



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

**ESTUDO ESPECTROSCÓPICO DA INTERAÇÃO ENTRE ANÁLOGOS
DA α -LAPACHONA E ALBUMINA SÉRICA HUMANA**

Romulo Correia Ferreira

Sob a Orientação do Professor
Dr. José Carlos Netto Ferreira

e Co-orientação do Professor
Dr. Darí Cesarin-Sobrinho

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

Seropédica, RJ
Abril de 2014

547
F383e
T

Ferreira, Rômulo Correia, 1985-
Estudo espectroscópico da interação
entre análogos da α -lapachona e albumina
sérica humana / Romulo Correia Ferreira. -
2014.
127 f.: il.

Orientador: José Carlos Netto Ferreira.
Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Química, 2014.
Bibliografia: f. 67-71.

1. Química orgânica - Teses. 2. Quinona
- Teses. 3. Análise espectral - Teses. 4.
Albumina - Teses. I. Ferreira, José Carlos
Netto, 1947-. II. Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

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

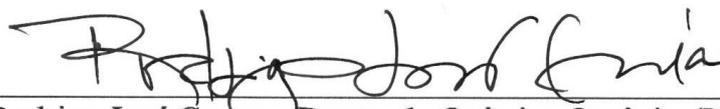
Romulo Correia Ferreira

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

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14/04/2014



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



Dr. Rodrigo José Correa - Depto. de Química Orgânica/IQ/UFRRJ



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

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

Dr. Sabrina Baptista Ferreira - Depto. de Química Orgânica/IQ/UFRRJ
(Suplente)

DEDICATÓRIA

Obrigado Sérgio de Oliveira Ferreira (*in memoriam*), pelo incentivo em tudo que fiz e pela certeza de seu orgulho por mais esta conquista. Seu trabalho ao lado de minha mãe não foi em vão. Obrigado Pai. Obrigado Mãe.

À minha companheira, amiga e mulher, somos noivos, mas tenho certeza que somos uma união bem mais forte que qualquer coisa. Essa é uma vitória que conquistamos juntos, entre muitas. Te amo, Vanessa Santos Tardem.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tornar possível o início e o término desta dissertação 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.

Ao laboratório de Fotoquímica do IQ/UFRJ, e especialmente ao Rodolfo, Rodriguinho, Reinaldo e aos professores Rodrigo José Correa e Nanci Lucas Garden por toda a atenção e imensa boa vontade na realização das análises de espectroscopia de fluorescência resolvida nas dependências do seu Laboratório de Fotoquímica.

Ao Prof. Mario Geraldo de Carvalho, pela aquisição do espectrofluorímetro que permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Sérgio de Oliveira Ferreira (*in memoriam*) e Maria Inês Correia, pela oportunidade do estudo, apoio, incentivo, dedicação e compreensão em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Bruno Correia Ferreira e Emanuele Correia Ferreira, pela paciência e grande amizade.

À minha noiva, Vanessa Santos Tardem, por toda ajuda durante todo o processo de elaboração deste trabalho, pelo conhecimento técnico que foi de grande ajuda, e principalmente pelo companheirismo, carinho, amizade, amor, apoio, compreensão, estímulo durante todo o tempo e, sobretudo, paciência nos momentos que mais precisei.

À minha sobrinha Beatriz, que proporcionou alegria em todos os momentos com seu jeito sempre alegre, tornando minha vida mais alegre com doces sorrisos e gargalhadas inconfundíveis.

Ao meu padrinho, Francisco José Correia, pelo apoio e preocupação e por acreditar no meu potencial.

Ao meu tio Fernando de Oliveira Ferreira, sempre calmo e sábio. Conversar com ele sempre foi renovador.

Aos meus sogros José Webel Tardem e Solange Maria Santos Tardem, pelo apoio e amizade.

Ao meu grande amigo Douglas Galvão Barros Pereira, pela amizade de anos, pelas longas conversas e pelo convívio.

Aos colegas de laboratório de Fotoquímica da UFRRJ Cosme Henrique, Leonardo Barros, Christian, Paula, Júlio, Edgar, Flávia, Veridiana, Henrique e Otávio, pelo companheirismo e amizade.

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

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

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.

Ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro concedido.

RESUMO

FERREIRA, Romulo Correia. **Estudo espectroscópico da interação entre análogos da α -lapachona e albumina sérica humana.** 2014. 127p Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A interação entre albumina sérica humana (ASH) e derivados da 1,4-naftoquinona (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), em solução tamponada (PBS, pH = 7,4), foi estudada por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), dicroísmo circular (DC), espectroscopia de emissão de fluorescência no estado estacionário e resolvida no tempo. Os resultados obtidos para as constantes de velocidade supressão de fluorescência de ASH ($k_q \cong 10^{12}$ L/mol.s) sugerem um mecanismo estático para o processo de supressão. Os valores de r , a distância entre doador e acceptor, calculados pela teoria de transferência de energia não radiativa de Förster ($r \cong 2$ a 4 nm), são menores do que 7 nm, o que indica a ocorrência de uma forte interação ASH/naftoquinonas que independe da temperatura.

Através do uso da espectroscopia de emissão de fluorescência foi possível verificar que na interação ASH/naftoquinonas, o resíduo de triptofano da ASH está em um ambiente mais hidrofóbico, quando comparado com ASH livre. Os valores obtidos para ΔH° e ΔS° são dependentes do substituinte contido na 1,4-naftoquinona, demonstrando assim que existe uma influência da estrutura das naftoquinonas na sua interação com ASH. Para valores de ΔH° positivos (processos endotérmicos), os processos de interação ocorreram primordialmente por interações de Van der Waals, demonstrando ligação com caráter hidrofóbico. Os valores de ΔG° negativos ($\Delta G^\circ \cong -24$ a -30 kJ/mol) demonstraram a espontaneidade de ligação das naftoquinonas com ASH. A principal interação é o contato hidrofóbico, mas a interação eletrostática também não pode ser excluída.

Por dicroísmo circular foi verificada diminuição da % de α -hélice da ASH a 208 nm e 222 nm como uma função do aumento da concentração das naftoquinonas. Esses efeitos podem ser atribuídos à formação de um complexo ASH/naftoquinona que deve estar induzindo variações conformacionais na ASH.

Palavras-chave: Espectroscopia. Quinonas. Albumina sérica humana (ASH).

ABSTRACT

FERREIRA, Romulo Correia. **Spectroscopic Study of the Interaction between α -lapachone analogues and Human Serum Albumin**. 2014. 127p Dissertação (Mestrado em Química, Química Orgânica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The interaction between human serum albumin (HSA) and 1,4-naphthoquinone derivatives (LP LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), in buffered solution (PBS, pH = 7.4), was studied by spectroscopic methods such as ultraviolet-visible (UV -Vis), circular dichroism (CD) and steady-state and time resolved fluorescence emission. The values obtained for the quenching rate constant of the fluorescence emission of HSA ($k_q \cong 10^{12}$ L/mol.s) suggest a static mechanism for the quenching process. The values of r , the distance between donor and acceptor, calculated by the theory of radiative energy transfer of Förster ($r \cong 2$ to 4 nm) are smaller than 7 nm, which indicate the occurrence of a HSA/naphthoquinone strong interaction, which is independent of temperature. Through the use of fluorescence emission spectroscopy it was possible to verify that in the interaction HSA/naphthoquinones, the Tryptophan residue of HSA is located in a more hydrophobic environment when compared to free HSA. The values obtained for ΔH° and ΔS° are dependent on the substituent contained in the naphthoquinone, thus demonstrating that there is an influence of the naphthoquinone structure on its interaction with HSA. For positive values of ΔH° (endothermic process), the interaction occurred primarily by Van der Waals forces, in connection with the hydrophobic character. The negative values of ΔG° (-24 to -30 kJ/mol) demonstrated the spontaneity of the interaction between naphthoquinones and HSA. The main interaction is resulting from a hydrophobic contact, but an electrostatic interaction cannot be excluded. Studies by circular dichroism spectroscopy revealed a decrease on the % of α -helix of HSA at 208 nm and 222 nm, as a function of increasing concentration of naphthoquinones. These effects can be attributed to the association of HSA/naphthoquinone which may induce conformational changes in HSA.

Keywords : Spectroscopy; Quinones; Human serum albumin (HSA) .

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Temperatura utilizada na absorção de UV-VIS de ASH na presença da respectiva naftoquinona (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl). 36
- Tabela 2.** Concentração final das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3,00 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 298K. 37
- Tabela 3.** Temperaturas utilizadas na espectroscopia de emissão de fluorescência de ASH na presença das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl). 37
- Tabela 4.** Concentração final das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3,00 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 305K, 310K e 315K. 37
- Tabela 5.** Temperaturas utilizadas na espectroscopia de dicroísmo circular de ASH na presença das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl). 38
- Tabela 6.** Concentração das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) após a adição de alíquotas de soluções das α -lapachonas ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), em 3,00 mL da solução de ASH ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L), para T=305K, 310K e 315K. 38
- Tabela 7.** Valores de K_{SV} e k_q calculados a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) em diferentes temperaturas (305K, 310K e 315K). 45
- Tabela 8.** Valores de K_a calculados através dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) em diferentes temperaturas (305K, 310K e 315K). 47
- Tabela 9.** Valores de ΔH , ΔS e ΔG (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl). 49
- Tabela 10.** Valores de número e ordem de ligação (n e K_b) obtidos a partir dos gráficos de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl). 53
- Tabela 11.** Valores de J, R_0 , E e r calculados para a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305K, 310K e 315K) e o espectro de absorção UV-Vis das naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 58
- Tabela 12.** % α -Hélice calculado a 208 nm e a 222 nm para ASH (pH = 7,4) contendo diferentes concentrações de naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH/LPs, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LPs} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$ e $32,30$ ($\times 10^{-6}$) mol/L. T = 305 K, 310 K e 315 K. 63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas das quinonas e seus derivados: Benzoquinona, naftoquinona e antraquinona.	1
Figura 2. Exemplos de benzoquinonas com atividade biológica.	2
Figura 3. Estruturas da Lawsona, alcanina e lapachol, respectivamente.	3
Figura 4. Estruturas da alizarina e emodina, respectivamente. A alizarina é utilizada como corante enquanto que a emodina tem propriedades laxantes.	3
Figura 5. Estrutura do Lapachol.	4
Figura 6. Estrutura da α -lapachona.	5
Figura 7. Formação da α -lapachona a partir do lapachol.	5
Figura 8. Exemplo de estrutura primária de uma proteína.	7
Figura 9. Estrutura do tipo α -hélice.	8
Figura 10. Estrutura do tipo folha- β .	8
Figura 11. Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.	9
Figura 12. Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.	9
Figura 13. Estrutura secundária de ASH, ilustrando a localização dos subdomínios, codificados por cores: IA-vermelho; IB-vermelho claro; IIA, verde; IIB-verde claro; IIIA,-azul; IIIB-azul claro. (GHUMAN et al., 2005)	10
Figura 14. Estrutura da dexametasona (DEX) [NAIK et. al., 2010].	16
Figura 15. Estrutura básica dos flavonóides rutina (X=H), hiperina (X= β -D-rutinosídeo) e quercetina (X= β -D-galactosídeo) [BI, et. al., 2004].	17
Figura 16. Estruturas químicas e simbologia utilizada para representar os compostos estudados neste trabalho.	17
Figura 17. Níveis de energia para os orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) [Bernard Valeur, 2001].	20
Figura 18. Distinção entre os estados singlete e tripleto, usando o formaldeído como exemplo [Valeur, 2005].	21
Figura 19. Esquema dos componentes da espectroscopia no ultravioleta/visível [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf]	22
Figura 20. Diagrama de Jablonski [modificado de Lakowicz, 2006].	23
Figura 21. Diagrama de um espectrofluorímetro com geometria perpendicular para excitação e emissão [modificado de Lakowicz, 2006].	26
Figura 22. Princípios de fluorimetria resolvida no tempo pulsada [modificado de Valeur, 2005].	27
Figura 23. Curva de decaimento de fluorescência [modificado de Lakowicz, 2006].	29
Figura 24. Esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular.	30
Figura 25. Esquema da luz elipticamente polarizada gerada por dicroísmo circular [Adaptada de http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo0.htm].	32
Figura 26. Elipse formada pela visão frontal da onda elipticamente polarizada [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf] acessado em 09/02/2014. “a/2” e “b/2” são, respectivamente, os eixos maior e menor. A é o ângulo de rotação do plano de polarização original, chamado de birrefringência circular, ou rotação ótica.	33
Figura 27. Estrutura de fenilalanina, tirosina e triptofano.	39
Figura 28. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) e contendo diferentes concentrações de naftoquinona (LP), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP} = 0,571; 1,14; 1,7; 2,26; 2,82; 3,37; 3,92; 4,47$ ($\times 10^{-5}$) mol/L.	40
Figura 29. Espectro de absorção no UV-vis da naftoquinona LP. $C_{LP} = 1 \times 10^{-5}$ mol/L.	41

- Figura 30.** Espectros de absorção de ASH 10^{-5} M em preto, ASH + 80uL de naftoquinona (LP) em vermelho e naftoquinona em PBS, verde, espectro obtido como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH+LP e ASH livre, normalizado). 41
- Figura 31.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em naftoquinona (LP), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP} = 0$; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67 e ($\times 10^{-5}$) mol/L, a T = 310K. 42
- Figura 32.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona (LP). 44
- Figura 33.** Curvas de decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de naftoquinona (LP) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP} = 0$; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85 ($\times 10^{-6}$ mol/L), 1,12, 2,24 e 4,48 ($\times 10^{-5}$ mol/L) a T = 298 K.O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento). 44
- Figura 34.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona (LP). 46
- Figura 35.** Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona (LP). 48
- Figura 36.** Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona (LP). 52
- Figura 37.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da naftoquinona (LP). $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 57
- Figura 38.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 310 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da naftoquinona (LP). $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 57
- Figura 39.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 315 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da naftoquinona (LP). $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 58
- Figura 40.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em naftoquinona (LP), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP} = 0$; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 305 K. 60
- Figura 41.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em naftoquinona (LP), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP} = 0$; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 310 K. 61
- Figura 42.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em α - naftoquinona (LP), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP} = 0$; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 315 K. 61
- Figura 43.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4), 305 K, contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0$; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85 ($\times 10^{-6}$ mol/L); e 1,12 ($\times 10^{-5}$) mol/L. 72
- Figura 44.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH=7,4); ASH + 80uL de α -pirano naftoquinona (LP4Cl) e α -pirano naftoquinona (LP4Cl) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 1,12 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310K. 72
- Figura 45.** Espectro de absorção UV-Vis da α -pirano naftoquinona (LP4Me) em solução de PBS. $C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 73
- Figura 46.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona

(LP4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); e $1,12$ ($\times 10^{-5}$) mol/L., a $T = 310$ K. 73

Figura 47. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Cl). 74

Figura 48. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela de α -pirano naftoquinona (LP4Cl). 74

Figura 49. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Cl). 75

Figura 50. Gráfico de $\text{Log}(F_0-F)/F$ versus $\text{log}[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Cl). 75

Figura 51 Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); e $1,12$ ($\times 10^{-5}$) mol/L. a $T = 298$ K. 76

Figura 52. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV α -pirano naftoquinona (LP4Cl). $C_{ASH} = C_{LP4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 76

Figura 53. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Cl). $C_{ASH} = C_{LP4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 77

Figura 54 Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Cl). $C_{ASH} = C_{LP4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 77

Figura 55. Espectros de dicroísmo circular para ASH ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K. 78

Figura 56. Espectros de dicroísmo circular para ASH ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K. 78

Figura 57 Espectros de dicroísmo circular para ASH ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K. 79

Figura 58. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e 5,3 ($\times 10^{-5}$) mol/L. 80

Figura 59. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$); ASH + 80uL de solução de α -pirano naftoquinona (LP4Me) e α -pirano naftoquinona (LP4Me) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 5,3 \times 10^{-5}$ mol/L. $T = 310$ K. 80

Figura 60. Espectro de absorção UV-Vis da α -pirano naftoquinona (LP4Me) em solução de PBS. $C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 81

Figura 61. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona

(LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e 5,3 ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K. 81

Figura 62. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me). 82

Figura 63. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me). 82

Figura 64 Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me). 83

Figura 65. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me). 83

Figura 66. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e 5,3($\times 10^{-5}$ mol/L) a $T = 298$ K. 84

Figura 67. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV α -pirano naftoquinona (LP4Me). $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 84

Figura 68. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Me). $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 85

Figura 69. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Me). $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 85

Figura 70. Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K. 86

Figura 71. Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L $C_{LP4Me} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K. 86

Figura 72. Espectros de dicroísmo circular para ASH ($pH = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K. 87

Figura 73. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 2,48; 4,94; 7,39; 9,82$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); 1,22; 1,46; 1,7; 1,94 ($\times 10^{-5}$ mol/L). 87

Figura 74. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS ($pH = 7,4$); ASH + 80uL de α -pirano naftoquinona (LP4F) e α -pirano naftoquinona (LP4F). como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 1,94 \times 10^{-5}$ mol/L. $T=310$ K. 88

Figura 75. Espectro de absorção UV-Vis da α -pirano naftoquinona (LP4F) em solução de PBS. $C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 88

Figura 76. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona

(LP4F), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 2,48; 4,94; 7,39; 9,82$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); 1,22; 1,46; 1,7; 1,94 ($\times 10^{-5}$ mol/L), a $T = 310$ K. 89

Figura 77. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4F). 89

Figura 78. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4F). 90

Figura 79. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4F). 90

Figura 80. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4F). 91

Figura 81. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 2,48; 4,94; 7,39; 9,82$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); 1,22; 1,46; 1,7; 1,94 ($\times 10^{-5}$ mol/L) a $T = 298$ K. 91

Figura 82. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4F) $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 92

Figura 83. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4F) $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 92

Figura 84. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4F) $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 93

Figura 85. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K. 93

Figura 86. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K. 94

Figura 87. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L $C_{LP4F} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K. 94

Figura 88. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 6,61 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,32; 1,97; 2,82; 3,26; 3,9; 4,54; 5,17 ($\times 10^{-5}$ mol/L). 95

Figura 89. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) e α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 5,7 \times 10^{-5}$ mol/L. $T = 310$ K. 95

Figura 90. Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) em solução de PBS. $C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 96

- Figura 91.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 6,61 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,32; 1,97; 2,82; 3,26; 3,9; 4,54; 5,17 ($\times 10^{-5}$ mol/L), a T = 315 K. 96
- Figura 92.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF). 97
- Figura 93.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF). 97
- Figura 94.** Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF). 98
- Figura 95.** Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 6,61 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,32; 1,97; 2,82; 3,26; 3,9; 4,54; 5,17 ($\times 10^{-5}$ mol/L) a T = 298 K. 98
- Figura 96.** Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF). 99
- Figura 97.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 99
- Figura 98.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 310 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 100
- Figura 99.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 315 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 100
- Figura 100.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 4; 8; 16$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 305 K. 101
- Figura 101.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 4; 8; 16$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 310 K. 101
- Figura 102.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 4; 8; 16$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 315 K. 102
- Figura 103.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e $5,3(\times 10^{-5})$ mol/L. T=305K. 102
- Figura 104.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) e α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 5,3 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K. 103
- Figura 105.** Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) em solução de PBS. $C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 103

- Figura 106.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e $5,3 \times 10^{-5}$ mol/L), a T = 310 K. 104
- Figura 107.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me). 104
- Figura 108.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me). 105
- Figura 109.** Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me). 105
- Figura 110.** Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me). 106
- Figura 111.** Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e $5,3 \times 10^{-5}$ mol/L) a T = 298 K. 106
- Figura 112.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 107
- Figura 113.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 310 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 107
- Figura 114.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 315 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 108
- Figura 115.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, ($x 10^{-6}$) mol/L, a T = 305 K. 108
- Figura 116.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, ($x 10^{-6}$) mol/L, a T = 310 K. 109
- Figura 117.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, ($x 10^{-6}$) mol/L, a T = 315 K. 109
- Figura 118.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,92; 7,81(x10^{-6}$ mol/L); 1,17; 1,55; 1,93; 2,31; 2,69 e $3,06 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K. 110
- Figura 119.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) e α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Br} = 3,06 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K. 110

- Figura 120.** Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) em solução de PBS. $C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 111
- Figura 121.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,92; 7,81(x10^{-6}$ mol/L); 1,17; 1,55; 1,93; 2,31; 2,69 e $3,06 \times 10^{-5}$ mol/L, a T = 310 K. 111
- Figura 122.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br). 112
- Figura 123.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br). 112
- Figura 124.** Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br). 113
- Figura 125.** Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br). 113
- Figura 126.** Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,92; 7,81(x10^{-6}$ mol/L); 1,17; 1,55; 1,93; 2,31; 2,69 e $3,06 \times 10^{-5}$ mol/L a T = 298 K. 114
- Figura 127.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 114
- Figura 128.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 310 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 115
- Figura 129.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 315 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 115
- Figura 130.** Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a T = 305 K. 116
- Figura 131.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a T = 310 K. 116
- Figura 132.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a T = 315 K. 117
- Figura 133.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,62; 7,22 (x10^{-6}$ mol/L); 1,08; 1,43; 1,79; 2,14; 2,49 e $2,83(x10^{-5}$ mol/L). T=310 K. 117
- Figura 134.** Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LF4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 2,83 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K. 118

- Figura 135.** Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) em solução de PBS. $C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 118
- Figura 136.** Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,62; 7,22 (x10^{-6}$ mol/L); 1,08; 1,43; 1,79; 2,14; 2,49 e 2,83($x10^{-5}$ mol/L), a T = 310 K. 119
- Figura 137.** Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl). 119
- Figura 138.** Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl). 120
- Figura 139.** Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl). 120
- Figura 140.** Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl). 121
- Figura 141.** Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,62; 7,22 (x10^{-6}$ mol/L); 1,08; 1,43; 1,79; 2,14; 2,49 e 2,83($x10^{-5}$ mol/L) a T = 298 K 121
- Figura 142.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 122
- Figura 143.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 310 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 122
- Figura 144.** Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 315 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L. 123
- Figura 145.** Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl}=0; 3,9;7,9; 15,70$ e 31,00 ($x 10^{-6}$) mol/L, ($x 10^{-6}$) mol/L, a T = 305 K. 123
- Figura 146.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} =0; 3,9;7,9; 15,70$ e 31,00 ($x 10^{-6}$) mol/L, a T = 310 K. 124
- Figura 147.** Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} =0; 3,9;7,9; 15,70$ e 31,00 ($x 10^{-6}$) mol/L, a T = 315 K. 124

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação de Stern-Volmer.	14
Equação 2. Equação para cálculo da multiplicidade.	21
Equação 3. Equação para determinação da população no estado excitado.	27
Equação 4. Equação para decaimento exponencial da população excitada.	28
Equação 5. Equação para cálculo da intensidade radiativa.	28
Equação 6. Tempo de vida em função das constantes de decaimento radiativo e não radiativo.	28
Equação 7. Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada.	30
Equação 8. Equação para determinar o coeficiente de extinção molar [Pace <i>et al.</i> (1995)].	31
Equação 9. Equação para determinar o dicróismo circular molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf] acessado em 09/02/2014.	31
Equação 10. Equação para determinar a elipticidade [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf] acessado em 09/02/2014.	33
Equação 11. Equação para determinar a elipticidade molar [Fasman (1996), Hecht (1998), Woody (1995) e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf] acessado em 09/02/2014].	33
Equação 12. Equação para a determinação de K_{SV} , e conseqüentemente, k_q . τ_o é o tempo de vida de fluorescência de ASH [SKLAR, L.A. et al. 1977].	45
Equação 13. Equação para determinar os valores de K_a .	46
Equação 14. Equações para a obtenção dos valores de ΔH° , ΔS° e ΔG° .	48
Equação 15. Equação para determinar dos valores de K_b e n .	52
Equação 16. Equação para o cálculo da integral de sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência de ASH e os espectros de absorção UV/visível [SHI et al. 2007] das naftoquinonas.	54
Equação 17. Equação para o cálculo da distância crítica entre a ASH e as naftoquinonas, quando sua eficiência de transferência é 50% [EPPS et al. (1998) e YUE et al. (2008)].	55
Equação 18. Equações para o cálculo da distância entre o triptofano da ASH e as naftoquinona [SKLAR et al. 1977 e YUE et al. 2008].	56
Equação 19. Equação para calcular os valores de MRE [KHAN et al. 2002].	62
Equação 20. Equações para calcular os valores de % de α -hélice da ASH.	62

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AD	gua milli-Q
ASH	Albumina sérica humana
ASB	Albumina sérica bovina
LP	2-phenil-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]cromano-5,10-diona
LP4Cl	2-(4-clorofenil)-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]cromano-5,10-diona
LP4Me	2-(4-metilfenil)-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]cromano-5,10-diona
LP4F	2-(4-fluorfenil)-3,4-diidro-2 <i>H</i> -benzo[<i>g</i>]chromano-5,10-diona
LF	2-fenil-2,3-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona
LF4Me	2-(4-metilfenil)-2,3-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona
LF4Br	2-(4-bromofenil)-2,3-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona
LF4Cl	2-(4-clorofenil)-2,3-diidronafto[2,3- <i>b</i>]furan-4,9-diona
DC	Dicrosimo circular
MeOH	Metanol
MRE	Elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual
PBS	Solução tampão de fostato
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Lapachol	3
1.2 α-lapachonas	5
1.3 Proteínas	6
1.4 Albuminas	10
1.4.1 Albumina Sérica Humana (ASH)	14
1.4.2 Interação entre compostos bioativos e albuminas séricas	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Materiais	18
3.1.1 Equipamentos	18
3.1.2 Vidraria	18
3.1.3 Reagentes	18
3.2 Métodos	19
3.2.1 Espectroscopia no ultravioleta/visível	19
3.2.2 Espectroscopia de emissão de fluorescência	22
3.2.2.1 Medidas de fluorescência no estado estacionário	25
3.2.2.2 Fluorescência resolvida no tempo	27
3.2.3 Dicroísmo Circular	29
3.3. Soluções	34
3.4 Estudos espectroscópicos na região do ultravioleta/visível (UV-Vis)	34
3.5 Estudos espectroscópicos por emissão de fluorescência	35
3.6 Estudos espectroscópicos por dicroísmo circular	36
3.7 Condições de análise	36
3.7.1 Ultravioleta/Visível	36
3.7.2 Fluorescência	37
3.7.3 Dicroísmo circular	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis)	39
4.2 Espectroscopia de fluorescência	42
4.3 Cálculo do raio de Förster	54
4.4 Dicroísmo circular (DC)	59
5 CONCLUSÕES	65
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7 ANEXO	72

1. Introdução

As quinonas formam um grupo extenso e diversificado de metabólitos especiais de ampla distribuição natural, estando presentes em diversas famílias de vegetais superiores, fungos, líquens, bactérias, artrópodes e equinodermos [LEMOS, T. G.; et al. 2007]. São estruturas do tipo dienodionas cíclicas que são divididas em diferentes grupos, sustentadas pelo esqueleto básico formado por um hidrocarboneto aromático que constitui o sistema quinonoídico, como: benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas, entre outras [SILVA, A. M. da].

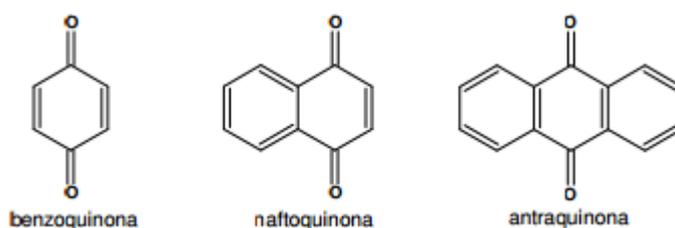


Figura 1. Estruturas das quinonas e seus derivados: Benzoquinona, naftoquinona e antraquinona.

As posições das carbonilas são variáveis e dependentes das possibilidades isoméricas do anel que as sustenta e estas formas diferem muito em suas propriedades (físicas, químicas e atividades biológicas). Quinonas com as carbonilas adjacentes são conhecidas como *orto*-quinonas e com as carbonilas opostas, separadas por dois átomos de carbono, como *para*-quinonas. Compostos *meta*-quinonóides são instáveis e conhecidos apenas sob as formas radicalares. A química destes isômeros do lapachol está amplamente descrita na literatura [PATAI, S. et al. 1988].

Benzoquinonas apresentam cor amarela e são encontradas em artrópodes, fungos e vegetais superiores. Alguns exemplos de benzoquinonas naturais têm suas estruturas ilustradas na figura 1: metil-1,4-benzoquinona, etil-1,4,-benzoquinona, 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona, 2-metoxi-1,4-benzoquinona e 2-metoxi-3-metil-1,4-benzoquinona, que são metabólitos irritantes produzidos por artrópodes; espinolusina, com propriedade complexante, e fumigatina, complexante e bacteriostática, que são obtidas dos fungos *Penicillium spinulosum* e *Aspergillus fumigatus*; e 6,7-desidroroleanona, que é encontrada nas raízes de

Salvia officinalis (as preparações com esta planta têm ações estimulante, cicatrizante e diurética, entre outras) [GIBAJA, O. S. 1998].

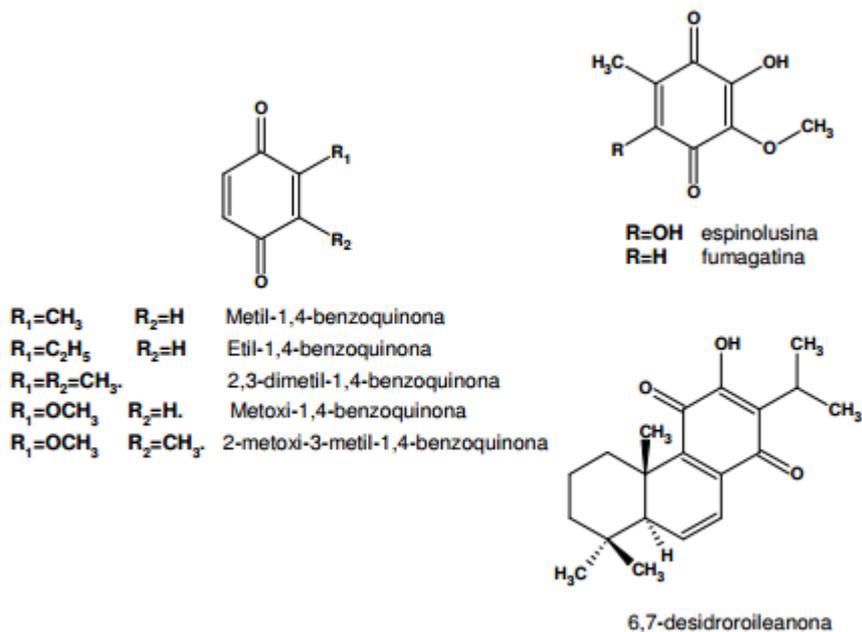


Figura 2. Exemplos de benzoquinonas com atividade biológica.

Naftoquinonas são substâncias com colorações que variam de amarelo a vermelho intenso. São encontradas em maior quantidade nos vegetais superiores do que em fungos e equinodermos. Na figura 3, a lawsona é uma naftoquinona simples, extraída dos talos e folhas de *Lawsonia inermis* (hena) e *L.spinosa* (litráceas), que é capaz de formar complexos coloridos com sais de alumínio, bismuto, cobalto, cobre e ferro e é amplamente utilizada na indústria de cosméticos, como um dos ingredientes da pasta de hena; enquanto que a plumbagina é encontrada em espécies do gênero *Plumbago* (plumbagináceas), *Drosera* (droserdáceas) e *Dyospiros* [LEMOS, T. G, et. al.] (ebenáceas), e é usada no tratamento da leishmaniose. A alcanina é encontrada nas raízes de *Alkanna Tinctoria*, e é usada como corante vermelho em alimentos, cosméticos e medicamentos e, finalmente, o lapachol e seus isômeros, as *beta*- e *alfa*-lapachonas, são naftoquinonas de grande importância farmacológica e são encontradas em espécies vegetais de várias famílias e, devido a esta importância, serão abordados com um pouco mais de detalhes mais adiante no texto.

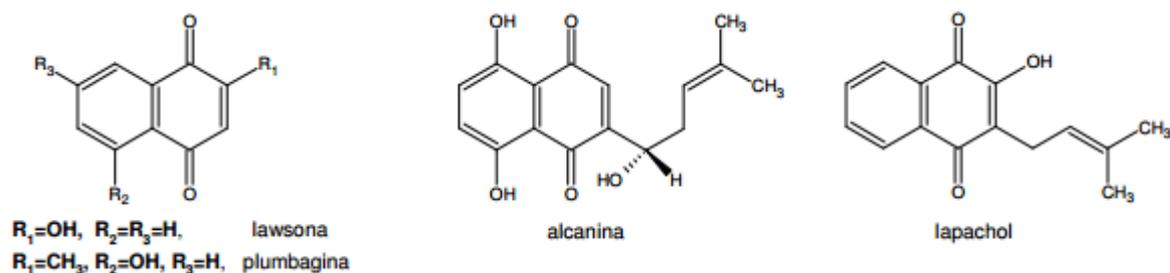


Figura 3. Estruturas da Lawsona, alcanina e lapachol, respectivamente.

As antraquinonas constituem o grupo mais extenso das quinonas naturais, podendo ser encontradas em vegetais de diversos gêneros e espécies das famílias rubiáceas, ramnáceas, poligonáceas, leguminosas, escrofulariáceas, liliáceas e verbenáceas, em líquens e fungos e em insetos tintórios da família dos coccídeos. A alizarina (figura 4) é um representante histórico por sua propriedade corante, presente nos extratos de *Rubia tinctorum* (rubiáceas), utilizados como corante por persas, egípcios, gregos e romanos. Sua síntese, em 1868, estabeleceu os princípios químicos da indústria dos corantes antraquinônicos, que se desenvolveu rapidamente e ocupou o lugar dos produtos das rubiáceas. A emodina é uma das polihidroantraquinonas mais importantes, presente em plantas do gênero *Rhamnus* (ramnáceas) e com propriedades laxantes [GIBAJA, O. S. 1998].

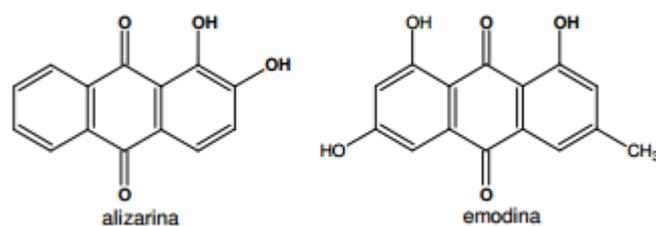


Figura 4. Estruturas da alizarina e emodina, respectivamente. A alizarina é utilizada como corante enquanto que a emodina tem propriedades laxantes.

1.1. Lapachol

O uso do lapachol (figura 5) no Brasil conta com uma longa história, culminando em seu estudo como anticancerígeno. Trata-se de uma naftoquinona isolada de uma fonte natural, o cerne do lenho de árvores da família do ipê (*Tabebuia spp.*, bignoniáceas), com um rendimento variado entre 1 e 7% em massa, dependendo da espécie e de outros fatores como a

região e a sazonalidade. O lapachol (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) que tem suas propriedades biológicas bem conhecidas, extraído de plantas da Família Bignoniaceae da Ásia e da América do Sul, ainda vem sendo investigado por novas atividades biológicas. Seus análogos são conhecidos por possuírem atividades antitumorais, antibióticas, antimaláricas e antiulcerosas [TORSELL, K. B. G. 1983; BRIELMANN, H. L.; et al. 2006.; VIEGAS JR., C. et al. 2006 e PINTO, A. C. 2002.].

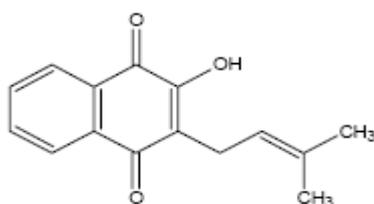


Figura 5. Estrutura do Lapachol.

O lapachol e quinonas relacionadas a este composto são representantes importantes da contribuição dos conhecimentos populares da população latinoamericana aos tratamentos à saúde humana. São constituintes químicos de espécies vegetais, várias espécies de *Tabebuia*, que têm sido utilizados culturalmente em diversas regiões do continente no combate a uma extensa gama de enfermidades (Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/paudarco.htm>>. Acesso em: 19 setembro 2013).

Dentre as quinonas obtidas o lapachol é o mais abundante e de extração mais fácil. A ocorrência do lapachol não se restringe às espécies deste gênero nem apenas à família das bignoniáceas, tendo sido identificado como constituinte de diversas espécies vegetais em famílias variadas [Fonseca et al. (2003), Hussain et al. (2007)].

Foi B. Gilbert um dos pioneiros no País na difusão da idéia da necessidade de investigações químicas e biológicas de compostos naturais de ocorrência abundante na flora brasileira, inclusive lapachol e lapachonas. Parte destes esforços pode ser observada na exploração da reatividade destas quinonas, sob diferentes condições, buscando a transformação do grupo quinonoídico em novos sistemas, incluindo a formação de ciclos e heterociclos. Um dos objetivos destas modificações estruturais, além da melhor compreensão do comportamento químico destes sistemas, é a obtenção de novos agentes contra doenças parasitárias endêmicas das regiões tropicais. [DE MOURA (2001)].

1.2. α -lapachonas

O potencial farmacêutico das quinonas naturais tem sido reconhecido já há bastante tempo. Sua atividade antimalárica [TORSSELL, K. B. G.1983; BRIELMANN, H. L.; et al. 2006. e VIEGAS JR., C. et al. 2006.] , antitumoral [BRIELMANN, H. L.; et al. 2006.; VIEGAS JR., C. et al. 2006 e PHILLIPSON, J. D.2001] , antiviral [PHILLIPSON, J. D.2001], anti-inflamatória[BRIELMANN, H. L.; et al. 2006], e antibacteriana[MONTANARI, C.A. et al., 2001.; LEMOS, T. G. et al, 2007; PATAI, S, 1974., PATAI, S.; et al.1988 e GIBAJA, O. S., 1998] é uma consequência da sua capacidade de agir como inibidores potentes do transporte de elétrons, como desacopladores de fosforilação oxidativa, como agentes de intercalação do DNA, como agentes alquilantes e como biorredutores.

A α -lapachona (2,2-dimetil-3,4-diidro-5,10-dioxo-2H-benzo-[g]-cromanona) pode ser extraída de plantas medicinais brasileiras como a *Tabebuia Bignoniaceae* [FUJII, N.; et al. 1997 e KRISHNAM, P.; et al. 2000.] e tem sido utilizada em pesquisas no estudo do tratamento de doenças infecciosas, com potencial atividade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes [MACHADO, T.B. et al. 2003].

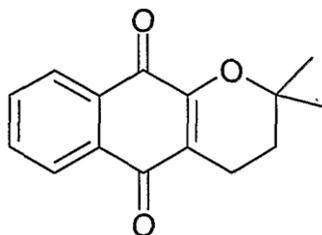


Figura 6. Estrutura da α -lapachona.

α -Lapachona também pode ser sintetizada a partir do lapachol, como mostrado na figura 7:

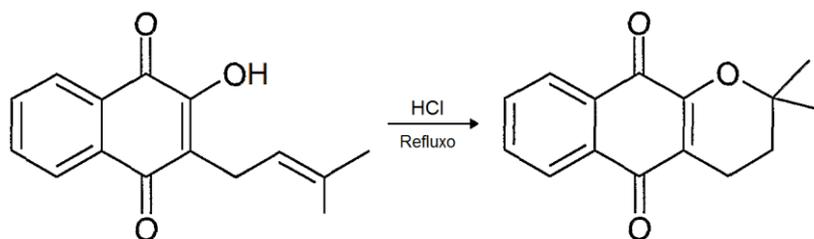


Figura 7. Formação da α -lapachona a partir do lapachol.

Esta naftoquinona mostra menor citotoxicidade e atividade redox quando comparada a outras quinonas bioativas [LI, C. J.; et. al. 1993; KRISHNAN, P.; et. al. 2001]. Entretanto, pode induzir a clivagem de DNA mediada por topoisomerase II, uma enzima essencial que faz a interconversão de diferentes formas topológicas de DNA e é o alvo para algumas drogas anticâncer [Disponível em: <http://www.rain-tree.com/paudarco.htm> acesso em: 13/02/2014. e disponível em: <http://www.rain-tree.com/pau-d-arco-traditional-uses.pdf> acesso em:13/02/2014 e PATERNÒ,E., 1882]

Assim, a α -lapachona não pode ser classificada como um agente tóxico, tampouco um inibidor catalítico. Isto faz com que a α -lapachona seja uma forte candidata para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de linhas de células resistentes a múltiplas drogas com tumores resistentes a hiperatividade com menor expressão de topoisomerase II [BURNETT, A. R, et al. 1967 e FONSECA, S. G. C.; et al. 2003.]

1.3 Proteínas

Os compostos orgânicos mais abundantes em animais superiores são as proteínas, representadas por cerca de 50 % do peso seco dos tecidos. Trata-se de moléculas poliméricas de cadeia longa, constituídas por um grande número de unidades monoméricas estruturais (os aminoácidos), podendo ser consideradas como copolímeros (mais de um tipo de monômero). Por conta do grande tamanho, formam soluções coloidais quando são dispersas em um solvente adequado, possuindo todas as características deste tipo de mistura. Por meio de hidrólise, pode-se quebrá-las em seqüências menores de aminoácidos (peptídeos). As proteínas são formadas através de ligações peptídicas entre os diversos tipos de aminoácidos e podemos classificá-las em duas grandes categorias: proteínas fibrosas e globulares. [LEHNINGER et al. 1993, STRYER 1995 e DOSE 1982].

Proteínas globulares são proteínas em que as cadeias de aminoácidos 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 aminoácidos 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 [LEHNINGER et al. 1993, STRYER 1995 e DOSE 1982].

Estrutura primária (Figura 8): 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)].

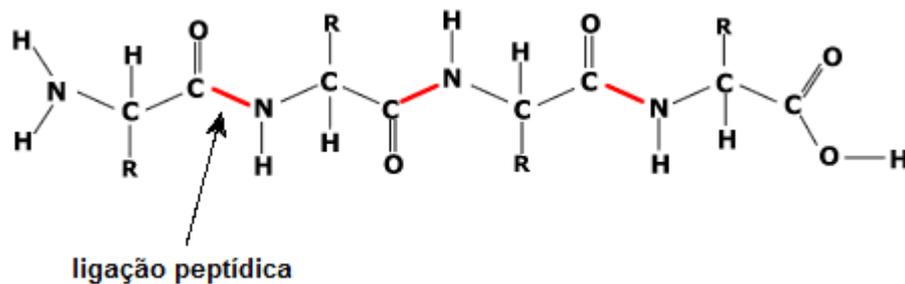


Figura 8. Exemplo de estrutura primária de uma proteína.

