

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO
DE ÁCIDOS NUCLEICOS EMPREGANDO TIOFLAVINA T COMO SONDA
FLUORIMÉTRICA BASEADA NO CONCEITO *off-on***

ALLYSSON ROBERTO BARBOSA DE LIMA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

ALLYSSON ROBERTO BARBOSA DE LIMA

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE
ÁCIDOS NUCLEICOS EMPREGANDO TIOFLAVINA T COMO SONDA
FLUORIMÉTRICA BASEADA NO CONCEITO *off-on*

Dissertação de mestrado apresentado ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Isis Martins Figueiredo

Coorientador: Prof. Dr. Josué C. Caldas Santos

Maceió – AL
2017

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade

L732d Lima, Allysson Roberto Barbosa de.
Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de ácidos nucleicos empregando Tioflavina T como sonda fluorimétrica baseada no conceito *off-on* / Allysson Roberto Barbosa de Lima. ó 2017.
65 f. : il.

Orientadora: Isis Martins Figueiredo.
Coorientador: Josué Carinhonha Caldas Santos.
Dissertação (Mestrado em Química) ó Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2017.

Bibliografia: f. 60-64.
Apêndice: f.65

1. Tioflavina T. 2. Sonda espectrofotométrica. 3. Conceito *off-on*. 4. DNA ó Fluorescência molecular. 5. RNA ó Fluorescência molecular. 6. Saliva. I. Título.

CDU: 543.9



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

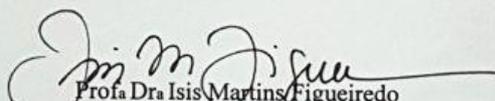


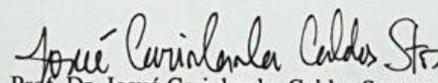
BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone/Fax: (82) 3214-1144
email: ppgqb.ufal@gmail.com

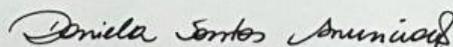
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Allysson Roberto Barbosa de Lima**, intitulada: “Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de ácidos nucleicos empregando Tioflavina T como sonda fluorimétrica baseada no conceito off-on”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, no dia 03 de abril de 2017, às 13h30, na Sala de Reuniões do IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA


Profa Dra Isis Martins Figueiredo
Orientadora (PPGQB/UFAL)


Prof. Dr. Josué Carinhonha Caldas Santos
Coorientador (PPGQB/UFAL)


Profa Dra Daniela Santos Anunciação
(PPGQB/UFAL)


Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
(ESENFAR/UFAL)

Dedico este trabalho aos meus pais por serem exemplos de vida. Por todo amor e carinho passados para mim. Como também dedico a minha irmã e minha namorada por acreditarem nas minhas escolhas e determinação para vencer as batalhas da vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, por me proporcionar sabedoria, foco, fé, proteção e determinação para vencer os obstáculos da vida e assim conseguir realizar aos poucos um dos sonhos da minha vida.

À minha FAMÍLIA, por todo apoio, compreensão nas escolhas da vida e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Benedito Roberto de Lima e Francisca Barbosa de Lima, por toda educação ensinada, pelo apoio, dedicação, carinho e amor. Enfim, por serem exemplos de pessoas humildes, nos quais me espelho a cada dia, meu muito obrigado. Te amo pai e mãe.

À minha única irmã Amanda Francine Barbosa de Lima, mesmo longe, torcendo por mim, me apoiando a enfrentar todas as batalhas que surgem ao longo da vida.

À minha tia Benildes Peixoto de Lima, por toda ajuda, carinho e amor, a mim e toda minha família.

À minha namorada, Emily Clara Marinho Fonseca, que durante esses quase dez anos juntos, sempre me apoiou nas decisões. Por todo amor, companheirismo e compreensão nos momentos mais difíceis de uma pós-graduação.

Ao meu amigo Elysson David por toda ajuda no âmbito profissional, pela amizade saudável fora da Universidade. Meu muito obrigado!

