CEX), etanol (ETOH), acetonitrila (ACN) e água milli-Q (AD)), Tabela 7 [Weast (1971)], para absorvância de aproximadamente 0,1 (Tabela 8) foi de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, uma vez que, o coeficiente de absorção molar ou absorvância molar (ϵ) para flavonóides é em torno de 10.000 a 50.000 L/cm.mol para absorvância $\cong 0,1$, Anexo A.

As moléculas flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e tiocromanona (TCR), foram estudadas por espectroscopia de fluorescência frente a solventes com diferentes polaridades (ordem de aumento de polaridade: cicloexano (CEX), etanol (ETOH), acetonitrila (ACN) e água milli-Q (AD)), Tabela 7 [Weast (1971)]. Os resultados mostraram que estes flavonóides não fluorescem, o que está de acordo com a literatura [Schulman (1975), Zou *et al.* (2002) e Lakowicz (1999 e 2006)], em que vários flavonóides analisados não apresentaram fluorescência.

Tabela 7. Índice de refração (nD) [Weast (1971)] para os solventes (cicloexano (CEX), diclorometano (DCM), etanol (ETOH), acetonitrila (ACN) e água milli-Q (AD)).

Solvente	nD a 25 °C
CEX	1,424
DCM	1,424
ETOH	1,359
ACN	1,342
AD	1,333

Tabela 8. Densidade ótica (OD) para os compostos (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e tiocromanona (TCR)) em CEX, ETOH, ACN e AD.

Molécula	CEX	ETOH	ACN	AD
Naftaleno (NAF)*	0,099	0,098	0,098	0,098
Flavona (FVA)	0,099	0,099	0,096	0,099
<i>alfa</i>-Naftoflavona (α-NAF)	0,099	0,098	0,097	0,099
<i>beta</i>-naftoflavona (β-NAF)	0,098	0,098	0,097	0,097
Tioflavona (TFA)	0,099	0,099	0,098	0,099
<i>S,S</i>-Dióxidotioflavona (SDF)	0,098	0,099	0,097	0,098
Flavanona (FNA)	0,099	0,098	0,098	0,099
Tiocromanona (TCR)	0,098	0,099	0,097	0,098

* Naftaleno (NAF) = referência.

5.2 Interação entre Quercetina (QUE), Agatisflavona (ATF), 7''-*O*-Metilagatisflavona (OMA), Amentoflavona (AMF) e Diidroochnaflavona (DOF), e Solventes (Acetonitrila (ACN), Diclorometano (DCM), Etanol (ETOH) e Água milli-Q (AD))

Os flavonóides, quercetina, agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona foram estudados, espectroscopicamente, frente a diferentes solventes (Diclorometano (DCM), Etanol (ETOH), Acetonitrila (ACN) e Água milli-Q (AD)), por absorção no ultravioleta/visível e emissão de fluorescência. Estes resultados e discussão estão mostrados a seguir.

5.2.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e espectroscopia de fluorescência

Quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF), diidroochnaflavona (DOF) e naftaleno (NAF) (composto utilizado como referência, Figura 43) foram estudadas frente a diversos solventes com diferentes polaridades (na seguinte sequência de aumento de polaridade: diclorometano (DCM), etanol (ETOH), acetonitrila (ACN) e água milli-Q (AD)), Tabela 7 [Weast (1971)], por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) e por espectroscopia de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) no estado estacionário.

Os espectros de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) estão apresentados nas Figuras 44-48. Estes espectros mostraram pouquíssima diferença na presença de solventes como ACN, ETOH e AD, Figuras 44-48, quando comparados entre si para cada flavonóide. Porém, quando na presença de DCM, percebe-se uma grande diferença na comparação dos espectros de UV-Vis de DCM com os de ACN, ETOH e AD. Essas variações de absorção, dependendo do solvente, são devidas às

transições $\pi\pi^*$. Para a agatisflavona (ATF) foi observada total diferença nos seus espectros de absorção em AD e em DCM (Figura 45).

A concentração estimada das soluções dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) e do naftaleno (NAF - referência) nos solventes (DCM, ETOH, ACN e AD) para uma densidade ótica (OD), ou seja, uma absorbância de aproximadamente 0,1 em $\lambda = 280$ (Tabela 9) foi de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, uma vez que, o coeficiente de absorção molar ou absortividade molar (ϵ) para flavonóides é em torno de 10.000 a 50.000 L/cm.mol para absorbância $\cong 0,1$, Anexo A.

Os espectros de emissão de fluorescência observados para os flavonóides QUE, ATF, OMA, AMF e DOF, na presença dos mesmos solventes (Tabela 7) [Weast (1971)], mostraram que estes flavonóides não fluorescem, o que está de acordo com a literatura [Schulman (1975), Zou *et al.* (2002) e Lakowicz (1999 e 2006)], em que vários flavonóides analisados não apresentaram fluorescência. É importante ressaltar que sobre os biflavonóides (ATF, AMF, OMA e DOF) em questão, não existe nada ligado à fotoquímica e/ou fotofísica na literatura.

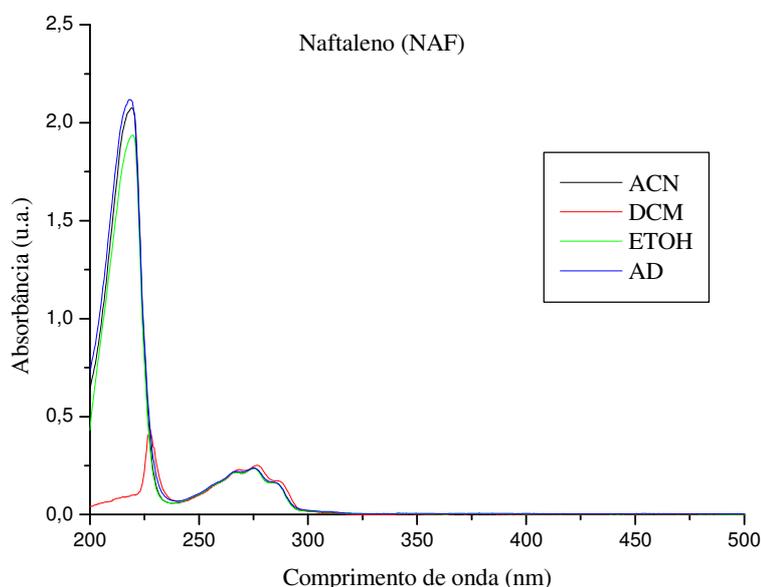


Figura 43. Espectro de absorção no UV-Vis da referência (naftaleno (NAF)) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{\text{NAF}} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

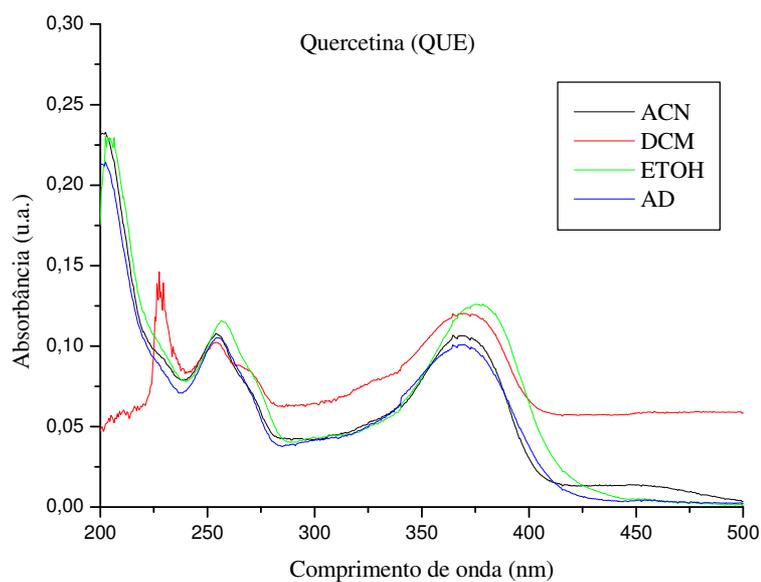


Figura 44. Espectro de absorção no UV-Vis de quercetina (QUE) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

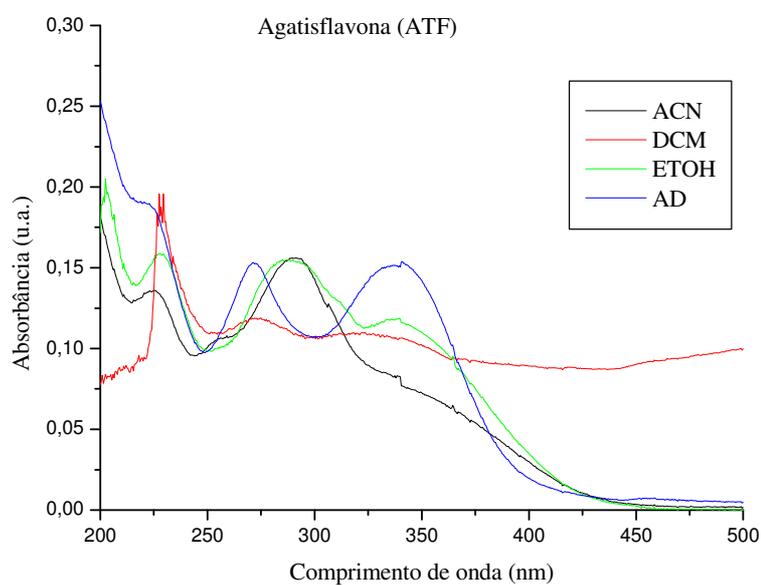


Figura 45. Espectro de absorção no UV-Vis de agatisflavona (ATF) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

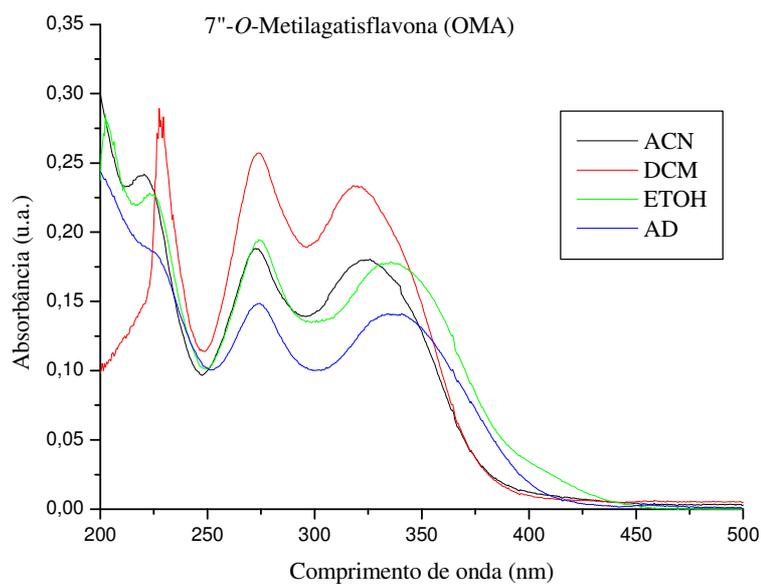


Figura 46. Espectro de absorção no UV-Vis de 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

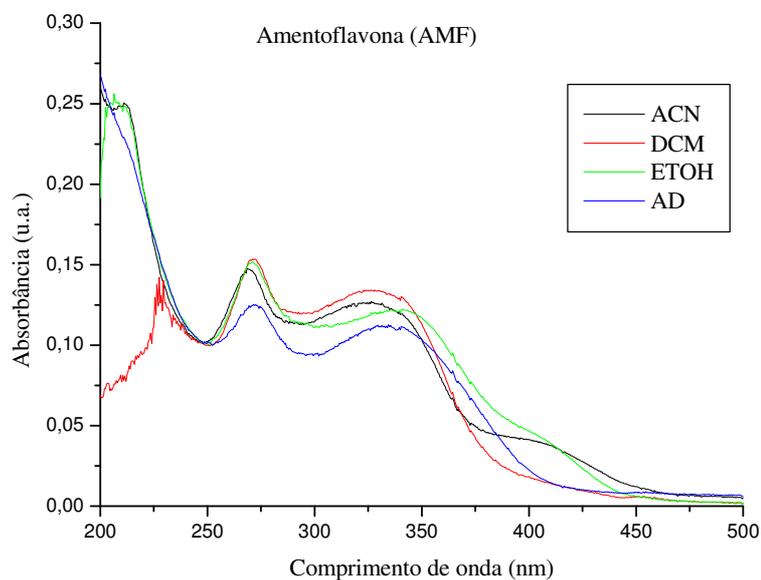


Figura 47. Espectro de absorção no UV-Vis de amentoflavona (AMF) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

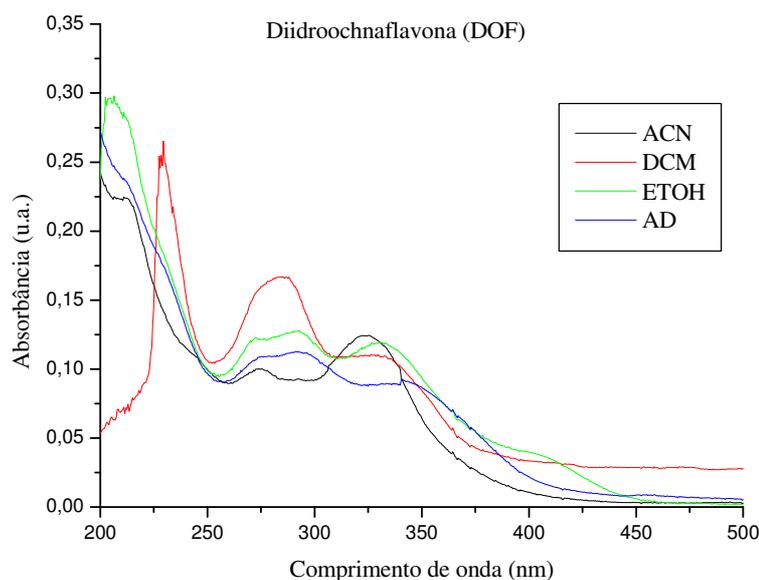


Figura 48. Espectro de absorção no UV-Vis de diidrochalcona (DOF) em acetonitrila (ACN), diclorometano (DCM), etanol (ETOH) e água milli-Q (AD). $C_{\text{DOF}} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabela 9. Densidade ótica (OD) para os compostos (quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF), diidrochalcona (DOF) e naftaleno (NAF) (referência)) em DCM, ETOH, ACN e AD.

Molécula	DCM	ETOH	ACN	AD
Naftaleno (NAF)*	0,098	0,100	0,099	0,100
Quercetina (QUE)	0,099	0,097	0,098	0,098
Agatisflavona (ATF)	0,099	0,098	0,099	0,099
7''-O-Metilagatisflavona (OMA)	0,100	0,100	0,099	0,099
Amentoflavona (AMF)	0,097	0,098	0,099	0,099
Diidrochalcona (DOF)	0,100	0,098	0,099	0,097

* Naftaleno (NAF) = referência.

5.3 Interação entre Quercetina (QUE), Agatisflavona (ATF), 7''-O-Metilagatisflavona (OMA), Amentoflavona (AMF) e Diidrochalcona (DOF), e Albumina Sérica Bovina (ASB)

Os flavonóides, quercetina, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochalcona foram estudados, espectroscopicamente, frente a albumina sérica bovina (ASB), por absorção no ultravioleta/visível, emissão de fluorescência, dicroísmo circular e modelagem molecular. Seus resultados e a discussão correspondente estão mostrados a seguir.

5.3.1 Espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis)

A espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) é um caminho muito simples para investigar as mudanças na estrutura e a formação de complexos [Yue *et al.* (2008)]. As mudanças na estrutura de ASB, induzidas pela adição de flavonóides, foram investigadas através de espectros de absorção UV-Vis. Os resultados obtidos acerca da ASB,

dos flavonóides e da interação entre ASB e os flavonóides quercetina, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona por absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) na faixa de 200 nm a 500 nm estão apresentados nas Figuras 52-57. A albumina (seja ASH ou ASB) apresenta uma banda de absorção com forte absorbância em torno de 208 nm, que é característica de estrutura α -hélice de proteína [Yue *et al.* (2008)]. A albumina sérica bovina (ASB), Figura 49, de acordo com a literatura [Cahill e Padera (1980) e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf], assim como a albumina sérica humana (ASH), também apresenta uma banda de absorção em torno de 280 nm, que é característica da absorção UV-Vis de triptofano (banda de absorção bem mais intensa que a da tirosina) e de tirosina (banda de absorção mais fraca que a do triptofano), conforme mostrado na Figura 50 [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf]. O triptofano é o responsável pela forte e característica absorção de luz pelas proteínas em comprimento de onda de 280 nm, Figura 50, a tirosina contribui menos um pouco, e, em menor extensão (quase nenhuma contribuição), a fenilalanina, todos absorvem luz na região ultravioleta do espectro [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf]. Triptofano, tirosina e fenilalanina (Figura 51) 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, Figura 51, [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

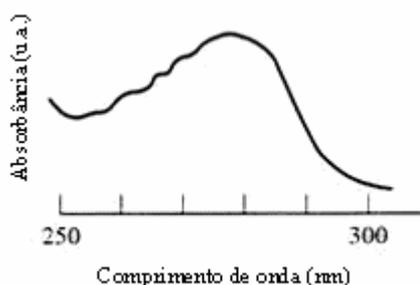


Figura 49. Espectro de absorção no UV-Vis de albumina sérica bovina (ASB) [Cahill e Padera (1980), www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

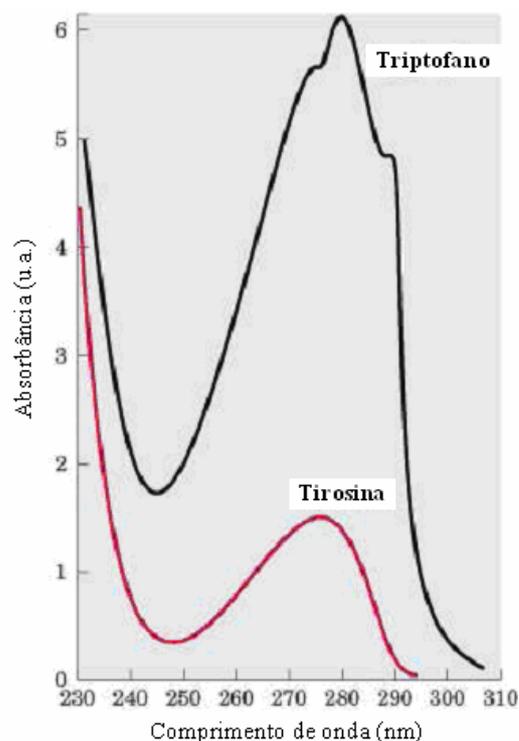


Figura 50. Espectro de absorção no UV-Vis de triptofano e de tirosina [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

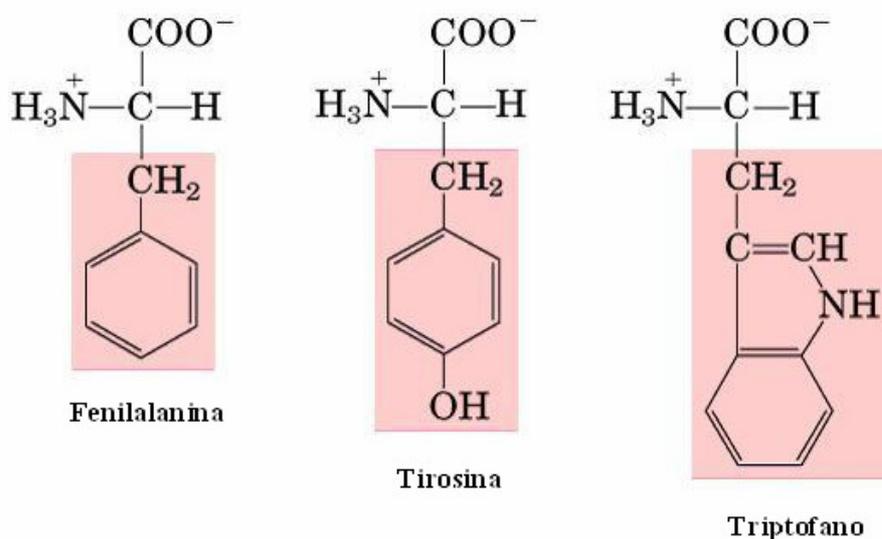


Figura 51. Estrutura de fenilalanina, tirosina e triptofano [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

A Figura 52 mostra 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). Para os flavonóides QUE, ATF, OMA e AMF também não foram observadas mudanças, ao serem comparados os seus espectros de absorção UV-Vis em água milli-Q (AD), Figuras 44-47, respectivamente, e em solução tampão de PBS (pH = 7,4). Já para o flavonóide DOF, perceberam-se mudanças

substanciais, quando comparados os seus espectros em água milli-Q (AD) (Figura 48) e em solução tampão de PBS (pH = 7,4).

A intensidade de absorvância do sistema flavonóides-ASB aumentou com o aumento da concentração de flavonóides (Figuras 53-57). Com o aumento da concentração dos flavonóides ocorreu um pequeno deslocamento hipsocrômico (deslocamento para o azul - menor comprimento de onda) da banda de absorção próxima a 208 nm (correspondente a ASB), assim como, também foi percebido, um pequeno deslocamento para o azul da banda de absorção próxima a 280 nm, característica do triptofano, indicando que houve a formação de um complexo entre os flavonóides e a albumina sérica bovina (ASB), Figuras 53-57, enquanto a hidrofobicidade diminui. As regiões principais para a ligação dos flavonóides 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 fármacos, como por exemplo, os flavonóides, podem se ligar, formando os complexos fármaco-ASB.

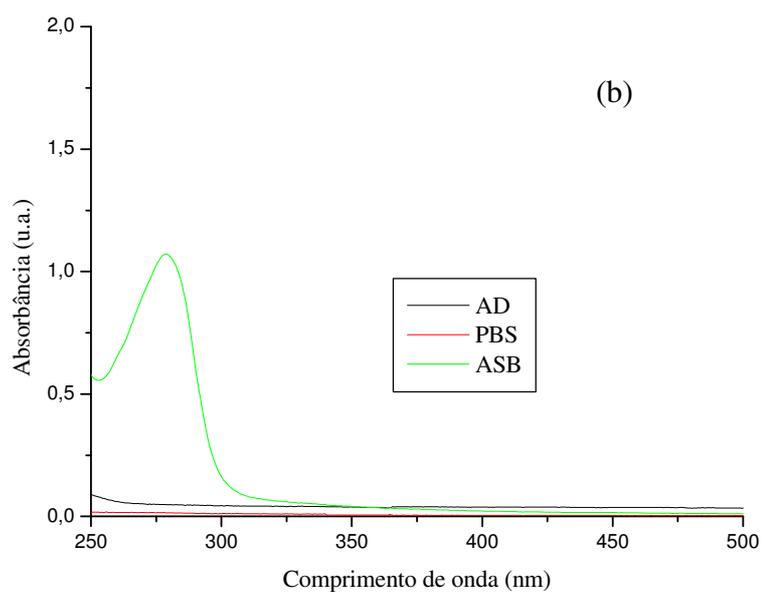
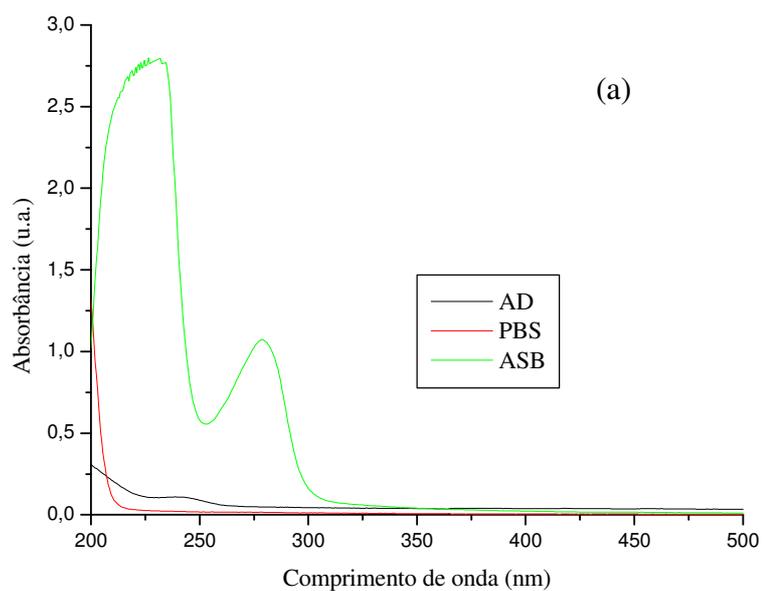


Figura 52. Espectros de absorção no UV-Vis de água milli-Q (AD), solução tampão de PBS (pH = 7,4) e solução de albumina sérica bovina (ASB) tamponada com PBS (pH = 7,4), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.

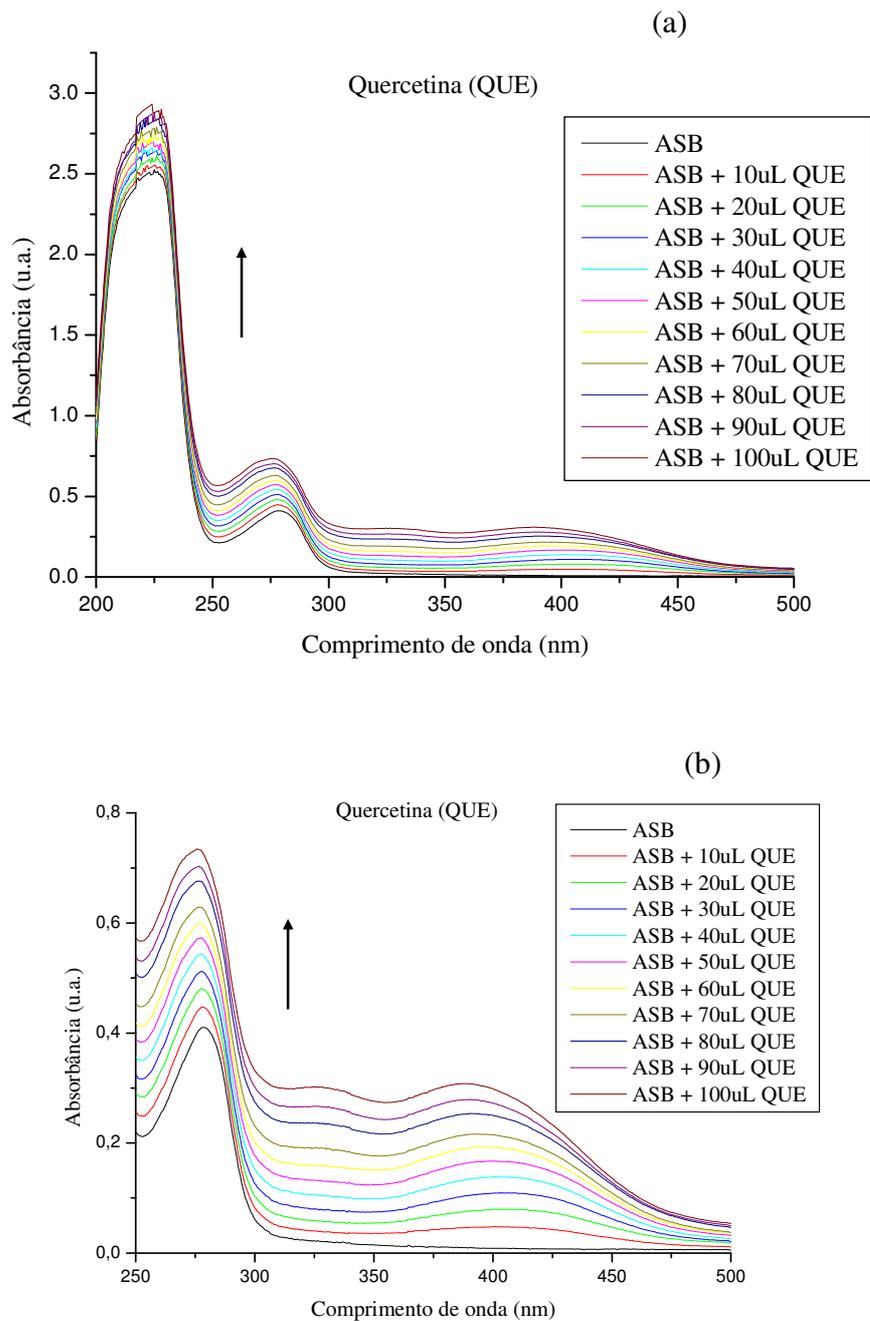


Figura 53. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70; 3,03$ e $3,37 (\times 10^{-5})$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.

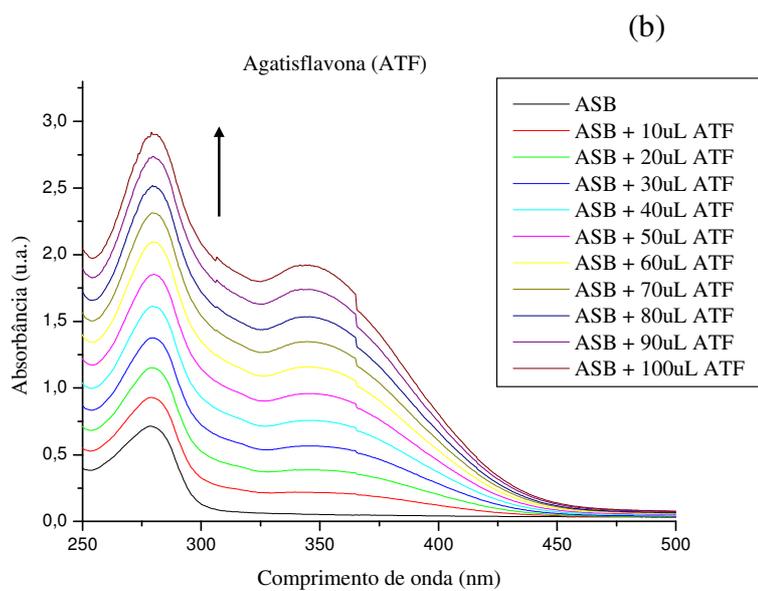
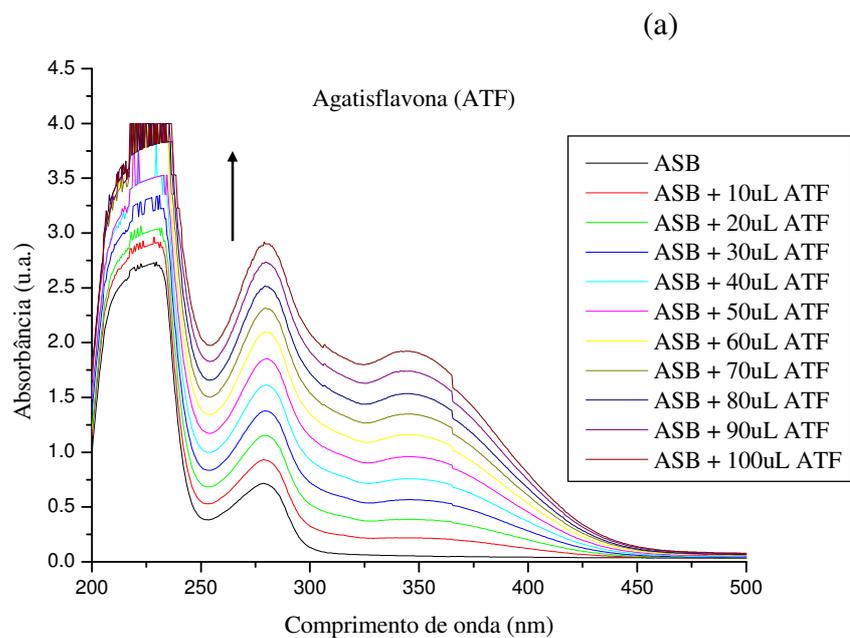


Figura 54. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66; 3,00$ e $3,33$ ($\times 10^{-5}$) mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.

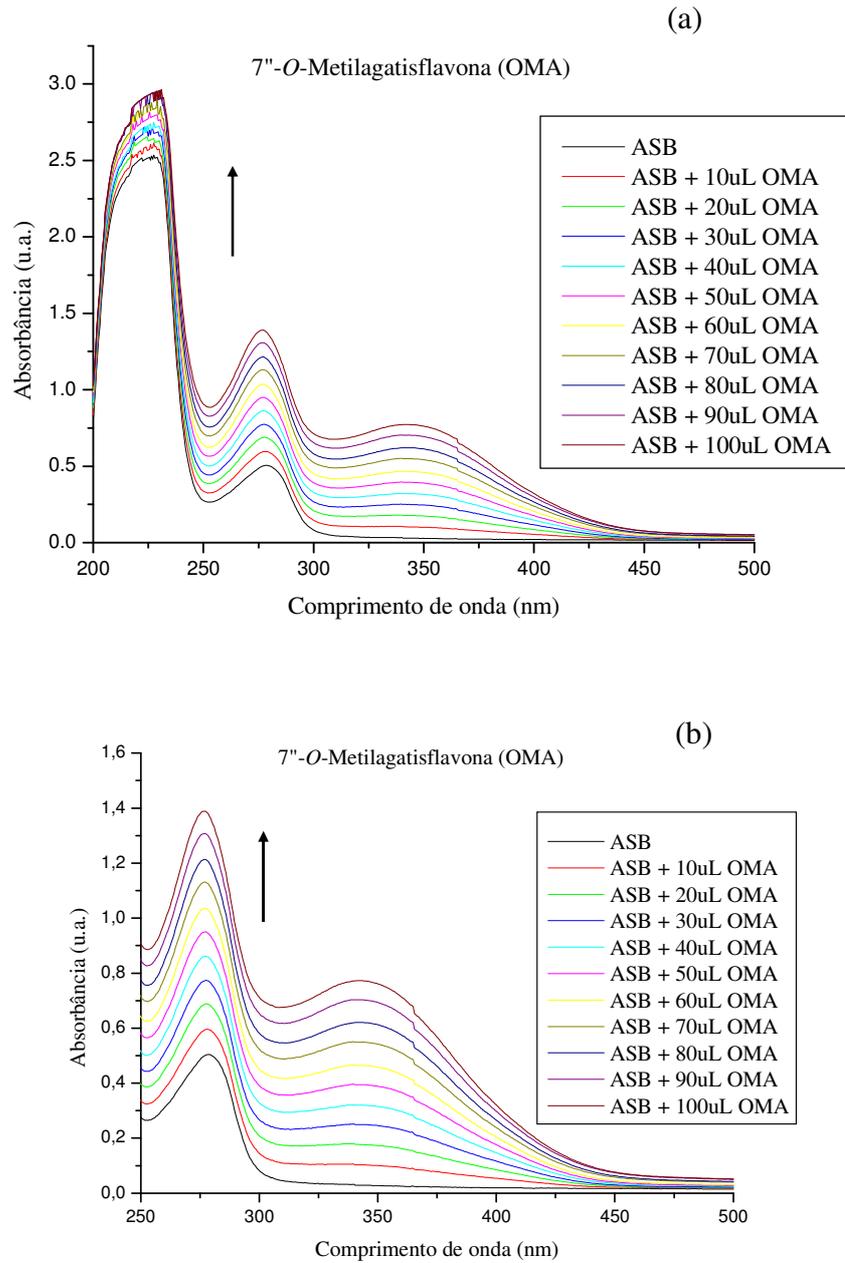


Figura 55. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7"-*O*-metilagatisflavona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74; 3,09$ e $3,43 (x 10^{-5})$ mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.

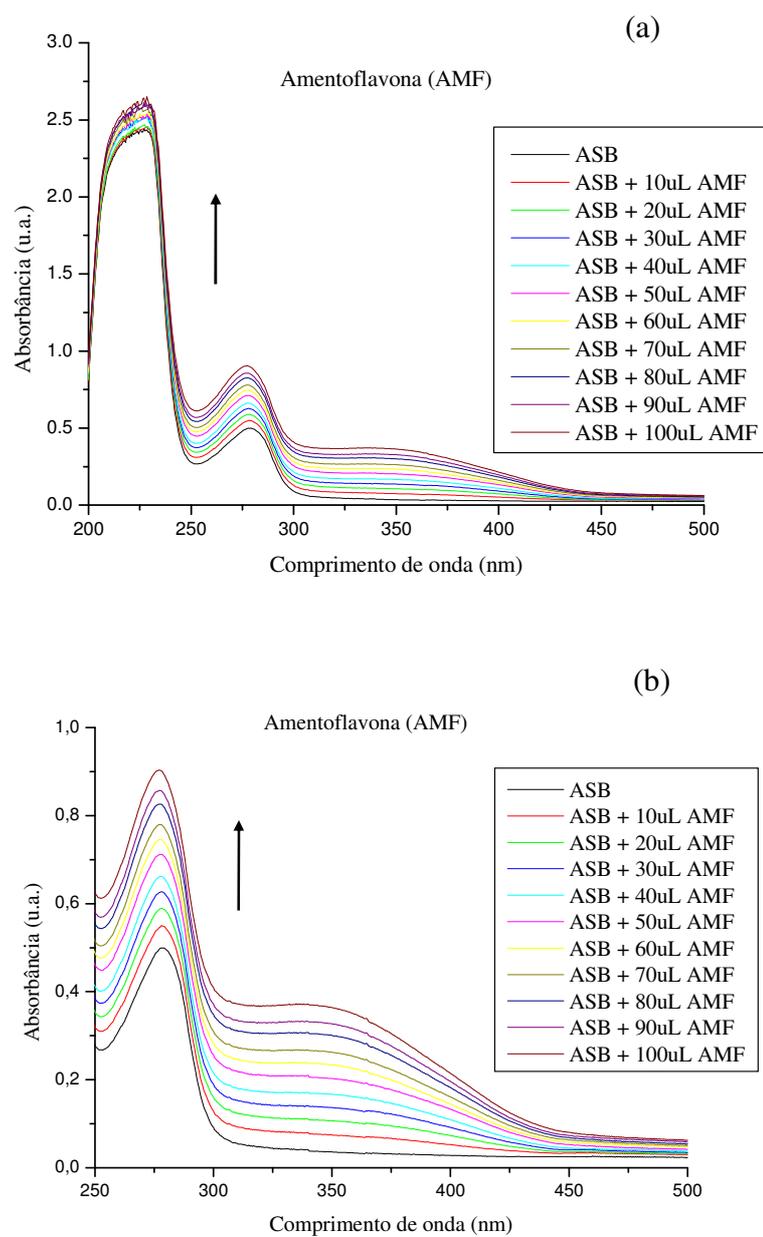


Figura 56. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66; 3,00$ e $3,33$ ($\times 10^{-5}$) mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.

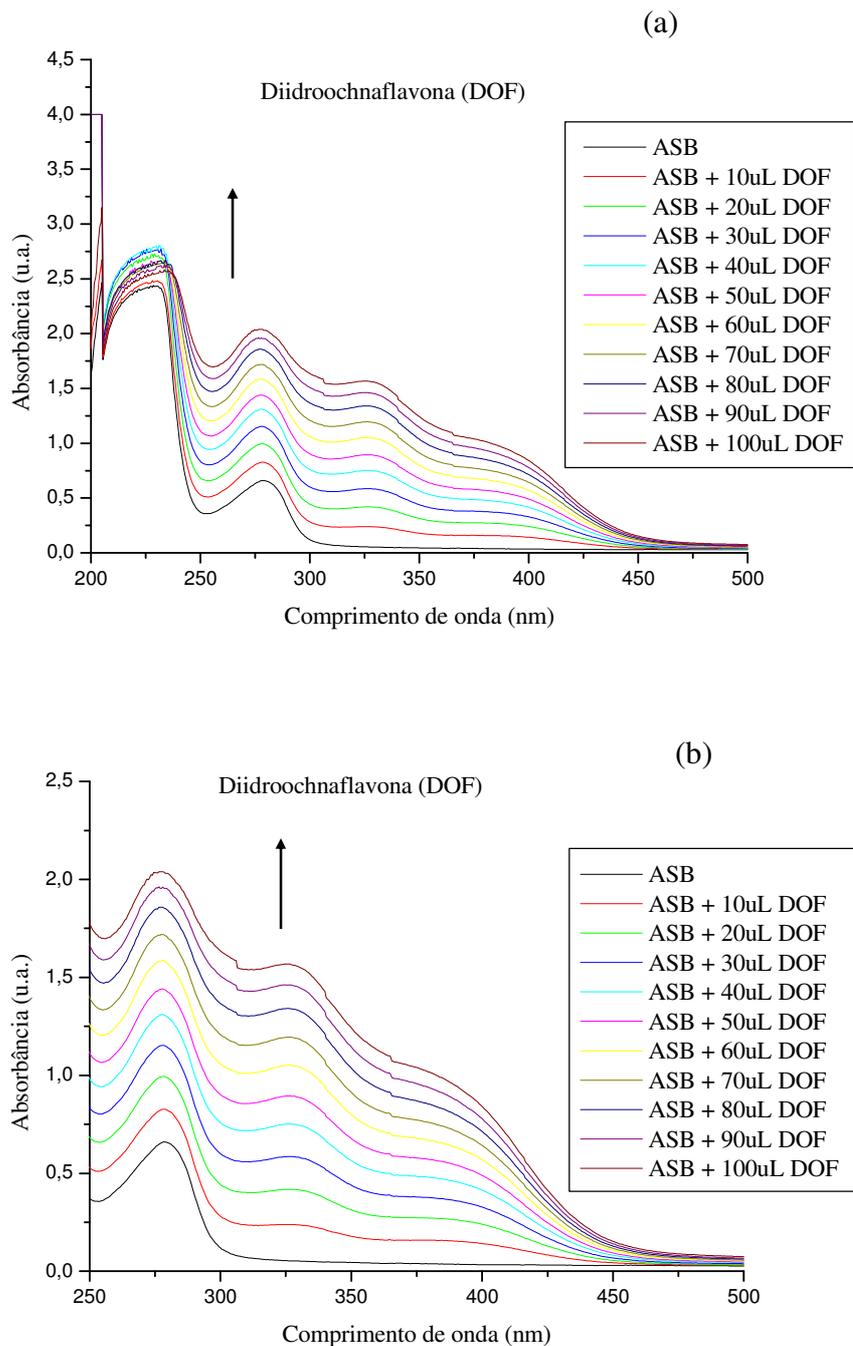


Figura 57. Espectros de absorção no UV-Vis de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochalcona, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80; 3,15$ e $3,50$ ($\times 10^{-5}$) mol/L. (a) $\lambda = 200$ a 500 nm e (b) $\lambda = 250$ a 500 nm.

5.3.2 Espectroscopia de fluorescência

A ASH tem somente três fluoróforos intrínsecos vizinhos (resíduos de triptofano (Trp), de tirosina (Tyr) e de fenilalanina (Phe)). A fluorescência intrínseca de ASH é consequência somente da presença do resíduo de triptofano (Trp) uma vez que o resíduo de fenilalanina (Phe) tem um rendimento quântico de fluorescência muito baixo e a fluorescência de tirosina (Tyr) é quase totalmente suprimida, quando esta se encontra ionizada, ou quando

está próxima de um grupo amino, carboxila ou de um triptofano (Trp) [Sulkowska (2002) e Yue *et al.* (2008)]. A característica da fluorescência intrínseca é que ela é muito sensível ao seu microambiente. Quando os arredores de ASH são alterados, sua fluorescência intrínseca é obviamente diminuída, causada por fatores como transição conformacional em proteínas, ligação de biomolécula, e desnaturação, etc. [Yue *et al.* (2008)]. Isso foi percebido na emissão de fluorescência de ASB (Figuras 58-82). A ASB também tem três fluoróforos intrínsecos vizinhos (resíduos de triptofano (Trp), de tirosina (Tyr) e de fenilalanina (Phe)). A fluorescência intrínseca de ASB é particularmente contribuída pelos resíduos de triptofano (Trp), assim como a ASH. A única diferença entre elas é que, a ASH é constituída por 585 resíduos de amino ácidos e apresenta apenas 1 resíduo de triptofano (Trp-214), enquanto, a ASB tem 582 resíduos de amino ácidos e apresenta 2 resíduos de triptofano (Trp-134 e Trp-212) [Stan *et al.* (2009)].

Para macromoléculas, a supressão de fluorescência pode dar alguma informação acerca da ligação de uma pequena molécula a uma proteína [Yue *et al.* (2008)]. As mudanças conformacionais de ASB foram avaliadas por espectroscopia de emissão de fluorescência. Os resultados obtidos acerca da ASB e da sua interação com os flavonóides quercetina, agatisflavona, 7'-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona por emissão de fluorescência em diferentes temperaturas ($T = 22^{\circ}\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e em $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm estão mostrados nas Figuras 58-82. Como água milli-Q (AD) e solução tampão de PBS (pH = 7,4) não emitem fluorescência, e como os flavonóides também não emitem fluorescência em 280 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm), o que se observa em $\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm, é a emissão de fluorescência da albumina sérica bovina (ASB). Nesses estudos, observou-se que a temperatura influenciou pouco ou quase nada na emissão de fluorescência e, em todos os casos, a presença desses flavonóides no meio (ASB) influenciou na emissão de fluorescência da albumina sérica bovina (ASB), uma vez que a emissão de fluorescência da ASB era suprimida pelos flavonóides (com a adição de alíquotas dos flavonóides), Figuras 58-82. A adição de flavonóides levou a uma gradativa diminuição na intensidade de fluorescência máxima de ASB (Figuras 58-82). Se pequenas moléculas, como esses flavonóides, podem suprimir os resíduos de triptofano, os resíduos devem estar localizados dentro ou próximo à posição de ligação (interação).

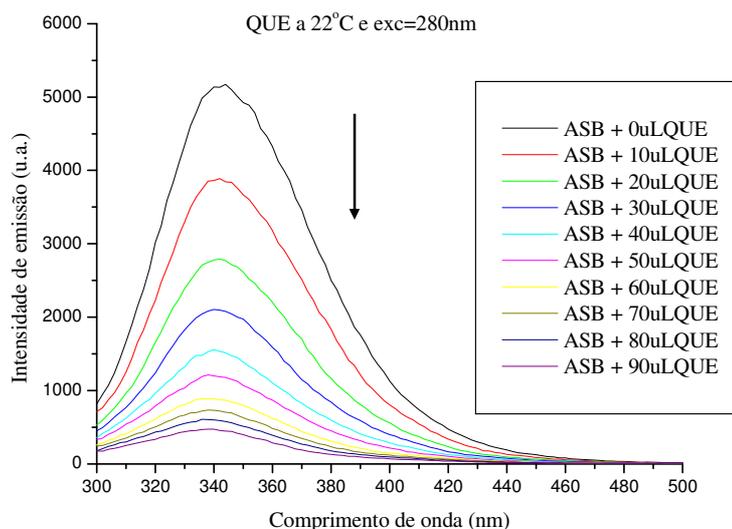


Figura 58. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 22^\circ\text{C}$.

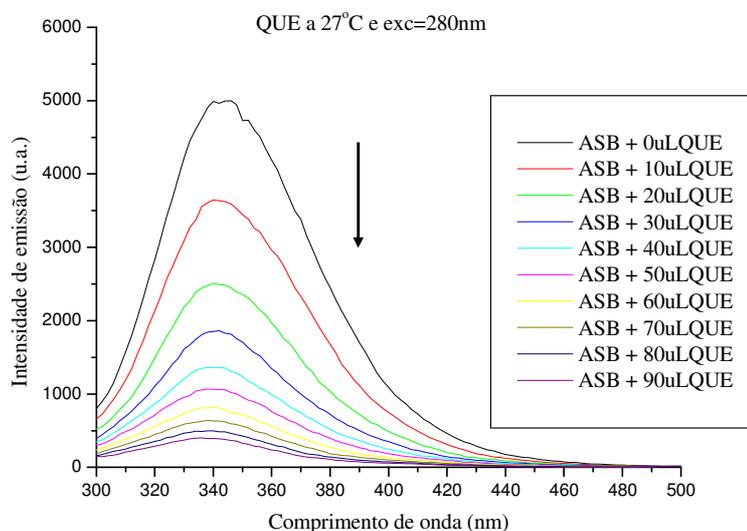


Figura 59. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 27^\circ\text{C}$.

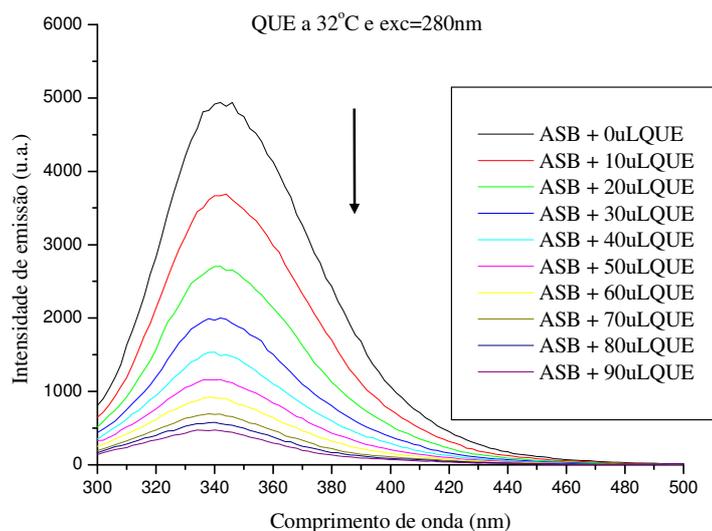


Figura 60. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 32^\circ\text{C}$.

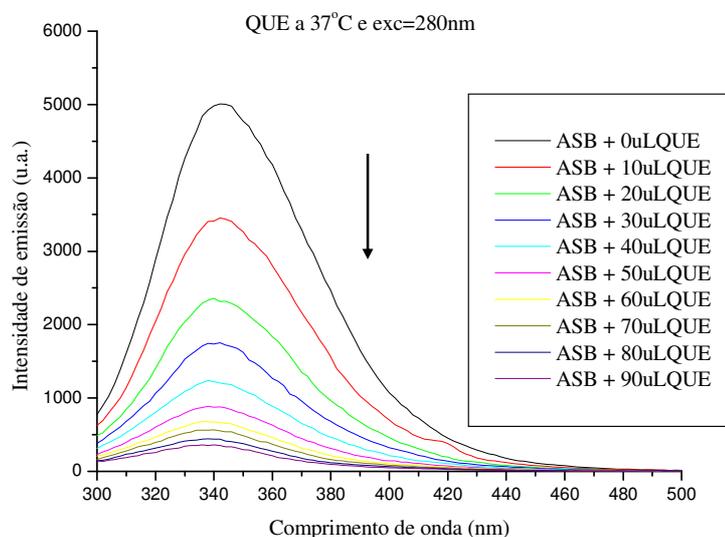


Figura 61. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 37^\circ\text{C}$.

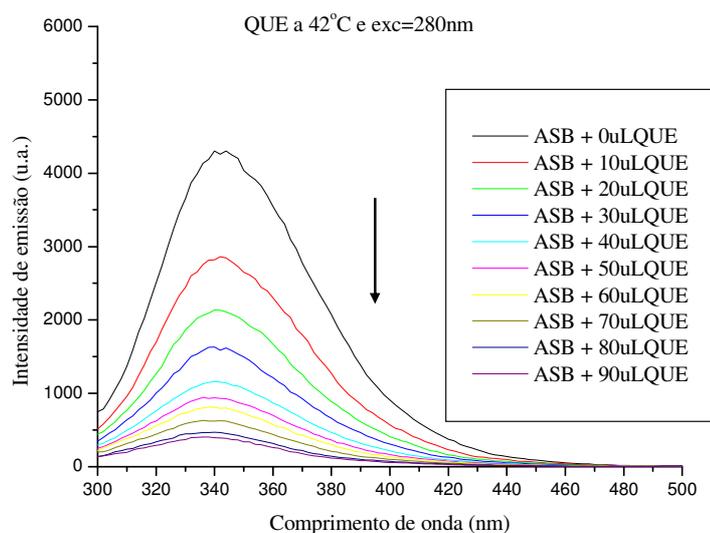


Figura 62. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{QUE} = 0; 0,34; 0,67; 1,01; 1,35; 1,69; 2,02; 2,36; 2,70$ e $3,03 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 42^\circ\text{C}$.

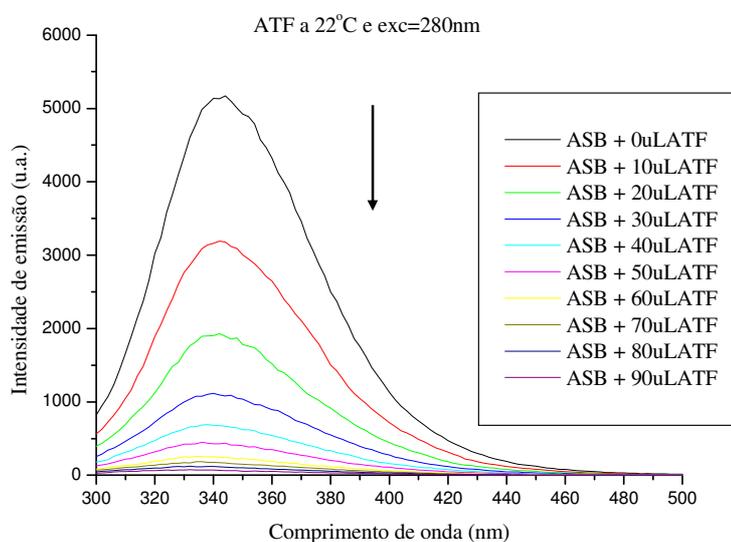


Figura 63. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 22^\circ\text{C}$.

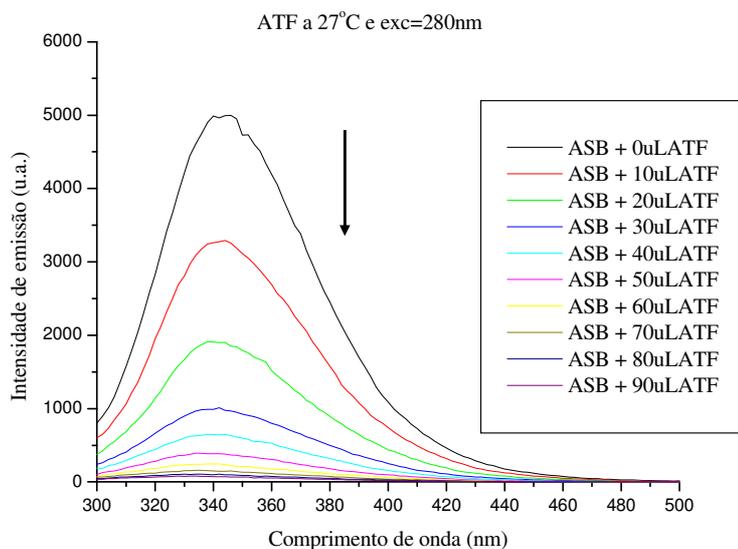


Figura 64. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 27^\circ\text{C}$.