Estrutura secundária (Figura 9): à medida que o comprimento das cadeias vai aumentando, e em função das condições físico-químicas do meio, a estrutura secundária é criada, compondo uma disposição espacial regular, repetitiva, geralmente mantida por ligações de hidrogênio. Sendo assim, pode-se ter:

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 9);

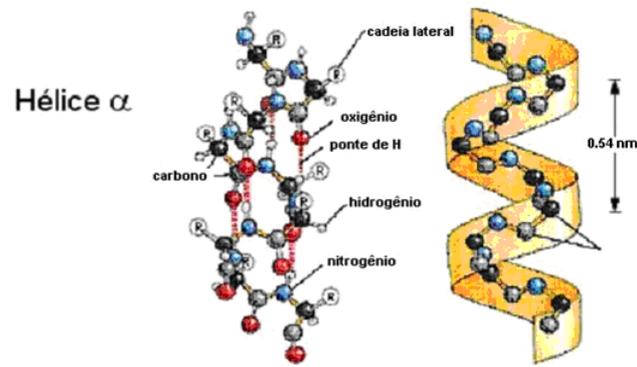


Figura 9. Estrutura do tipo α -hélice.

folha- β : as cadeias de peptídeos se unem formando filas paralelas que se estabilizam de maneira intermolecular mediante pontes de hidrogênio, (Figura 10) [LEHNINGER et al. (1993), STRYER (1995) e DOSE (1982)].

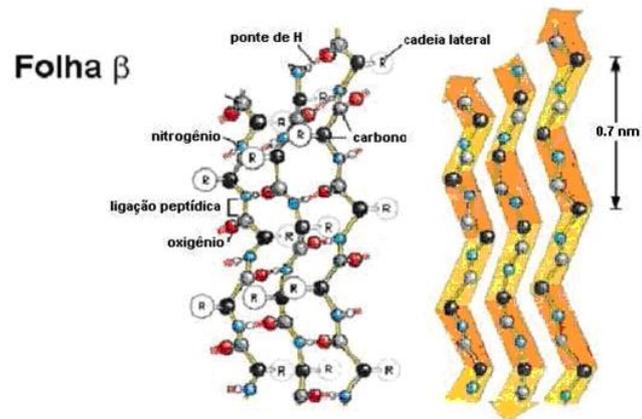


Figura 10. Estrutura do tipo folha- β .

Estrutura terciária (Figura 10): é a estrutura da maioria das proteínas globulares e aparece a partir das hélices, que voltam a se enrolar (pode ser dito também que há enovelamento). 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 11) [LEHNINGER et al. (1993), STRYER (1995) e DOSE (1982)].

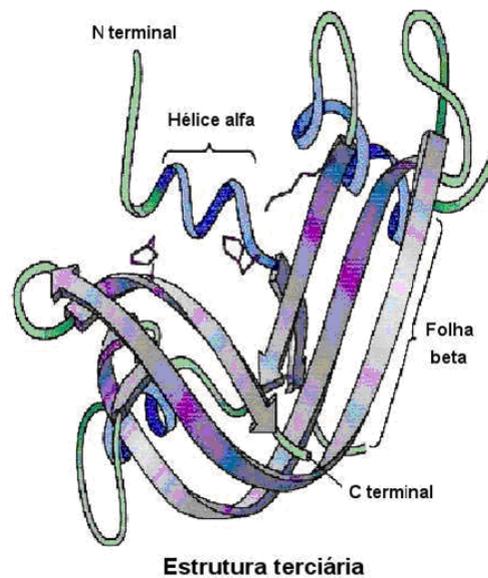


Figura 11. Exemplo de estrutura terciária de uma proteína.

Estrutura quaternária (Figura 12): são estruturas compostas por várias moléculas separadas, mas entrelaçadas em estrutura terciária. Aplica-se somente a proteínas constituídas por duas ou mais cadeias polipeptídicas e refere-se à disposição espacial dessas cadeias e às 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)].

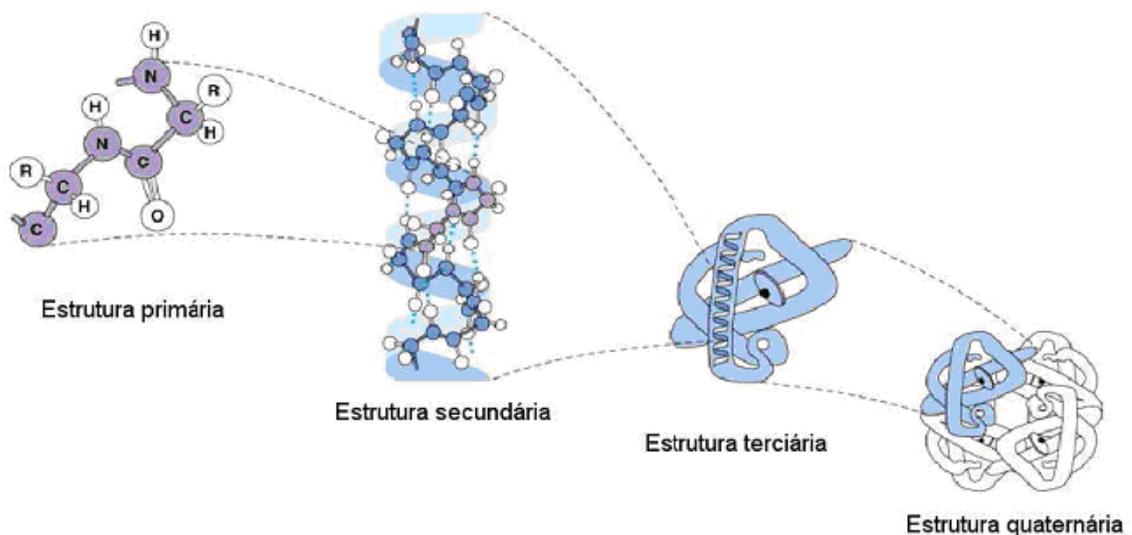


Figura 12. Níveis de organização da estrutura molecular de uma proteína.

1.4 Albuminas

A albumina (Figura 13) é uma proteína globular de alto valor biológico, presente na clara do ovo, no leite e no sangue. No sangue é a principal proteína, que se encontra em grande abundância no plasma, e é sintetizada no fígado. A concentração normal de albumina no sangue animal fica entre 3,5 e 5,0 gramas por decilitro, e é cerca de 50% das proteínas plasmáticas. O resto de proteínas presentes no plasma chamam-se globulinas. A albumina é fundamental para a manutenção da pressão osmótica, necessária para a distribuição correta dos líquidos corporais entre o compartimento intravascular e o extravascular, localizado entre os tecidos.

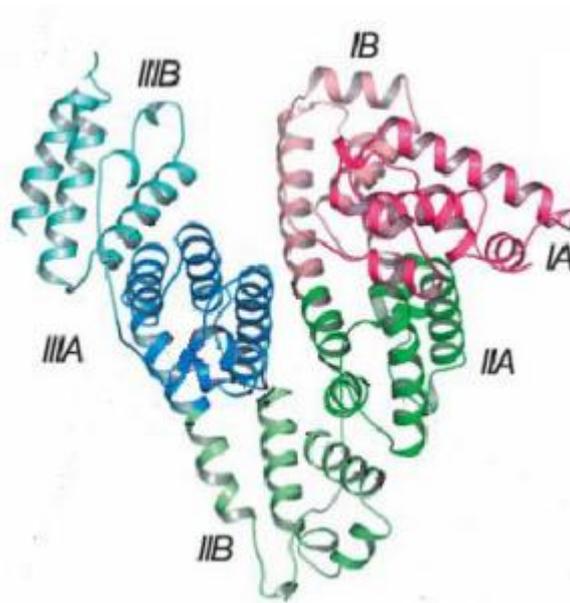


Figura 13. Estrutura secundária de ASH, ilustrando a localização dos subdomínios, codificados por cores: IA-vermelho; IB-vermelho claro; IIA, verde; IIB-verde claro; IIIA,-azul; IIIB-azul claro. (GHUMAN et al., 2005)

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, a sua proteína majoritária, que possui propriedades antigênicas resistentes à desnaturação térmica e é termo-estável) e lactoalbumina (albumina do leite).

1.4.1 Albumina sérica humana (ASH)

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

Albuminas séricas (ASs em português) ou SAs (em inglês, *serum albumins*) são proteínas constituintes do sistema circulatório de maior solubilidade e têm muitas funções fisiológicas, incluindo a manutenção da pressão osmótica [HE et al (1992), SUGIO et al. (1999), CUI et al. (2008) e YUE et al. (2008)] e controle do pH [SUGIO et al. (1999) e TANG et al. (2006)]. Além da sua ação como transportadora, distribuidora e metabolizadora de inúmeros ligantes endógenos e exógenos, como por exemplo, fármacos, metabólitos, ácidos graxos, amino ácidos (geralmente triptofano e cisteína), hormônios, esteróides, cátions e ânions, metais (como cálcio, cobre, zinco, níquel, mercúrio, prata e ouro etc.), a interação destes ligantes com albuminas resulta no aumento da solubilidade de compostos bioativos no plasma, diminuindo a sua toxicidade (composto bioativo) [HE et al. (1992), BHATTACHARYA et al. (2000), ZSILA et al. (2003), HE et al. (2005), TANG et al. (2005), HE et al. (2006), TANG et al. (2006), CUI et al. (2007), LI et al. (2007), CUI et al. (2008), LI et al. (2008), SHAW e PAL (2008), YUE et al. (2008) e LI et al. (2009)]. A ligação entre ligantes (compostos bioativos) e ASs é um fator determinante e importante para a farmacodinâmica e farmacocinética de um fármaco, dependendo da concentração administrada, podendo afetar a sua distribuição e eliminação [PETITPAS et al. (2001), HE et al. (2005), CUI et al. (2007), YUE et al. (2008) e STAN et al. (2009)].

A albumina sérica humana (ASH) (Figura 13) é um polipeptídeo simples e não-glicosilado com a geometria da proteína sendo em forma de coração [FALINI et al. (2006) e LI et al. (2009)] com a sua estrutura contendo aproximadamente 67% de α -hélice [HE et al. (1992), HE et al. (2006) e STAN et al. (2009)] e podendo se ligar e transportar compostos bioativos pouco solúveis em água (hidrofóbicos) [LI et al. (2008) e TAKEHARA et al. (2009)]. A concentração de ASH no plasma sanguíneo é de 40 mg/mL (4-5 g/100mL) [SUGIO et al. (1999)] e seu peso molecular é de 66-66,5 kDa (66.000-66.500 g/mol) [TANG et al. (2005) e HE et al. (2006)]. A ASH contém 585 resíduos de amino ácidos [CUI et al. (2008), LI et al. (2008), SHAW et al. (2008) e LI et al. (2009)], incluindo 17 ligações de dissulfeto, uma cisteína livre [HE et al. (1992), SUGIO et al. (1999), BHATTACHARYA et al (2000), PETITPAS et al. (2001), HE et al. (2006) e STAN et al. (2009)] e um resíduo de

triptofano (Trp-214) [HE et al.(1992), LI et al. (2007), SHAW et al. (2008) e TAKEHARA et al. (2009)].

A capacidade da ASH (e de outras proteínas de uma forma geral) se ligar a compostos aromáticos e heterocíclicos depende 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)]. Em sua estrutura estão presentes três domínios α -hélice semelhantes, os domínios I, II e III, que contêm os resíduos de amino ácidos 1-195, 196-383 e 384-585, respectivamente [TANG et al. (2006), LI et al. (2007), CUI et al. (2008), LI et al. (2008), YUE et al. (2008), LI et al. (2009), SUGIO et al. (1999), PETITPAS et al. (2001), FALINI et al. (2006), SHAW et al. (2008) e YUE et al. (2008)]. Cada domínio subdivide-se em dois subdomínios, A e B [FALINI et al. (2006)], que contém seis e quatro α -hélices, respectivamente [PETITPAS et al. (2001) e HE et al. (2005)].

Análises cristalográficas da estrutura da ASH revelam que os sítios de ligação com os compostos bioativos estão localizados nos subdomínios IIA e IIIA [SULKOWSKA (2002), ZSILA et al. (2003), TANG et al. (2005), KANDAGAL et al. (2006), LI et al. (2007), SHAW et al (2008) e LI et al. (2009)], os quais são consistentes com os sítios I e II, respectivamente [CUI et al. (2007) e LI et al. (2009)]. Uma grande cavidade hidrofóbica, na qual está contido um resíduo de triptofano (Trp-214), está presente no subdomínio IIA [CUI et al. (2007) e LI et al. (2009)]. [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 principal região para ocorrência de ligação dos compostos bioativos está situada no sítio I, formado por uma grande cavidade hidrofóbica presente no subdomínio IIA, onde muitos compostos bioativos, como por exemplo, 1,4-naftoquinonas, como as α - lapachonas, podem se ligar [KRANGH-HANSEN et al. (2002), KANDAGAL et al. (2006), STAN et al. (2009) e TAKEHARA et al. (2009)].

1.4.2 Interação entre compostos bioativos e albuminas séricas

As albuminas séricas são proteínas abundantes no plasma sanguíneo, sendo as mais comuns as albuminas séricas humana e bovina. Elas apresentam grande solubilidade no

sistema circulatório, aumentando a solubilidade de compostos bioativos hidrofóbicos no plasma, além de apresentarem inúmeras funções fisiológicas e são utilizadas para modelar a atuação de fármacos na célula *in vivo* e *in vitro* [LI et al. (2008)], e por isso, são extremamente utilizadas para transportar compostos bioativos endógenos e exógenos. A interação do composto bioativo com a albumina influencia a sua distribuição, excreção, metabolismo tendo relação de dependência com a concentração de composto bioativo administrado [PETITPAS et al. (2001), HE et al. (2005), KANDAGAL et al. (2006), TANG et al. (2006), SHI et al. (2007) e STAN et al. (2009)].

Entre as principais técnicas utilizadas para monitoramento da interação entre um composto bioativo e albumina sérica, pode-se destacar: espectroscopia de emissão de fluorescência [XU et al. (1996), YAMASAKI et al. (1999) e WILTING et al. (1980)], espectroscopia no ultravioleta (UV) [BARONI et al. (2001)], espectroscopia de dicroísmo circular (DC) [WILTING et al. (1980)], espectroscopia Raman [SHEN et al. (2003)], ressonância magnética nuclear (RMN) [SULKOWSKA et al. (2005)], 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 espectroscopia de emissão de fluorescência, umas das técnicas utilizadas no presente trabalho, é um dos métodos mais úteis para se estudar as interações moleculares envolvendo proteínas, por conta da elevada sensibilidade, seletividade, conveniência, rapidez, simplicidade e fundamento teórico abundante. Apresenta vantagens em relação aos métodos convencionais (cromatografia de exclusão por afinidade ou tamanho, ultrafiltração e ultracentrifugação) empregados para se estudar este tipo de interação, uma vez que estes métodos apresentam pouca sensibilidade ou tempo de operação muito longo. Além disso, estes métodos normalmente requerem soluções de proteína em concentrações muito superiores à da constante de dissociação do complexo ligante-proteína sob investigação [ORAVCOVA et al. (1996) e EPPS et al. (1998)]. Medindo-se a supressão da fluorescência intrínseca da albumina é possível fazer uma estimativa sobre a acessibilidade de sítios aos grupos fluoróforos da albumina. Esta informação pode ajudar a prever o mecanismo de interação do ligante com a albumina sérica [YUE et al. (2008)].

A supressão de fluorescência se refere a qualquer processo que diminua a intensidade de fluorescência de uma amostra. Uma variedade de interações moleculares pode resultar em supressão, incluindo reações no estado excitado, rearranjos moleculares, transferência de

energia, formação de complexo no estado fundamental e supressão colisional [LAKOWICZ (2006) e CHENG et al. (2009)].

O processo de supressão pode ser classificado como sendo estático ou dinâmico. Supressão de fluorescência dinâmica (ou colisional) é a desativação de um fluoróforo em seu estado excitado por contato ou colisão com outra molécula (supressor) em solução. O fluoróforo retorna ao estado fundamental devido à difusão, após o encontro com o supressor (agente de extinção). Entretanto, as moléculas não passam por alterações químicas no processo. A diminuição de intensidade de fluorescência causada por supressão colisional pode ser descrita pela equação de Stern-Volmer (equação 1), onde a relação entre a diminuição da intensidade de emissão de fluorescência e da concentração de supressor é linear. Por outro lado, a supressão estática pode ocorrer quando um fluoróforo e um supressor não fluorescente formam um complexo ou uma pré-associação não fluorescente ou quando estão a uma distância onde a extinção ocorre durante a excitação. A supressão dinâmica pode ser distinguida da supressão estática por sua dependência com a temperatura e a viscosidade do meio, ou por mudanças consideráveis no tempo de vida de emissão de fluorescência por parte do seu estado excitado singlete quando na presença do supressor [CHENG *et al.* (2009)].

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{e} \quad K_{SV} = k_q\tau_0$$

Equação 1. Equação de Stern-Volmer.

Onde: K_{SV} é a constante de Stern-Volmer, k_q é a constante de velocidade de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de vida de fluorescência para o fluoróforo na ausência do supressor; $[Q]$ é a concentração do supressor.

Através dos estudos de supressão de fluorescência, os parâmetros termodinâmicos ΔG° , ΔH° e ΔS° podem ser obtidos experimentalmente a partir das constantes de velocidade de supressão empregando-se as equações de Stern-Volmer, Stern-Volmer modificada e Van't Hoff, quais possibilitam ainda a obtenção de outros valores como constantes de ligação (K_b) e o número de sítios de ligação (n). As forças que atuam entre uma pequena molécula e uma macromolécula incluem ligação hidrogênio, força de van der Waals, força eletrostática, força de interação hidrofóbica e outras. Considerando a dependência da constante de ligação com a

temperatura, um processo termodinâmico é responsável pela formação do complexo [LI et al. (2007) e YUE et al. (2008)].

Os cálculos do raio de Förster obtidos através da sobreposição dos espectros de emissão e absorção doador-aceptor fornecem a distância média entre o resíduo de triptofano (Trp-214, doador) da albumina e a molécula supressora (aceptor), que 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 da transferência energética (E) está relacionada com as distâncias R_0 (distância crítica entre o doador e o aceptor quando a eficiência de transferência de energia é 50%) e r (distância de ligação entre doador e aceptor) entre o doador (ASH) e o aceptor (composto bioativo), quando sua eficiência de transferência for 50%.

As interações da albumina sérica humana (ASH) com diferentes classes de moléculas têm sido amplamente estudadas, com a finalidade de avaliar a interação de diversos fármacos com sangue humano através de ensaios *in vitro* com uso da espectroscopia de emissão de fluorescência. Estudos com ansamicinas, antineoplásicos, esteroides e flavonoides são frequentes na literatura. Estes estudos têm a finalidade de avaliar as interações entre diversas drogas com albumina [CUI, et. al. 2004; CHI, et. al. 2011; BI, et. al. 2005; GUO, et. al. 2008; KANDAGAL et. al., NAIK et. al., 2010, e SINGH, & MITRA].

Através da técnica espectroscópica de emissão de fluorescência, considerada de grande importância na área de farmacologia e clínica médica, é possível avaliar a dependência da interação entre diferentes moléculas com albumina, verificando diferentes efeitos, como por exemplo: grupos substituintes, mudanças estruturais, temperatura e impedimento estérico. Este estudo fornece dados importantes para a produção de novos medicamentos para diversas finalidades e tratamentos. Sendo também importante para a avaliação de processos farmacocinéticos, como a distribuição de medicamentos e seu transporte.

Semicarbazidas são usadas como agentes antivirais e antifúngicos, (caso da 1-benzoil-4-p-clorofenil-tiossemicarbazida) (BCPT) [CUI, et. al. 2004], a tetraciclina como agente antibacteriano [CHI, et. al. 2011; e BI, et. al. 2005] e o cetoconazol também como agente antifúngico [GUO, et. al. 2008]. Ambos suprimem a fluorescência de ASH com deslocamento para o azul no máximo de emissão, sugerindo aumento de hidrofobicidade na região de interação fármaco-triptofano. Através dos parâmetros termodinâmicos foi possível verificar que a força atuante na interação que forma o complexo ASH/fármaco é predominantemente hidrofóbicas para BCPT [CUI, et. al. 2004]. No caso das tetraciclinas, a interação

predominante é eletrostática. As forças atuantes na ligação cetoconazol-ASH são provenientes de interações hidrofóbicas e eletrostáticas [GUO, et. al. 2008].

Estudos sobre as interações entre derivados de ácido cinâmico, como o agente antineoplásico cloridrato de gencitabina (GEM), e agentes antitumorais como o ácido-4-(dimetilamino) cinâmico (DMACA) e o *trans-p*-(dimetilamino) cinamato de etila (EDAC) [KANDAGAL et. al., e SINGH, & MITRA] e albuminas séricas, por espectroscopia de fluorescência, mostraram que o agente antineoplásico GEM reduz a fluorescência intrínseca da albumina, sem que haja alteração no comprimento de onda máximo de emissão. Já a interação entre albumina e os derivados do ácido cinâmico, revelou que para EDAC há um leve deslocamento para o azul no máximo de emissão, enquanto para DMACA este deslocamento ocorre para o vermelho. O efeito de temperatura nas constantes de Stern-Volmer confirma que o mecanismo do processo de supressão de fluorescência da albumina é estático para interações com GEM, EDAC e DMACA. Os valores da constante de ligação sugerem que DMACA interage mais fortemente. Ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas governam a interação entre GEM e albumina. Para o caso de EDAC e DMACA as interações predominantes são hidrofóbicas e eletrostáticas.

Membro da classe de hormônios esteroidais, o glicocorticóide dexametasona (DEX) (Figura 14) foi objeto de estudo da interação com albuminas séricas [NAIK et. al., 2010]. DEX é um composto que atua como um agente anti-inflamatório e imunossupressor e é capaz de diminuir a intensidade de fluorescência de albuminas séricas com um desvio para o azul de no máximo de emissão através de um processo de supressão estático. O número de sítios de ligação, n , para DEX-ASH indica que há um sítio de ligação específico na ASH para DEX. Os parâmetros termodinâmicos sugerem que as principais interações entre DEX e ASH são ligações de hidrogênio e van der Waals [NAIK et. al., 2010].

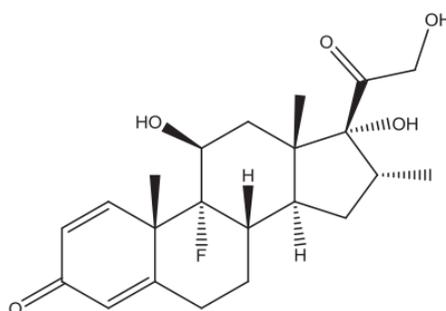


Figura 14. Estrutura da dexametasona (DEX) [NAIK et. al., 2010].

Existem também estudos de interação entre flavonoides e ASH. A supressão de fluorescência intrínseca de ASH causada por quercetina, rutina e hiperina (Figura 15) ocorre através de um mecanismo estático. A influência do efeito de impedimento estérico pode ter relação com a ordem das constantes de ligação observadas, sugerindo que a capacidade de ligação destes três flavonóides com ASH segue a seguinte ordem: rutina < hiperina < quercetina. Os parâmetros termodinâmicos indicam que a interação entre estes flavonóides e ASH é predominantemente eletrostática [BI, et. al., 2004].

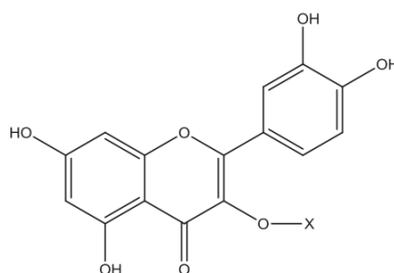


Figura 15. Estrutura básica dos flavonóides rutina ($X=H$), hiperina ($X=\beta$ -D-rutinosídeo) e quercetina ($X= \beta$ -D-galactosídeo) [BI, et. al., 2004].

Neste trabalho, decidiu-se estudar a interação de diferentes análogos da α -lapachona, derivados da 1,4-naftoquinona contendo anel pirano ou 2,3-diidrofurano com albumina sérica humana (ASH) através das técnicas espectroscópicas de emissão de fluorescência estacionária, emissão de fluorescência por resolução temporal, ultra-violeta visível e dicroísmo circular. As estruturas são ilustradas juntamente com a simbologia utilizada neste trabalho na figura 16.

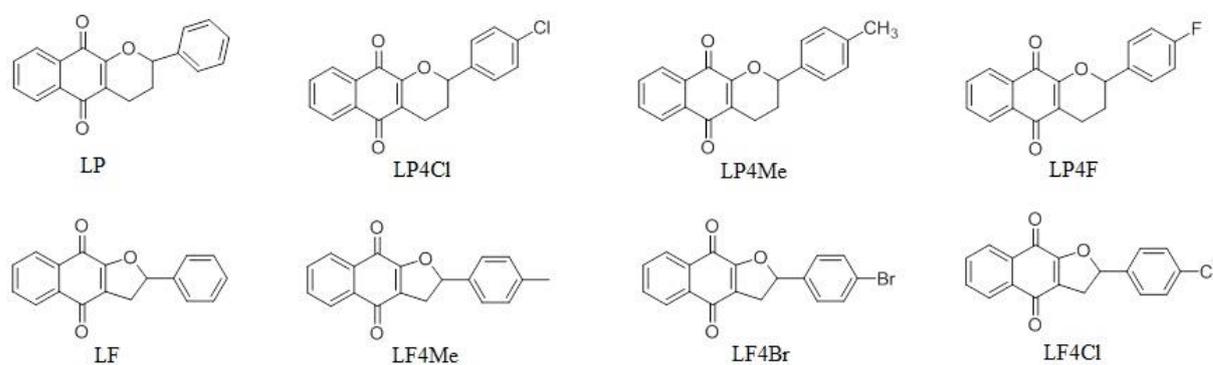


Figura 16. Estruturas químicas e simbologia utilizada para representar os compostos estudados neste trabalho.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

Os experimentos de espectroscopia de emissão de fluorescência, espectroscopia de absorção no ultravioleta e espectroscopia de dicroísmo circular foram realizados utilizando um espectrofluorímetro Jasco modelo J-815 possuindo sistema de temperatura termostatizado Jasco PFD-425S15F com precisão de 0,1 °C.

Nos espectros de ultravioleta e dicroísmo circular foi utilizada uma cubeta de duas faces polidas (quartzo) de caminho óptico de 1 cm, enquanto que nos espectros de fluorescência foi utilizada cubeta de 4 faces polidas (quartzo) de caminho óptico de 1 cm.

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

3.1.2 Vidraria

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

- A vidraria foi colocada em imersão em uma solução de etanol/água 1:1, com acréscimo de 10% de NaOH, durante 24 horas;
- Enxaguada com água corrente;
- Enxaguada com água destilada;
- Enxaguada com metanol grau espectroscópico.
- Enxaguada com acetona grau espectroscópico.
- Seca à temperatura ambiente.

3.1.3 Reagentes

As α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas empregadas na presente dissertação foram sintetizados no Laboratório de Síntese de Carboidratos e Nucleosídeos, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense, e gentilmente fornecidos pelos Profs. Drs. Vitor F. Ferreira e Sabrina Ferreira. [FERREIRA, et. al., 2010, FREIRE, et. al. 2010 e SILVA et. al., 2009].

Metanol grau espectrofotométrico e hidróxido de sódio P.A. foram adquiridos da Vetec.

Albumina sérica humana (ASH) foi adquirido da Aldrich.

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

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

3.2 Métodos

As α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) foram analisados em soluções de PBS com albumina sérica humana (ASH) por técnicas de espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis), espectroscopia de emissão de fluorescência com variação de temperatura ($\lambda_{exc} = 280$ nm; T = 305K, 310K, 315K) e espectroscopia de dicroísmo circular na temperatura constante de 310K.

3.2.1. Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis)

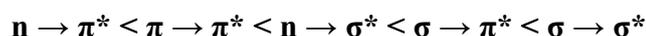
A absorção de um fóton pode ser relacionada, em muitos casos, à transição eletrônica de um cromóforo de uma molécula. Na espectroscopia na região do UV-Vis a transição eletrônica consiste na promoção de um elétron (por absorção de um fóton) contido em um orbital molecular ligante ou não-ligante do estado fundamental (menor energia) para um orbital vazio, que no caso da espectroscopia de absorção, seria de mais alta energia, chamados de LUMO, ou LUMO+1, cujo nome varia dependendo do nível energético.

Para moléculas orgânicas, os elétrons podem ser excitados a partir dos orbitais moleculares ligantes σ e π , que são chamados de HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital). Pode haver excitação de elétrons de orbital molecular não ligante (NBMO- Nonbonding Molecular Orbital) (figura 17).

A espectrometria no ultravioleta é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados pois para muitas estruturas eletrônicas esta absorção ocorre em uma porção pouco acessível do ultravioleta [Silverstein *et al.* 1994]. Os grupos que têm absorções características são chamados de cromóforos e sua presença é responsável, com frequência, pela coloração das substâncias [Atkins e De Paula 2004].

No exemplo mostrado na figura 17, a transição eletrônica responsável pela absorção de compostos que possuem grupo carbonila pode ser atribuída aos pares de elétrons isolados do átomo de oxigênio, gerando a transição $n \rightarrow \pi^*$. As energias típicas de absorção são da ordem de 4 eV (290 nm). Como as transições $n \rightarrow \pi^*$ são proibidas, isto é, possuem baixa probabilidade de ocorrer, por simetria, as absorções são fracas [Atkins e De Paula 2004]. Isso pode ser verificado experimentalmente através da leitura de espectros de UV-Vis em várias concentrações, para obtenção do ϵ (através da Lei de Beer: $A = \epsilon \cdot b \cdot c$), com a sua magnitude indicando o grau de probabilidade da transição eletrônica observada.

Classificando em ordem crescente, as transições eletrônicas geralmente estão na seguinte ordem:



Para ilustração desses níveis de energia, na Figura 7 está o formaldeído como exemplo, com todas as possibilidades de transição eletrônica.

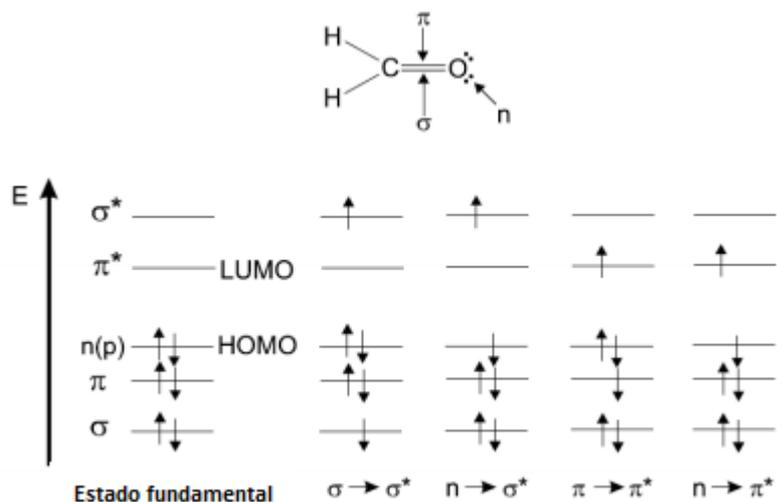


Figura 17. Níveis de energia para os orbitais moleculares do formaldeído (HOMO: orbital molecular ocupado de mais alta energia; LUMO: orbital molecular desocupado de mais baixa energia) VALEUR, 2001].

Quando um dos dois elétrons de spins opostos (pertencentes ao HOMO) é transferido para um orbital molecular de maior energia, seu spin, em princípio, não é alterado, sendo que ambos estados são chamados de singlete (normalmente denominado S_0 para o estado

fundamental, e S_1, S_2, \dots, S_n para os estados excitados) (Figura 18) e a transição correspondente é chamada de uma transição singlete-singlete..

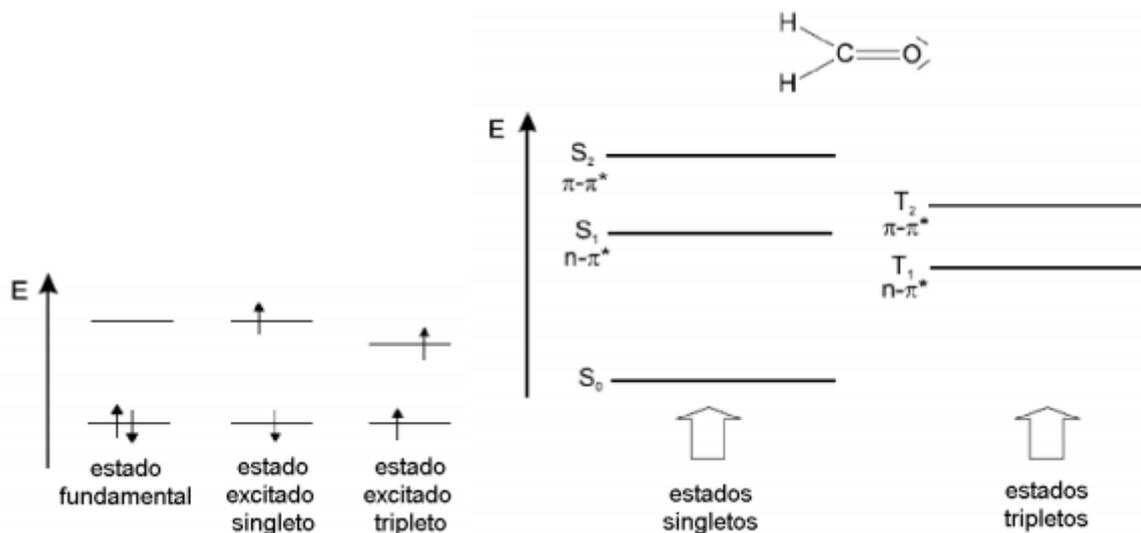


Figura 18. Distinção entre os estados singlete e tripleto, usando o formaldeído como exemplo [VALEUR, 2001].

Uma molécula no estado excitado singlete pode sofrer conversão para um estado em que o elétron excitado tenha seu spin modificado, e por existirem dois elétrons com spins paralelos, o número quântico total de spin é 1 e a multiplicidade é 3. Tal estado é chamado de estado tripleto porque corresponde a três estados de mesma energia. De acordo com a regra de Hund, o estado tripleto tem uma energia menor que a do estado singlete de mesma configuração.

$$M = 2S + 1$$

$$S = \sum s_i, \text{ com } s_i = +\frac{1}{2} \text{ ou } -\frac{1}{2}$$

Equação 2. Equação para cálculo da multiplicidade.

Onde: S é o número quântico de spin total; M é a multiplicidade; S_i é o número quântico de spin.

A sobreposição e coplanaridade dos orbitais π em sistemas conjugados permite que os elétrons estejam deslocalizados sobre todo o sistema (efeito de ressonância). Por não haver sobreposição entre os orbitais σ e π , o sistema de elétrons π pode ser considerado como independente das ligações σ . Pode-se dizer que a extensão do sistema π é inversamente proporcional à energia para a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e, por isso, o comprimento de onda da banda de absorção correspondente é maior. Esta regra aplica-se a sistemas conjugados lineares (polienos) e sistemas conjugados cíclicos (moléculas aromáticas).

A espectroscopia de absorção é uma técnica que consiste em obter dados a partir da absorção de radiação de energia eletromagnética, em função do comprimento de onda, na faixa entre ~ 200 nm e ~ 750 nm, para amostras de substâncias geralmente diluídas em um solvente transparente. A Figura 19 mostra o esquema de um espectrofotômetro para a obtenção de espectros na região do UV-vis.

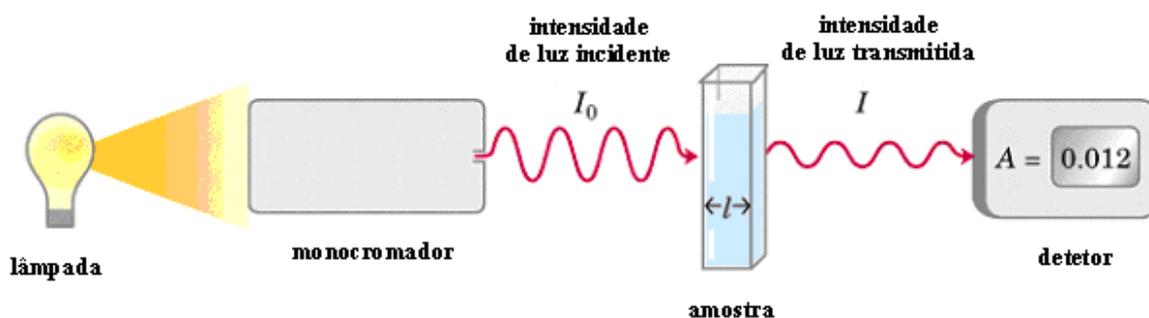


Figura 19. Esquema dos componentes da espectroscopia no ultravioleta/visível [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf] acessado em 07/02/2014.

3.2.2. Espectroscopia de emissão de fluorescência

Como consequência do processo de excitação de uma molécula, que absorve energia em um dado comprimento de onda, o resultado pode ser a emissão de energia na forma de luz, fenômeno conhecido por luminescência. Existem dois casos específicos de luminescência resultantes do processo de absorção de radiação luminosa, a fluorescência e a fosforescência.

Empregando-se o diagrama de Jablonski (Figura 20) pode-se visualizar de forma simples os processos resultantes da absorção de um fóton por uma determinada espécie, tais como conversão interna, fluorescência, cruzamento entre sistemas, fosforescência. Os estados

eletrônicos singletes são representados por S_0 (estado eletrônico fundamental), S_1 , S_2 , ... S_n para os estados eletrônicos excitados e estados tripletes, T_1 , T_2 ,... T_n . Níveis vibracionais são associados com cada estado eletrônico. É importante perceber que a absorção de um fóton é muito rápida ($\cong 10^{-15}$ s) quando comparada com todos os outros processos, não havendo deslocamento concomitante dos núcleos dos átomos formadores de uma ligação, de acordo com o princípio de Franck-Condon (uma transição eletrônica ocorre preferencialmente sem mudanças nas posições dos núcleos atômicos nas moléculas e em seu ambiente).

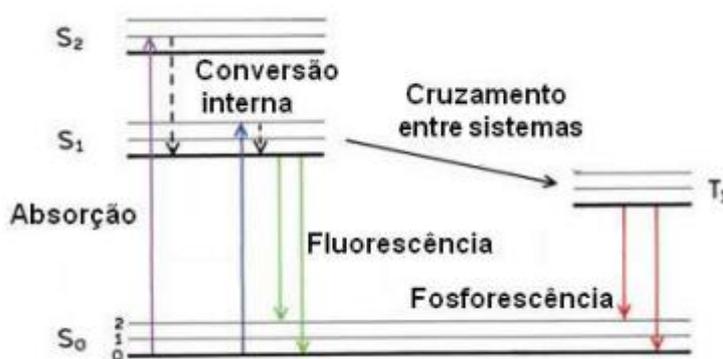


Figura 20. Diagrama de Jablonski [modificado de Lakowicz, 2006].

As setas verticais indicam o início da absorção a partir do nível mais baixo de energia vibracional de S_0 , pois a temperatura ambiente a maioria das moléculas está neste nível. A absorção de um fóton pode levar a molécula para um dos níveis vibracionais de S_1 , S_2 , ... S_n . A transição 0-0 trata-se de uma transição eletrônica do nível vibracional de mais baixa energia do S_0 para o nível vibracional de mais baixa energia de S_1 . Ela é aproximadamente a mesma para absorção e fluorescência. No entanto, o espectro de fluorescência é localizado em comprimentos de onda maiores (energia mais baixa) que o espectro de absorção, devido à perda de energia no estado excitado decorrente da relaxação vibracional. Moléculas excitadas encontram-se no estado S_1 por certo tempo (de poucas dezenas de picosegundos a poucas centenas de nanosegundos, tempo que depende do tipo da molécula e do meio) antes de emitir um fóton ou percorrer outros processos de desexcitação. Depois da excitação de uma população de moléculas por um pulso de luz muito curto, a intensidade da fluorescência decresce exponencialmente com um tempo característico, refletindo o tempo de vida médio das moléculas no estado excitado S_1 .

Como visto no Diagrama de Jablonski, entre os processos de desexcitação podemos citar:

- **Conversão interna** – Transição não-radiativa entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Este processo é seguido por uma relaxação vibracional (em solução) para o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico, S_1 por exemplo, com transferência do excesso de energia vibracional para moléculas vizinhas. Este fenômeno possui tempo característico de 10^{-11} a 10^{-9} s.
- **Fluorescência:** É chamada de fluorescência a emissão de fótons acompanhada da relaxação radiativa $S_1 \rightarrow S_0$. A emissão de fluorescência, geralmente, ocorre a partir de S_1 e suas características não são dependentes do comprimento de onda de excitação.
- **Cruzamento entre sistemas:** Transição não-radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes. Exemplificando, uma molécula excitada no nível vibracional 0 do estado S_1 pode mover-se para um nível vibracional isoenergético do estado tripleto T_n , assim a conversão interna seguida da relaxação vibracional vai levá-la ao nível vibracional mais baixo de T_1 . O cruzamento entre sistemas pode ser rápido o suficiente (entre 10^{-7} e 10^{-11} s) para competir com outros caminhos de desexcitação a partir de S_1 (fluorescência e conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$).
- **Fosforescência versus desexcitação não-radiativa:** A desativação unimolecular não-radiativa a partir do estado tripleto T_1 em uma solução (considerando temperatura ambiente) é predominante sobre a desexcitação radiativa, que para este caso é chamada fosforescência. A transição $T_1 \rightarrow S_0$ tem baixíssima probabilidade de ocorrência por conta da diferença entre as respectivas multiplicidades, por isso dita proibida, (pode ser observada devido ao acoplamento spin-órbita), e a constante de decaimento radiativo é muito pequena. O espectro de fosforescência é localizado em comprimentos de onda maiores que no espectro de fluorescência, porque a energia do nível vibracional mais baixo do estado tripleto T_1 é menor que o do estado singlete S_1 . O fenômeno de fosforescência é melhor observado a baixas temperaturas, por conta da diminuição de processos de desativação competitivos, como transferência de energia eletrônica e vibracional.

As transições correspondentes ao processo de absorção e de emissão de fluorescência 0-0 serão possivelmente coincidentes quando estão na região do visível. O espectro de

absorção é resultante das transições $0 \rightarrow 0$, $1 \rightarrow 0$, $2 \rightarrow 0$, $n \rightarrow 0$ 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 $0 \leftarrow 0$, $0 \leftarrow 1$, $0 \leftarrow 2$, $0 \leftarrow n$ e os picos se deslocam para números de onda decrescentes. Picos de absorbância $0 \rightarrow 0$ e de fluorescência $0 \leftarrow 0$ não são exatamente coincidentes por conta do solvente conter interações diferentes com o soluto no estado fundamental e no estado excitado (por exemplo, as estruturas das ligações hidrogênio podem ser diferentes para cada caso). Como as moléculas do solvente não possuem tempo suficiente para reorganização durante a transição, a absorção ocorre em ambiente característico do soluto solvatado no estado fundamental. A fluorescência ocorre em ambiente característico do estado excitado solvatado [ATKINS e DE PAULA, 2004].