Aos meus amigos João César e Isabella Miranda, que junto comigo entraram nessa jornada para vencermos várias batalhas. Por toda troca de conhecimentos, Obrigado amigos!

Ao meu amigo José Guimarães por toda ajuda nos obstáculos acadêmicos.

À minha amiga Laura Chagas, por compartilhar algumas experiências no laboratório a cerca do desenvolvimento do presente trabalho.

À professora Isis Martins Figueiredo e ao professor Josué Carinhanha Caldas Santos, por assumirem esse trabalho com muita dedicação, por compartilharem suas experiências e seus conhecimentos, pela paciência e compreensão. Muito obrigado!

A todos os meus amigos de curso e do laboratório (LINQA) que de alguma forma me ajudaram no processo de formação.

Por fim, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas – FAPEAL, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES pelo apoio financeiro.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

A determinação de ácidos nucleicos em amostras biológicas tem sido imprescindível nas últimas décadas para muitos processos analíticos, como reação de polimerase em cadeia (PCR), genotipagem, diagnóstico clínico, determinação de organismos geneticamente modificados em ingredientes alimentares, testes para determinação de DNA fetal em sangue materno, aplicações forenses, entre outros. Medidas de absorvância no UV-vis são comumente usadas para quantificação de ácidos nucleicos. Entretanto, os resultados obtidos são aproximados e a exatidão das medidas é limitada. Dessa forma, este trabalho apresenta um método simples e rápido empregando a Tioflavina T (TT) como sonda sensível e seletiva para determinação de DNA e/ou RNA através de fluorescência molecular. O mecanismo da reação consiste na interação da TT com DNA ou RNA. Este mecanismo se baseia no conceito *off-on* em que a tioflavina livre em solução apresenta baixa fluorescência, mas ao interagir com o ácido nucleico, ocorre restrição de rotação na molécula de TT, tornando-a planar e possibilitando o alinhamento dos orbitais π , desta forma, provocando aumento na intensidade de fluorescência. Após a adição de DNA, a TT mostrou um desvio para o vermelho (efeito batocrômico) nos espectros de absorção molecular, indicando que ocorre interação com a macromolécula. As condições experimentais foram otimizadas empregando DNA de salmão como modelo experimental de ácido nucleico (stDNA) em pH = 5, tampão MES (10 mM) e a concentração de TT em 5 μM . No estudo da força iônica observou-se que o aumento da concentração de NaCl (0 - 150 mM) desfavorece o processo de interação TT-DNA, indicando que a interação se dá por meio de atrações eletrostáticas. Além disso, realizou-se o estudo do modo de ligação com os competidores como brometo de etídio e berenil evidenciando que um segundo tipo de interação ocorre preferencialmente via *groove*. Nestas condições, a sonda respondeu a diferentes ácidos nucleicos (DNA e RNA) de forma imediata, sendo o sinal estável pelo menos até 120 min. O método proposto apresentou faixa linear de concentração de 0,1-1,5 mg L^{-1} em stDNA com limite de detecção (LOD) de 0,012 mg L^{-1} e desvio padrão relativo (RSD) menor que 3,7%. Quando se utilizou RNA como padrão a faixa linear foi de 0,25-3,0 mg L^{-1} com LOD de 0,073 mg L^{-1} e RSD menor que 3,2 %. Os íons Fe(III) e as proteínas albumina e lisozima foram os principais interferentes do método. Por fim, determinou-se a concentração de ácidos nucleicos em uma amostra de DNA extraído de plasma sanguíneo (padrão stDNA – 57 mg L^{-1} e ctDNA – 48,5 mg L^{-1}), além disso, também foi realizado o ensaio de recuperação empregando ctDNA e stDNA em amostras de saliva, no qual obteve-se recuperações na faixa de 67-89%.

Palavras-Chave: Tioflavina T. Sondas. Conceito *off-on*. DNA e RNA. Saliva.