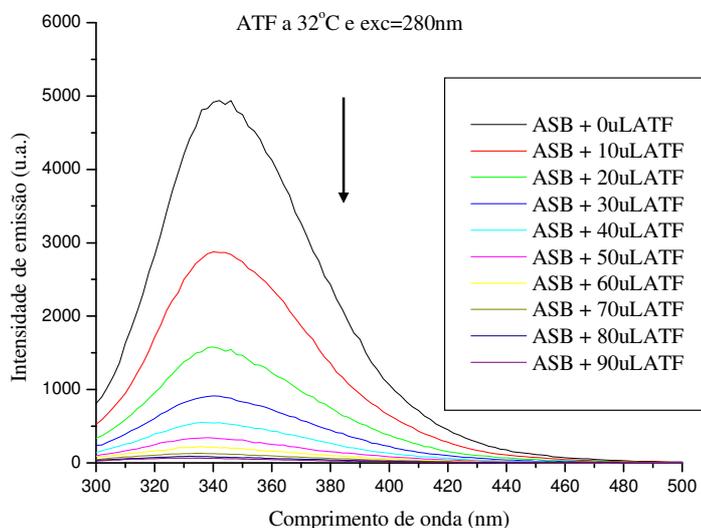


Figura 65. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 32^\circ\text{C}$.

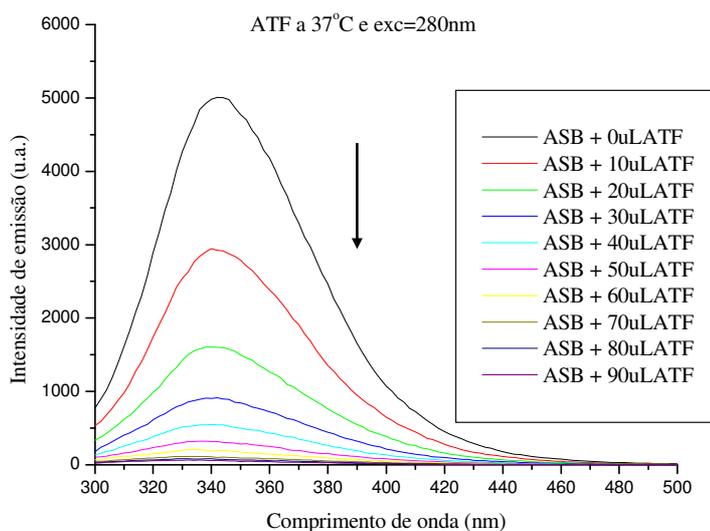


Figura 66. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 37^\circ\text{C}$.

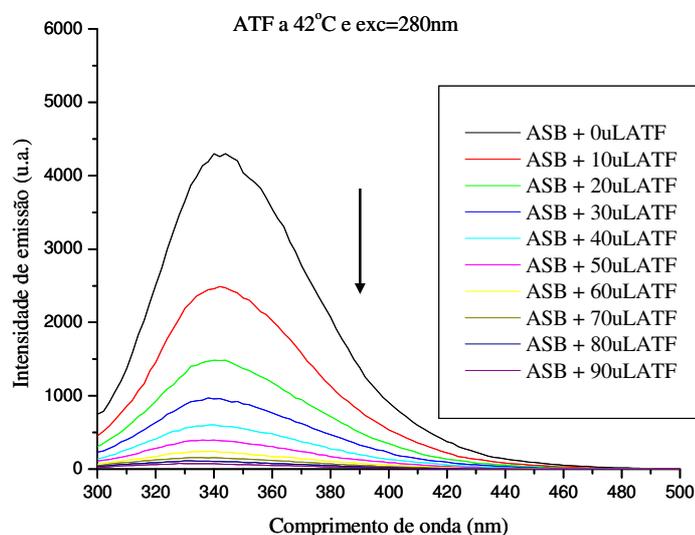


Figura 67. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{ATF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 42^\circ\text{C}$.

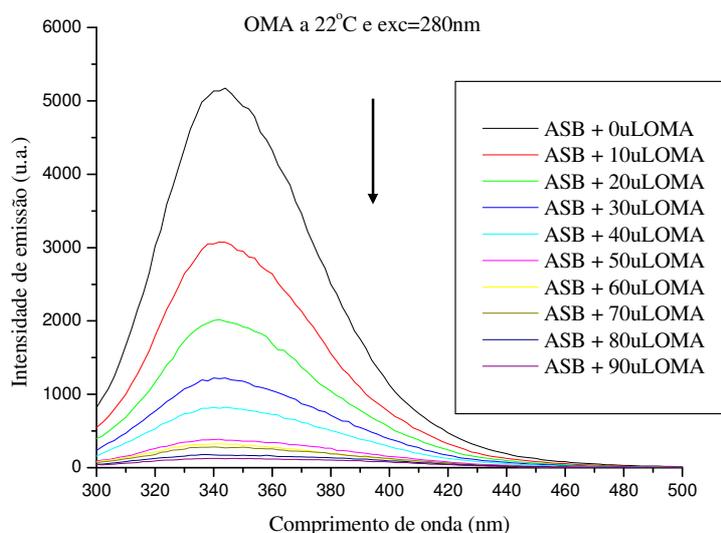


Figura 68. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 22^\circ\text{C}$.

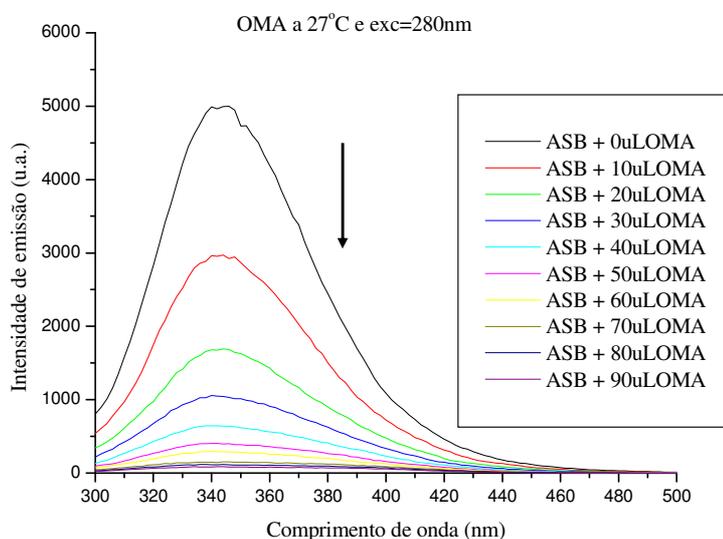


Figura 69. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 27^\circ\text{C}$.

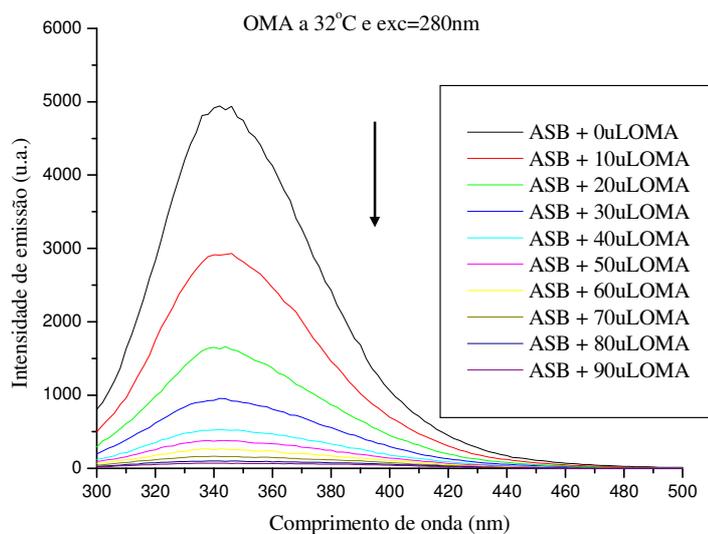


Figura 70. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilgatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 32^\circ\text{C}$.

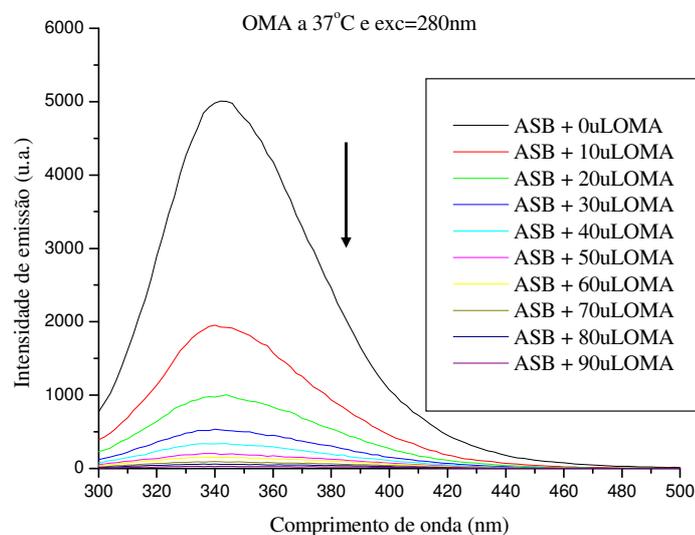


Figura 71. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilgatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 37^\circ\text{C}$.

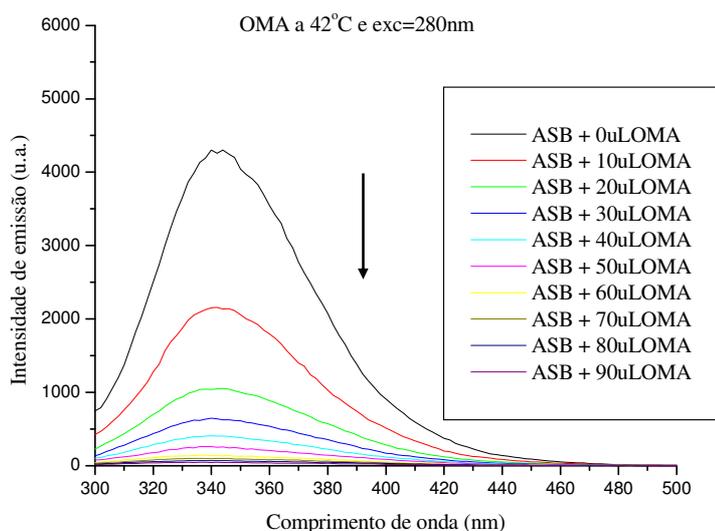


Figura 72. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-O-metilgatisflavona (OMA), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{OMA} = 0; 0,34; 0,69; 1,03; 1,37; 1,72; 2,06; 2,40; 2,74$ e $3,09 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 42^\circ\text{C}$.

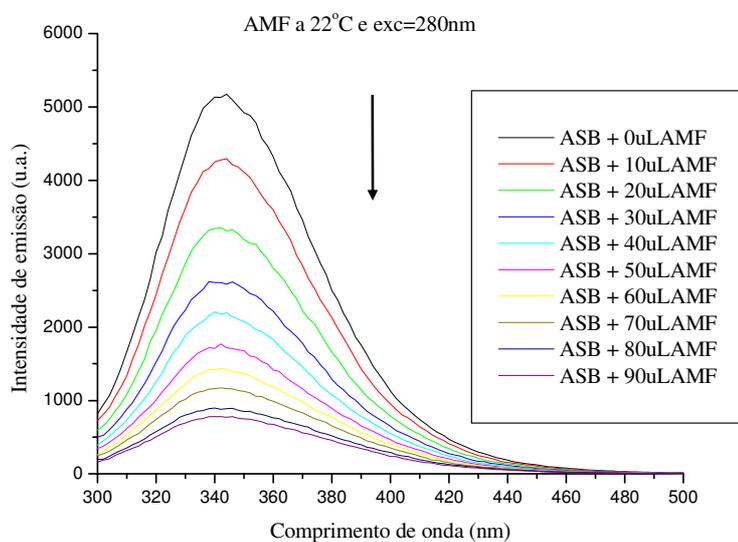


Figura 73. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 22^\circ\text{C}$.

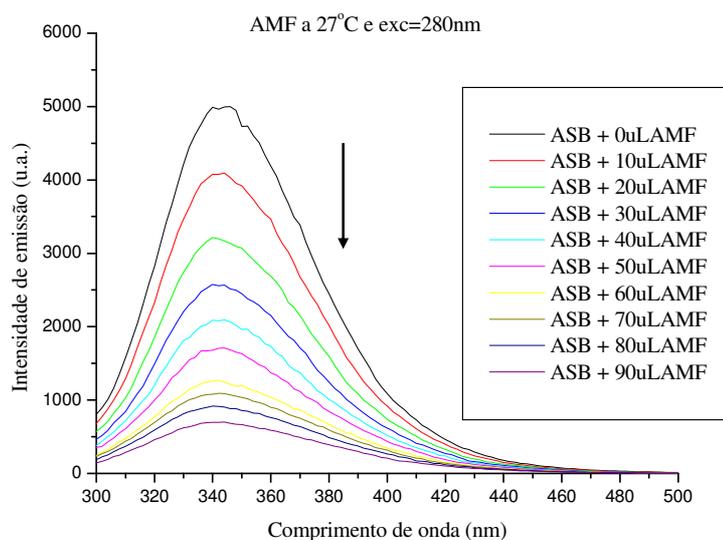


Figura 74. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 27^\circ\text{C}$.

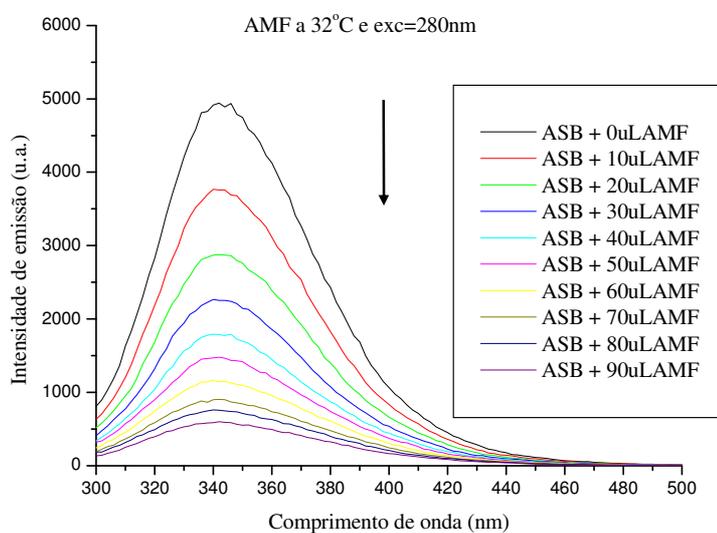


Figura 75. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (\times 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 32^\circ\text{C}$.

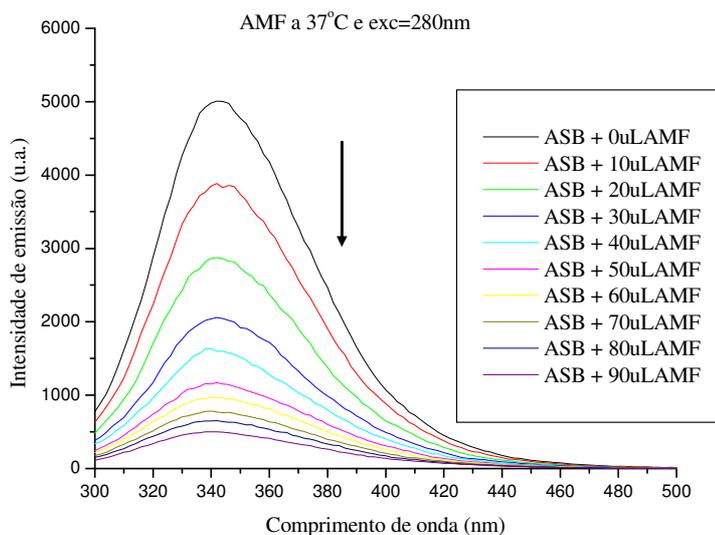


Figura 76. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 37^\circ\text{C}$.

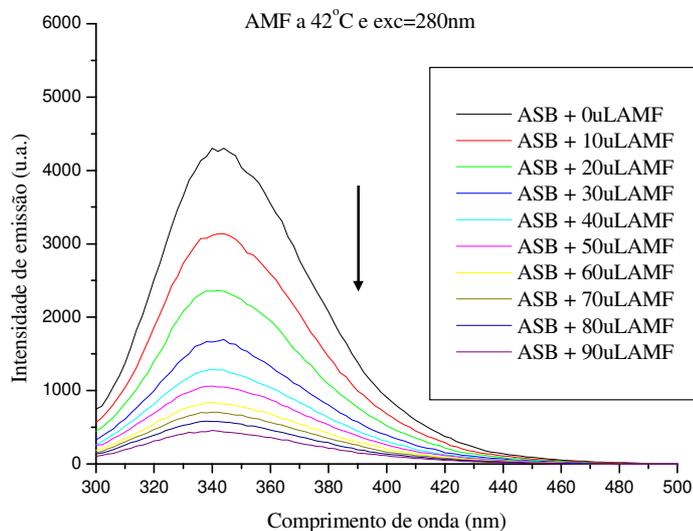


Figura 77. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{AMF} = 0; 0,33; 0,67; 1,00; 1,33; 1,67; 2,00; 2,33; 2,66$ e $3,00 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 42^\circ\text{C}$.

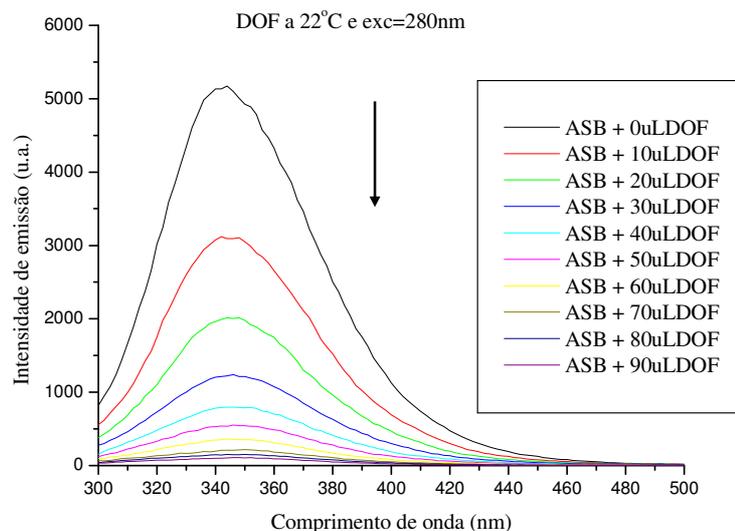


Figura 78. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochalcona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 22^\circ\text{C}$.

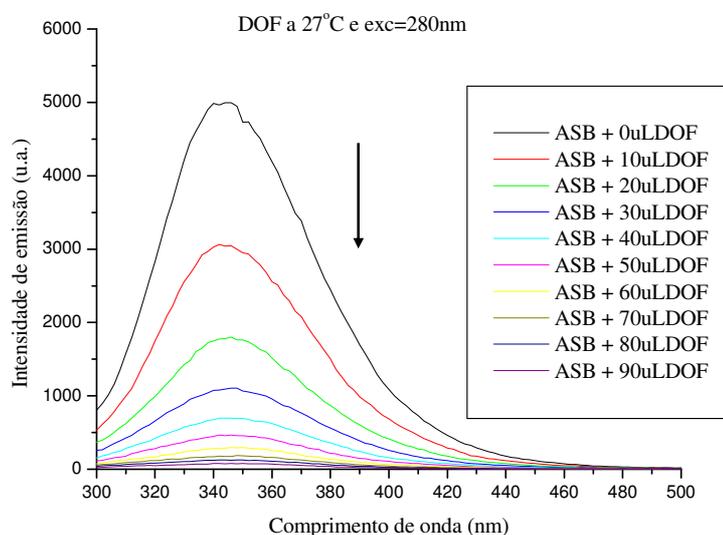


Figura 79. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochalcona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 27^\circ\text{C}$.

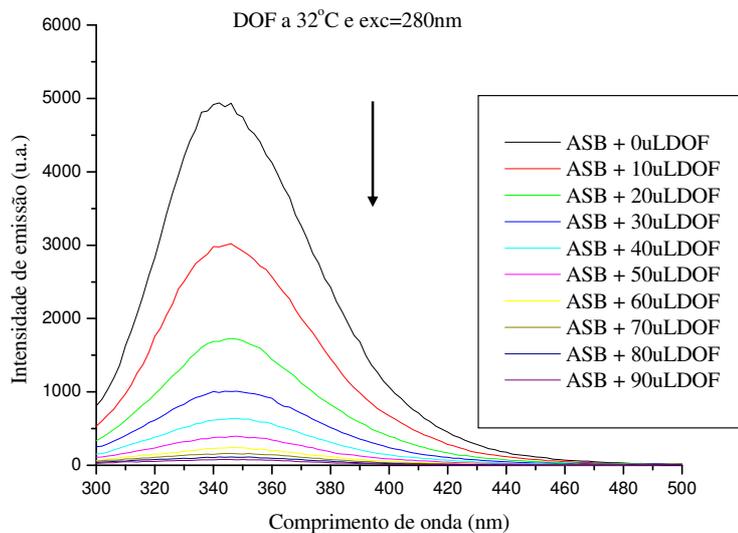


Figura 80. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochalcona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 32^\circ\text{C}$.

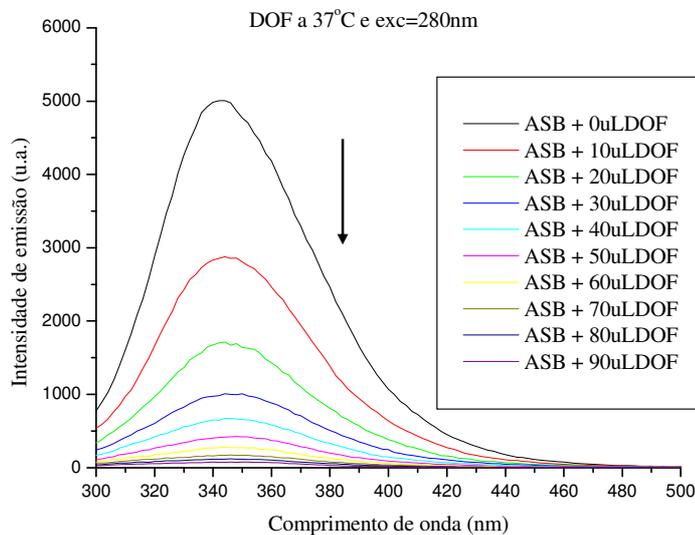


Figura 81. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochalcona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 37^\circ\text{C}$.

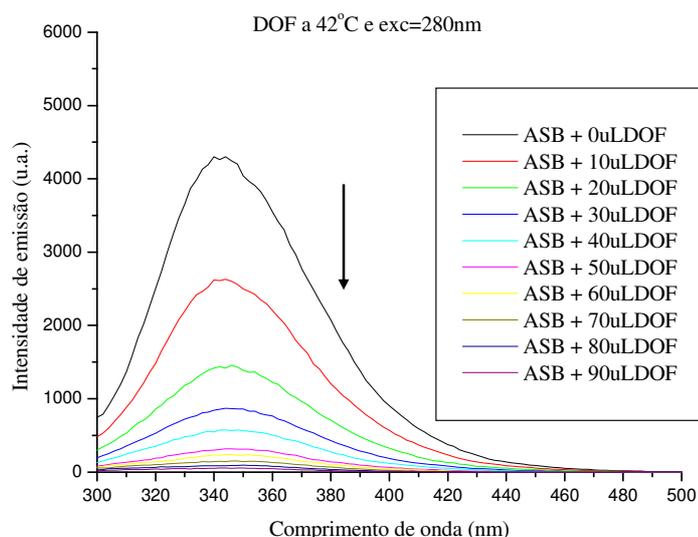


Figura 82. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{DOF} = 0; 0,35; 0,70; 1,05; 1,40; 1,75; 2,10; 2,45; 2,80$ e $3,15 (x 10^{-5}) \text{ mol/L}$, a $T = 42^\circ\text{C}$.

Os espectros de emissão de fluorescência resultantes da interação entre ASB e os flavonóides sob estudo, nas temperaturas de 22°C , 27°C , 32°C , 37°C e 42°C , (Figuras 58-82) mostraram a presença de uma forte emissão de fluorescência (intensidade de emissão de fluorescência máxima) da albumina (ASB) entre 341 e 346 nm ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$), o que indica que a posição de interação entre os flavonóides 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 dos flavonóides não deve mudar a polaridade do microambiente hidrofóbico ao redor do triptofano na ASB [Cheng *et al.* (2009)]. Com o aumento da concentração dos flavonóides ocorreu 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) e Li *et al.* (2009)] 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 flavonóides [Li *et al.* (2009)], ou seja, ASB pura (livre), o cromóforo da ASB está localizado em um ambiente mais hidrofóbico após a adição de flavonóides [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 flavonóides e ASB se dar em ambiente mais 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 mais hidrofóbico, tornando a polaridade ao redor do triptofano mais hidrofóbica, reduzindo a polaridade do ambiente ao redor do ligante (flavonóides) [Cui *et al.* (2007), He *et al.* (2006) e Li *et al.* (2009)]. Existem casos na literatura, onde, com o aumento da concentração do fármaco na solução de albumina, ocorre um leve deslocamento para o vermelho [Shi *et al.* (2007), Tang *et al.* (2006) e Yue *et al.* (2008)] na emissão da albumina, sugerindo que a fármaco se ligue à cavidade hidrofóbica da albumina, resultando em uma perda estrutural da albumina, em 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 fármaco suprime a fluorescência de ASB durante a complexação.

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)].

O processo de supressão pode seguir dois tipos de mecanismos: estático ou dinâmico. Após a obtenção experimental dos espectros de emissão de fluorescência da albumina nas diferentes temperaturas, foram calculadas as constantes envolvidas nesse processo de supressão da fluorescência da ASB, que podem então, claramente indicar se o processo de supressão é estático ou dinâmico [Chen *et al.* (1990) e Yue *et al.* (2008)]. A alta temperatura, os resultados das constantes de velocidade são mais distantes da difusão e é mais difícil ocorrer supressão colisional, o que levará, tipicamente, à dissociação de complexos fracamente ligados. Além disso, quando a constante de supressão aumenta com o aumento da temperatura, a supressão é dinâmica, e quando a constante de supressão diminui com o aumento da temperatura, a supressão é estática [Yue *et al.* (2008)]. Quando a constante de velocidade não é influenciada pela temperatura, as colisões devem diminuir.

O possível mecanismo de supressão pode ser interpretado a partir 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)]. 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 flavonóides foram obtidas a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer (Equação 10 [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 (τ_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 pelos flavonóides, a diferentes temperaturas (22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C), estão mostrados nas Figuras 83-87. Os valores de K_{SV} e k_q estão dados nas Tabelas 10-14 e demonstram que o provável processo de supressão de ASB pela interação com os flavonóides é estático, em função dos altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão pelos flavonóides ($k_q \cong 10^{13}$ a 10^{14} L/mol.s), e pouco dependentes da temperatura (Tabelas 10-14). 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-flavonóides. 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 10. Equação para a determinação de K_{SV} , e consequentemente, k_q .

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

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

τ_0 = tempo de vida de ASB sem supressor;
 [Q] = concentração de supressor (flavonóide) ou concentração de ligante (flavonóide);
 F_0 = intensidade de emissão de fluorescência sem supressor (ASB pura);
 F = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (flavonóide).

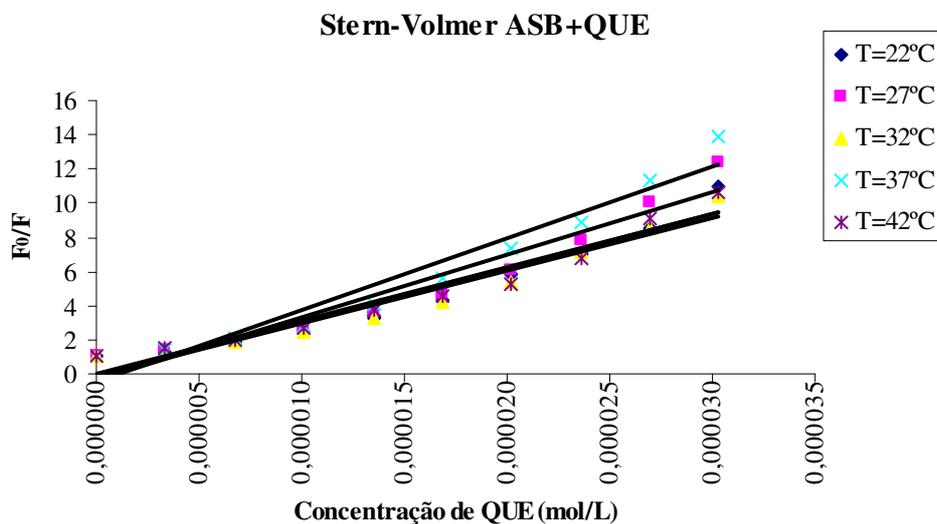


Figura 83. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina.

Tabela 10. 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) por quercetina.

Quercetina			
pH	T (°C)	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)
7,4	22	$3,18 \times 10^5$	$3,18 \times 10^{13}$
	27	$3,65 \times 10^5$	$3,65 \times 10^{13}$
	32	$3,08 \times 10^5$	$3,08 \times 10^{13}$
	37	$4,21 \times 10^5$	$4,21 \times 10^{13}$
	42	$3,11 \times 10^5$	$3,11 \times 10^{13}$

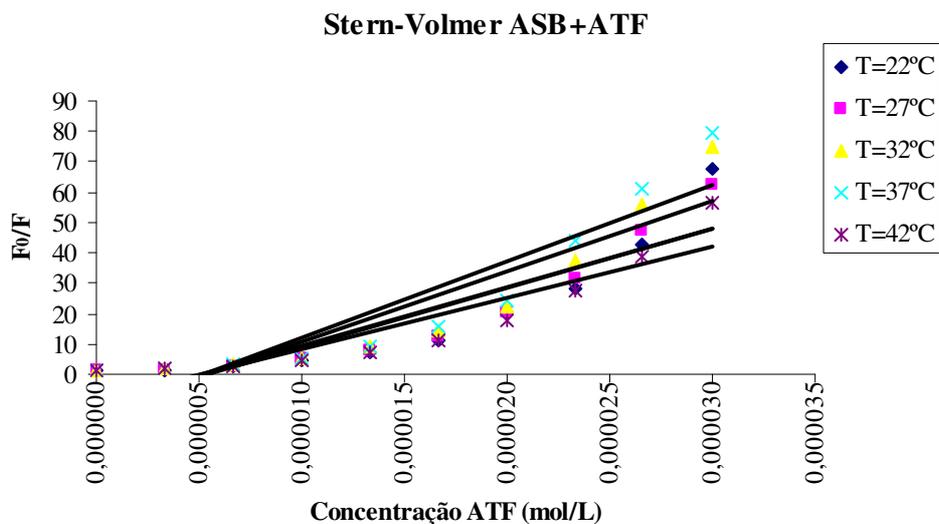


Figura 84. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona.

Tabela 11. 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) por agatisflavona.

Agatisflavona			
pH	T (°C)	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)
7,4	22	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	27	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	32	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	37	$3,00 \times 10^6$	$3,00 \times 10^{14}$
	42	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$

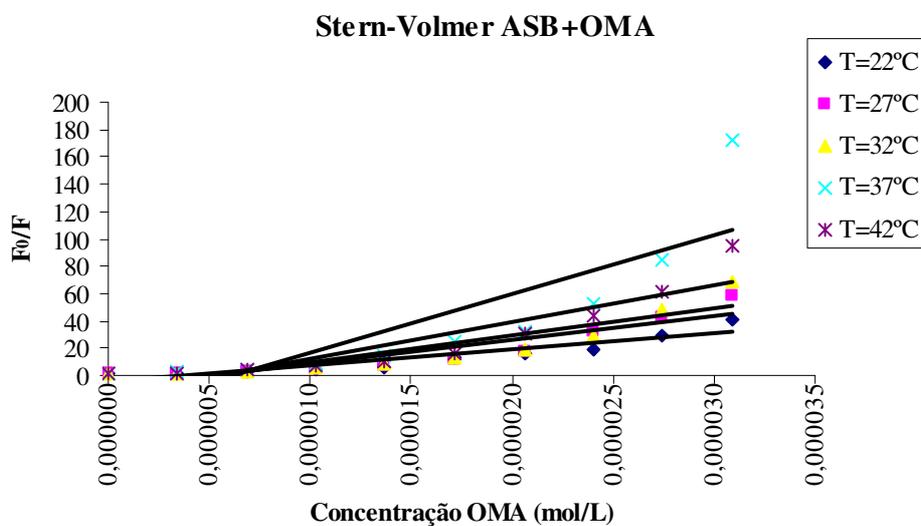


Figura 85. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona.

Tabela 12. 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) por 7''-O-metilagatisflavona.

7''-O-Metilagatisflavona			
pH	T (°C)	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)
7,4	22	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^{14}$
	27	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	32	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	37	$4,00 \times 10^6$	$4,00 \times 10^{14}$
	42	$3,00 \times 10^6$	$3,00 \times 10^{14}$

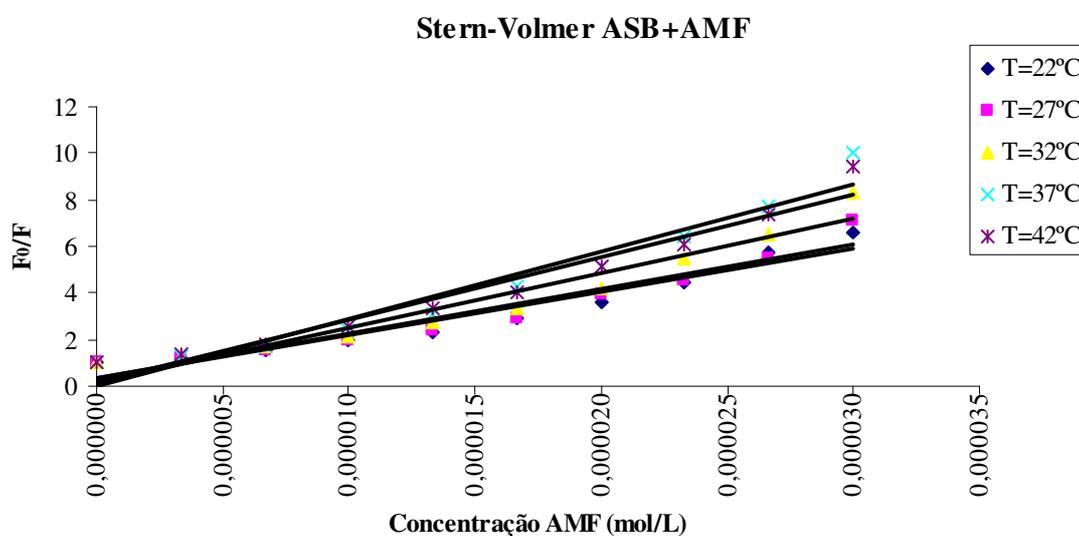


Figura 86. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona.

Tabela 13. 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) por amentoflavona.

Amentoflavona			
pH	T (°C)	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)
7,4	22	$1,86 \times 10^5$	$1,86 \times 10^{13}$
	27	$1,94 \times 10^5$	$1,94 \times 10^{13}$
	32	$2,32 \times 10^5$	$2,32 \times 10^{13}$
	37	$2,89 \times 10^5$	$2,89 \times 10^{13}$
	42	$2,69 \times 10^5$	$2,69 \times 10^{13}$

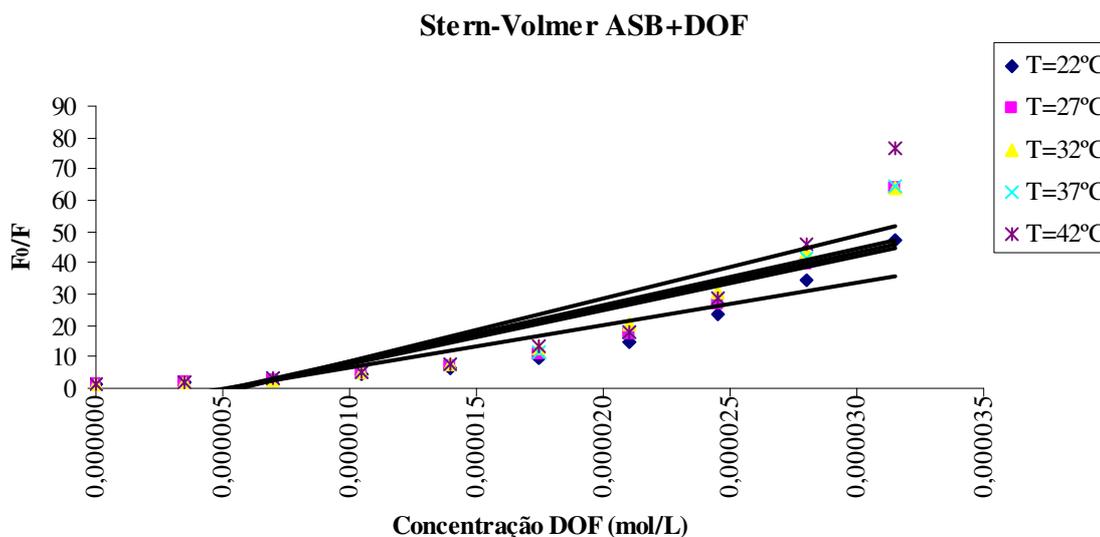


Figura 87. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochalcona.

Tabela 14. 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) por diidrochalcona.

Diidrochalcona			
pH	T (°C)	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)
7,4	22	$1,00 \times 10^6$	$1,00 \times 10^{14}$
	27	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	32	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	37	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$
	42	$2,00 \times 10^6$	$2,00 \times 10^{14}$

As constantes de supressão efetivas para os fluoróforos acessíveis, ou constantes de ligação de Stern-Volmer modificadas (K_a), foram obtidas a partir da construção de gráficos de Stern-Volmer modificados (Equação 11 [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 nas Figuras 88-92. Os valores de K_a encontrados na presença dos flavonóides ($K_a \cong 10^4$ a 10^5 L/mol) estão apresentados na Tabela 15, e deixam claro que os flavonóides 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) para fortes interações entre fármacos e albumina [He *et al.* (2005), Tang *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Zhang *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

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

Equação 11. 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 (flavonóide);

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

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

F = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (flavonóide)

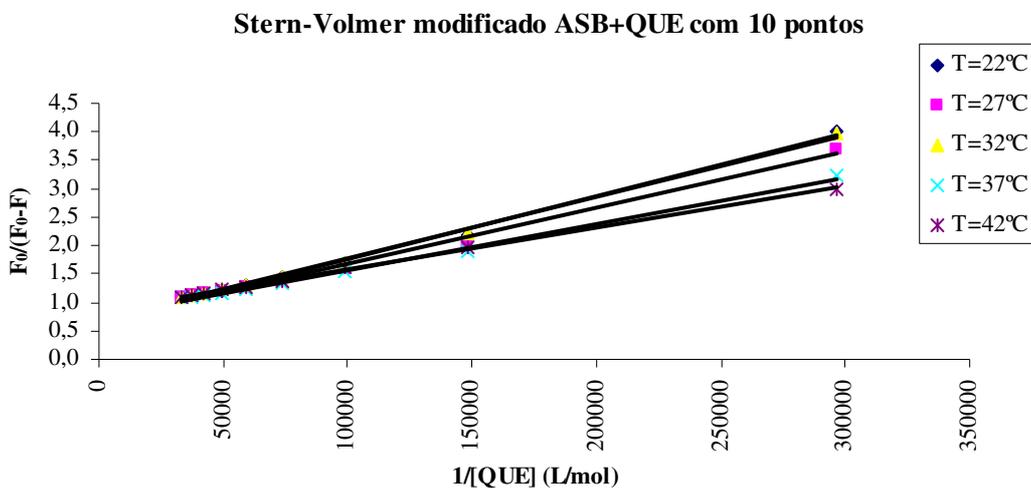


Figura 88. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) por quercetina (QUE).

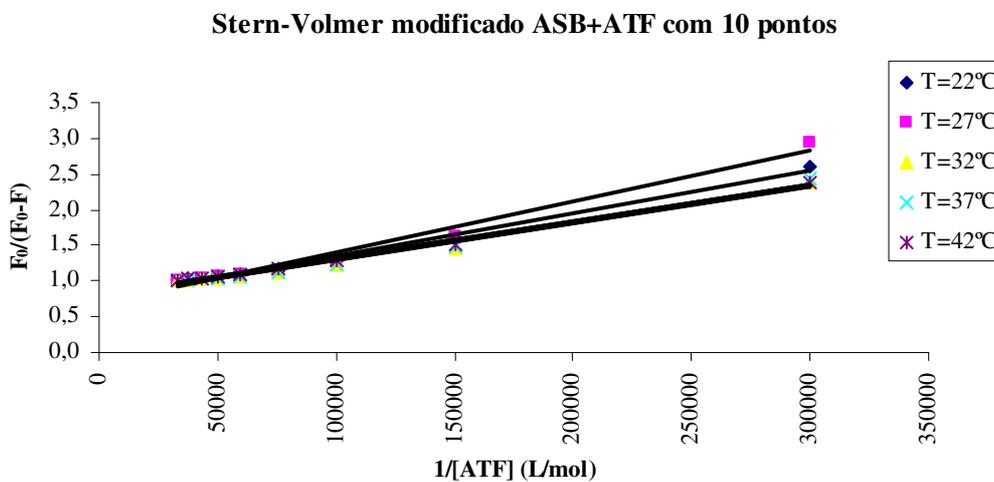


Figura 89. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$) por agatisflavona (ATF).

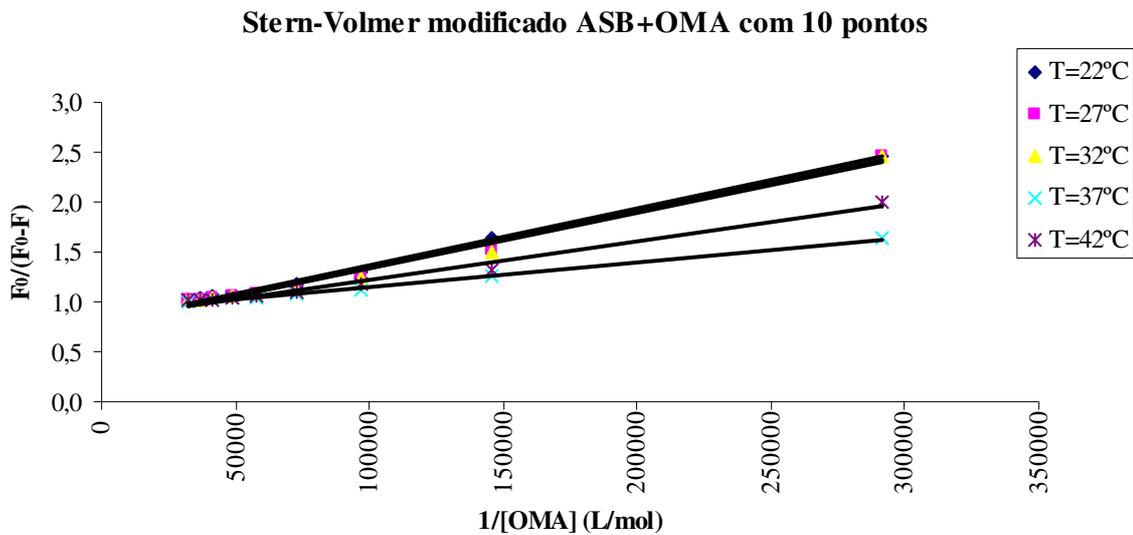


Figura 90. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) por 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA).

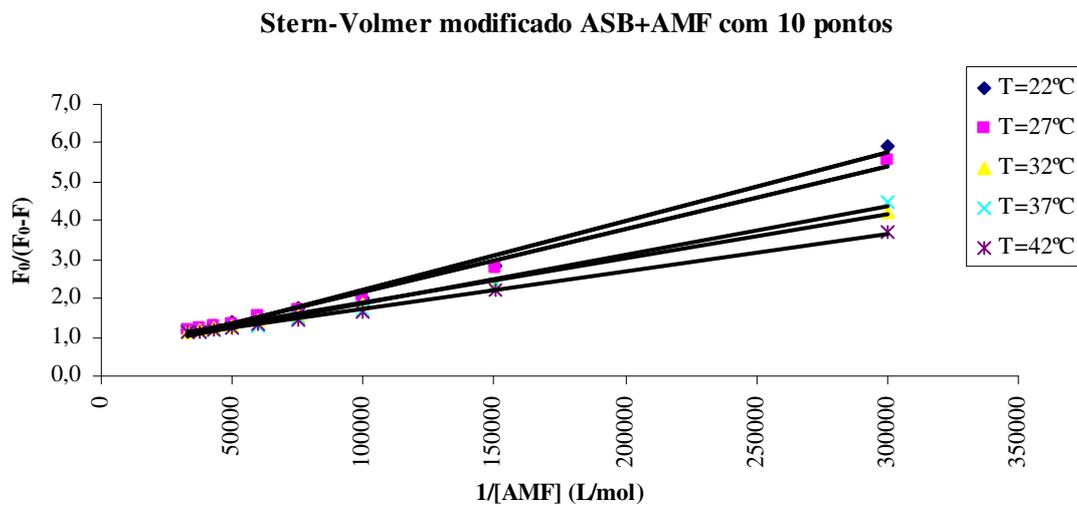


Figura 91. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) por amentoflavona (AMF).

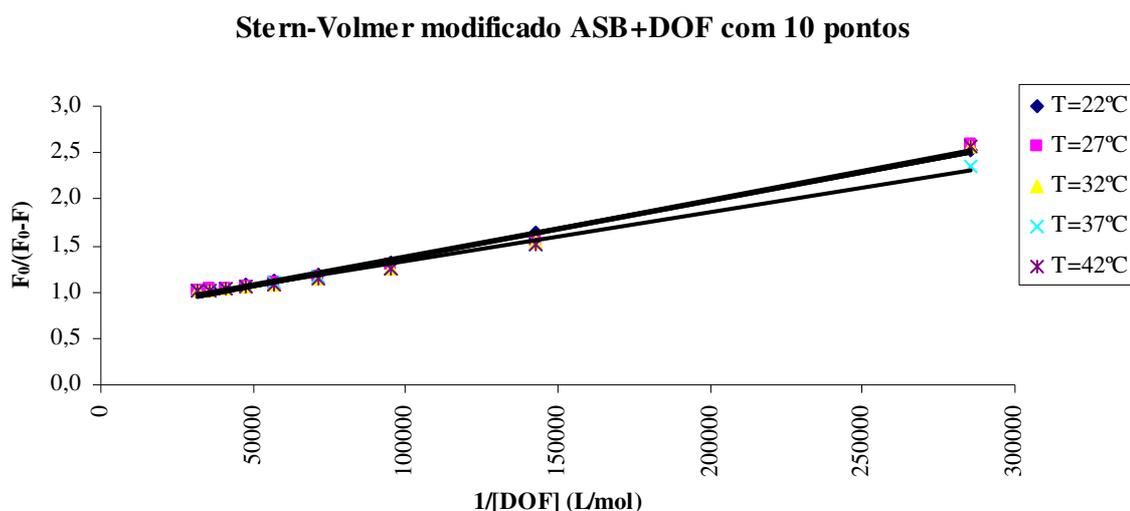


Figura 92. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) por diidrochnaflavona (DOF).

Tabela 15. Valores de K_a obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pelos flavonóides.

pH	T (°C)	QUE	ATF	OMA	AMF	DOF
		K_a (L/mol)	K_a (L/mol)	K_a (L/mol)	K_a (L/mol)	K_a (L/mol)
7,4	22	$6,60 \times 10^4$	$1,25 \times 10^5$	$1,33 \times 10^5$	$2,33 \times 10^4$	$1,32 \times 10^5$
	27	$6,93 \times 10^4$	$9,61 \times 10^4$	$1,30 \times 10^5$	$2,67 \times 10^4$	$1,27 \times 10^5$
	32	$6,83 \times 10^4$	$1,56 \times 10^5$	$1,28 \times 10^5$	$7,25 \times 10^4$	$1,25 \times 10^5$
	37	$9,44 \times 10^4$	$1,53 \times 10^5$	$4,54 \times 10^5$	$5,92 \times 10^4$	$1,61 \times 10^5$
	42	$1,24 \times 10^5$	$1,61 \times 10^5$	$2,11 \times 10^5$	$7,55 \times 10^4$	$1,25 \times 10^5$

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)]. Com este propósito, a variação da constante de ligação foi estudada em função da temperatura a partir do qual parâmetros termodinâmicos foram calculados baseados na dependência da constante de ligação (para a ligação flavonóides-ASB) com a temperatura.

Através dos valores de K_a encontrados para a supressão de ASB foram construídos gráficos de van't Hoff modificados (van't Hoff do Stern-Volmer modificado), Equação 12 [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)] e Figuras 93-97, a partir dos quais foi feita a determinação dos parâmetros termodinâmicos envolvidos no processo de supressão da ASB, ou seja, foram obtidos valores de variação de entalpia (ΔH^0) e de entropia (ΔS^0) e, a partir deles, foram calculados os valores de variação de energia livre de Gibbs (ΔG^0), Tabelas 16-20. As temperaturas de 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C foram escolhidas, pois a albumina sérica bovina (ASB) não apresenta qualquer degradação estrutural nestas temperaturas.

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

Equação 12. Equações para a obtenção dos valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 .

Onde: ΔH^0 = variação de entalpia;

ΔS^0 = variação de entropia;

ΔG^0 = variação de energia livre de Gibbs;

T = temperatura absoluta (em K);

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

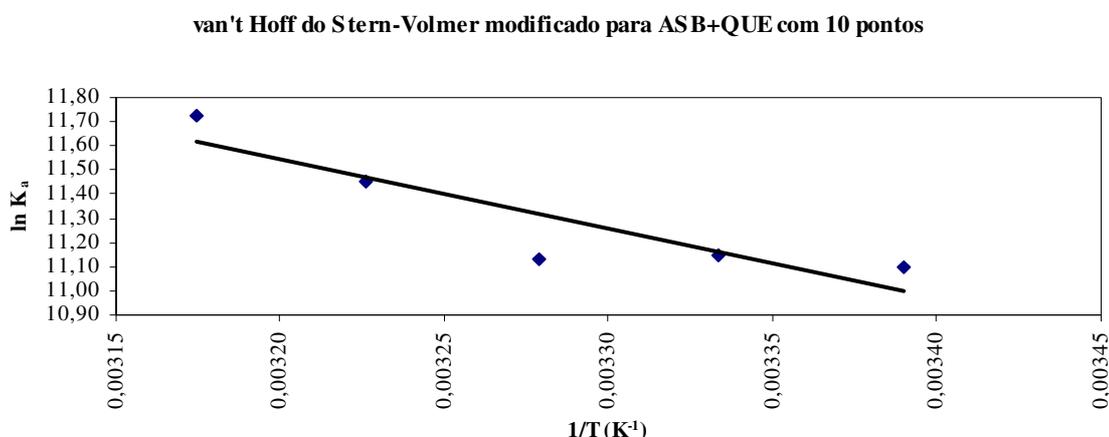


Figura 93. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina (QUE).

Tabela 16. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina.

Quercetina (QUE)					
pH	T (°C)	K_a (L/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)	ΔG^0 (kJ/mol)
7,4	22	6,60 x 10 ⁴	24,0158	172,8231	-26,9670
	27	6,93 x 10 ⁴			-27,8311
	32	6,83 x 10 ⁴			-28,6952
	37	9,44 x 10 ⁴			-29,5593
	42	1,24 x 10 ⁵			-30,4235

van't Hoff do Stern-Volmer modificado para ASB+ATF com 10 pontos

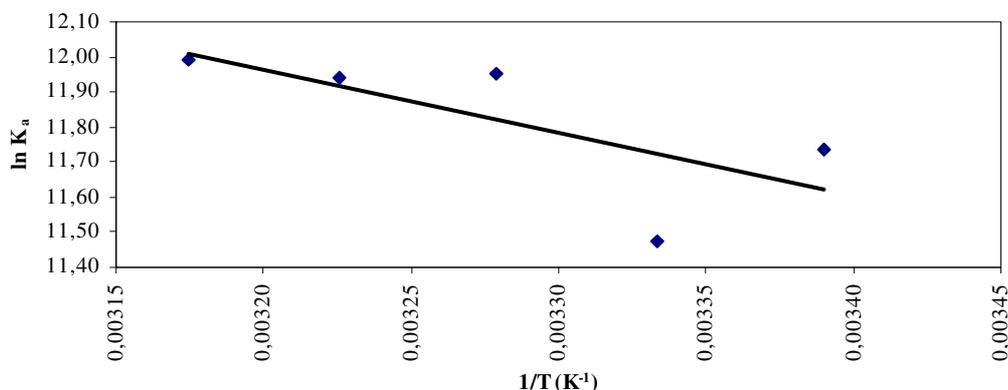


Figura 94. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona (ATF).

Tabela 17. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona.

Agatisflavona (ATF)					
pH	T (°C)	K_a (L/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)	ΔG^0 (kJ/mol)
7,4	22	$1,25 \times 10^5$	15,0957	147,7730	-28,4973
	27	$9,61 \times 10^4$			-29,2362
	32	$1,56 \times 10^5$			-29,9750
	37	$1,53 \times 10^5$			-30,7139
	42	$1,61 \times 10^5$			-31,4528

van't Hoff do Stern-Volmer modificado para ASB+OMA com 10 pontos

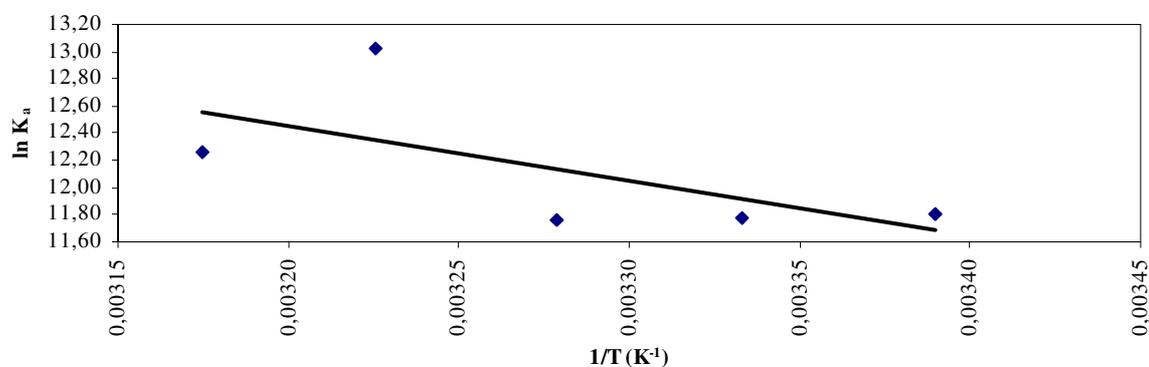


Figura 95. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona (OMA).

Tabela 18. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona.