A fluorescência acontece em frequência inferior a da radiação incidente, isso porque a transição radiativa só ocorre depois que parte da energia vibracional tenha se dispersado no ambiente. O mecanismo também sugere que a intensidade da fluorescência depende da capacidade das moléculas do solvente de aceitarem os quanta eletrônicos e vibracionais, ou seja, depende da sua natureza. Um solvente com moléculas que têm níveis vibracionais muito espaçados (como a água por exemplo) pode aceitar um grande quantum de energia eletrônica e deste modo, extinguir a fluorescência [ATKINS e DE PAULA, 2004].

3.2.2.1. Medidas de fluorescência no estado estacionário

A Figura 21 mostra os componentes de um espectrofluorímetro convencional. A fonte de luz é geralmente uma lâmpada de xenônio de alta pressão, que oferece a vantagem de emissão contínua variando de $\cong 250$ nm até o infravermelho. Um monocromador é utilizado para seleção do comprimento de onda de excitação. A fluorescência é direcionada em um ângulo reto em relação ao feixe incidente e detectada através de um segundo monocromador e por uma fotomultiplicadora. O módulo ótico contém várias partes: um porta-amostra, fendas, polarizadores e um espalhador de feixe para fotodiodos.

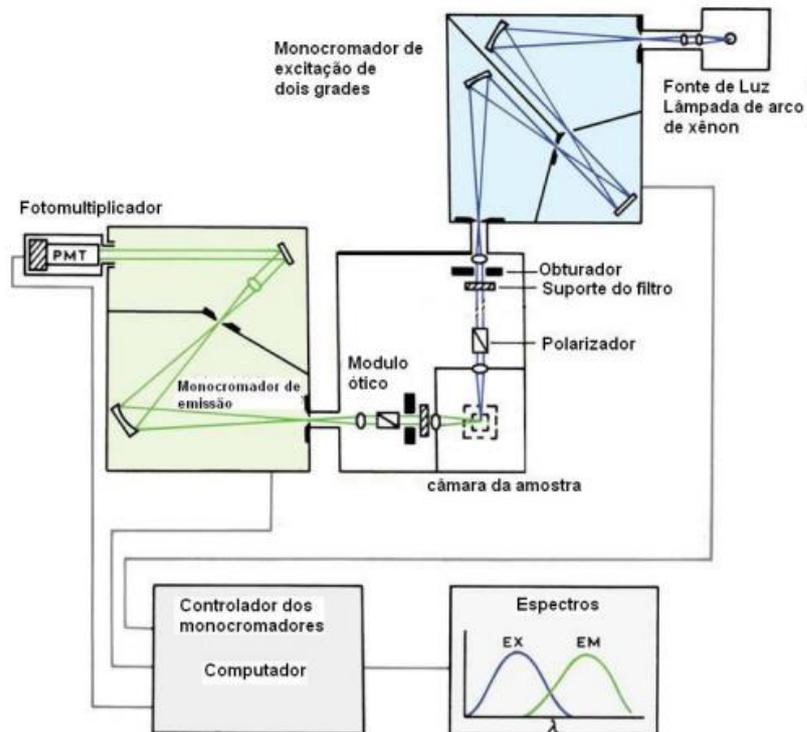


Figura 21. Diagrama de um espectrofluorímetro com geometria perpendicular para excitação e emissão [modificado de LAKOWICZ, 2006].

As intensidades de fluorescência são mostradas em um espectro de emissão em função do comprimento de onda, obtido mantendo-se o comprimento de onda da luz de excitação fixo, em geral no máximo de absorção do fluoróforo. O espectro de emissão representa as transições dos níveis vibracionais do primeiro estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 . O estado singlete leva aproximadamente 10^{-9} s para decaimento. Durante esse tempo vários processos podem ocorrer, tais como reações de protonação / desprotonação, mudanças conformacionais locais em proteínas e interações de diversas substâncias exógenas com biomoléculas. A fluorescência pode ser suprimida como resultado da interação entre o composto fluorescente e outras substâncias presentes na solução, por efeitos da temperatura, por efeitos de filtro interno, pela presença de oxigênio ou impurezas na solução. Além disso, em concentrações elevadas pode ocorrer a formação de dímeros ou polímeros, o que origina a diminuição da eficiência quântica e a alteração dos espectros de absorção e emissão, resultando em uma diminuição da intensidade de fluorescência.

A intensidade de fluorescência é diretamente proporcional à concentração do fluoróforo quando em soluções muito diluídas (ou seja, absorvância muito baixa). Para concentrações baixas o suficiente (absorvância < 0.1) a luz incidente é ligeiramente atenuada ao longo da cubeta. Já em concentrações altas, uma parte significativa da luz incidente é

absorvida antes de chegar ao ponto onde a fluorescência é observada (efeito de filtro interno). Outra parte significativa da luz emitida também é reabsorvida antes desta sair da cubeta (efeito de filtro interno secundário), levando a um aparente decréscimo da intensidade de fluorescência.

3.2.2.2. Fluorescência resolvida no tempo

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

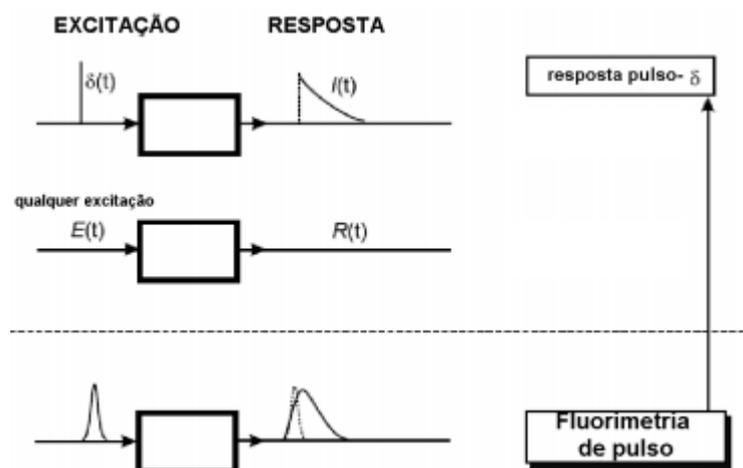


Figura 22. Princípios de fluorimetria resolvida no tempo pulsada [modificado de Valeur, 2005].

Supondo, em um exemplo, que uma amostra contendo um fluoróforo seja excitada com um pulso de luz infinitamente curto, resultando na excitação de uma população inicial N_0 de fluoróforos para o primeiro estado excitado singlete, o decaimento para o estado fundamental ocorre com uma constante de velocidade $k_r + k_{nr}$, como mostra a equação 3.

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

Equação 3. Equação para determinação da população no estado excitado.

Onde: $N(t)$ = número de moléculas excitadas no tempo t ; k_r = constante de velocidade radiativa (fluorescência ou fosforescência); k_{nr} = constante de velocidade de decaimento não radiativo.

A emissão é um evento aleatório, onde cada fluoróforo possui igual probabilidade de emissão num dado intervalo de tempo. Ao integrar a equação 3, tem-se um decaimento exponencial da população excitada, como visto na equação 4:

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

Equação 4. Equação para decaimento exponencial da população excitada.

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

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

Equação 5. Equação para cálculo da intensidade radiativa.

Sendo τ o tempo de vida e α a intensidade no tempo zero, onde:

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

Equação 6. Tempo de vida em função das constantes de decaimento radiativo e não radiativo.

O tempo de vida de fluorescência, em geral, é relacionado com o tempo requerido para a intensidade decair 63.21% ($1/e$) de seu valor inicial. O tempo de vida é determinado na maioria das vezes através do coeficiente angular do gráfico $\log I(t)$ versus t (Figura 23).

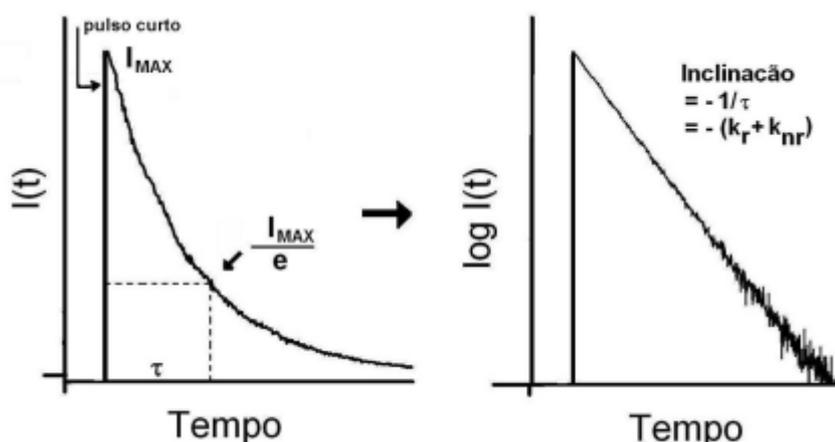


Figura 23. Curva de decaimento de fluorescência [modificado de Lakowicz, 2006].

3.2.3. Dicroísmo circular (DC)

O dicroísmo circular é útil para o estudo de moléculas opticamente ativas (moléculas quirais), macromoléculas, e também para moléculas de origem biológica, como proteínas, carboidratos, dendrímeros. Também é uma técnica sensível para monitorar mudanças conformacionais nas proteínas [YUE et al. 2008], sendo amplamente usada para a determinação da estrutura secundária de macromoléculas [KELLY et al. 2005 e CHENG et al. 2009]. A espectroscopia de dicroísmo circular fundamenta-se na absorção diferencial da luz polarizada circularmente no sentido horário (direita) ou no sentido anti-horário (esquerda), ou seja, na diferença entre elas: $DC = A_{Esq} - A_{Dir}$. [FASMAN 1996 e WOODY 1995].

O DC também tem aplicação no monitoramento de mudanças conformacionais em macromoléculas, composição de misturas quirais e interação dessas macromoléculas com outras moléculas menores. As vantagens na utilização desta técnica são a rapidez e simplicidade na execução de experimentos e recuperação total da amostra (técnica não destrutiva), com as análises sendo feitas 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 24) mostra um esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular [FASMAN 1996 e WOODY 1995].

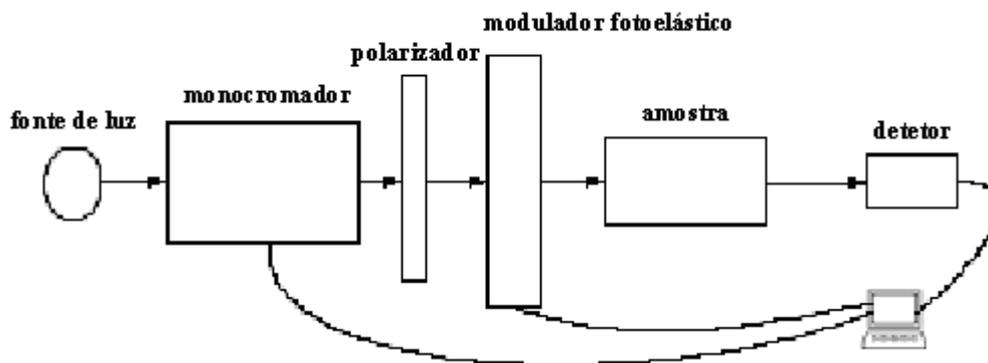


Figura 24. Esquema dos componentes básicos do dicroísmo circular.

A luz linearmente polarizada é composta de dois componentes circularmente polarizados de mesma intensidade. Em cada um desses componentes o feixe de radiação eletromagnética gira na direção de propagação. Observando-se perpendicularmente a variação no vetor elétrico com o tempo, percebe-se que a ponta deste vetor segue uma hélice, rodando no sentido horário para a luz polarizada circularmente para a direita e anti-horário para a esquerda. A absorção de luz não-polarizada é descrita pela absorvância (A) e é definida pela Equação 7 [FASMAN 1996 e WOODY 1995].

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

Equação 7. Equação para determinar a absorção de luz não-polarizada.

Onde: A é a absorvância, I_0 é a intensidade da luz incidente; I é a intensidade após a luz percorrer uma distância l no meio.

Segundo a lei de Lambert-Beer (Equação 8) [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, é possível 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 9, 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].

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

Equação 8. Equação para determinar o coeficiente de extinção molar [PACE et al. 1995].

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

Todos os instrumentos comerciais de DC medem a variação de absorvância (ΔA) ($\Delta A = A_E - A_D = (\epsilon_E - \epsilon_D) \cdot c \cdot l$). Por razões históricas, entretanto, os aparelhos de DC são calibrados para elipticidade (θ), Equação 10 [FASMAN 1996, HECHT 1998, WOODY 1995 e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf, acessado em 09/02/2104]. Para eliminar os efeitos do caminho ótico e da concentração, a elipticidade (θ) é expressa na forma de elipticidade molar (θ_m), Equação 11 [FASMAN 1996, HECHT 1998, WOODY 1995 e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf, acessado em 09/02/2014], que também é representada por MRE (elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual). Dessa forma, quando o feixe de luz plano polarizada atravessa um meio oticamente anisotrópico, é gerada a luz elipticamente polarizada, que é a base da técnica espectroscópica de dicroísmo circular (Figura 20) [Adaptada de <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo0.htm>, acessado em 09/02/2014].

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

Equação 9. Equação para determinar o dicroísmo circular molar [FASMAN 1996, HECHT 1998, WOODY 1995 e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf acessado em 09/02/2014].

Onde: $\Delta\epsilon$ é o dicroísmo circular molar (em L/cm.mol); ϵ_E é o coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a esquerda (em L/cm.mol); ϵ_D é o coeficiente de extinção molar para a luz circularmente polarizada para a direita (em L/cm.mol); A_E é a

absorbância para a luz circularmente polarizada para a esquerda; A_D é a absorbância para a luz circularmente polarizada para a direita; c é a concentração da espécie que absorve a luz (em mol/L); l é a distância que a luz percorre no meio também chamado de caminho ótico (em cm).

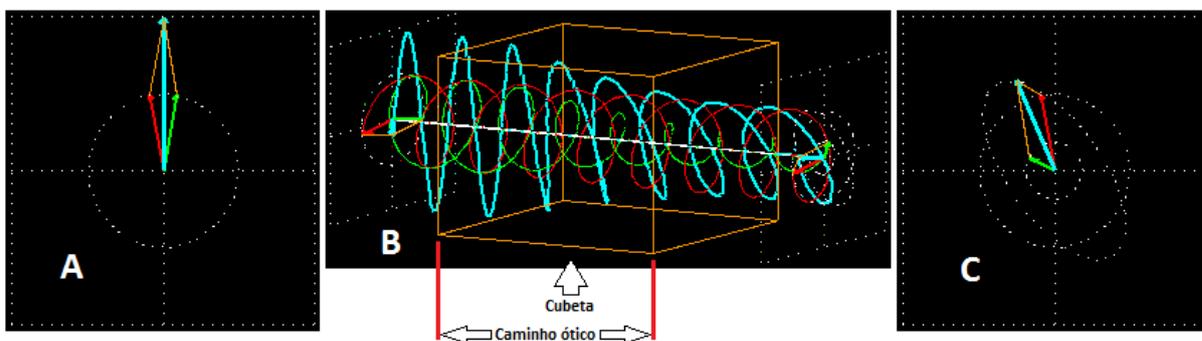


Figura 25. Esquema da luz elípticamente polarizada gerada por dicroísmo circular [Adaptada de <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo0.htm> acessado em 09/02/2014].

De acordo com a figura 27, em “A” temos a soma das componentes circularmente polarizadas à direita e à esquerda (em vermelho e verde) que resulta em um feixe de luz plano-polarizada (em azul). Em “B”, temos a passagem da onda de luz por uma cubeta contendo, por exemplo, uma solução de amostra opticamente anisotrópica (uma amostra quiral). Em seu caminho ótico observamos maior absorção da componente circular verde (diminuição da amplitude), quando comparada com a componente circular vermelha, resultando, como mostrado em “C”, a luz elípticamente polarizada formada. É importante lembrar que nesta figura foi considerado apenas o componente elétrico do feixe de onda eletromagnética para que haja melhor visualização.

As medidas de elipticidade são feitas partindo dos ângulos mostrados na figura 21:

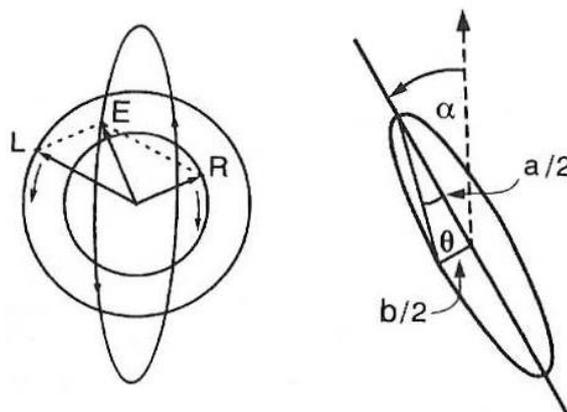


Figura 26. Elipse formada pela visão frontal da onda elipticamente polarizada [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf] acessado em 09/02/2014. “a/2” e “b/2” são, respectivamente, os eixos maior e menor. A é o ângulo de rotação do plano de polarização original, chamado de birrefringência circular, ou rotação ótica.

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

Equação 10. Equação para determinar a elipticidade [Fasman 1996, Hecht 1998, Woody 1995 e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf] acessado em 09/02/2014.

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

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

Equação 11. Equação para determinar a elipticidade molar [FASMAN 1996, HECHT 1998, WOODY 1995 e www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf acessado em 09/02/2014].

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 as estruturas secundária e terciária de proteínas [JOHNSON 1988, VENYAMINOV e YANG 1996 e CORDEIRO 2005]. Valores negativos máximos de elipicidade (θ) em 208 nm e 222 nm são indicativos da presença de estrutura predominantemente em α -hélice, e valores de elipicidade 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. Soluções

- Soluções de concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L para as α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) em metanol (solução 1);
- Solução de tampão fosfato (PBS), de pH = 7,4 (1 sachê solubilizado em 1 L de água milli-Q);
- Soluções $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L de albumina sérica humana (ASH) em solução de tampão fosfato (PBS) (pH = 7,4) (solução 2);
- Soluções $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L de albumina sérica humana (ASH) em solução de tampão fosfato (PBS) (pH = 7,4) (solução 3).

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

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

Todas as medidas foram feitas a três diferentes temperaturas, 305, 310 e 315 K, empregando-se um controlador de temperatura do tipo Peltier, modelo Jasco TFD-425S-15. Esperou-se 10 min para estabilização da temperatura antes de cada medida experimental. Em todos os casos, as medidas foram feitas 3 min após a adição do supressor, durante os quais as amostras foram agitadas a 230 rpm empregando-se um agitador tipo Vortex marca Jasco, modelo PFCD425S/15. Tal procedimento foi também empregado nos experimentos de fluorescência no estado estacionário e de dicroísmo circular.

No espectrômetro de ultravioleta também foram realizadas varreduras na faixa de 200 nm a 400 nm, utilizando-se células de quartzo, com um volume de 3 mL de solução de albumina sérica humana (ASH) tamponada com PBS (pH = 7,4) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L (branco), de modo a se obter o espectro de absorção UV-Vis apenas de ASH.

Empregando-se a solução de albumina (ASH) (3,00 mL), foi efetuada uma titulação com adição sucessiva de alíquotas de 10 μ L de solução das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, e os espectros de absorção UV-Vis foram registrados a cada adição, além do branco, onde havia apenas albumina (Figuras 28, 40, 55, 70, 85, 100, 115 e 130).

No espectrômetro de ultravioleta também foram realizadas varreduras na faixa de 200 nm a 400 nm, utilizando-se células de quartzo contendo um volume de 3,00 mL de solução de PBS, onde foram adicionadas alíquotas de solução metanólica das naftoquinonas até se obter uma concentração final de $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, e, novamente, os respectivos espectros foram registrados após cada adição de alíquota da solução da naftoquinona correspondente (Figuras 29, 42, 57, 72, 87, 102, 117 e 132).

3.5. Estudos espectroscópicos por emissão de fluorescência

Foram registrados espectros de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{ex}=280$ nm, emissão 300-500 nm) em solução tampão de PBS (pH = 7,4), com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L nas temperaturas de 305K, 310K e 315K. Para as medidas de fluorescência com resolução temporal as concentrações estão especificadas na tabela 4.

Os estudos da interação das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) com a albumina sérica humana (ASH), por espectroscopia de fluorescência foi realizada inicialmente pelo registro da emissão de fluorescência de uma alíquota de 3,00 mL de uma solução de albumina sérica humana (ASH) tamponada com PBS (pH = 7,4), de concentração aproximadamente $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L de modo a obter a intensidade de fluorescência inicial (F_0), sendo em seguida, realizada uma titulação através da adição de alíquotas sucessivas das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) com concentração de

aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L de modo a obter um valor de supressão inicial ($F_0 - F$) com aproximadamente 10% do valor inicial da fluorescência da ASH (F_0) (Figuras 31, 43, 58, 73, 88, 103, 118 e 133).

As condições utilizadas para estas análises foram as seguintes: espectro de emissão de fluorescência (varredura de 300 nm a 450 nm), e comprimento de onda de excitação ($\lambda_{exc} = 280$ nm), com fendas de emissão a 6,0 nm e de excitação a 10 nm e velocidade de 100 nm/min. Todos os estudos espectroscópicos de emissão de fluorescência foram realizados nas temperaturas de 305K, 310K e 315K.

3.6. Estudos espectroscópicos por dicroísmo circular

As condições utilizadas para esta análise foram: varredura (faixa) de 200 nm a 250 nm, com velocidade de 100 nm/min no espectropolarímetro e controle de temperatura ($T = 305K, 305K$ e $315K$). A linha de base foi a solução aquosa de PBS ($pH = 7,4$). Os espectros das soluções aquosas de albumina sérica humana (ASH) 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 foram colocados 3,00 mL de uma solução de albumina (ASH) tamponada com PBS ($pH = 7,4$) de $1,00 \times 10^{-6}$ mol/L em uma célula de quartzo, e medida a sua elipticidade (branco), em diferentes temperaturas ($T = 305K, 310K$ e $315K$), (Figura 29-31) as quais foram suprimidas com adições sucessivas de alíquotas (12 μL , 24 μL , 48 μL e 96 μL) de soluções das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) com concentração de aproximadamente $1,00 \times 10^{-3}$ mol/L, até se obter uma concentração final de α -lapachonas na célula de quartzo em torno de $3,00 \times 10^{-5}$ mol/L. Após cada uma dessas adições, foram feitas leituras sucessivas da solução contida na célula de quartzo. (Figuras 40-42, 52-54, 67-69, 82-84, 97-99, 112-114, 127-129 e 142-144).

3.7. Condições de análise

3.7.1. Ultravioleta/Visível

Tabela 1. Temperatura utilizada na absorção de UV-VIS de ASH na presença da respectiva naftoquinona (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl).

pH	T (K)
7,4	305

Tabela 2. Concentração final das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3,00 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 298K.

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

3.7.2. Fluorescência

Tabela 3. Temperaturas utilizadas na espectroscopia de emissão de fluorescência de ASH na presença das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl).

pH	T (K)
7,4	305
	310
	315

Tabela 4. Concentração final das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), após a adição de alíquotas de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol/L, em 3,00 mL da solução de ASH $1,00 \times 10^{-5}$ mol/L, para T = 305K, 310K e 315K.

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

3.7.3. Dicroísmo Circular

Tabela 5. Temperaturas utilizadas na espectroscopia de dicroísmo circular de ASH na presença das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl).

pH	T (K)
7,4	305
	310
	315

Tabela 6. Concentração das α -2,3-diidrofurano- e α -pirano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) após a adição de alíquotas de soluções das α -lapachonas ($1,0 \times 10^{-3}$ mol/L), em 3,00 mL da solução de ASH ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L), para T=305K, 310K e 315K.

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

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão acerca do estudo espectroscópico da interação de α -pirano- e α -2,3-diidrofurano naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) com albumina sérica humana (ASH) estão apresentados a seguir.

4.1 Espectroscopia no ultravioleta/visível (UV-Vis)

A albumina sérica humana (ASH) possui uma banda de absorção em comprimento de onda por volta de 280 nm, atribuída principalmente à absorção do triptofano, com menor contribuição pela tirosina e fenilalanina [www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf e www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

Triptofano, tirosina e fenilalanina (Figura 27) por serem relativamente não polares, podem participar de interações hidrofóbicas, que são relativamente fortes quando os grupos aromáticos (grupos aromáticos ligados à estrutura base do amino ácido) ficam posicionados lado a lado. O grupo hidroxila da tirosina pode formar ligações hidrogênio atuando como um grupo funcional importante quando se fala em atividade enzimática. A tirosina e o triptofano possuem maior polaridade por conta da presença dos grupamentos hidroxila na tirosina e amino no núcleo indólico do triptofano [www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf].

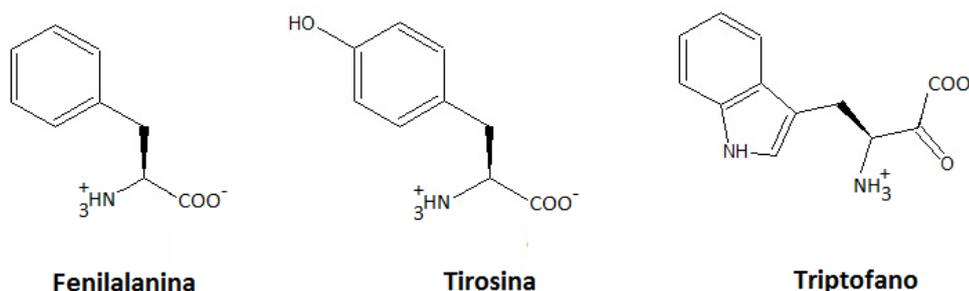


Figura 27. Estrutura de fenilalanina, tirosina e triptofano.

As mudanças estruturais de ASH, como uma da adição das naftoquinonas, foram estudadas através de espectros de absorção na região do UV-Vis. Os espectros de absorção na região de 200 nm a 450 nm para ASH (em solução 10^{-5} mol/L com tampão PBS), na ausência e na presença de concentrações variadas das naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF,

LF4Me, LF4Br, LF4Cl) estão apresentados na Figura 28 para LP e no anexo para os demais compostos (Figuras 42, 57, 72, 87, 102, 117 e 132).

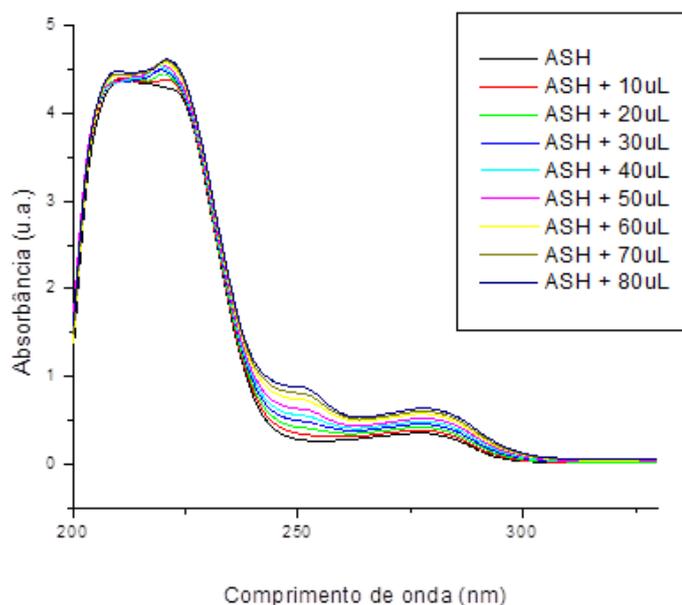


Figura 28. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) e contendo diferentes concentrações de naftoquinona (LP), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP} = 0,571; 1,14; 1,7; 2,26; 2,82; 3,37; 3,92; 4,47$ ($\times 10^{-5}$) mol/L.

Não é possível se chegar a uma conclusão quanto à formação de um complexo ASH-naftoquinona analisando os espectros de absorção no UV-Vis contidos na Figura 29 (e figuras 42, 57, 72, 87, 102, 117 e 132 para os demais compostos). Como a naftoquinona (LP) em PBS (Figura 28), apresenta máximos de absorção em torno de 250 nm e 285 nm, que é coincidente com o máximo de absorção do triptofano da ASH, a 280 nm, a explicação para o deslocamento batocrômico do espectro de absorção de ASH seria que ele é resultante da adição desta naftoquinona, deslocamento este que claramente aumenta de acordo com o aumento da concentração de LP, como mostra a figura 30.

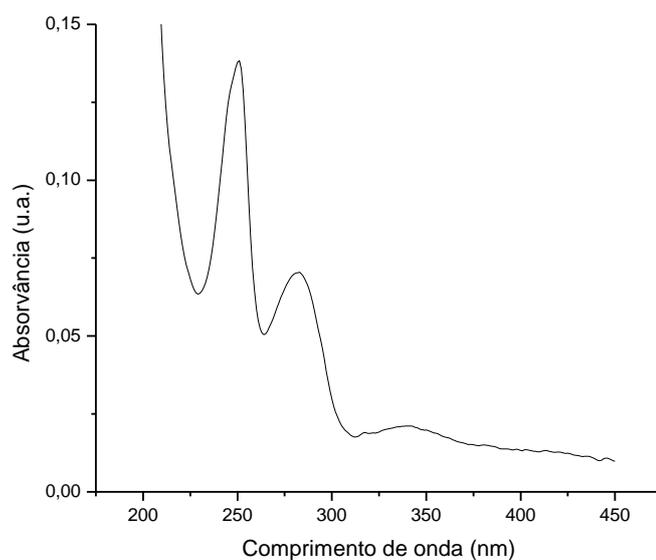


Figura 29. Espectro de absorção no UV-vis da naftoquinona LP. $C_{LP} = 1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

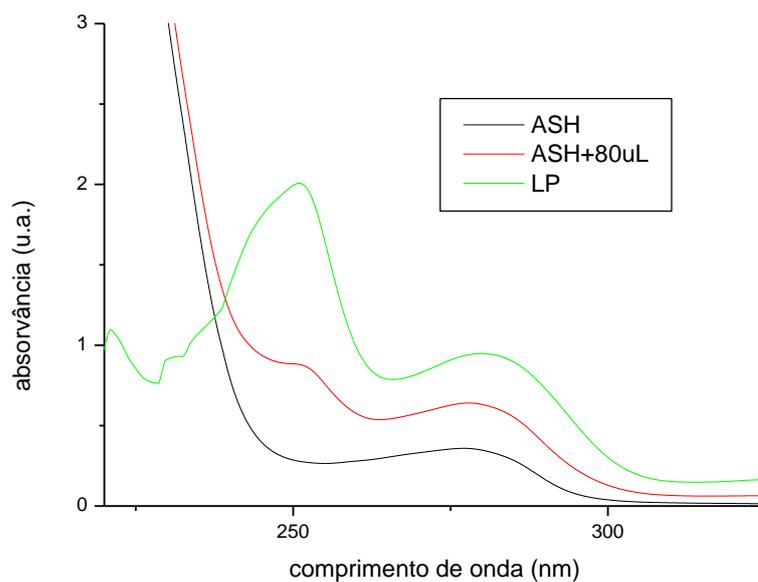


Figura 30. Espectros de absorção de ASH 10^{-5} M em preto, ASH + 80uL de naftoquinona (LP) em vermelho e naftoquinona em PBS, verde, espectro obtido como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH+LP e ASH livre, normalizado).

Os resultados obtidos da interação da naftoquinona (LP) e seus derivados (LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) com ASH, por conta das bandas de absorção das naftoquinona próximas ao máximo de absorção de 280 nm, típica do triptofano, sofreram aumento das intensidades de absorção com o aumento da concentração de naftoquinona (Figura 30, 41, 56, 71, 86, 101, 116 e 131), o que não possibilita a indicação da formação de um complexo entre as α - naftoquinonas e a albumina sérica humana (ASH) no estado fundamental.

4.2 Espectroscopia de fluorescência

Os resultados dos estudos de supressão de fluorescência da ASH como resultado da interação com as naftoquinonas (LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), em solução de tampão de fosfato (pH= 7,4) na temperatura de 305K, estão apresentados na Figura 31 para LP e no anexo para os demais compostos (Figuras 43, 58, 73, 88, 103, 118 e 133).

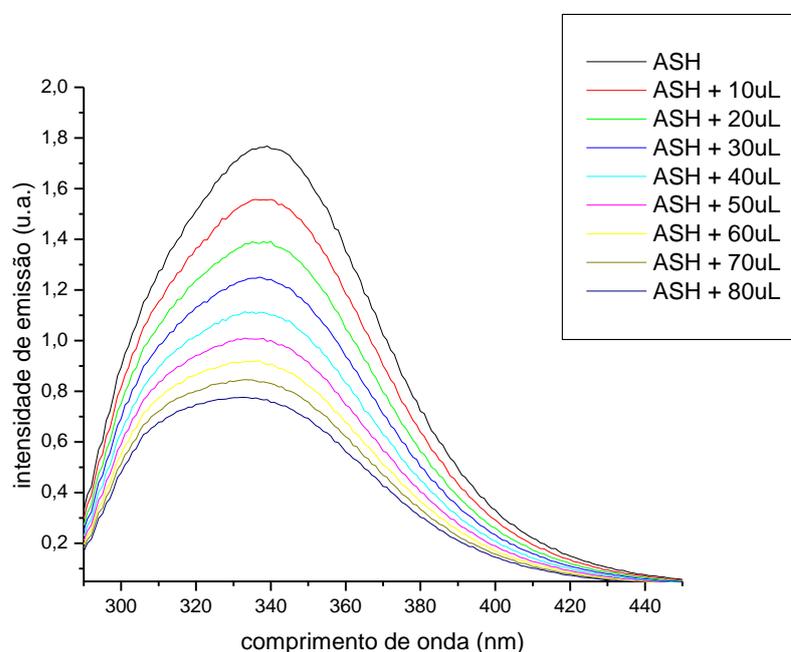


Figura 31. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em naftoquinona (LP), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP} = 0; 0,085; 0,16; 0,25; 0,33; 0,42; 0,51; 0,60; 0,67$ e ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K.

A adição de alíquotas de naftoquinona a uma solução de ASH ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L) levou a uma diminuição gradativa na intensidade de emissão máxima de fluorescência de ASH (Figuras 31, 43, 58, 73, 88, 103, 118 e 133), indicando que a adição da naftoquinona resulta em uma localização do supressor próxima ao resíduo de triptofano [WEI et. al. 2006 e CHENG et al. 2009].

O aumento na concentração das naftoquinonas, decorrente de adições sucessivas, resultou em um leve deslocamento na banda de emissão de fluorescências da albumina para o azul, o que sugere a ocorrência da interação do composto na cavidade hidrofóbica da albumina, gerando pequenas mudanças estruturais nesta região, e acarretando uma diminuição da polaridade ao redor do resíduo de triptofano [SHI et. al. 2007, TANG et. al. 2006 e CHENG et. al. 2009]

Os gráficos de Stern-Volmer correspondentes à supressão de fluorescência dos resíduos de triptofano de ASH pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), a diferentes temperaturas (305K, 310K e 315K), podem ser expressos pela Equação 12 e estão mostrados na Figura 32 para LP e no anexo para os demais compostos (Figuras 44, 59, 74, 89, 104, 119 e 134).

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

Onde: $\tau_0 = 1 \times 10^{-8}$ s

Equação 12. Equação para a determinação de K_{SV} , e conseqüentemente, k_q . τ_0 é o tempo de vida de fluorescência de ASH [SKLAR, L.A. et. al. 1977].

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 ASH na ausência de supressor; $[Q]$ = concentração de supressor (naftoquinona) ou concentração de ligante (naftoquinona); F_0 = intensidade de emissão de fluorescência na ausência de supressor (ASH pura); F = intensidade de emissão de fluorescência na presença de supressor (naftoquinonas).

Os valores de K_{SV} (entre 10^4 e 10^5 L/mol), calculados a partir da equação 2 e mostrados na Tabela 7, demonstram que o provável mecanismo de supressão de ASH pela interação com as naftoquinonas é estático e o processo é pouco dependente da temperatura. Os altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão pelas naftoquinonas ($k_q \cong 10^{12}$ a 10^{13} L/mol.s), empregando-se o valor para o tempo de vida de fluorescência de ASH de $\tau_0 = 1 \times 10^{-8}$ s [SKLAR, L.A. et al. 1977], muito mais altos do que a constante de velocidade de difusão ($k_q \cong 5 \times 10^9$ L/mol.s, em água) [MUROV, et al., 1993], indicam a formação de uma pré-associação ASH/naftoquinonas.

As medidas de fluorescência no estado estacionário envolvem o processo total (supressões dinâmica e/ou estática). No entanto, na supressão de fluorescência resolvida no tempo apenas o mecanismo de supressão dinâmico é medido. Portanto, as medidas de tempo de vida são o método mais confiável para distinção entre supressão dinâmica e estática. Os decaimentos para a emissão de fluorescência de ASH resolvida no tempo, como uma função da concentração das α -naftoquinonas adicionadas ao meio, ilustrado na figura 33 (e os demais nos anexos, figuras 48, 63, 78, 92, 108, 123 e 138), demonstraram, em todos os casos, como pode ser visto através dos valores de k_q (equação 12), que a supressão teve maior contribuição do mecanismo estático e pouca contribuição do processo dinâmico. Os valores de K_{SV} foram semelhantes aos da literatura para outras moléculas ($K_{SV} \cong 10^5$ L/mol), da mesma forma que os valores de k_q concordam de maneira geral com os da literatura para outras moléculas ($k_q \cong 10^{12}$ a 10^{13} 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].

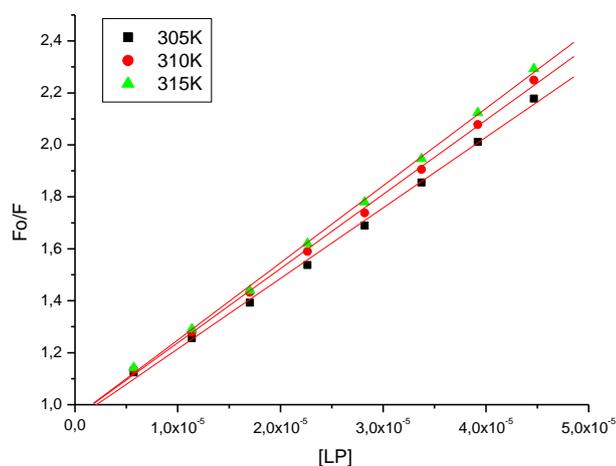


Figura 32. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona (LP).

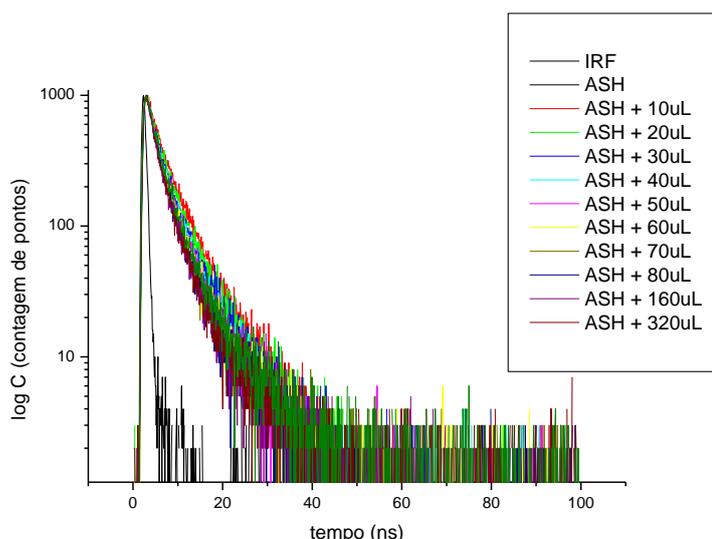


Figura 33. Curvas de decaimento para a emissão de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em presença de diversas concentrações de naftoquinona (LP) ($C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP} = 0; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85$ ($\times 10^{-6}$ mol/L), 1,12, 2,24 e 4,48 ($\times 10^{-5}$ mol/L) a $T = 298$ K. O decaimento curto corresponde ao IRF (fator de resposta do instrumento).

Tabela 7. Valores de K_{SV} e k_q calculados a partir dos gráficos de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) em diferentes temperaturas (305K, 310K e 315K).

T (K)	305		310		315	
	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)	K_{SV} (L/mol)	k_q (L/mol.s)
LP	27151,69	2,72E+12	28578,01	2,86E+12	29713,70	2,97E+12
LP4Cl	45335,74	4,53E+12	43198,74	4,32E+12	42106,08	4,21E+12
LP4Me	39643,75	3,96E+12	35678,02	3,57E+12	33154,83	3,32E+12
LP4F	55628,71	5,56E+12	52047,51	5,20E+12	48316,59	4,83E+12
LF	25980,64	2,60E+12	23412,51	2,34E+12	20128,97	2,01E+12
LF4Me	134521,96	1,35E+13	97498,20	9,75E+12	93596,80	9,36E+12
LF4Br	26653,27	2,67E+12	25097,99	2,51E+12	25250,20	2,53E+12
LF4Cl	48870,73	4,89E+12	47918,22	4,79E+12	45700,63	4,57E+12

As constantes de supressão efetivas para as naftoquinonas, ou constantes de ligação de Stern-Volmer modificadas (K_a), foram calculadas através de gráficos de Stern-Volmer modificados (Equação 14 [HE et al. 2005, XIE et al. 2005, LAKOWICZ 2006, TANG et al. 2006, XIE et al. 2006, CUI et al. 2007, LI et al. 2007, LI et al. 2008, ZHANG et al. 2008, LI

et al. 2009 e CHENG et al. 2009]), conforme mostrado na Figura 34 para LP e no anexo para os demais compostos (Figuras 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 135).

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

Equação 13. 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 (naftoquinona); f = intensidade de fluorescência máxima fracional da proteína ou fração da fluorescência inicial que é acessível ao supressor (naftoquinona); F_0 = intensidade de emissão de fluorescência na ausência de supressor; F = intensidade de emissão de fluorescência na presença de supressor (com naftoquinona)

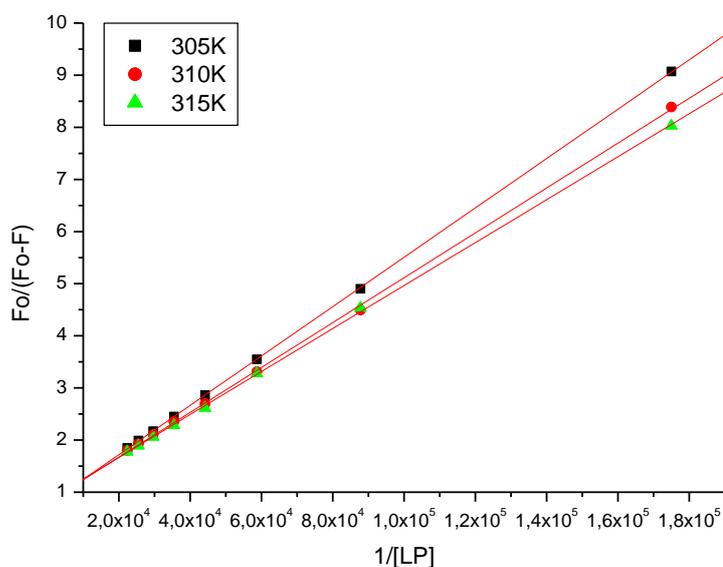


Figura 34. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona (LP).