ABSTRACT

The nucleic acid determination in biological samples has been essential in the last decades for many analytical processes, such as polymerase chain reaction (PCR), genotyping, clinical diagnosis, genetically modified organism determination in food ingredients, fetal DNA maternal blood test, forensic applications and others. Absorbance measurements in the UV-vis region are frequently employed for nucleic acid quantifications. Nevertheless, the results are often approximated and measurement accuracy is limited. Thus, this work presents a low-cost and simple method for DNA and/or RNA determination employing Thioflavin T (TT) by molecular fluorescence. The reaction mechanism consists of the interaction of TT and DNA or RNA. This mechanism is based on the off-on concept in which the free TT in solution shows low fluorescence but when interacts with the nucleic acid there is a rotation restriction in the TT molecule, becoming rigid, which allows the alignment of π orbitals and consequently increases its fluorescence intensity. After the addition of DNA, TT showed a redshift (bathochromic effect) in the molecular absorption spectra, indicating that there is interaction with the macromolecule. Experimental conditions were optimized applying salmon test DNA as experimental model for nucleic acids (stDNA) in pH = 5, MES buffer solution (10 mM) and TT concentration of 5 μM . For the ionic strength studies, it was observed that increasing NaCl concentration (0 – 150 mM) the TT-DNA interaction process is disfavored, indicating that the interaction mechanism occurs through electrostatic attractions. Moreover, binding mode assays with competitors (ethidium bromide and berenil) were performed, showing that the second type of interaction occurs preferentially by *groove*. In those conditions, the probe was able to respond immediately to different nucleic acids, with the signal stable for at least 120 min. The proposed method presents a 0.1 – 1.5 mg L^{-1} linear range in stDNA, with a LOD of 0.012 mg L^{-1} relative standard deviation lower than 3.7 %. Applying RNA as a standard, the method shows linear range of 0.25 – 3.0 mg L^{-1} , LOD of 0.073 mg L^{-1} and RSD lower than 3.2 %. Fe(III) ion and albumin and lysozyme proteins were the main interference species to the method. At last, the concentration of nucleic acids in a DNA sample extracted from blood plasma was determined (stDNA – 57 mg L^{-1} and ctDNA – 48,5 mg L^{-1} standards), moreover, it was performed a recovery assay applying ctDNA and stDNA in saliva samples whose recoveries in the range of 67 – 89%.

Key-words: Thioflavin T. Probes. *off-on* concept. DNA and RNA. Saliva.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Diagrama de Jablonski.....	15
Figura 2 –	Demonstração do sistema <i>off-on</i> . Modo desligado (<i>turn off</i>) somente o analito e modo ligado (<i>turn on</i>) analito na presença da sonda emitindo fluorescência.....	17
Figura 3 –	Estrutura química da TT. a) Na forma de linhas; b) Na forma de linhas e bolas demonstrando a livre rotação da ligação simples.....	17
Figura 4 –	Estrutura do DNA dupla fita e formação dos pares de bases AT e CG.....	20
Figura 5 –	Exemplificação dos modos de interação (ligações covalentes e não covalentes) de compostos com DNA.....	21
Figura 6 –	Estruturas dos tipos de sondas fluorimétricas encontradas em trabalhos de interação com DNA, seguido dos valores para 100 mg da sonda (exceto <i>Sybr green I</i>) e tipo de interação.....	22
Figura 7 –	Espectro de absorvância da formação do complexo (Tris 5 mM, pH = 7,4, 25 °C). a) TT (5 µM) e stDNA (0 – 128 mg L ⁻¹) e a.1) TT (5 µM) e stDNA (128,0 mg L ⁻¹); b) TT (10,0 µM) e stDNA (0 – 256 mg L ⁻¹) e b.1) TT (10 µM) e stDNA (256 mg L ⁻¹).....	34
Figura 8 –	Espectros de fluorescência da TT (10 µM) (Tris 5 mM, pH = 7,4, 25 °C, slit 5x5) com adição de incrementos de a) ctDNA de 0 – 64 mg L ⁻¹ ; b) stDNA 0 – 64 mg L ⁻¹ ; c) gráfico comparativo da intensidade de fluorescência (IF) entre stDNA e ctDNA.....	36
Figura 9 –	a) Avaliação da sensibilidade analítica com a variação do pH (2 - 8); Espectro TT 5 µM (tampão fosfato 5 mM) titulada com incrementos de: b) stDNA (0 – mg L ⁻¹) em pH = 5; c) stDNA (0 – 4 mg L ⁻¹) em pH = 2; d) stDNA (0 – 4 mg L ⁻¹) em pH = 8.....	40
Figura 10 –	Estrutura das moléculas que compõe os sistemas tampão avaliados.....	40
Figura 11 –	Avaliação do tipo de solução tampão na sensibilidade analítica (gráficos a; b; c; d; e) e razão a/B (gráficos f; g; h; i; j). Tampão 5 mM, TT 5 µM, stDNA (0 – 4 mg L ⁻¹), 25 °C.	42
Figura 12 –	Efeito da concentração do MES (mM) na sensibilidade analítica (Tampão	