7''-O-Metilagatisflavona (OMA)					
pH	T (°C)	K_a (L/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)	ΔG^0 (kJ/mol)
7,4	22	1,33 x 10 ⁵	33,6750	211,2671	-28,6488
	27	1,30 x 10 ⁵			-29,7051
	32	1,28 x 10 ⁵			-30,7614
	37	4,54 x 10 ⁵			-31,8178
	42	2,11 x 10 ⁵			-32,8741

van't Hoff do Stern-Volmer modificado para ASB+AMF com 10 pontos

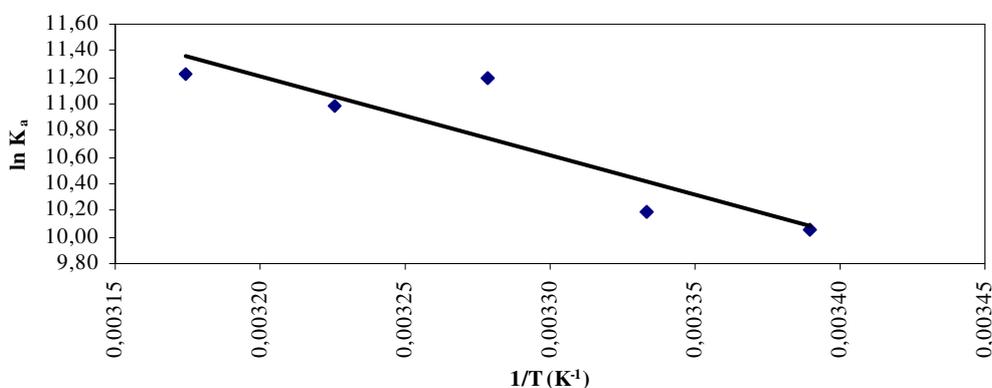


Figura 96. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona (AMF).

Tabela 19. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona.

Amentoflavona (AMF)					
pH	T (°C)	K_a (L/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)	ΔG^0 (kJ/mol)
7,4	22	2,33 x 10 ⁴	48,9395	249,7609	-24,7399
	27	2,67 x 10 ⁴			-25,9887
	32	7,25 x 10 ⁴			-27,2375
	37	5,92 x 10 ⁴			-28,4863
	42	7,55 x 10 ⁴			-29,7351

van't Hoff do Stern-Volmer modificado para ASB+DOF com 10 pontos

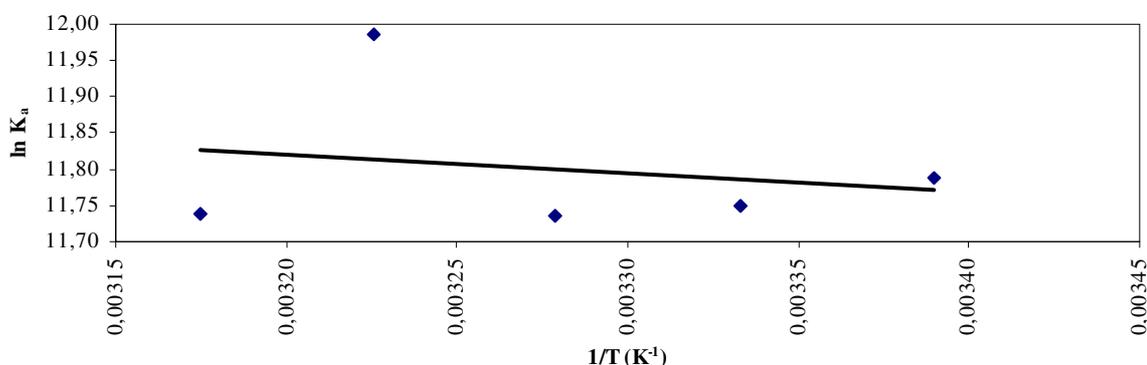


Figura 97. Gráfico de van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochonaflavona (DOF).

Tabela 20. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de van't Hoff modificados para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochonaflavona.

Diidrochonaflavona (DOF)					
pH	T (°C)	K _a (L/mol)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)	ΔG^0 (kJ/mol)
7,4	22	$1,32 \times 10^5$	2,1902	105,2802	-28,8675
	27	$1,27 \times 10^5$			-29,3939
	32	$1,25 \times 10^5$			-29,9203
	37	$1,61 \times 10^5$			-30,4467
	42	$1,25 \times 10^5$			-30,9731

Para interação fármaco-proteína, valores positivos de ΔS^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 fármaco-proteína, valores de ΔS^0 positivos e de ΔH^0 negativos indicam que os processos de ligação ocorrem entropicamente. Para interações tipicamente hidrofóbicas, os valores de ΔS^0 e de ΔH^0 são positivos, enquanto que valores de ΔS^0 e de ΔH^0 negativos, indicam que a ligação fármaco-proteína é principalmente comandada pela entalpia e a entropia é desfavorável para a ligação, apontando para interações por forças de van der Waals e formação de ligação hidrogênio em um meio dielétrico baixo [Ross e Subramanian (1981), Yue *et al.* (2008) e Cheng *et al.* (2009)]. Além disso, interações eletrostáticas específicas entre espécies iônicas e soluções aquosas são caracterizadas por um valor de ΔS^0 positivo e um pequeno valor de ΔH^0 negativo [Yue *et al.* (2008) e Li *et al.* (2009)].

Os valores de ΔH^0 positivos, em todos os casos, mostraram que o processo de ligação dos flavonóides com a ASB foi endotérmico (Tabelas 16-20). Os valores de ΔS^0 positivos evidenciaram que o tipo de interação entre os flavonóides e a ASB foi hidrofóbico, e os valores de ΔG^0 negativos ($\Delta G^0 \cong -24$ a -32 kJ/mol) demonstraram a espontaneidade de ligação dos flavonóides com a ASB (Tabelas 16-20). Os valores de ΔS^0 e de ΔH^0 positivos, indicam que a interação entre ASB e os flavonóides foi hidrofóbica (Tabelas 16-20). Não é possível

contabilizar parâmetros termodinâmicos de compostos de coordenação flavonóides-ASB baseado, simplesmente, em um modelo de força intermolecular. A ligação de flavonóides a ASB pode envolver uma interação fortemente hidrofóbica, evidenciada pelos valores positivos de ΔS^0 (grande contribuição de ΔS^0), tendo pouca contribuição de ΔH^0 . Consequentemente, a principal interação é o contato hidrofóbico, mas a interação eletrostática também não pode ser excluída.

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 13 [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 mostrado nas Figuras 98-102 e Tabela 21. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 21, o número de sítios de ligação entre a ASB e os flavonóides, é aproximadamente igual a 1 para QUE e AMF, e aproximadamente igual a 2 para ATF, OMA e DOF. Isso indica que para QUE e AMF ($n \cong 1$) existe somente uma interação molecular entre elas e uma molécula de ASB. Já para ATF, OMA e DOF ($n \cong 2$) existem duas interações moleculares de ATF, de OMA e de DOF para uma molécula de ASB. Essas interações entre os flavonóides e a albumina (ASB) são do tipo hidrofóbica.

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

Equação 13. 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 (flavonóide);

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

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

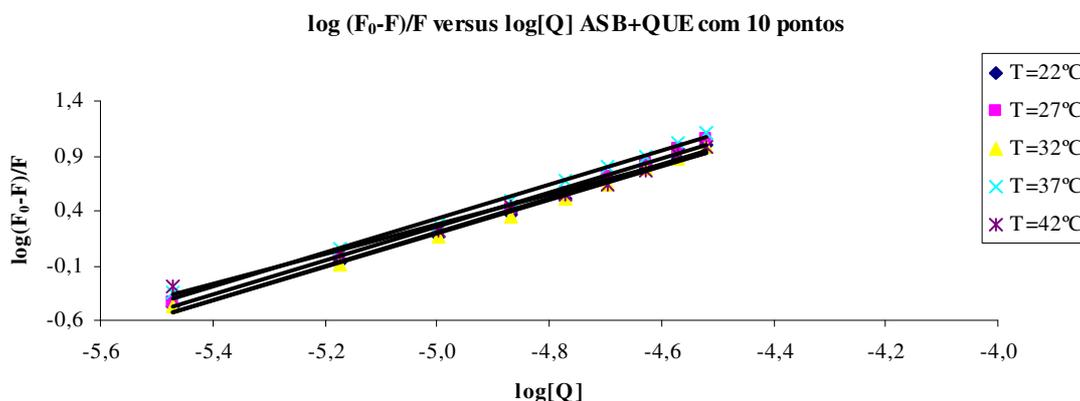


Figura 98. Gráfico de $\log(F_0 - F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por quercetina (QUE).

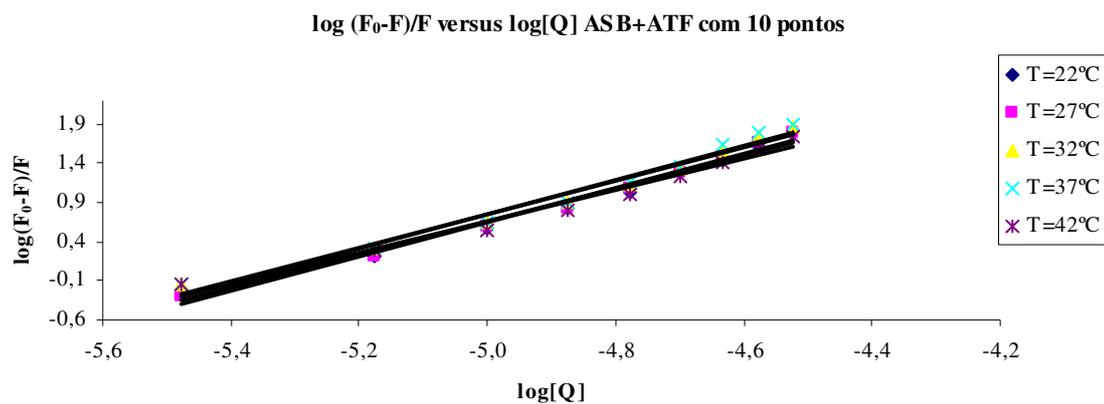


Figura 99. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por agatisflavona (ATF).

Figura 100. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por 7''-O-metilagatisflavona (OMA).

Figura 101. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por amentoflavona (AMF).

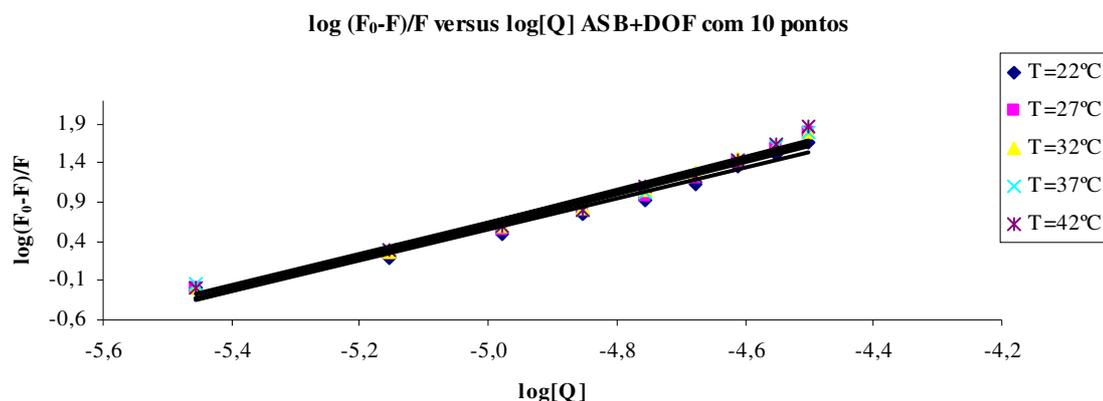


Figura 102. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por diidrochnaflavona (DOF).

Tabela 21. Valores de K_b e n obtidos a partir de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) por QUE, ATF, OMA, AMF e DOF.

		pH = 7,4				
Flavonóide		T (°C)				
		22	27	32	37	42
QUE	K_b (L/mol)	$8,18 \times 10^7$	$9,43 \times 10^7$	$6,52 \times 10^7$	$1,07 \times 10^8$	$1,09 \times 10^7$
	n	1,5422	1,5437	1,5238	1,5404	1,3539
ATF	K_b (L/mol)	$1,83 \times 10^{11}$	$4,67 \times 10^{11}$	$2,55 \times 10^{11}$	$5,56 \times 10^{11}$	$3,71 \times 10^{10}$
	n	2,1213	2,2038	2,1332	2,1979	1,9820
OMA	K_b (L/mol)	$1,03 \times 10^{10}$	$6,73 \times 10^{10}$	$1,12 \times 10^{11}$	$1,29 \times 10^{11}$	$1,20 \times 10^{11}$
	n	1,8866	2,0356	2,0739	2,0269	2,0503
AMF	K_b (L/mol)	$2,94 \times 10^7$	$2,81 \times 10^7$	$1,58 \times 10^7$	$8,36 \times 10^7$	$1,78 \times 10^7$
	n	1,4952	1,4883	1,4170	1,5512	1,4100
DOF	K_b (L/mol)	$2,23 \times 10^{10}$	$7,89 \times 10^{10}$	$1,28 \times 10^{11}$	$4,89 \times 10^{10}$	$1,61 \times 10^{11}$
	n	1,9586	2,0599	2,0952	2,0101	2,1144

Os resultados encontrados para os valores de K_b e n mostraram (Figuras 98-102 e Tabela 21), mais uma vez, pouquíssima dependência com a temperatura e, além disso, o número de sítios de ligação (n) foi um pouco maior para agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA) e diidrochnaflavona (DOF), indicando uma maior disponibilidade para o processo de interação entre ASB e esses flavonóides, ou seja, maior facilidade para a formação dos complexos ASB-ATF, ASB-OMA e ASB-DOF. De uma maneira geral, os valores de K_b e n indicam que o provável mecanismo de supressão de fluorescência de ASB por flavonóides é estático, pois não houve uma relação com o aumento da temperatura.

O fenômeno de transferência de energia tem muitas aplicações em processos de conversão de energia. A ação fotodinâmica, que é frequentemente usada no tratamento de câncer, é também uma consequência de transferência de energia [Bapistha e Indig (1998), Kandagal *et al.* (2006), Li *et al.* (2007), Yue *et al.* (2008), Zhang *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009), Qing *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)]. A distância entre o resíduo de triptofano (doador) e o fármaco (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 os flavonóides foi verificado a partir da sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência da supressão de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) a diferentes temperaturas (T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C) e os espectros de absorção UV/visível dos flavonóides, Figuras 103-127. Os valores da integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASB) com o espectro de absorção do acceptor (flavonóide) (J) foram calculados de acordo com a Equação 14 [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 acceptor (flavonóide) para uma concentração de ASB igual a de flavonóides ([ASB] = [flavonóides] = $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L) estão mostradas nas Figuras 103-127.

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

Equação 14. 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)] dos flavonóides.

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

F(λ) = intensidade de fluorescência do doador (ASB) em um comprimento de onda λ ;

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

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

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

A Equação 15 [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 acceptor (flavonóide), 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 acceptor (flavonóide) (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 acceptor, 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)].

$$R_0^6 = 8,8 \times 10^{-25} K^2 N^{-4} \Phi J \quad \left. \begin{array}{l} K^2 = 2/3 \\ N = 1,336 \\ \phi = 0,15 \end{array} \right\} \text{ASB}$$

Equação 15. Equação para o cálculo da distância crítica entre a ASB e os flavonóides, 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 (flavonóide) (doador e aceptor são livres para assumir qualquer orientação, $K^2 = 2/3$);

N = índice de refração do meio;

ϕ = 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 (flavonóide);

R_0 = distância crítica entre o doador (ASB) e o aceptor (flavonóide), 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 (flavonóide) (E) foi usada a Equação 16 [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 (flavonóide) ou distância de ligação entre doador (ASB) e aceptor (flavonóide) (r). Os valores de J , R_0 , E e r calculados estão apresentados nas Tabelas 22-26.

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

Equação 16. Equações para o cálculo da distância entre o triptofano da ASB e os flavonóides [Sklar *et al.* (1977) e Yue *et al.* (2008)].

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

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

F = intensidade de emissão de fluorescência com supressor (flavonóide);

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

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

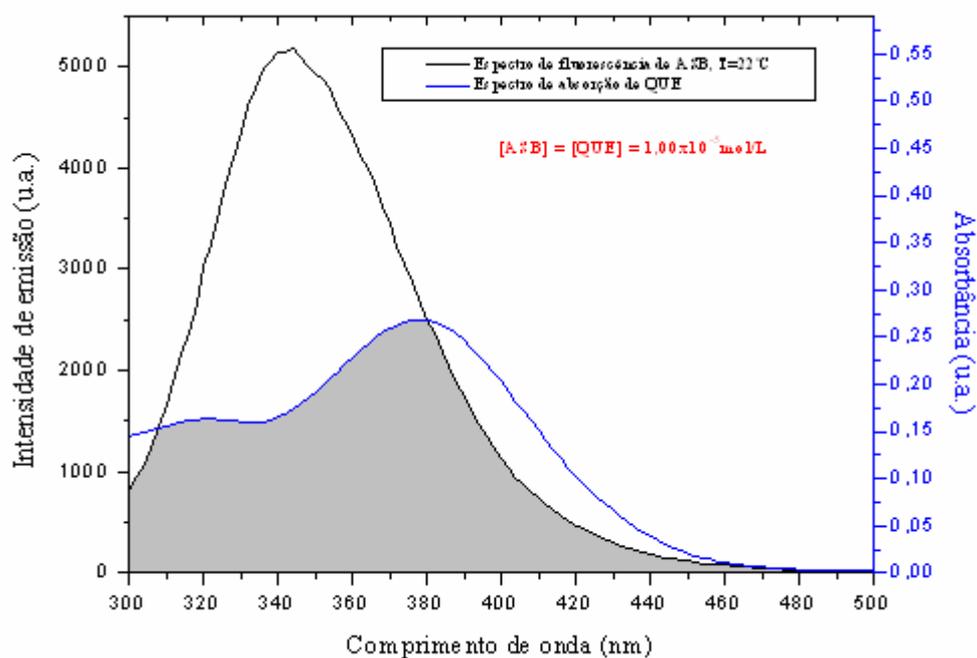


Figura 103. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de quercetina. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{QUE}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

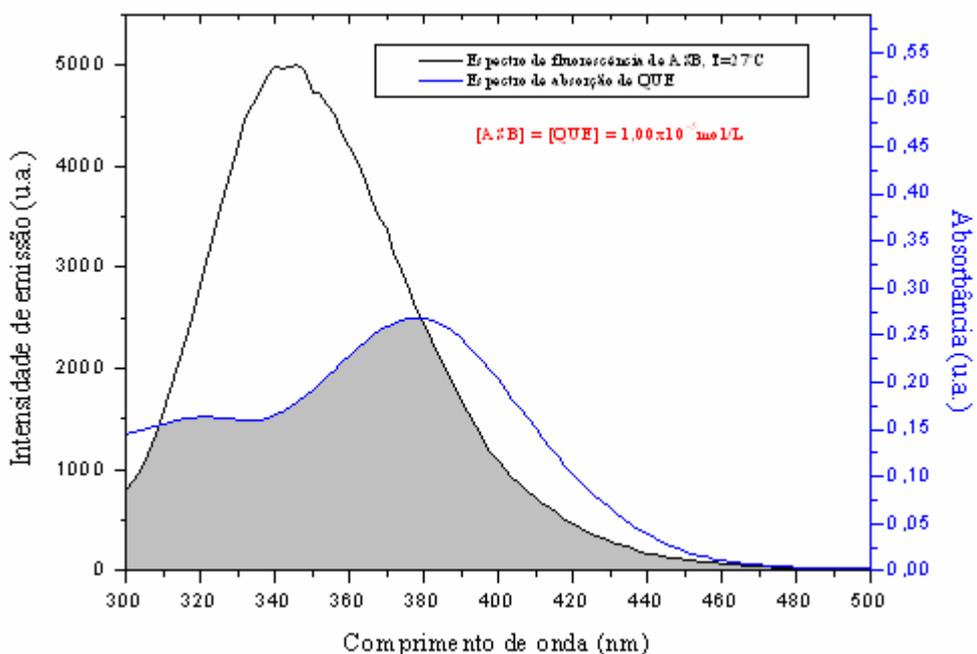


Figura 104. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de quercetina. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{QUE}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

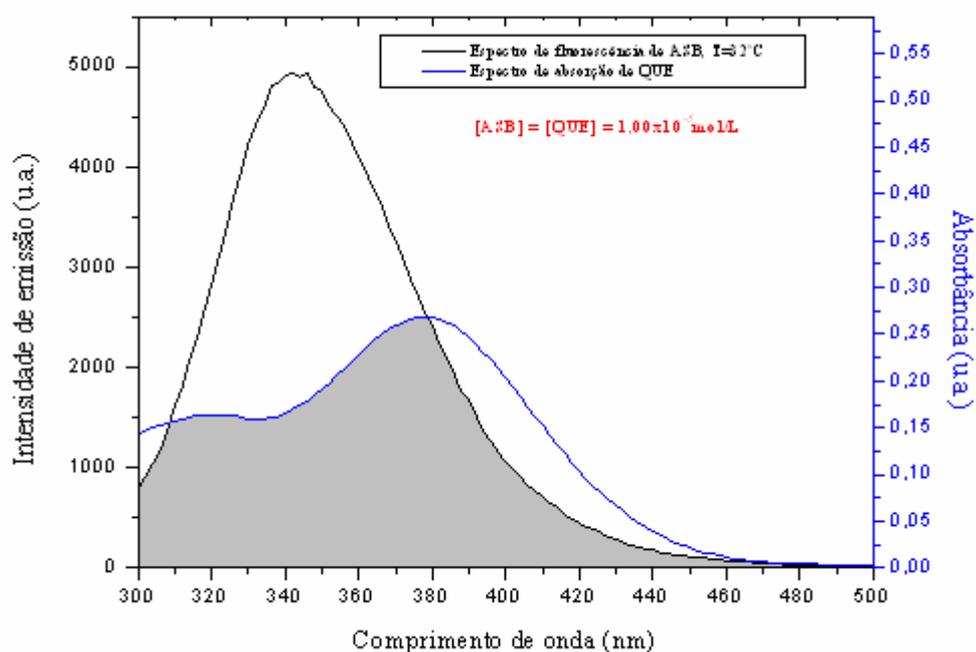


Figura 105. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

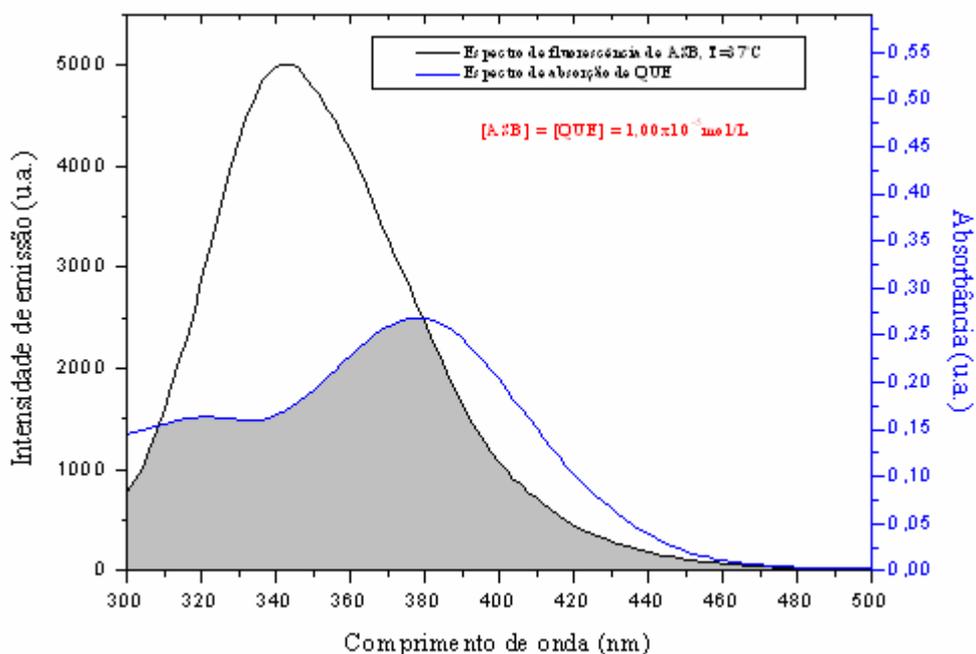


Figura 106. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

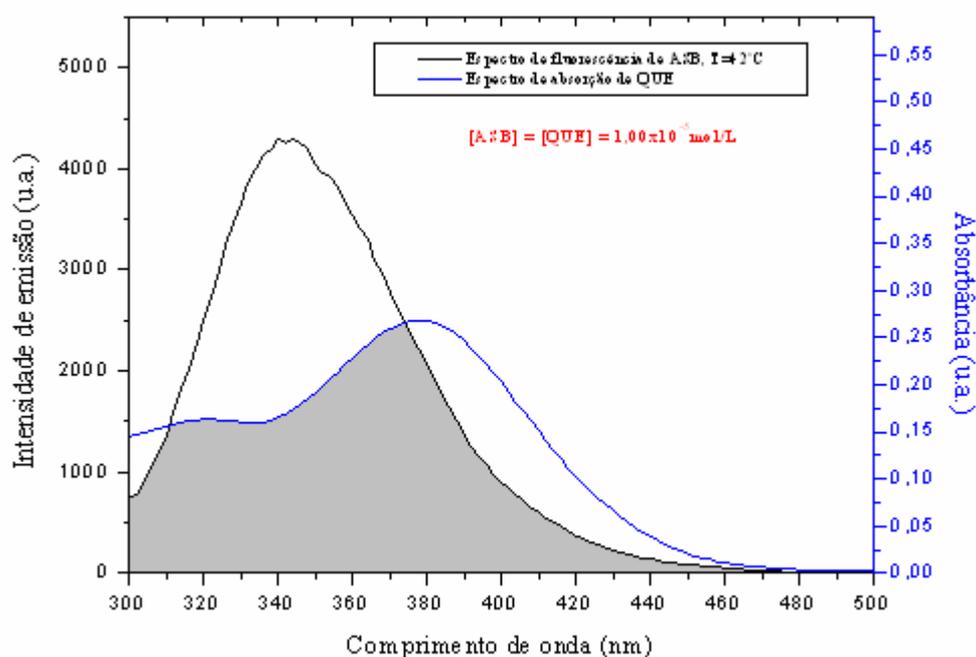


Figura 107. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de quercetina. $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabela 22. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da quercetina (QUE). $C_{ASB} = C_{QUE} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Quercetina (QUE)					
pH	T ($^\circ\text{C}$)	J ($\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$)	R_0 (nm)	E	r (nm)
7,4	22	$3,16 \times 10^{-14}$	3,09	0,59	2,90
	27	$3,16 \times 10^{-14}$	3,09	0,63	2,84
	32	$3,15 \times 10^{-14}$	3,09	0,59	2,90
	37	$3,15 \times 10^{-14}$	3,09	0,65	2,79
	42	$3,14 \times 10^{-14}$	3,09	0,62	2,84

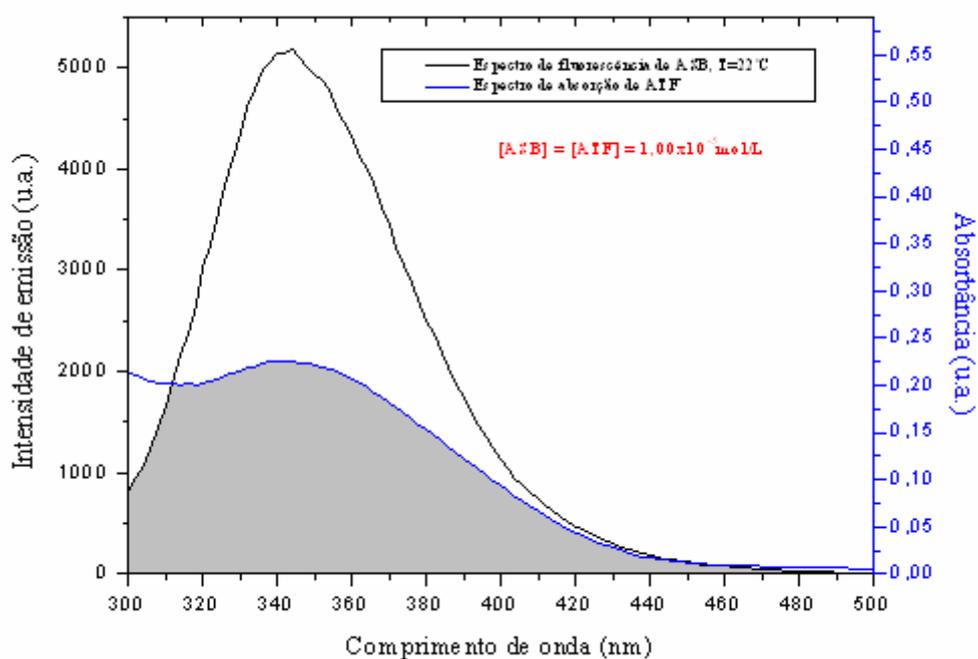


Figura 108. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{AIF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

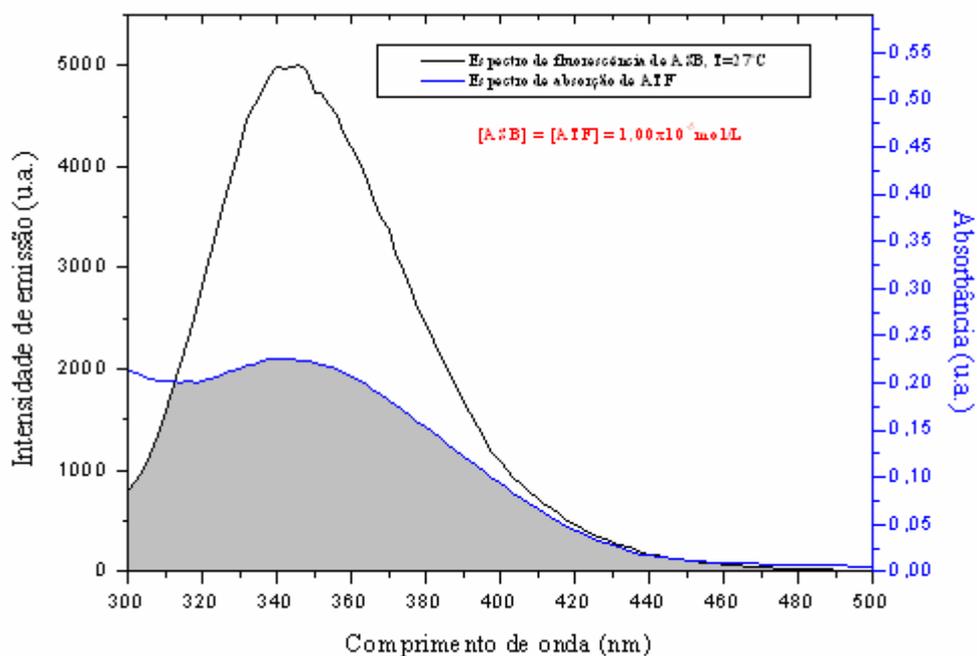


Figura 109. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{AIF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

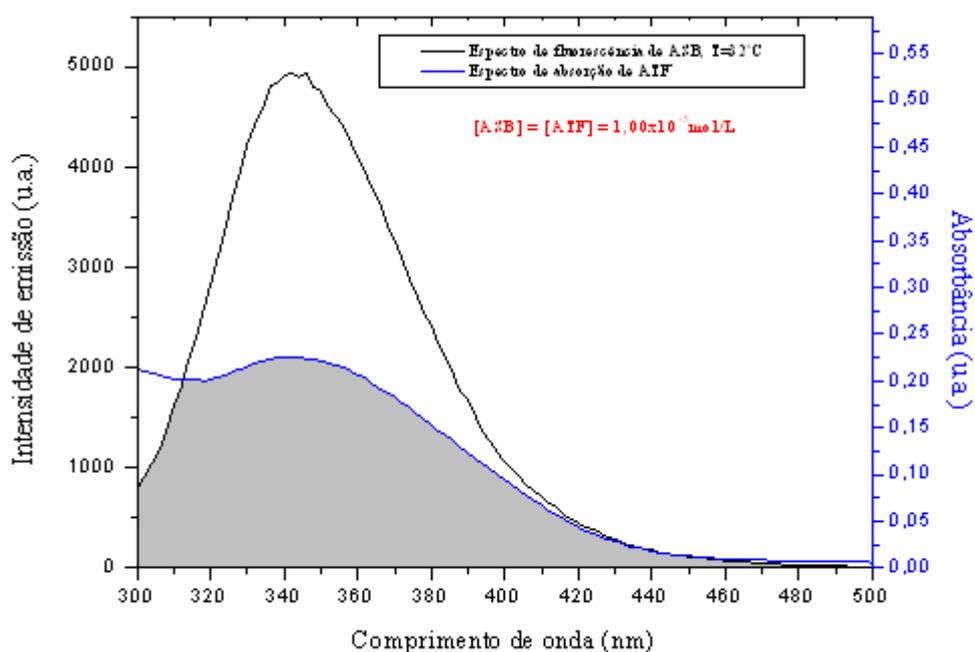


Figura 110. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{ATF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

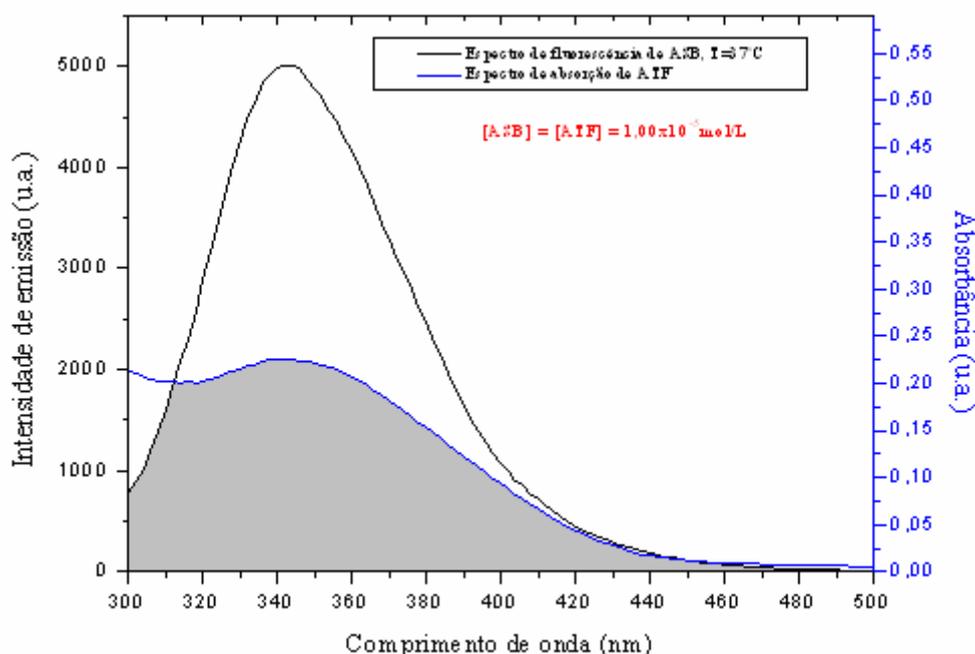


Figura 111. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{ATF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

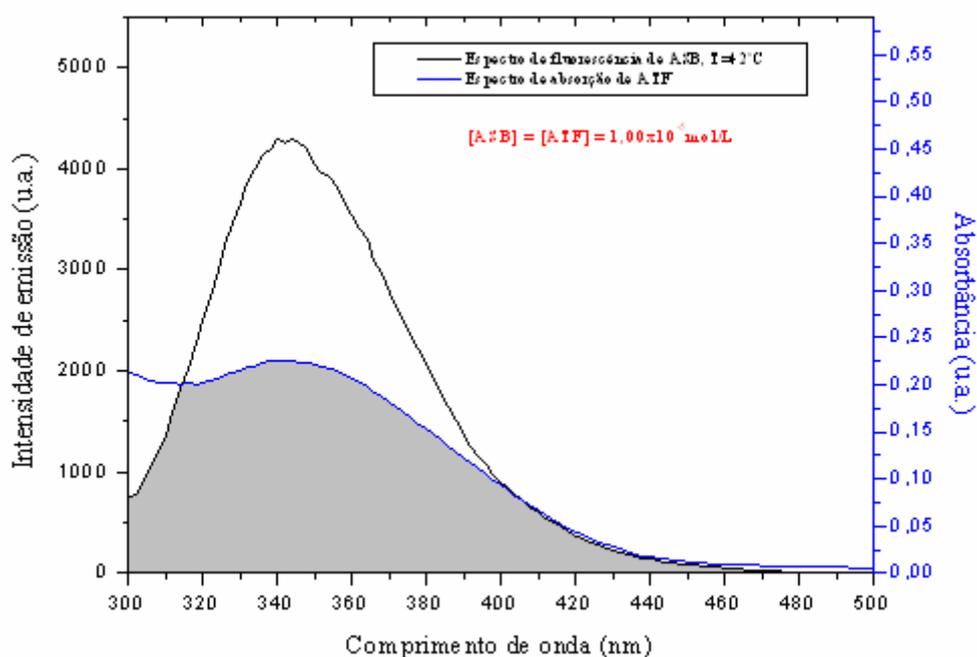


Figura 112. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de agatisflavona. $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabela 23. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da agatisflavona (ATF). $C_{ASB} = C_{ATF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Agatisflavona (ATF)					
pH	T (°C)	J (cm ³ .L/mol)	R ₀ (nm)	E	r (nm)
7,4	22	$2,83 \times 10^{-14}$	3,04	0,78	2,45
	27	$2,83 \times 10^{-14}$	3,04	0,80	2,42
	32	$2,83 \times 10^{-14}$	3,04	0,82	2,37
	37	$2,83 \times 10^{-14}$	3,04	0,82	2,36
	42	$2,83 \times 10^{-14}$	3,04	0,77	2,47

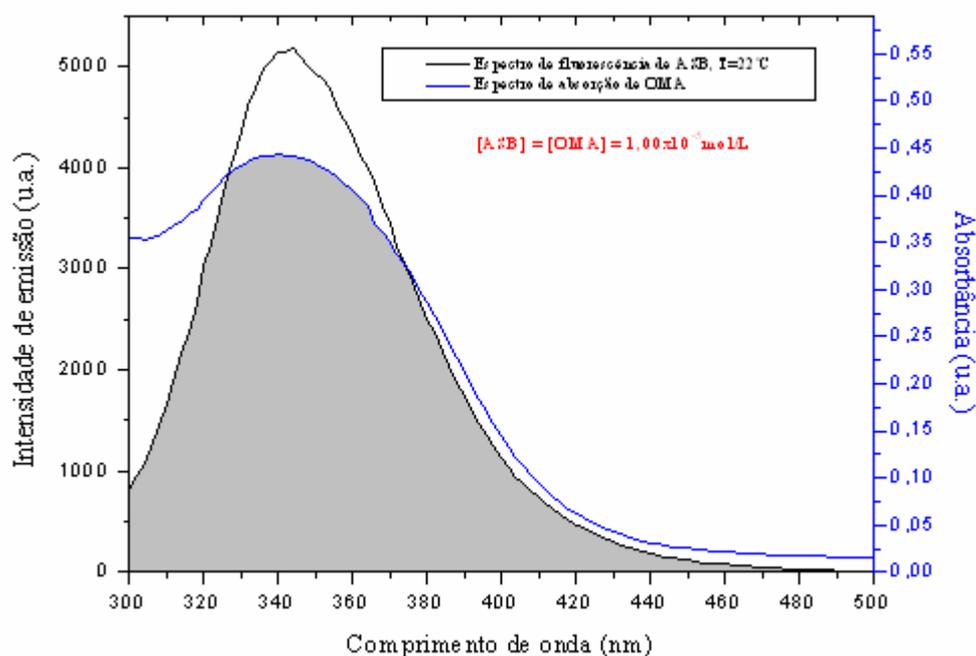


Figura 113. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de 7''-*O*-metilagatisflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{OMA}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

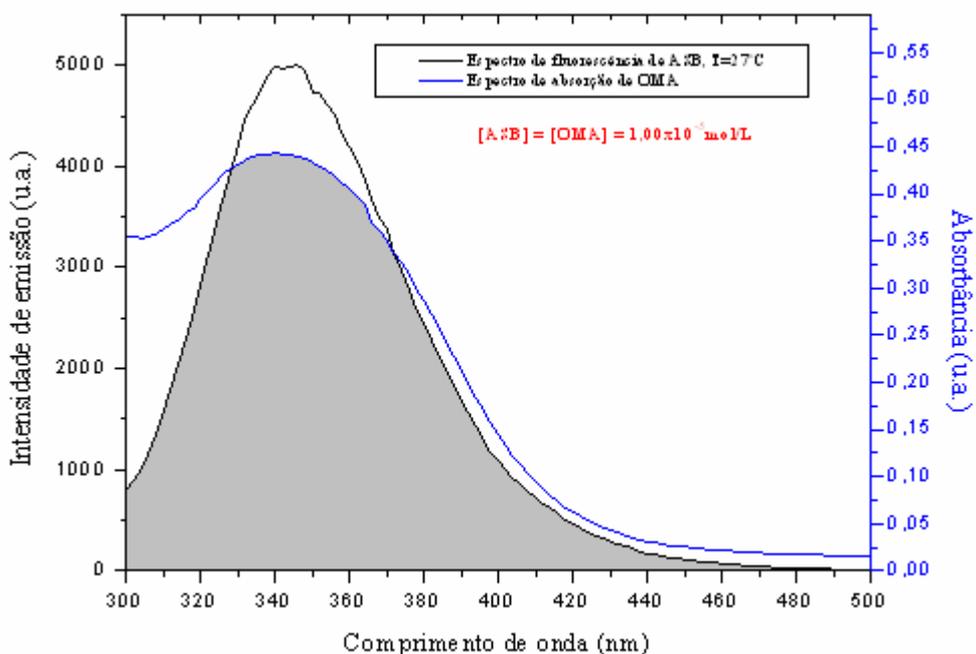


Figura 114. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de 7''-*O*-metilagatisflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{OMA}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

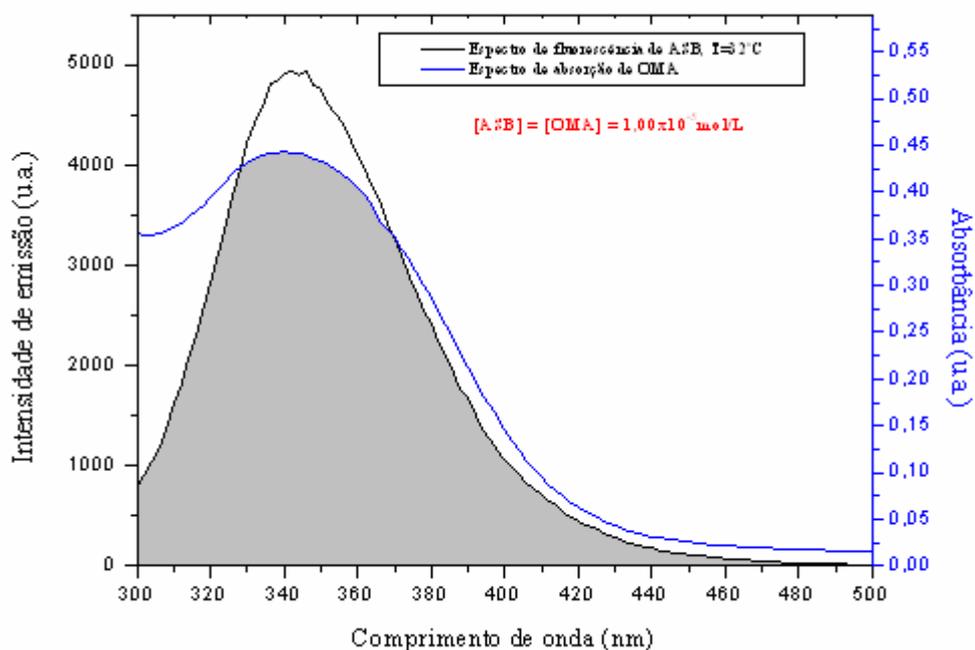


Figura 115. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de 7''-*O*-metilagatisflavona. $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

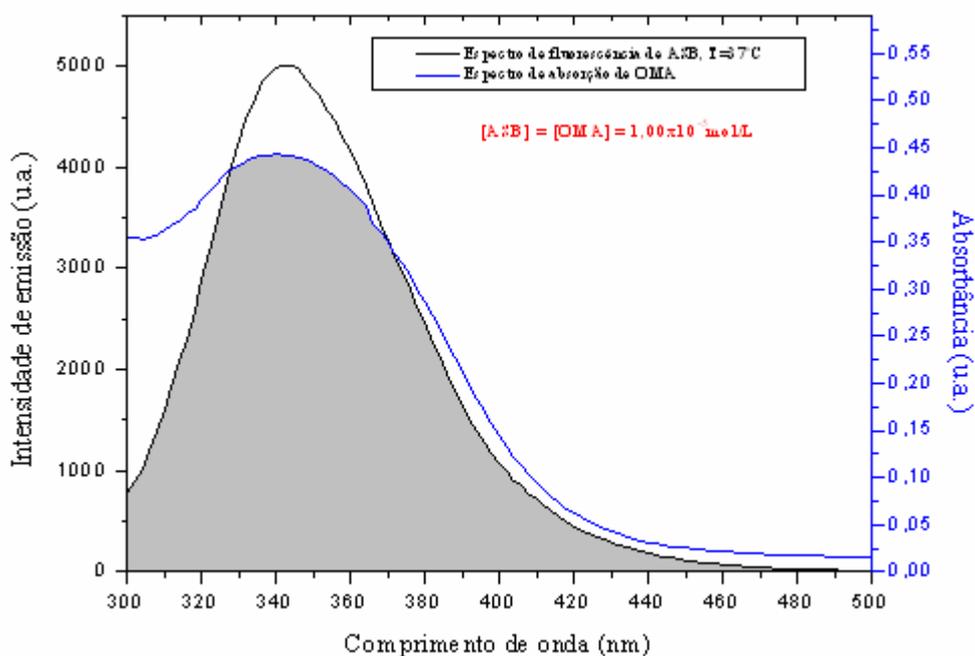


Figura 116. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de 7''-*O*-metilagatisflavona. $C_{ASB} = C_{OMA} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

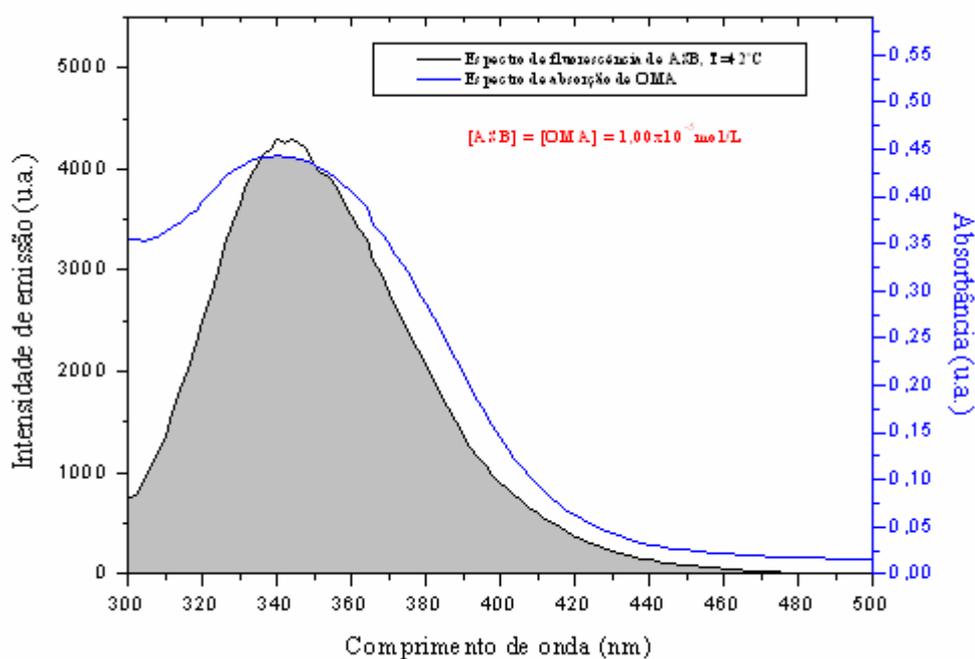


Figura 117. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de 7''-*O*-metilagatisflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{OMA}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Tabela 24. Valores de J , R_0 , E e r calculados para a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASB ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA). $C_{\text{ASB}} = C_{\text{OMA}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

7''- <i>O</i> -Metilagatisflavona (OMA)					
pH	T ($^\circ\text{C}$)	J ($\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$)	R_0 (nm)	E	r (nm)
7,4	22	$5,25 \times 10^{-14}$	3,36	0,76	2,77
	27	$5,25 \times 10^{-14}$	3,36	0,79	2,70
	32	$5,25 \times 10^{-14}$	3,36	0,81	2,65
	37	$5,25 \times 10^{-14}$	3,36	0,89	2,36
	42	$5,26 \times 10^{-14}$	3,37	0,85	2,52

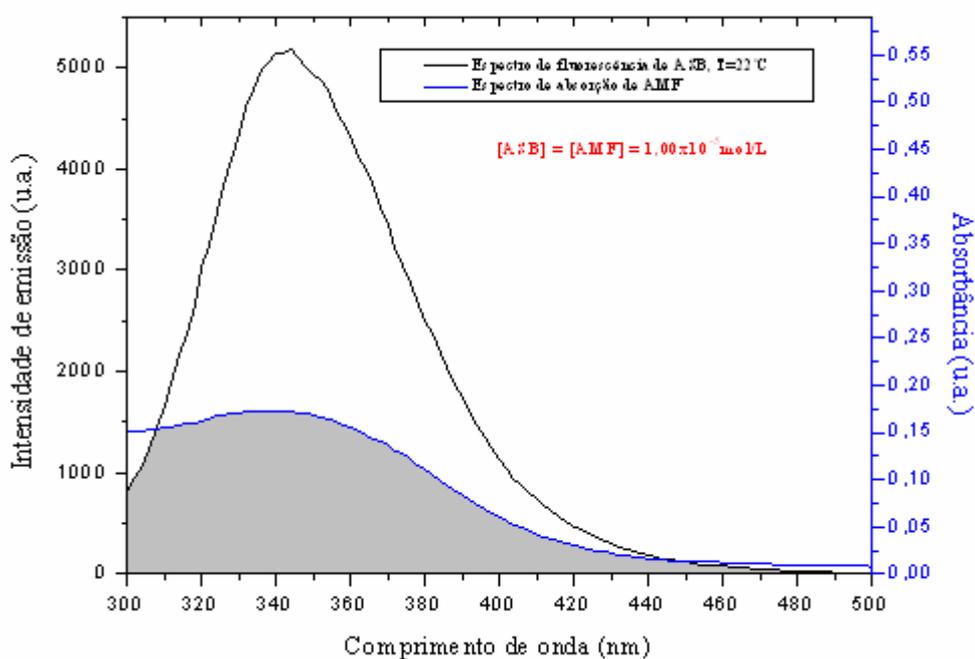


Figura 118. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{AMF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

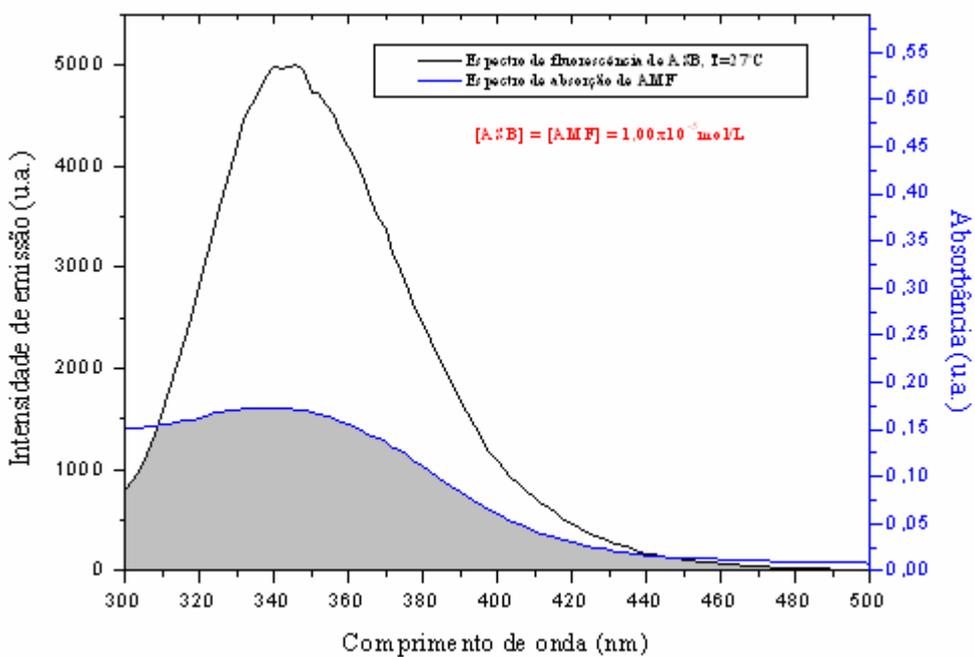


Figura 119. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{AMF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