Tabela 8. Valores de K_a calculados através dos gráficos de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) em diferentes temperaturas (305K, 310K e 315K).

Composto	Temperatura (K)		
	305	310	315
	Ka(L/mol)	Ka(L/mol)	Ka(L/mol)
LP	16296,23	18802,17	20368,38
LP4Cl	46759,97	61593,69	70470,98
LP4Me	24521,42	23426,32	22715,18
LP4F	36057,74	36277,87	36474,98
LF	21451,36	16196,74	13680,69
LF4Me	110909,80	98697,25	81883,63
LF4Br	15523,43	22238,05	28877,72
LF4Cl	33427,57	32750,77	31638,87

Os valores de K_a encontrados no estudo da supressão da fluorescência de ASH na presença das naftoquinonas ($K_a \cong 10^4$ L/mol) apresentados na Tabela 8 deixam claro que as naftoquinonas se ligam fortemente a ASH, visto que os valores de K_a foram bem parecidos com os da literatura para outras moléculas bioativas ($K_a \cong 10^4$ a 10^5 L/mol) que apresentam fortes interações com albumina [HE et al. 2005, TANG et al. 2006, LI et al. 2007, ZHANG et al. 2008 e LI et al. 2009].

Com o uso dos valores de K_a calculados para a supressão de ASH foram construídos, a partir da equação de Stern-Volmer modificada, gráficos de Van't Hoff (Equação 15) [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] que vão apresentados na Figura 35 para LP e no anexo para os demais derivados da α - naftoquinona (Figuras 46, 61, 76, 91, 106, 121 e 136). A partir destes gráficos foram feitas as determinações dos parâmetros termodinâmicos de variação de entalpia (ΔH°) e entropia (ΔS°) envolvidos na supressão da ASH e, através destes, foram calculados os valores de variação de energia livre de Gibbs (ΔG°), (Tabela 3). As temperaturas de 305K, 310K e 315K foram

escolhidas, pois a albumina sérica humana (ASH) 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 14. 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).

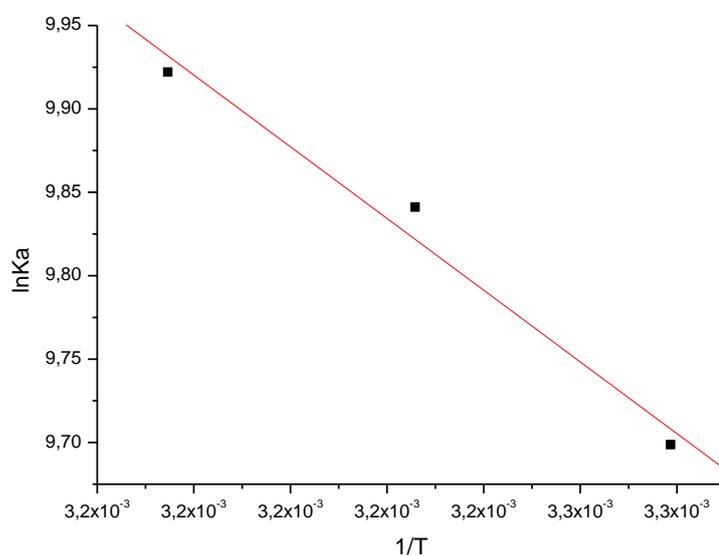


Figura 35. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela naftoquinona (LP).

Tabela 9. Valores de ΔH^0 , ΔS^0 e ΔG^0 (parâmetros termodinâmicos) obtidos a partir dos gráficos de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl).

	T (K)	ΔH^0 (kJ/mol)	ΔS^0 (J/mol.K)	ΔG^0 (kJ/mol)
LP	305	17,84196	140	-24,6183
	310			-25,3144
	315			-26,0105
LP4Cl	305	32,85266	198,5	-27,3063
	310			-28,2925
	315			-29,2787
LP4Me	305	-6,11748	62,0	-25,6241
	310			-25,9439
	315			-26,2637
LP4F	305	0,919187	90,2	-26,6077
	310			-27,0590
	315			-27,5102
LF	305	-35,9736	-35,2	-25,2470
	310			-25,0711
	315			-24,8953
LF4Me	305	-24,2272	-17,3	-29,4998
	310			-29,5862
	315			-29,6727
LF4Br	305	49,61869	24,3	-24,5071
	310			-25,7223
	315			-26,9375
LF4Cl	305	-4,39059	72,2	-26,4238
	310			-26,7850
	315			-27,1462

Para interação composto bioativo-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 à diminuição do nível de organização das moléculas de água que estão arranjadas ao redor do ligante. Já valores negativos para a variação de entalpia indicam a possível ocorrência de interação hidrofílica com provável formação de ligações de hidrogênio.

Para interações tipicamente hidrofóbicas, os valores de ΔS° e de ΔH° são positivos, sendo neste caso a espontaneidade da interação controlada unicamente pela entropia, apontando para interações predominantemente por forças de van der Waals [YUE et al. 2008 e LI et al. 2009].

Nos processos de interação compostos bioativos-proteína, valores de ΔS° positivos e de ΔH° negativos indicam que os processos de ligação ocorrem entropicamente com a diminuição da ordenação ao redor do triptofano como consequência da inserção de uma nova espécie na cavidade e ao mesmo tempo ocorrem fortes interações tipo ligação de hidrogênio composto bioativo-proteína [YUE et al. 2008 e LI et al. 2009].

Nos casos de interações espontâneas, onde os valores de ΔS° e de ΔH° são negativos, indicam que a ligação composto bioativo-proteína é principalmente comandada pela entalpia e a entropia é desfavorável para a ligação, apontando para interações por forças de van der Waals e formação de ligação hidrogênio em um meio dielétrico baixo [ROSS e SUBRAMANIAN 1981, YUE et al. 2008 e CHENG et al. 2009].

Além disso, interações eletrostáticas específicas entre espécies iônicas e soluções aquosas são caracterizadas por um valor de ΔS positivo e um pequeno valor de ΔH° negativo [YUE et al. 2008 e LI et al. 2009].

Os valores de ΔH° e ΔS° mostram que existe uma dependência da estrutura das naftoquinonas na interação com ASH. Em termos entálpicos, a eletronegatividade dos átomos de cloro e flúor em LP4Cl, LP4F e LF4Cl faz com que haja diminuição das possibilidades de interações mais fortes como interações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e dipolo-dipolo. O átomo de bromo em LF4Br causa, além da hidrofobicidade, efeito de impedimento estérico, por conta de seu elevado volume.

Em LP, as interações provavelmente hidrofóbicas por conta dos valores positivos de ΔH° e ΔS° mostram que houve desorganização do sistema (desarranjo das moléculas de água no interior do sítio de ligação) para ocorrência da interação LP-ASH. No caso de LP4Me, os valores negativos de ΔH° e positivo de ΔS° mostram a possibilidade de ocorrência de interações hidrofílicas entre LP4Me e ASH.

Os valores de ΔH° e ΔS° para LF e LF4Me, mostram que as interações são hidrofílicas, e a diferença entre ΔH° de LF e ΔH° de LF4Me é consequência da presença da metila que provoca um aumento da lipofilicidade, causando um certo efeito de impedimento estérico, justificando o valor de -27,7576 KJ/mol, contra -35,9736 KJ/mol de LF [YUE et al. 2008 e LI et al. 2009].

Os valores de ΔS° positivos evidenciaram que o tipo de interação entre as naftoquinonas e a ASH foi hidrofóbico, e os valores de ΔG° negativos ($\Delta G \cong -24$ a -29 kJ/mol) demonstraram a espontaneidade de ligação das naftoquinonas com a ASH (Tabela 9). Os valores de ΔS° e de ΔH° positivos, indicam que a interação entre ASH e as naftoquinonas foi hidrofóbica (Tabela 9). Não é possível contabilizar parâmetros termodinâmicos de compostos de coordenação α -naftoquinonas/ASH baseado, simplesmente, em um modelo de força intermolecular. A ligação entre naftoquinonas e ASH pode envolver uma interação fortemente hidrofóbica, evidenciada pelos valores positivos de ΔS° (grande contribuição de ΔS°), tendo pouca contribuição de ΔH° . Consequentemente, a principal interação é o contato hidrofóbico, mas a interação eletrostática também não pode ser excluída.

Nos casos em que os valores de ΔH° são negativos, existe forte indicação de que a interação entre ASH e naftoquinona (LP) tem maior caráter hidrofílico. Com isso, a interação LP-ASH exerce papel preponderantemente hidrofílico no microambiente ao redor do resíduo triptofano, e que interações específicas, tais como ligação de hidrogênio possam estar acontecendo [YUE et al. 2008 e LI et al. 2009].

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 16 [GAO et al. 2004, KANDAGAL et al. 2006, XIE et al. 2006, LI et al. 2007, SHI et al. 2007, QI et al. 2008, WANG et al. 2008, ZHANG et al. 2008, LI et al. 2009, CHENG et al. 2009, QING et al. 2009 e STAN et al. 2009]), como mostrados na Figura 36 para LP e no anexo para os demais compostos (Figuras 47, 62, 77, 93, 107, 122 e 137). De acordo com os resultados mostrados na Tabela 10, o número de sítios de ligação entre a ASH e as naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), é aproximadamente igual a 1. Isso indica que apenas uma interação molecular acontece entre as α - naftoquinonas estudadas e uma molécula de ASH, as quais são do tipo hidrofóbico para LP, LP4Cl, LP4F e LP4Me, e hidrofílicas para LF, LF4Me, LF4Br e LF4Cl.

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

Equação 15. 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 (naftoquinona); F_0 = intensidade de emissão de fluorescência na ausência do supressor (ASH pura); F = intensidade de emissão de fluorescência na presença do supressor (com naftoquinonas).

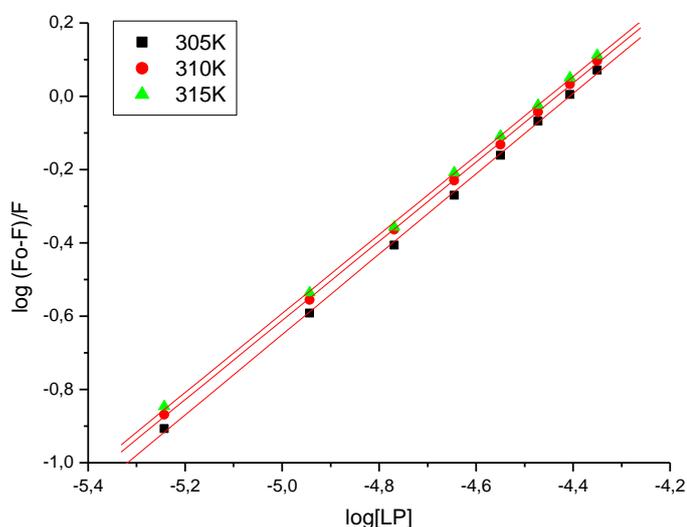


Figura 36. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{nm}$) pela naftoquinona (LP).

Os resultados encontrados para os valores de K_b e n mostraram (Tabela 10) novamente pouquíssima dependência da temperatura. Os valores de K_b e n indicam que o provável mecanismo de supressão de fluorescência de ASH pelas α - naftoquinonas é estático, pois não houve uma relação com o aumento da temperatura.

Tabela 10. Valores de número e ordem de ligação (n e K_b) obtidos a partir dos gráficos de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280\text{ nm}$) pelas naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl).

	T (K)	<i>n</i>	K_b
LP	305	1,09647	67945,39
	310	1,08005	61439,83
	315	1,07777	65510,07
LP4Cl	305	0,99697	44045,34
	310	0,94828	24258,28
	315	0,92823	19226,05
LP4Me	305	1,10756	107040,96
	310	1,09819	90354,54
	315	1,08261	73063,42
LP4F	305	1,0883	142301,67
	310	1,06207	99320,75
	315	1,04829	80123,52
LF	305	1,05074	41391,39
	310	1,07243	46189,15
	315	1,06817	38364,15
LF4Me	305	1,04083	211426,78
	310	0,99478	92078,87
	315	1,02362	121716,65
LF4Br	305	1,07596	57398,43
	310	1,01491	29390,70
	315	0,97981	20584,96
LF4Cl	305	1,07525	105370,73
	310	1,07802	106032,74
	315	1,07346	96008,57

4.3 Cálculo do raio de Förster

O cálculo da distância entre o resíduo de triptofano (doador de energia) e a molécula supressora (aceptor de energia) pode ser feito de acordo com a teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster [FÖRSTER 1948, YUE et al. 2008 e CHENG et al. 2009],

onde a eficiência de transferência de energia (E) tem relação com as distâncias R_0 e r entre doador e acceptor [YUE et al. 2008 e CHENG et al. 2009].

A transferência de energia envolvida na interação entre ASH e as naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) foi verificada fazendo a sobreposição dos espectros de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) nas temperaturas estudadas ($T = 305K, 310K$ e $315K$) com os espectros de absorção UV/visível das naftoquinonas, (Figuras 37-39, 49-51, 64-66, 79-81, 94-96, 109-111, 124-126 e 139-141). Os valores da integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASH) com o respectivo espectro de absorção do acceptor (naftoquinona) (J) foram calculados de acordo com a Equação 17 [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 figuras que ilustram as sobreposições dos espectros de emissão de fluorescência do doador (ASH) com os espectros respectivos de absorção do acceptor (naftoquinona) para uma concentração de ASH igual a da naftoquinona **LP** ($[ASH] = [naftoquinonas] = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L) são mostradas nas Figuras 37-39.

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

Equação 16. Equação para o cálculo da integral de sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência de ASH e os espectros de absorção UV/visível [SHI et al. 2007] das naftoquinonas.

Onde: J = integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASH) com o espectro de absorção do acceptor (naftoquinona); $F(\lambda)$ = intensidade de fluorescência do doador (ASH) em um comprimento de onda λ ; $\varepsilon(\lambda)$ = coeficiente de absorção molar, ou absorvidade molar do acceptor (naftoquinona) em um comprimento de onda λ [PACE et al. (1995)]; λ = comprimento de onda (λ em cm; $1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-7}$ cm; $1 \text{ cm} = 1 \times 10^7$ nm); $\Delta\lambda$ = variação de comprimento de onda.

A Equação 18 [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 usada para o cálculo dos valores de distância crítica entre doador (ASH) e acceptor (naftoquinona), quando a 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 (ASH) e a absorção do dipolo do acceptor (naftoquinona) (K^2) é o parâmetro menos correto. 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].

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

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

Equação 17. Equação para o cálculo da distância crítica entre a ASH e as naftoquinonas, 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 (ASH) e a absorção do dipolo do acceptor (naftoquinona) (doador e acceptor são livres para assumir qualquer orientação, $K^2 = 2/3$); N = índice de refração do meio; ϕ = rendimento quântico de fluorescência do doador (ASH); J = integral de sobreposição do espectro de emissão de fluorescência do doador (ASH) com o espectro de absorção do acceptor (naftoquinona); R_0 = distância crítica entre o doador (ASH) e o acceptor (naftoquinona), quando sua eficiência de transferência é 50%.

O cálculo dos valores de eficiência de transferência de energia (Teoria de Förster) entre doador (ASH) e acceptor (naftoquinona) (E) foi feito através da Equação 19 [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]. Por conta da relação entre J, E e R_0 , foi possível calcular os valores de distância (r) entre o triptofano do doador (ASH) e o acceptor (naftoquinona). Os valores de J, R_0 , E e r calculados estão apresentados na Tabela 5.

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

Equação 18. Equações para o cálculo da distância entre o triptofano da ASH e as naftoquinona [SKLAR et al. 1977 e YUE et al. 2008].

Onde: E = eficiência de transferência de energia (Teoria de Förster) entre doador (ASH) e acceptor (naftoquinona); F_0 = intensidade de emissão de fluorescência na ausência do supressor (só ASH); F = intensidade de emissão de fluorescência na presença do supressor (naftoquinonas); R_0 = distância crítica entre o doador (ASH) e o acceptor (naftoquinonas), quando sua eficiência de transferência é 50%; r = distância entre o triptofano do doador (ASH) e o acceptor (naftoquinona) ou distância de ligação entre doador (ASH) e acceptor (naftoquinona).

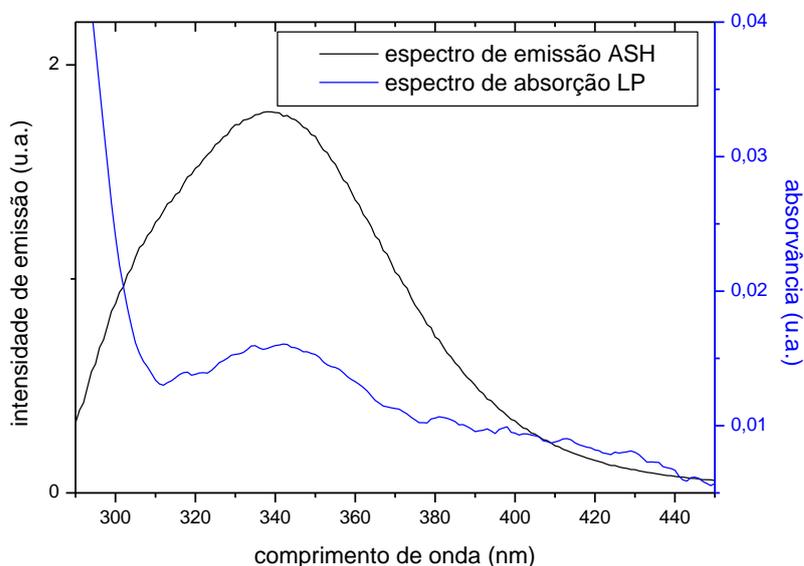


Figura 37. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da naftoquinona (LP). $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

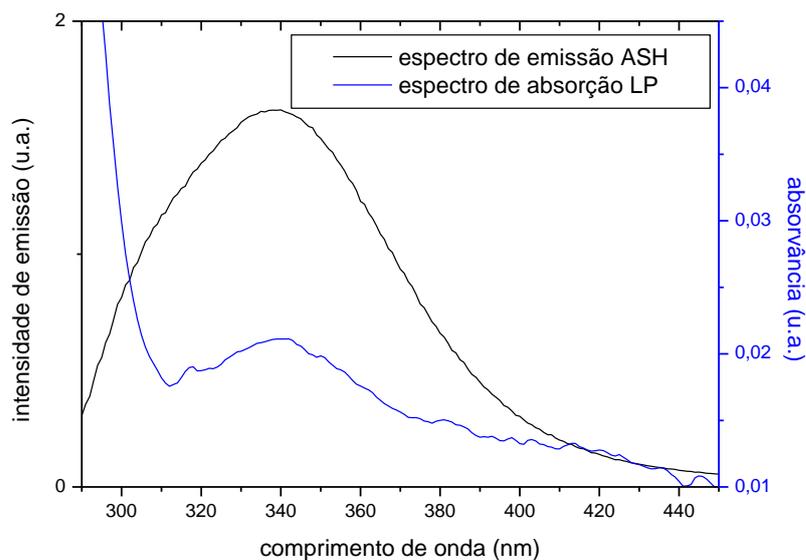


Figura 38. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da naftoquinona (LP). $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

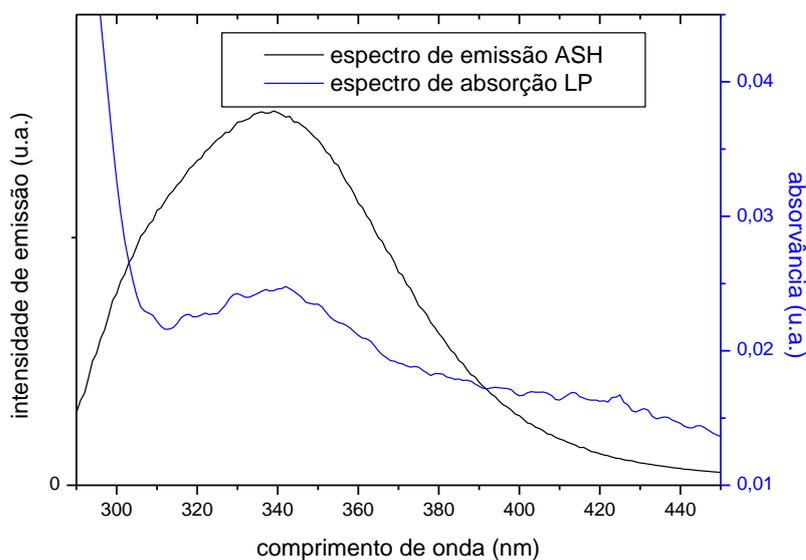


Figura 39. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da naftoquinona (LP). $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

Tabela 11. Valores de J , R_0 , E e r calculados para a sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência da ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K, 310 K e 315 K) e o espectro de absorção

UV-Vis das naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) $C_{ASH} = C_{LP} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

	T (K)	J (cm³.L/mol)	R₀ (nm)	E	r (nm)
LP	305	2,00316E-15	2,49	0,23287	3,03
	310	2,69389E-15	2,61	0,243198	3,15
	315	3,21291E-15	2,69	0,213403	3,34
LP4Cl	305	4,9676E-15	2,89	0,154783	3,84
	310	4,88125E-15	2,88	0,189723	3,67
	315	5,31802E-15	2,92	0,151397	3,72
LP4Me	305	2,03237E-15	2,49	0,223914	3,06
	310	1,03407E-14	3,27	0,282672	3,09
	315	3,19498E-15	2,69	0,257518	3,20
LP4F	305	1,47996E-15	2,36	0,2082	2,95
	310	1,85308E-15	2,45	0,22588	3,01
	315	2,33622E-15	2,55	0,261637	3,03
LF	305	1,64809E-15	2,41	0,122533	3,34
	310	2,58223E-15	2,59	0,169209	3,38
	315	3,5308E-15	2,73	0,181256	3,51
LF4Me	305	1,34672E-15	2,32	0,255212	2,78
	310	1,41851E-15	2,35	0,300897	2,70
	315	1,40963E-15	2,34	0,225921	2,88
LF4Br	305	1,91922E-15	2,47	0,203266	3,10
	310	2,46736E-15	2,57	0,239635	3,12
	315	3,26396E-15	2,70	0,225362	3,31
LF4Cl	305	3,74221E-16	1,87	0,091987	2,75
	310	4,66644E-16	1,95	0,11513	2,74
	315	5,98533E-16	2,03	0,11263	2,86

De acordo com as Equações 17-19, e para as condições de ASH ($K^2 = 2/3$, $N = 1,336$ e $\phi = 0,15$) [MILLER 1979 e CHENG et al. 2009], o valor da distância entre as naftoquinonas e o resíduo de triptofano ($r \cong 2$ a 3 nm, Tabela 11) foi menor que 7 nm ($r < 7$ nm) [HE et al. 2006 e YUE et al. 2008], para todos os casos de interação entre ASH e naftoquinonas. Isto é,

portanto, um indício da possibilidade de ocorrência do fenômeno de transferência de energia entre ASH e naftoquinonas, estando de acordo com a teoria de transferência de energia não-radiativa de Förster (Teoria de Förster) [YUE et al. 2008], por indicar que ocorreu realmente um processo de supressão estática na interação entre naftoquinonas e ASH. [LAKOWICZ 2006 e CHENG et al. 2009].

4.4 Dicroísmo circular (DC)

Espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para avaliar a mudança estrutural de ASH induzida pela adição das naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl). Os espectros de dicroísmo circular obtidos para ASH na presença das naftoquinonas LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl, em diferentes temperaturas ($T = 305 \text{ K}$, 310 K e 315 K), estão apresentados nas Figuras 40-42 para a naftoquinona (LP) e no anexo para os demais derivados (Figuras 52-54, 67-69, 82-84, 97-99, 112-114, 127-129 e 142-144). Foi observado que a adição de alíquotas das naftoquinonas à albumina sérica humana acarreta mudanças em sua elipticidade. Os espectros de DC de ASH com naftoquinonas (Figuras 40-42, 52-54, 67-69, 82-84, 97-99, 112-114, 127-129 e 142-144) exibiram dois sinais negativos (efeitos Cotton negativos) com máximo correspondente na região do ultravioleta (UV) a 208 nm e a 222 nm , que são característicos da 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 contribuem para a transição $n\pi^*$ da ligação da estrutura α -hélice da proteína [YANG e GAO 2002, HE et al. 2006, LI et al. 2007 e YUE et al. 2008]. Os espectros de dicroísmo circular para ASH livre e na presença de naftoquinonas possuem perfis semelhantes, com variações apenas nas intensidades, o que significa que a estrutura de ASH é constituída predominantemente por α -hélice [YUE et al. 2008]. A interação das α -naftoquinonas com a ASH resultou na diminuição de ambas as bandas (208nm e 222nm), sugerindo que ocorreram mudanças na estrutura secundária da proteína, sendo mais um indicativo da formação de complexos entre ASH e as naftoquinonas.

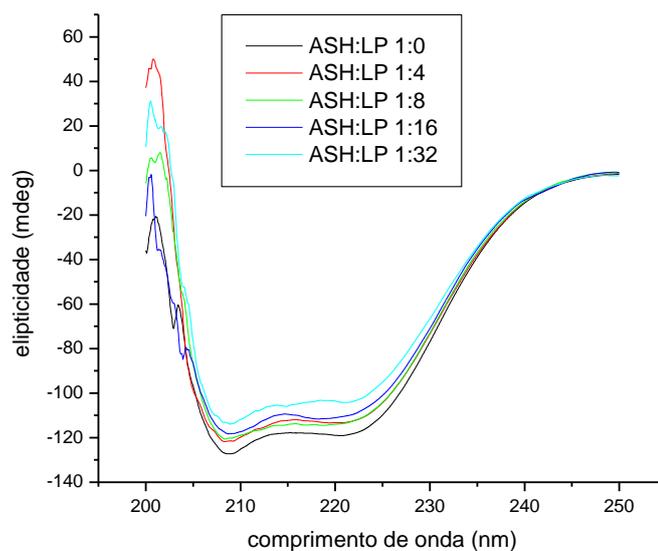


Figura 40. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em naftoquinona (LP), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K.

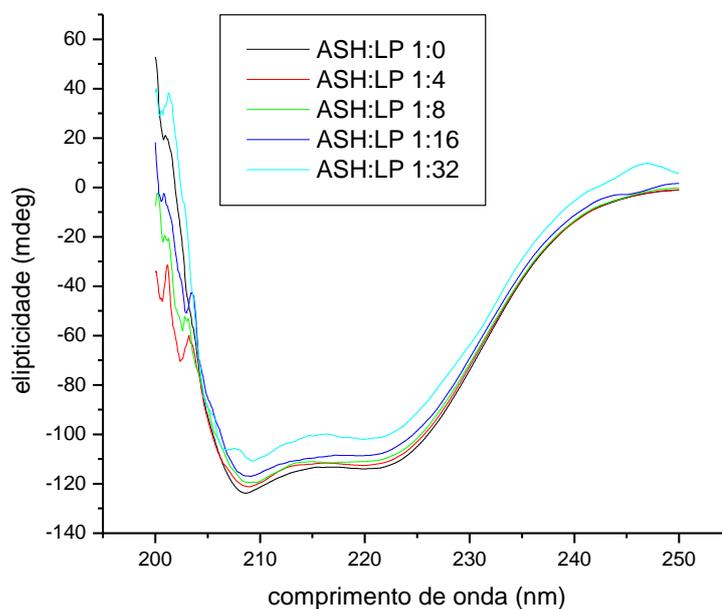


Figura 41. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em naftoquinona (LP), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K.

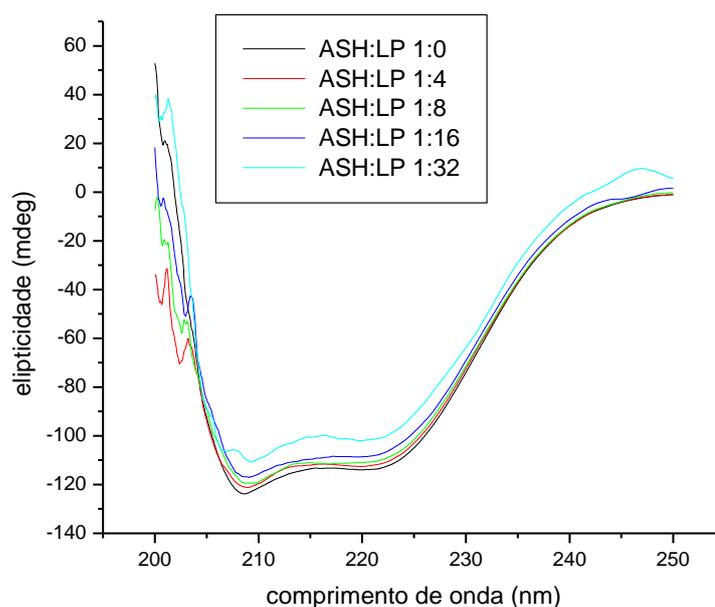


Figura 42. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) em α - naftoquinona (LP), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP} = 0$; 3,9;7,9; 15,70 e 31,00 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a T = 315 K.

A variação da temperatura não influenciou de maneira significativa em todos os casos, visto que as bandas negativas em 208 nm e 222 nm (características de transições $n\pi^*$ da estrutura secundária α -hélice de proteínas no ultravioleta) apresentaram o mesmo perfil nas temperaturas de 305K, 310K e 315K, para as ASH/naftoquinonas (Figuras 40-42, 52-54, 67-69, 82-84, 97-99, 112-114, 127-129 e 142-144). Com isso, é possível concluir que a temperatura tem pouca contribuição para essas mudanças espectrais, com o aumento das concentrações das naftoquinonas sendo o grande responsável por elas.

Através do uso das Equações 20 e 21 foi possível estimar o percentual de α -hélice para a estrutura secundária de ASH livre e na presença das naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) [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) nos comprimentos de onda de 208 nm e 222 nm foram utilizados para calcular a elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual (MRE). Especificamente para estes comprimentos de onda foram obtidos MRE_{208} e MRE_{222} (Equação 9 [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]). Os valores de MRE_{208} e MRE_{222} foram então utilizados na Equação 10 [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 cálculo dos valores de percentual de α -hélice na estrutura secundária da ASH (% α -hélice), (Tabela 12).

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

Equação 19. Equação para calcular os valores de MRE [KHAN et al. 2002].

Onde: MRE = elipticidade residual significativa ou elipticidade molar residual ($\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$); θ = elipticidade observada (mdeg); n = número de amino ácidos residuais ou resíduos de amino ácido (582 para ASH); l = comprimento ótico da cubeta (1 cm); C_p = concentração molar de ASH ($1,00 \times 10^{-6}$ mol/L).

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

Equação 20. Equações para calcular os valores de % de α -hélice da ASH.

Onde: MRE_{208} = elipticidade residual significativa em 208 nm ($\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$); MRE_{222} = elipticidade residual significativa em 222 nm ($\text{deg.cm}^2/\text{dmol}$); % α -hélice = percentual de α -hélice na estrutura da ASH

Tabela 12. % α -Hélice calculado a 208 nm e a 222 nm para ASH (pH = 7,4) contendo diferentes concentrações de naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH/LPs, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LPs} = 0; 4,04; 8,08; 16,20$ e $32,30$ ($\times 10^{-6}$) mol/L. T = 305 K, 310 K e 315 K.

	T (K)	% α -hélice					
		305		310		315	
		208	222	208	222	208	222
LP	1:0	60,919	59,229	59,221	54,880	60,059	57,143
	1:4	57,978	55,988	55,473	53,011	58,045	55,021
	1:8	57,183	55,989	61,976	58,508	57,459	54,160
	1:16	51,005	58,406	51,530	49,553	55,393	52,290
	1:32	47,560	50,998	51,683	47,925	54,187	50,388

LP4Cl	1:0	60,778	58,500	58,779	55,677	58,428	56,397
	1:4	57,591	56,627	55,212	53,370	58,210	55,069
	1:8	56,991	54,802	54,047	51,282	55,393	51,895
	1:16	53,654	51,047	49,403	46,327	53,807	51,570
	1:32	46,539	45,672	46,101	43,135	48,403	46,536
LP4Me	1:0	59,655	57,718	58,200	56,050	60,825	58,344
	1:4	58,330	56,376	57,756	54,549	58,867	55,927
	1:8	56,653	55,638	55,174	53,675	56,030	55,378
	1:16	54,724	54,753	53,965	52,659	56,994	54,329
	1:32	53,653	53,272	50,893	49,964	51,830	51,713
LP4F	1:0	60,222	58,197	57,914	55,290	60,745	58,216
	1:4	58,619	56,675	56,349	54,335	60,059	56,944
	1:8	58,398	54,766	55,160	54,115	56,218	54,462
	1:16	55,655	52,772	53,155	53,089	54,116	50,643
	1:32	51,265	49,308	48,231	49,115	52,403	49,254
LF	1:0	60,973	58,875	60,488	58,475	58,951	55,924
	1:4	60,745	57,830	59,716	56,585	58,328	55,321
	1:8	58,362	57,176	57,794	56,337	57,978	55,289
	1:16	57,903	56,179	56,135	55,586	55,207	54,220
	1:32	56,764	54,345	53,815	53,326	47,635	52,739
LF4Me	1:0	58,223	56,220	61,030	58,643	60,048	56,889
	1:4	57,182	55,346	60,701	57,278	58,295	55,810
	1:8	55,270	54,397	58,039	56,376	57,464	55,276
	1:16	53,125	52,946	60,273	54,752	56,552	54,464
	1:32	43,946	51,691	52,160	51,968	55,794	53,847
LF4Br	1:0	58,903	57,073	58,499	55,972	58,444	56,185
	1:4	57,298	54,911	56,237	54,064	57,179	54,457
	1:8	54,617	53,458	54,041	52,201	57,174	54,222
	1:16	48,938	51,653	52,849	49,900	54,884	52,052
	1:32	39,449	47,147	44,613	46,533	50,570	48,801
LF4Cl	1:0	58,784	56,331	61,048	57,437	59,978	57,536
	1:4	58,164	56,256	59,098	56,481	58,893	56,177
	1:8	57,898	55,659	58,663	56,292	58,448	56,110
	1:16	56,434	54,813	58,829	55,887	58,274	55,500
	1:32	55,591	54,072	55,734	54,255	58,025	55,035

A partir dos resultados mostrados na Tabela 12, nota-se uma diminuição do valor para % α -hélice da estrutura secundária da proteína (ASH), quando em presença das naftoquinonas

(razões molares de ASH:naftoquinonas de 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), quando comparados com os resultados na ASH livre (ASH:naftoquinonas em proporção 1:0), o que indica a formação de interação entre as naftoquinonas e os resíduos de aminoácidos da cadeia polipeptídica de ASH, havendo também diminuição da quantidade de ligações hidrogênio [KANG et al. 2004, SHAIKH et al. 2007, YUE et al. 2008 e CHENG et al. 2009]. Esta justificativa é coerente com as possíveis mudanças conformacionais obtidas pela observação dos espectros de emissão de fluorescência e com os valores dos parâmetros termodinâmicos. A avaliação por dicroísmo circular da interação entre a albumina sérica humana (ASH) e as naftoquinonas mostrou-se dependente da concentração de naftoquinona ministrada e muito pouco da temperatura. Assim, de maneira geral, a diminuição do percentual de α -hélice na estrutura da ASH é consequência direta do aumento de concentração das naftoquinonas.

5 CONCLUSÕES

Os resultados dos estudos espectroscópicos de absorção na região do ultravioleta/visível (UV-Vis) para a interação entre a albumina sérica humana (ASH) com as diversas α -2,3diidrofurano- e α -piranonaftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl) não forneceram informações conclusivas referentes à possível ocorrência de um complexo no estado fundamental, pois não foram verificadas grandes alterações nas regiões de máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}} = 280\text{nm}$) do sistema ASH/naftoquinonas.

Os resultados dos estudos por espectroscopia de emissão de fluorescência da interação entre ASH e as naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K, mostraram que ocorreu a supressão da banda de emissão de fluorescência da albumina (ASH) que apresenta um máximo de emissão a 340 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 280\text{ nm}$), indicando que a interação entre as naftoquinonas e a ASH deve envolver os resíduos de triptofano da proteína. O leve efeito hipsocrômico observado com o aumento da concentração das naftoquinonas, na banda de emissão da proteína (ASH), sugere que o cromóforo da proteína (ASH) está em um ambiente diferente daquele anterior à adição das naftoquinonas (ASH livre), sendo levado para um ambiente mais hidrofóbico para LP, LP4Cl, LP4F e LF4Br e mais hidrofílico para LP4Me, LP4F, LF e LF4Me. Os efeitos na polaridade do microambiente ao redor do resíduo de triptofano indicam uma provável formação do complexo ASH/naftoquinona.

As constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) ($K_{\text{SV}} \cong 10^4$ a 10^5 L/mol) indicam que o provável processo de supressão de ASH pela interação com as naftoquinonas é estático, com pouca contribuição do processo de supressão dinâmica, com a formação de pré-associação ASH/naftoquinonas antecedendo o processo de transferência de energia. Os altos valores encontrados para as constantes de velocidade de supressão de fluorescência (k_q) para a interação entre ASH e as naftoquinonas ($k_q \cong 10^{12}$ a 10^{13} L/mol.s), quando comparados com a constante de velocidade de difusão ($k_q \cong 5 \times 10^9$ L/mol.s, em água) também indicam o caráter estático desta supressão, o que foi confirmado por estudos da supressão da fluorescência de ASH empregando fluorescência resolvida no tempo.

Os valores de K_a obtidos a partir dos gráficos de Stern-Volmer modificados das naftoquinonas apresentaram valores ($K_a \cong 10^4$ a 10^5 L/mol), bem parecidos com os da literatura para outras moléculas ($K_a \cong 10^4$ a 10^5) indicando a ocorrência de interação forte ASH/naftoquinonas.

Os valores de ΔH° positivos, verificados em alguns casos, mostraram que o processo de ligação das naftoquinonas com a ASH foram preferencialmente hidrofóbicos, e os valores de ΔS° também positivos evidenciaram que o tipo de interação entre esse grupo de compostos (LP, LP4Cl, LP4F e LF4Br) e ASH é hidrofóbico. Os valores de ΔG° negativos demonstraram a espontaneidade de ligação das naftoquinonas com a ASH com o módulo do valor entre 24 e 29 KJ/mol (5,75 a 6,94 Kcal/mol) demonstrando que o processo de interação é reversível e que nesse caso a albumina sérica humana será um bom carreador para estes compostos.

Os valores de ΔH° negativos para as naftoquinonas (LP4Me, LF, LF4Me e LF4Cl) indicam que a interação nesse caso deve possuir um certo caráter hidrofílico, sugerindo ligações do tipo ligação de hidrogênio e/ou dipolo-dipolo. Por outro lado, considerando os valores positivos encontrados para o termo entrópico (ΔS°) é possível atribuir, como demonstrado no parâmetro entálpico, que não podemos descartar a possibilidade da contribuição hidrofóbica da interação ASH/naftoquinonas para essa classe de compostos.

O número de sítios de ligação (n) foi aproximadamente igual a 1 em todos os casos. Isso indica que existe somente uma interação molecular entre as lapachonas estudadas e a molécula de ASH. Os valores de K_b indicam uma forte interação entre o composto bioativo e ASH.

Os resultados obtidos para o processo de transferência de energia de Förster, com valores de $r \cong 2$ a 4 nm ($r < 7$ nm), sugerem uma alta probabilidade de ocorrer o fenômeno de transferência de energia entre ASH e naftoquinonas.

Os estudos por espectroscopia de dicroísmo circular para a interação entre ASH e as naftoquinonas (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br, LF4Cl), nas temperaturas de 305 K, 310 K e 315 K, mostraram que ocorreu uma diminuição da % de α -hélice da estrutura secundária da proteína (ASH), como consequência apenas do aumento da concentração das lapachonas e independente da variação da temperatura. Como Isto pode ser claramente evidenciado pela manutenção da forma dos espectros com variações somente nas intensidade das bandas negativas (208 e 222 nm), indicando a formação de um complexo entre ASH e as naftoquinonas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ATKINS, P.; PAULA, J De. Físico-Química, 7ª. Ed., LTC, 2004, 2.
- BANERJEE, A.; BASU, K.; SENGUPTA, P. K. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 2008, 90, 33.
- BARONI, S.; MATTU, M.; VANNINI, A.; CIPOLLONE, R.; AIME, S.; ASCENZI, P.; FASANO, M. Eur. J. Biochem. 2001, 268, 6214.
- S. BI, D. SONG, Y. TIAN, X. ZHOU, Z. LIU, H. ZHANG, Spectrochim. Acta A 61 2005 629.
- BHATTACHARYA, A. A; CURRY, S.; FRANKS, N. P. J. Biol. Chem. 2000, 275, 38731.
- BRIELMANN, H. L.; SETZER, W. N.; KAUFMAN, P. B.; KIRAKOSYAN, A.; CSEKE, L. J. Phytochem.: The Chem. Comp. of Plants. In: CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER, S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. Nat. Prod. from Plants. 2. Ed. N. Iorque, Taylor & Francis, 2006. cap. 1. p. 1.
- BUENO, C. J; JIMÉNEZ, M. C.; MIRANDA, M. A. J. Phys. Chem. B 2009, 113, 6891.
- BURNETT, A. R; THOMSON, R. H. Naturally occurring quinines. Part X. The quinonoid compounds of *Tabebuia avellaneda*(Bignoniaceae). J. of Chem. Soc. (C).[s.l.], 1967. p. 2100.
- 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.
- Z. CHI, R. LIU, Biomacromolecules 12, 2011, 203.
- CORDEIRO, Y. M. L. Bases estruturais e termodinâmicas para conversão conformacional da proteína do prion e possíveis implicações sobre a patogenia. Tese de Doutorado, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Fevereiro, 2005.
- CUI, F.; 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.; QIN, L. X., GUI-SHENG ZHANG, G. S.; YAO, X. J.; DU, J. Int. J. Biol. Macromol. 2008, 42, 221.
- F.-L. CUI, J. FAN, J.-P. LI, Z.-D. HU, Bioorg. Med. Chem. 2004, 12, 151.
- DE MOURA, K. C. G.; EMERY, F. S.; NEVES-PINTO, CL.; PINTO, M. C. F. R.; DANTAS, A. P.; SALOMAO, K.; DE CASTRO, S.L.; PINTO, A. V.. Trypanocidal activity of isolated naphthoquinones from *Tabebuia* and some heterocyclic derivatives: a review from an interdisciplinary study. Journal of the Brazilian Chemical Society[s.l.], 2001.v. 12, n. 3, 325.
- DOSE, K. Bioquímica. EPU/Springer, EDUSP, São Paulo, 1982.
- DUFOUR, C., e DANGLES, O. (2005). Flavonoid-serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1721, 164.
- 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.
- FONSECA, S. G. C.; BRAGA, R. M. C.; SANTANA, D. P.. Lapachol – química farmacologia e métodos de dosagem. *Revista Brasileira de Farmácia*. [s.l.], 2003, v. 84, n. 1, 9.
- FÖRSTER, T. Ann. Phys. 1948, 2, 55.