	pH = 5, TT 5 μM , stDNA (0 – 4 mg L^{-1}), <i>slit</i> 5x10, 25 °C.....	43
Figura 13 –	Avaliação da concentração de NaCl (mM) na sensibilidade analítica (Tampão MES 10 mM. pH = 5, TT 5 μM , stDNA (0 – 4 mg L^{-1}), <i>slit</i> 5x10, 25 °C).....	44
Figura 14 –	a) Espectro da 5F2 b) Espectro da 5B8 com diferentes incrementos de stDNA (0 – 4 mg L^{-1}) para ambos; c) Estrutura da 5F2 e c) Estrutura da 5B8 . (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μM , stDNA (0 – 4 mg L^{-1}), 25 °C).....	45
Figura 15 –	a) Efeito da concentração da Tioflavina T (μM) na sensibilidade analítica; b) razão coeficiente angular por branco analítico x concentração Tioflavina T (μM). (Tampão MES 10 mM pH = 5, stDNA (0 – 4 mg L^{-1}), <i>slit</i> 5x10, 25 °C).....	46
Figura 16 –	Espectros TT com incrementos de stDNA (0 – 0,5 mg L^{-1}) a) TT (5 μM); b) TT (10 μM); c) TT (25 μM). (Tampão MES 10 mM pH = 5, <i>slit</i> 5x10, 25 °C).....	47
Figura 17 –	a) Gráfico do perfil do estudo cinético (IF x Tempo); b) Gráfico do perfil do estudo de estabilidade. (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μM , stDNA (0 – 4 mg L^{-1}), <i>slit</i> 5x10, 25 °C).....	48
Figura 18 –	Gráfico de IF em função da concentração de stDNA (0 - 150 mg L^{-1}). (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μM , 25 °C).....	49
Figura 19 –	Estrutura dos competidores: a) brometo de etídio e b) berenil.....	51
Figura 20 –	Gráfico comparativo entre brometo de etídio e berenil por K_{SV}	52

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Equações das retas para análise dos *slits* (Tris 5 mM, pH = 7,4, 25 °C); TT (5 µM) com incrementos de stDNA (0,0 – 37,3 mg L⁻¹). *a = coeficiente angular e B = branco analítico (curva mg L⁻¹)..... 38
- Tabela 2 – Avaliação da constante de ligação K_b e número de bases (*n*) que contém uma molécula de TT na presença de NaCl (mM). Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 µM, stDNA (0 - 150 mg L⁻¹), 25 °C)..... 50
- Tabela 3 – Constante de Stern-Volmer na ausência e presença de NaCl (100 mM) para brometo de etídio (EB) e berenil. (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 µM, stDNA 6 µM, 25 °C)..... 51
- Tabela 4 – Dados dos cálculos das figuras de mérito. FL – faixa linear . (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 µM, 25 °C)..... 53
- Tabela 5 – Dados referentes ao estudo dos possíveis interferentes. (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 µM, stDNA (0,5 mg L⁻¹), 25 °C)..... 54
- Tabela 6 – Resultados da recuperação do stDNA adicionado e concentração de ácidos nucleicos totais (padrão: stDNA) presente nas salivas (diluídas 200x)..... 56