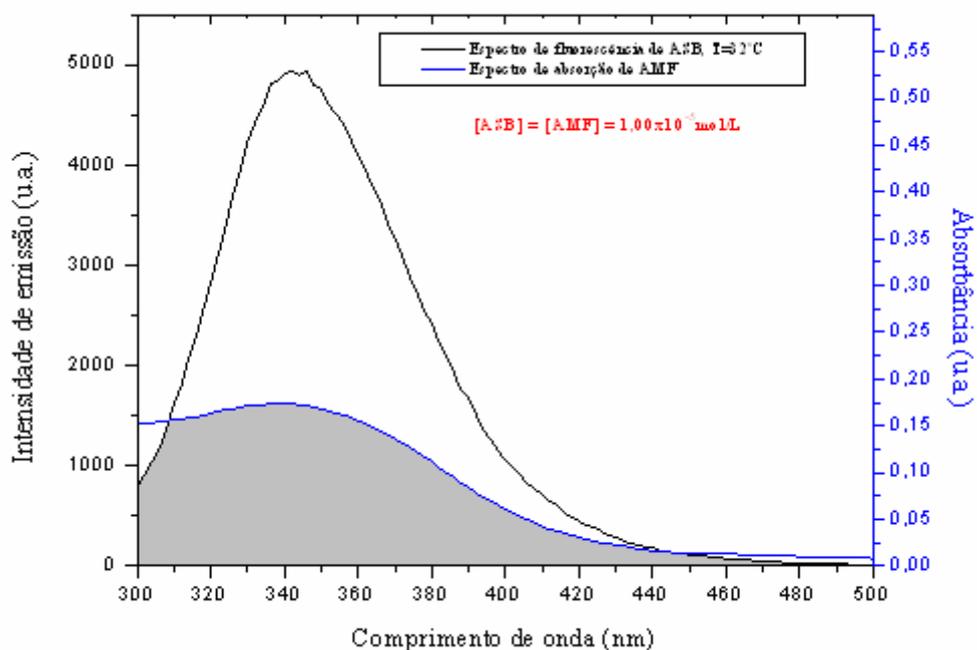


Figura 120. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

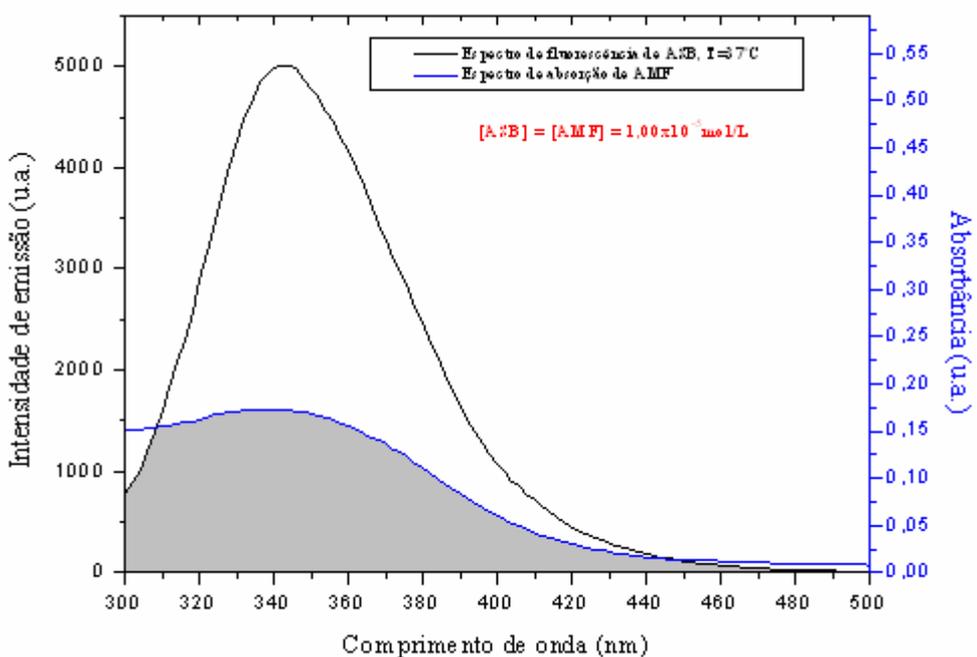


Figura 121. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{ASB} = C_{AMF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

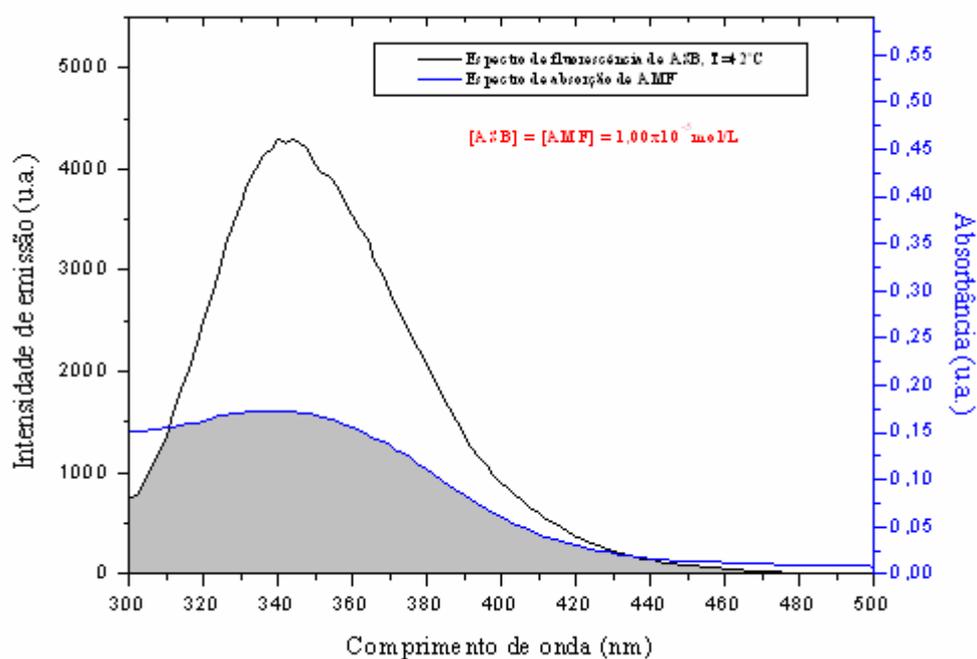


Figura 122. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de amentoflavona. $C_{\text{ASB}} = C_{\text{AMF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Tabela 25. Valores de J , R_0 , E e r calculados para a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASB ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da amentoflavona (AMF). $C_{\text{ASB}} = C_{\text{AMF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

Amentoflavona (AMF)					
pH	T ($^\circ\text{C}$)	J ($\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$)	R_0 (nm)	E	r (nm)
7,4	22	$2,13 \times 10^{-14}$	2,90	0,49	2,91
	27	$2,14 \times 10^{-14}$	2,90	0,48	2,93
	32	$2,13 \times 10^{-14}$	2,90	0,54	2,82
	37	$2,13 \times 10^{-14}$	2,90	0,59	2,73
	42	$2,14 \times 10^{-14}$	2,90	0,61	2,70

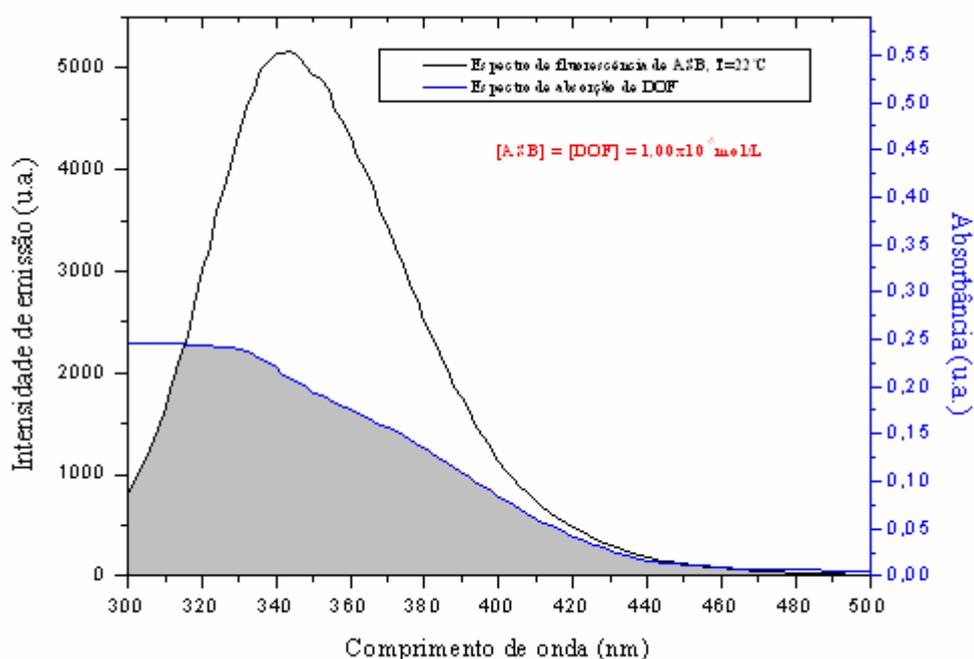


Figura 123. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 22^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochonaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

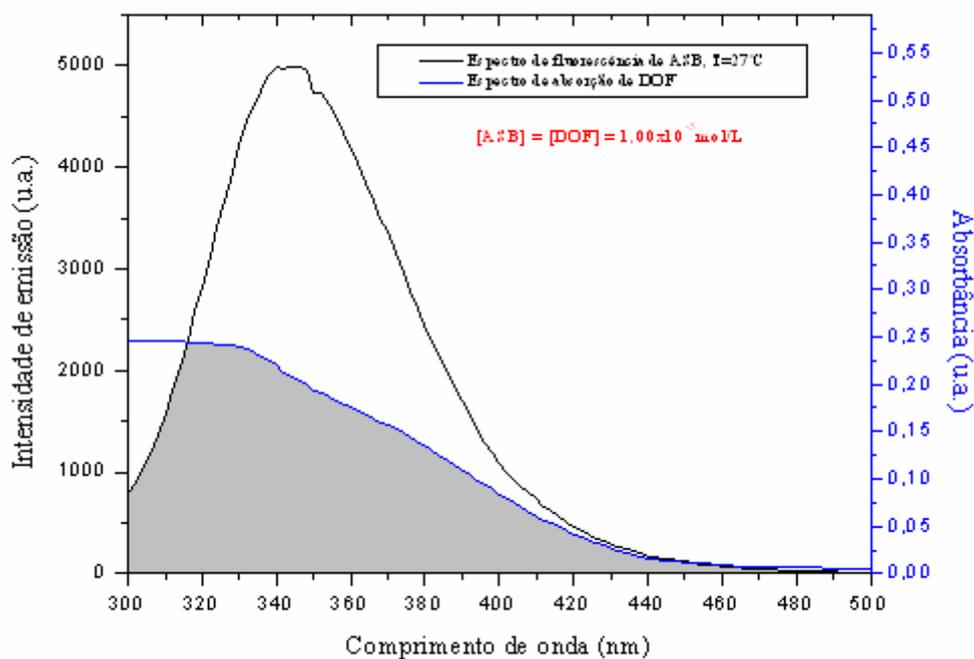


Figura 124. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 27^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochonaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

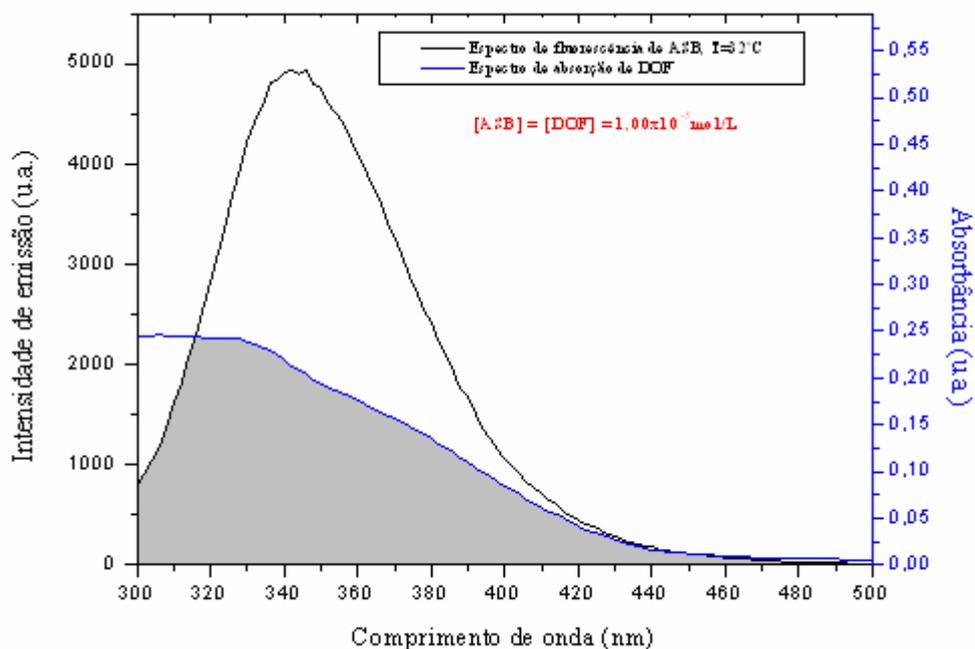


Figura 125. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ e $T = 32^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de diidrochonaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

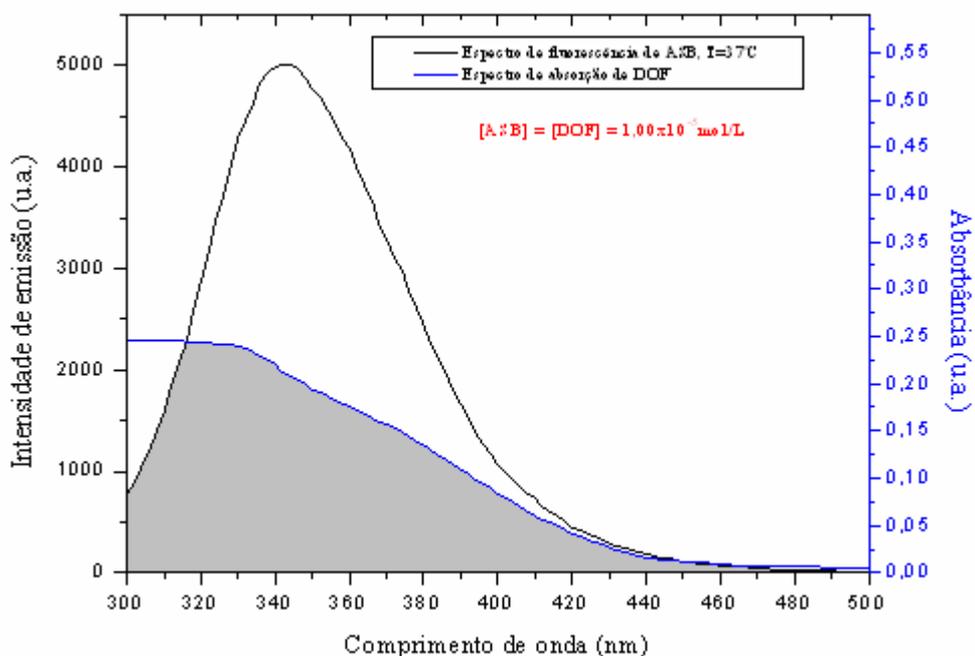


Figura 126. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ e $T = 37^\circ\text{C}$) de ASB ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV de diidrochonaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

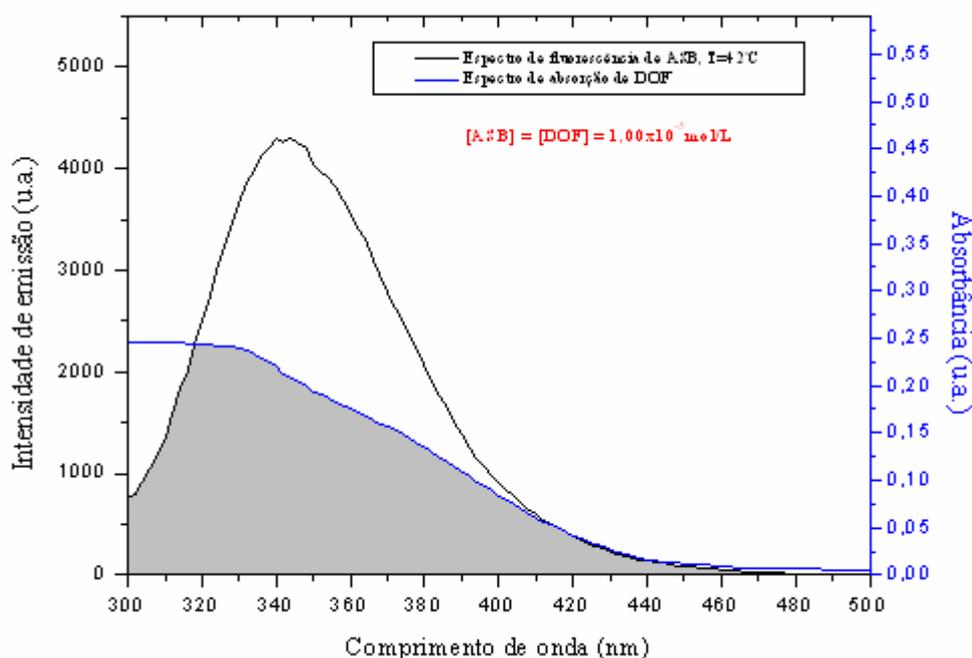


Figura 127. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 42^\circ\text{C}$) de ASB (pH = 7,4) e de absorção UV de diidrochonaflavona. $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabela 26. 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 $T = 22^\circ\text{C}$, 27°C , 32°C , 37°C e 42°C) e o espectro de absorção UV-Vis da diidrochonaflavona (DOF). $C_{ASB} = C_{DOF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Diidrochonaflavona (DOF)					
pH	T ($^\circ\text{C}$)	J ($\text{cm}^3 \cdot \text{L/mol}$)	R_0 (nm)	E	r (nm)
7,4	22	$2,56 \times 10^{-14}$	2,98	0,76	2,46
	27	$2,56 \times 10^{-14}$	2,98	0,78	2,42
	32	$2,56 \times 10^{-14}$	2,98	0,80	2,38
	37	$2,56 \times 10^{-14}$	2,98	0,80	2,37
	42	$2,56 \times 10^{-14}$	2,99	0,80	2,38

De acordo com as Equações 16-18, 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 os flavonóides e o resíduo de triptofano ($r \cong 2$ a 3 nm, Tabelas 22-26) 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 flavonóide. Isto é um forte indício do alto nível de possibilidade de ocorrer o fenômeno de transferência de energia entre ASB e flavonóides. 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 flavonóides e ASB. [Lakowicz (2006) e Cheng et al. (2009)].

5.3.3 Dicroísmo circular (DC)

O dicroísmo circular 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)]. Espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para avaliar a mudança estrutural de ASB induzida pela adição de flavonóides. Os espectros de dicroísmo circular obtidos para ASB na ausência de flavonóides (Figura 128) e na presença de flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona), em diferentes temperaturas ($T = 25^{\circ}\text{C}$, 37°C e 42°C), estão apresentados nas Figuras 129-148. Nestes estudos foi observado que a adição de alíquotas dos flavonóides à albumina sérica bovina influenciou na sua elipticidade. Os espectros de DC de ASB e de ASB:flavonóides (Figuras 128-148) exibiram duas bandas negativas na região do ultravioleta (UV) de 208 nm e 222 nm, características de estrutura α -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 α -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 flavonóides foram semelhantes, quanto ao formato, somente apresentando variações de intensidade das bandas, o que significa que a estrutura de ASB foi predominantemente α -hélice [Yue *et al.* (2008)]. A interação dos flavonóides com a ASB resultou na diminuição de ambas as bandas (com alguns flavonóides diminuiu mais e com outros menos), sugerindo claramente a ocorrência de mudanças consideráveis na estrutura secundária da proteína, o que pode ser indicativo da formação de complexos entre ASB e os flavonóides.

Os espectros de DC na presença de flavonóides como agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA) e diidroochnaflavona (DOF) apresentaram bandas positivas e negativas em comprimentos de onda acima de 240 nm ($\lambda > 240$ nm), características de quiralidade, sendo específicas para esses biflavonóides, uma vez que essa região não é significativa para albuminas (no caso, ASB), Figuras 133-140 e 145-148. A amentoflavona (AMF), também apresenta esta característica de quiralidade, porém, em $\lambda > 240$ nm, está pouco perceptível, quase não dá para ver nos espectros (Figuras 141-144), mas, se comparados com os da quercetina (QUE), nesta região, a QUE não apresenta nenhum vestígio. Esta característica de quiralidade é comum em biflavonóides. E, como o dicroísmo circular é uma técnica sensível para monitorar mudanças conformacionais na estrutura secundária de proteínas [Yue *et al.* (2008), Kelly *et al.* (2005) e Cheng *et al.* (2009)], além de ser muito útil para o estudo de moléculas quirais, macromoléculas, sejam elas ou não de origem biológica, as unidades opticamente ativas das moléculas podem exibir sinal na espectroscopia de dicroísmo circular. Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nessa luz incidente.

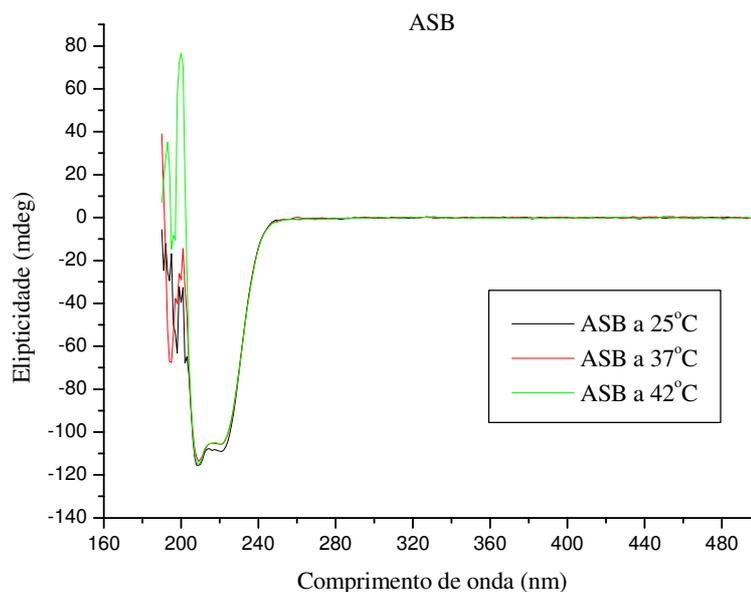


Figura 128. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4), $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}\text{C}$, 37°C e 42°C .

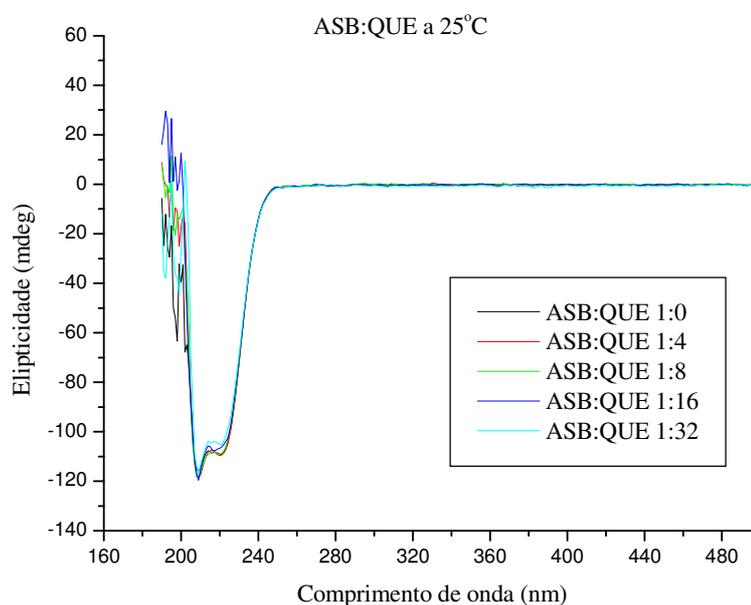


Figura 129. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$ e $32,30$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 25^{\circ}\text{C}$.

O comportamento das bandas negativas da albumina, em 208 nm e 222 nm (características de transições $n\pi^*$ da estrutura secundária α -hélice de proteínas no ultravioleta), mostrou-se bem parecido frente a variação de temperatura (Figuras 128-148) tanto para ASB livre quanto para na presença dos flavonóides, as curvas dos espectros

apresentaram mudanças em $T = 25^{\circ}\text{C}$, 37°C e 42°C , porém, essas mudanças foram mínimas quando comparadas às mudanças com a adição de biflavonóides (em temperatura fixa na presença de biflavonóides), Figuras 133, 137, 141 e 145, que foram bem perceptíveis, principalmente, para ATF, OMA e DOF. Essas diferenças foram menos visíveis para a QUE (Figura 129), mas, bem notadas na presença dos biflavonóides. Dessa forma, a temperatura contribuiu pouquíssimo para essas mudanças espectrais, enquanto, a concentração dos flavonóides foi a grande responsável por essas mudanças.

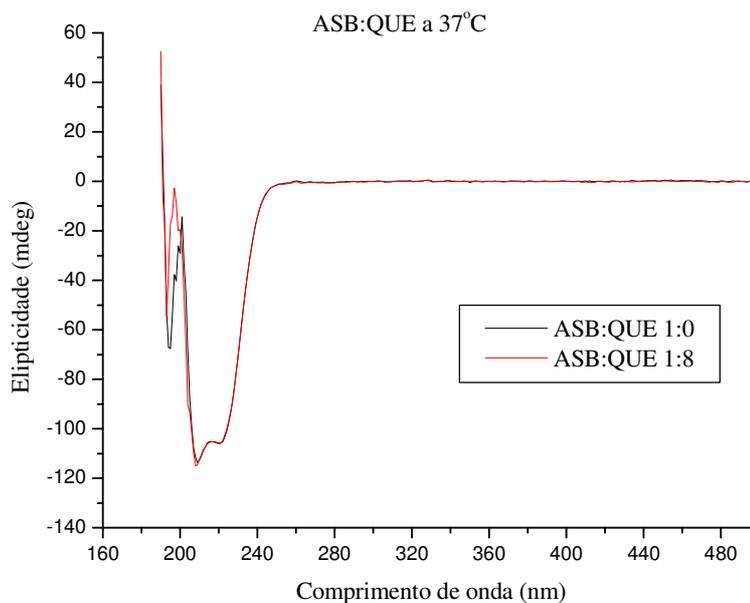


Figura 130. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:QUE, $C_{\text{ASB}} = 1,00 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ e $C_{\text{QUE}} = 0$ e $8,08 (x 10^{-6}) \text{ mol/L}$, a $T = 37^{\circ}\text{C}$.

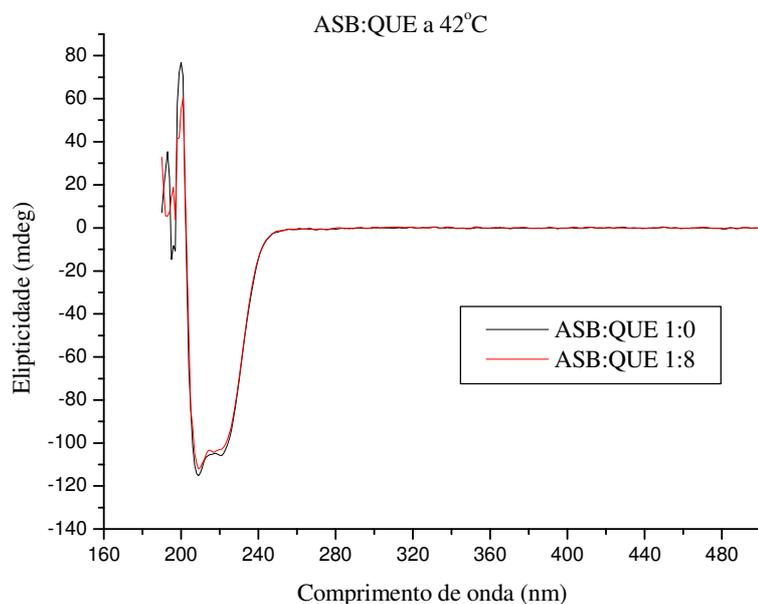


Figura 131. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de quercetina (QUE), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 0$ e $8,08 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 42^\circ\text{C}$.

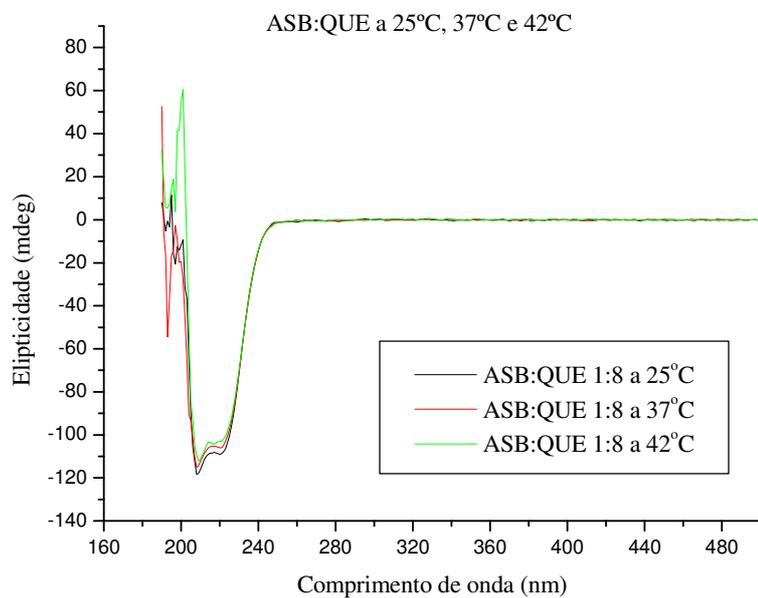


Figura 132. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de quercetina (QUE), na proporção 1:8 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 8,08 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^\circ\text{C}$, 37°C e 42°C .

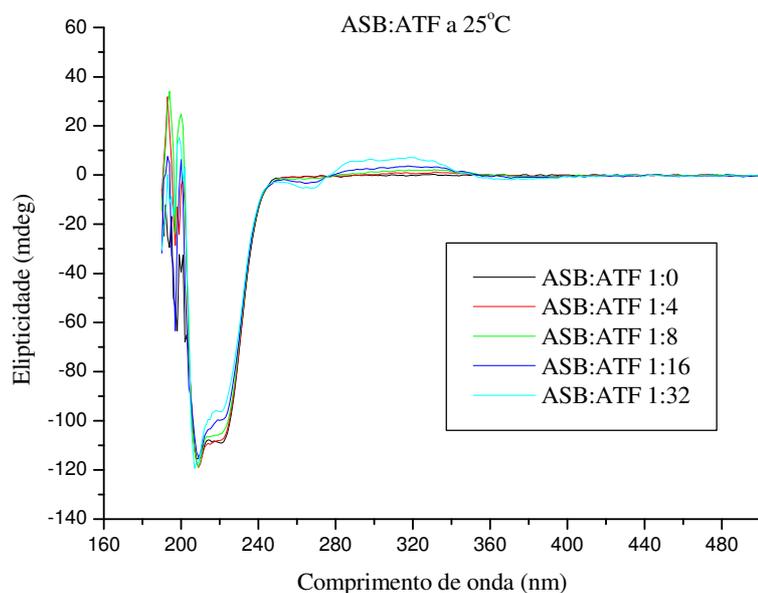


Figura 133. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 4,00; 8,00; 16,00$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 25^\circ\text{C}$.

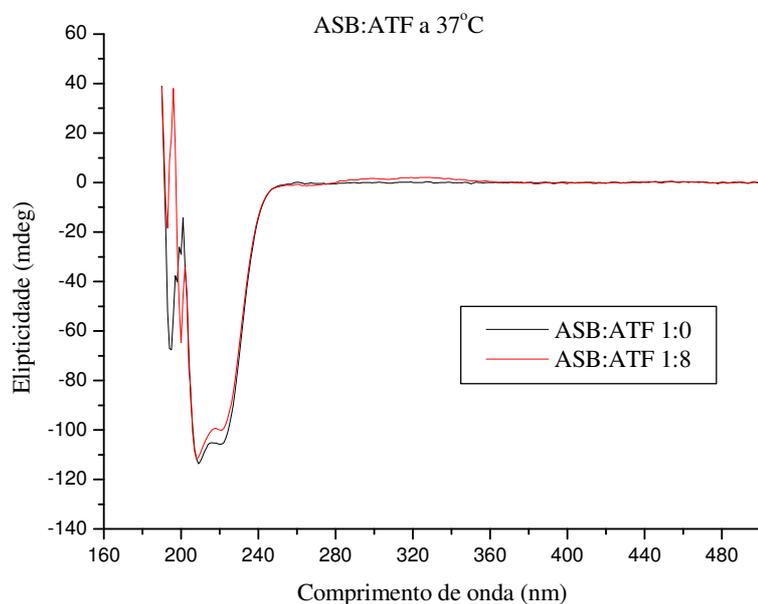


Figura 134. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0$ e $8,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 37^\circ\text{C}$.

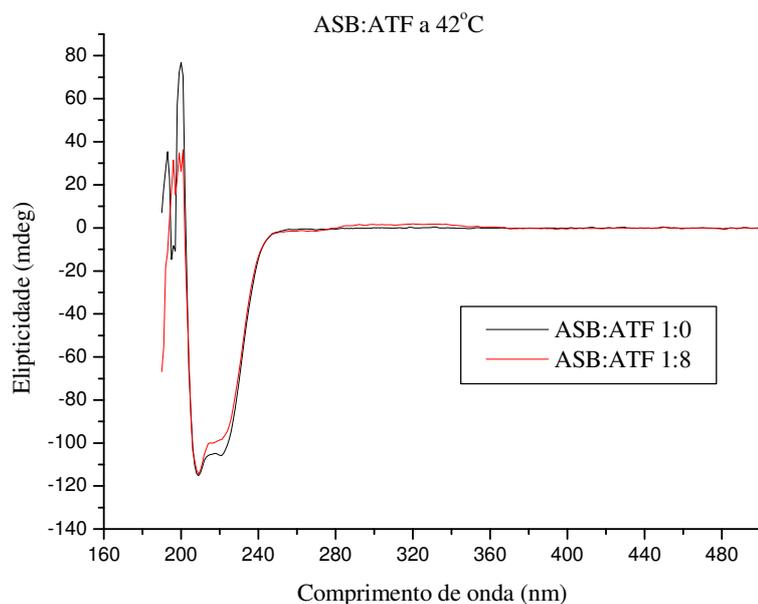


Figura 135. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de agatisflavona (ATF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0$ e $8,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 42^{\circ}\text{C}$.

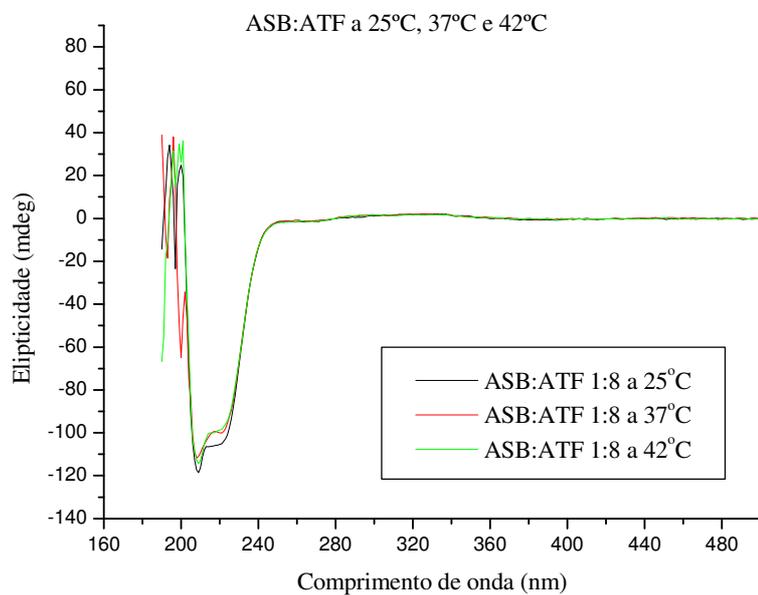


Figura 136. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de agatisflavona (ATF), na proporção 1:8 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 8,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}\text{C}$, 37°C e 42°C .

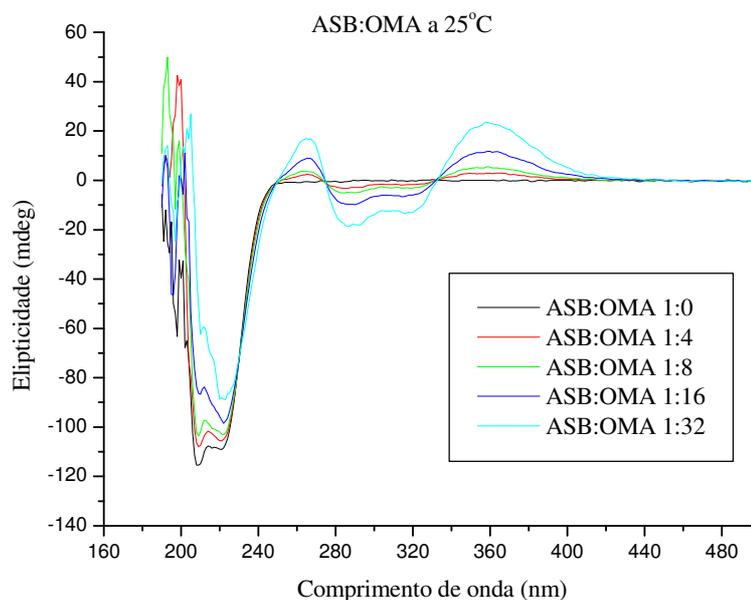


Figura 137. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 0$; 4,12; 8,24; 16,50 e 33,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 25^\circ\text{C}$.

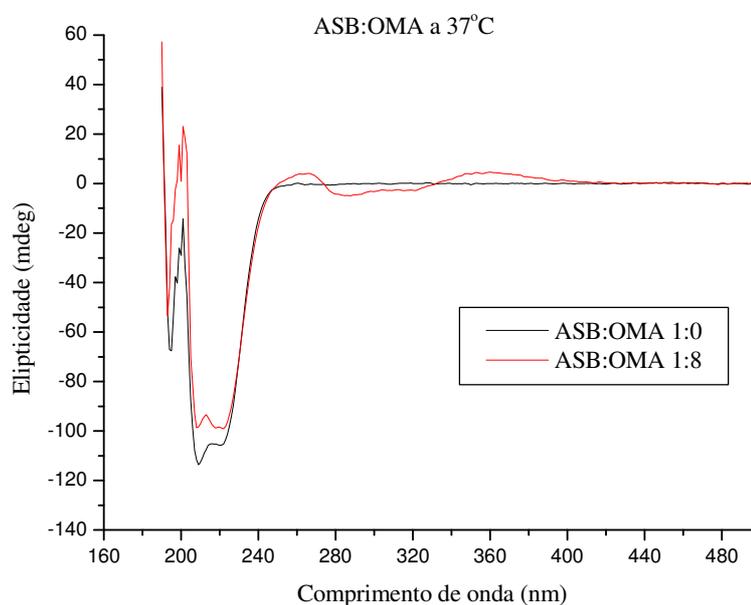


Figura 138. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 0$ e 8,24 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 37^\circ\text{C}$.

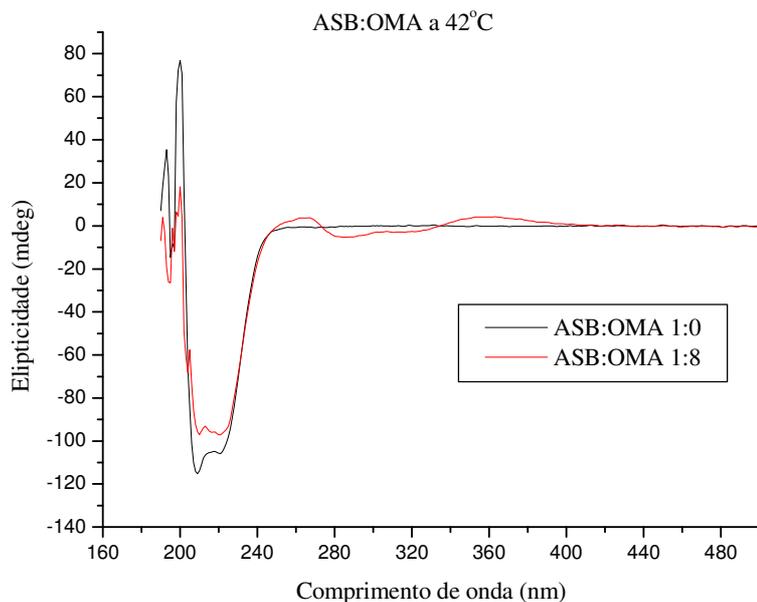


Figura 139. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 0$ e $8,24 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 42^\circ\text{C}$.

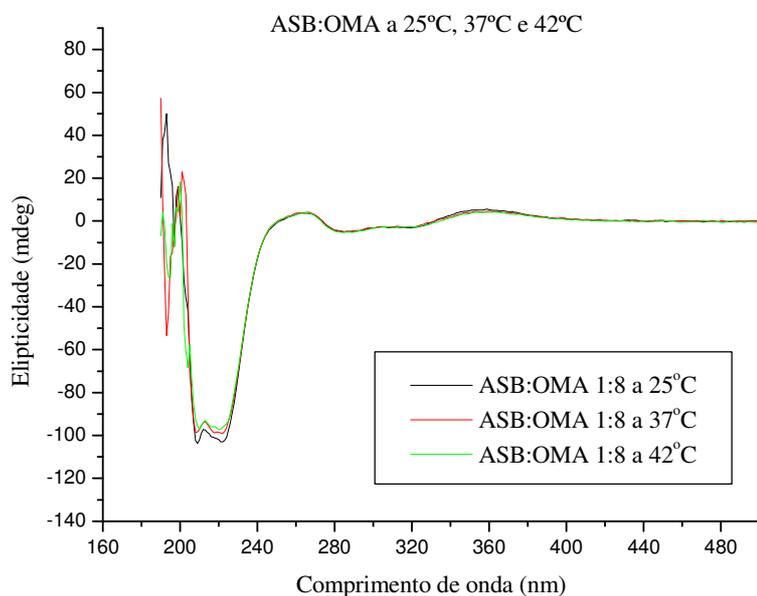


Figura 140. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA), na proporção 1:8 de ASB:OMA, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{OMA} = 8,24 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^\circ\text{C}$, 37°C e 42°C .

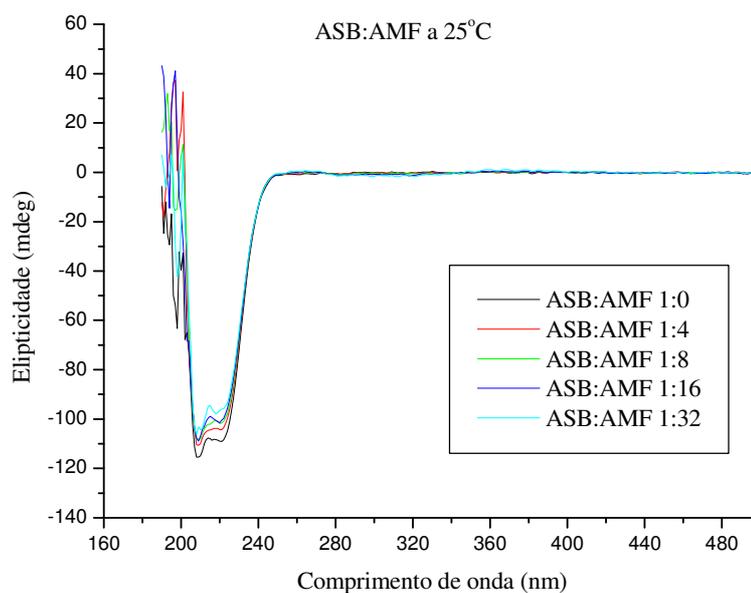


Figura 141. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 4,00; 8,00; 16,00$ e $32,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 25^{\circ}\text{C}$.

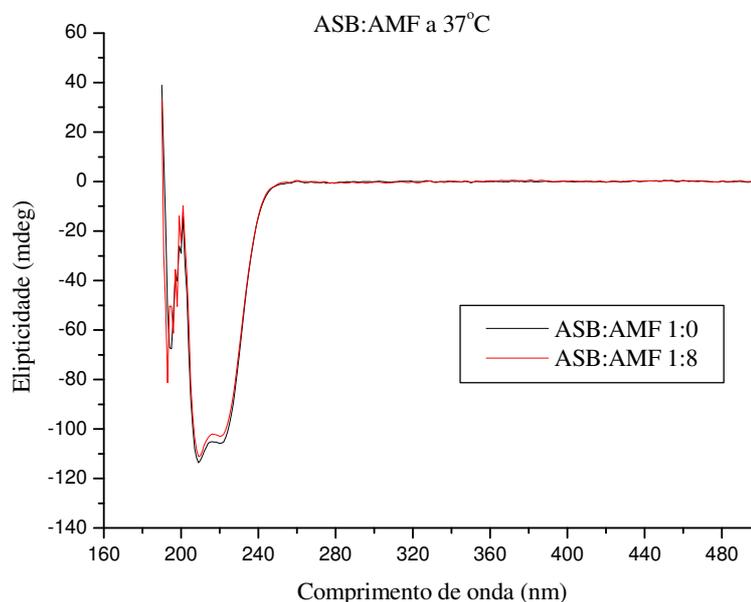


Figura 142. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0$ e $8,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 37^{\circ}\text{C}$.

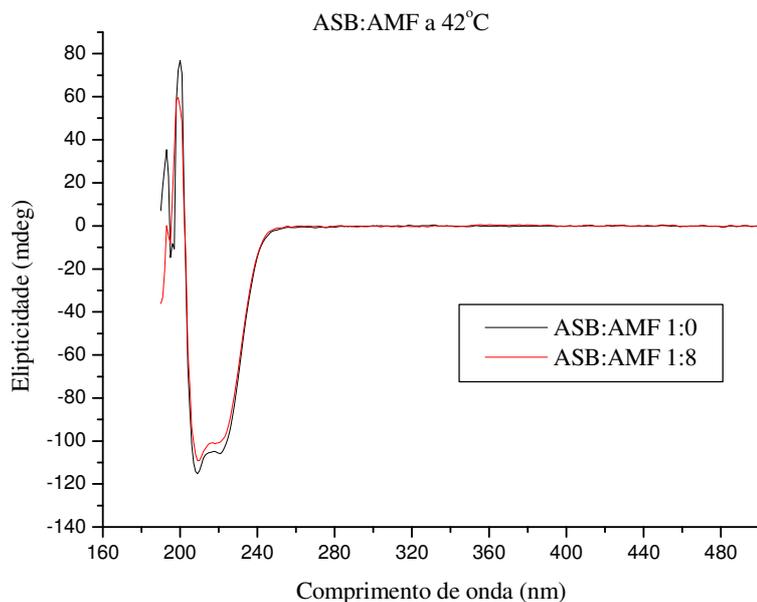


Figura 143. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de amentoflavona (AMF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0$ e $8,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 42^{\circ}\text{C}$.

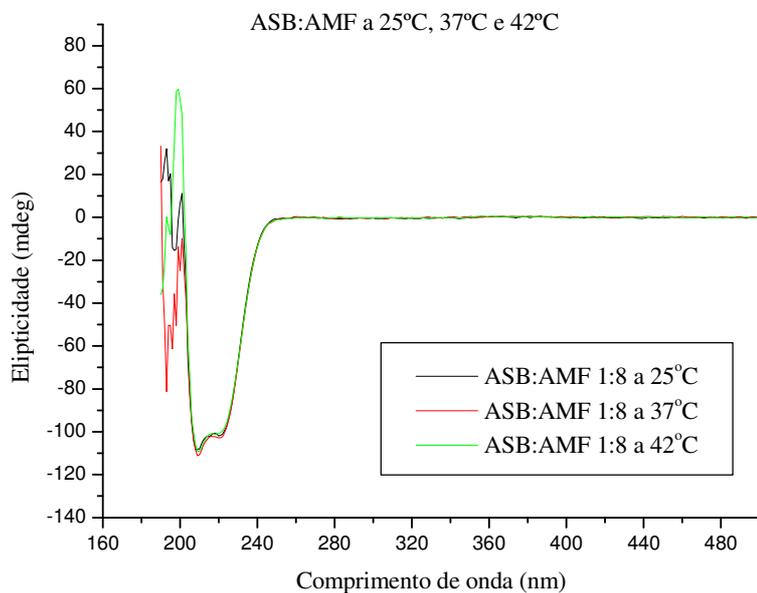


Figura 144. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de amentoflavona (AMF), na proporção 1:8 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 8,00 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}\text{C}$, 37°C e 42°C .

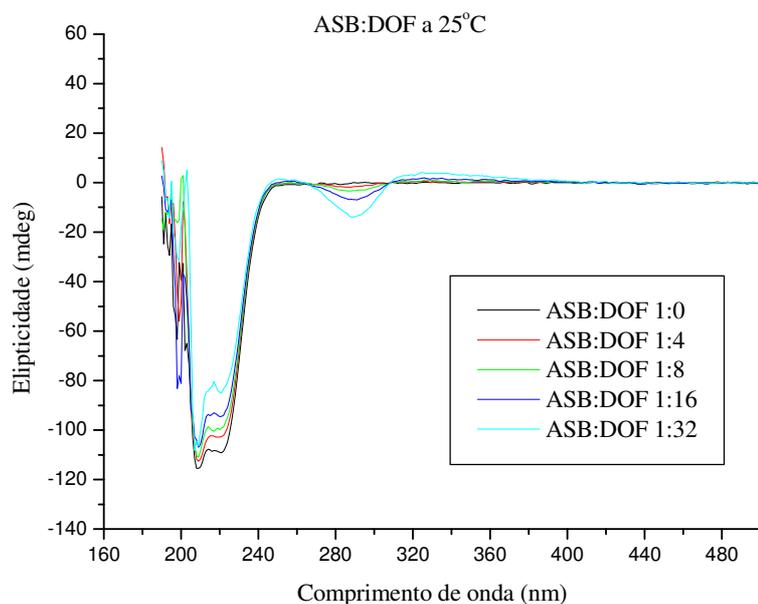


Figura 145. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochalcona (DOF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 4,20; 8,40; 16,80$ e $33,60$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 25^{\circ}\text{C}$.

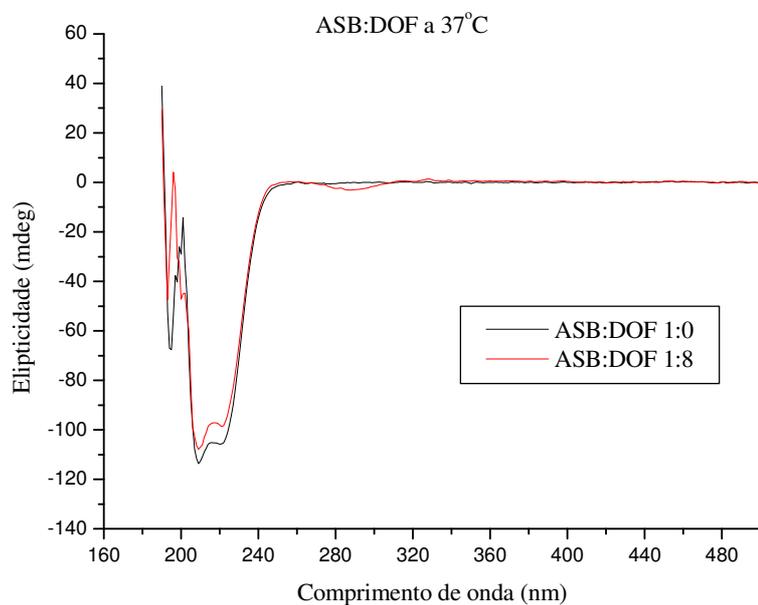


Figura 146. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochalcona (DOF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0$ e $8,40$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 37^{\circ}\text{C}$.

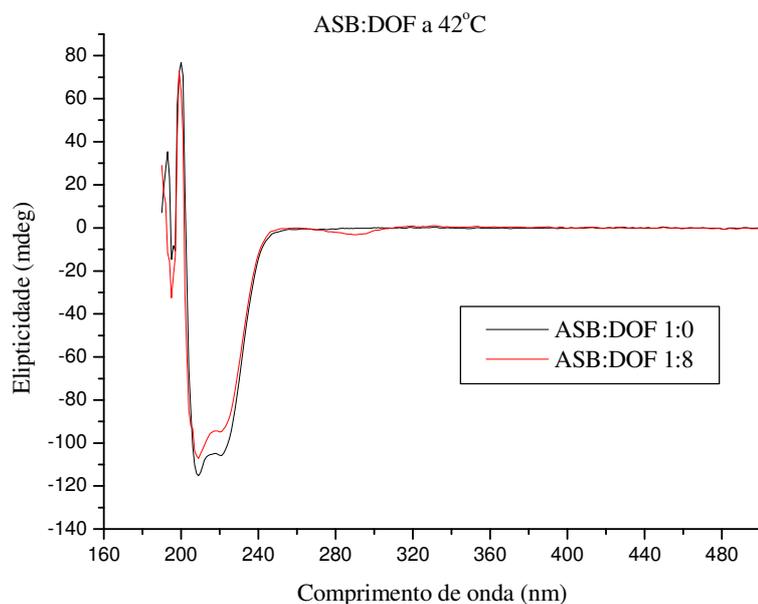


Figura 147. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diferentes concentrações de diidrochnaflavona (DOF), nas proporções 1:0 e 1:8 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0$ e $8,40 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 42^{\circ}\text{C}$.

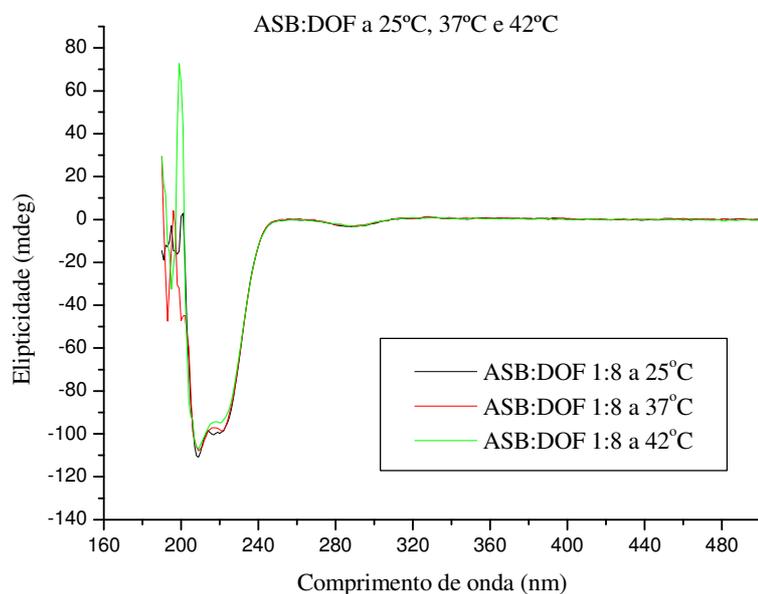


Figura 148. Espectros de dicroísmo circular de ASB em solução tamponada com PBS (pH = 7,4) na presença de diidrochnaflavona (DOF), na proporção 1:8 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 8,40 \times 10^{-6}$ mol/L, a $T = 25^{\circ}\text{C}$, 37°C e 42°C .

Estimativas acerca do % de α -hélice para a estrutura secundária de ASB na ausência e na presença de flavonóides foram feitas usando as Equações 19 e 20 [Chen *et al.* (1972), Khan *et al.* (2002), Gao *et al.* (2004), He *et al.* (2005), He *et al.* (2006), Kandagal *et al.*

(2006), Yue *et al.* (2008), Cheng *et al.* (2009) e Stan *et al.* (2009)]. Os valores experimentais de elipticidade (θ) foram lidos nos comprimentos de onda de 208 nm e 222 nm, e foram utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (MRE), especificamente MRE_{208} e MRE_{222} (Equação 17 [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 α -hélice de proteína [Stan *et al.* (2009)] e correspondem às transições $n\pi^*$ que ocorrem na sua estrutura secundária α -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 18 [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 α -hélice na estrutura secundária da ASB (% α -hélice), Tabelas 27-31. Os valores encontrados para % de α -hélice em 208 nm e 222 nm para ASB:flavonóides 1:0 (ou seja, para albumina livre), Tabelas 27-31, foram 54,63% e 53,79%. Após a adição dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF), de uma forma geral estes valores de % de α -hélice sofreram redução. Por exemplo, para proporções ASB:flavonóides 1:4, ou seja, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{flavonóides} \cong 4,00 \times 10^{-6}$ mol/L, ocorreu diminuição do % de α -hélice em 208 nm e 222 nm, para aproximadamente 51% e 50%, respectivamente, indicando que parte da estrutura secundária da ASB (α -hélice) foi destruída, apontando para a formação dos complexos ASB-flavonóides.