- FUJII, N.; YAMASHITA, Y.; MIZUKAMI, T.; NAKANO, H.. Correlation between the formation of cleavable complex with topoisomerase I and growth-inhibitory activity for saintopin-type antibiotics. *Molecular Pharmacology*. [s.l.], v. 51, p. 269-276. 1997.
- GAO, H.; LEI, L.; LIU, J.; KONG, Q.; CHEN, X.; HU, Z. J. *Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2004, 167, 213.
- GIBAJA, O. S. *Pigmentos Naturales Quinónicos*. Lima: UNMSM, Fondo Editorial, 1998. 277.
- Q.-L. GUO, R. LI, X. ZHOU, Y. LIU, *Chin. J. Chem.* 2008, 26, 2207.
- HARBORNE, J. B. 1994. *The flavonoids: Advances in research since 1986*. London: Chapman Hall, 620.
- HE, X. M.; CARTER, D. C. *Nature* 1992, 358, 209.
- 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.
- HECHT, E. *Optics*. 3rd Ed., Addison Wesley Longman, Massachusetts, 1998.
- HEPEL, M. *Electroanalysis* 2005, 17, 1401.
- HORROCKS JR., W. D. W.; COLLIER, W. E. J. *Am. Chem. Soc.* 1981, 103, 2856.
- HUSSAIN, H.; KROHN, K.; AHMAD, V. U.; MIANA, G. A., GREEN, I. R. *Lapachol: an overview*. *ARKIVOC*. [s.l.], 2007. v. ii, p. 145-171.
- JOHNSON, W. C. Jr. *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 1988, 17, 145.
- KANDAGAL, P. B.; ASHOKA, S.; SEETHARAMAPPA, J.; SHAIKH, S. M. T.; JADEGOUD, Y.; IJARE, O. B. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2006, 41, 393.
- KANDAGAL, P. B.; SEETHARAMAPPA, J.; ASHOKA, S.; SHAIKH, S. M. T.; MANJUNATHA, D. H. J. *Int. J. Biol. Macromol.* 2006, 39, 234.
- KANG, J.; LIU, Y.; XIE, M. X.; LI, S.; JIANG, M.; WANG, Y. D. *Biochim. Biophys. Acta* 2004, 1674, 205
- 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
- KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, 695.
- KRISHNAN, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanisms of cellular ADN topoisomerase II inhibition by the pyranonaphthoquinones derivatives α -lapachone and β -lapachone. *Cancer Chem. Pharm.* [s.l.], 2001. v. 47, 187.
- KRISHNAM, P.; BASTOW, K. F. Novel mechanisms of ADN topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives - eleutherin, α -lapachone and β lapachone. *Biochemical Pharmacology*. [s.l.], 2000. v. 60, p. 1367.
- KARREMAN, G.; STEELE, R. H.; GYÖRGYI, A. S. *Biochem.* 1967, 11, 140.
- LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, third ed., Springer, 2006, 278.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 2^a. Ed. Sarvier, São Paulo, 1993.
- LEMOES, T. G.; MONTE, F. J. Q.; SANTOS, A.K. L.; FONSECA, A. M.; SANTOS, H. S.; OLIVEIRA, M. F.; COSTA, S. M. O.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.. Quinones from plants of northeastern Brazil: structural diversity, chemical transformations, NMR data and biological activities. *Natural Product Research*. [s.l.], 2007. v. 21, n. 6, p. 529.
- LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B.. β -lapachone, a novel ADN topoisomerase I Inhibitor with a mode of action diferent from camptothecin. *The J. of Biol.Chem.*[s.l.], 1993, v. 268, n. 30, 22463.
- LI, Y.; Yao, X.; Jin, J.; Chen, X.; Hu, Z. *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1774, 51.

- 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, D.; Ji, B.; Sun, H. *Spectrochim. Acta Part A* 2009, 73, 35.
- LIU, J.; TIAN, J. N.; ZHANG, J.; HU, Z.; CHEN, X. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 376, 864.
- MACHADO, T.B.; PINTO, A.V.; PINTO, M.C.F.R.; LEAL, I.C.R.; SILVA, M.G.; AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M. A.; SANTOS, K.R.N. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2003, 279, 84.
- MAHESHA, H. G.; SINGH, S. A.; SRINIVASAN, N.; RAO, A. G. A. *FEBS J.* 2006, 273, 451.
- 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.
- MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V. S.. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*. [s.l.], 2001. v. 24, n. 1, 105.
- MONTI, S.; MANET, I.; MANOLI, F.; OTTANI, S.; MARCONI, G. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2009, 8, 805.
- MUROV, S. L.; CARMICHAEL, I.; HUG, G. L.; *Handbook of Photochemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc.: New York, 1993.
- P.N. NAIK, S.A. CHIMATADAR, S.T. NANDIBEWOR, J. *Photochem. Photobiol. B* 100 (2010) 147.
- OBBERG, 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.
- PATAI, S. *The Chemistry of Quinonoid Compounds*. v. 1. N. Iorque. Wiley, 1974.
- PATAI, S.; RAPPOPORT, Z. *The Chemistry of Quinonoid Compounds*. v. 2. N. Iorque. Wiley, 1988.
- PATERNÒ, E. *Ricerche sull'acido lapacico*. *Gazzeta Chimica Italiana*. [s.l.], 1882, v. 12, p. 337.
- PETERS, T. *All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA, 1996.
- PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A.; TWINE, S.; EAST, M.; CURRY, S. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 22804.
- PHILLIPSON, J. D.. *Phytochemistry and medicinal plants*. *Phytochemistry*. [s.l.], 2001, v. 56, n. 3, p. 237.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.. *Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas*. *Química Nova*. [s.l.], 2002. v. 25, n. Supl. 1, 45.
- 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.
- ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. *Biochem.* 1981, 20, 3096.
- SHAIKH, S. M. T.; SEETHARAMAPPA, J.; KANDAL, P. B.; MANJUNATHA, D. H.; ASHOKA, S. *Dyes Pigments* 2007, 74, 665.
- SHAW, A. K.; PAL, S. K. *J. Photochem. Photobiol B: Biol.* 2008, 90, 69.
- SHEN, X. C.; LIANG, H.; GUO, J. H. *J. Inorg. Biochem.* 2003, 95.
- SHI, X. Y.; CAO, H.; REN, F. L.; XU, M. *Chem. Biodiver.* 2007, 4, 2780.

- SILVA, A. M. da, - Síntese de novos naftoimidazóis derivados de B lapachona e compostos relacionados, empregando irradiação na região de microondas e reagentes suportados, e outras sínteses .2009. 2v. : il.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. 5ª. Ed., Editora Guanabara Koogan, 1994.
- T.S. SINGH, S. MITRA, Spectrochim. Acta A 2011, 78, 942.
- SKLAR, L. A.; HUDSON, B. S.; SIMONI, R. D.; Biochemistry-US 1977, 16, 5100)
- STAN, D.; MATEI, I.; MIHAILESEU, C; SAVIN, M.; MATACHE, M; HILLEBRAND, M.; BACIU, I. Mol. 2009, 14, 1614
- 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.
- 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.; 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.
- TANG, J.; LUAN, F.; CHEN, X. Bioorg. Med. Chem. 2006, 14, 3210.
- TORSELL, K. B. G.. Natural Product Chemistry. N. Iorque. Wiley, 1983.E.U.A.
- VALEUR B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. 2001Wiley-VCH Verlag GmbH ISBNs: 3-527-29919-X (Hardcover); 3-527-60024-8 (Electronic)
- 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.
- VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. Química Nova. [s.l], 2006. v. 29, n. 2, 326.
- WANG, N.; YE, L.; ZHAO, B. Q.; YU, J. X. BRAZ. J. Med. Biol. Res. 2008, 41, 589.
- WEI, Y. L.; LI, J. P; DONG, C.; SHUANG, S. M.; LIU, D. S.; HUIE, C. W. Talanta 2006, 70, 377.
- WILTING, J.; VAN DER GIESEN, W. F.; JANSSEN, L. H. M.; WEIDEMAN, M. M.; OTAGIRI, M.; PERRIN, J. H. J. Biol. Chem. 1980, 255, 3032.
- WOODY, R.W. Meth. Enzymol. 1995, 246, 34.
- WU, Y. H.; JI, X. B.; HU, S. H. Bioelectrochem. 2004, 64, 91.
- XIE, M. X.; XU, X. Y.; WANG, Y. D. Biochim. Biophys. Acta 2005, 1724, 215.
- XIE, M. X.; LONG, M.; LIU, Y.; QIN, C.; WANG, Y. D. Biochim. Biophys. Acta 2006, 1760, 1184.
- 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.
- 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.
ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 447.
www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf. Acesso em: 02/02/2014
www2.iq.usp.br/docente/mhgdmede/aulas.../aminoacidos2009.pdf. Acesso em: 07/02/2014
www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf. Acessado em: 09/02/2014.
www.rain-tree.com/paudarco.htm. Acessado em: 13/02/2014.
www.rain-tree.com/pau-d-arco-traditional-uses.pdf. Acessado em: 13/02/2014.
Adaptada de <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo0.htm>. Acessado em: 09/02/2014.
www.ioc.fiocruz.br/peptideos2008/pdf/dicroismo_circular.pdf. Acessado em: 09/02/2014.
Adaptada de <http://www.enzim.hu/~szia/cddemo/edemo0.htm>. Acessado em: 09/02/2014.
www.rain-tree.com/paudarco.htm acessado em: 19/01/2014
www.click4biology.info/c4b/7/pro7.5.htm acessado em 15/01/2014

7 ANEXO

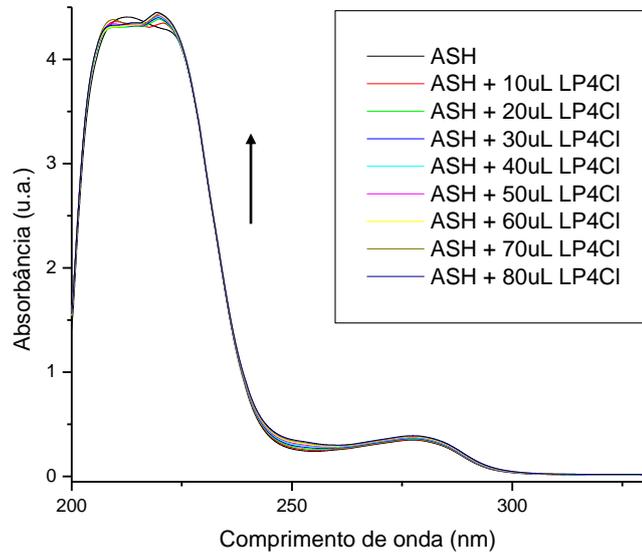


Figura 43. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4), 305 K, contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4CI), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4CI} = 0; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); e $1,12$ ($\times 10^{-5}$) mol/L.

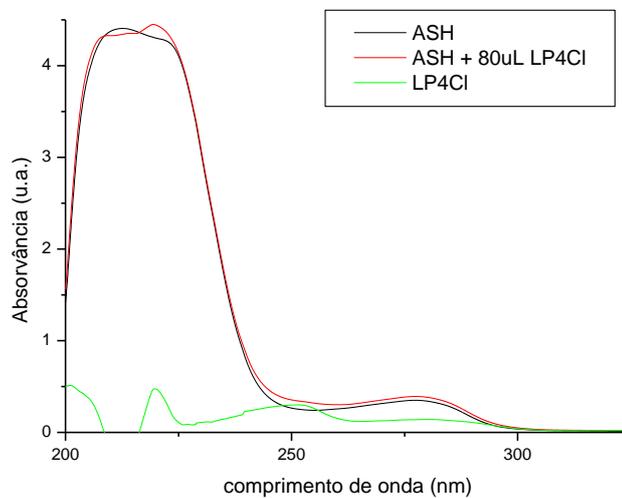


Figura 44. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -pirano naftoquinona (LP4CI) e α -pirano naftoquinona (LP4CI) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4CI). Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4CI} = 1,12 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K.

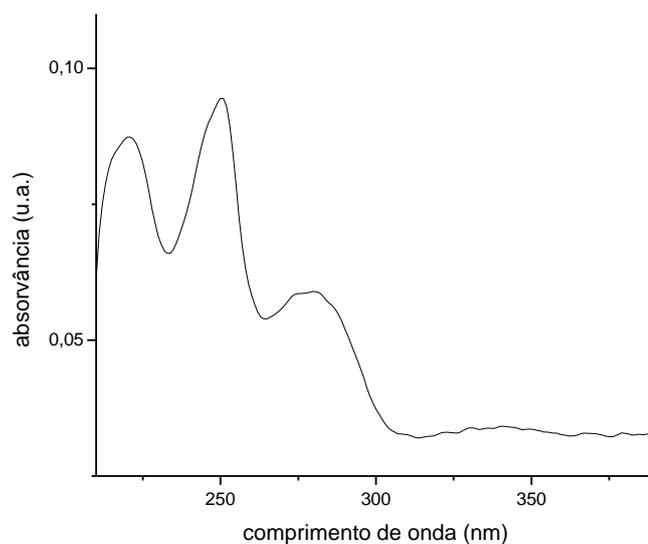


Figura 45. Espectro de absorção UV-Vis da α -pirano naftoquinona (LP4Me) em solução de PBS. $C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

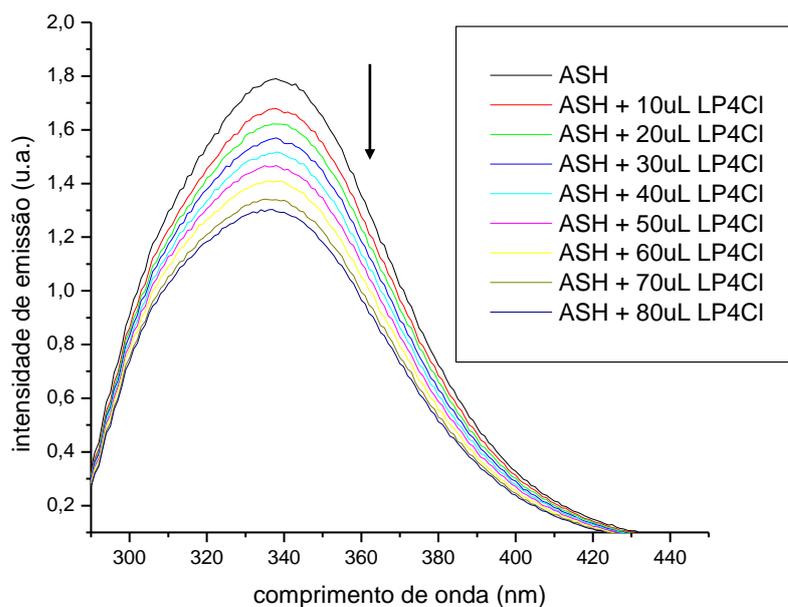


Figura 46. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS ($pH = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); e $1,12$ ($\times 10^{-5}$) mol/L., a $T = 310$ K.

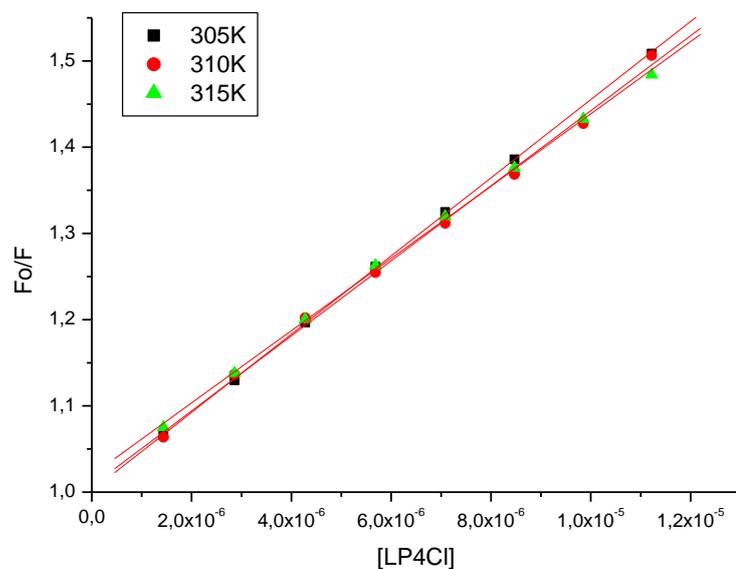


Figura 47. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Cl).

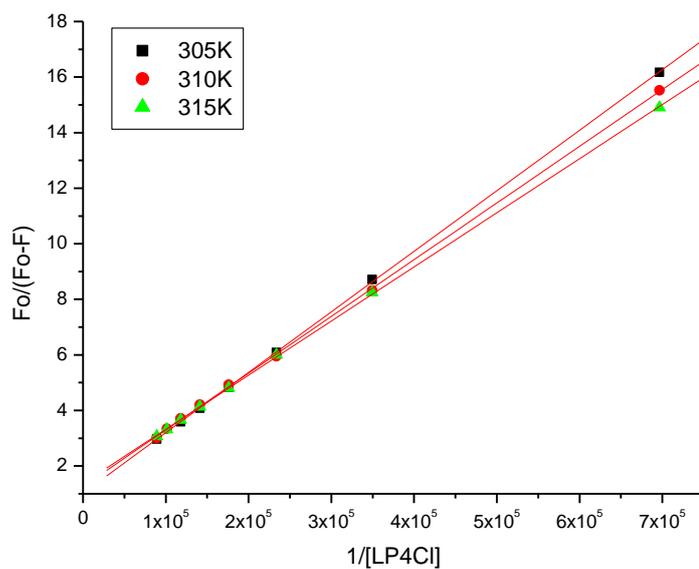


Figura 48. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{\text{exc}} = 280$ nm) pela de α -pirano naftoquinona (LP4Cl).

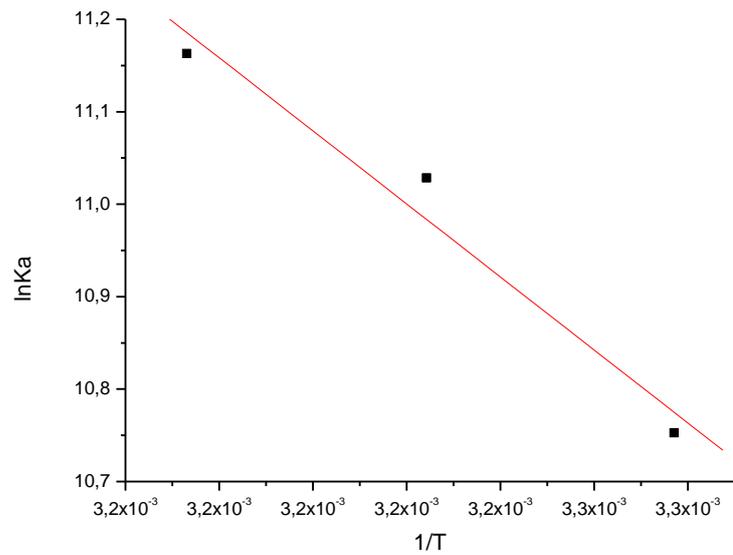


Figura 49. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4CI).

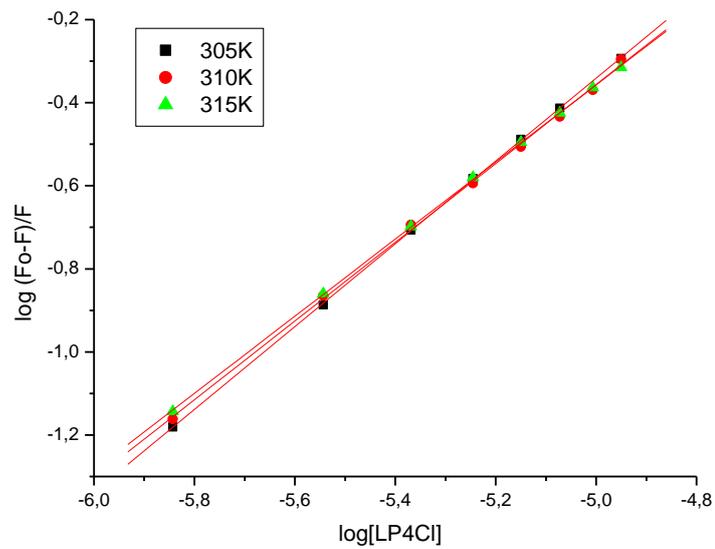


Figura 50. Gráfico de $\text{Log}(F_0-F)/F$ versus $\text{log}[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4CI).

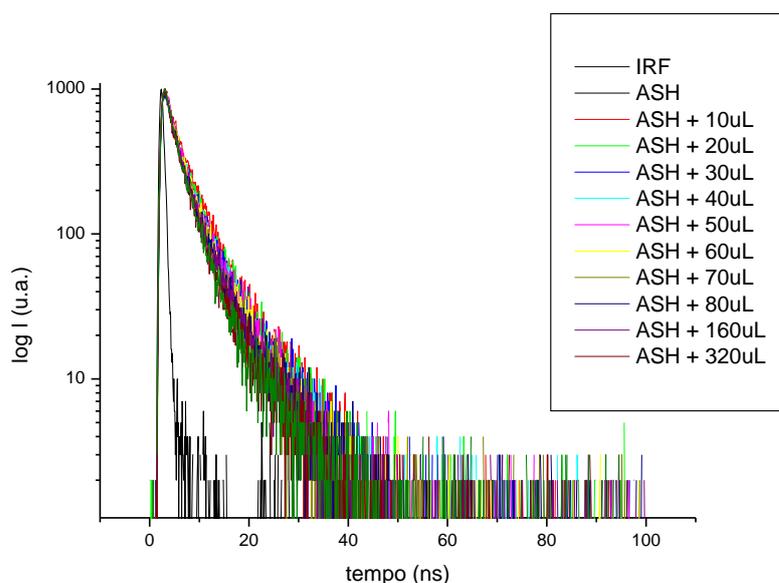


Figura 51 Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LP4Cl} = 0; 1,44; 2,86; 4,28; 5,68; 7,08; 8,47; 9,85 (\times 10^{-6} \text{ mol/L});$ e $1,12 (\times 10^{-5} \text{ mol/L})$. a $T = 298 \text{ K}$.

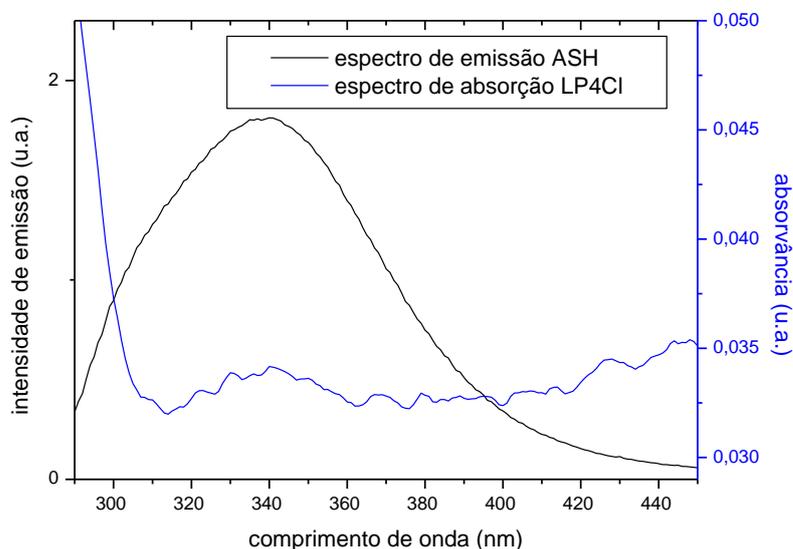


Figura 52. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ e $T = 305 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV α -pirano naftoquinona (LP4Cl). $C_{ASH} = C_{LP4Cl} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

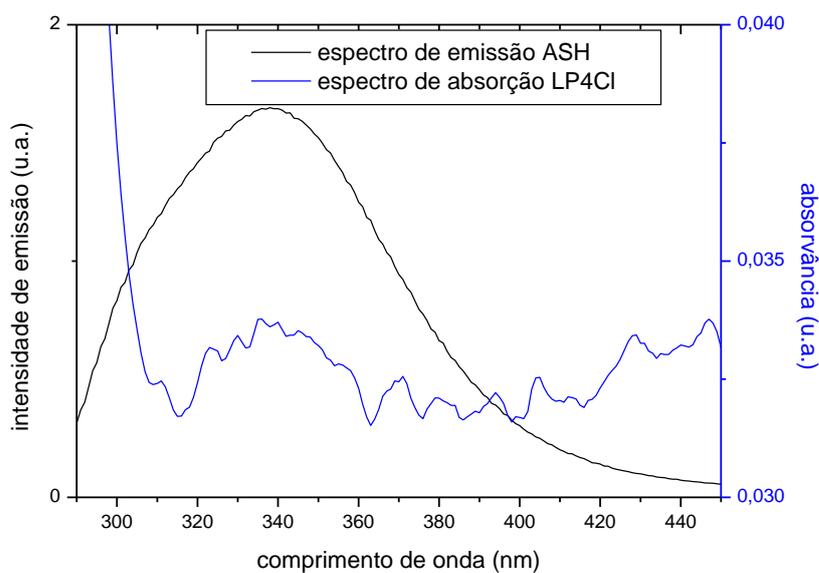


Figura 53. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Cl). $C_{ASH} = C_{LP4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

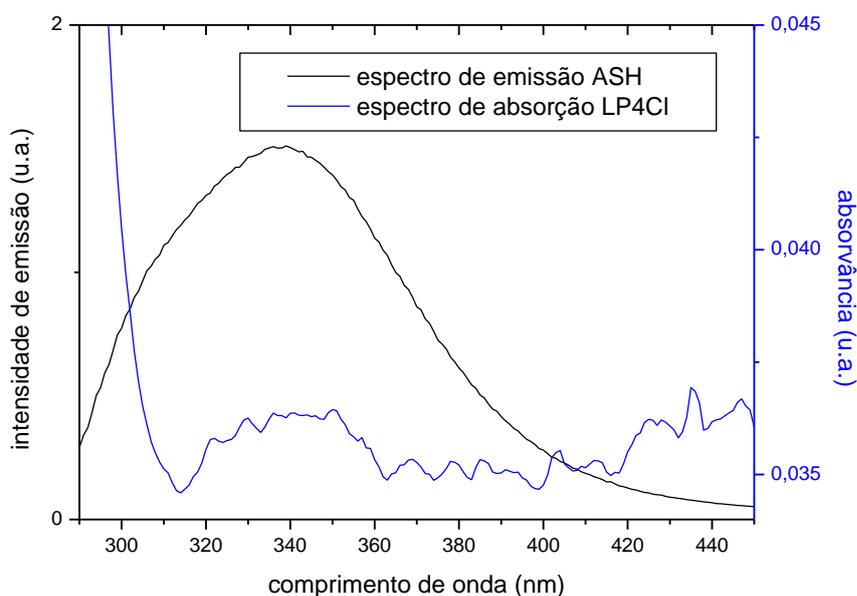


Figura 54 Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Cl). $C_{ASH} = C_{LP4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

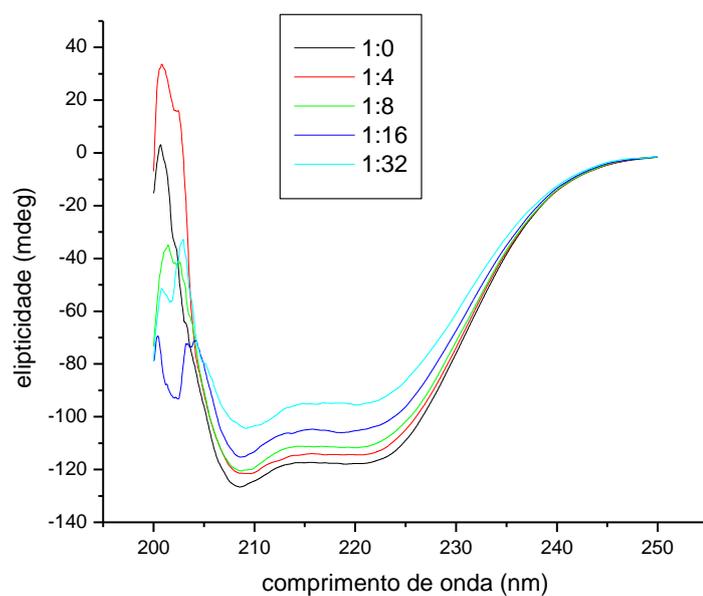


Figura 55. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K.

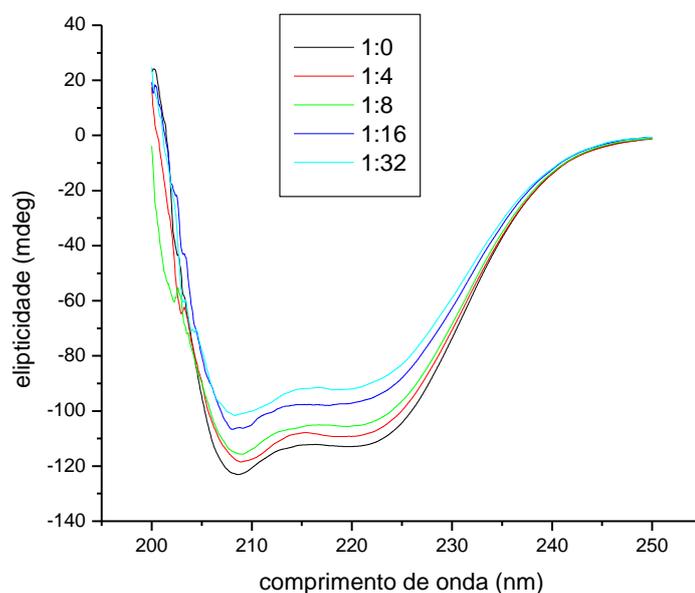


Figura 56. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K.

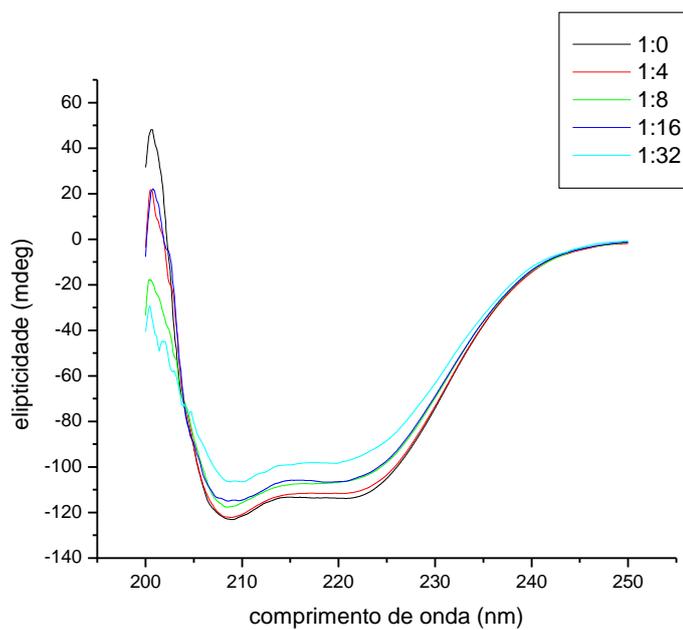


Figura 57 Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

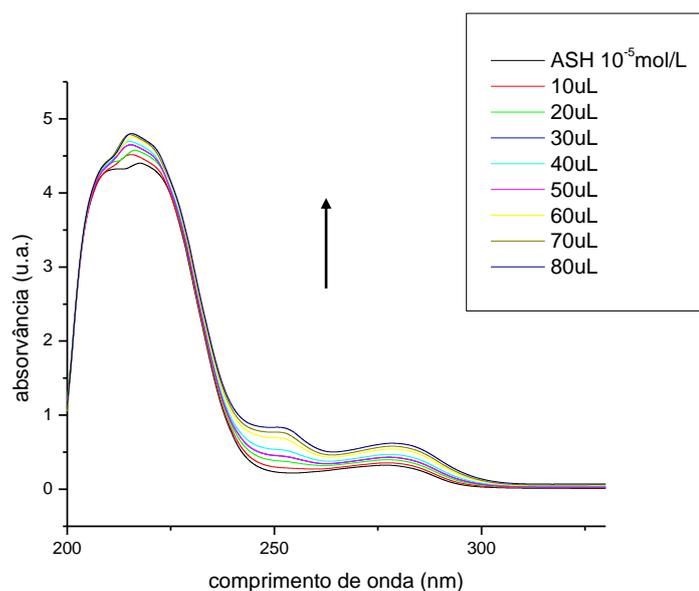


Figura 58. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e 5,3 ($\times 10^{-5}$) mol/L.

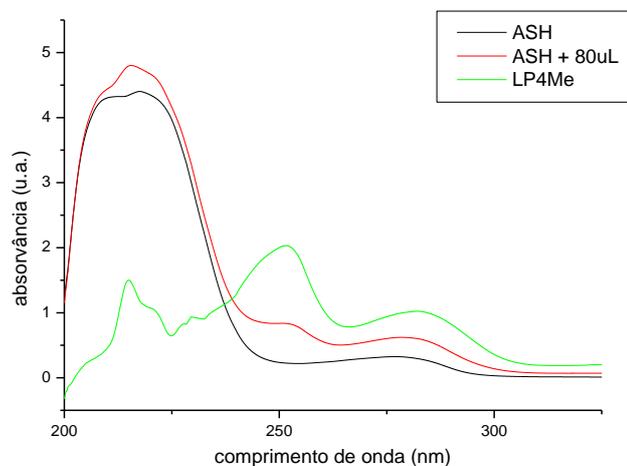


Figura 59. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de solução de α -pirano naftoquinona (LP4Me) e α -pirano naftoquinona (LP4Me) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 5,3 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K.

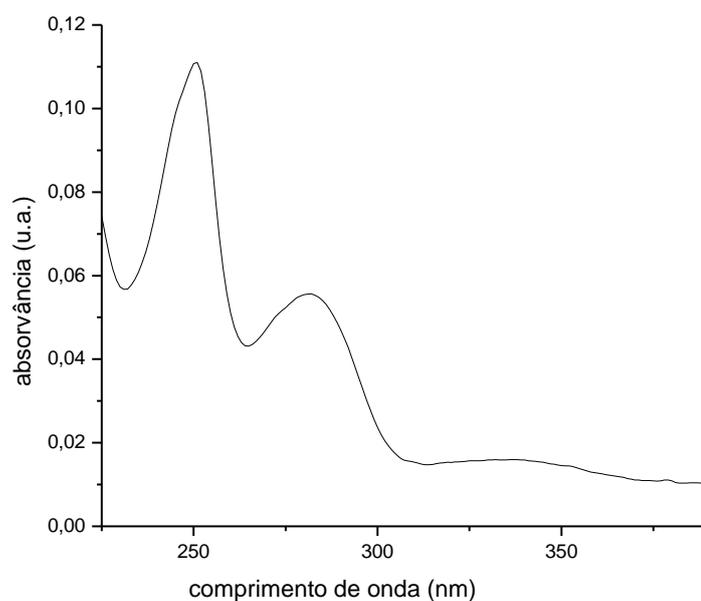


Figura 60. Espectro de absorção UV-Vis da α -pirano naftoquinona (LP4Me) em solução de PBS. $C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

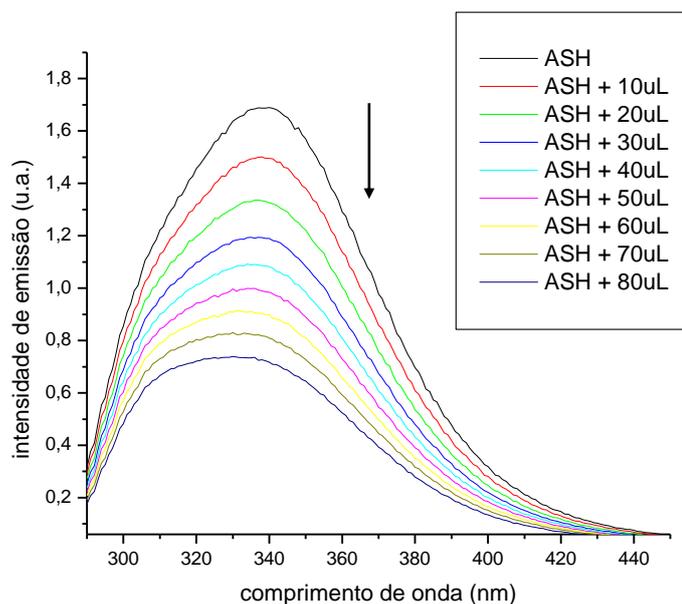


Figura 61. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e 5,3 ($\times 10^{-5}$) mol/L, a $T = 310$ K.

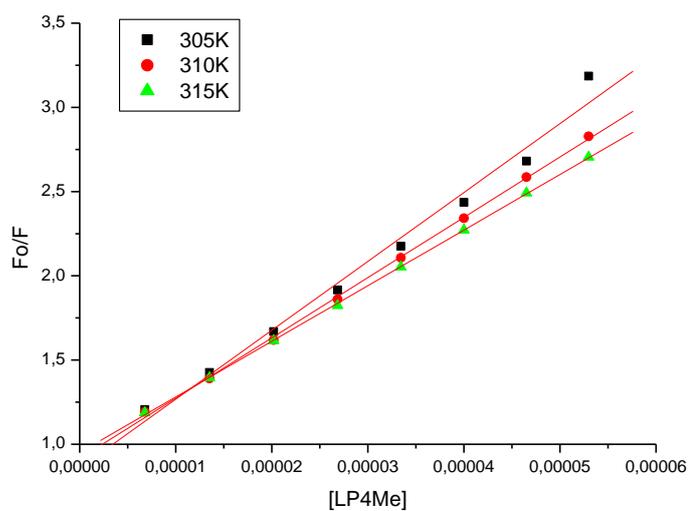


Figura 62. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me).

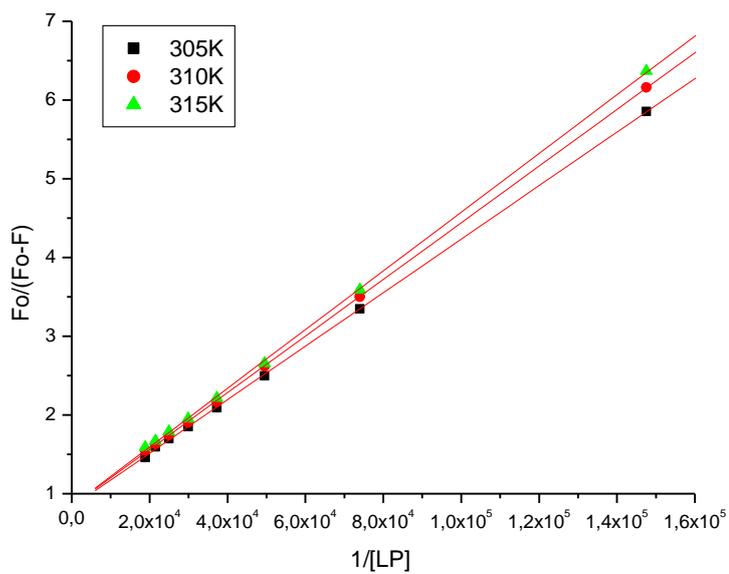


Figura 63. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me).

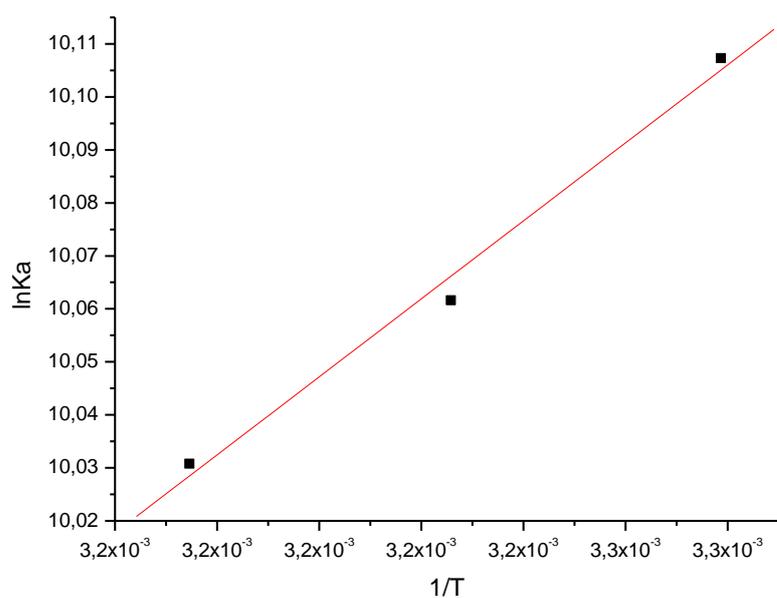


Figura 64 Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me).

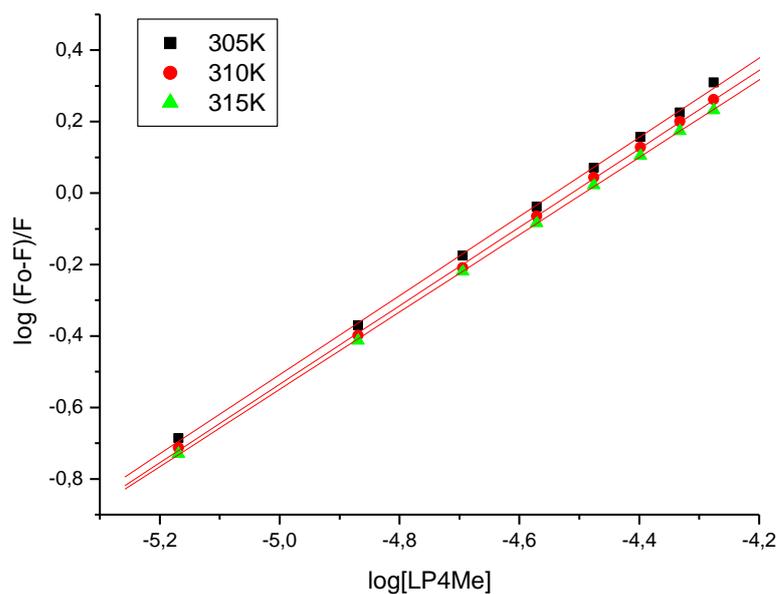


Figura 65. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4Me).