LISTA DE ABREVIATURAS

ctDNA	DNA do timo do vitelo (bezerro) (do inglês “ <i>Calf thymus</i> ”)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”)
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
EB	Brometo de etídio (do inglês “ <i>Ehtidium bromide</i> ”)
FD	Fator de diluição
FL	Faixa linear
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazina-1-etanosulfônico
IF	Intensidade de fluorescência
K_b	Constante de ligação
K_{SV}	Constante de Stern Volmer
LOD	Limite de detecção (do inglês “ <i>Limit of detection</i> ”)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês “ <i>Limit of quantification</i> ”)
MES	Ácido 4-Moforfolinoetanosulfônico
MOPS	Ácido 4-Moforfolinopropanosulfônico
PIPES	Ácido 1,4-Piperazinadietanosulfônico
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês “ <i>ribonucleic acid</i> ”)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês “ <i>relative standard deviation</i> ”)
stDNA	DNA de salmão (do inglês “ <i>salmon test DNA</i> ”)
Tris	2-Amino-2-hidróximetil-1,3-propanodiol
TT	Tioflavina T
UV-vis	Ultravioleta-visível
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
5F2	4-(benzo[d]tiazol-2-il)-N,N-dimetilanilina
5B8	4-(benzo[d]imidazol-2-il)-N,N-dimetilanilina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	14
1.1	Características gerais do DNA.....	19
2	OBJETIVOS.....	23
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	24
3.1	Reagentes e Preparo das soluções	24
3.2	Equipamentos utilizados	27
3.3	Procedimentos	27
3.3.1	Determinação da concentração de stDNA (<i>salmon tests</i>) e ctDNA (<i>Calf thymus</i>)	27
3.3.2	Escolha do tipo de ácido nucleico (stDNA x ctDNA)	28
3.3.3	Avaliação espectrofotométrica da interação macromolécula-ligante	28
3.3.4	Estudo da largura das fendas (<i>slit</i>) de excitação e emissão.....	28
3.3.5	Avaliação do pH do meio e tipo de tampão	29
3.3.6	Avaliação da concentração do tampão.....	29
3.3.7	Estudo da força iônica do meio.....	30
3.3.8	Estudo da concentração do ligante (Tioflavina T)	30
3.3.9	Análise da cinética e estabilidade da reação e cálculo da constante de ligação	30
3.3.10	Avaliação do modo de ligação	31
3.3.11	Figuras de mérito	31
3.3.12	Análise dos possíveis interferentes.....	32
3.3.13	Ensaio de recuperação.....	32
3.3.14	Tratamento estatístico dos dados	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	34
4.1	Avaliação da interação macromolécula-ligante por UV-vis	34
4.2	Avaliação do tipo de DNA a ser utilizado (stDNA x ctDNA).....	35
4.3	Estudo da otimização das larguras das fendas (<i>slit</i>) de excitação e emissão	37
4.4	Estudo de otimização do pH e tipo de tampão.....	39
4.5	Avaliação da concentração do tampão.....	43
4.6	Estudo da força iônica.....	44
4.7	Avaliação da concentração da sonda (TT)	45
4.8	Estudo cinético, estabilidade e cálculo da constante de ligação (K_b)	47
4.9	Avaliação do modo de ligação	50
4.10	Figuras de mérito	52
4.11	Análise dos possíveis interferentes.....	53
4.12	Ensaio de recuperação.....	55

5	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE A	65

1 INTRODUÇÃO GERAL

Nos últimos anos, diversos estudos têm sido desenvolvidos com o interesse na determinação de diferentes tipos de materiais (DNA/RNA, aminoácidos, proteínas, células) em amostras biológicas. Esses estudos envolvem, principalmente, a determinação de materiais genéticos, a exemplo do DNA, pois este está relacionado a uma variedade de procedimentos analíticos, tais como: reação em cadeia da polimerase (PCR), diagnóstico clínico, genotipagem, aplicações forenses, entre outros.