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

Equação 17. Equação para calcular os valores de MRE [Khan *et al.* (2002)].

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

θ = elipticidade observada (mdeg);

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

l = comprimento ótico da cubeta (1 cm);

C_p = concentração molar de ASB ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L).

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

Equação 18. Equações para calcular os valores de % de α -hélice da ASB.

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

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

% α -hélice = percentual de α -hélice na estrutura da ASB.

Tabela 27. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de quercetina (QUE), T = 25°C, 37°C e 42°C. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:QUE, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{QUE} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$ e $32,30$ ($\times 10^{-6}$) mol/L.

pH	T (°C)	Amostra	θ_{208} (mdeg)	MRE_{208} (deg.cm ² /dmol)	% α -hélice
7,4	25	ASB livre (1:0)	-115,482	-19842,2680	54,63
		ASB + QUE (1:4)	-117,636	-20212,3711	55,90
		ASB + QUE (1:8)	-118,281	-20323,1959	56,29
		ASB + QUE (1:16)	-116,542	-20024,3986	55,26
		ASB + QUE (1:32)	-113,64	-19525,7732	53,54
	37	ASB livre (1:0)	-111,552	-19167,0103	52,30
		ASB + QUE (1:8)	-114,957	-19752,0619	54,32
	42	ASB livre (1:0)	-114,167	-19616,3230	53,85
		ASB + QUE (1:8)	-109,156	-18755,3265	50,88
	pH	T (°C)	Amostra	θ_{222} (mdeg)	MRE_{222} (deg.cm ² /dmol)
7,4	25	ASB livre (1:0)	-108,47	-18637,4570	53,79
		ASB + QUE (1:4)	-108,648	-18668,0412	53,89
		ASB + QUE (1:8)	-107,825	-18526,6323	53,42
		ASB + QUE (1:16)	-105,232	-18081,0997	51,95
		ASB + QUE (1:32)	-103,732	-17823,3677	51,10
	37	ASB livre (1:0)	-105,258	-18085,5670	51,97
		ASB + QUE (1:8)	-104,86	-18017,1821	51,74
	42	ASB livre (1:0)	-104,773	-18002,2337	51,69
		ASB + QUE (1:8)	-102,028	-17530,5842	50,13

Tabela 28. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de agatisflavona (ATF), T = 25°C, 37°C e 42°C. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:ATF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{ATF} = 0; 4,00; 8,00; 16,00$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L.

pH	T (°C)	Amostra	θ_{208} (mdeg)	MRE ₂₀₈ (deg.cm ² /dmol)	% α -hélice
7,4	25	ASB livre (1:0)	-115,482	-19842,2680	54,63
		ASB + ATF (1:4)	-116,767	-20063,0584	55,39
		ASB + ATF (1:8)	-117,209	-20139,0034	55,65
		ASB + ATF (1:16)	-112,652	-19356,0138	52,95
		ASB + ATF (1:32)	-116,695	-20050,6873	55,35
	37	ASB livre (1:0)	-111,552	-19167,0103	52,30
		ASB + ATF (1:8)	-111,678	-19188,6598	52,37
	42	ASB livre (1:0)	-114,167	-19616,3230	53,85
		ASB + ATF (1:8)	-112,553	-19339,0034	52,89
	pH	T (°C)	Amostra	θ_{222} (mdeg)	MRE ₂₂₂ (deg.cm ² /dmol)
7,4	25	ASB livre (1:0)	-108,47	-18637,4570	53,79
		ASB + ATF (1:4)	-107,185	-18416,6667	53,06
		ASB + ATF (1:8)	-104,065	-17880,5842	51,29
		ASB + ATF (1:16)	-99,3974	-17078,5911	48,64
		ASB + ATF (1:32)	-95,2675	-16368,9863	46,30
	37	ASB livre (1:0)	-105,258	-18085,5670	51,97
		ASB + ATF (1:8)	-99,42	-17082,4742	48,66
	42	ASB livre (1:0)	-104,773	-18002,2337	51,69
		ASB + ATF (1:8)	-97,2651	-16712,2165	47,43

Os valores de % de α -hélice encontrados para a interação ASB:OMA nas proporções 1:16 e 1:32 foram baixos, 35,67% e 8,89% (Tabela 29), respectivamente, em relação à redução do % de α -hélice para as outras proporções e para as outras moléculas. Para ASB:OMA de 1:32, o valor foi muitíssimo mais baixo, quando comparado a todos os outros, provavelmente, porque deve está ocorrendo uma maior interação entre ASB e OMA, fazendo com que o % de α -hélice diminua bruscamente.

Tabela 29. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de 7''-O-metilagatisflavona (OMA), T = 25°C, 37°C e 42°C. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:OMA, C_{ASB} = 1,00 x 10⁻⁶ mol/L e C_{OMA} = 0; 4,12; 8,24; 16,50 e 33,00 (x 10⁻⁶) mol/L.

pH	T (°C)	Amostra	θ_{208} (mdeg)	MRE ₂₀₈ (deg.cm ² /dmol)	% α -hélice
7,4	25	ASB livre (1:0)	-115,482	-19842,2680	54,63
		ASB + OMA (1:4)	-106,381	-18278,5223	49,24
		ASB + OMA (1:8)	-102,32	-17580,7560	46,83
		ASB + OMA (1:16)	-83,4838	-14344,2955	35,67
		ASB + OMA (1:32)	-38,291	-6579,2096	8,89
	37	ASB livre (1:0)	-111,552	-19167,0103	52,30
		ASB + OMA (1:8)	-98,6478	-16949,7938	44,65
	42	ASB livre (1:0)	-114,167	-19616,3230	53,85
		ASB + OMA (1:8)	-92,4498	-15884,8454	40,98
	pH	T (°C)	Amostra	θ_{222} (mdeg)	MRE ₂₂₂ (deg.cm ² /dmol)
7,4	25	ASB livre (1:0)	-108,47	-18637,4570	53,79
		ASB + OMA (1:4)	-105,001	-18041,4089	51,82
		ASB + OMA (1:8)	-102,991	-17696,0481	50,68
		ASB + OMA (1:16)	-98,5144	-16926,8729	48,14
		ASB + OMA (1:32)	-88,6074	-15224,6392	42,52
	37	ASB livre (1:0)	-105,258	-18085,5670	51,97
		ASB + OMA (1:8)	-99,0932	-17026,3230	48,47
	42	ASB livre (1:0)	-104,773	-18002,2337	51,69
		ASB + OMA (1:8)	-96,3008	-16546,5292	46,89

Tabela 30. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de amentoflavona (AMF), T = 25°C, 37°C e 42°C. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:AMF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{AMF} = 0; 4,00; 8,00; 16,00$ e $32,00 (x 10^{-6})$ mol/L.

pH	T (°C)	Amostra	θ_{208} (mdeg)	MRE ₂₀₈ (deg.cm ² /dmol)	% α -hélice
7,4	25	ASB livre (1:0)	-115,482	-19842,2680	54,63
		ASB + AMF (1:4)	-110,483	-18983,3333	51,67
		ASB + AMF (1:8)	-108,398	-18625,0859	50,43
		ASB + AMF (1:16)	-107,658	-18497,9381	49,99
		ASB + AMF (1:32)	-105,975	-18208,7629	49,00
	37	ASB livre (1:0)	-111,552	-19167,0103	52,30
		ASB + AMF (1:8)	-108,307	-18609,4502	50,38
	42	ASB livre (1:0)	-114,167	-19616,3230	53,85
		ASB + AMF (1:8)	-106,103	-18230,7560	49,07
	pH	T (°C)	Amostra	θ_{222} (mdeg)	MRE ₂₂₂ (deg.cm ² /dmol)
7,4	25	ASB livre (1:0)	-108,47	-18637,4570	53,79
		ASB + AMF (1:4)	-103,576	-17796,5636	51,01
		ASB + AMF (1:8)	-101,023	-17357,9038	49,56
		ASB + AMF (1:16)	-99,7163	-17133,3849	48,82
		ASB + AMF (1:32)	-95,7866	-16458,1787	46,59
	37	ASB livre (1:0)	-105,258	-18085,5670	51,97
		ASB + AMF (1:8)	-102,19	-17558,4192	50,23
	42	ASB livre (1:0)	-104,773	-18002,2337	51,69
		ASB + AMF (1:8)	-99,3842	-17076,3230	48,63

Tabela 31. % α -Hélice calculado em 208 nm e em 222 nm para ASB (pH = 7,4) na presença de diidrochonaflavona (DOF), T = 25°C, 37°C e 42°C. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASB:DOF, $C_{ASB} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{DOF} = 0; 4,20; 8,40; 16,80$ e $33,60 (x 10^{-6})$ mol/L.

pH	T (°C)	Amostra	θ_{208} (mdeg)	MRE ₂₀₈ (deg.cm ² /dmol)	% α -hélice
7,4	25	ASB livre (1:0)	-115,482	-19842,2680	54,63
		ASB + DOF (1:4)	-111,755	-19201,8900	52,42
		ASB + DOF (1:8)	-110,311	-18953,7801	51,56
		ASB + DOF (1:16)	-103,911	-17854,1237	47,77
		ASB + DOF (1:32)	-104,461	-17948,6254	48,10
	37	ASB livre (1:0)	-111,552	-19167,0103	52,30
		ASB + DOF (1:8)	-106,308	-18265,9794	49,19
	42	ASB livre (1:0)	-114,167	-19616,3230	53,85
		ASB + DOF (1:8)	-105,856	-18188,3162	48,93
	pH	T (°C)	Amostra	θ_{222} (mdeg)	MRE ₂₂₂ (deg.cm ² /dmol)
7,4	25	ASB livre (1:0)	-108,47	-18637,4570	53,79
		ASB + DOF (1:4)	-102,11	-17544,6735	50,18
		ASB + DOF (1:8)	-98,6488	-16949,9656	48,22
		ASB + DOF (1:16)	-94,0366	-16157,4914	45,60
		ASB + DOF (1:32)	-83,2144	-14298,0069	39,47
	37	ASB livre (1:0)	-105,258	-18085,5670	51,97
		ASB + DOF (1:8)	-98,3335	-16895,7904	48,04
	42	ASB livre (1:0)	-104,773	-18002,2337	51,69
		ASB + DOF (1:8)	-93,4732	-16060,6873	45,28

Os resultados obtidos para a variação do % α -hélice da estrutura secundária da proteína (ASB), Tabelas 27-31, mostraram uma diminuição com a presença de flavonóides (nas razões molares de ASB:flavonóides de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), quando comparados com os resultados na ausência de flavonóides (ASB:flavonóides na proporção 1:0), indicando que houve interação dos flavonóides com os resíduos de amino ácidos da cadeia principal polipeptídica de ASB e que a rede de ligações hidrogênio foi destruída [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 os flavonóides, avaliada por dicroísmo circular mostrou-se dependente da concentração de flavonóides ministrada e muito pouco da temperatura, ocorrendo, de uma maneira geral, diminuição do % de α -hélice na estrutura da ASB, devido ao aumento de concentração dos flavonóides.

5.3.4 Modelagem molecular (MM)

Apesar das soluções experimentais terem sido manuseadas com total cuidado, em ambientes adequados, de forma a representar condições fisiológicas, é difícil determinar a localização exata dos sítios de ligação. O programa *docking* foi utilizado para examinar a forma de ligação dos favonóides quercetina (QUE), agatisflavona (ATF), 7''-O-metilagatisflavona (OMA), amentoflavona (AMF) e diidrochonaflavona (DOF) com o sítio ativo da albumina sérica bovina (ASB).

Por modelagem molecular foi identificado que existem interações entre os dois resíduos de triptofano da ASB e um resíduo de tirosina da ASB (de menor contribuição) com os flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF). Para alguns desses flavonóides a interação foi maior e para outros menor.

A ASB apresenta dois resíduos de triptofano, Trp-134 e Trp-212, e um resíduo de tirosina, Tyr-409. Por analogia utilizando-se o programa *docking*, verificou-se que os dois resíduos de triptofano correspondentes são Trp-158 e Trp-237, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente, e o resíduo de tirosina correspondente é Tyr-434, situado no subdomínio IIIA (a tirosina tem menor contribuição no processo de interação).

Cálculos de *docking* para avaliar as interações entre os flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) e a ASB foram realizados em torno de 10, 15 e 20 Å. Com o Trp-158, as melhores interações se dividiram entre 15 e 20 Å, pois, a geometria ficou melhor. Com este triptofano em 10 Å, os ligantes (flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF)) ficaram muito na boca ou para fora da cavidade hidrofóbica. Com o Trp-237, em 10, 15 e 20 Å, houve muita interação π , porém, os melhores resultados de interação foram encontrados em torno de 10 Å. Com a Tyr-434, em 10, 15 e 20 Å, todas as interações foram ruins. Comparando-se os resultados de interação entre os flavonóides e os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e entre os flavonóides e o resíduo de tirosina (Tyr-434), os melhores valores pertencem ao sítio de ligação do Trp-237 em 10 Å.

Com isso, para ter um efeito comparativo, estes cálculos feitos por *dockagem* em torno de 10 Å estão mostrados nas Tabelas 32-34, e indicaram que: para o resíduo de triptofano 158 (Trp-158), a melhor interação ocorreu com a diidroochnaflavona (DOF), pois, o valor do fitness foi maior, e a menor interação foi com a quercetina (QUE), conforme mostrado na Tabela 32; para o resíduo de triptofano 237 (Trp-237), a maior interação se deu com a agatisflavona (ATF), maior fitness, e a menor interação foi com a quercetina (QUE), Tabela 33; e para o resíduo de tirosina (Tyr-434), a melhor interação foi com a quercetina (QUE), devido ao seu maior fitness, e a pior interação ocorreu com a agatisflavona (ATF), como apresentado na Tabela 34.

As regiões principais para a ligação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com os sítios de ligação da ASB estão localizadas em cavidades hidrofóbicas nos subdomínios IB e IIA (consistentes com os sítios I e II) e os resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) de ASB estão nesses subdomínios, respectivamente, Figuras 149, 151, 153, 155 e 157. Existe uma grande cavidade hidrofóbica presente no subdomínio IIA (Figuras 150, 152, 154, 156 e 158), onde os flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) podem se ligar com o resíduo de triptofano Trp-237, formando o complexo flavonóide-ASB, pois, o melhor sítio de ligação com os flavonóides está no Trp-237.

Tabela 32. Interação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com o resíduo de triptofano 158 (Trp-158) da ASB por *dockagem* em torno de 10 Å.

Flavonóide	Fitness da Interação com o Trp-158
Quercetina (QUE)	55,48
Agatisflavona (ATF)	57,31
7''-O-Metilagatisflavona (OMA)	60,37
Amentoflavona (AMF)	62,66
Diidroochnaflavona (DOF)	69,04

Tabela 33. Interação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com o resíduo de triptofano 237 (Trp-237) da ASB por *dockagem* em torno de 10 Å.

Flavonóide	Fitness da Interação com o Trp-237
Quercetina (QUE)	58,61
Agatisflavona (ATF)	77,54
7''-O-Metilagatisflavona (OMA)	73,75
Amentoflavona (AMF)	75,34
Diidrochnaflavona (DOF)	62,71

Tabela 34. Interação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com o resíduo de tirosina 434 (Tyr-434) da ASB por *dockagem* em torno de 10 Å.

Flavonóide	Fitness da Interação com a Tyr-434
Quercetina (QUE)	44,26
Agatisflavona (ATF)	-11,11
7''-O-Metilagatisflavona (OMA)	20,72
Amentoflavona (AMF)	42,92
Diidrochnaflavona (DOF)	44,24

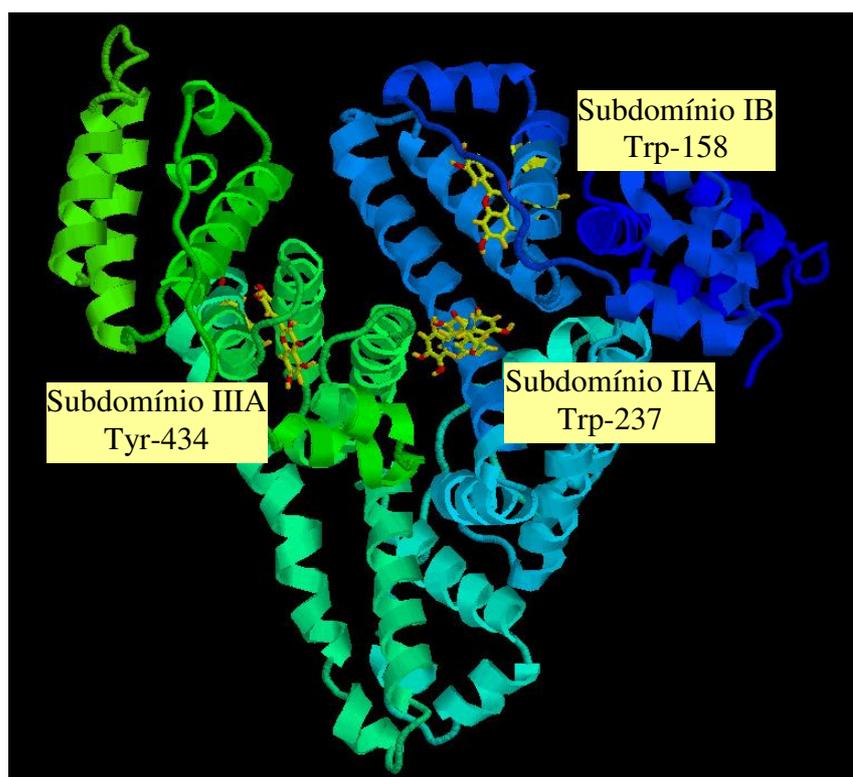


Figura 149. Modelo de ligação entre quercetina (QUE) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por *dockagem* em torno de 10 Å.

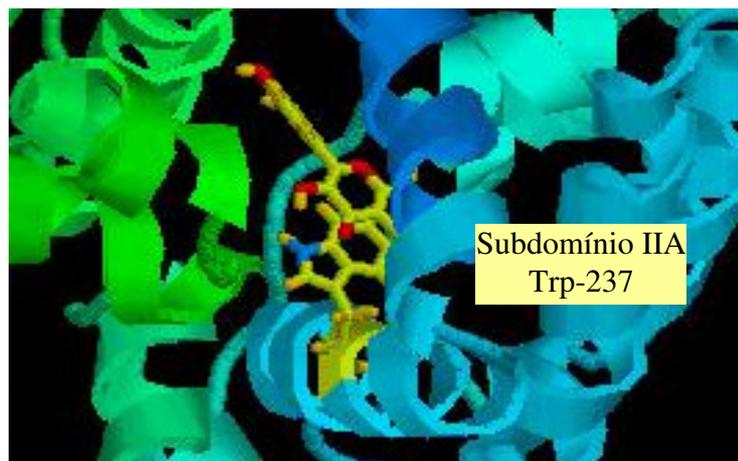


Figura 150. Modelo de ligação entre quercetina (QUE) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por *dockagem* em torno de 10 Å.

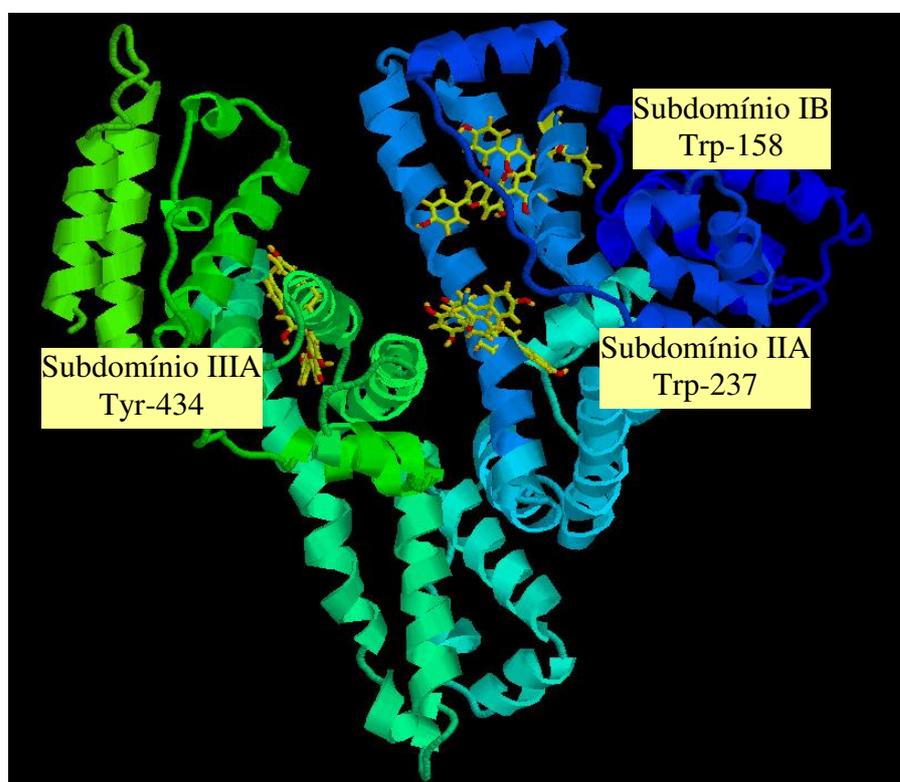


Figura 151. Modelo de ligação entre agatisflavona (ATF) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por *dockagem* em torno de 10 Å.

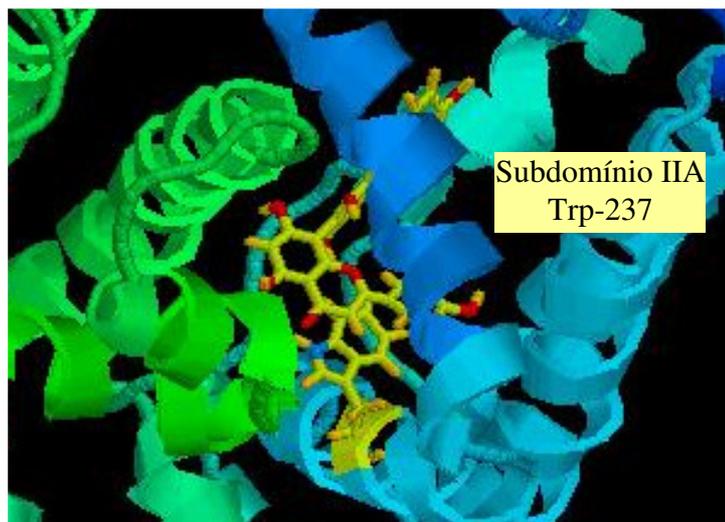


Figura 152. Modelo de ligação entre agatisflavona (ATF) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por *dockagem* em torno de 10 Å.

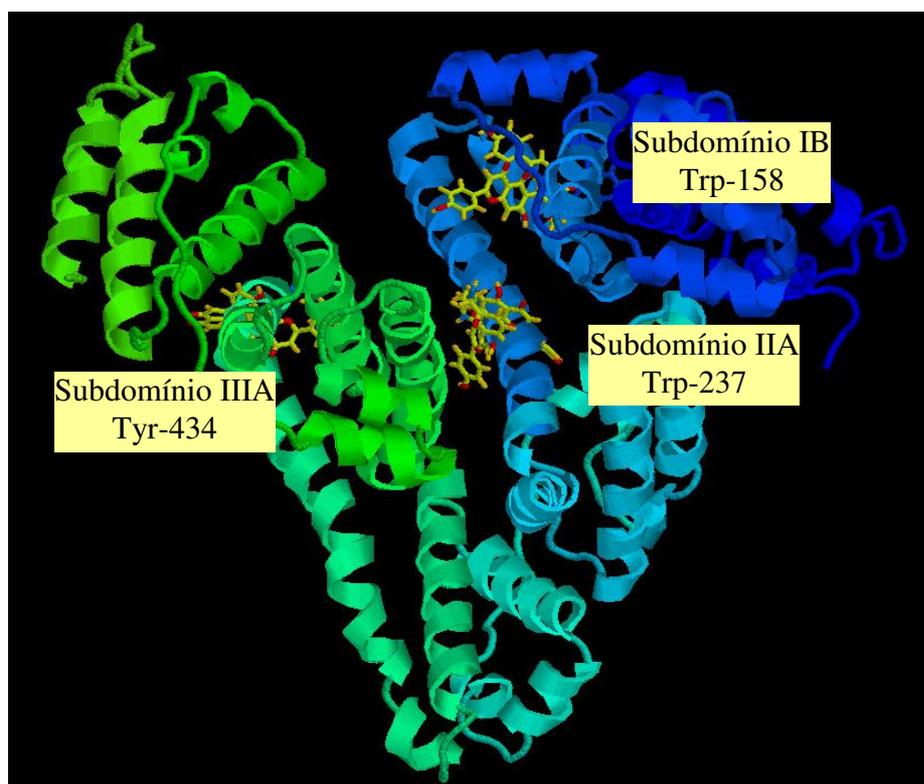


Figura 153. Modelo de ligação entre 7'-*O*-metilagatisflavona (OMA) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por *dockagem* em torno de 10 Å.

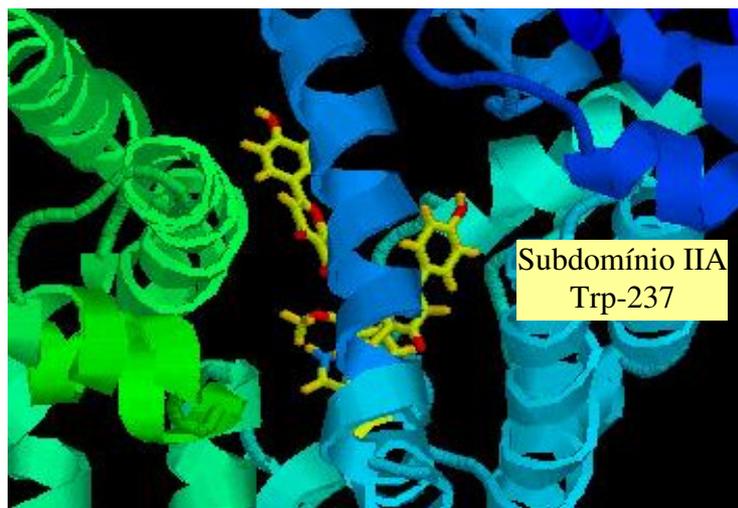


Figura 154. Modelo de ligação entre 7''-*O*-metilagatisflavona (OMA) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por *dockagem* em torno de 10 Å.

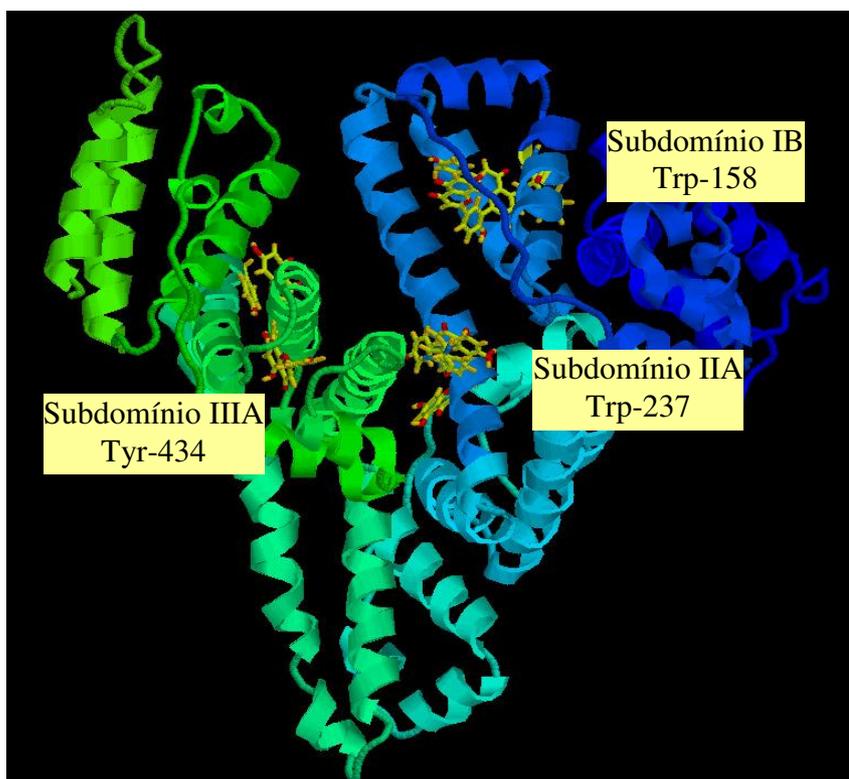


Figura 155. Modelo de ligação entre amentoflavona (AMF) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por *dockagem* em torno de 10 Å.

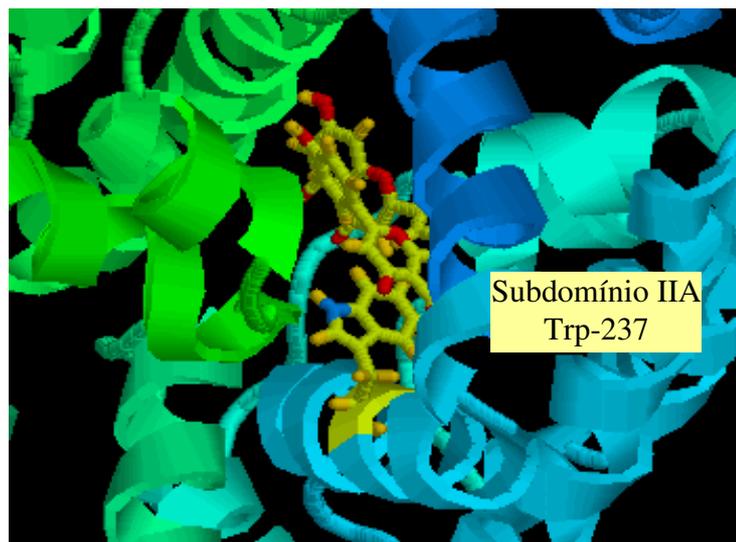


Figura 156. Modelo de ligação entre amentoflavona (AMF) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por *dockagem* em torno de 10 Å.

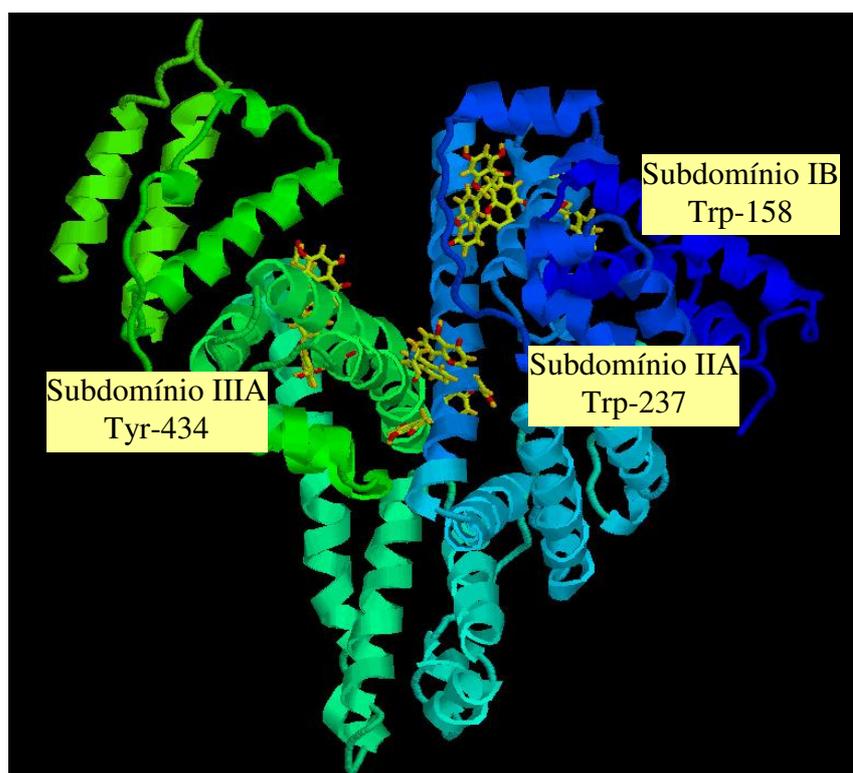


Figura 157. Modelo de ligação entre diidrochalcona (DOF) e ASB para os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e para um resíduo de tirosina (Tyr-434) por *dockagem* em torno de 10 Å.

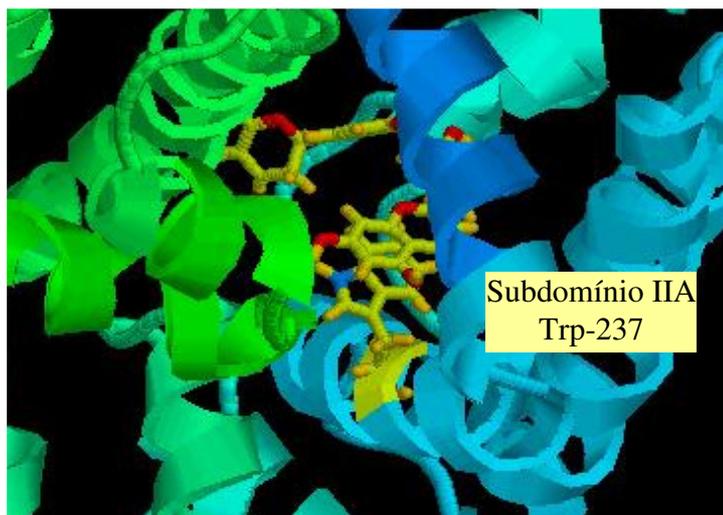


Figura 158. Modelo de ligação entre diidrochalcona (DOF) e ASB para um dos resíduos de triptofano (Trp-237) por *dockagem* em torno de 10 Å.

6 CONCLUSÕES

A irradiação de tioflavona, *S,S*-dióxidotioflavona e tiocromanona, em acetonitrila, por fotólise por pulso de laser de nanossegundo, levou à formação de seus respectivos estados excitados triplete. Através das constantes de velocidade de supressão obtidas para a tiocromanona foi possível observar que na presença de supressores por transferência de hidrogênio, ocorreu a formação do radical cetila derivado da tiocromanona e, com supressor por transferência de elétron, houve a formação do ânion radical derivado da tiocromanona. As constantes de velocidade de supressão obtidas para a tiocromanona com fenóis variaram de $(1,1 \pm 0,1) \times 10^8$ L/mol.s (4-cianofenol) a $(5,8 \pm 1,0) \times 10^9$ L/mol.s (hidroquinona). Um gráfico de Hammett para a reação do triplete de tiocromanona com uma série de fenóis contendo substituintes polares resultou em uma constante de reação $\rho = -0,90$. Este valor negativo para a constante de reação ρ está plenamente de acordo com um mecanismo envolvendo uma transferência acoplada elétron/próton no processo de transferência de hidrogênio do fenol para a carbonila triplete.

Os flavonóides sintéticos comerciais (flavona, *alfa*-naftoflavona, *beta*-naftoflavona, tioflavona, flavanona e quercetina), o flavonóide sintetizado (*S,S*-dióxidotioflavona), os flavonóides naturais (biflavonóides (agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona)) e a tiocromanona, avaliados por espectroscopia de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm), frente a solventes com diferentes polaridades (cicloexano (CEX), diclorometano (DCM), etanol (ETOH), acetonitrina (ACN) e água milli-Q (AD)), não apresentaram emissão de fluorescência.

Para a quercetina e os biflavonóides (agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona), em solventes com diferentes polaridades (diclorometano (DCM), etanol (ETOH), acetonitrina (ACN) e água milli-Q (AD)), os espectros de absorção no UV-Vis mostraram pouquíssima diferença na presença de solventes como ACN, ETOH e AD, quando comparados entre si. Entretanto, na presença de DCM, percebe-se uma grande diferença na comparação dos espectros de UV-Vis de DCM com os de ACN, ETOH e AD. Essas variações de absorção, dependendo do solvente, são devidas às transições $\pi\pi^*$. Para a agatisflavona foi observada total diferença nos seus espectros de absorção em AD e em DCM.

A espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis) para as interações entre ASB e flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidroochnaflavona), indicou mudanças conformacionais na estrutura secundária de ASB, induzidas pela adição de flavonóides. A ASB apresenta uma banda de absorção com forte absorbância em torno de 208 nm, que é característica de estrutura α -hélice de proteína e uma banda de absorção em torno de 280 nm, que é característica da absorção UV-Vis de triptofano (banda de absorção bem mais intensa que a de tirosina) e de tirosina (banda de absorção mais fraca que a de triptofano). Como o triptofano é o responsável pela forte e característica absorção de luz pelas proteínas em comprimento de onda de 280 nm, com o aumento da concentração dos flavonóides ocorreu um pequeno deslocamento hipsocrômico (deslocamento para o azul - menor comprimento de onda) das bandas de absorção próximas a 208 nm e 280 nm (correspondentes a ASB e triptofano, respectivamente), indicando que houve a formação de um complexo entre os flavonóides e a ASB, à medida que a hidrofobicidade vai diminuindo. As regiões principais para a ligação dos flavonóides 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 fármacos, como

por exemplo, os flavonóides, podem se ligar, formando os complexos fármaco-ASB. Para a diidrochonaflavona foram notadas mudanças substanciais quando comparados seus espectros em AD e em solução tampão de PBS (pH = 7,4). Já para quercetina, agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona não foram observadas essas mudanças.

Os espectros de emissão de fluorescência resultantes da interação entre ASB e os flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochonaflavona), nas temperaturas de 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C, mostraram a presença de uma forte emissão de fluorescência (intensidade de emissão de fluorescência máxima) da albumina (ASB) entre 341 e 346 nm ($\lambda_{exc} = 280$ nm), o que indica que a posição de interação entre os flavonóides e a ASB está localizada ou próxima aos resíduos de triptofano. Como não se observa mudanças consideráveis no comprimento de onda de emissão máxima, isto implica em que a adição dos flavonóides não deve mudar a polaridade do microambiente hidrofóbico ao redor do triptofano na ASB. Com o aumento da concentração dos flavonóides ocorreu um leve deslocamento para o azul, na emissão da proteína (ASB), sugerindo que o cromóforo da proteína (ASB) está em um ambiente diferente daquele anterior à adição dos flavonóides (ASB livre), ou seja, o cromóforo da ASB está localizado em um ambiente mais hidrofóbico após a adição de flavonóides, reduzindo a polaridade do ambiente ao redor dos flavonóides, e indicando mudança de conformação na albumina (provável formação do complexo ASB-flavonóides), e que a interação e a transferência de energia foram fortes o suficiente.

Através da supressão de fluorescência dos resíduos de triptofano de ASB pelos flavonóides quercetina, agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochonaflavona, a diferentes temperaturas (22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C), os valores de K_{SV} e k_q demonstram que o provável processo de supressão de ASB pela interação com os flavonóides é estático, em função dos altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão pelos flavonóides ($k_q \cong 10^{13}$ a 10^{14} L/mol.s), e pouco dependentes 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-flavonóides. 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), assim como os valores de k_q da literatura para outras moléculas ($k_q \cong 10^{11}$ a 10^{14} L/mol.s). Os valores de K_a na presença dos flavonóides ($K_a \cong 10^4$ a 10^5 L/mol), deixam evidente que os flavonóides se ligam fortemente a ASB, uma vez que os valores de K_a da literatura para outras moléculas ($K_a \cong 10^4$ a 10^5 L/mol) são considerados para fortes interações entre fármacos e albumina. Os valores de ΔH^0 positivos, em todos os casos, mostraram que o processo de ligação dos flavonóides com a ASB é endotérmico, e os valores de ΔS^0 também positivos evidenciaram que o tipo de interação entre os flavonóides e a ASB é hidrofóbico, e os valores de ΔG^0 negativos ($\Delta G^0 \cong -24$ a -32 kJ/mol) demonstraram a espontaneidade de ligação dos flavonóides com a ASB. Além disso, os valores de ΔS^0 e de ΔH^0 positivos, indicam que a interação entre ASB e os flavonóides é hidrofóbica. Para uma supressão estática, os sítios de ligação são independentes dos sítios equivalentes na macromolécula. O número de sítios de ligação (n) é aproximadamente igual a 1 para quercetina e amentoflavona, e aproximadamente igual a 2 para agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona e diidrochonaflavona. Isso indica que para quercetina e amentoflavona ($n \cong 1$) existe somente uma interação molecular entre elas e uma molécula de ASB. Já para agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona e diidrochonaflavona, ($n \cong 2$) existem duas interações moleculares de agatisflavona, 7''-*O*-metilagatisflavona e diidrochonaflavona para uma molécula de ASB, e essas interações entre os flavonóides e a albumina (ASB) são do tipo hidrofóbica. E, os valores de K_b fortalecem essa afirmação.

O processo de transferência de energia envolvido na interação entre ASB e os flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochonaflavona) foi verificado a partir da sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência da supressão de ASB ($\lambda_{exc} = 280$ nm) a diferentes temperaturas (T = 22°C, 27°C, 32°C, 37°C e 42°C) e os espectros de absorção UV/visível dos flavonóides ([ASB] = [flavonóides] = $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L). Para as condições de ASB ($K^2 = 2/3$, N = 1,336 e $\phi = 0,15$), o valor da distância entre os flavonóides e o resíduo de triptofano ($r \cong 2$ a 3 nm), foi menor que 7 nm ($r < 7$ nm), para todos os casos de interação entre ASB e flavonóide, o que sugere uma alta probabilidade de ocorrer o fenômeno de transferência de energia entre ASB e flavonóides. Isso está de acordo com a teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster (Teoria de Förster), indicando que ocorreu realmente, um processo de supressão estática na interação entre flavonóides e ASB.

Por dicroísmo circular, para quercetina, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochonaflavona, em diferentes temperaturas (T = 25°C, 37°C e 42°C), nos espectros foram percebidas duas bandas negativas em 208 nm e 222 nm, características de estrutura α -hélice de proteína (contribuintes para a transição $n\pi^*$ da ligação da estrutura α -hélice da ASB), sendo perceptíveis as possíveis mudanças estruturais de ASB induzidas pela adição de flavonóides, uma vez que as suas adições influenciou na elipticidade da estrutura da ASB. Os espectros de dicroísmo circular para ASB na presença e na ausência de flavonóides apresentaram formas semelhantes, com variações somente de intensidade das bandas negativas, o que significa que a estrutura de ASB foi predominantemente α -hélice. A interação dos flavonóides com a ASB resultou na diminuição de ambas as bandas, com alguns flavonóides diminuiu mais e com outros menos, indicando a ocorrência de mudanças consideráveis na estrutura secundária da proteína (ASB), o que pode ser indicativo da formação de complexos entre ASB e os flavonóides. As bandas positivas e negativas em comprimentos de onda acima de 240 nm ($\lambda > 240$ nm), características de quiralidade, mostraram-se mais significativas para agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona e diidrochonaflavona. Para amentoflavona está pouco perceptível, mas, também existe, uma vez que a quiralidade é mais comum em biflavonóides. A variação do % de α -hélice da estrutura secundária da proteína (ASB), apresentou uma diminuição com a presença de flavonóides (nas razões molares de ASB:flavonóides de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), quando comparados com os resultados na ausência de flavonóides (ASB livre), indicando que houve interação dos flavonóides com os resíduos de amino ácidos da cadeia principal polipeptídica de ASB, e que a rede de ligações hidrogênio foi destruída, indicando a possível formação do complexo ASB-flavonóides. 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 ASB e os flavonóides, foi dependente da concentração de flavonóides e muito pouco da temperatura, ocorrendo, de uma forma geral, diminuição do % de α -hélice na estrutura secundária da ASB, em função do aumento de concentração dos flavonóides.

Sendo assim, a interação entre a albumina sérica bovina (ASB) e os flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochonaflavona) depende da concentração de flavonóides e muito pouco da temperatura. Esses efeitos podem ser atribuídos à formação de um complexo ASB-flavonóides que pode estar induzindo variações conformacionais na estrutura secundária α -hélice na ASB.

Por modelagem molecular (programa *docking*) foi identificado que existem as interações entre os sítios ativos da albumina sérica bovina (ASB) (os dois resíduos de triptofano da ASB e um resíduo de tirosina da ASB (de menor contribuição)) com os flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7''-O-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochonaflavona). Para alguns desses flavonóides a interação foi maior e para outros menor. A ASB apresenta dois resíduos de triptofano, Trp-134 e Trp-212, e um resíduo de

tirosina, Tyr-409, que são análogos à dois resíduos de triptofano correspondentes, Trp-158 e Trp-237, localizados nos subdomínios IB e IIA, respectivamente, e à um resíduo de tirosina correspondente, Tyr-434, situado no subdomínio IIIA (a tirosina tem menor contribuição no processo de interação). Através de cálculos de *docking* e comparando-se os resultados de interação entre os flavonóides e os dois resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) e entre os flavonóides e o resíduo de tirosina (Tyr-434), os melhores valores pertencem ao sítio de ligação do Trp-237 em 10 Å, onde a maior interação ocorreu com a agatisflavona (ATF) e a menor interação foi com a quercetina (QUE). Dessa forma, as regiões principais para a ligação dos flavonóides (QUE, ATF, OMA, AMF e DOF) com os sítios de ligação da ASB estão localizadas em cavidades hidrofóbicas nos subdomínios IB e IIA (consistentes com os sítios I e II) e os resíduos de triptofano (Trp-158 e Trp-237) de ASB estão nesses subdomínios, respectivamente. Existe uma grande cavidade hidrofóbica presente no subdomínio IIA, onde os flavonóides podem se ligar com o resíduo de triptofano Trp-237 (o melhor sítio de ligação com os flavonóides está no Trp-237), formando o complexo flavonóide-ASB.

7 SUGESTÕES FUTURAS

Estudar a interação entre a albumina sérica bovina (ASB) e os flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7"-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochnaflavona) por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível e por espectroscopia de emissão de fluorescência e dicroísmo circular em diferentes temperaturas, mantendo-se fixa a concentração de flavonóides e utilizando-se a albumina sérica bovina como supressor, pH = 7,4, em PBS.

Estudar a interação entre albumina sérica humana (HSA) e os flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7"-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochnaflavona) por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível e por espectroscopia de emissão de fluorescência e dicroísmo circular em diferentes temperaturas, mantendo-se fixa a concentração de albumina sérica humana e utilizando-se os flavonóides como supressores, pH = 7,4, em PBS.

Estudar a interação entre albumina sérica humana (HSA) e os flavonóides (quercetina, agatisflavona, 7"-*O*-metilagatisflavona, amentoflavona e diidrochnaflavona) por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível e por espectroscopia de emissão de fluorescência e dicroísmo circular em diferentes temperaturas, mantendo-se fixa a concentração de flavonóides e utilizando-se a albumina sérica humana como supressor, pH = 7,4, em PBS.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, B.; Parveen, S.; Khan, R. H. *Biomacromol.* **2006**, *7*, 1350.
- Andlauer, W.; Fürst, P. *Cer. Foods Worl.* **1998**, *43*, 356.
- Ashoka, S.; Seetharamappa, J.; Kandagal, P. B.; Shaikh, S. M. T. *J. Luminesc.* **2006**, *121*, 179.
- Atkins, P.; De Paula, J. *Físico-Química*, 7^a Ed., LTC, **2004**, 2.
- Banerjee, A.; Basu, K.; Sengupta, P. K. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2008**, *90*, 33.
- Baptista, M. S.; Indig, G. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4678.
- Bapistha, M.; Indig, G. L. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4678.
- Baroni, S.; Mattu, M.; Vannini, A.; Cipollone, R.; Aime, S.; Ascenzi, P.; Fasano, M. *Eur. J. Biochem.* **2001**, *268*, 6214.
- Barroso, G. M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. UFV, MG, **1986**.
- Bhattacharya, A. A.; Curry, S.; Franks, N. P. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 38731.
- Beecher, G. R. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 3248S.
- Bensasson, R.; Land, E. J.; Mavdinas, B. *Photochem. Photobiol.* **1976**, *23*, 189.
- Bensasson, R. V.; Land, E. J.; Truscott, T. G. *Flash photolysis and pulse radiolysis: contributions to the chemistry of biology and medicine*. Pergamon, Oxford, **1983**.
- Bertoti, A. R.; Guimarães, A. K.; Ferreira, J. C. N. *28a. Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Poços de Caldas, **2005**.
- Bertoti, A. R.; Ferreira, J. C. N. *29a. Reunião da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, **2006**.
- Bi, S.; Song, D.; Tian, Y.; Zhou, X.; Liu, Z.; Zhang, H. *Spectrochim. Acta Part A* **2005**, *61*, 629.
- Bohm, B. A. *Introduction to flavonoids*. Harwood Academic Publishers, **1998**.
- Braga, R. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. Imprensa Oficial, Fortaleza, **1960**.
- Bueno, C. J.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6891.
- Burda, S.; Oleszek, W. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2774.
- Cahill, J. E.; Padera, F. G. *Amer. Lab.* **1980**, *12*, 109.
- Carvalho, I.; Pupo, M. T.; Borges, A. D. L.; Bernardes, L. S. C. *Quím. Nova* **2003**, *26*, 3.
- Chapman; Hall *The flavonoids. Advances in research*. Ed. J. B. Harborne e T. J. Mabry, London, Publ. **1982**.
- Chapman; Hall *The flavonoids*. Ed. J. B. Harborne, London, Publ. **1994**.
- Chari, V. M.; Chen, F.; Chen, L.; Ilyas, M.; Lin, Y. C.; Lin, Y. M.; Neszmely, A.; Wagner, H. *Phytochem.* **1977**, *16*, 1273.
- Chen, G. Z.; Huang, X. Z.; Xu, J. G.; Zheng, Z. Z.; Wang, Z. B. *The methods of fluorescence analysis*, Science Press, Beijing, **1990**.
- Chen, L.; Li, J.; Luo, C.; Liu, H.; Xu, W.; Chen, G.; Liew, O. W.; Zhu, W.; Puah, C. M.; Shen, X.; Jiang, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 8295.
- Chen, L.; Rinco, O.; Popov, J.; Vuong, N.; Johnston, L. J. *Photochem. Photobiol.* **2006**, *82*, 31.
- 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.
- Christoff, M.; Toscano, V. G.; Baader, W. J. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1996**, *101*, 11.
- Cordeiro, Y. M. L. *Bases estruturais e termodinâmicas para conversão conformacional da proteína do prion e possíveis implicações sobre a patogenicidade*. Tese de Doutorado, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Fevereiro, **2005**.

- Cortes, S. F.; Valadares, M. Y.; De Oliveira, A B.; Lemos, S. V.; Barbosa, M. P. T.; Braga, F. *C. Planta Med.* **2002**, *68*, 412.
- 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.
- Cui, F. L.; Fan, J.; Ma, D. L.; Liu, M. C.; Chen, X. G.; Hu, Z. D. *Anal. Lett.* **2003**, *36*, 2151.
- Cui, F. L.; Fan, J.; Li, P. G.; Hu, Z. D. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 151.
- Cui, F. L.; Fan, J.; Li, W.; Fan, Y. C.; Hu, Z. D. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *34*, 189.
- Cui, F. L.; Qin, L. X., Gui-Sheng Zhang, G. S.; Yao, X. J.; Du, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, *42*, 221.
- Da Silva, V. C. *Metabólitos especiais isolados das raízes de Andira anthelmia (Vell.) Macbr. e Andira fraxinifolia Benth. (Leguminosae) e das folhas de Palicourea coriacea (Cham.) K. Schum. (Rubiaceae)*. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Novembro, **2006**.
- Dahlgren, R. M. T. *Bot. J. Line Soc.* **1980**, *80*, 91.
- Daniel, J. F. de S.; De Carvalho, M. G.; Cardoso, R. da S.; Agra, M. de F.; Eberlin, M. N. *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16*, 634.
- De Aguiar, C. L.; De Alencar, S. M.; Tsai, S. M.; Park, Y. K. *B. CEPPA* **2007**, *25*, 61.
- Degáspari, C. H.; Waszczyński, N. *Vis. Acad.* **2004**, *5*, 33.
- De Carvalho, M. G.; Alves, C. C. F.; Silva, K. G. S.; Eberlin, M. N.; Werle, A. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 146.
- De Carvalho, M. G.; De Carvalho, G. J. A.; Braz-Filho, R. *J. Braz. Chem. Soc.* **2000**, *11*, 143.
- De Carvalho, M. G.; Oliveira, M. C. C.; Werle, A. A. *J. Braz. Chem. Soc.* **2002**, *11*, 232.
- De Lucas, N. C.; Netto-Ferreira, J. C. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **1998**, *116*, 203.
- De Lucas, N. C.; Correa, R. J.; Albuquerque, A. C. C.; Firme, C. L.; Garden, S. J.; Bertoti, A. R.; Netto-Ferreira, J. C. *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 1117.
- De Lucas, N. C.; Elias, M. M.; Firme, C. L.; Correa, R. J.; Garden, S. J.; Netto-Ferreira, J. C.; Nicodem, D. E. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2009**, *201*, 1.
- De Oliveira, M. M.; Sampaio, M. P.; Simon, F.; Gilbert, B.; Mors, W. B. *An. Acad. Bras. Ciênc.* **1972**, *44*, 41.
- Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A. A.; Capasso, F. *Life Sci.* **1999**, *65*, 337.
- Dora, G.; Edwards, J. M. *J. Nat. Prod.* **1991**, *54*, 796.
- Dos Santos, C. B. *Contribuição ao estudo químico de ouratea parviflora (Ochnaceae)*. Monografia, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Setembro, **2009**.
- Dose, K. *Bioquímica*. EPU/Springer, EDUSP, São Paulo, **1982**.
- Drewes, S. E.; Hudson, N. A.; Bates, R. B.; Linz, G. S. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 105.
- Edelhoch, H. *Biochem.* **1967**, *6*, 1948.
- 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**.
- Felício, J. D.; Gonçalves, E.; Braggio, M. M.; Constantino, L.; Albasini, A.; Lins, A. P. *Planta Med.* **1995**, *61*, 217.
- Felício, J. D.; Rossi, M. H.; Braggio, M. M.; Gonzalez, E.; Pak, A.; Cordeiro, I.; Felício, R. C. *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 79.