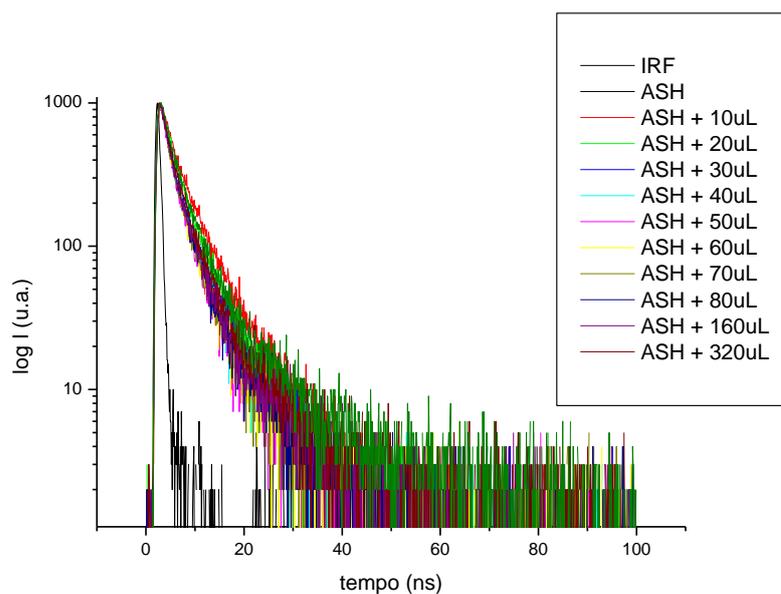


Figura 66. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS ($\text{pH} = 7,4$) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6} \text{ mol/L}; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65$ e $5,3(x10^{-5} \text{ mol/L})$ a $T = 298 \text{ K}$

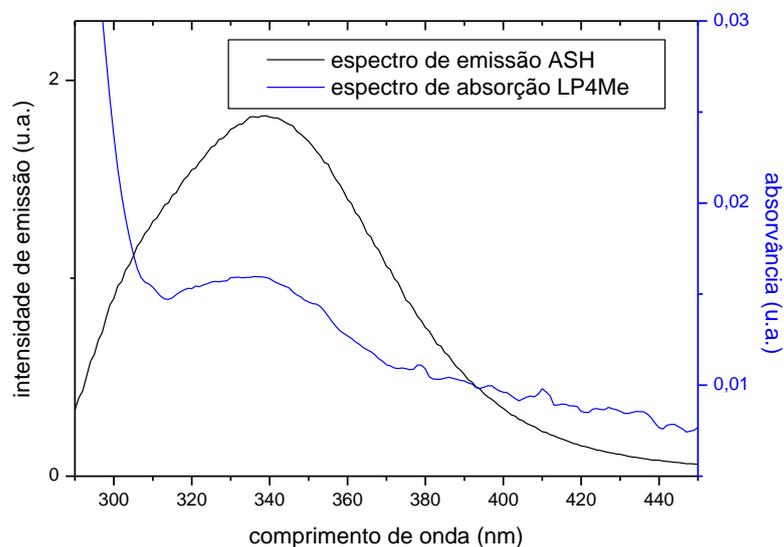


Figura 67. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$ e $T = 305 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV α -pirano naftoquinona (LP4Me). $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

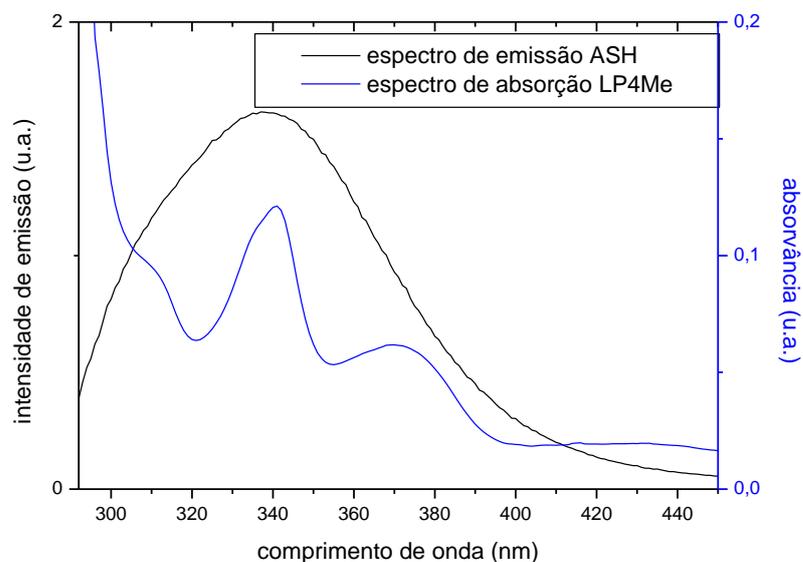


Figura 68. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Me). $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

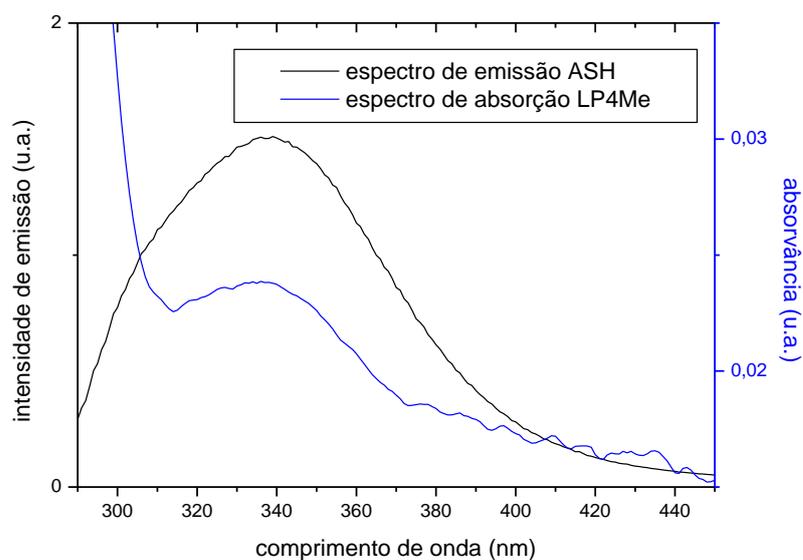


Figura 69. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4Me). $C_{ASH} = C_{LP4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

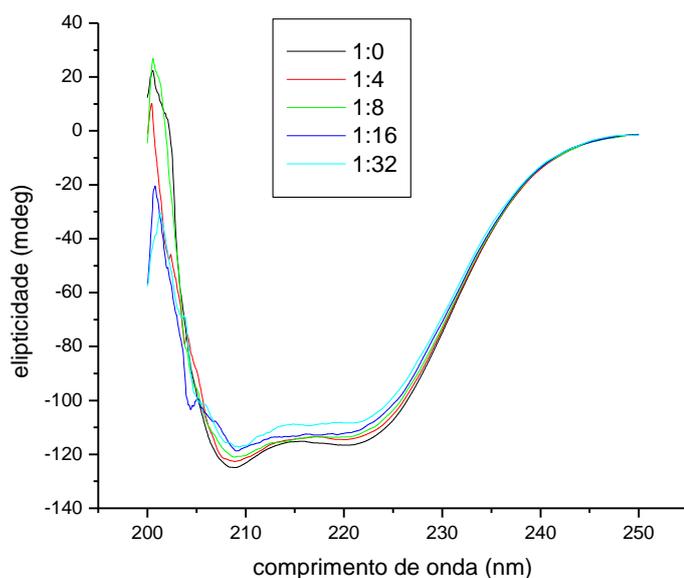


Figura 70. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K.

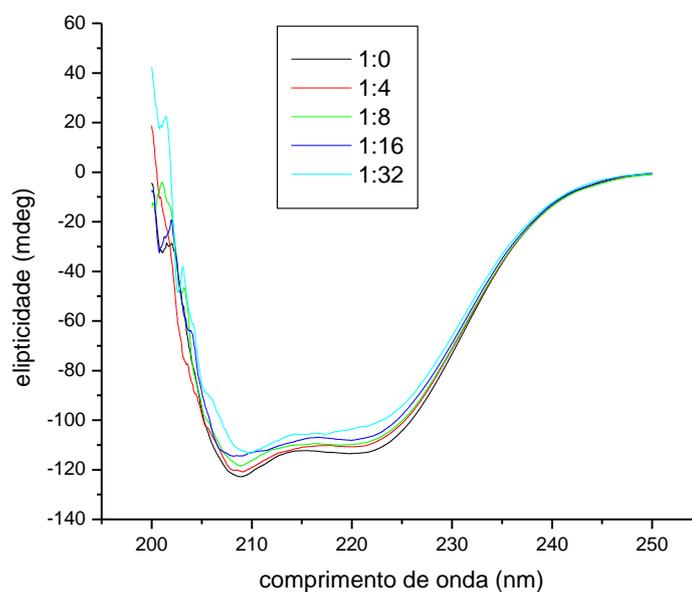


Figura 71 . Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L $C_{LP4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K.

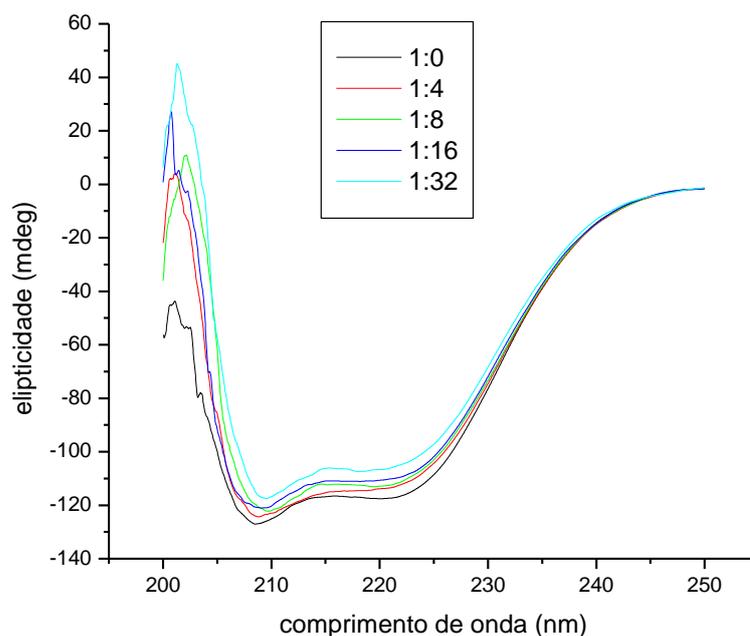


Figura 72. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH: LP4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K.

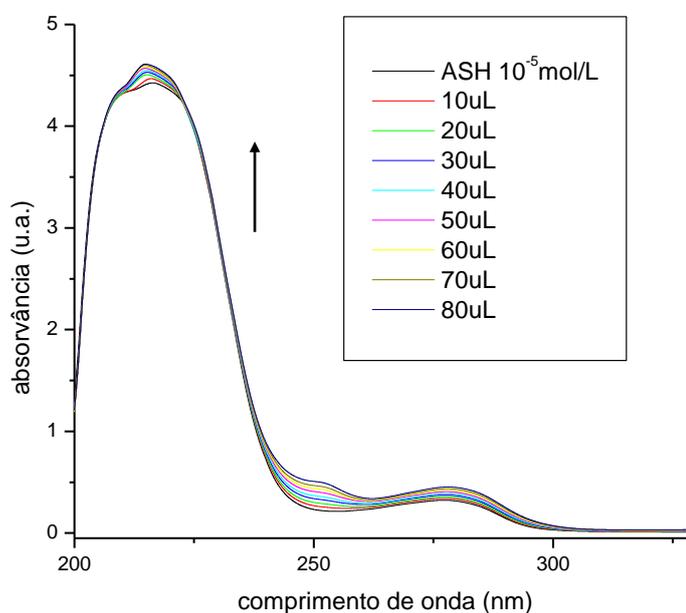


Figura 73. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 2,48; 4,94; 7,39; 9,82 (x10^{-6})$ mol/L); $1,22; 1,46; 1,7; 1,94 (x10^{-5})$ mol/L).

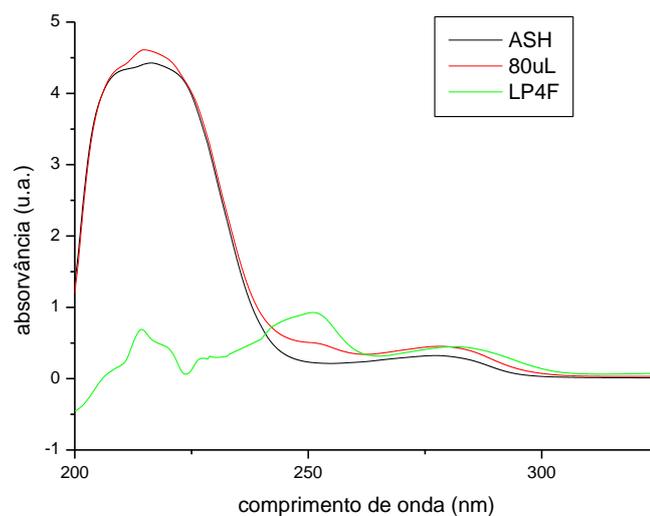


Figura 74. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -pirano naftoquinona (LP4F) e α -pirano naftoquinona (LP4F). como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 1,94 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K.

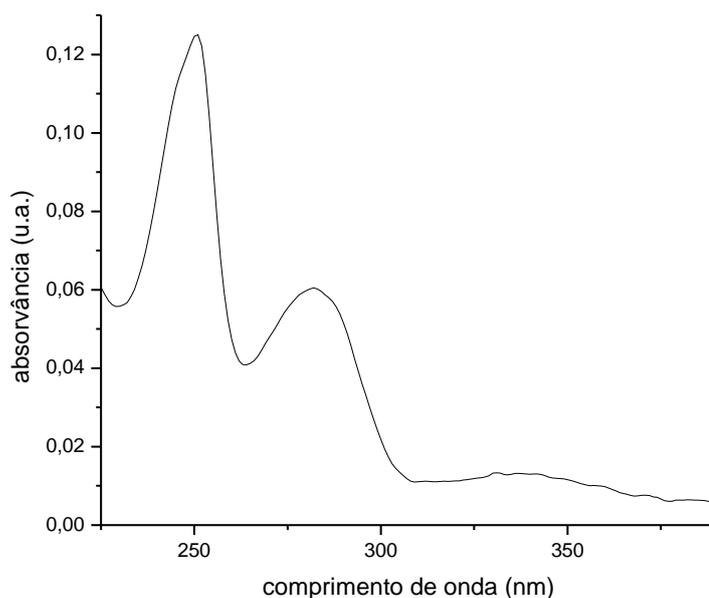


Figura 75. Espectro de absorção UV-Vis da α -pirano naftoquinona (LP4F) em solução de PBS. $C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

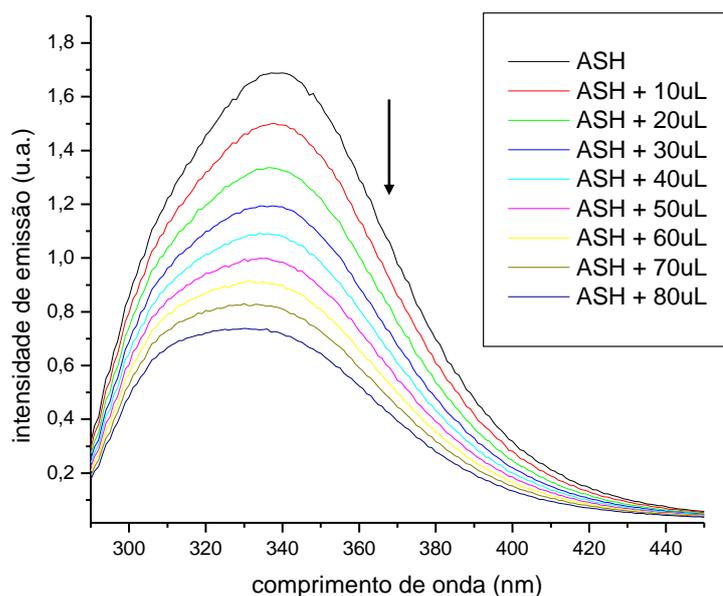


Figura 76. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 2,48; 4,94; 7,39; 9,82$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); 1,22; 1,46; 1,7; 1,94 ($\times 10^{-5}$ mol/L), a $T = 310$ K.

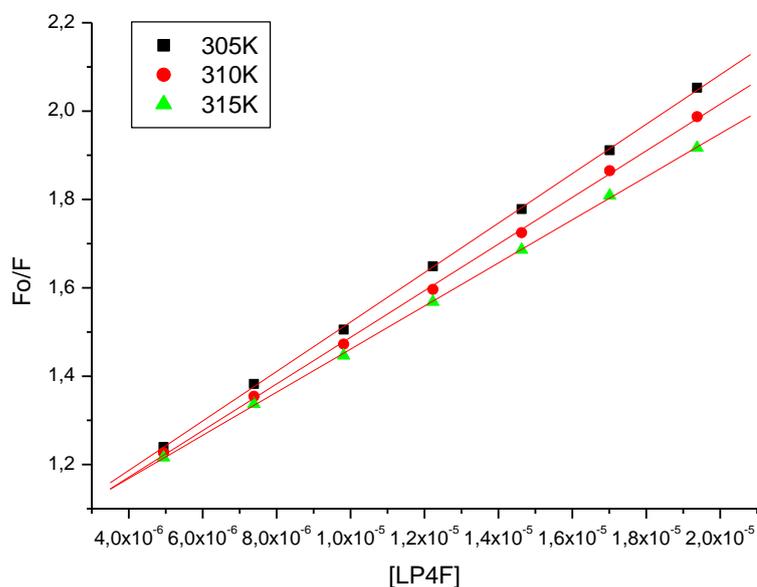


Figura 77. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4F).

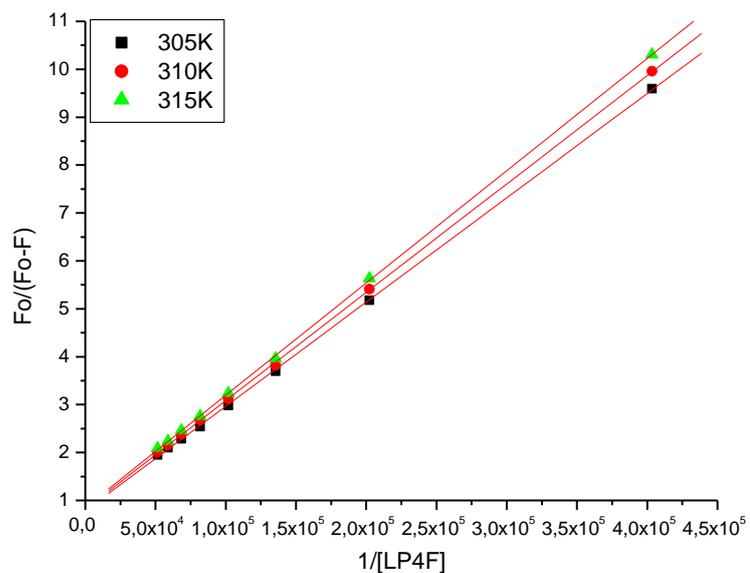


Figura 78. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela α -pirano naftoquinona (LP4F).

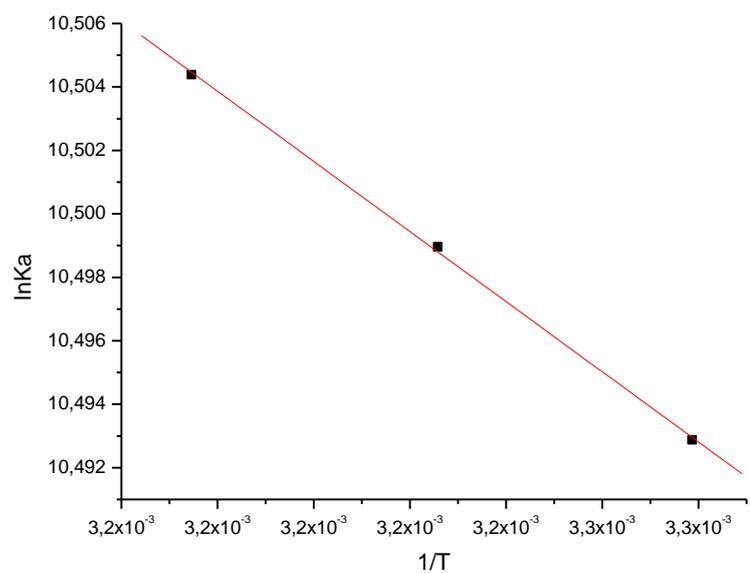


Figura 79. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela α -pirano naftoquinona (LP4F).

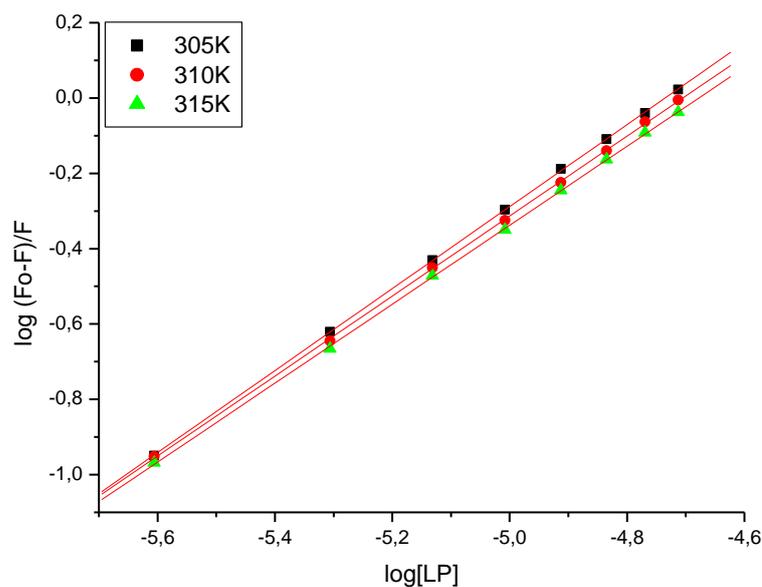


Figura 80. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -pirano naftoquinona (LP4F).

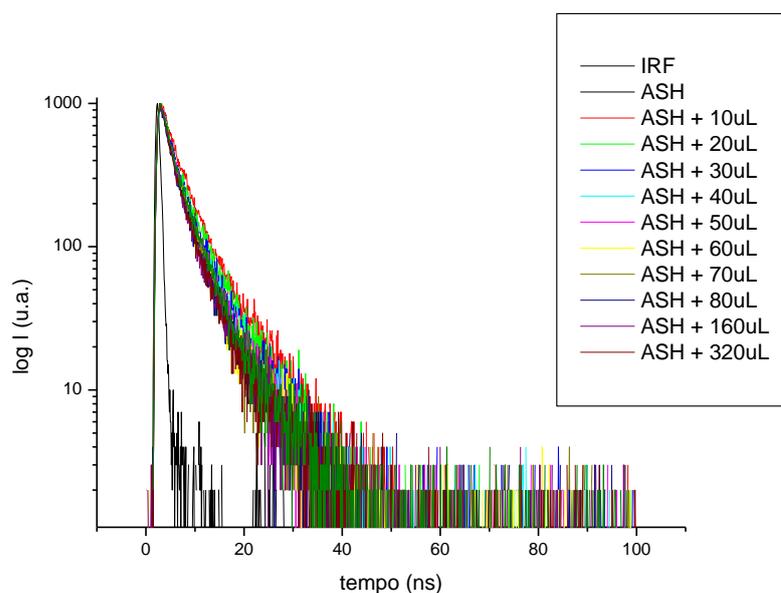


Figura 81. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 2,48; 4,94; 7,39; 9,82$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); 1,22; 1,46; 1,7; 1,94 ($\times 10^{-5}$ mol/L) a T = 298 K

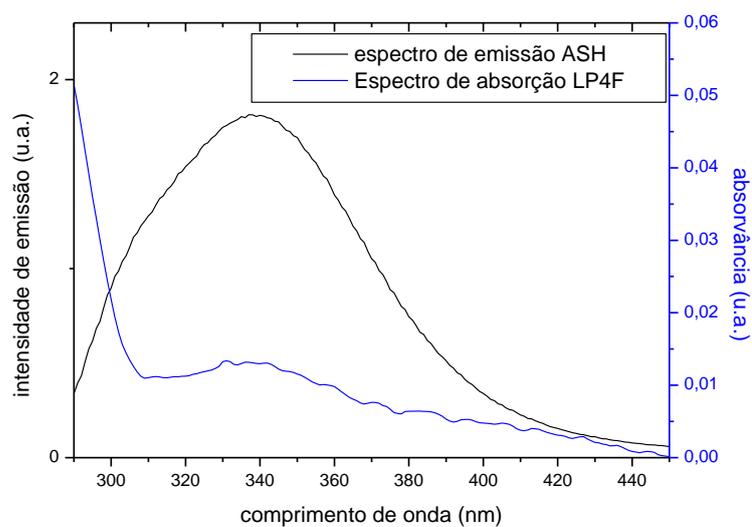


Figura 82. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4F) $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

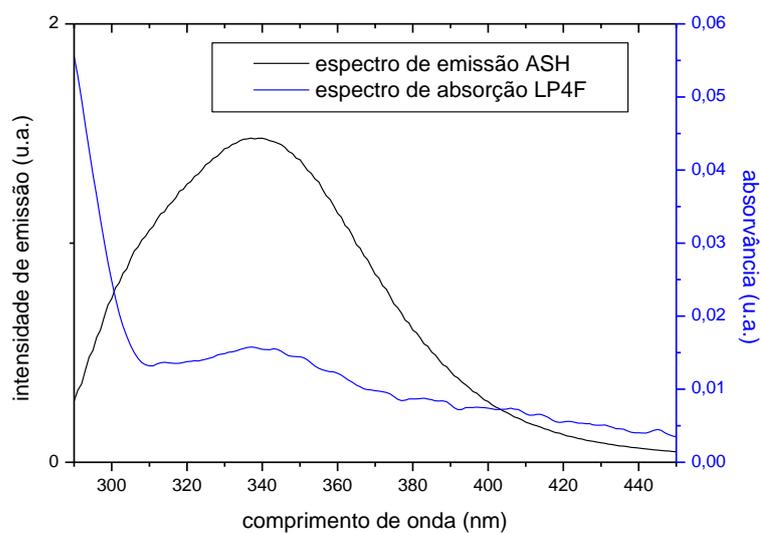


Figura 83. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 310$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4F) $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

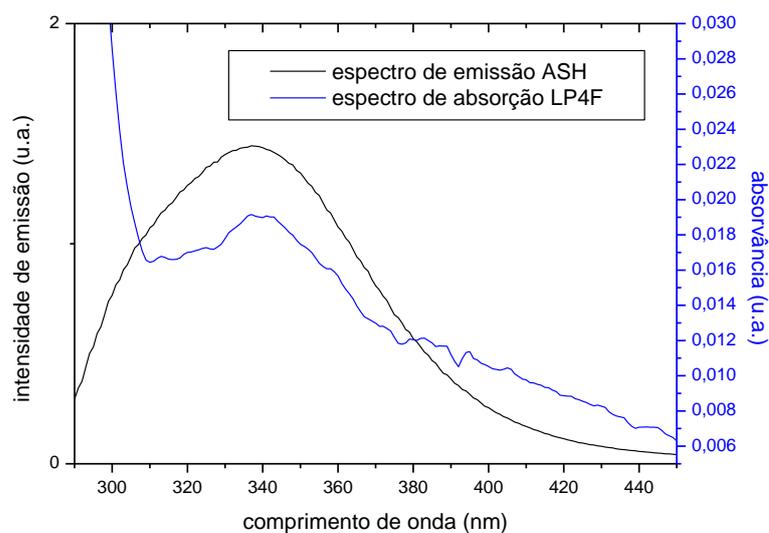


Figura 84. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -pirano naftoquinona (LP4F) $C_{ASH} = C_{LP4F} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

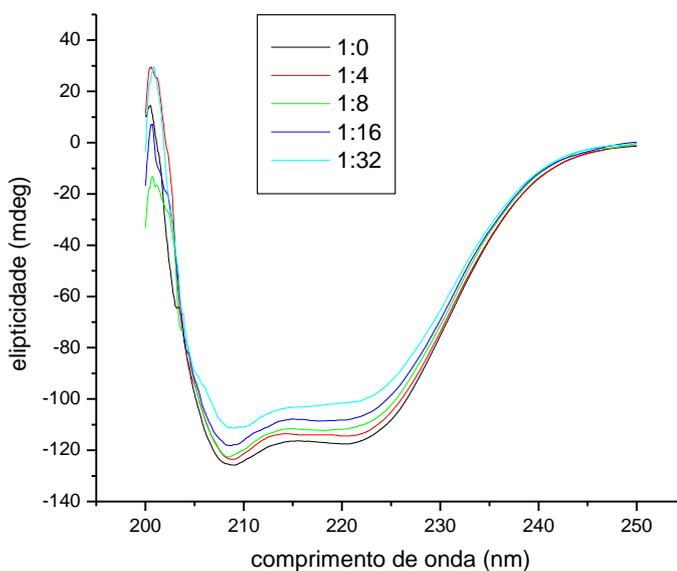


Figura 85. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 4; 8; 16$ e 32 ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K.

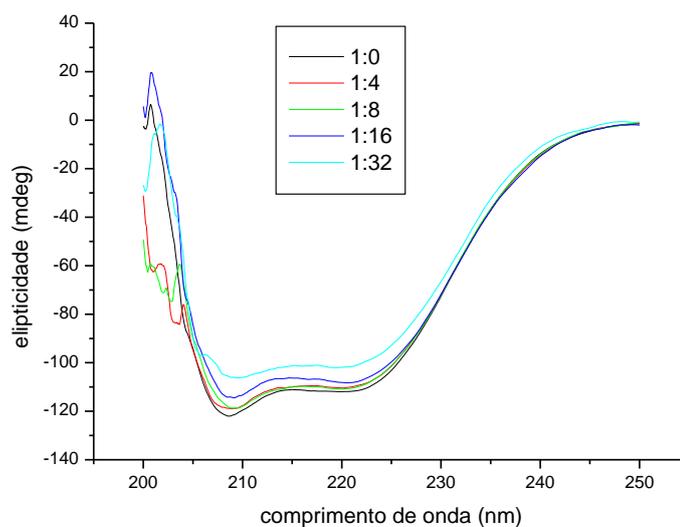


Figura 86. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LP4F} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K.

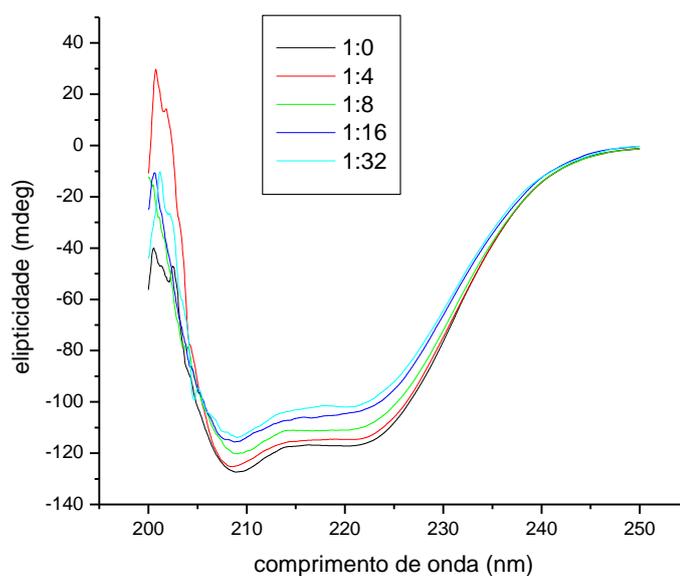


Figura 87. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -pirano naftoquinona (LP4F), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LP4F, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L $C_{LP4F} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K.

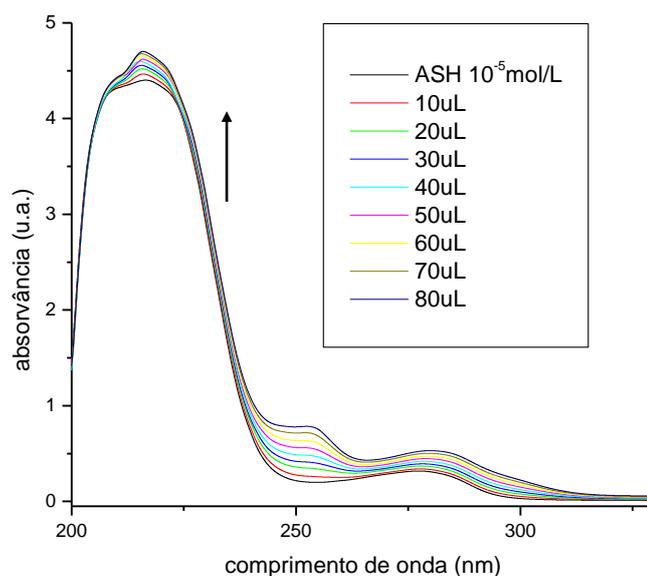


Figura 88. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 6,61 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,32; 1,97; 2,82; 3,26; 3,9; 4,54; 5,17 ($\times 10^{-5}$ mol/L).

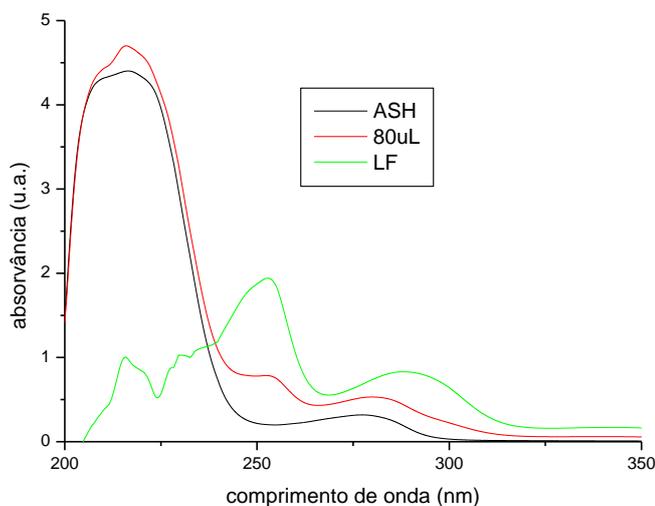


Figura 89. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) e α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 5,7 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K.

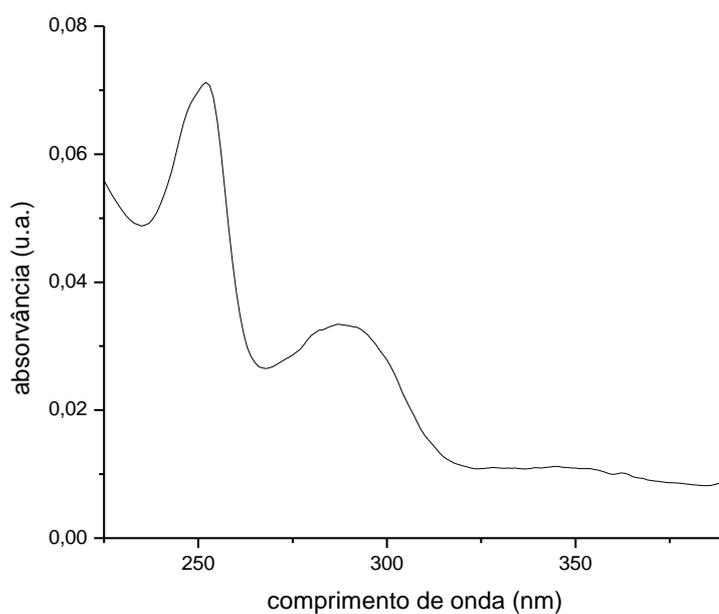


Figura 90. Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) em solução de PBS. $C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

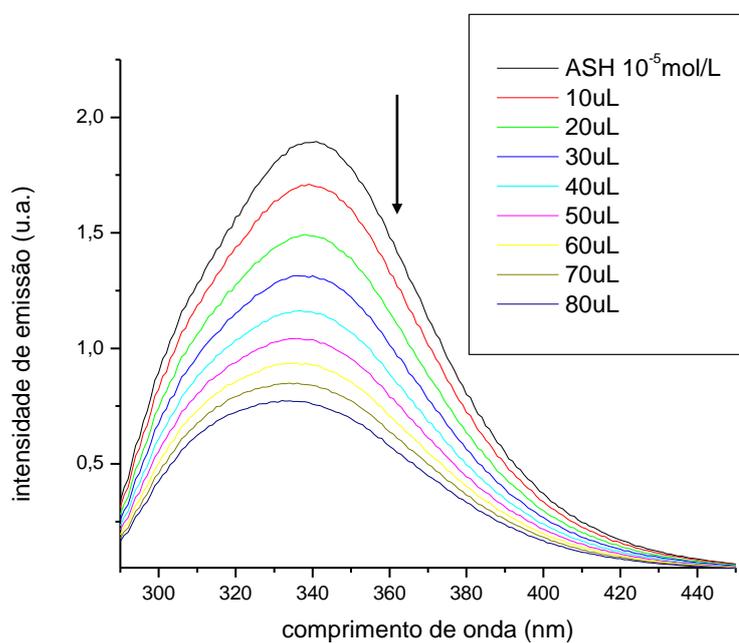


Figura 91. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) em α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 6,61 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,32; 1,97; 2,82; 3,26; 3,9; 4,54; 5,17 ($\times 10^{-5}$ mol/L), a $T = 315$ K.

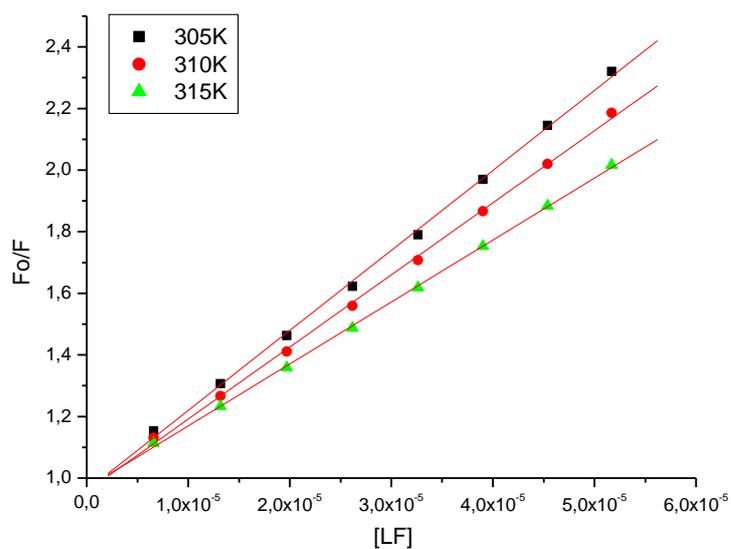


Figura 92. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF).

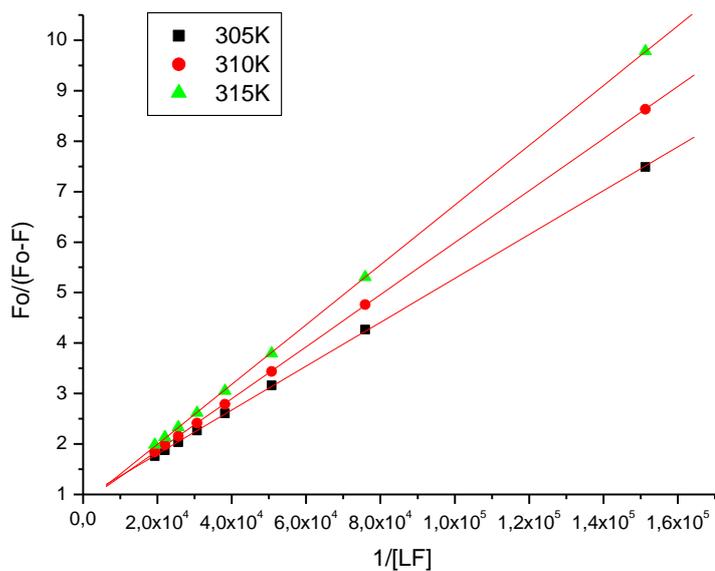


Figura 93. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF).

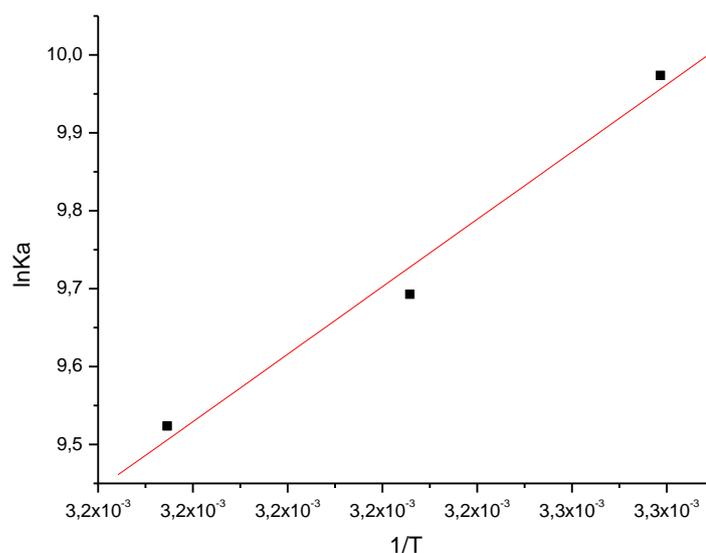


Figura 94. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF).

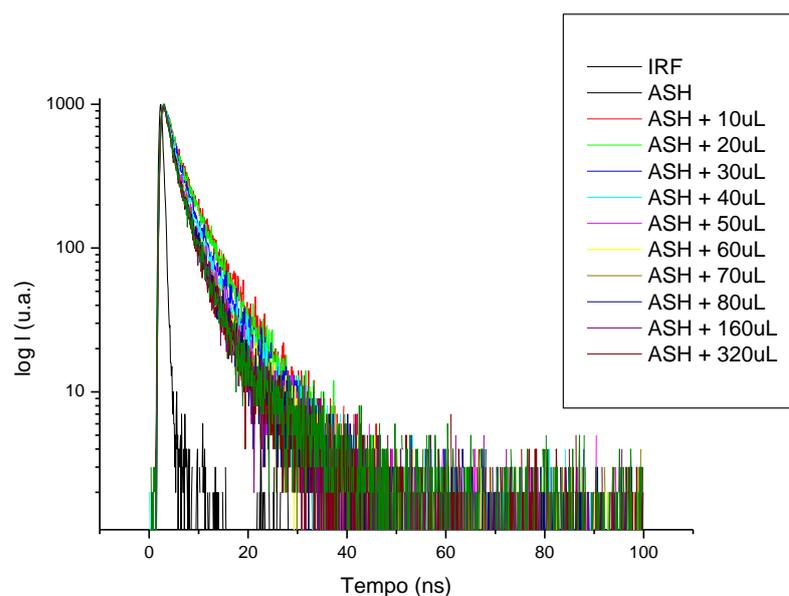


Figura 95. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 6,61 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,32; 1,97; 2,82; 3,26; 3,9; 4,54; 5,17 ($\times 10^{-5}$ mol/L) a $T = 298$ K

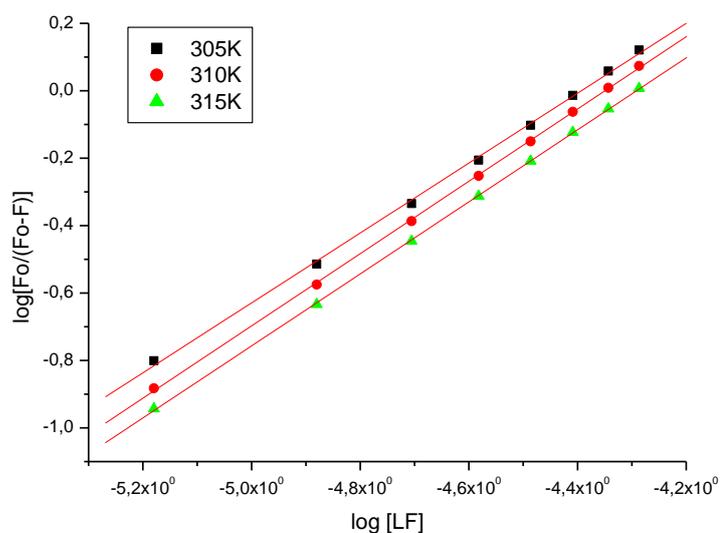


Figura 96. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF).