Nesse sentido, métodos analíticos têm sido desenvolvidos com a prerrogativa de determinar e/ou monitorar esse tipo de material biológico (DNA) e para isso se utilizam sondas analíticas que são espécies químicas responsáveis pela determinação/monitorização de outras substâncias por meio de um sinal mensurável (MURUDKAR et al., 2012). As técnicas eletroquímicas, quimioluminescentes e de fluorescência molecular são as mais utilizadas para esse tipo de aplicação, sendo esta última destacada por apresentar boa reprodutibilidade, precisão em análises traço, alta sensibilidade e versatilidade (MURUDKAR et al., 2014).

A fluorescência molecular é uma técnica baseada na interação da radiação eletromagnética com a matéria. Seu princípio baseia-se em uma espécie que absorve radiação em um determinado comprimento de onda (λ), ou seja, no λ_{ex} (comprimento de onda de excitação), onde o elétron é excitado para um nível de maior energia. Após essa etapa, uma parte dessa energia é perdida, principalmente, por dois tipos de relaxação não-radiativas, ou seja, conversão interna e relaxação vibracional, que podem ser caracterizadas em função de colisões moleculares, vibração/torção molecular e/ou transferida para moléculas que estejam próximas. Neste sentido, a energia residual é emitida na forma de fóton até que o elétron retorne ao seu estado fundamental (Figura 1) (FILHO, 2005; SKOOG et al., 2006).

O comprimento de onda de excitação pode ser diferenciado do comprimento de onda de emissão (Figura 1), pois os fótons emitidos apresentam menor quantidade de energia que os fótons de excitação (absorção) e por consequência, maiores λ , como pode ser observado na equação 1, onde a energia é inversamente proporcional ao comprimento de onda (LAKOWICZ, 2006; FILHO, 2005).

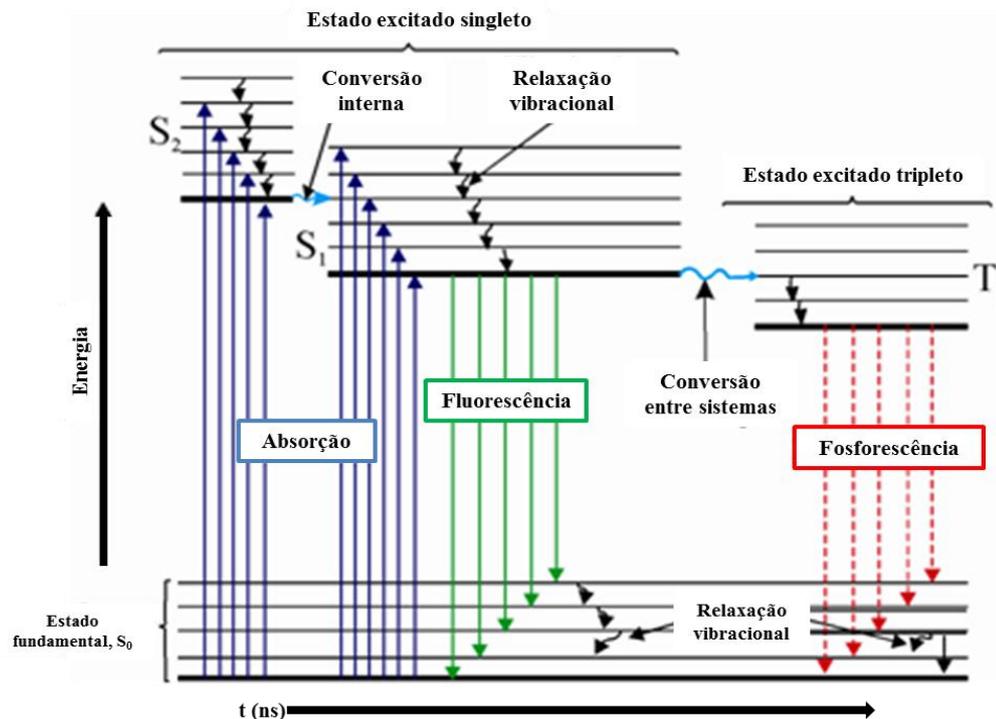
$$E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{equação 1}$$

em que, **E** é a energia do fóton, **h** a constante de Planck, **c** a velocidade da luz e λ o comprimento de onda (LAKOWICZ, 2006; SKOOG et al., 2006).