- Fernandes, R. D. *Estudo químico e atividades biológicas de Ouratea hexasperma var. planchonii Engl. (Ochnaceae)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Julho, **2008**.
- 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.
- Gill, S. C.; von Hippel, P. H. *Anal. Biochem.* **1989**, 182, 319.
- Gonçalez, E.; Felício, J. D.; Pinto, M. M. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2001**, 34, 1453.
- Gugler, R.; Leschik, M.; Dengler, H. J. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **1975**, 9, 229.
- Guo, M.; Zou, J. W.; Yi, P. G.; Shang, Z. C.; Hu, G. X.; Yu, Q. S. *Anal. Sci.* **2004**, 20, 465.
- Hammett, L. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1937**, 59, 96.
- Hammett, L. P. *Trans. Faraday Soc.* **1938**, 34, 156.
- 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, 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, X. M.; Carter, D. C. *Nature* **1992**, 358, 209.
- Hecht, E. *Optics*. 3rd Ed., Addison Wesley Longman, Massachusetts, **1998**.
- Heller, W.; Forkmann, G. *The Flavonoids: advances in research since 1980*. Chapman & Hall, London, **1988**, 399.
- Hepel, M. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1401.
- Hermann, A. P.; Willems, M.; Janke, H. D. *Water Res.* **2001**, 35, 2575.
- Hodek, P.; Trefil, P.; Stiborová, M. *Chem. Biol. Interact.* **2002**, 139, 1.
- Horrocks Jr., W. D. W.; Collier, W. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2856.
- Hu, Y. J.; Liu, Y.; Shen, X. S.; Fang, X. Y.; Qu, S. S. *J. J. Mol. Struct.* **2005**, 738, 143.
- Hu, Y. J.; Liu, Y.; Wang, J. B.; Xiao, X. H.; Qu, S. S. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 36, 915.
- Hu, Y. J.; Liu, Y.; Zhang, L. X.; Zhao, R. M.; Qu, S. S. *J. Mol. Struct.* **2005**, 750, 174.
- Il'chev, Y. V.; Perry, J. L.; Simon, J. D. *J. Phys. Chem. B* **2002**, 106, 460.
- Johnson, W. C. Jr. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* **1988**, 17, 145.
- Joly, A. B. B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 12a ed., Cia Editora Nacional, São Paulo, **1988**.
- Kanakakis, C. D.; Tarantilis, P. A.; Polissiou, M. G.; Diamantoglou, S.; Riahi, H. A. T. *J. Mol. Struct.* **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.
- Karreman, G.; Steele, R. H.; Györgyi, A. S. *Biochem.* **1967**, 11, 140.
- Kelly, S. M.; Tess, T. J.; Price, N. C. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, 1751, 119.
- Khan, M. A.; Muzzamil, S.; Musarrat, J. *Int. J. Biol. Macromol.* **2002**, 30, 243.
- Khan, S. N.; Islam, B.; Rajeswari, M. R.; Usmani, H.; Khan, A. U. *Acta Biochim. Polonica* **2008**, 55, 399.
- Koes, R. E.; Quattrocchio, F.; Mol, J. N. M. *Bioessays* **1994**, 16, 123.
- Kragh-Hansen, U.; Chuang, V. T. G.; Otagiri, M. *Biol. Pharm. Bull.* **2002**, 25, 695.
- Kumar, C.V.; Chattopadhyay; Das, P. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 5143.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; García-Parilla, M. C.; Troncoso, A. M.; Fett, R. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2004**, 24, 691.

- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum Press, New York, **1999**.
- Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third ed., Springer, **2006**, 278.
- Lameira, J.; Medeiros, I. G.; Reis, M.; Santos, A. S.; Alves, C. N. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7105.
- Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2ª. Ed., Sarvier, São Paulo, **1993**.
- Li, D.; Ji, B.; Sun, H. *Spectrochim. Acta Part A* **2009**, *73*, 35.
- Li, D.; Zhu, J.; Jin, J.; Yao, X. *J. Mol. Struct.* **2007**, *846*, 34.
- Li, J.; Ren, C.; Zhang, Y.; Liu, X.; Yao, X.; Hu, Z. *J. Mol. Struct.* **2008**, *885*, 64.
- Li, Y.; Yao, X.; Jin, J.; Chen, X.; Hu, Z. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1774*, 51.
- Likhitwitayawuid, K.; Rungserchai, R.; Ruangrunsi, N.; Phadungcharoen, T. *Phytochem.* **2001**, *56*, 353.
- Lin, Y. M.; Flavin, M. T.; Schure, R.; Chen, F. C.; Sidwell, R.; Barnard, D. L.; Huffman, J. H.; Kern, E. R. *Planta Med.* **1999**, *65*, 120.
- Lindqvist, C. R. *Hebd. Scé. Acad. Sci., Ser. C* **1966**, *263*, 852.
- Liu, J.; Tian, J. N.; Zhang, J.; Hu, Z.; Chen, X. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *376*, 864.
- Lopes, R. M.; De Oliveira, T. T.; Nagem, T. J.; Pinto, A. S. *Biotechnol. Ciênc. Desenvolv.* **2007**, *18*.
- Mahesha, H. G.; Singh, S. A.; Srinivasan, N.; Rao, A. G. A. *FEBS J.* **2006**, *273*, 451.
- Mamede, M. E. O.; Pastore, G. M. *B CEPPA* **2004**, *22*, 233.
- Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L. *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, *79*, 727.
- Marcol, P. Q.; Lima, E. O.; Maia, R. F.; Xavier, L. F. *Chem. Abst.* **1988**, *108*, 399.
- Mbing, J. N.; Pegnyemb, D. E.; Tih, R. G.; Sondengam, B. L.; Blond, A.; Bodo, B. *Phytochem.* **2003**, *63*, 427.
- Messanga, B. B.; Kimbu, S. F.; Sondengam, B. L.; Bodo, B. *Phytochem.* **2002**, *59*, 435.
- 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.
- Monici, M.; Mulinacci, P.; Baglioni, P.; Vincieri, F. F. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **1993**, *20*, 167.
- Montanari, C. A.; Bolzani, V. S. *Quím. Nova.* **2001**, *24*, 105.
- Monti, S.; Manet, I.; Manoli, F.; Ottani, S.; Marconi, G. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 805.
- Moreira, I. C.; De Carvalho, M. G.; Bastos A B. F.; Braz-Filho, R. *Phytochem.* **1999**, *51*, 833.
- Moreira, I. C.; Sobrinho, D. C.; De Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R. *Phytochem.* **1994**, *35*, 1567.
- Moriyama, Y.; Ohta, D.; Hachiya, K.; Mitsui, Y.; Takeda, K. *Protein Chem.* **1996**, *15*, 265.
- Moser, J.; Boscá, F.; Lovell, W. W.; Castell, J. V.; Miranda, M. A.; Hye, A. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2000**, *58*, 13.
- Müzell, D. P. *Propriedades biológicas de extratos de Melissa officinalis L. (Lamiaceae) em ratos wistar*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, **2006**.
- Navea, S.; Tauler, R.; Goormaghtigh, E.; De Juan, A. *Protein* **2006**, *63*, 527.
- Netto-Ferreira, J. C.; Bernardes, B.; Ferreira, A. B. B.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2008**, *7*, 467.
- Netto-Ferreira, J. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Bernardes, B.; Ferreira, A. B. B.; Miranda, M. A. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, *10*, 6645.
- Netto-Ferreira, J. C.; Lhiaubet-Vallet, V.; Bernardes, B.; Ferreira, A. B. B.; Miranda, M. A. *Photochem. Photobiol.* **2009**, *85*, 153.

- Oberg, K. A.; Uversky, V. M. *Pro. Pept. Lett.* **2001**, *8*, 297.
- 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.
- Park, K. H.; Park, Y.; Han, J.; Im, K.; Lee, B. W.; Jeong, I. Y.; Jeong, T.; Lee, W. S. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *16*, 5580.
- Pastukhov, A. V.; Levchenko, L. A.; Sadkov, A. P. *J. Mol. Struct.* **2007**, *842*, 60.
- Patrick, G. L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 2nd ed., Oxford University Press, Oxford, **2001**.
- Pegnyemb, D. E.; Tih, R. G.; Sondengam, B. L.; Blond, A.; Bodo, B. *Phytochem.* **2001**, *57*, 579.
- Peters, T. *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA, **1996**.
- Peterson, J.; Dwyer, J. *Nutri. Res.* **1998**, *18*, 1995.
- Petitpas, I.; Bhattacharya, A.; Twine, S.; East, M.; Curry, S. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22804.
- Pietta, P. G. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 1035.
- Porter, G.; Friess, S. L.; Lewis, E. S.; Weissberger, A. *Techniques of Organic Chemistry*. 2nd Ed., Wiley-Interscience, New York, Part 2, **1963**, *8*, 1055.
- 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.
- Rabek, J. F. *Experimental Methods in Photochemistry and Photophysics*. Wiley, New York, Part 2, **1982**, *23*.
- Ross, P. D.; Subramanian, S. *Biochem.* **1981**, *20*, 3096.
- Sampaio, M. P.; De Oliveira, M. M. *An. Acad. Bras. Cienc.* **1975**, *47*, 149.
- Sant' Anna, C. M. R. *Quím. Nova* **2002**, *25*, 505.
- Schulman, S. G. *Molecular luminescence spectroscopy: methods & applications – Part 1. Chemical analysis*. Ed. John Wiley & Sons, New York, **1975**, *77*, 230.
- Sengupta, B.; Sengupta, P. K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *299*, 400.
- Serra, A. C.; de Lucas, N. C.; Netto-Ferreira, J. C. *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 481.
- 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.
- Shukla, D.; Schepp, N. P.; Mathivan, N.; Johnston, L. J. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 1820.
- Silva, M. T.; Netto-Ferreira, J. C. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **2004**, *162*, 225.
- Silverstein, R. M.; Bassler, G. C.; Morrill, T. C. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*. 5^a Ed., Editora Guanabara Koogan, **1994**.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gusman, G.; Mello, J. C. P. de; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. UFSC/ UFRGS, Florianópolis/Porto Alegre, **2001**.
- Sklar, L. A.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D. *Biochem.* **1977**, *16*, 5100.
- Smith, D. A.; Banks, S. W. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. Ed. V. Cody, E. Middleton e J. B. Harborne, Alan R. Liss, New York, **1986**.
- Smith, D. A.; Banks, S. W. *Plant flavonoids in biology and medicine: biochemical, pharmacological and structure-activity relationships*. Ed. V. Cody, E. Middleton e J. B. Harborne, Alan R. Liss, New York, **1986**.

- Stan, D.; Matei, I.; Mihailescu, C.; Savin, M.; Matache, M.; Hillebrand, M.; Baciú, I. *Mol.* **2009**, *14*, 1614.
- Stern, O.; Volmer, M. *Physik. Z.* **1919**, *20*, 183.
- Stryer, L. *Biochemistry*. 4th. 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.
- Suzart, L. R. *Considerações sobre os gêneros Ouratea e Luxemburgia, estudo químico de duas espécies de Ochnaceae: Ouratea hexasperma St. Hil e Ouratea cuspidata St. Hil e atividades biológicas*. Dissertação de Doutorado, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Fevereiro, **2007**.
- Suzart, L. R.; Daniel, J. F. S.; De Carvalho, M. G.; Kaplan, M. A. C. *Quím. Nova* **2007**, *30*, 984.
- 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.
- Thavasi, V.; Leong, L. P.; Bettens, R. P. A. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 4918.
- Tih, A.; Martin, M. T.; Tih, R. G.; Vuidepot, I.; Sondengam, B. L.; Bodo, B. *Phytochem.* **1992**, *31*, 3595.
- Tih, R. G.; Sondengam, B. L.; Martin, M. T.; Bodo, B. *Phytochem.* **1989**, *28*, 1557.
- Trueba, G. P. *Rev. Cubana Invest. Biomed.* **2003**, *22*, 48.
- Vayá, I.; Jiménez, M. C.; Miranda, M. A. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 2694.
- 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.
- Velandia, J. R.; De Carvalho M. G.; Braz-Filho, R. *Quím. Nova* **1998**, *21*, 397.
- Velandia, J. R.; De Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R.; Werle A. A. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 283.
- Volp, A. C.; Renhe, I. R. T.; Barra, K.; Stringueta, P. C. *Rev. Bras. Nutr. Clin.* **2008**, *23*, 141.
- Wang, N.; Ye, L.; Zhao, B. Q.; Yu, J. X. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **2008**, *41*, 589.
- Weast, R. C. *CRC Handbook of Chemistry and Physics*. 51st. Ed., Published by The Chemical Rubber Co., 18901 Cranwood Parkway, Cleveland, Ohio, **1971**, 44128.
- Wei, Y. L.; Li, J. P.; Dong, C.; Shuang, S. M.; Liu, D. S.; Huie, C. W. *Talanta* **2006**, *70*, 377.
- Wermuth, G.; Ganellin, C. R.; Lindberg, P.; Mitscher, L. A. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1129.
- West, M. A. *Creation and Detection of the Excited State*. W. ware, Ed., M. Dekker, New York, **1976**, *4*, 217.
- 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.
- Yan, H.; Zhao, S.; Yang, J.; Zhu, X.; Dai, G.; Liang, H.; Pan, F.; Weng, L. *J. Sol. Chem.* **2009**, 38, 1183.
- Yang, P.; Gao, F. *The principle of bioinorganic chemistry*, Science Press, Beijing, **2002**, 349.
- Yokozawa, T.; Dong, E.; Liu, Z.W.; Shimizu, M. *Phytother. Res.* **1997**, 11, 446.
- Yuan, T.; Weljie, A. M.; Vogel, H. J. *Biochem.* **1998**, 37, 3187.
- Yue, Y.; Zhang, Y.; Qin, J.; Chen, X. *J. Mol. Struc.* **2008**, 888, 25.
- Yue, Y.; Zhang, Y.; Li, Y.; Zhu, J.; Qin, J.; Chen, X. *J. Luminesc.* **2008**, 128, 513.
- Zhang, G.; Que, Q.; Pan, J.; Guo, J. *J. Mol. Struc.* **2008**, 881, 132.
- Zhang, L. W.; Wang, K.; Zhang, X. X. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 603, 101.
- Zhang, N. Y.; Fasco, M. J.; Huang, L.; Guengerich, F. P.; Kaminsky, L. S. *Cancer Res.* **1996**, 56, 3926.
- Zou, L.; Harkey, M. R.; Henderson, G. L. *Phytomed.* **2002**, 9, 263.
- Zsila, F.; Bikádi, Z.; Simonyi, M. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65, 447.
- Zubik, J. R.; Sulkowska, A.; Pozycka, J.; Gazdzicka, K.; Bojko, B.; Jurczyk, M. M.; Sulkowski, W. W. *J. Mol. Struc.* **2009**, 97, 54.
- www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf, visitada em 03/03/2010.
- www2.iq.usp.br/docente/mhgmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf, visitada em 03/03/2010.
- www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/, visitada em 03/03/2010.
- www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html, visitada em 20/03/2007.

ANEXO A

A.1 Flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR)

Os flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR) foram analisados por algumas técnicas. O peso molecular, o ponto de fusão, o teste de solubilidade e a determinação do coeficiente de absorção molar (absortividade molar) acerca desses compostos estão descritos a seguir.

A.1.1 Peso molecular e ponto de fusão

Os pesos moleculares (PM) dos flavonóides e da tiocromanona descritos na literatura [www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html] estão apresentados na Tabela A.1.

Os pontos de fusão (p.f.), não corrigidos, dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e da tiocromanona (TCR), foram medidos. Seus valores foram bem parecidos com os da literatura [www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html], indicando que as amostras, provavelmente, estavam puras, conforme mostrado na Tabela A.1.

Tabela A.1. Peso molecular (da literatura [www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html]) e ponto de fusão (medido e da literatura [www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemical-synthesis/chemical-synthesis-catalog.html]) dos flavonóides e da tiocromanona (TCR).

Molécula	PM (g/mol) (literatura)	p.f. (°C) (medido)	p.f. (°C) (literatura)
Flavona (FVA)	222,24	98 ± 2	97 – 98,5
<i>Alfa</i> -naftoflavona (α -NAF)	272,30	157 ± 2	156 – 159
<i>Beta</i> -naftoflavona (β -NAF)	272,30	166 ± 2	164 – 166
Tioflavona (TFA)	238,31	125 ± 2	125 – 127
<i>S,S</i> -Dióxidotioflavona (SDF)	270,31	133 ± 2	–
Flavanona (FNA)	224,26	74 ± 2	76 – 78
Tiocromanona (TCR)	164,23	30 ± 2	28 – 30

A.1.2 Teste de solubilidade

A solubilidade dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e da tiocromanona (TCR), foi avaliada frente a vários solventes e está mostrada na Tabela A.2.

Tabela A.2. Solubilidade dos flavonóides e da tiocromanona (TCR) em diversos solventes.

Molécula/Solvente	Solubilidade
Flavona (FVA)	
Água destilada	insolúvel
Metanol	solúvel

Etanol	solúvel
Acetato de Etila	solúvel
Acetona	solúvel
Acetonitrila	solúvel
Diclorometano	solúvel
Clorofórmio	solúvel
Cicloexano	solúvel
Hexano	insolúvel
<hr/>	
<i>Alfa-naftoflavona (α-NAF)</i>	
Água destilada	insolúvel
Metanol	solúvel a quente
Etanol	solúvel a quente
Acetato de Etila	solúvel
Acetona	solúvel a quente
Acetonitrila	solúvel
Diclorometano	solúvel
Clorofórmio	solúvel
Cicloexano	solúvel
Hexano	insolúvel
<hr/>	
<i>Beta-naftoflavona (β-NAF)</i>	
Água destilada	insolúvel
Metanol	solúvel a quente
Etanol	solúvel a quente
Acetato de Etila	solúvel
Acetona	solúvel a quente
Acetonitrila	solúvel
Diclorometano	solúvel
Clorofórmio	solúvel
Cicloexano	solúvel
Hexano	insolúvel
<hr/>	
<i>Tioflavona (TFA)</i>	
Água destilada	insolúvel
Metanol	solúvel a quente
Etanol	solúvel a quente
<hr/>	
Acetato de Etila	solúvel
Acetona	solúvel a quente
Acetonitrila	Solúvel
Diclorometano	Solúvel
Clorofórmio	Solúvel
Cicloexano	Solúvel
Hexano	insolúvel
<hr/>	
<i>S,S-Dióxidotioflavona (SDF)</i>	
Água destilada	insolúvel
Metanol	solúvel
Etanol	solúvel
Acetato de Etila	solúvel
Acetona	solúvel
Acetonitrila	solúvel
Diclorometano	solúvel
Clorofórmio	solúvel

Cicloexano	solúvel
Hexano	insolúvel
Flavanona (FNA)	
Água destilada	insolúvel
Metanol	solúvel
Etanol	solúvel
Acetato de Etila	solúvel
Acetona	solúvel
Acetonitrila	solúvel
Diclorometano	solúvel
Clorofórmio	solúvel
Cicloexano	solúvel
Hexano	solúvel
Tiocromanona (TCR)	
Água destilada	insolúvel
Metanol	solúvel
Etanol	solúvel
Acetato de Etila	solúvel
Acetona	solúvel
Acetonitrila	solúvel
Diclorometano	solúvel
Clorofórmio	solúvel
Cicloexano	solúvel
Hexano	solúvel

A.1.3 Caracterização

Os flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR) foram caracterizados por determinação estrutural, utilizando-se as seguintes técnicas: espectroscopia de infravermelho (FTIR), Anexo A, ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C), Anexo B, e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), Anexo C. Seus resultados foram condizentes com os da literatura, indicando que essas amostras de flavonóides e tiocromanona (TCR) estavam realmente puras. Os espectros característicos de cada uma delas estão apresentados nos Anexos A.A, A.B e A.C.

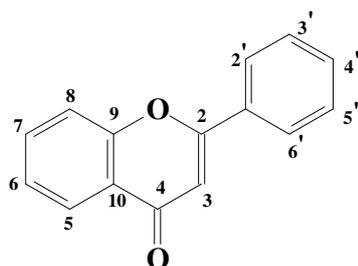
A.1.3.1 Flavona (FVA)

Aspecto: sólido branco.

p.f. = $98\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ (Lit. $97\text{ }^\circ\text{C} - 98,5\text{ }^\circ\text{C}$)

FTIR (KBr) (cm^{-1}): 3070 ($\nu_{\text{C-H}}$ (aromático)); 1645 ($\nu_{\text{C=O}}$ (cetona aromática)); 1604 ($\nu_{\text{C=C}}$ conjugada com C=O); 1604, 1567 e 1465 ($\nu_{\text{C=C}}$ (vibrações de esqueleto aromático)); 767 ($\delta_{\text{C-H}}$ (4H vizinhos de aromático)); 767 e 673 ($\delta_{\text{C-H}}$ (5H vizinhos de aromático)).

RMN ^1H (CDCl_3) (ppm):



- 6,70 [s (H₃), 1H];
- 7,35 [m (H₆, H₈, H_{3'}, H_{4'} e H_{5'}), 5H];
- 7,57 [m (H₇), 1H];
- 7,77 [m (H_{2'} e H_{6'}), 2H];
- 8,11 [dd (H₅), 1H).

m/z (%): 222 (100), 206 (1), 194 (28), 181 (1), 165 (3), 152 (1), 139 (2), 120 (3), 102 (2), 92 (25), 76 (2), 63 (14), 50 (3).

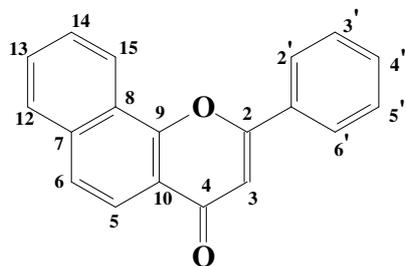
A.1.3.2 Alfa-naftoflavona (α -NAF)

Aspecto: sólido amarelado.

p.f. = 157 °C \pm 2 °C (Lit. 156 °C – 159 °C)

FTIR (KBr) (cm⁻¹): 3046 (ν_{C-H} (aromático)); 1641 ($\nu_{C=C}$ conjugada com C=O); 1629 ($\nu_{C=O}$ (cetona aromática)); 1569, 1510 e 1438 ($\nu_{C=C}$ (vibrações de esqueleto aromático)); 823 (δ_{C-H} (2H vizinhos de aromático)); 781 (δ_{C-H} (4H vizinhos de aromático)); 761 e 698 (δ_{C-H} (5H vizinhos de aromático)).

RMN ¹H (CDCl₃) (ppm):



- 6,71 [s (H₃), 1H];
- 7,42 [m (H₆, H₁₃, H_{3'}, H_{4'} e H_{5'}), 5H];
- 7,64 [m (H₁₄), 1H];
- 7,74 [m (H₅ e H₁₂), 2H];
- 7,91 [d (H_{2'} e H_{6'}), 2H];
- 8,20 [m (H₁₅), 1H).

m/z (%): 272 (100), 257 (1), 244 (10), 229 (1), 215 (2), 188 (1), 170 (53), 142 (7), 114 (25), 102 (4), 88 (6), 74 (4), 63 (4), 50 (5).

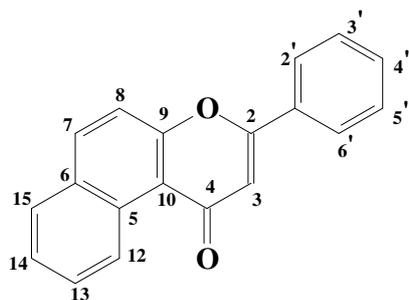
A.1.3.3 Beta-naftoflavona (β -NAF)

Aspecto: sólido amarelo alaranjado (mostarda).

p.f. = 166 °C \pm 2 °C (Lit. 164 °C – 166 °C)

FTIR (KBr) (cm⁻¹): 3052 (ν_{C-H} (aromático)); 1637 ($\nu_{C=O}$ (cetona aromática)); 1600 ($\nu_{C=C}$ conjugada com C=O); 1600, 1511 e 1448 ($\nu_{C=C}$ (vibrações de esqueleto aromático)); 823 (δ_{C-H} (2H vizinhos de aromático)); 755 (δ_{C-H} (4H vizinhos de aromático)); 755 e 686 (δ_{C-H} (5H vizinhos de aromático)).

RMN ¹H (CDCl₃) (ppm):



- 6,97 [s (H₃), 1H];
- 7,31 [m (H₈), 1H];
- 7,52 [m (H₁₄, H_{3'}, H_{4'} e H_{5'}), 4H];
- 7,72 [m (H₁₃), 1H];
- 7,88 [m (H₁₅, H_{2'} e H_{6'}), 3H];
- 8,04 [d (H₇), 1H];
- 10,04 [d (H₁₂), 1H].

m/z (%): 272 (100), 244 (48), 230 (1), 216 (4), 190 (1), 170 (22), 158 (1), 142 (22), 114 (23), 102 (3), 88 (6), 76 (5), 63 (5), 50 (7).

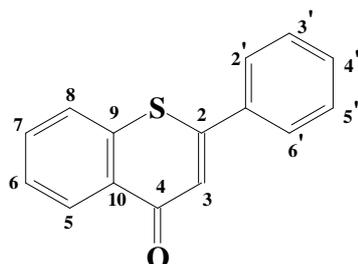
A.1.3.4 Tioflavona (TFA)

Aspecto: sólido marfim.

p.f. = 125 °C ± 2 °C (Lit. 125 °C – 127 °C)

FTIR (KBr) (cm⁻¹): 3066 (ν_{C-H} (aromático)); 1619 (ν_{C=O} (cetona aromática)); 1587 (ν_{C=C} conjugada com C=O); 1587, 1483 e 1439 (ν_{C=C} (vibrações de esqueleto aromático)); 759 (δ_{C-H} (4H vizinhos de aromático)); 730 e 696 (δ_{C-H} (5H vizinhos de aromático)); 665 (ν_{C-S}).

RMN ¹H (CDCl₃) (ppm):



- 7,26 [m (H₃ e H_{4'}), 2H];
- 7,49 [m (H₈, H_{3'} e H_{5'}), 3H];
- 7,62 [m (H₆, H₇, H_{2'} e H_{6'}), 4H];
- 8,53 [m (H₅), 1H].

m/z (%): 238 (100), 210 (52), 196 (1), 178 (3), 165 (6), 152 (1), 136 (20), 108 (17), 92 (2), 76 (8), 50 (10).

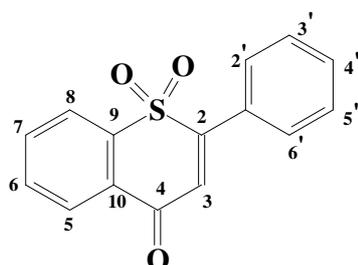
A.1.3.5 S,S-Dióxidotioflavona (SDF)

Aspecto: sólido amarelo.

p.f. = 133 °C ± 2 °C (Lit. —)

FTIR (KBr) (cm⁻¹): 3060 (ν_{C-H} (aromático)); 1652 (ν_{C=O} (cetona aromática)); 1589 (ν_{C=C} conjugada com C=O); 1589, 1500 e 1440 (ν_{C=C} (vibrações de esqueleto aromático)); 1292 e 1151 (ν_{S=O}); 755 (δ_{C-H} (4H vizinhos de aromático)); 738 e 676 (δ_{C-H} (5H vizinhos de aromático)); 659 (ν_{C-S}).

RMN ¹H (CDCl₃) (ppm):



- 6,83 [s (H₃), 1H];
- 7,51 [m (H_{3'}, H_{4'} e H_{5'}), 3H];
- 7,83 [m (H₆, H₇, H_{2'} e H_{6'}), 4H];
- 8,10 [m (H₈), 1H];
- 8,21 [m (H₅), 1H].

m/z (%): 270 (5), 238 (75), 222 (5), 210 (45), 195 (2), 178 (15), 165 (12), 149 (9), 136 (22), 105 (100), 89 (5), 76 (77), 63 (14), 50 (43).

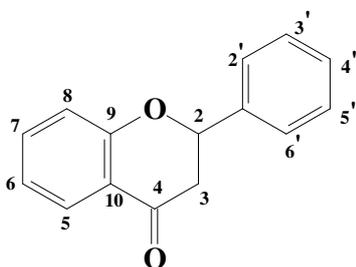
A.1.3.6 Flavanona (FNA)

Aspecto: sólido branco.

p.f. = 74 °C ± 2 °C (Lit. 76 °C – 78 °C)

FTIR (KBr) (cm⁻¹): 3039 (ν_{C-H} (aromático)); 2896 (ν_s CH₂); 1687 (ν_{C=O} (cetona aromática)); 1606 (ν_{C=C} conjugada com C=O); 1606, 1577 e 1456 (ν_{C=C} (vibrações de esqueleto aromático)); 1456 (δ_{as} CH₂); 765 (δ_{C-H} (4H vizinhos de aromático)); 765 e 700 (δ_{C-H} (5H vizinhos de aromático)).

RMN ¹H (CDCl₃) (ppm):



- 2,95 [m (H₃ (3a e 3b)), 2H];
- 5,44 [dd (H₂), 1H];
- 7,03 [m (H₆ e H₇), 2H];
- 7,43 [m (H₈, H_{2'}, H_{3'}, H_{4'}, H_{5'} e H_{6'}), 6H];
- 7,93 [m (H₅), 1H].

m/z (%): 223 (100), 207 (13), 196 (1), 182 (1), 165 (1), 147 (23), 131 (4), 121 (8), 103 (4), 92 (28), 77 (2), 63 (16), 51 (2).

A.1.3.7 Tiocromanona (TCR)

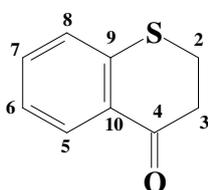
Aspecto: sólido amarelo ou líquido amarelo, dependendo da temperatura, pois apresenta baixo ponto de fusão.

p.f. = 30 °C ± 2 °C (Lit. 28 °C – 30 °C)

p.e. = 153 °C ± 2 °C (Lit. 154 °C)

FTIR (KBr) (cm⁻¹): 3066 (ν_{C-H} (aromático)); 2958 (ν_{as} CH₂); 2921 (ν_s CH₂); 1679 (ν_{C=O} (cetona aromática)); 1592 (ν_{C=C} conjugada com C=O); 1592 e 1457 (ν_{C=C} (vibrações de esqueleto aromático)); 1436 (δ_{as} CH₂); 761 (δ_{C-H} (4H vizinhos de aromático)); 653 (ν_{C-S}).

RMN ¹H (CDCl₃) (ppm):



- 2,94 [m (H₃ (3a e 3b)), 2H];
- 3,19 [m (H₂ (2a e 2b)), 2H];
- 7,13 [m (H₈), 1H];
- 7,24 [m (H₆), 1H];
- 7,34 [m (H₇), 1H];
- 8,07 [dd (H₅), 1H].

m/z (%): 164 (100), 152 (1), 136 (68), 121 (1), 108 (28), 92 (2), 82 (5), 69 (8), 63 (4), 50 (3).

A.1.4 Determinação do coeficiente de absorção molar (coeficiente de extinção molar ou absortividade molar) (ϵ) para os flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR)

Primeiramente, soluções de concentração aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L de flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR) em diclorometano foram preparadas em balão volumétrico de 5 mL. Para cada amostra, em uma célula de quartzo (cubeta) com 2 faces polidas foram colocados 3 mL de diclorometano para se obter curvas de UV das amostras, lidas por espectroscopia de absorção no ultravioleta/visível (UV-Vis). Adições da solução $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L de flavonóides e tiocromanona (TCR) em diclorometano foram feitas a essa cubeta (contendo 3 mL de diclorometano) de 30 μ L em 30 μ L, de modo a ser obtida uma curva de UV para cada adição de 30 μ L. Desse modo, foi possível construir um gráfico de absorbância (A) x concentração (C) de flavonóides e de tiocromanona na cubeta para cada amostra, que é representado por uma reta (é linear, quando a Lei de Lambert-Beer é seguida), e a partir de cada gráfico foi determinado o coeficiente de absorção molar (absortividade molar) (ϵ), o qual é o coeficiente angular da reta.

Para os cálculos de cada concentração na cubeta, após a adição de cada um dos 30 μ L, foi feito o seguinte (Equação A.1):

$$M = m / (PM \times V)$$

Equação A.1. Equação para calcular a concentração na cubeta.

Onde: M = molaridade (mol/L);

m = massa de flavonóides e de tiocromanona (g);

PM = peso molecular de flavonóides e de tiocromanona (g/mol);

V = volume da solução de flavonóides e de seus derivados = 5 mL = 0,005 L (L).

Em 5 mL de solução de concentração aproximadamente 1×10^{-3} mol/L de flavonóides e de tiocromanona, as concentrações dependiam do PM de cada amostra, e por isso, variavam para cada amostra, porém, todas eram na ordem de 10^{-3} .

A.1.4.1 Cálculo da concentração de flavona (FVA) na cubeta

Solução de flavona em diclorometano:

$$M = 0,0015 / (222,24 \times 0,005)$$

$$M = 1,35 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Em 5 mL = 0,005 L de solução de flavona tinha-se x mol de flavona:

$$1,35 \times 10^{-3} \text{ mol} \text{ ----- } 1 \text{ L}$$

$$x \text{ mol} \text{ ----- } 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$x = 6,75 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Em uma alíquota de 30 μ L = 0,000030 L desta solução de flavona (5 mL = 0,005 L) tinha-se y mol de flavona:

$$6,75 \times 10^{-6} \text{ mol} \text{ ----- } 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$y \text{ mol} \text{ ----- } 30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$$

$$y = 4,05 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

Adicionando-se $4,05 \times 10^{-8}$ mol de flavona (que estava em 30 μ L = 0,000030 L de solução de flavona) a 3 mL = 0,003 L de diclorometano que estava na cubeta, ficou um

volume total de 0,00303 L na cubeta. Em 1 L de solução total na cubeta, tinha-se z mol (concentração final na cubeta após a adição de cada 30 µL de solução de flavona):

$$4,05 \times 10^{-8} \text{ mol} \text{ -----} 3 \text{ mL} + 30 \text{ µL} = 0,00303 \text{ L}$$

$$z \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL} = 1 \text{ L}$$

$$z = 1,34 \times 10^{-5} \text{ mol, que estava contido em 1 L de solução de flavona}$$

Sendo assim, foram feitos esses cálculos para cada adição de 30 µL em 30 µL (30 µL, 60 µL, 90 µL e 120 µL).

A.1.4.2 Cálculo da concentração de *alfa*-naftoflavona (α -NAF) na cubeta

Solução de *alfa*-naftoflavona em diclorometano:

$$M = 0,0015 / (272,30 \times 0,005)$$

$$M = 1,10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Em 5 mL = 0,005 L de solução de *alfa*-naftoflavona tinha-se x mol de *alfa*-naftoflavona:

$$1,10 \times 10^{-3} \text{ mol} \text{ -----} 1 \text{ L}$$

$$x \text{ mol} \text{ -----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$x = 5,51 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Em uma alíquota de 30 µL = 0,000030 L desta solução de *alfa*-naftoflavona (5 mL = 0,005 L) tinha-se y mol de *alfa*-naftoflavona:

$$5,51 \times 10^{-6} \text{ mol} \text{ -----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$y \text{ mol} \text{ -----} 30 \text{ µL} = 0,000030 \text{ L}$$

$$y = 3,31 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

Adicionando-se $3,31 \times 10^{-8}$ mol de *alfa*-naftoflavona (que estava em 30 µL = 0,000030 L de solução de *alfa*-naftoflavona) a 3 mL = 0,003 L de diclorometano que estava na cubeta, ficou um volume total de 0,00303 L na cubeta. Em 1 L de solução total na cubeta, tinha-se z mol (concentração final na cubeta após a adição de cada 30 µL de solução de *alfa*-naftoflavona):

$$3,31 \times 10^{-8} \text{ mol} \text{ -----} 3 \text{ mL} + 30 \text{ µL} = 0,00303 \text{ L}$$

$$z \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL} = 1 \text{ L}$$

$$z = 1,09 \times 10^{-5} \text{ mol, que estava contido em 1 L de solução de } \alpha\text{-naftoflavona}$$

Sendo assim, foram feitos esses cálculos para cada adição de 30 µL em 30 µL (30 µL, 60 µL, 90 µL e 120 µL).

A.1.4.3 Cálculo da concentração de *beta*-naftoflavona (β -NAF) na cubeta

Solução de *beta*-naftoflavona em diclorometano:

$$M = 0,0015 / (272,30 \times 0,005)$$

$$M = 1,10 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Em 5 mL = 0,005 L de solução de *beta*-naftoflavona tinha-se x mol de *beta*-naftoflavona:

$$1,10 \times 10^{-3} \text{ mol} \text{ -----} 1 \text{ L}$$

$$x \text{ mol} \text{ -----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$x = 5,51 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Em uma alíquota de 30 µL = 0,000030 L desta solução de *beta*-naftoflavona (5 mL = 0,005 L) tinha-se y mol de *beta*-naftoflavona:

$$5,51 \times 10^{-6} \text{ mol} \text{ -----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$y \text{ mol} \text{ -----} 30 \text{ µL} = 0,000030 \text{ L}$$

$$y = 3,31 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

Adicionando-se $3,31 \times 10^{-8}$ mol de *beta*-naftoflavona (que estava em $30 \mu\text{L} = 0,000030$ L de solução de *beta*-naftoflavona) a $3 \text{ mL} = 0,003 \text{ L}$ de diclorometano que estava na cubeta, ficou um volume total de $0,00303 \text{ L}$ na cubeta. Em 1 L de solução total na cubeta, tinha-se z mol (concentração final na cubeta após a adição de cada $30 \mu\text{L}$ de solução de *beta*-naftoflavona):

$$\begin{aligned} 3,31 \times 10^{-8} \text{ mol} & \text{-----} 3 \text{ mL} + 30 \mu\text{L} = 0,00303 \text{ L} \\ z \text{ mol} & \text{-----} 1000 \text{ mL} = 1 \text{ L} \end{aligned}$$

$$z = 1,09 \times 10^{-5} \text{ mol, que estava contido em } 1 \text{ L de solução de } \beta\text{-naftoflavona}$$

Sendo assim, foram feitos esses cálculos para cada adição de $30 \mu\text{L}$ em $30 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{L}$, $60 \mu\text{L}$, $90 \mu\text{L}$ e $120 \mu\text{L}$).

A.1.4.4 Cálculo da concentração de tioflavona (TFA) na cubeta

Solução de tioflavona em diclorometano:

$$M = 0,0013 / (238,31 \times 0,005)$$

$$M = 1,09 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Em $5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$ de solução de tioflavona tinha-se x mol de tioflavona:

$$\begin{aligned} 1,09 \times 10^{-3} \text{ mol} & \text{-----} 1 \text{ L} \\ x \text{ mol} & \text{-----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L} \\ x & = 5,46 \times 10^{-6} \text{ mol} \end{aligned}$$

Em uma alíquota de $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ desta solução de tioflavona ($5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$) tinha-se y mol de tioflavona:

$$\begin{aligned} 5,46 \times 10^{-6} \text{ mol} & \text{-----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L} \\ y \text{ mol} & \text{-----} 30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L} \\ y & = 3,27 \times 10^{-8} \text{ mol} \end{aligned}$$

Adicionando-se $3,27 \times 10^{-8}$ mol de tioflavona (que estava em $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ de solução de tioflavona) a $3 \text{ mL} = 0,003 \text{ L}$ de diclorometano que estava na cubeta, ficou um volume total de $0,00303 \text{ L}$ na cubeta. Em 1 L de solução total na cubeta, tinha-se z mol (concentração final na cubeta após a adição de cada $30 \mu\text{L}$ de solução de tioflavona):

$$\begin{aligned} 3,27 \times 10^{-8} \text{ mol} & \text{-----} 3 \text{ mL} + 30 \mu\text{L} = 0,00303 \text{ L} \\ z \text{ mol} & \text{-----} 1000 \text{ mL} = 1 \text{ L} \end{aligned}$$

$$z = 1,08 \times 10^{-5} \text{ mol, que estava contido em } 1 \text{ L de solução de tioflavona}$$

Sendo assim, foram feitos esses cálculos para cada adição de $30 \mu\text{L}$ em $30 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{L}$, $60 \mu\text{L}$, $90 \mu\text{L}$ e $120 \mu\text{L}$).

A.1.4.5 Cálculo da concentração de *S,S*-dióxiidotioflavona (SDF) na cubeta

Solução de *S,S*-dióxiidotioflavona em diclorometano:

$$M = 0,0015 / (270,31 \times 0,005)$$

$$M = 1,11 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Em $5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$ de solução de *S,S*-dióxiidotioflavona tinha-se x mol de *S,S*-dióxiidotioflavona:

$$\begin{aligned} 1,11 \times 10^{-3} \text{ mol} & \text{-----} 1 \text{ L} \\ x \text{ mol} & \text{-----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L} \\ x & = 5,55 \times 10^{-6} \text{ mol} \end{aligned}$$

Em uma alíquota de $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ desta solução de *S,S*-dióxiidotioflavona ($5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$) tinha-se y mol de *S,S*-dióxiidotioflavona:

$$\begin{aligned} 5,55 \times 10^{-6} \text{ mol} & \text{-----} 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L} \\ y \text{ mol} & \text{-----} 30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L} \\ y & = 3,33 \times 10^{-8} \text{ mol} \end{aligned}$$

Adicionando-se $3,33 \times 10^{-8}$ mol de *S,S*-dióxidotiotioflavona (que estava em $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ de solução de *S,S*-dióxidotiotioflavona) a $3 \text{ mL} = 0,003 \text{ L}$ de diclorometano que estava na cubeta, ficou um volume total de $0,00303 \text{ L}$ na cubeta. Em 1 L de solução total na cubeta, tinha-se z mol (concentração final na cubeta após a adição de cada $30 \mu\text{L}$ de solução de *S,S*-dióxidotiotioflavona):

$$3,33 \times 10^{-8} \text{ mol} \text{ ----- } 3 \text{ mL} + 30 \mu\text{L} = 0,00303 \text{ L}$$

$$z \text{ mol} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} = 1 \text{ L}$$

$$z = 1,10 \times 10^{-5} \text{ mol, que estava contido em } 1 \text{ L de solução de } S,S\text{-dióxidotiotioflavona}$$

Sendo assim, foram feitos esses cálculos para cada adição de $30 \mu\text{L}$ em $30 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{L}$, $60 \mu\text{L}$, $90 \mu\text{L}$ e $120 \mu\text{L}$).

A.1.4.6 Cálculo da concentração de flavanona (FNA) na cubeta

Solução de flavanona em diclorometano:

$$M = 0,0015 / (224,26 \times 0,005)$$

$$M = 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Em $5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$ de solução de flavanona tinha-se x mol de flavanona:

$$1,34 \times 10^{-3} \text{ mol} \text{ ----- } 1 \text{ L}$$

$$x \text{ mol} \text{ ----- } 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$x = 6,69 \times 10^{-6} \text{ mol}$$

Em uma alíquota de $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ desta solução de flavanona ($5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$) tinha-se y mol de flavanona:

$$6,69 \times 10^{-6} \text{ mol} \text{ ----- } 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$y \text{ mol} \text{ ----- } 30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$$

$$y = 4,01 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

Adicionando-se $4,01 \times 10^{-8}$ mol de flavanona (que estava em $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ de solução de flavanona) a $3 \text{ mL} = 0,003 \text{ L}$ de diclorometano que estava na cubeta, ficou um volume total de $0,00303 \text{ L}$ na cubeta. Em 1 L de solução total na cubeta, tinha-se z mol (concentração final na cubeta após a adição de cada $30 \mu\text{L}$ de solução de flavanona):

$$4,01 \times 10^{-8} \text{ mol} \text{ ----- } 3 \text{ mL} + 30 \mu\text{L} = 0,00303 \text{ L}$$

$$z \text{ mol} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} = 1 \text{ L}$$

$$z = 1,32 \times 10^{-5} \text{ mol, que estava contido em } 1 \text{ L de solução de flavanona}$$

Sendo assim, foram feitos esses cálculos para cada adição de $30 \mu\text{L}$ em $30 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{L}$, $60 \mu\text{L}$, $90 \mu\text{L}$ e $120 \mu\text{L}$).

A.1.4.7 Cálculo da concentração de tiocromanona (TCR) na cubeta

Solução de tiocromanona em diclorometano:

$$M = 0,0021 / (164,23 \times 0,005)$$

$$M = 2,56 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$$

Em $5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$ de solução de tiocromanona tinha-se x mol de tiocromanona:

$$2,56 \times 10^{-3} \text{ mol} \text{ ----- } 1 \text{ L}$$

$$x \text{ mol} \text{ ----- } 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$x = 1,28 \times 10^{-5} \text{ mol}$$

Em uma alíquota de $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ desta solução de tiocromanona ($5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$) tinha-se y mol de tiocromanona:

$$1,28 \times 10^{-5} \text{ mol} \text{ ----- } 5 \text{ mL} = 0,005 \text{ L}$$

$$y \text{ mol} \text{ ----- } 30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$$

$$y = 7,67 \times 10^{-8} \text{ mol}$$

Adicionando-se $7,67 \times 10^{-8}$ mol de tiocromanona (que estava em $30 \mu\text{L} = 0,000030 \text{ L}$ de solução de tiocromanona) a $3 \text{ mL} = 0,003 \text{ L}$ de diclorometano que estava na cubeta, ficou um volume total de $0,00303 \text{ L}$ na cubeta. Em 1 L de solução total na cubeta, tinha-se z mol (concentração final na cubeta após a adição de cada $30 \mu\text{L}$ de solução de tiocromanona):

$$7,67 \times 10^{-8} \text{ mol} \text{ -----} 3 \text{ mL} + 30 \mu\text{L} = 0,00303 \text{ L}$$

$$z \text{ mol} \text{ -----} 1000 \text{ mL} = 1 \text{ L}$$

$$z = 2,53 \times 10^{-5} \text{ mol, que estava contido em } 1 \text{ L de solução de tiocromanona}$$

Sendo assim, foram feitos esses cálculos para cada adição de $30 \mu\text{L}$ em $30 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{L}$, $60 \mu\text{L}$, $90 \mu\text{L}$ e $120 \mu\text{L}$).

A.1.4.8 Construção de gráficos de absorvância (A) x concentração (C) para a determinação do coeficiente de absorção molar (coeficiente de extinção molar ou absorvância molar) (ϵ) para os flavonóides (flavona (FVA), α -naftoflavona (α -NAF), β -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF) e flavanona (FNA)) e a tiocromanona (TCR)

Após todos os cálculos para cada adição de $30 \mu\text{L}$ em $30 \mu\text{L}$ ($30 \mu\text{L}$, $60 \mu\text{L}$, $90 \mu\text{L}$ e $120 \mu\text{L}$) terem sido feitos, foram construídos gráficos representativos, e em seguida, foram lidos os seus respectivos coeficientes de absorção molar (absorvância molar) (ϵ). Os gráficos construídos para determinar o coeficiente de absorção molar (absorvância molar) (ϵ) para flavona (FVA), α -naftoflavona (α -NAF), β -naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e tiocromanona (TCR) estão apresentados nas Figuras A.1 e A.2, A.3 e A.4, A.5 e A.6, A.7 e A.8, A.9 e A.10, A.11 e A.12, e A.13 e A.14, respectivamente.

Os valores de coeficiente de correlação (R) encontrados (superiores a 0,99) foram excelentes, garantindo a linearidade, e indicando que a Lei de Lambert-Beer estava sendo seguida. Como a Lei de Lambert-Beer exige que se trabalhe em condições baixas de absorvância (0,2 a 0,8), isso foi respeitado, pois existe um determinado limite de concentração que tem que ser respeitado, para que a linearidade ocorra, o que foi o caso deste trabalho. Quando se trabalha em condições muito altas de absorvância, foge-se do limite de concentração determinado pela Lei de Lambert-Beer e com isso, começam a ocorrer interações intermoleculares, agregados, e outras espécies, e a Lei não é mais seguida, acarretando em curvaturas no gráfico de absorvância (A) x concentração (C), e isso não foi observado neste trabalho, até porque os coeficientes de correlação encontrados foram muito bons.

Os valores de ϵ (coeficiente angular da reta) encontrados variaram de $4.425,4 \text{ L/cm.mol}$ a 44.506 L/cm.mol , dependendo do comprimento de onda (λ) da banda característica em questão e do tipo de transição envolvida. Esses foram superiores a $4.425,4 \text{ L/mol}$, o que é comum para moléculas como as que foram utilizadas, ou seja, moléculas que apresentam grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$) e dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$) sendo parte de uma cadeia conjugada. A absorção de 270 nm a 290 nm , característica de presença de grupo carbonila ($\text{C}=\text{O}$), está de acordo com a literatura [Atkins e De Paula (2004)]. No caso desses flavonóides, a dupla ligação ($\text{C}=\text{C}$) é parte de uma cadeia conjugada, então, as energias dos orbitais moleculares aproximam-se mutuamente, e a transição $\pi\pi^*$ desloca-se para maiores comprimentos de onda.

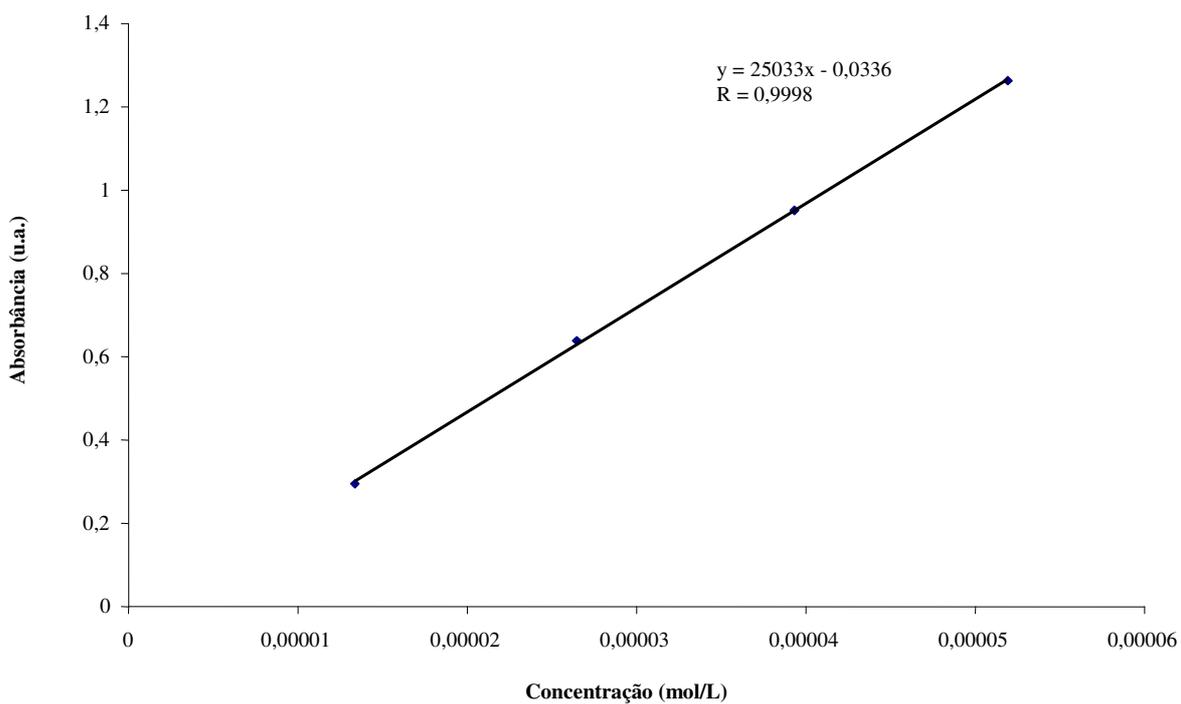


Figura A.1. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavona (FVA), $\lambda = 253$ nm e $\epsilon = 25.033$ L/cm.mol.

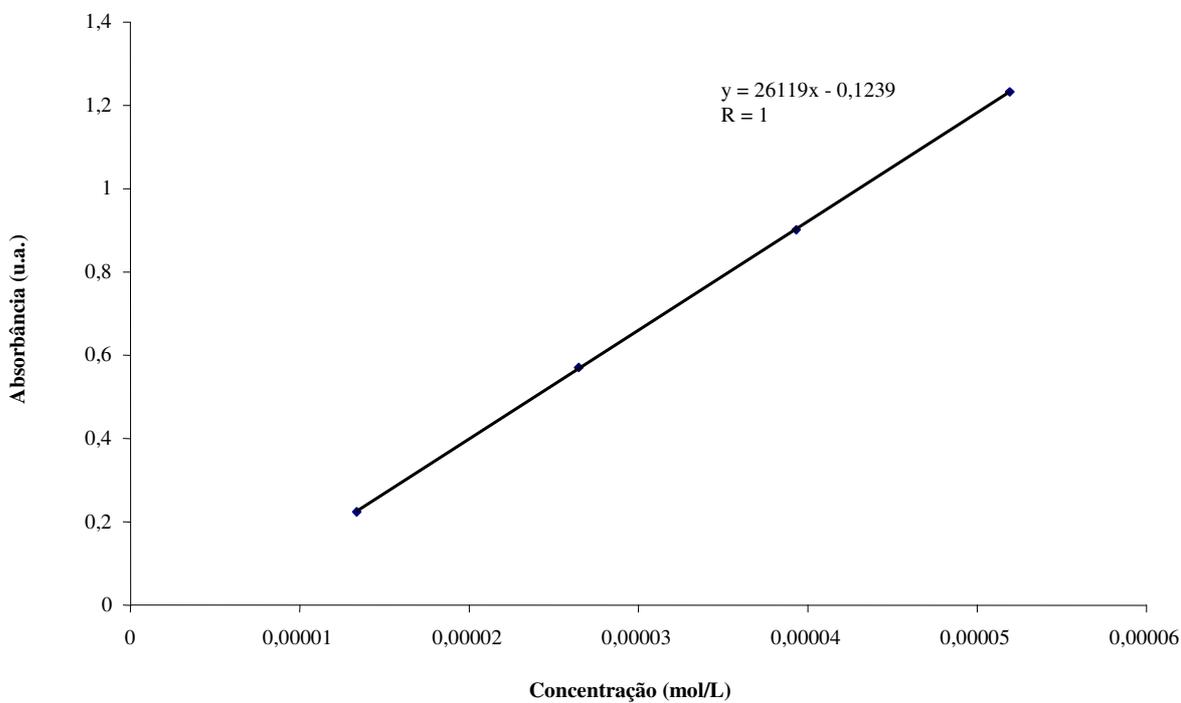


Figura A.2. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavona (FVA), $\lambda = 293$ nm e $\epsilon = 26.119$ L/cm.mol.