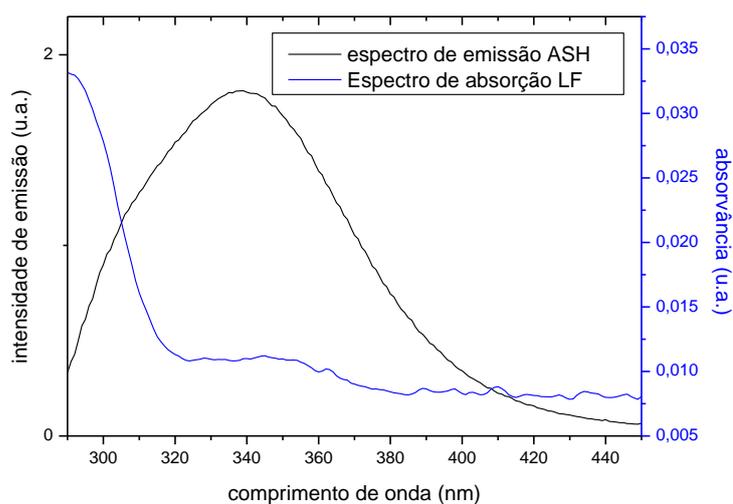


Figura 97. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 305$ K) de ASH ($pH = 7,4$) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) $C_{ASH} = C_{LF} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

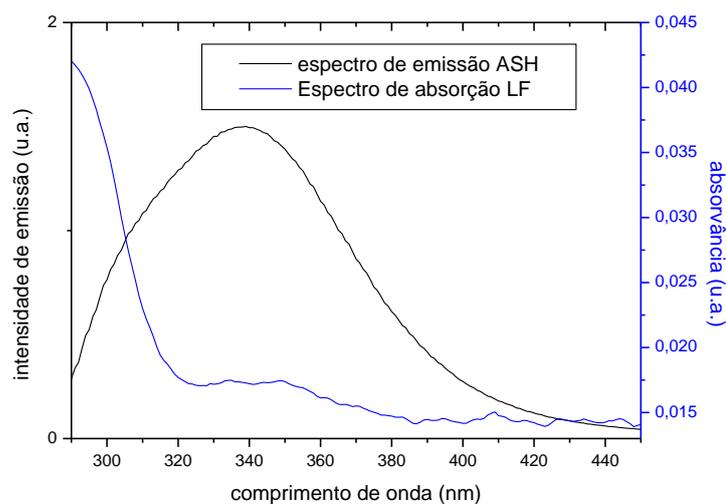


Figura 98. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 310 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

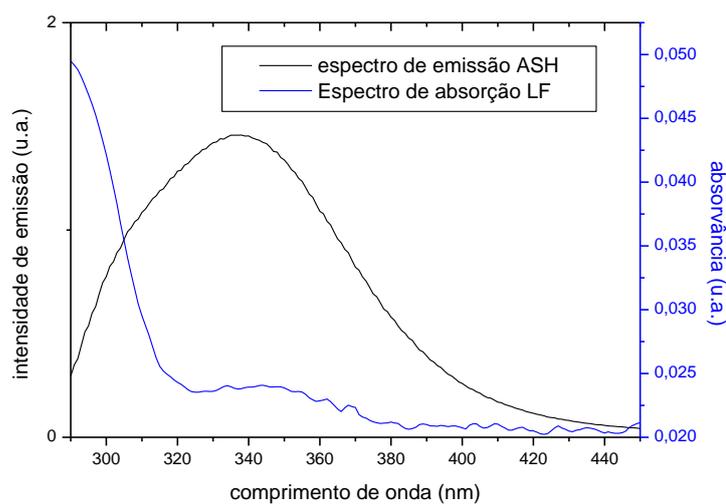


Figura 99. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 315 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

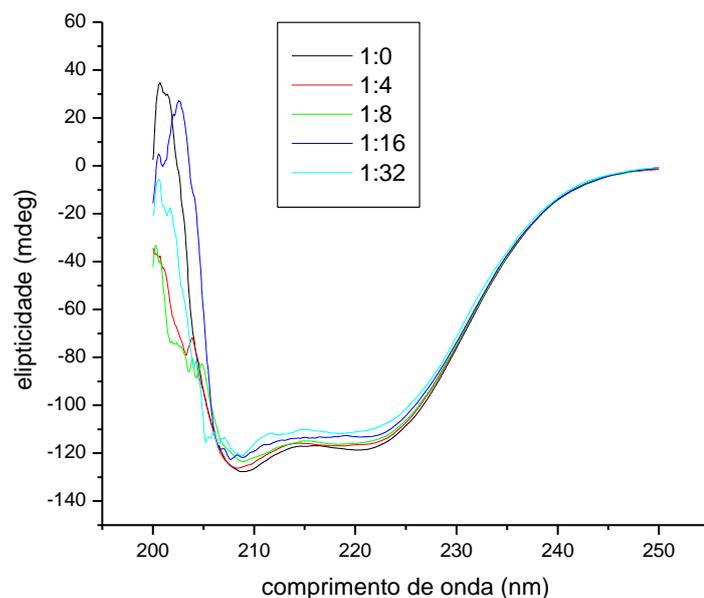


Figura 100. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 4; 8; 16$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K.

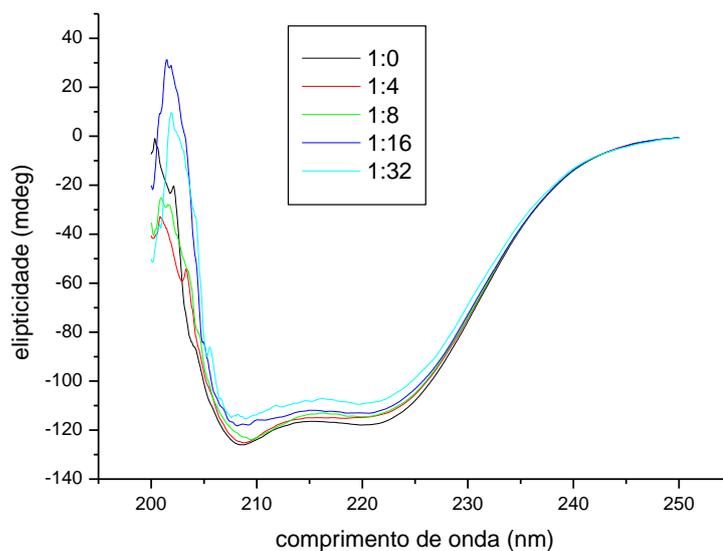


Figura 101. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 4; 8; 16$ e $32,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K.

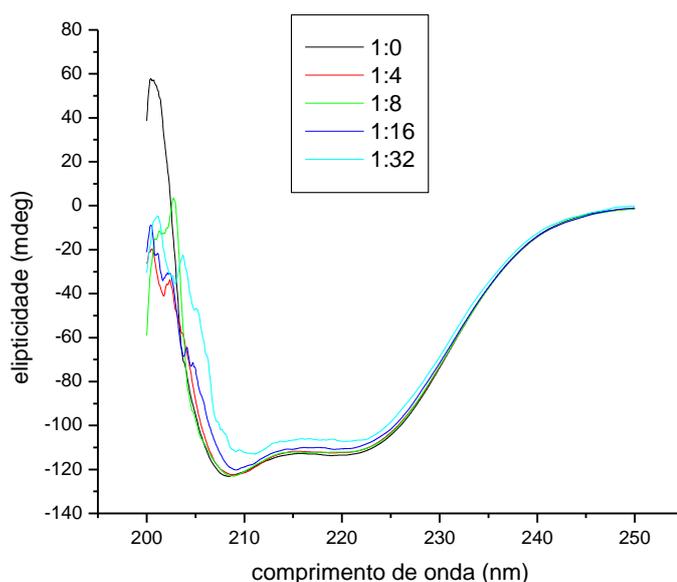


Figura 102. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF} = 0; 4; 8; 16$ e $32,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 315$ K.

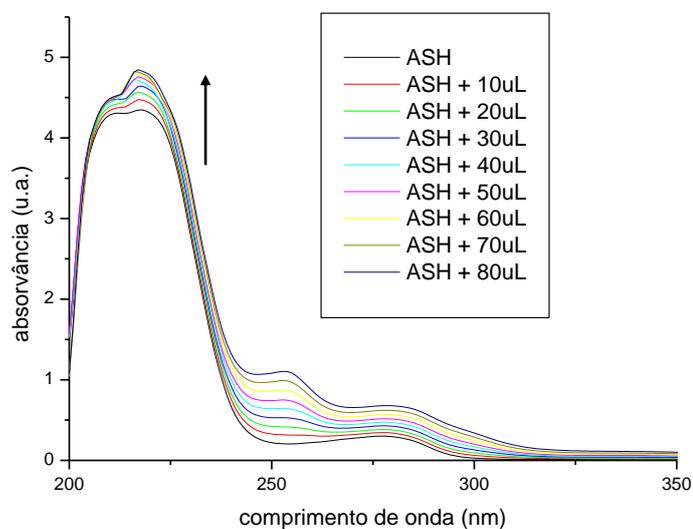


Figura 103. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e $5,3(x10^{-5})$ mol/L. $T=305$ K.

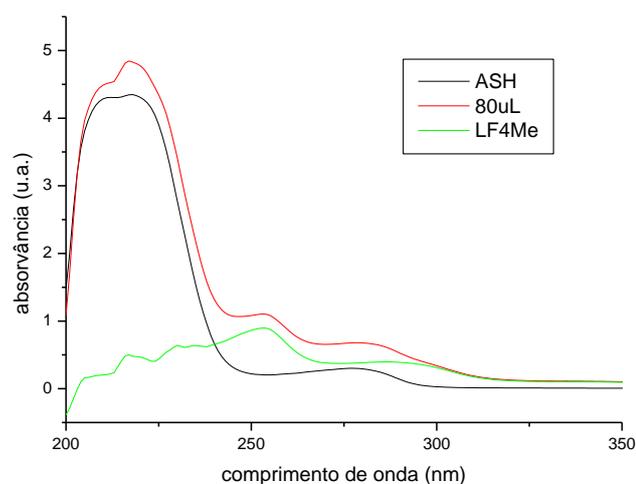


Figura 104. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) e α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4F} = 5,3 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K.

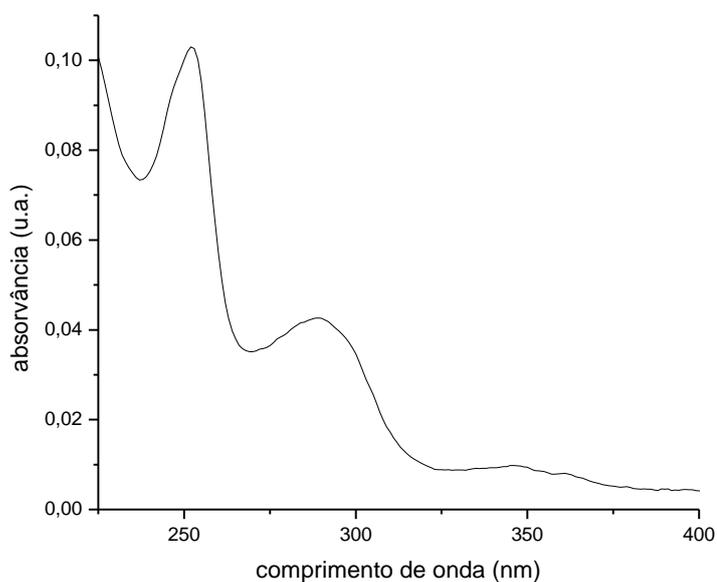


Figura 105. Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) em solução de PBS. $C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

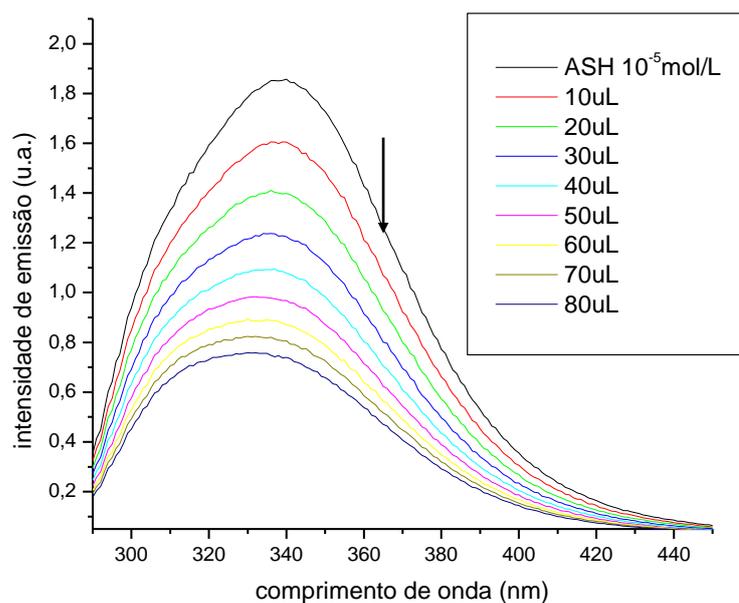


Figura 106. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), $C_{LF4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e $5,3 \times 10^{-5}$ mol/L, a $T = 310$ K.

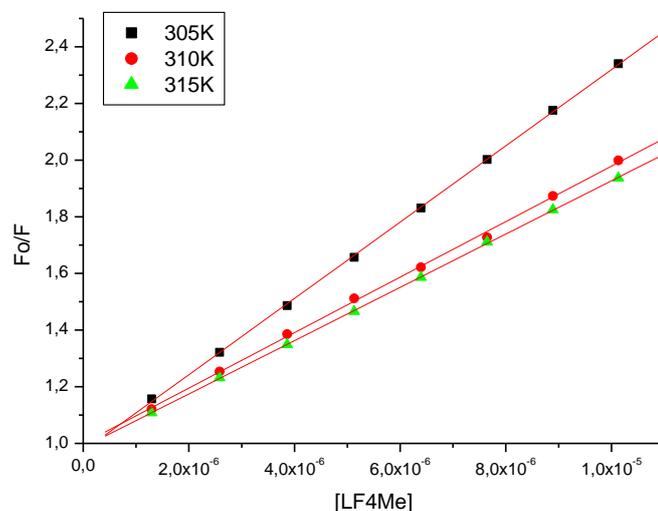


Figura 107. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me).

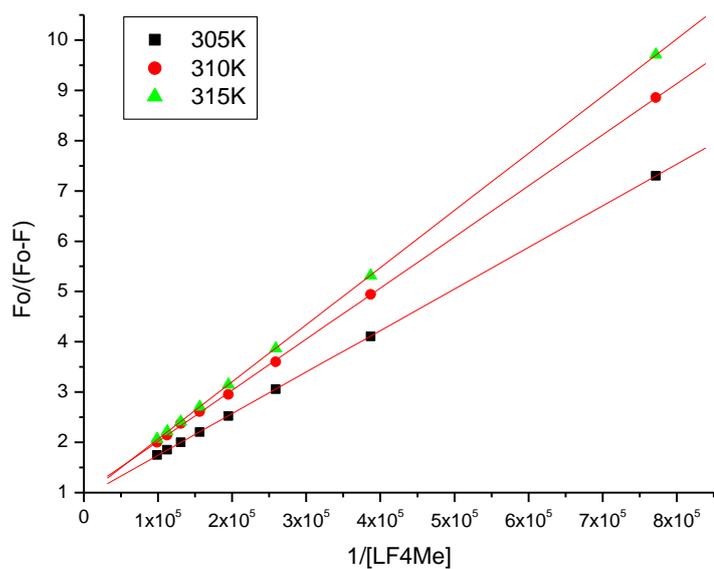


Figura 108. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me).

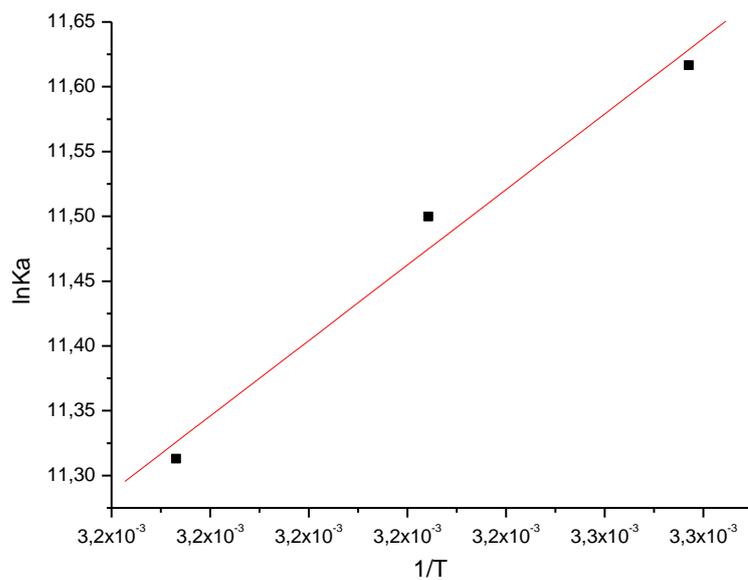


Figura 109. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me).

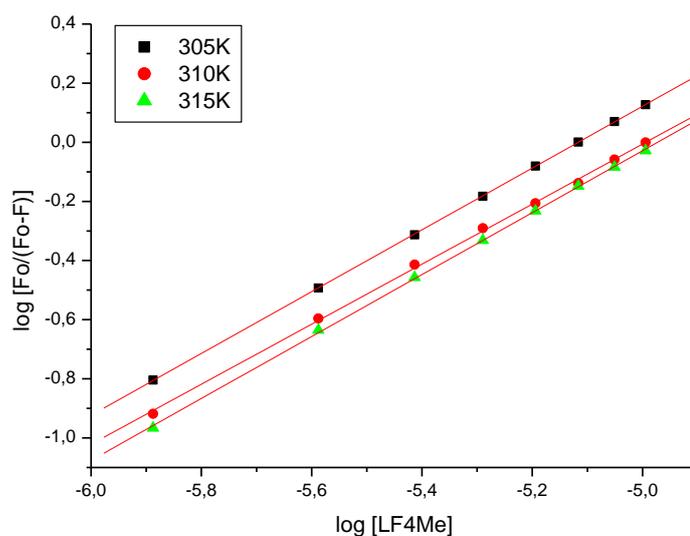


Figura 110. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me).

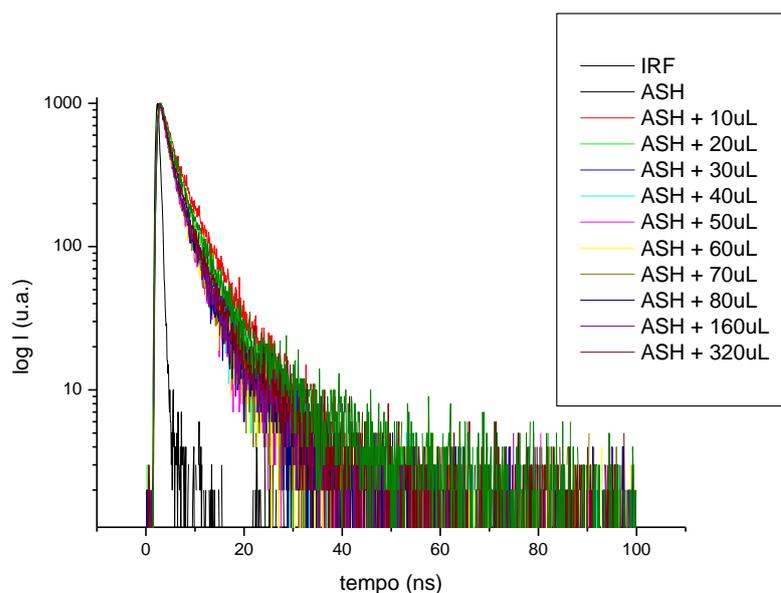


Figura 111. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LP4Me), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Me} = 0; 6,78 \times 10^{-6}$ mol/L; 1,35; 2,02; 2,68; 3,34; 4; 4,65 e $5,3 \times 10^{-5}$ mol/L) a T = 298 K

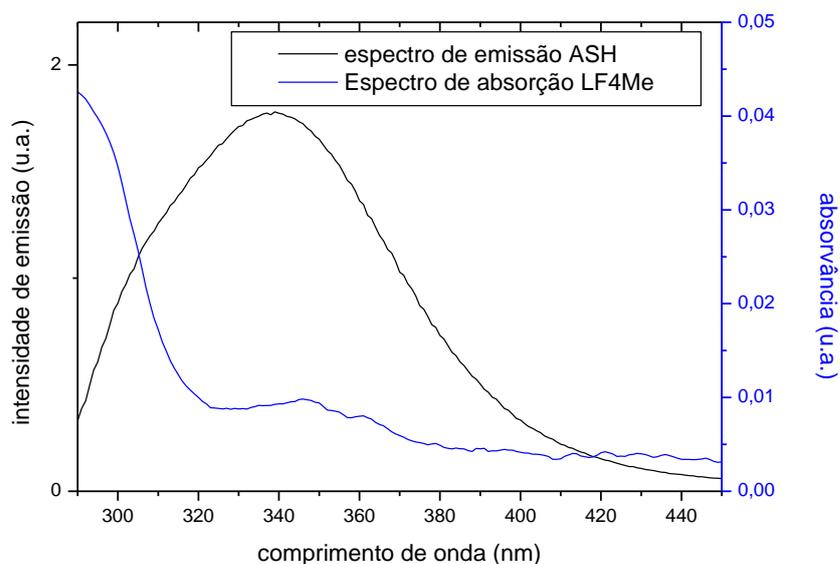


Figura 112. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 305 \text{ K}$) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF4Me}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

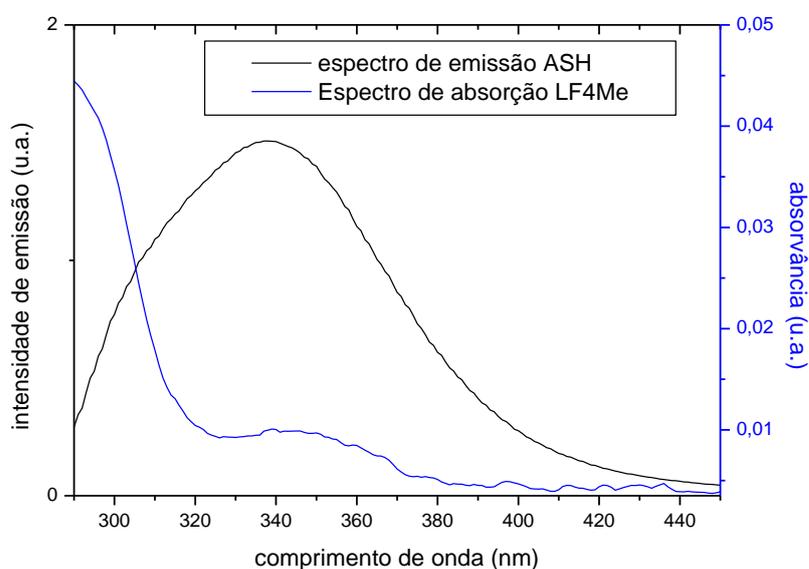


Figura 113. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 310 \text{ K}$) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF4Me}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

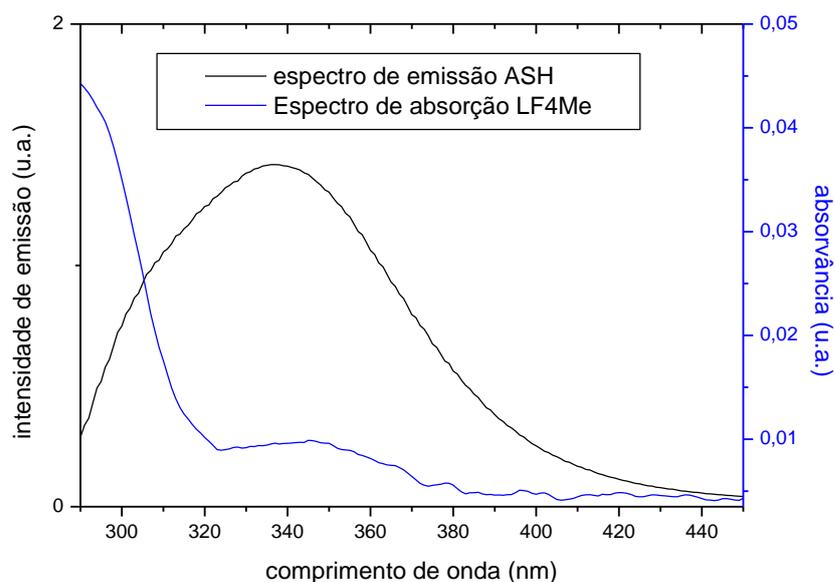


Figura 114. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me) $C_{ASH} = C_{LF4Me} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

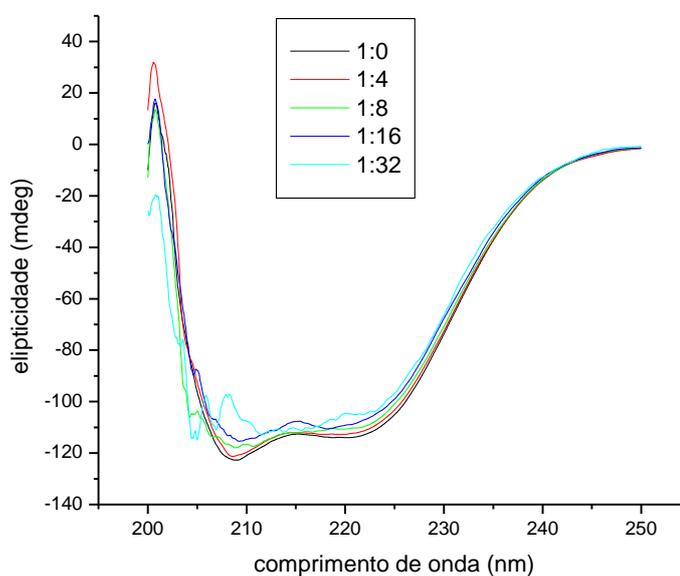


Figura 115. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 305$ K.

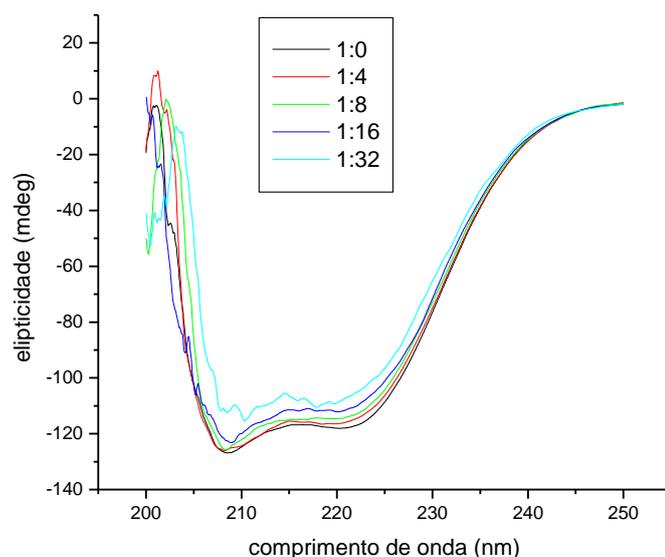


Figura 116. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, ($x 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K.

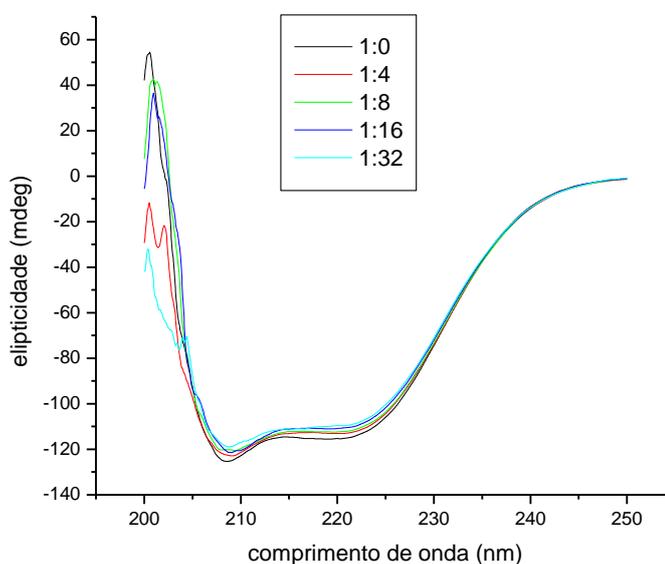


Figura 117. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Me), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Me, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Me} = 0; 4; 8; 16$ e $32 (x 10^{-6})$ mol/L, ($x 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

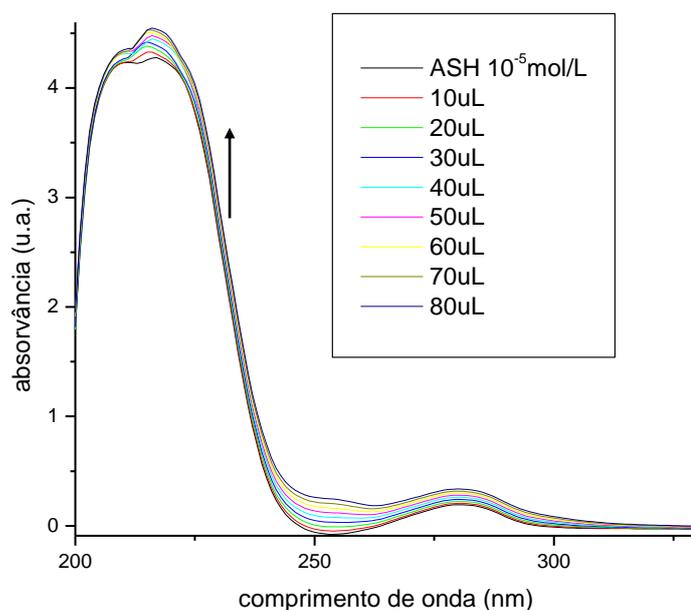


Figura 118. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,92; 7,81(\times 10^{-6}$ mol/L); 1,17; 1,55; 1,93; 2,31; 2,69 e $3,06 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K

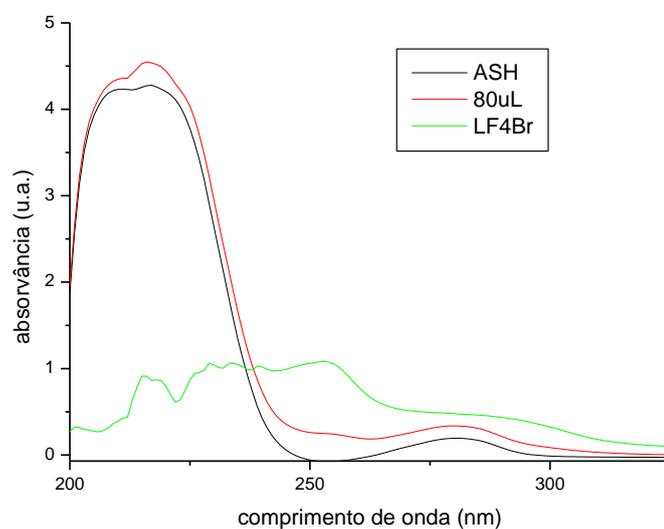


Figura 119. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) e α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LP4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Br} = 3,06 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K.

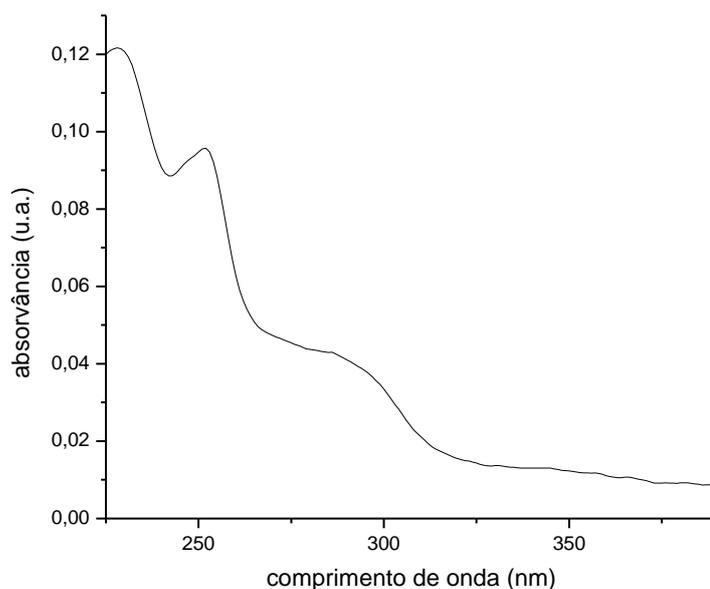


Figura 120. Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) em solução de PBS. $C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

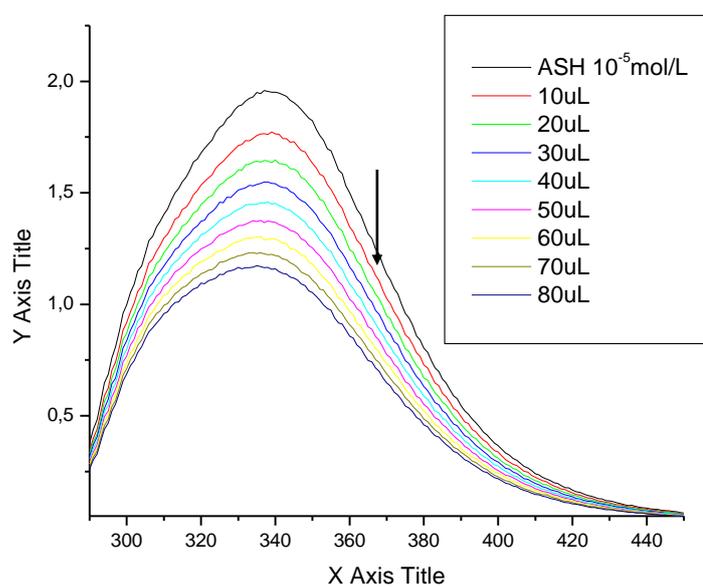


Figura 121. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,92; 7,81(x10^{-6}$ mol/L); 1,17; 1,55; 1,93; 2,31; 2,69 e $3,06 \times 10^{-5}$ mol/L, a $T = 310$ K.

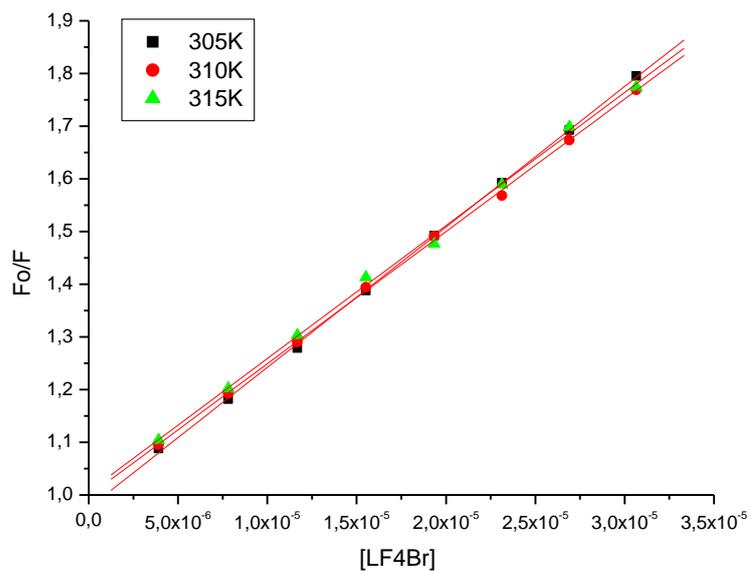


Figura 122. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br).

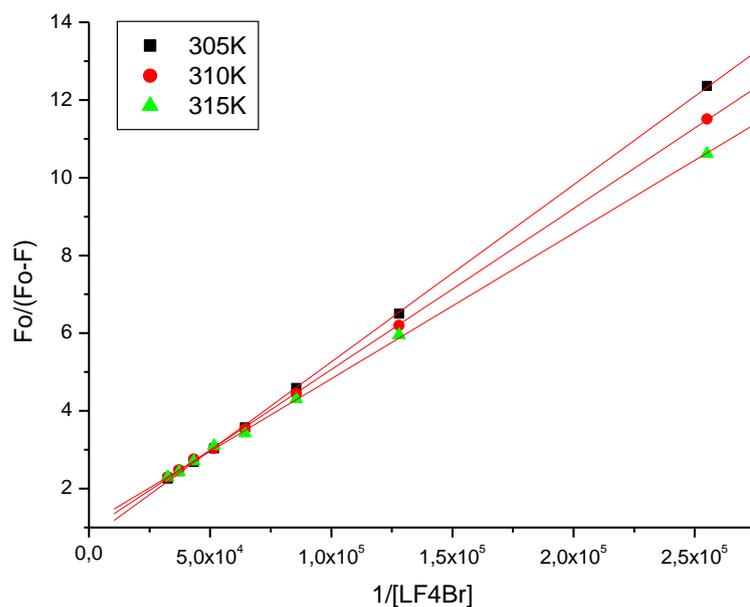


Figura 123. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br).

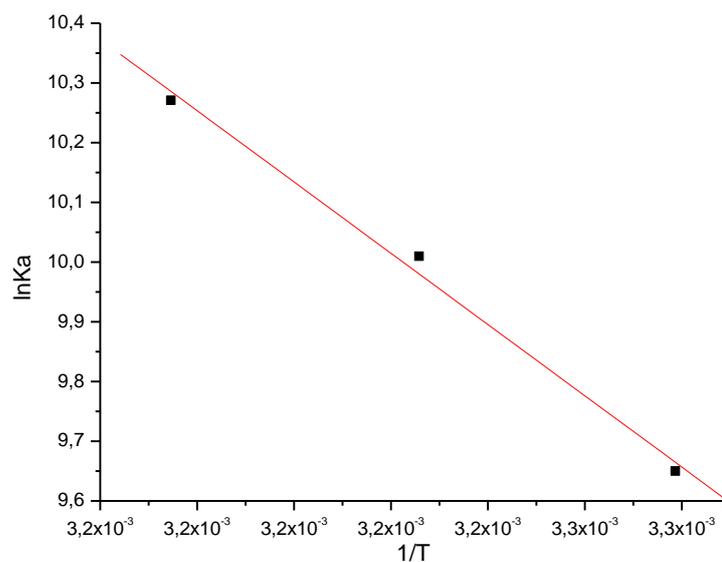


Figura 124. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br).

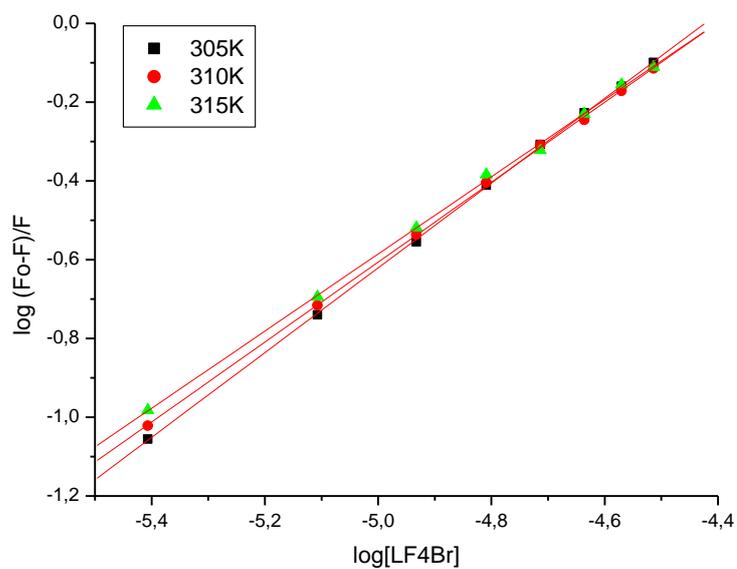


Figura 125. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br).

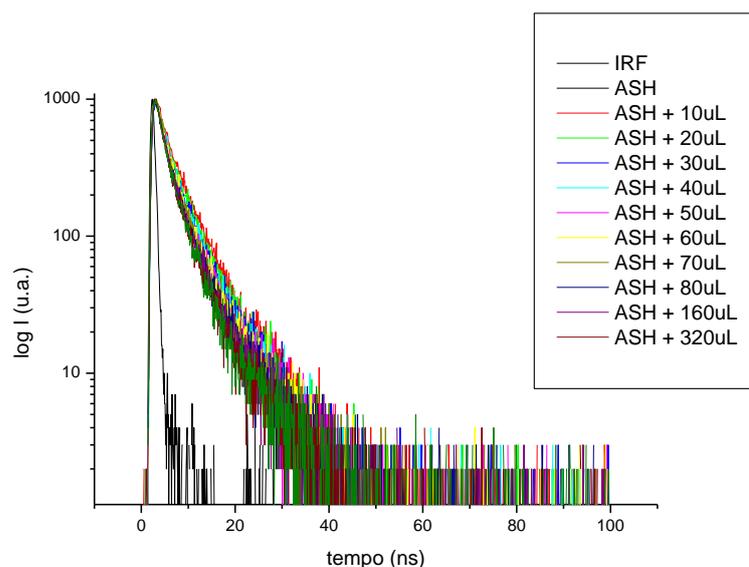


Figura 126. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,92; 7,81(\times 10^{-6}$ mol/L); 1,17; 1,55; 1,93; 2,31; 2,69 e $3,06 \times 10^{-5}$ mol/L a T = 298 K

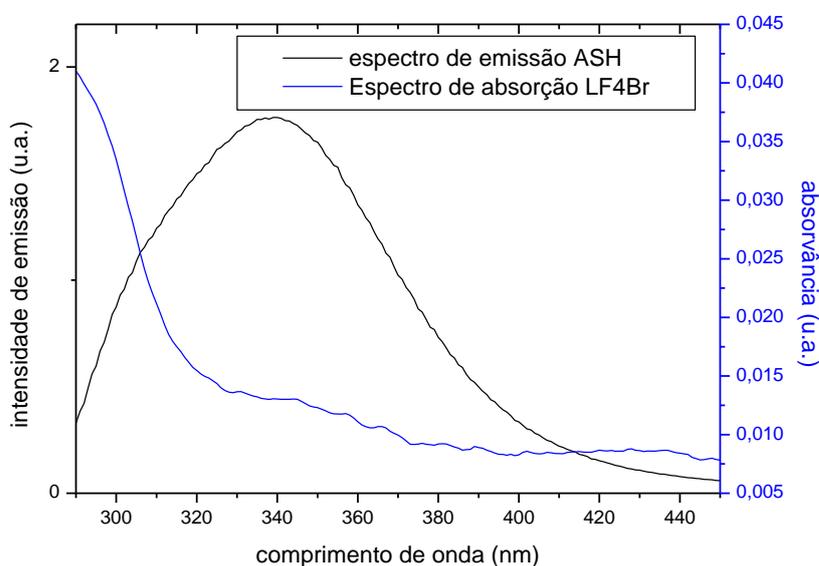


Figura 127. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e T = 305 K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) $C_{ASH} = C_{LF4Br} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

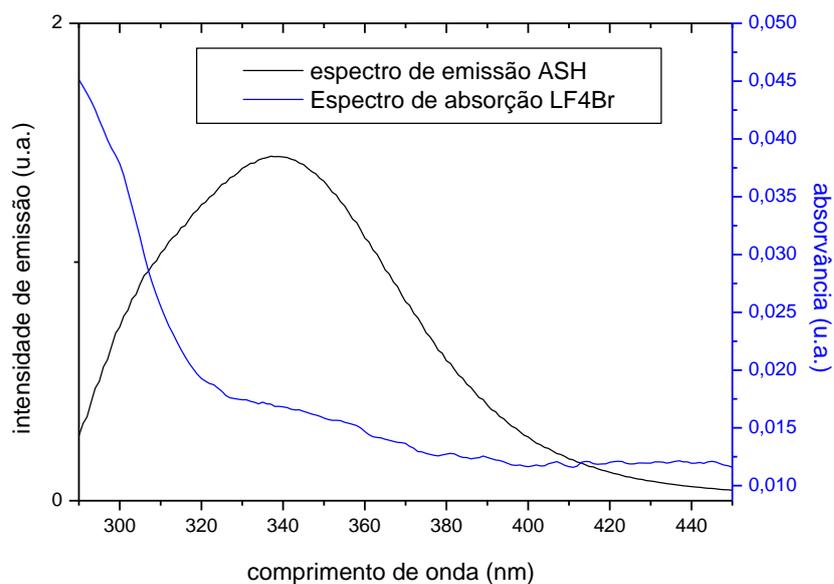


Figura 128. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 310 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF4Br}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

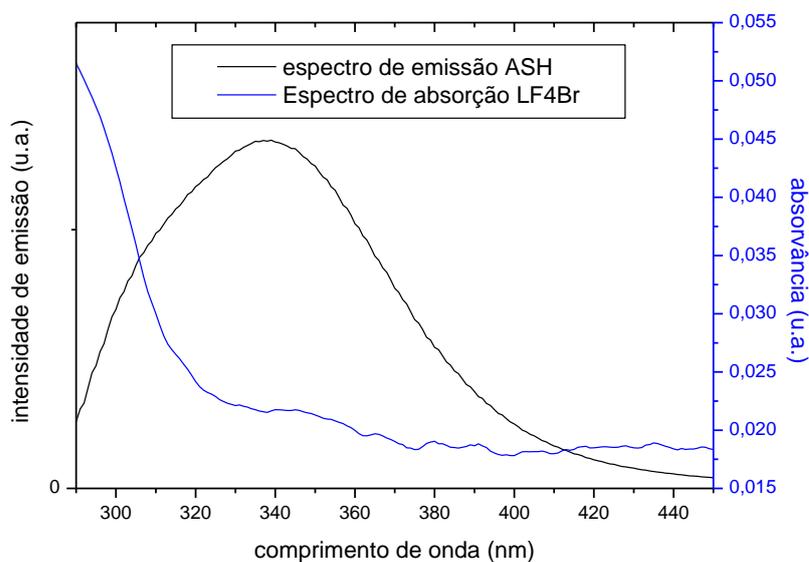


Figura 129. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 315 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF4Br}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

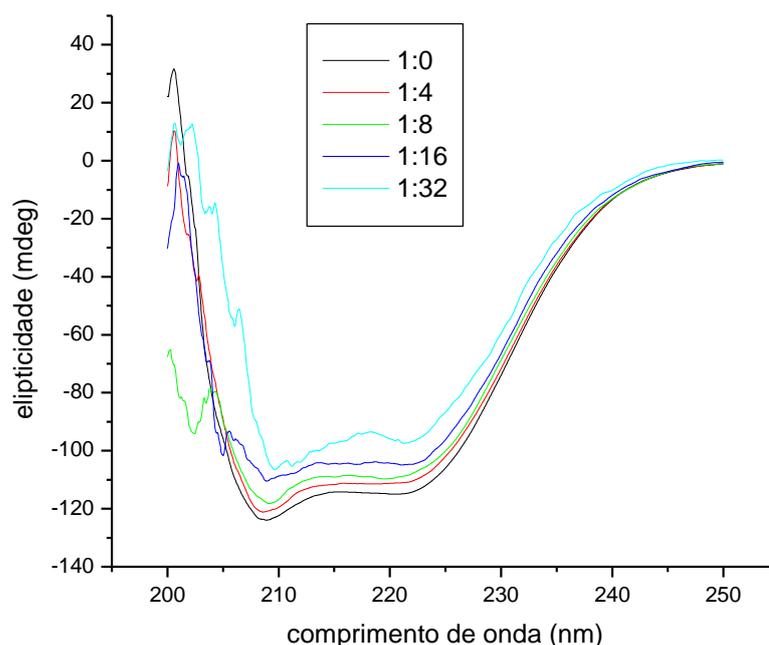


Figura 130. Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) em contendo concentrações variadas de α -2,3-dihidrofurano naftoquinona (LF4Br), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00 (x 10^{-6})$ mol/L, ($x 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K.

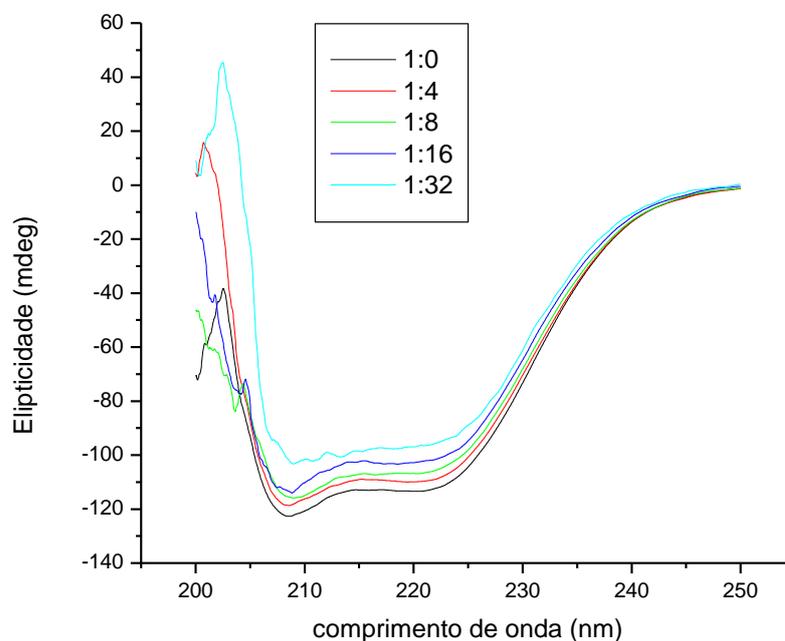


Figura 131. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-dihidrofurano naftoquinona (LF4Br), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00 (x 10^{-6})$ mol/L, a $T = 310$ K.

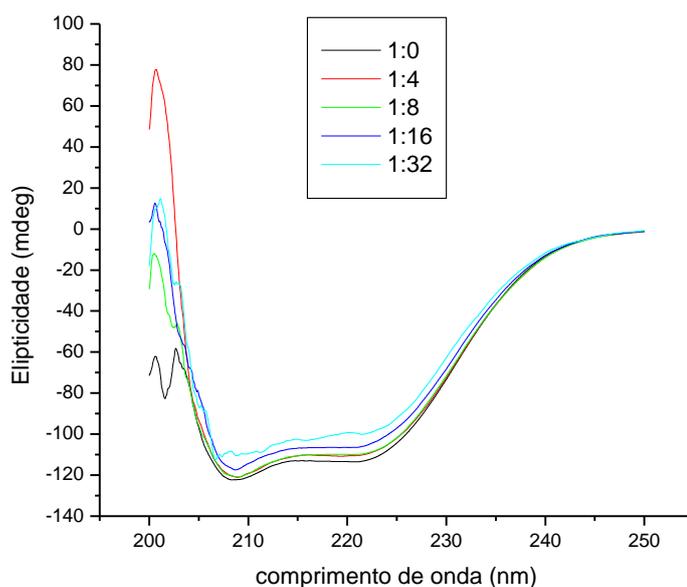


Figura 132. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Br), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Br, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Br} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

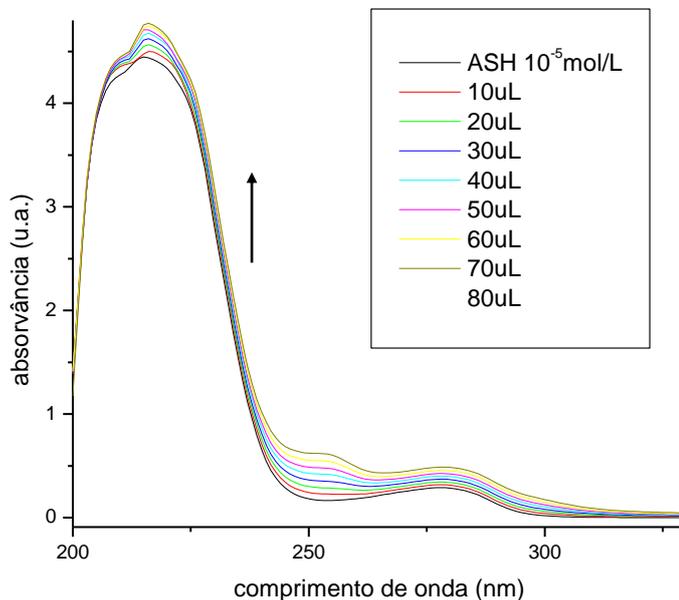


Figura 133. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,62; 7,22$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); 1,08; 1,43; 1,79; 2,14; 2,49 e $2,83$ ($\times 10^{-5}$ mol/L). $T = 310$ K

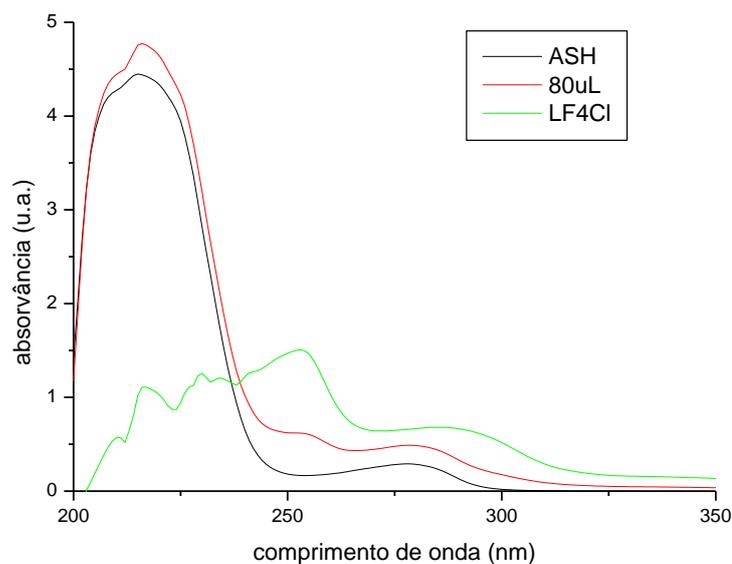


Figura 134. Espectros de absorção no UV-Vis para solução de ASH livre tamponada com PBS (pH = 7,4); ASH + 80uL de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) como resultado de deconvolução (subtração entre os espectros de ASH livre e ASH + LF4Cl. Para todos os três espectros: $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LP4Cl} = 2,83 \times 10^{-5}$ mol/L. T=310 K.

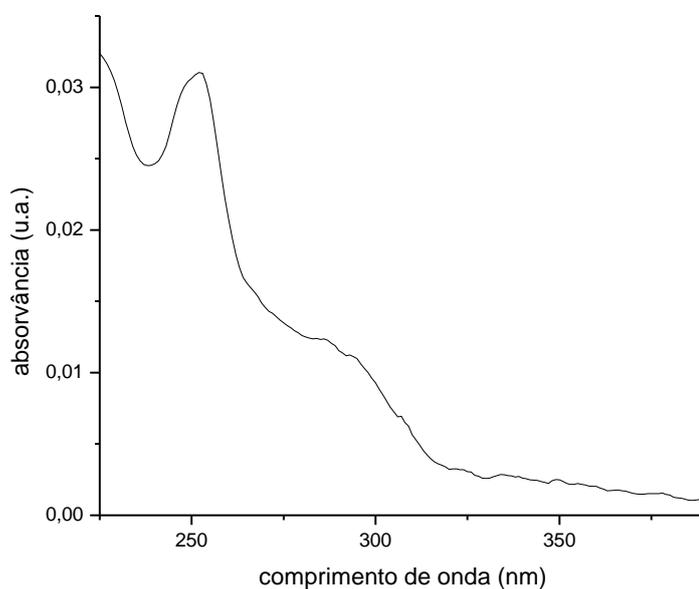


Figura 135. Espectro de absorção UV-Vis da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) em solução de PBS. $C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

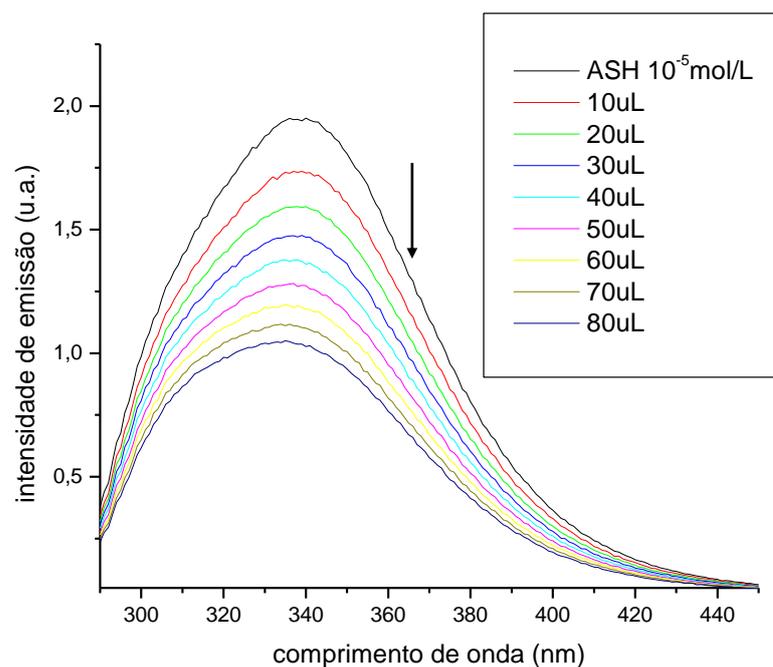


Figura 136. Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm) para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,62; 7,22$ ($\times 10^{-6}$ mol/L); 1,08; 1,43; 1,79; 2,14; 2,49 e 2,83 ($\times 10^{-5}$ mol/L), a T = 310 K.

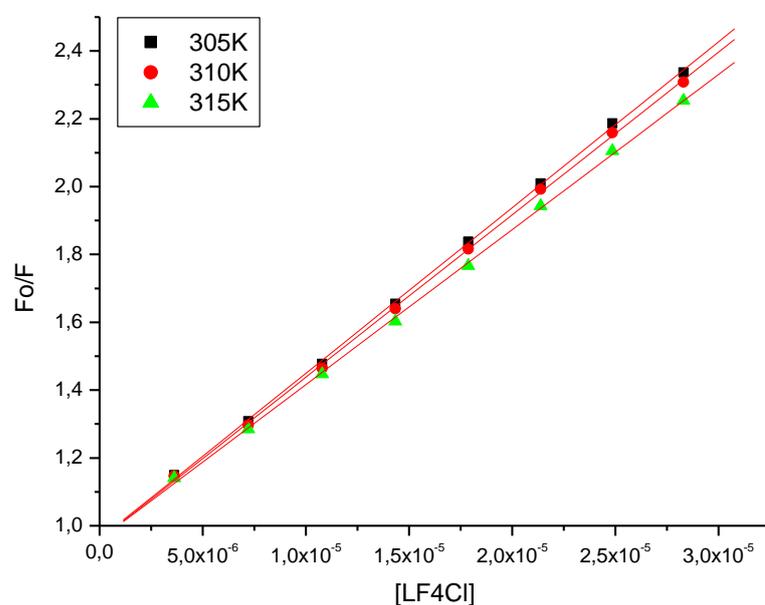


Figura 137. Gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl).

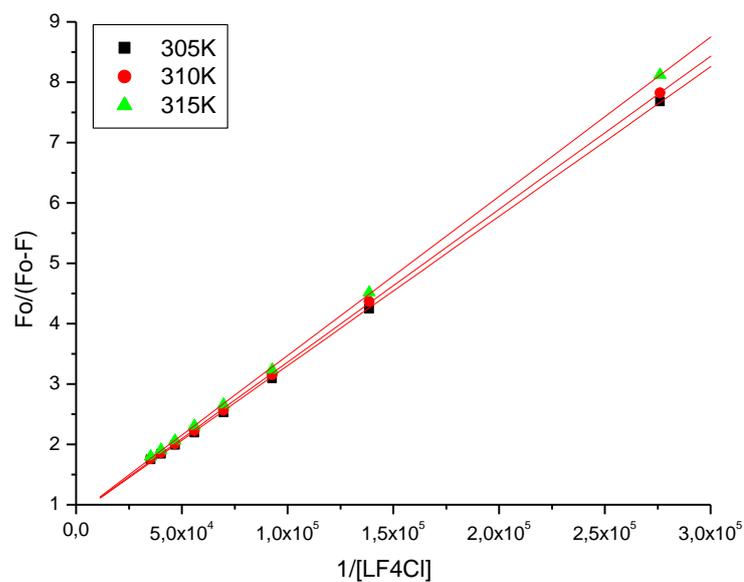


Figura 138. Gráfico de Stern-Volmer modificado para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl).

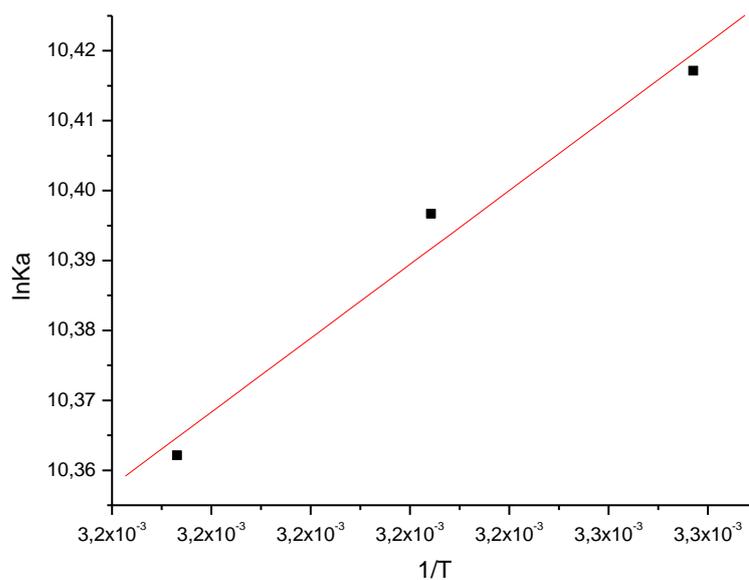


Figura 139. Gráfico de Van't Hoff para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl).

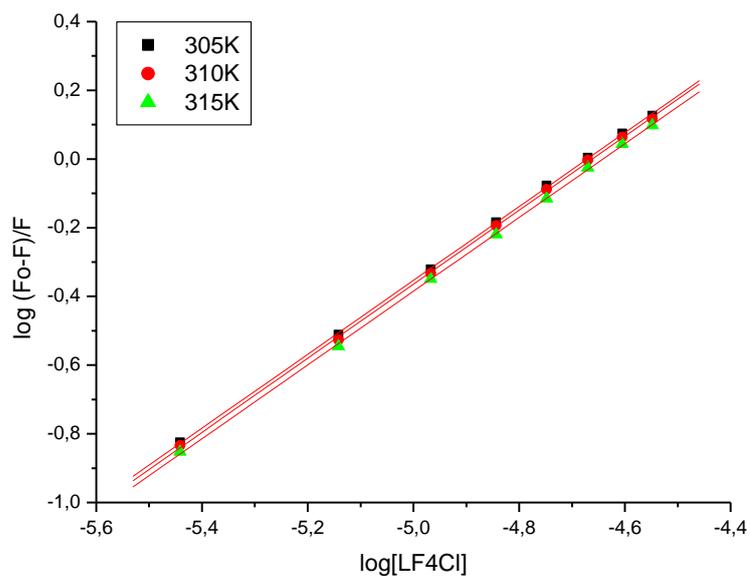


Figura 140. Gráfico de $\log(F_0-F)/F$ versus $\log[Q]$ para a supressão de fluorescência de ASH ($\lambda_{exc} = 280$ nm) pela α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl).

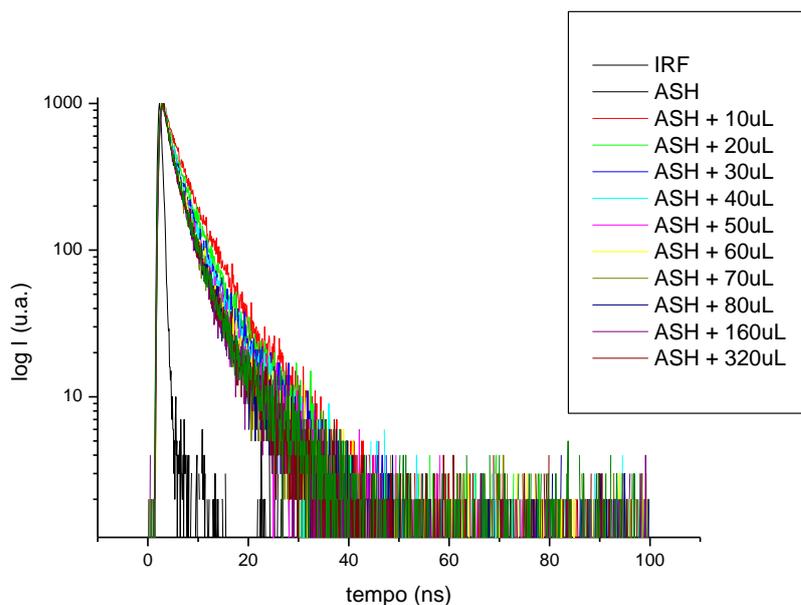


Figura 141. Espectro de fluorescência resolvida no tempo ($\lambda_{exc} = 280$ nm), mostrando IRF (fator de resposta do instrumento), Espectros de emissão de fluorescência para solução de ASH tamponada com PBS (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,62; 7,22 (\times 10^{-6})$ mol/L; 1,08; 1,43; 1,79; 2,14; 2,49 e $2,83(\times 10^{-5})$ mol/L) a $T = 298$ K

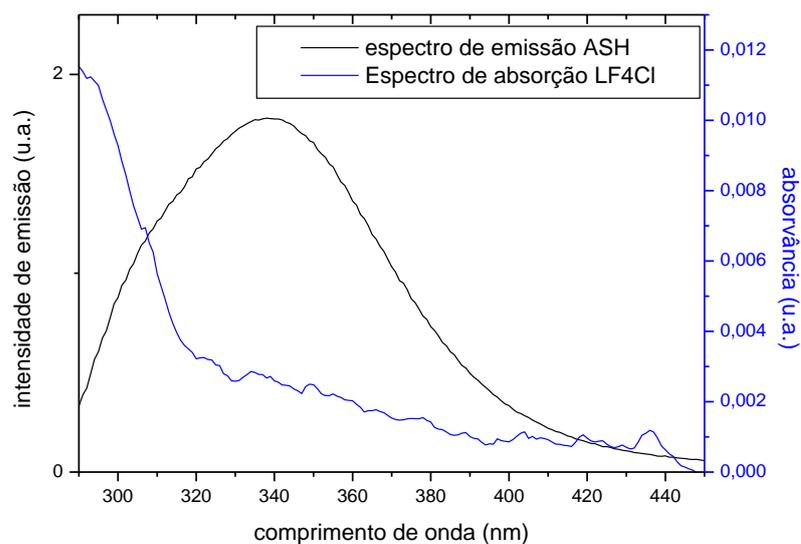


Figura 142. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 305 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF4Cl}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

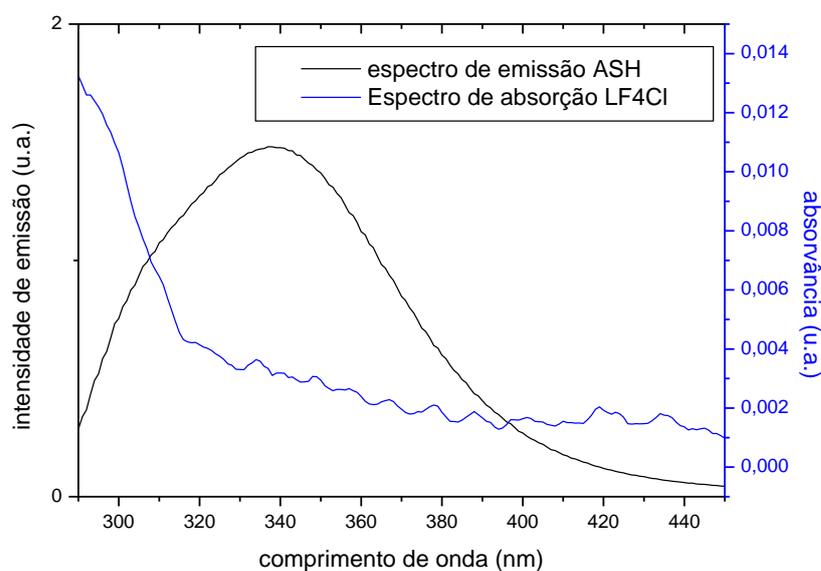


Figura 143. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ e $T = 310 \text{ K}$) de ASH ($\text{pH} = 7,4$) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) $C_{\text{ASH}} = C_{\text{LF4Cl}} = 1,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$.

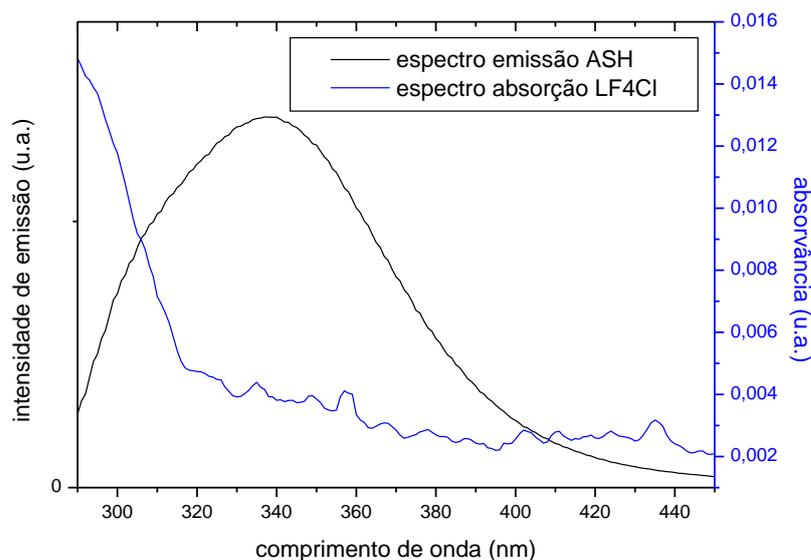


Figura 144. Sobreposição entre os espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 280$ nm e $T = 315$ K) de ASH (pH = 7,4) e de absorção UV da α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl) $C_{ASH} = C_{LF4Cl} = 1,00 \times 10^{-5}$ mol/L.

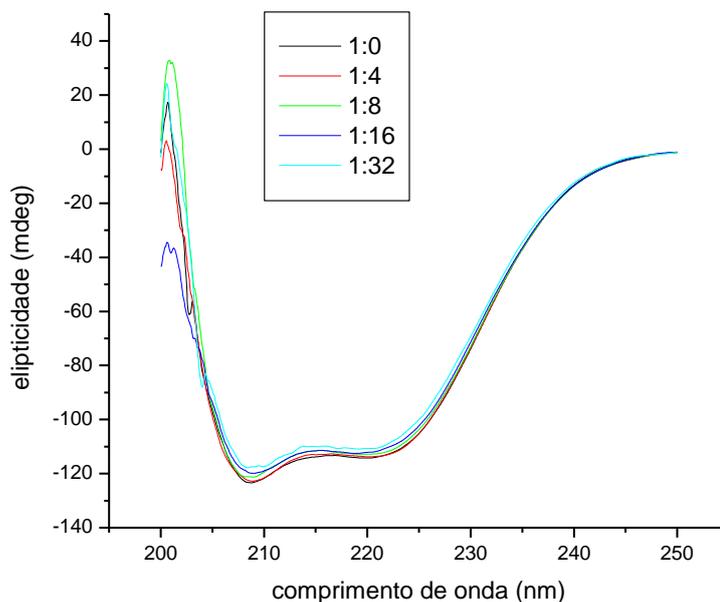


Figura 145. Espectros de dicroísmo circular pra ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 305$ K.

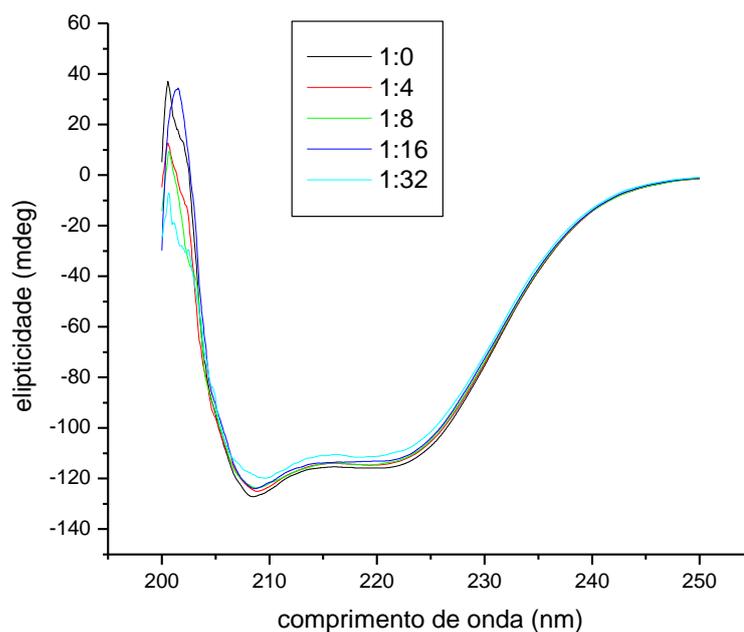


Figura 146. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 310$ K.

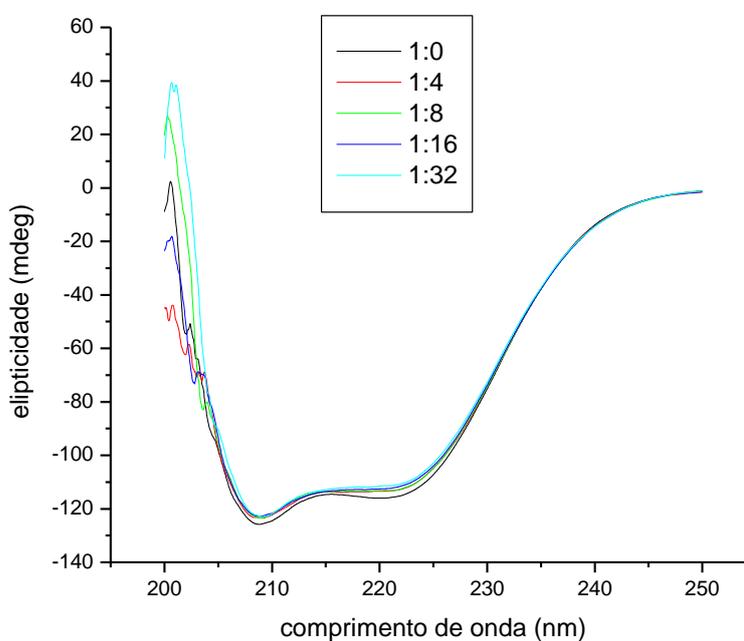


Figura 147. Espectros de dicroísmo circular para ASH (pH = 7,4) contendo concentrações variadas de α -2,3-diidrofurano naftoquinona (LF4Cl), nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:LF4Cl, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e $C_{LF4Cl} = 0; 3,9; 7,9; 15,70$ e $31,00$ ($\times 10^{-6}$) mol/L, a $T = 315$ K.

Tabela 16. MRE calculado em 208nm e em 222 nm para ASH (pH = 7,4) em naftoquinona (LP, LP4Cl, LP4Me, LP4F, LF, LF4Me, LF4Br e LF4Cl), T = 305 K, 310 K e 315 K. Nas proporções 1:0, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32 de ASH:naftoquinona, $C_{ASH} = 1,00 \times 10^{-6}$ mol/L e concentrações das naftoquinonas C = 0; 4,04; 8,08; 16,20 e 32,30 ($\times 10^{-6}$) mol/L.

	T (K)		θ_{208} (mdeg)	MRE ₂₀₈ (deg.cm ² /dmol)	θ_{222} (mdeg)	MRE ₂₂₂ (deg.cm ² /dmol)
LP	305	(1:0)	-126,099	-2,17E+04	-118,067	-2,03E+04
		(1:4)	-121,136	-2,08E+04	-112,352	-1,93E+04
		(1:8)	-119,793	-2,06E+04	-112,353	-1,93E+04
		(1:16)	-116,615	-1,88E+04	-109,366	-2,00E+04
		(1:32)	-112,576	-1,78E+04	-103,551	-1,78E+04
	310	1:0	-123,234	-2,12E+04	-110,397	-1,90E+04
		1:4	-116,907	-2,01E+04	-107,101	-1,84E+04
		1:8	-127,883	-2,20E+04	-116,795	-2,01E+04
		1:16	-110,253	-1,89E+04	-101,004	-1,74E+04
		1:32	-110,511	-1,90E+04	-98,1328	-1,69E+04
	315	1:0	-124,648	-2,14E+04	-114,389	-1,97E+04
		1:4	-121,249	-2,08E+04	-110,647	-1,90E+04
		1:8	-120,260	-2,07E+04	-109,128	-1,88E+04
		1:16	-116,772	-2,01E+04	-105,830	-1,82E+04
		1:32	-114,736	-1,97E+04	-102,476	-1,76E+04
LP4Cl	305	1:0	-125,861	-2,16E+04	-116,782	-2,01E+04
		1:4	-120,482	-2,07E+04	-113,478	-1,95E+04
		1:8	-119,470	-2,05E+04	-110,260	-1,89E+04
		1:16	-113,837	-1,96E+04	-103,638	-1,78E+04
		1:32	-101,829	-1,75E+04	-94,1596	-1,62E+04
	310	1:0	-122,487	-2,10E+04	-111,803	-1,92E+04
		1:4	-116,467	-2,00E+04	-107,734	-1,85E+04
		1:8	-114,500	-1,97E+04	-104,052	-1,79E+04
		1:16	-106,663	-1,83E+04	-95,3139	-1,64E+04
		1:32	-101,090	-1,74E+04	-89,6848	-1,54E+04
	315	1:0	-121,894	-2,09E+04	-113,073	-1,94E+04
		1:4	-121,527	-2,09E+04	-110,730	-1,90E+04
		1:8	-116,773	-2,01E+04	-105,134	-1,81E+04
		1:16	-114,095	-1,96E+04	-104,560	-1,80E+04
		1:32	-104,975	-1,80E+04	-95,6834	-1,64E+04
LP4Me	305	1:0	-124,000	-2,13E+04	-115,000	-1,98E+04
		1:4	-122,000	-2,09E+04	-113,000	-1,94E+04
		1:8	-119,000	-2,04E+04	-111,735	-1,92E+04
		1:16	-116,000	-1,99E+04	-110,173	-1,89E+04
		1:32	-113,836	-1,96E+04	-107,562	-1,85E+04
	310	1:0	-121,510	-2,09E+04	-112,461	-1,93E+04
		1:4	-120,761	-2,07E+04	-109,813	-1,89E+04
		1:8	-116,403	-2,00E+04	-108,273	-1,86E+04
		1:16	-114,362	-1,96E+04	-106,481	-1,83E+04
		1:32	-109,177	-1,88E+04	-101,729	-1,75E+04
	315	1:0	-125,940	-2,16E+04	-116,506	-2,00E+04
		1:4	-122,636	-2,11E+04	-112,244	-1,93E+04
		1:8	-117,848	-2,02E+04	-111,276	-1,91E+04
		1:16	-119,474	-2,05E+04	-109,426	-1,88E+04
		1:32	-110,759	-1,90E+04	-104,813	-1,80E+04

LP4F	305	1:0	-125,000	-2,15E+04	-116,000	-2,00E+04
		1:4	-122,000	-2,10E+04	-114,000	-1,95E+04
		1:8	-122,000	-2,09E+04	-110,196	-1,89E+04
		1:16	-117,000	-2,01E+04	-106,68	-1,83E+04
		1:32	-109,805	-1,89E+04	-100,572	-1,73E+04
	310	1:0	-121,028	-2,08E+04	-111,121	-1,91E+04
		1:4	-118,386	-2,03E+04	-109,437	-1,88E+04
		1:8	-116,379	-2,00E+04	-109,048	-1,87E+04
		1:16	-112,995	-1,94E+04	-107,239	-1,84E+04
		1:32	-104,685	-1,80E+04	-100,232	-1,72E+04
	315	1:0	-125,805	-2,16E+04	-116,280	-2,00E+04
		1:4	-124,647	-2,14E+04	-114,038	-1,96E+04
		1:8	-118,164	-2,03E+04	-109,661	-1,88E+04
		1:16	-114,617	-1,97E+04	-102,926	-1,77E+04
		1:32	-111,726	-1,92E+04	-100,477	-1,73E+04
LF	305	1:0	-126,190	-2,17E+04	-117,443	-2,02E+04
		1:4	-125,806	-2,16E+04	-115,599	-1,99E+04
		1:8	-121,784	-2,09E+04	-114,446	-1,97E+04
		1:16	-121,008	-2,08E+04	-112,689	-1,94E+04
		1:32	-119,087	-2,05E+04	-109,454	-1,88E+04
	310	1:0	-125,371	-2,15E+04	-116,738	-2,01E+04
		1:4	-124,068	-2,13E+04	-113,405	-1,95E+04
		1:8	-120,824	-2,08E+04	-112,967	-1,94E+04
		1:16	-118,025	-2,03E+04	-111,642	-1,92E+04
		1:32	-114,109	-1,96E+04	-107,657	-1,85E+04
	315	1:0	-122,777	-2,11E+04	-112,239	-1,93E+04
		1:4	-121,726	-2,09E+04	-111,176	-1,91E+04
		1:8	-121,135	-2,08E+04	-111,119	-1,91E+04
		1:16	-116,458	-2,00E+04	-109,233	-1,88E+04
		1:32	-103,679	-1,78E+04	-106,622	-1,83E+04
LF4Me	305	1:0	-121,549	-2,09E+04	-112,761	-1,94E+04
		1:4	-119,791	-2,06E+04	-111,220	-1,91E+04
		1:8	-116,564	-2,00E+04	-109,546	-1,88E+04
		1:16	-112,944	-1,94E+04	-106,987	-1,84E+04
		1:32	-97,452	-1,67E+04	-104,774	-1,80E+04
	310	1:0	-126,287	-2,17E+04	-117,033	-2,01E+04
		1:4	-125,731	-2,16E+04	-114,627	-1,97E+04
		1:8	-121,239	-2,08E+04	-113,035	-1,94E+04
		1:16	-125,008	-2,15E+04	-110,172	-1,89E+04
		1:32	-111,315	-1,91E+04	-105,262	-1,81E+04
	315	1:0	-124,629	-2,14E+04	-113,940	-1,96E+04
		1:4	-121,671	-2,09E+04	-112,037	-1,93E+04
		1:8	-120,267	-2,07E+04	-111,096	-1,91E+04
		1:16	-118,729	-2,04E+04	-109,664	-1,88E+04
		1:32	-117,449	-2,02E+04	-108,575	-1,87E+04

Continua na próxima página

LF4Br	305	1:0	-122,697	-2,11E+04	-114,264	-1,96E+04
		1:4	-119,988	-2,06E+04	-110,452	-1,90E+04
		1:8	-115,463	-1,98E+04	-107,890	-1,85E+04
		1:16	-105,877	-1,82E+04	-104,707	-1,80E+04
		1:32	-89,862	-1,54E+04	-96,761	-1,66E+04
	310	1:0	-122,015	-2,10E+04	-112,324	-1,93E+04
		1:4	-118,197	-2,03E+04	-108,959	-1,87E+04
		1:8	-114,49	-1,97E+04	-105,674	-1,82E+04
		1:16	-112,479	-1,93E+04	-101,615	-1,75E+04
		1:32	-98,578	-1,69E+04	-95,678	-1,64E+04
	315	1:0	-121,922	-2,09E+04	-112,699	-1,94E+04
		1:4	-119,787	-2,06E+04	-109,651	-1,88E+04
		1:8	-119,779	-2,06E+04	-109,237	-1,88E+04
		1:16	-115,913	-1,99E+04	-105,411	-1,81E+04
		1:32	-108,632	-1,87E+04	-99,678	-1,71E+04
LF4Cl	305	1:0	-122,496	-2,10E+04	-112,956	-1,94E+04
		1:4	-121,449	-2,09E+04	-112,824	-1,94E+04
		1:8	-121,001	-2,08E+04	-111,771	-1,92E+04
		1:16	-118,529	-2,04E+04	-110,280	-1,89E+04
		1:32	-117,106	-2,01E+04	-108,973	-1,87E+04
	310	1:0	-126,316	-2,17E+04	-114,906	-1,97E+04
		1:4	-123,025	-2,11E+04	-113,221	-1,95E+04
		1:8	-122,291	-2,10E+04	-112,887	-1,94E+04
		1:16	-122,571	-2,11E+04	-112,174	-1,93E+04
		1:32	-117,348	-2,02E+04	-109,295	-1,88E+04
	315	1:0	-124,511	-2,14E+04	-115,081	-1,98E+04
		1:4	-122,679	-2,11E+04	-112,685	-1,94E+04
		1:8	-121,929	-2,10E+04	-112,566	-1,93E+04
		1:16	-121,635	-2,09E+04	-111,491	-1,92E+04
		1:32	-121,214	-2,08E+04	-110,670	-1,90E+04