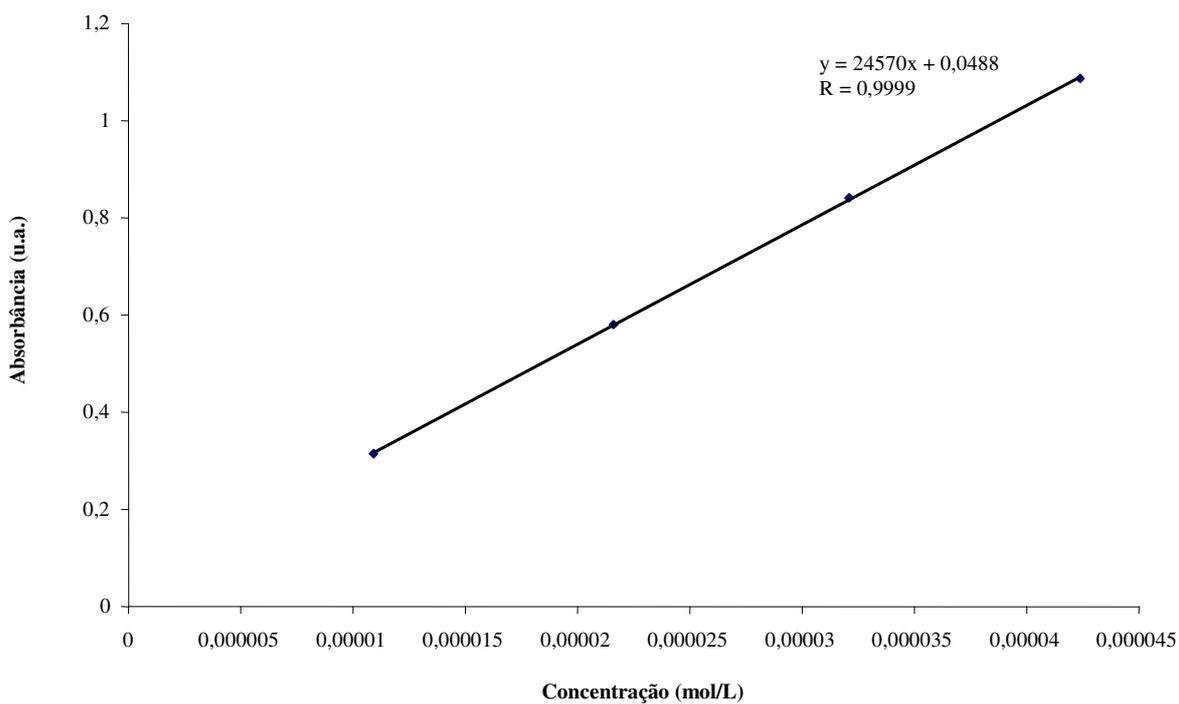


Figura A.3. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a *alfa*-naftoflavona (α -NAF), $\lambda = 232,5$ nm e $\epsilon = 24.570$ L/cm.mol.

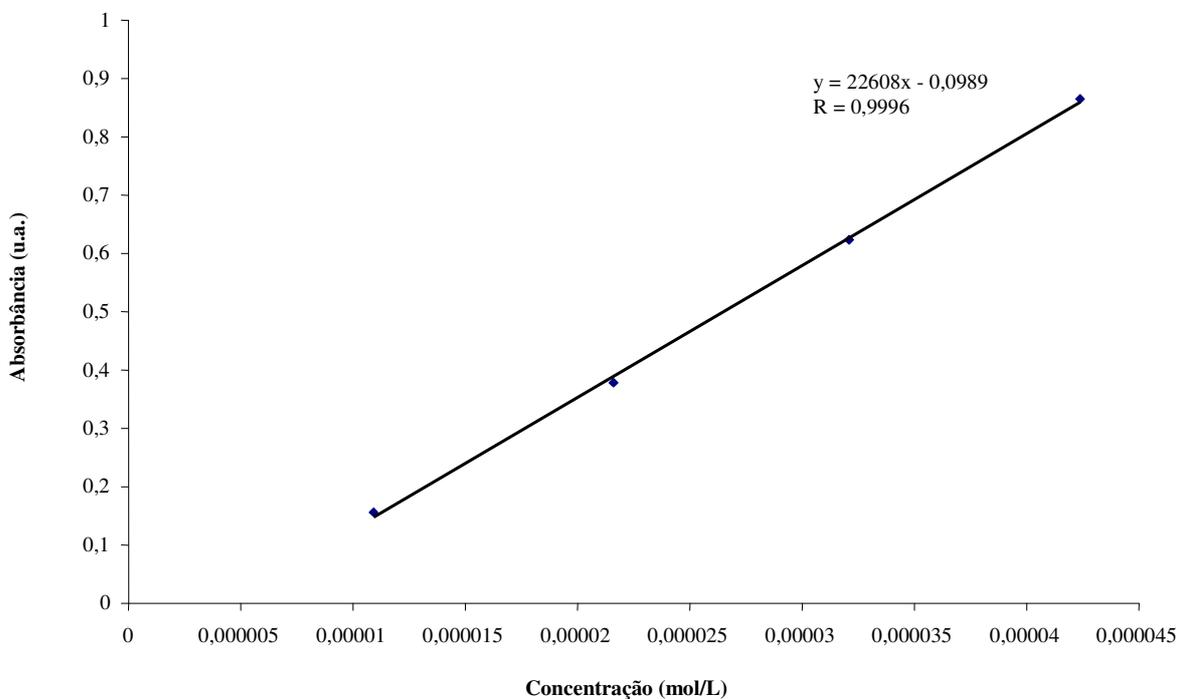


Figura A.4. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a *alfa*-naftoflavona (α -NAF), $\lambda = 285,5$ nm e $\epsilon = 22.608$ L/cm.mol.

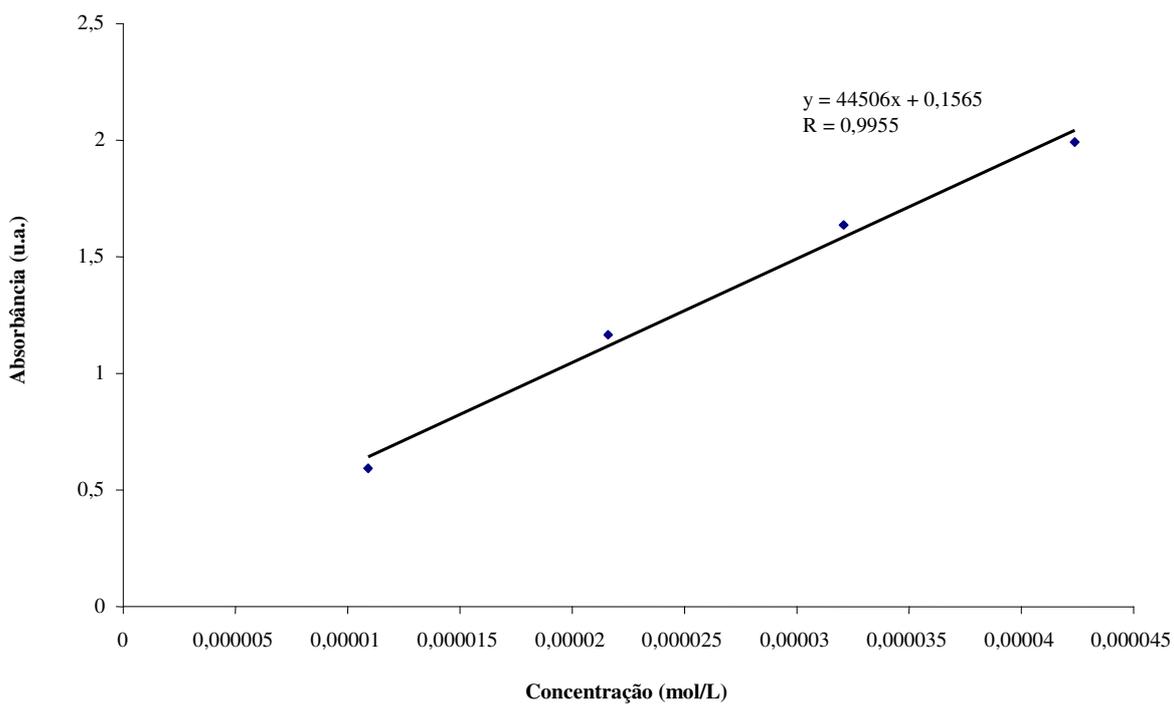


Figura A.5. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a *beta*-naftoflavona (β -NAF), $\lambda = 235$ nm e $\epsilon = 44.506$ L/cm.mol.

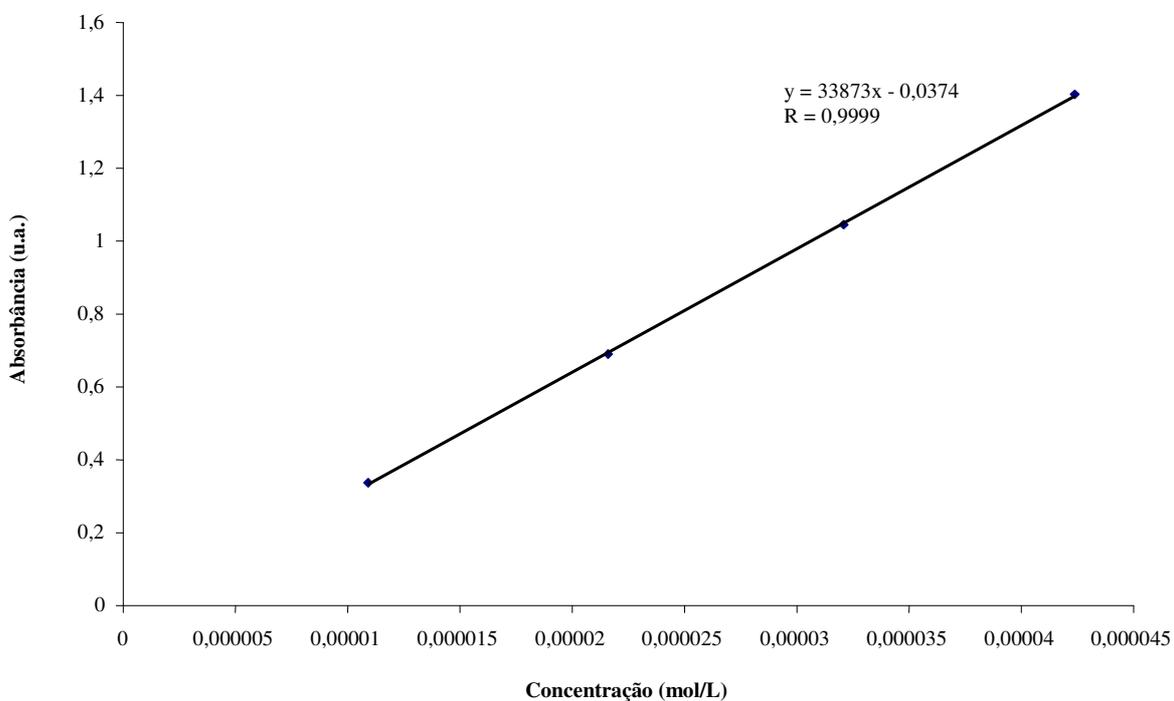


Figura A.6. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a *beta*-naftoflavona (β -NAF), $\lambda = 283,5$ nm e $\epsilon = 33.873$ L/cm.mol.

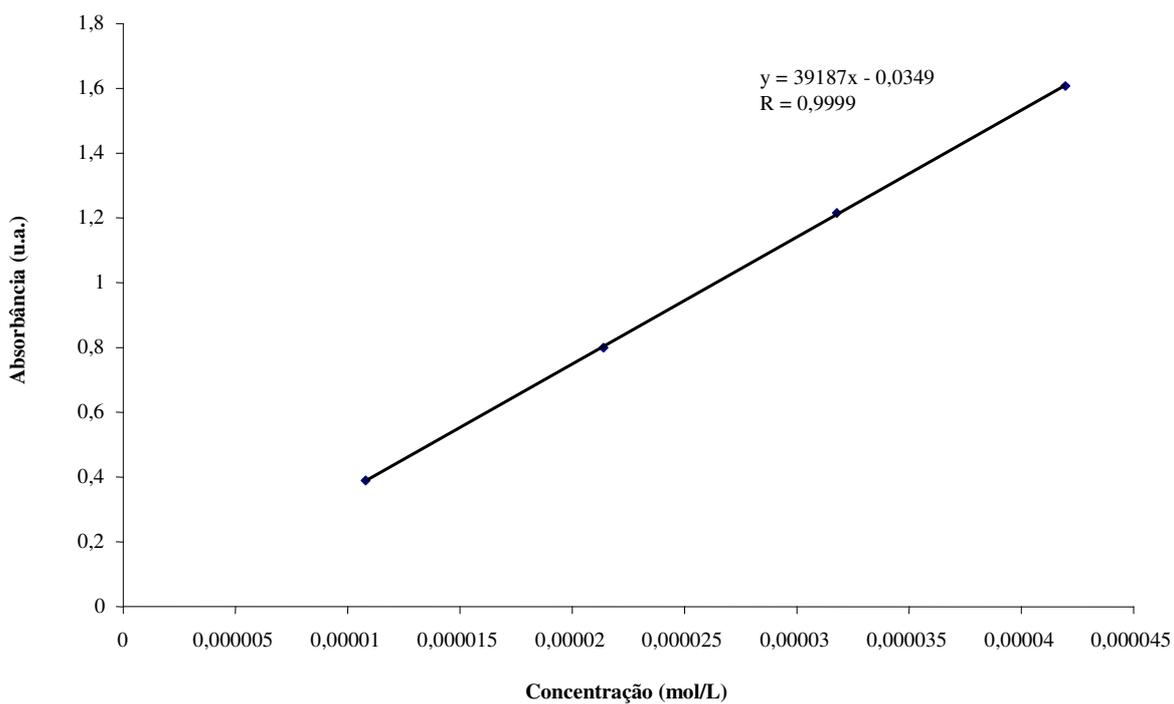


Figura A.7. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tioflavona (TFA), $\lambda = 273$ nm e $\epsilon = 39.187$ L/cm.mol.

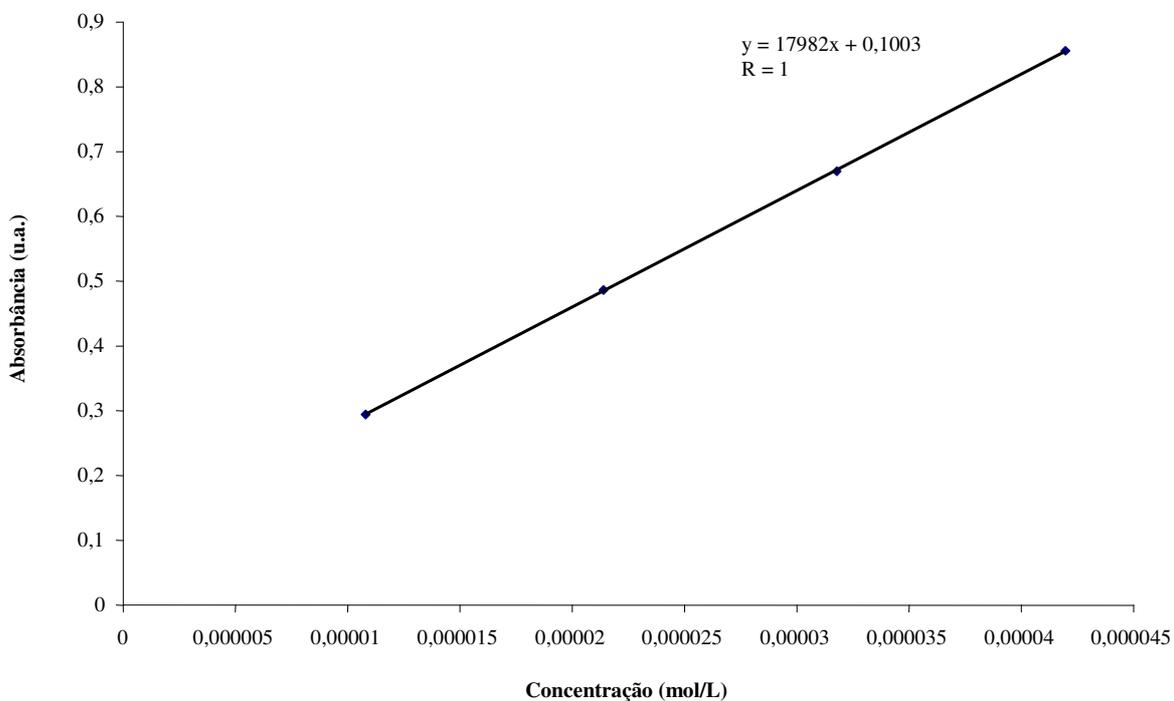


Figura A.8. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tioflavona (TFA), $\lambda = 347$ nm e $\epsilon = 17.982$ L/cm.mol.

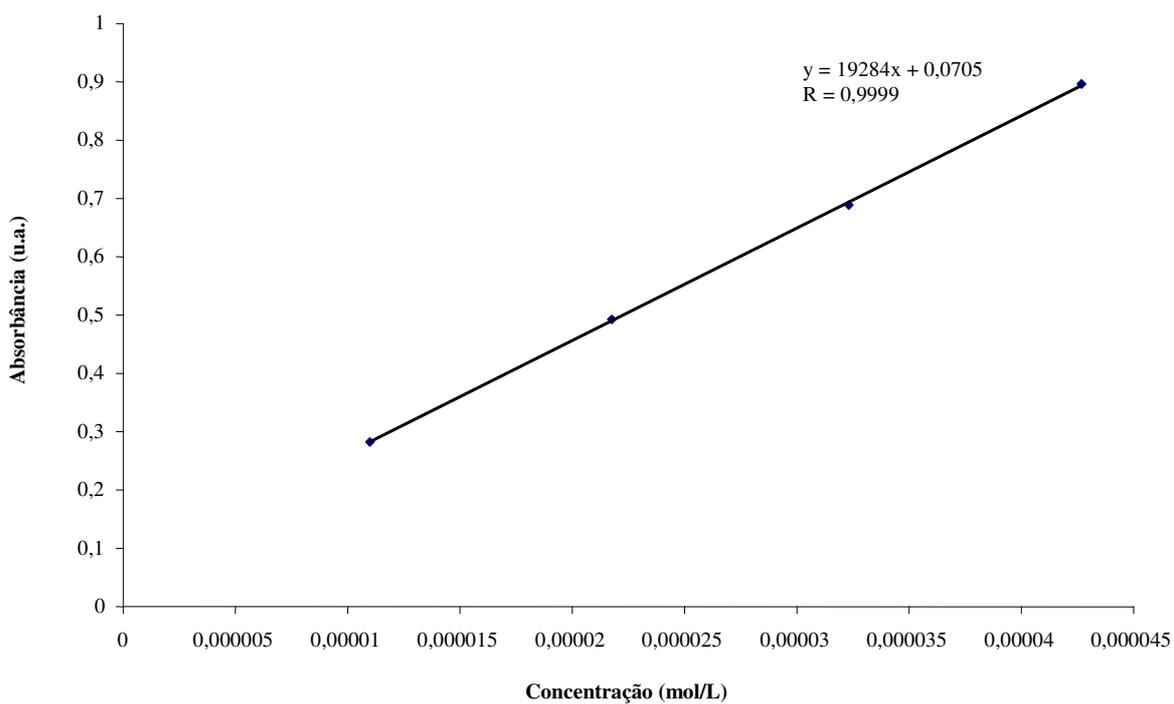


Figura A.9. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), $\lambda = 236$ nm e $\epsilon = 19.284$ L/cm.mol.

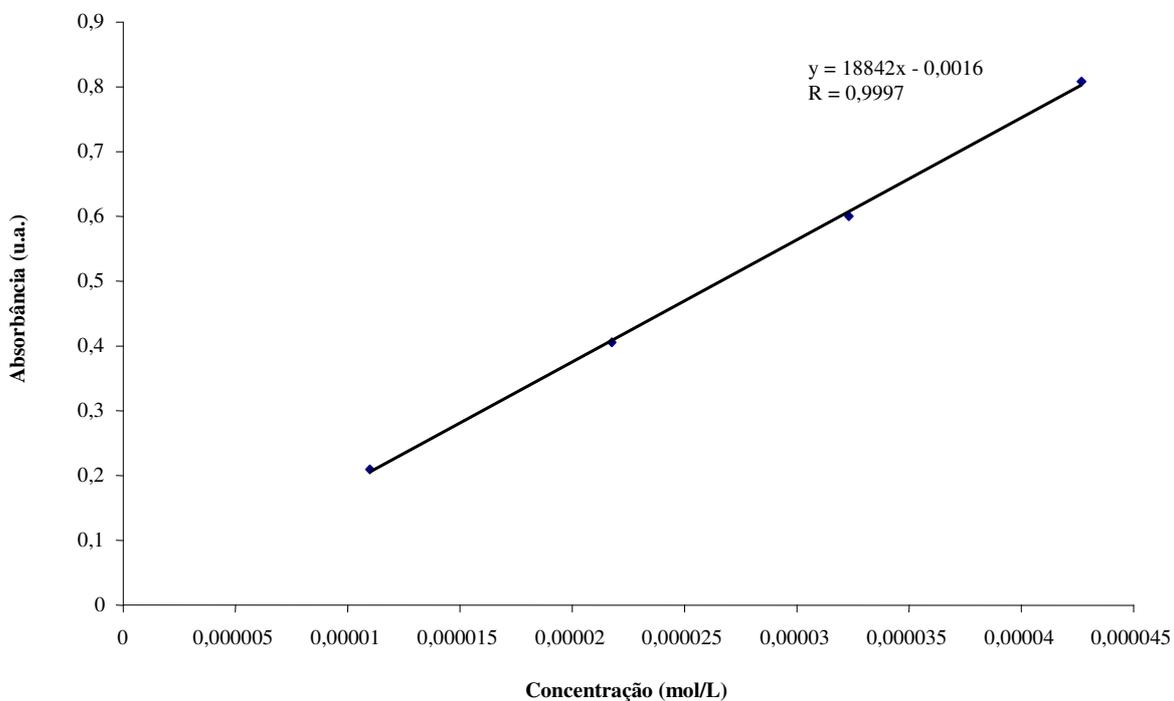


Figura A.10. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), $\lambda = 312,5$ nm e $\epsilon = 18.842$ L/cm.mol.

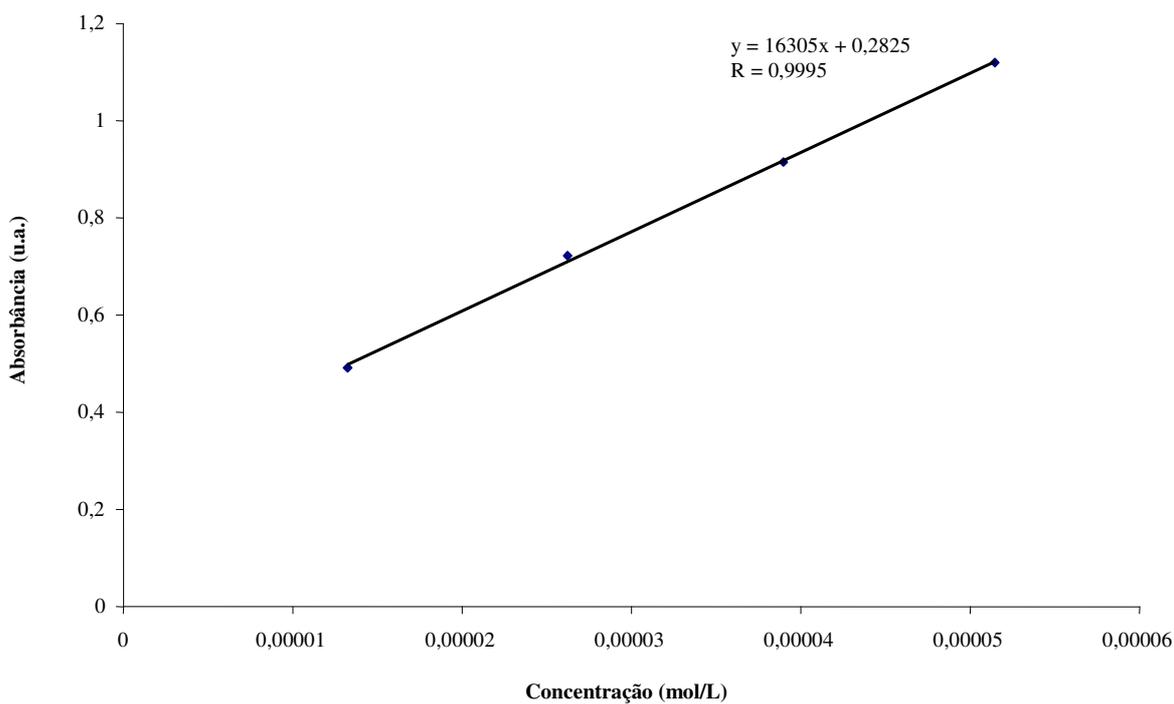


Figura A.11. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavanona (FNA), $\lambda = 251$ nm e $\epsilon = 16.305$ L/cm.mol.

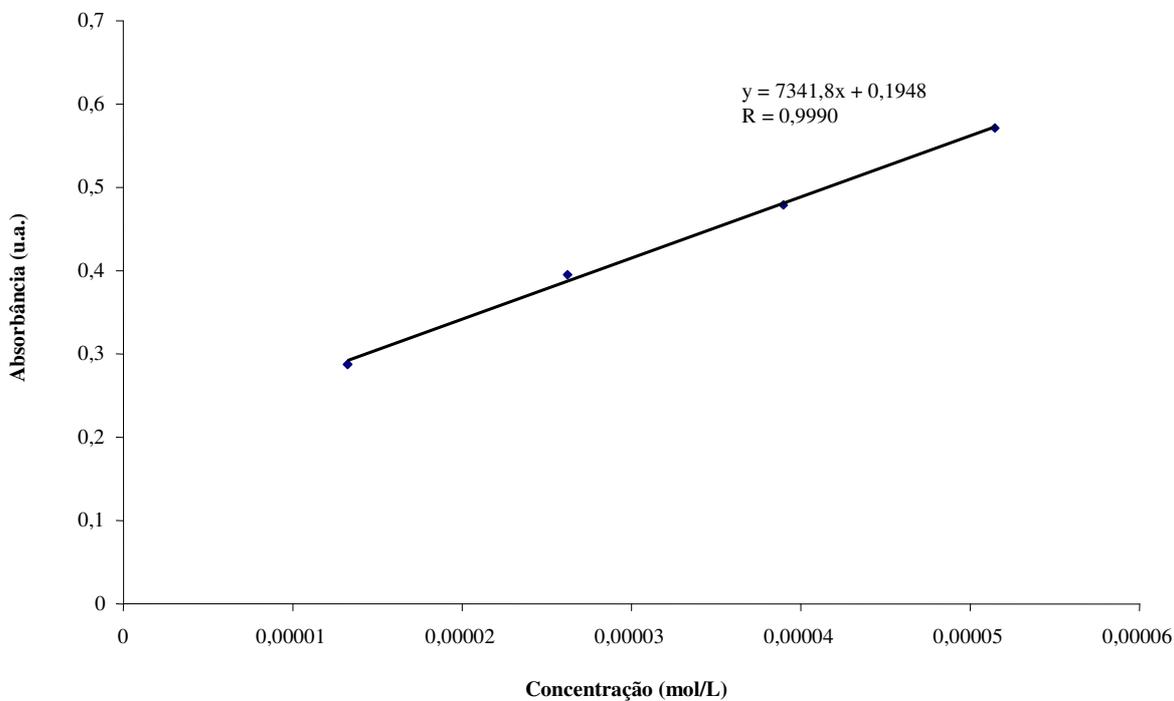


Figura A.12. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a flavanona (FNA), $\lambda = 319,5$ nm e $\epsilon = 7.341,8$ L/cm.mol.

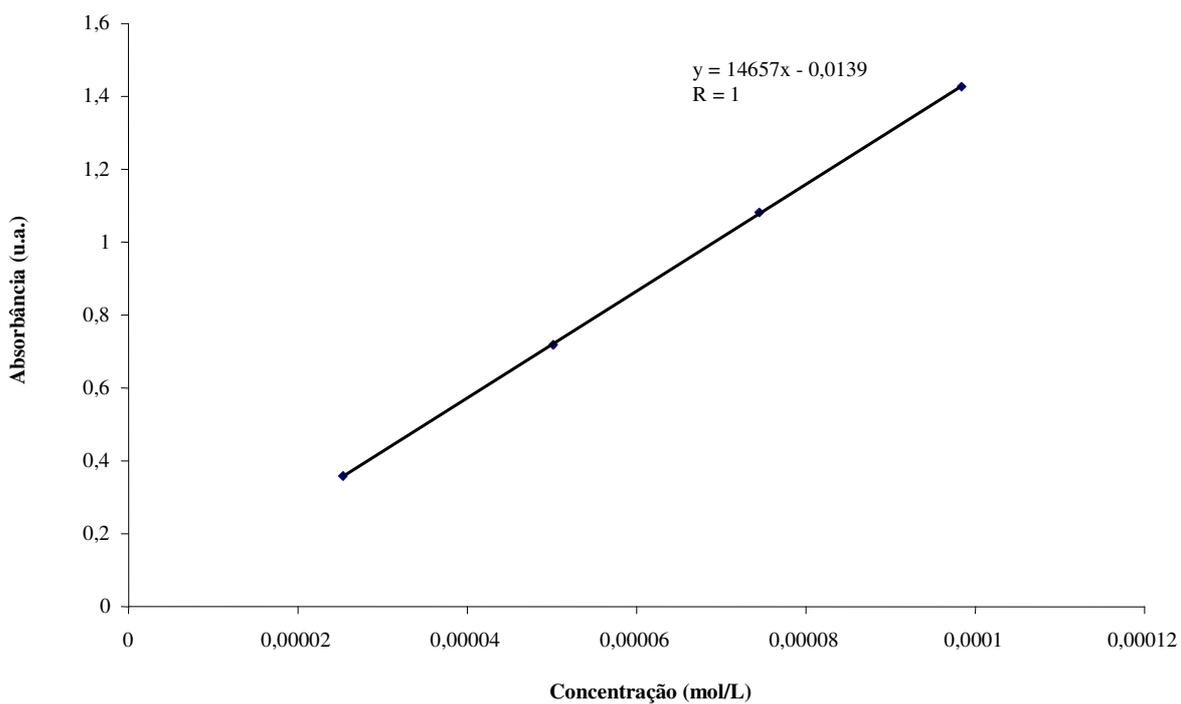


Figura A.13. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tiocromanona (TCR), $\lambda = 247,5$ nm e $\epsilon = 14.657$ L/cm.mol.

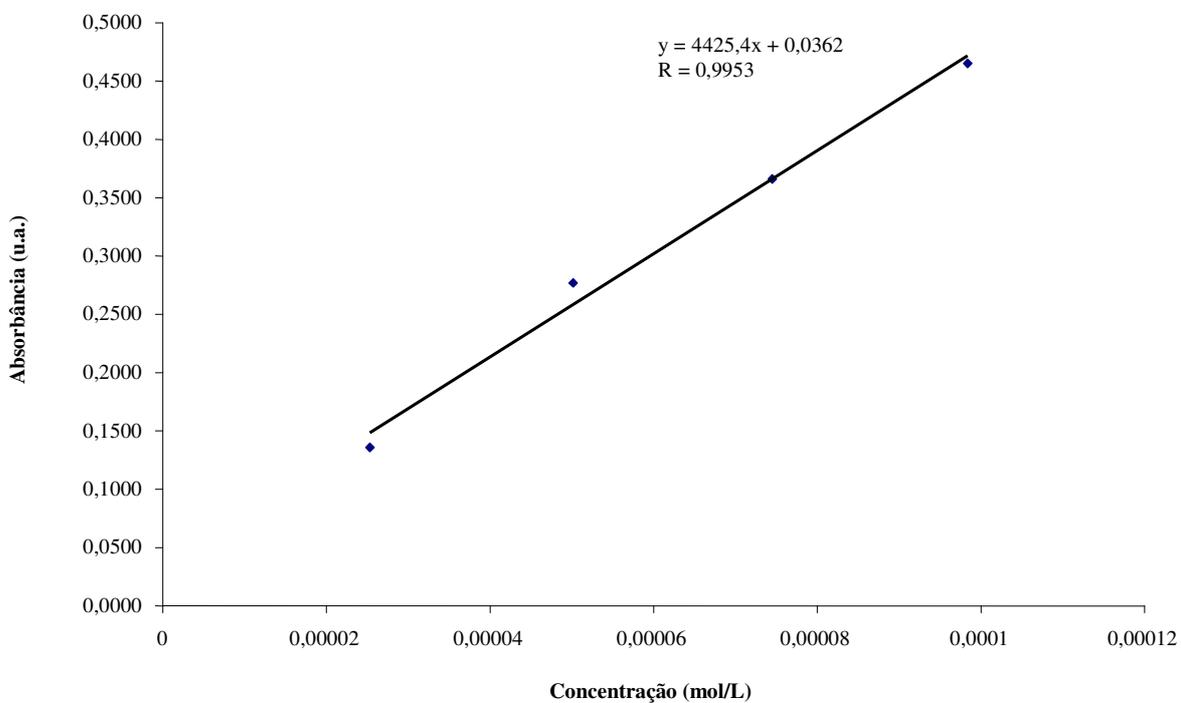


Figura A.14. Gráfico de absorvância (A) x concentração (C) para a tiocromanona (TCR), $\lambda = 299$ nm e $\epsilon = 4.425,4$ L/cm.mol.

Anexo A.A Espectros no infravermelho para os flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR).

As Figuras A.A.1 a A.A.7 mostram os espectros de infravermelho obtidos por espectroscopia de infravermelho (FTIR).

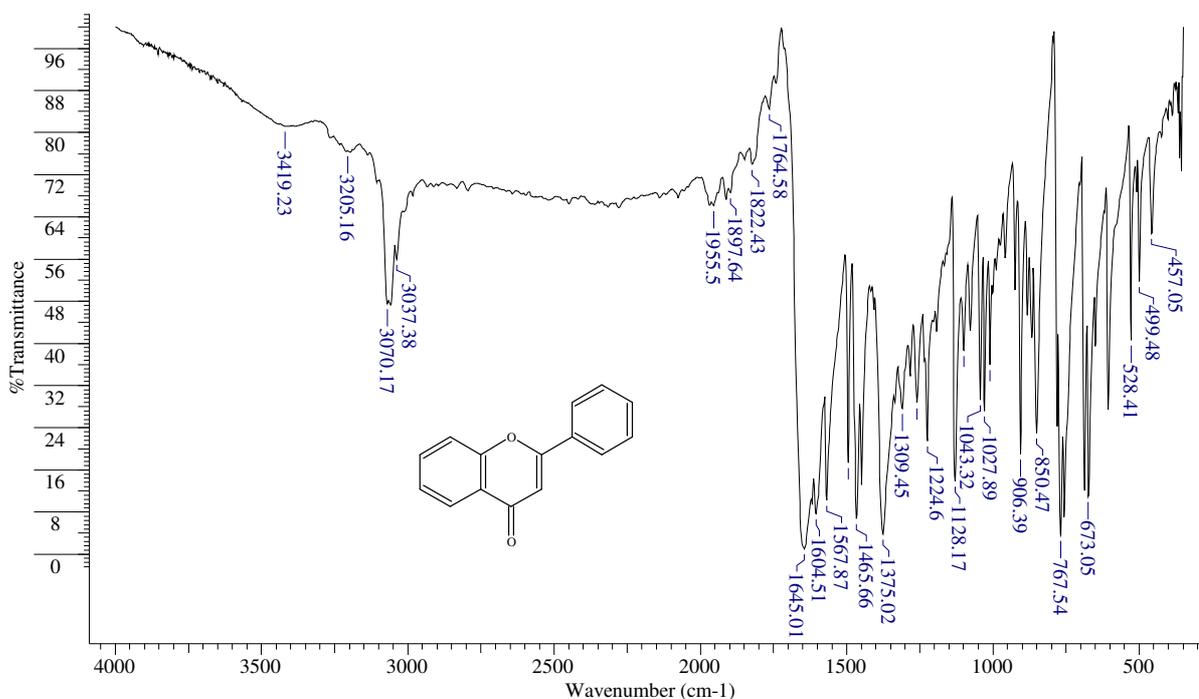


Figura A.A.1. Espectro no infravermelho para flavona (FVA).

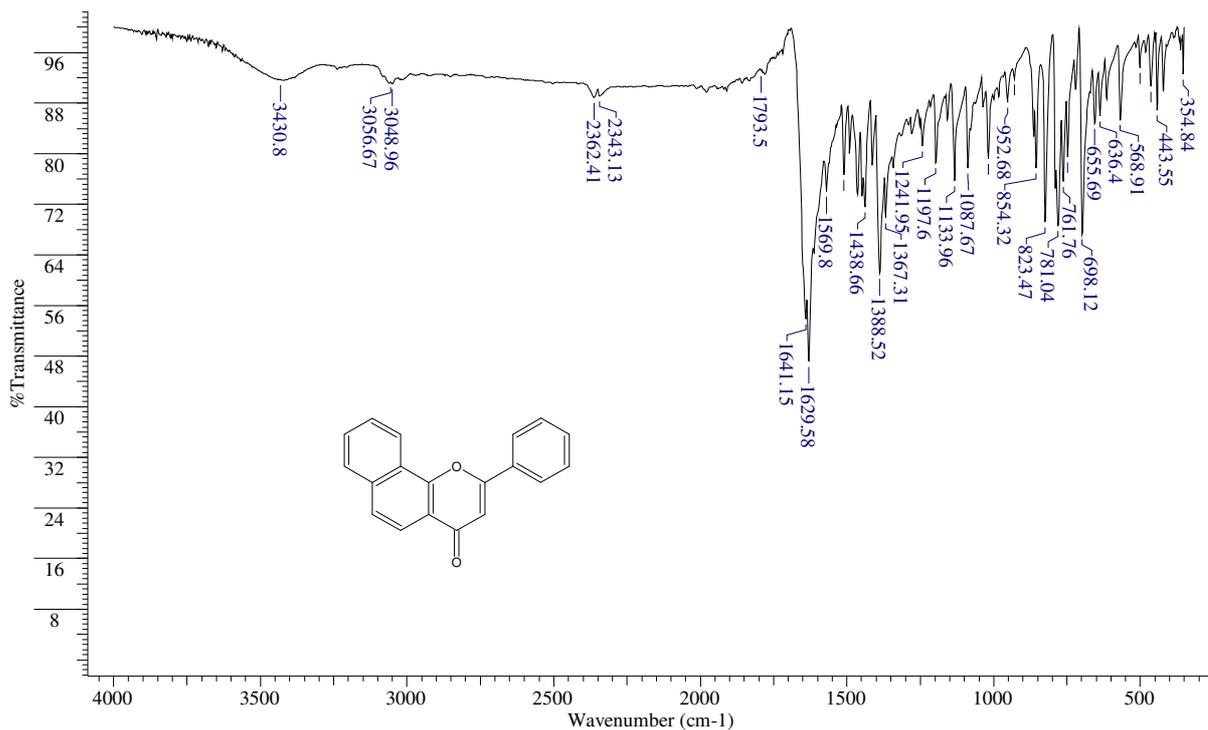


Figura A.A.2. Espectro no infravermelho para α -naftoflavona (α -NAF).

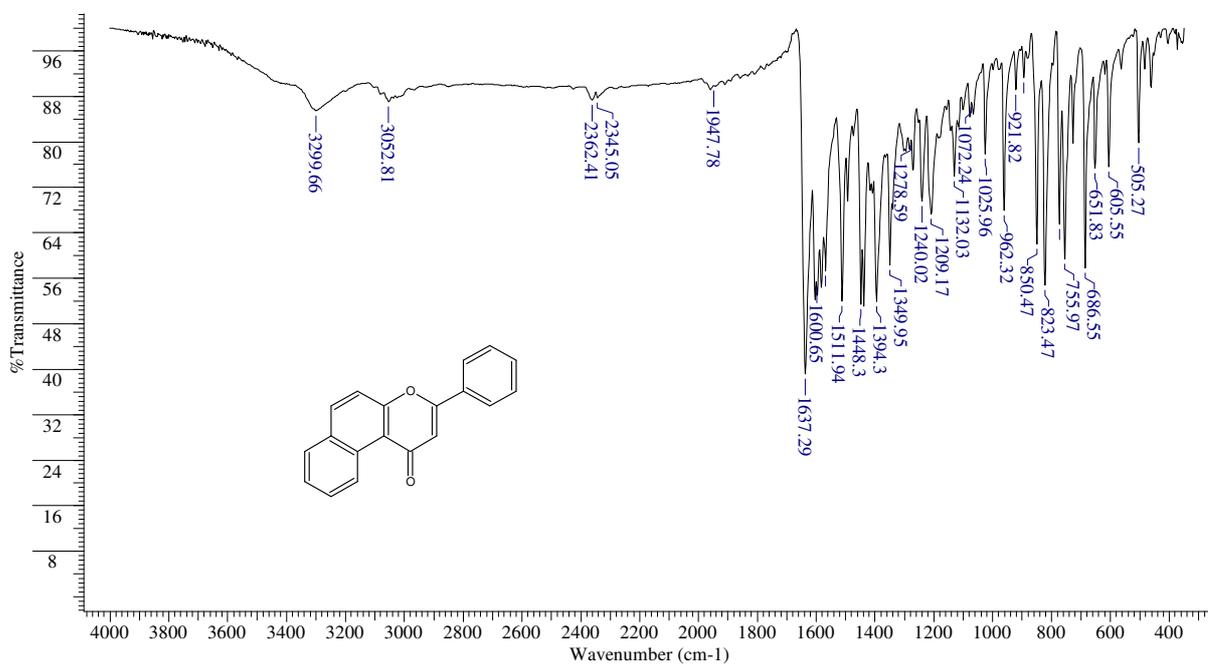


Figura A.A.3. Espectro no infravermelho para β -naftoflavona (β -NAF).

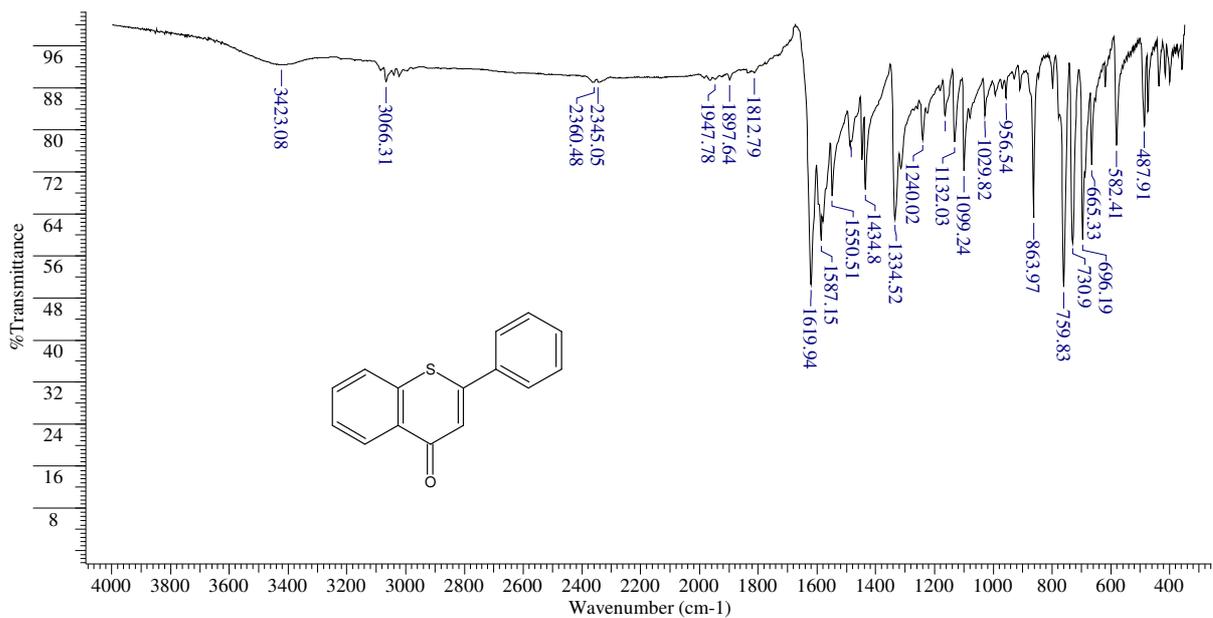


Figura A.A.4. Espectro no infravermelho para tioflavona (TFA).

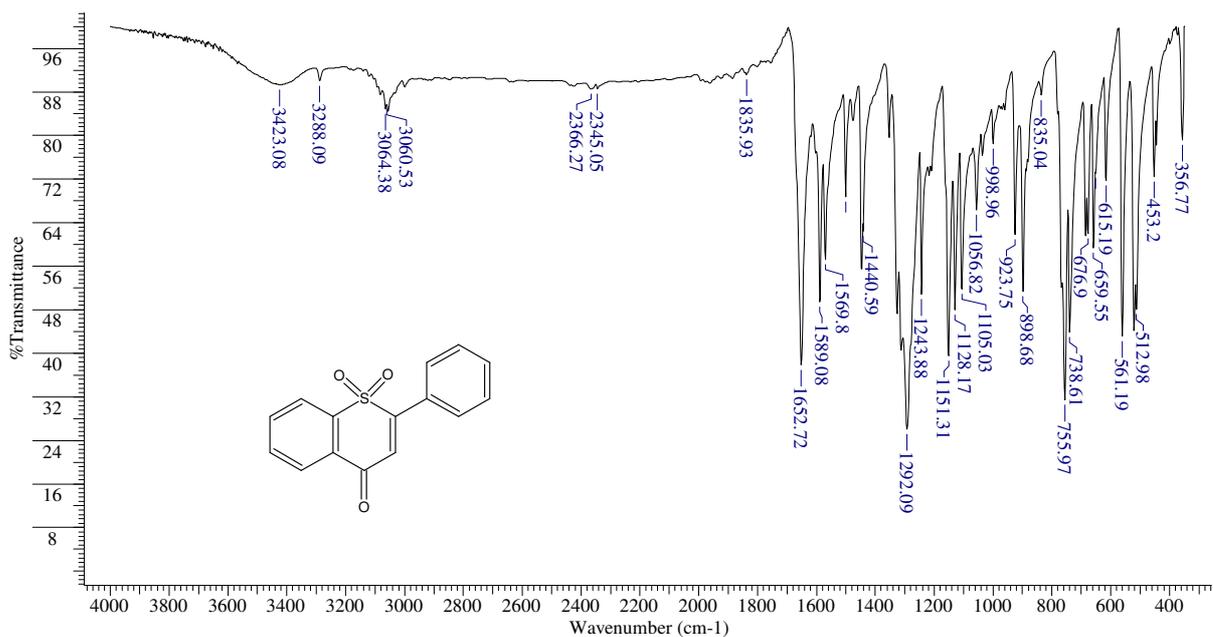


Figura A.A.5. Espectro no infravermelho para *S,S*-dióxidotioflavona (SDF).

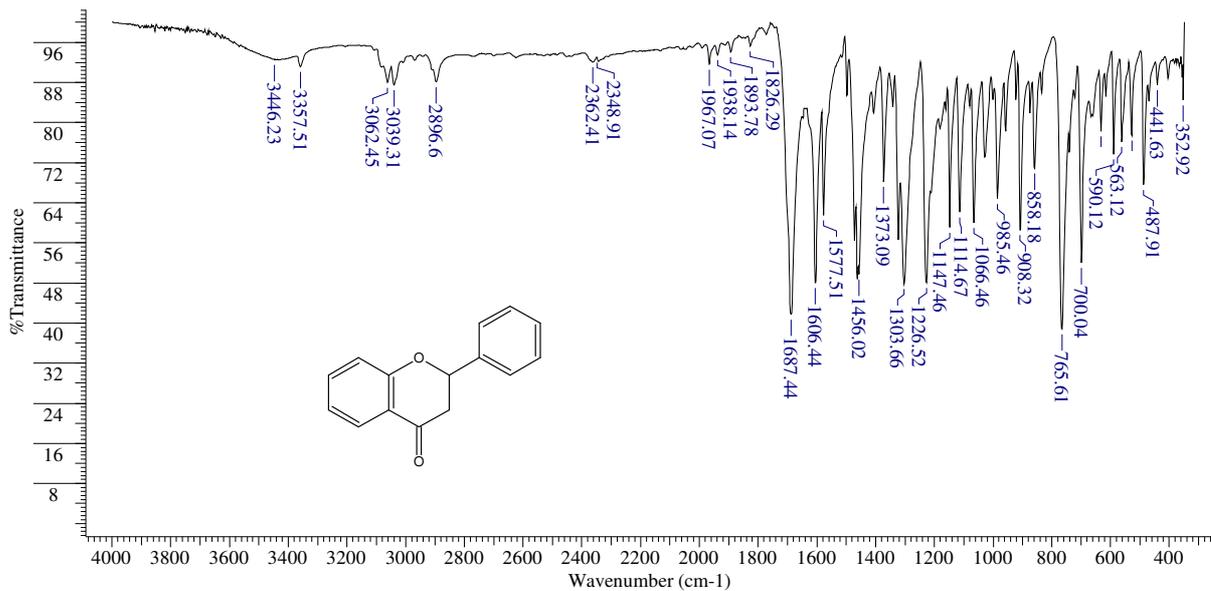


Figura A.A.6. Espectro no infravermelho para flavanona (FNA).

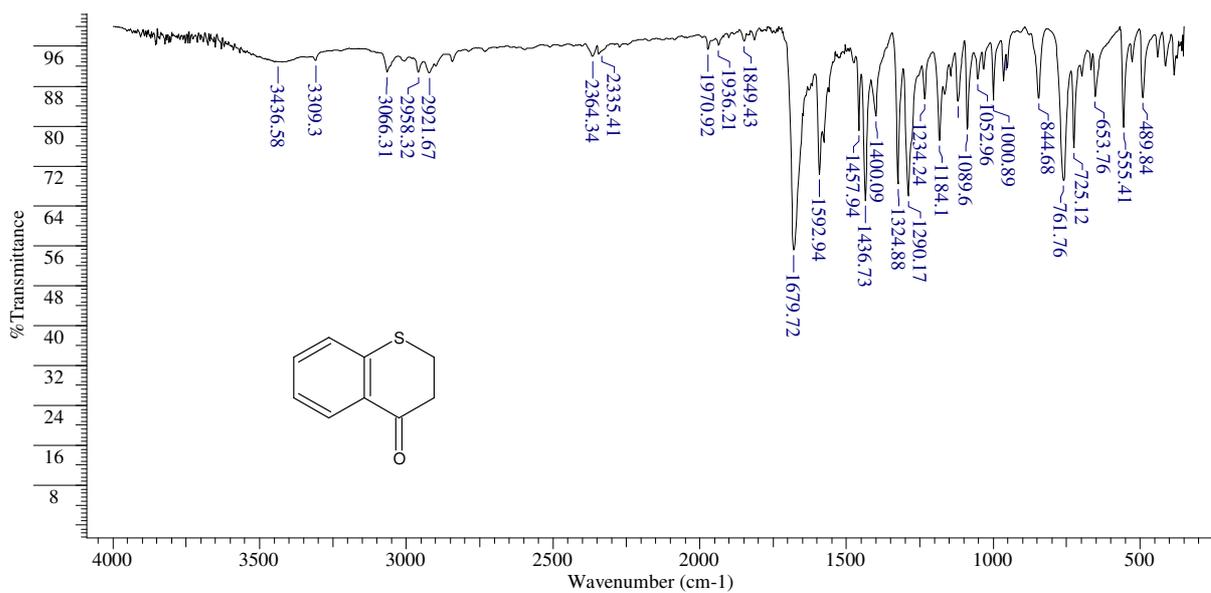


Figura A.A.7. Espectro no infravermelho para tiocromanona (TCR).

Anexo A.B Espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA)) e tiocromanona (TCR).

As Figuras A.B.1 a A.B.14 mostram os espectros de RMN ^1H e ^{13}C obtidos por ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C (RMN ^1H e ^{13}C).

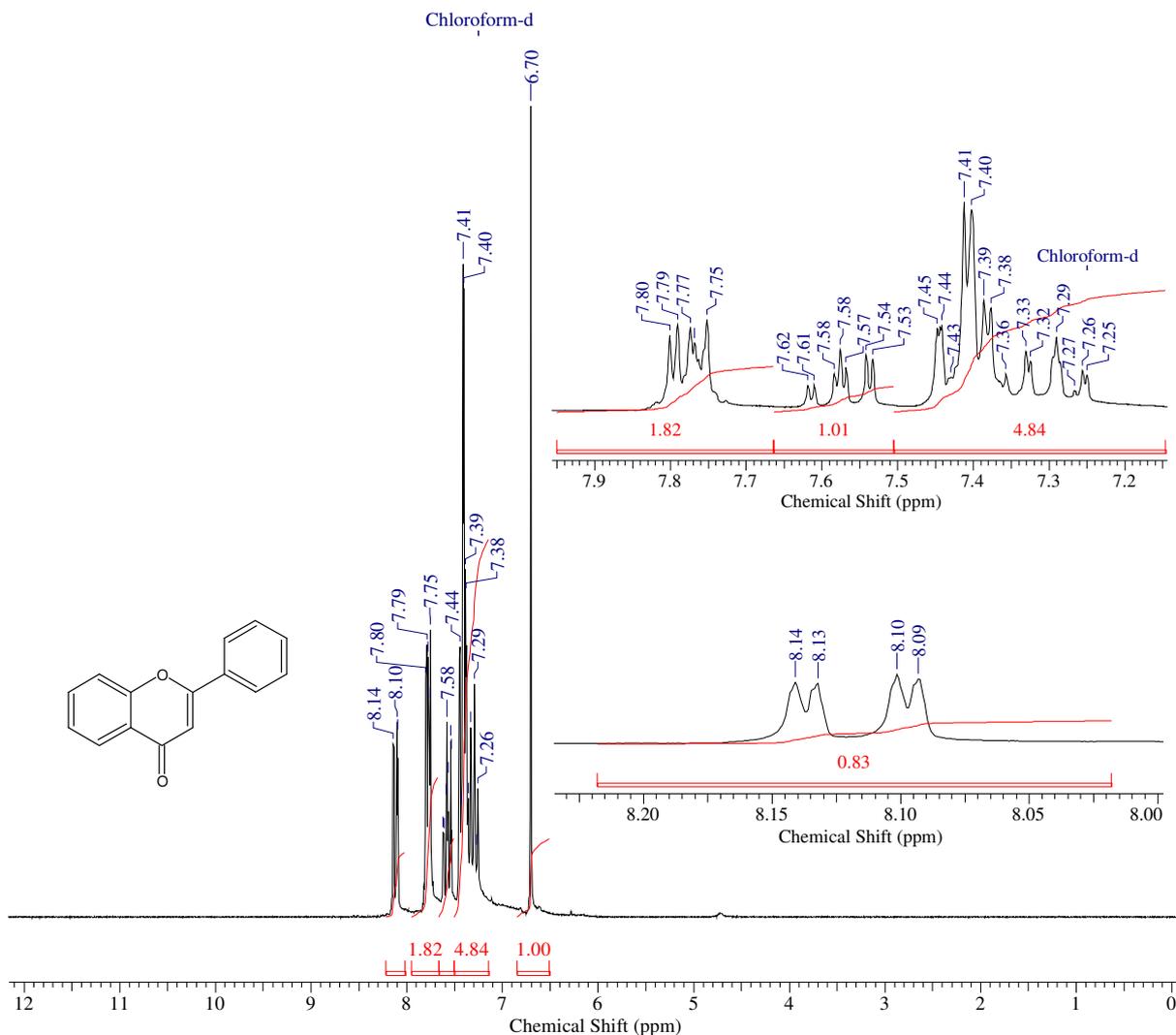


Figura A.B.1. Espectro de RMN ^1H da flavona (FVA).

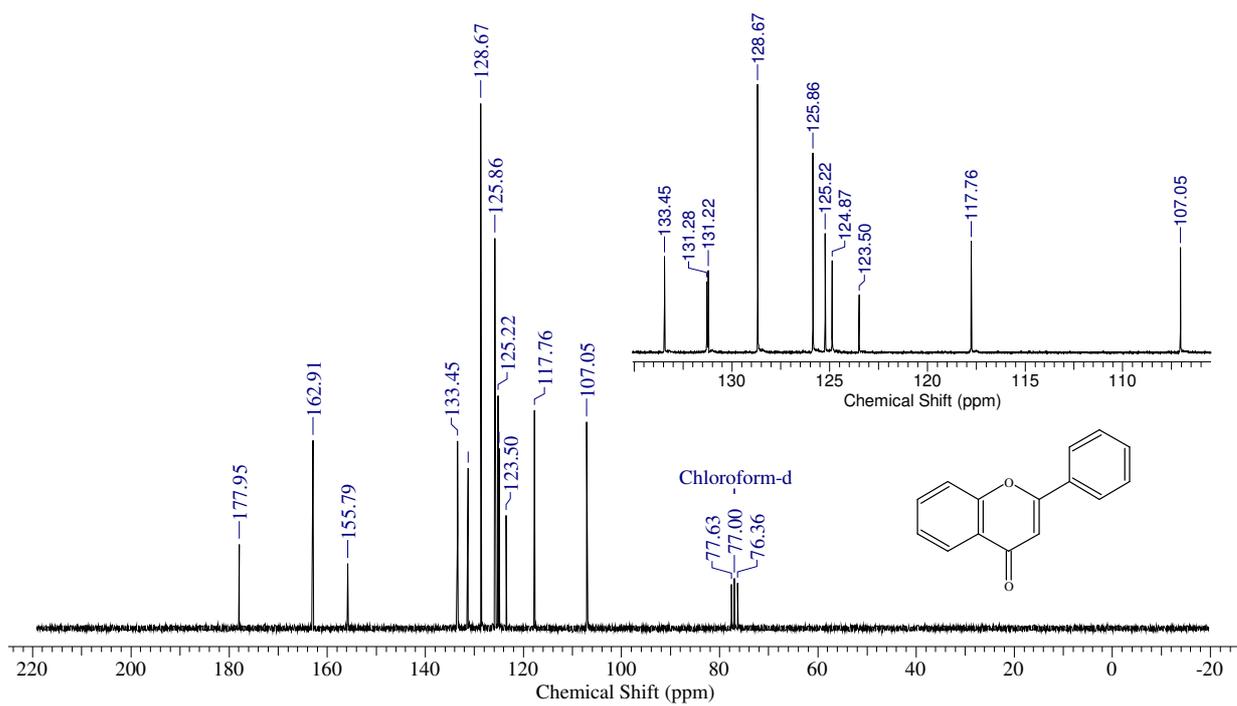


Figura A.B.2. Espectro de RMN ^{13}C da flavona (FVA).

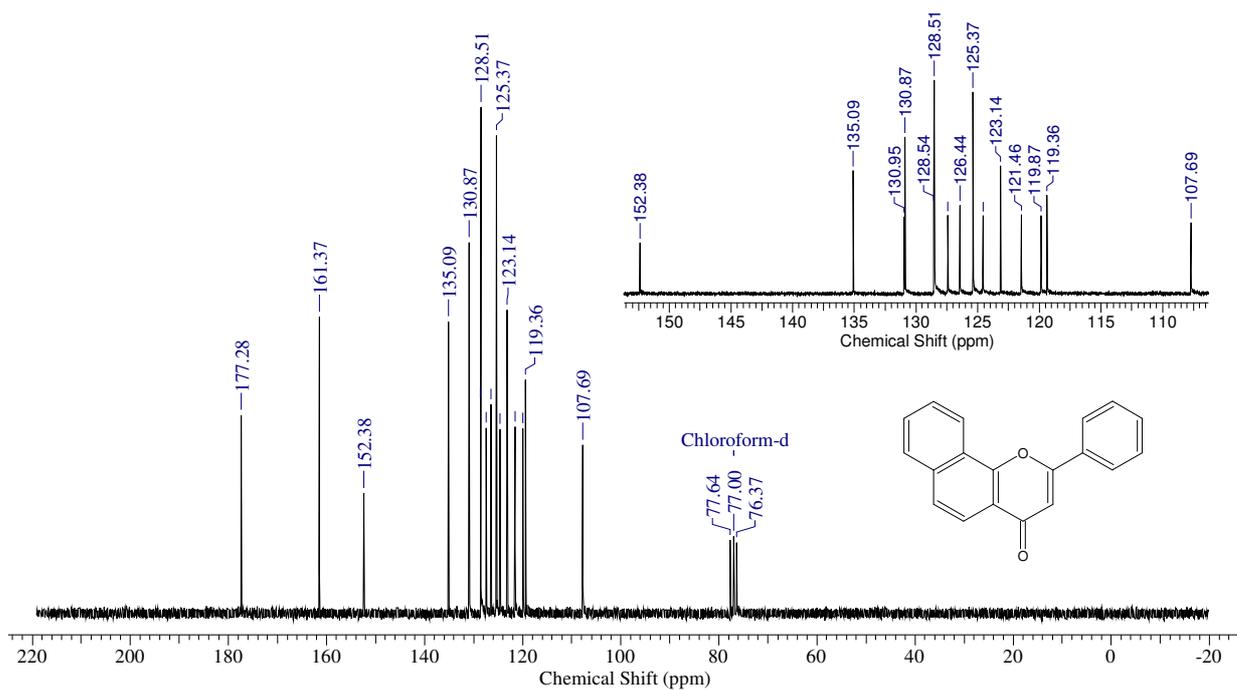


Figura A.B.4. Espectro de RMN ^{13}C da α -naftoflavona (α -NAF).

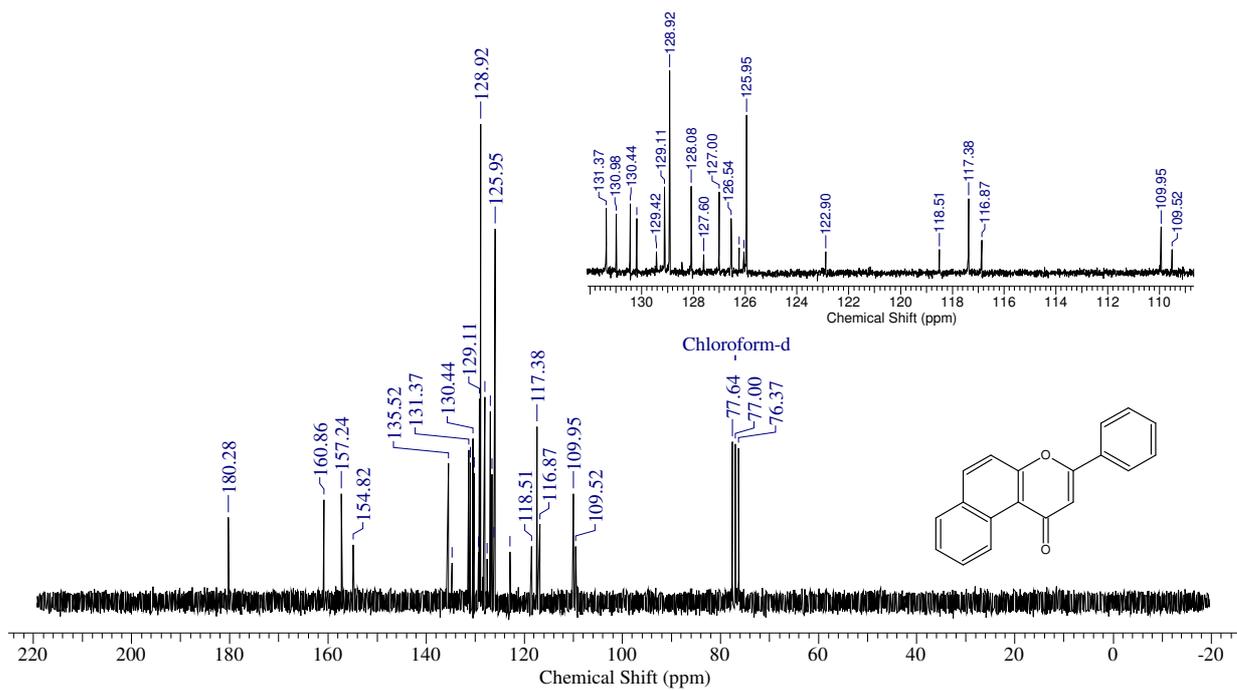


Figura A.B.6. Espectro de RMN ^{13}C da β -naftoflavona (β -NAF).

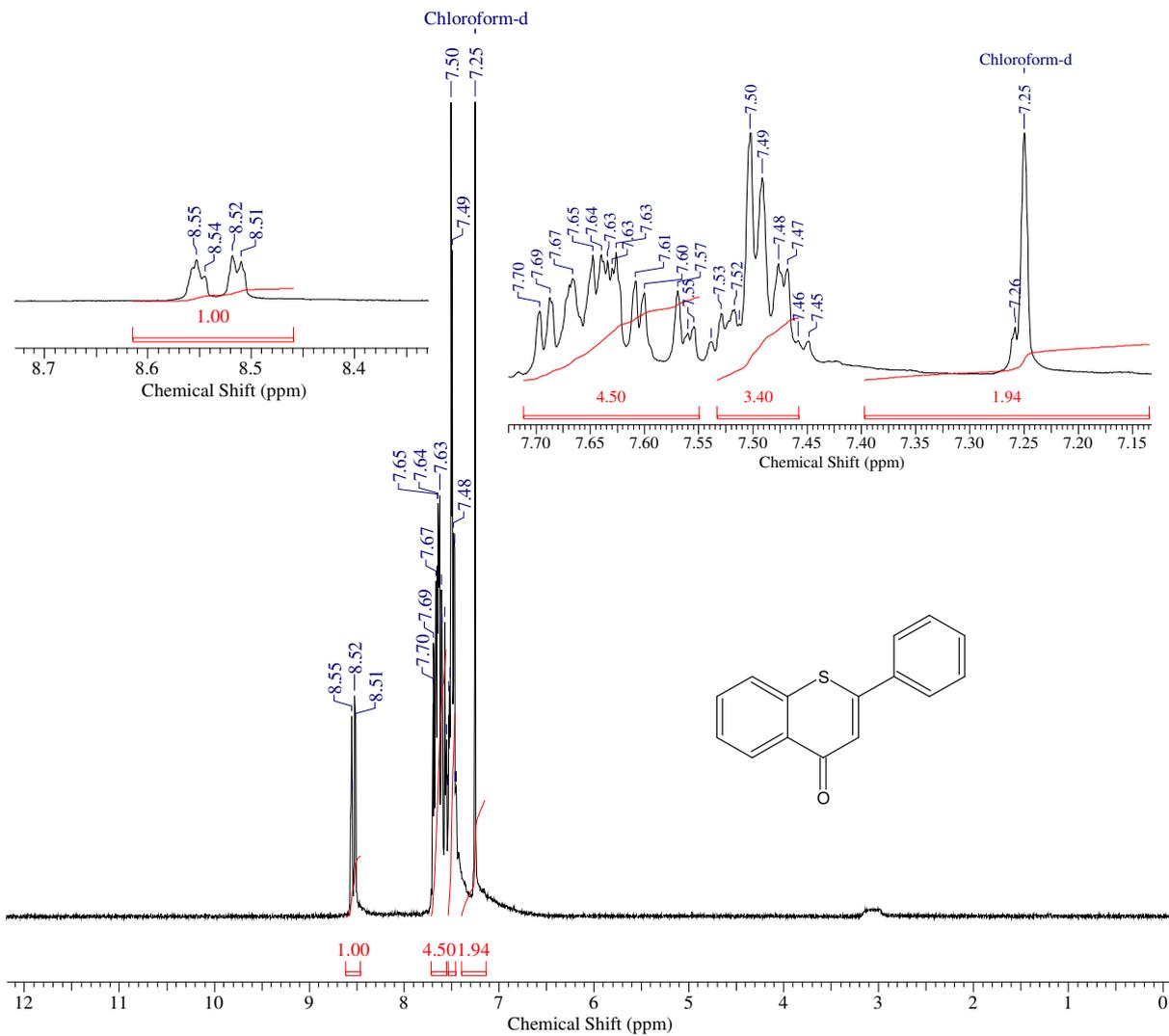


Figura A.B.7. Espectro de RMN ^1H da tioflavona (TFA).

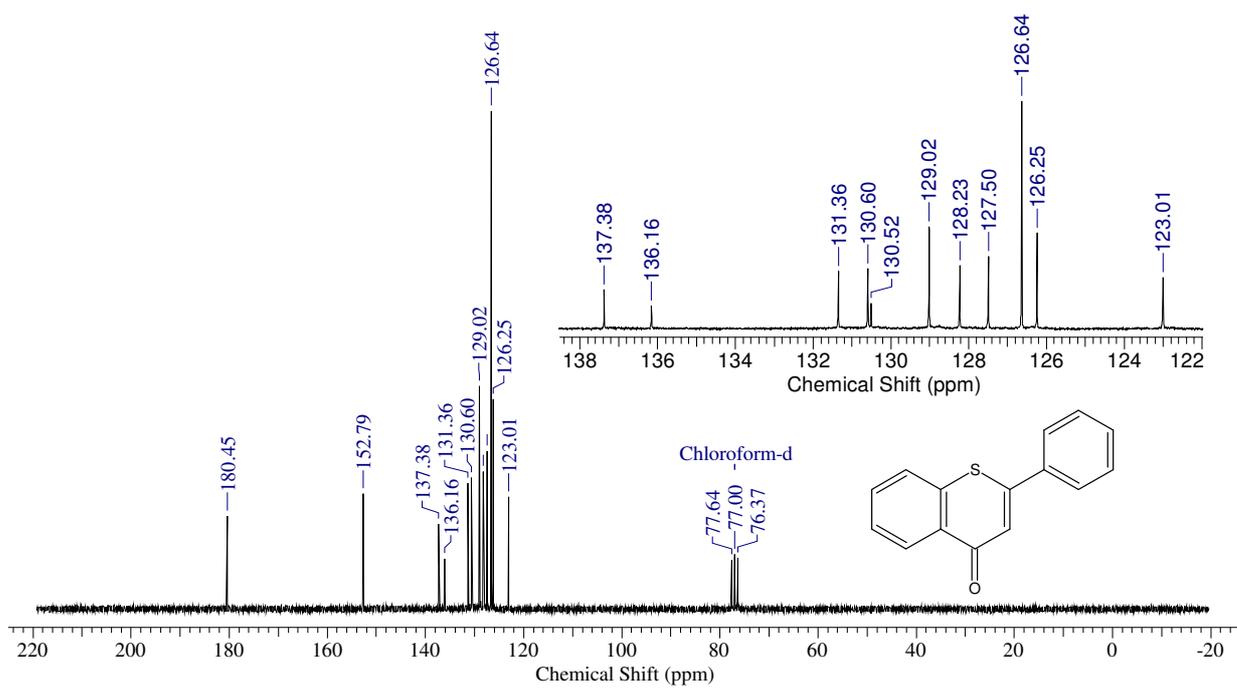


Figura A.B.8. Espectro de RMN ^{13}C da tioflavona (TFA).

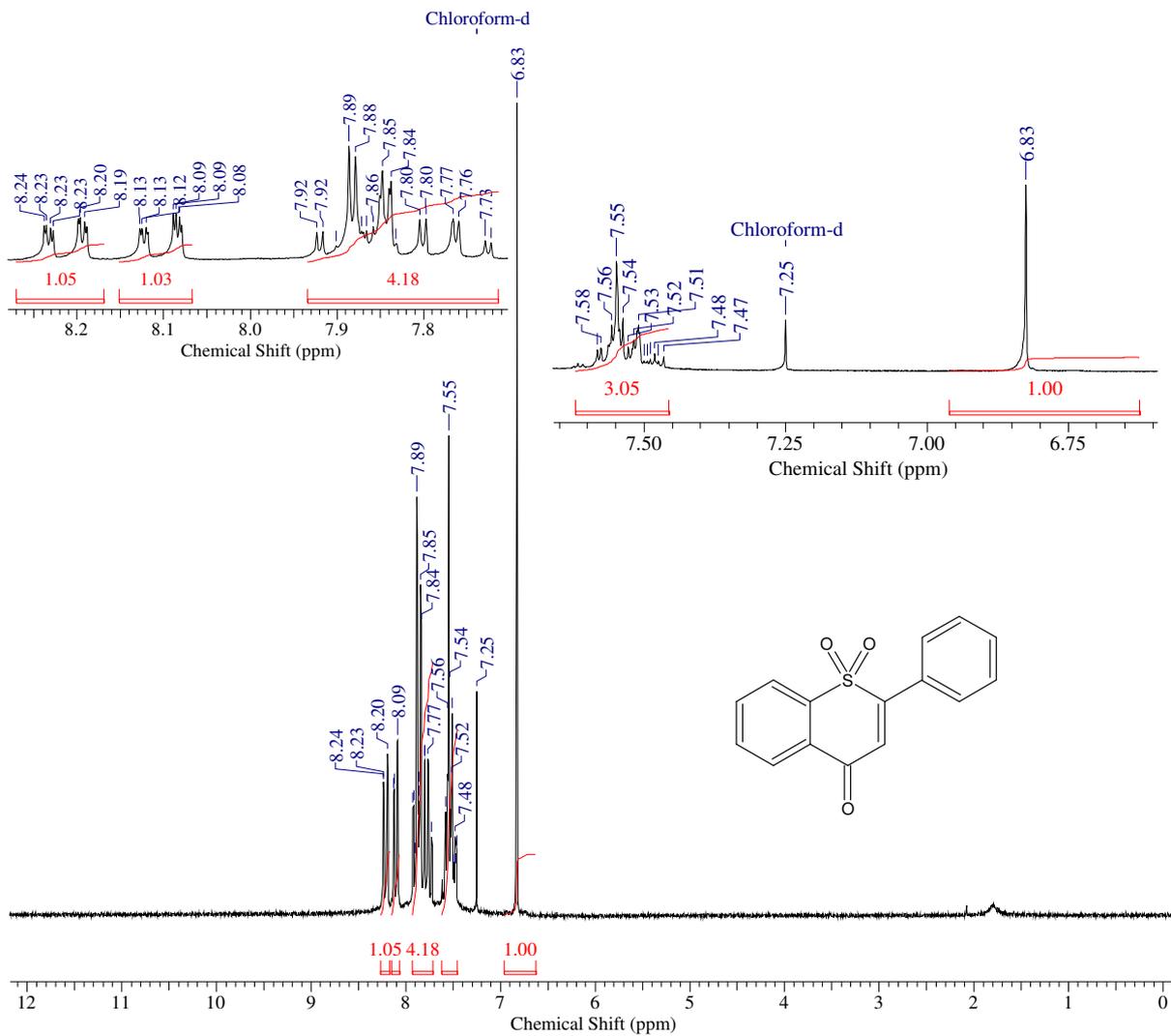


Figura A.B.9. Espectro de RMN ^1H da *S,S*-dióxidotioflavona (SDF).

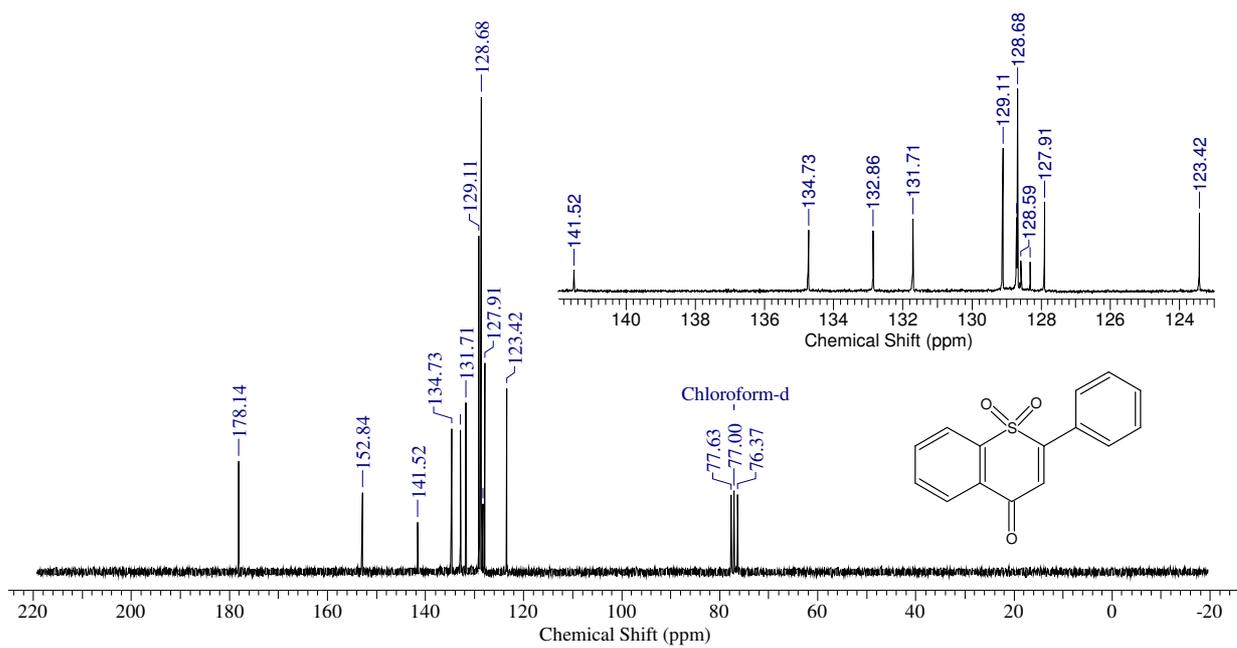


Figura A.B.10. Espectro de RMN ^{13}C da *S,S*-dióxidotioflavona (SDF).

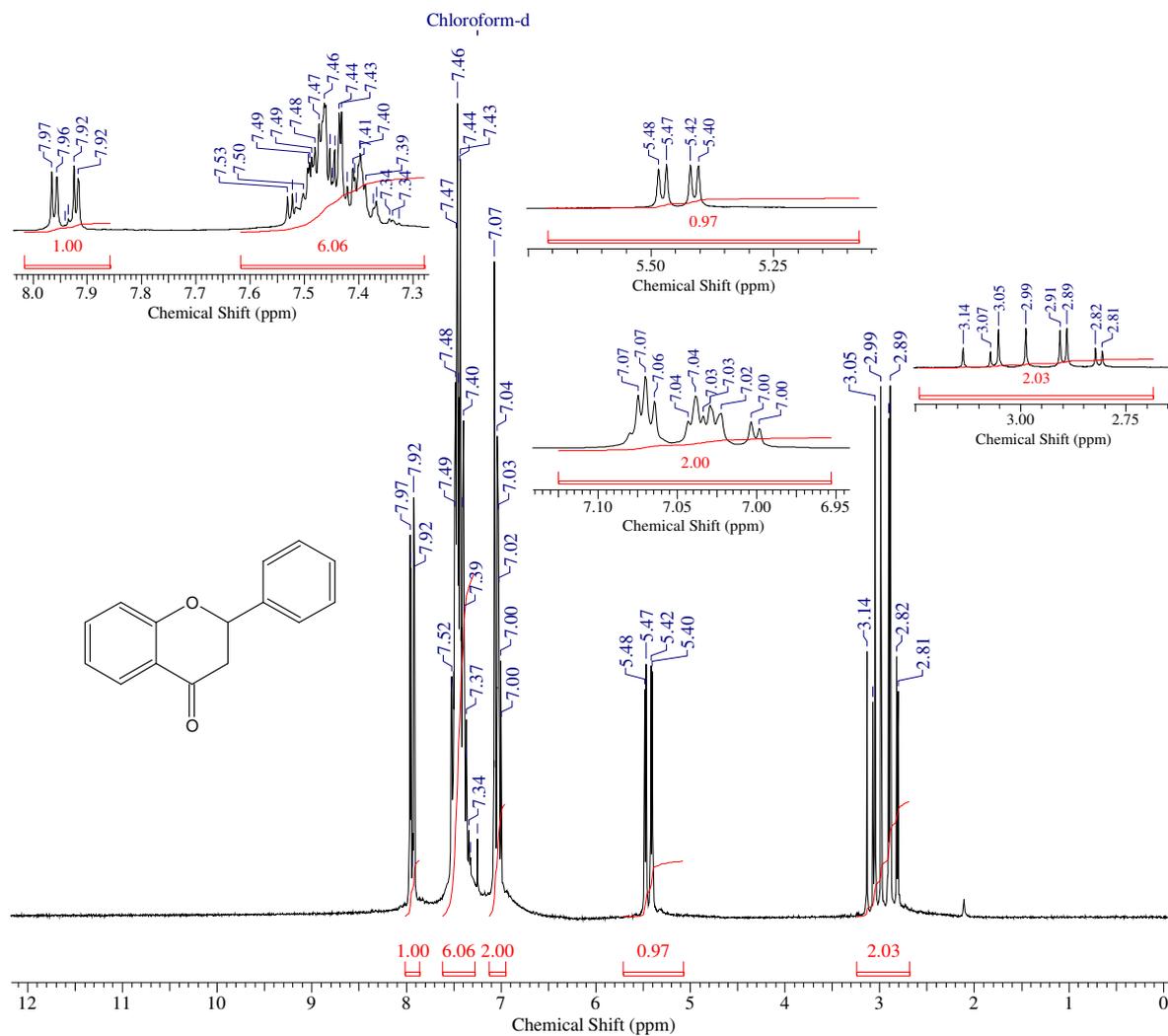


Figura A.B.11. Espectro de RMN ¹H da flavanona (FNA).

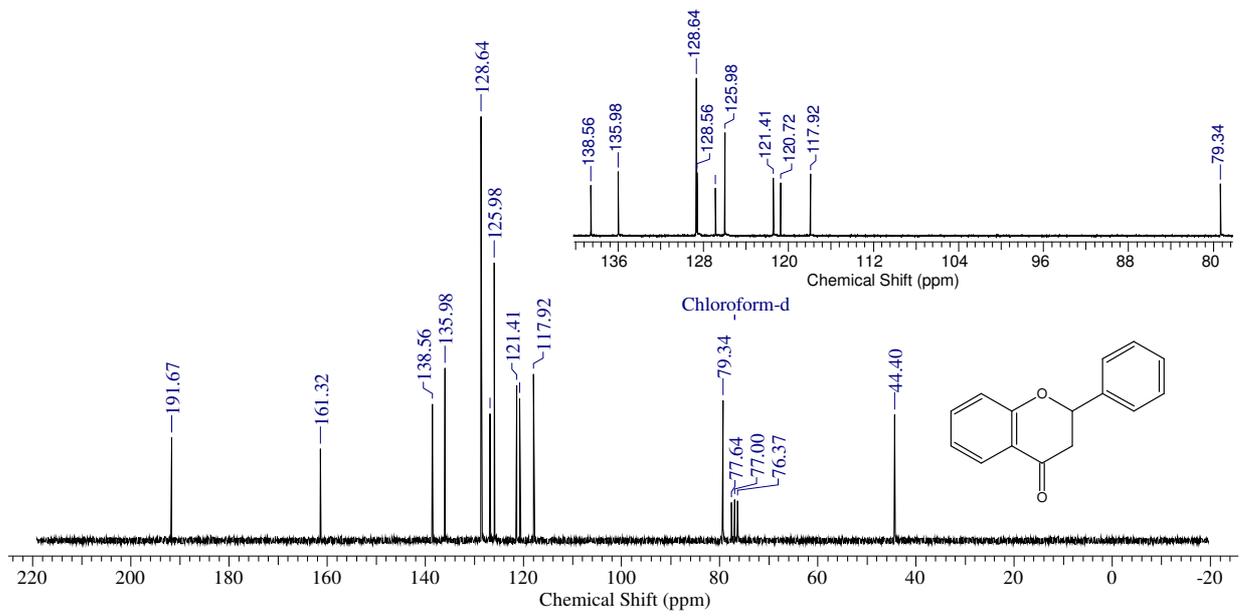


Figura A.B.12. Espectro de RMN ^{13}C da flavanona (FNA).

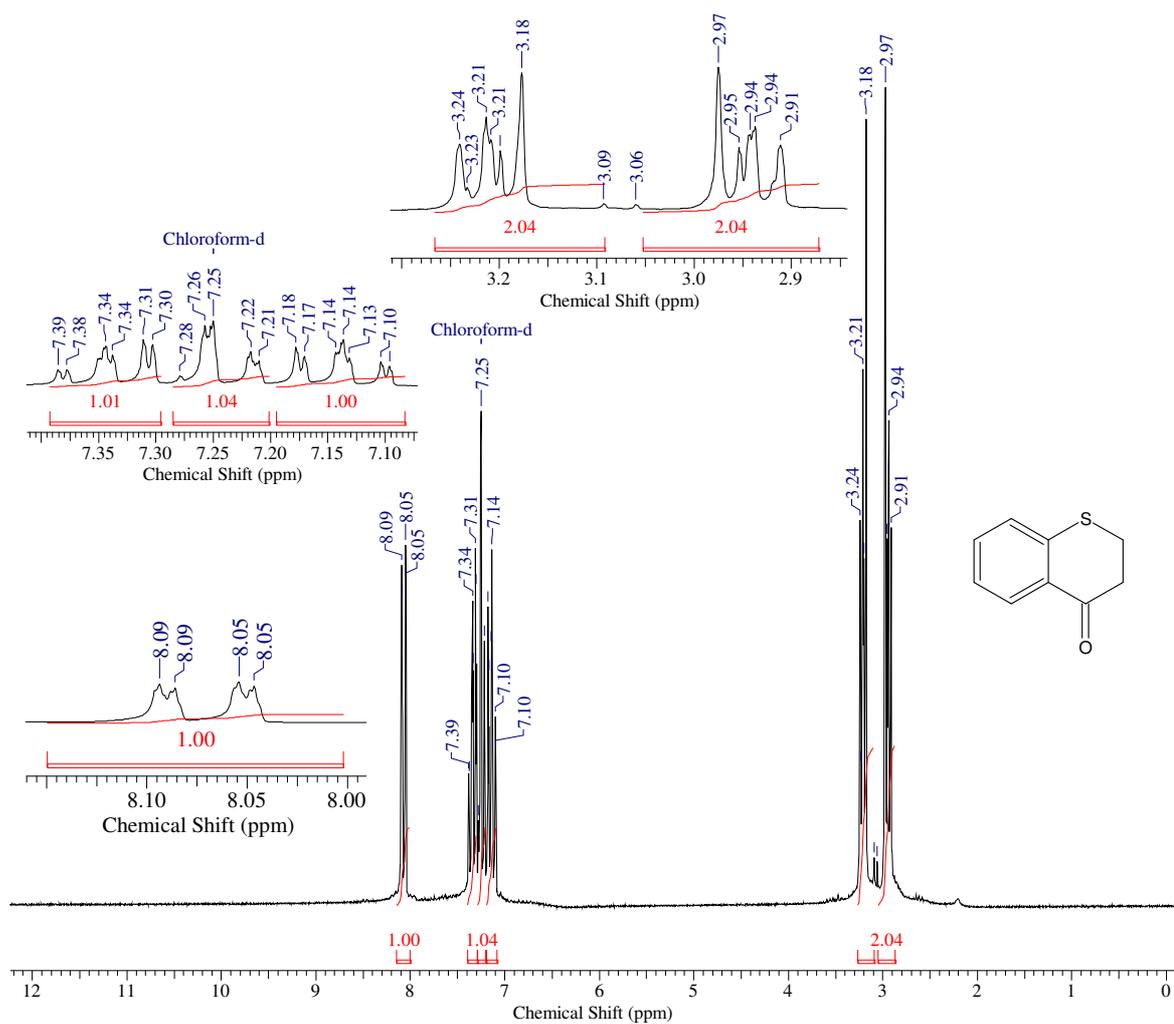


Figura A.B.13. Espectro de RMN ^1H da tiocromanona (TCR).

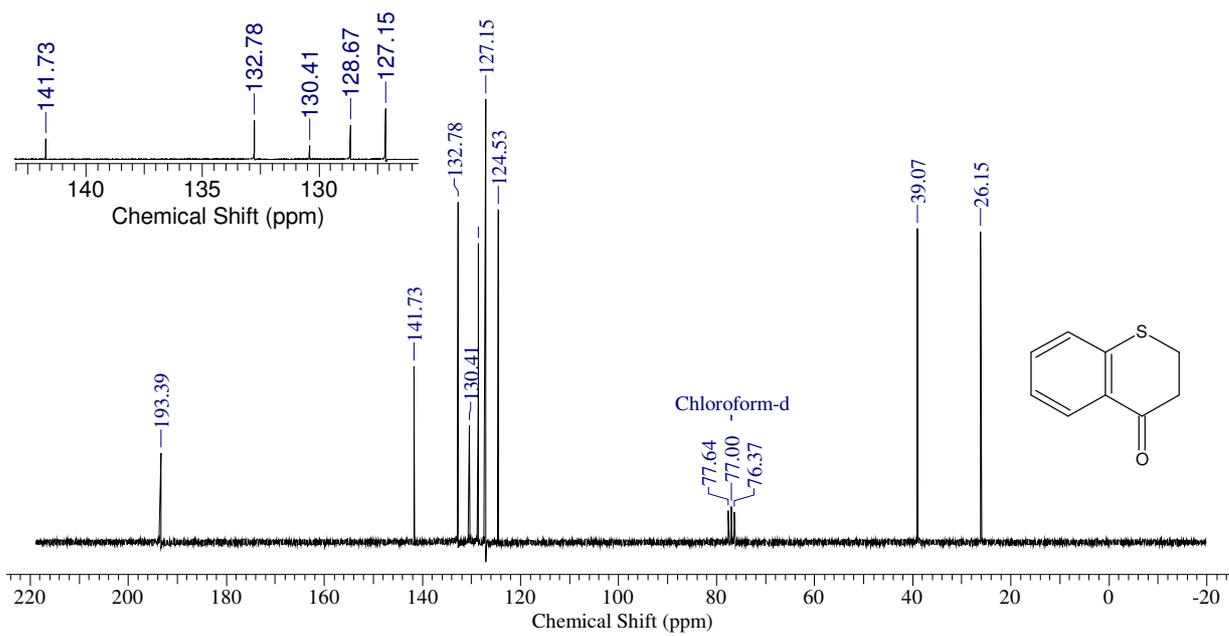


Figura A.B.14. Espectro de RMN ^{13}C da tiocromanona (TCR).

Anexo A.C Espectros de massas dos flavonóides (flavona (FVA), *alfa*-naftoflavona (α -NAF), *beta*-naftoflavona (β -NAF), tioflavona (TFA), *S,S*-dióxidotioflavona (SDF), flavanona (FNA) e tiocromanona (TCR).

As Figuras A.C.1 a A.C.7 mostram os espectros de massas obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

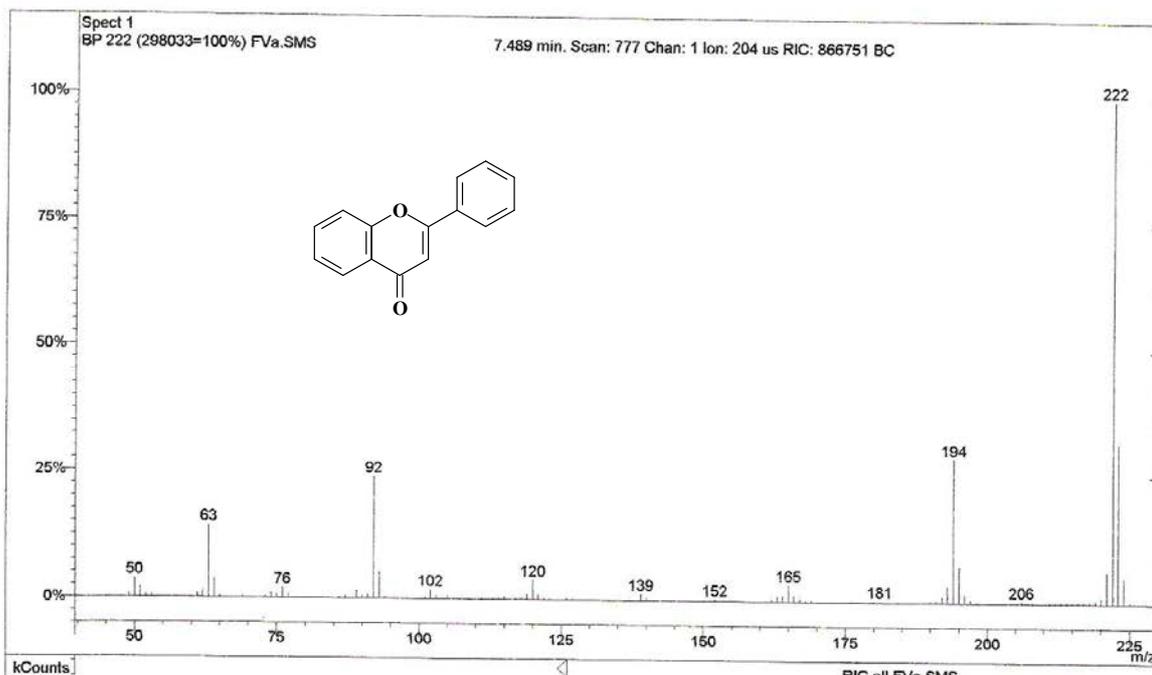


Figura A.C.1. Espectro de massas da flavona (FVA).

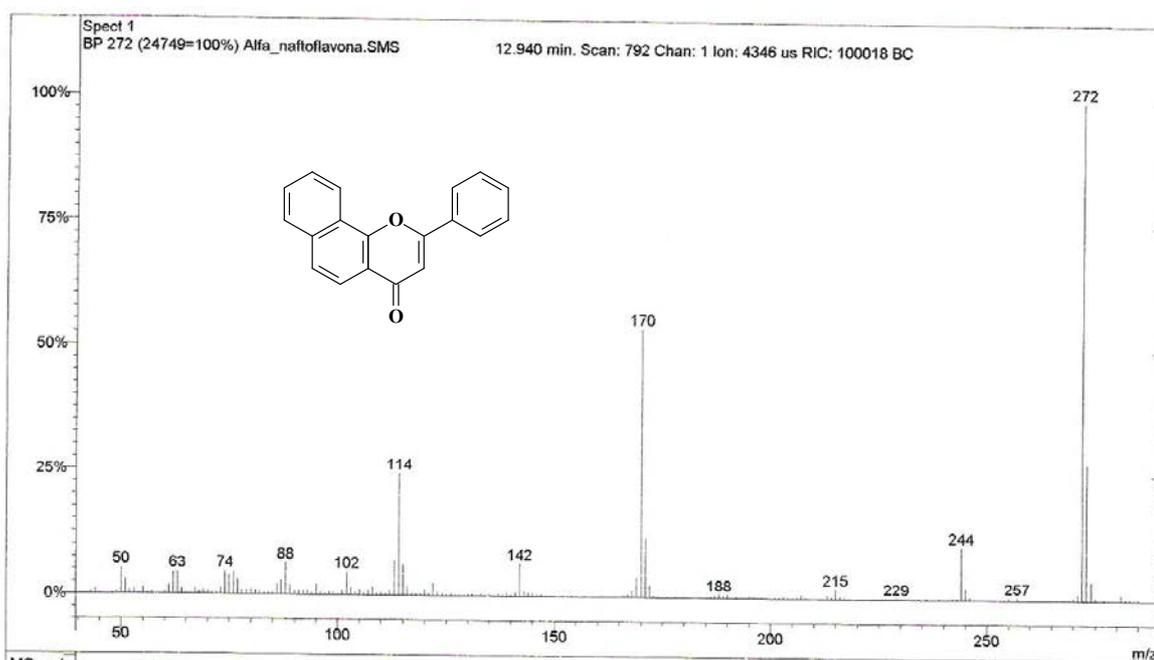


Figura A.C.2. Espectro de massas da *alfa*-naftoflavona (α -NAF).

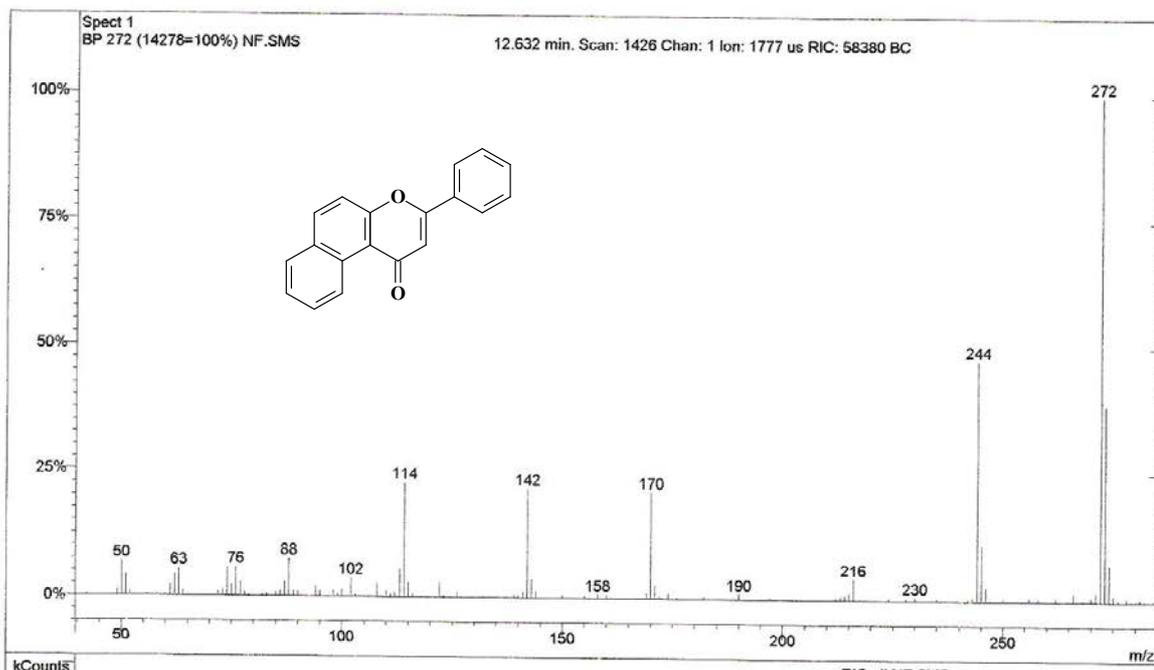


Figura A.C.3. Espectro de massas da *beta*-naftoflavona (β -NAF).

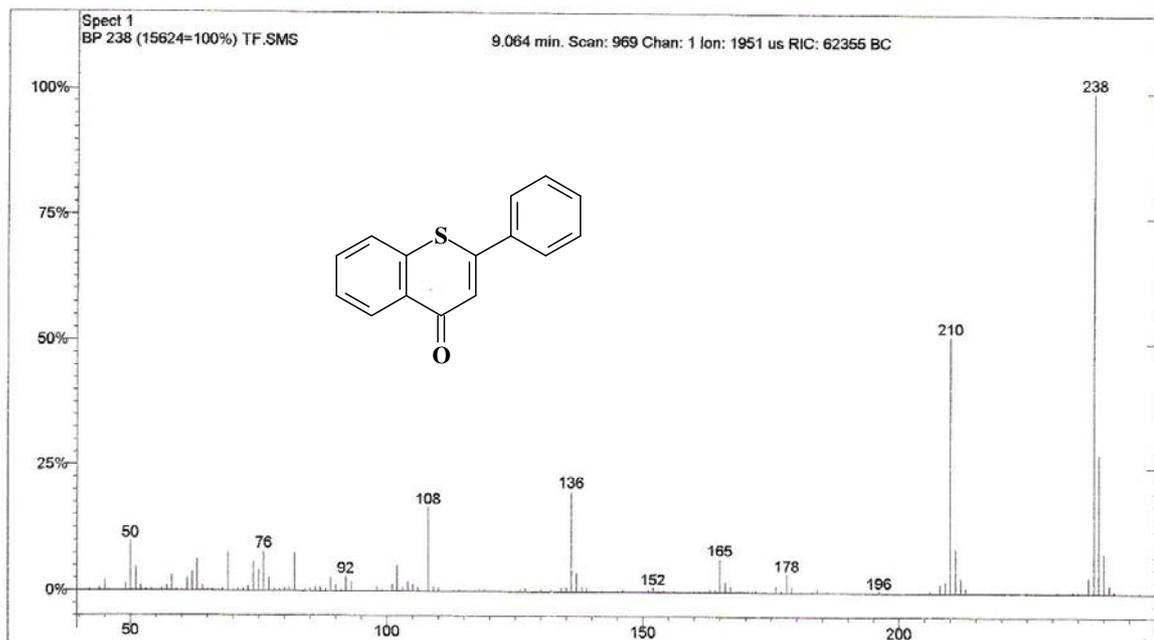


Figura A.C.4. Espectro de massas da tioflavona (TFA).

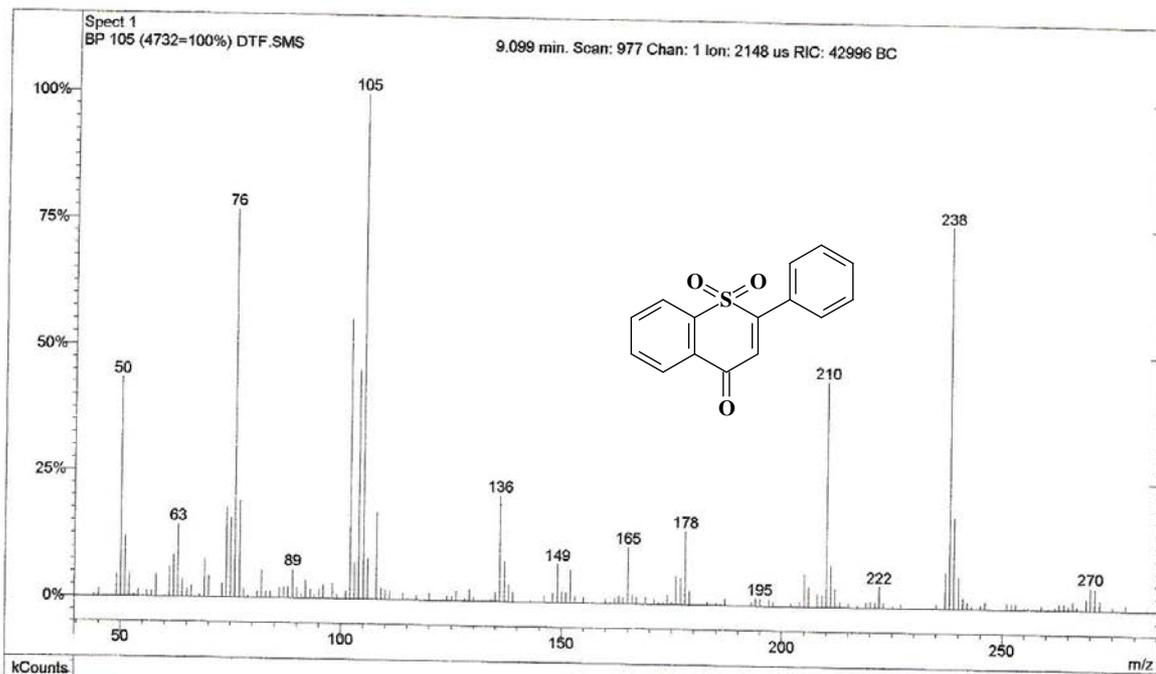


Figura A.C.5. Espectro de massas da *S,S*-dióxidotioflavona (SDF).

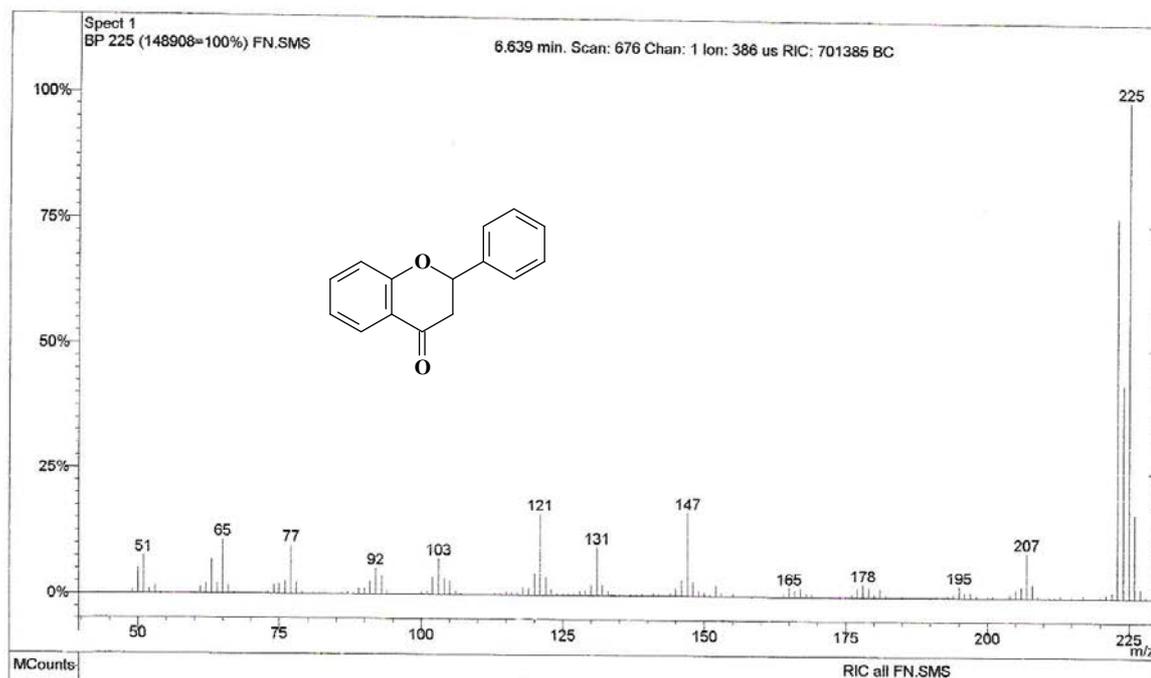


Figura A.C.6. Espectro de massas da flavanona (FNA).

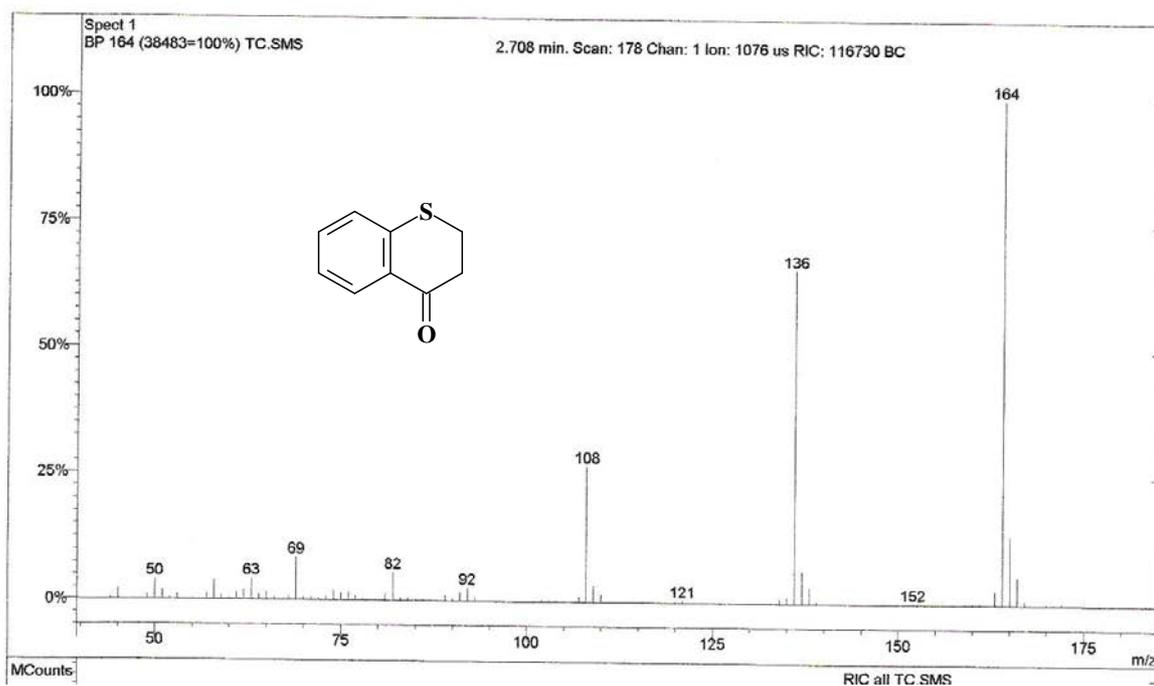


Figura A.C.7. Espectro de massas da tiocromanona (TCR).

Phenolic Hydrogen Abstraction by the Triplet Excited State of Thiochromanone: A Laser Flash Photolysis Study

Alessandra M. Ribeiro,^a Ada Ruth Bertoti^b and José Carlos Netto-Ferreira^{*,a,b}

^aDepartamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23851-970 Seropédica-RJ, Brazil

^bInstituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Campus de Ondina, 40170-490 Salvador-BA, Brazil

O estado excitado triplete de cetonas pode oxidar substratos biológicos acarretando danos a diversas biomoléculas como aminoácidos, nucleosídeos e mesmo DNA. Como parte de nossos estudos acerca da interação entre carbonilas e fenóis, foi investigada a reatividade do estado excitado triplete de tiocromanona (**1**) frente a fenóis, em acetonitrila, empregando a técnica de fotólise por pulso de laser de nanossegundo. As constantes de velocidade de supressão obtidas variaram de $(1,1 \pm 0,1) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (4-cianofenol) a $(5,8 \pm 1,0) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (hidroquinona). Um gráfico de Hammett para a reação do triplete de **1** com uma série de fenóis contendo substituintes polares resultou em uma constante de reação $\rho = -0,90$. Este valor negativo para a constante de reação ρ está plenamente de acordo com um mecanismo envolvendo uma transferência acoplada elétron/próton no processo de transferência de hidrogênio do fenol para a carbonila triplete.

Triplet ketones are known to oxidize biological substrates which can lead to damage of several biomolecules such as amino acids, nucleosides and DNA. As part of our systematic study on the interaction between carbonyl compounds and phenols, the triplet reactivity of thiochromanone (**1**) towards substituted phenols, in acetonitrile, was investigated employing the laser flash photolysis technique. The quenching rate constants ranged from $(1.1 \pm 0.1) \times 10^8 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (4-cyanophenol) to $(5.8 \pm 1.0) \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (hydroquinone). A Hammett plot for the reaction of triplet **1** with phenols containing polar substituents resulted in a reaction constant $\rho = -0.90$. This negative value observed for the reaction constant ρ is in accord with a mechanism in which the hydrogen transfer from phenols to the triplet carbonyl involves a coupled electron/proton transfer.

Keywords: thiochromanone, laser flash photolysis, triplet excited state, hydrogen donors