Além disso, no processo fluorescência a orientação do *spin* do elétron é mantida mesmo no estado excitado, ou seja, estado excitado singleto, possibilitando maior facilidade para emparelhamento dos *spins* dos elétrons ao retornar ao estado fundamental. Por consequência, um tempo de vida de emissão de radiação menor ($10^{-10} - 10^{-5}$ s) quando comparado a fosforescência.

A fosforescência molecular é um processo bastante similar à fluorescência molecular, diferenciando-se no seu tempo de emissão de radiação, que pode ocorrer na escala de segundos a horas ($10^{-5} - 10^4$ s). Neste processo, ocorre a alteração na multiplicidade do spin (convertendo-se de singleto para tripleto), ou seja, o elétron absorve radiação passando para o estado excitado singleto, logo após sendo convertido para o estado excitado tripleto e por fim, retornando ao estado fundamental na forma singleto (figura 1). Todo esse caminho faz com que essa emissão de radiação seja em um período maior de tempo, diferenciando-se assim da fluorescência molecular (SKOOG et al., 2006).

Figura 1 - Diagrama de Jablonski.



Fonte: adaptado de Thermofisher probes, 2017.

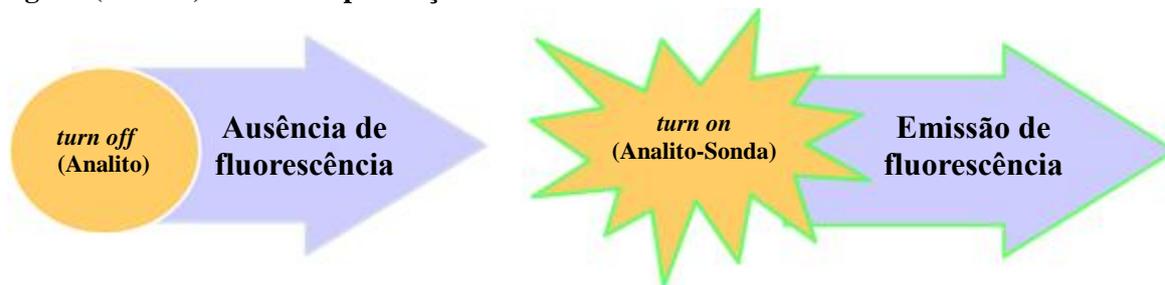
Sabendo essas informações a cerca das sondas analíticas e da técnica fluorescência molecular, é possível inferir que a busca por sondas empregando a respectiva técnica é de grande interesse em diversas metodologias, podendo ser utilizadas em análises clínicas, análises forenses, criminais, processos de biologia molecular e celular e, principalmente, em estudos que tem interesse em detectar e quantificar ácidos nucleicos (DNA e/ou RNA). Os

ácidos nucleicos são importantes devido ao seu papel fundamental nos processos da vida, tais como: processos de replicação, síntese de proteínas e transporte de informações do código genético (NELSON; COX, 2011). Neste enfoque, sondas analíticas fluorescentes são aquelas espécies empregadas para estudar o comportamento de um analito por meio de sinal mensurável, ou seja, através da emissão de fluorescência. Esse sinal, geralmente, pode ser medido pela mudança no comportamento espectral da sonda analítica frente ao analito, quando a própria espécie a ser estudada não pode ser medida diretamente por fluorescência, em que um complexo supramolecular formado emite fluorescência, ou ainda por meio da supressão da intensidade de fluorescência da sonda.

De acordo com Murudkar e colaboradores (2014) e Narayanaswamy e colaboradores (2014) a utilização de sondas fluorescentes baseadas no conceito *off-on* são as mais desejáveis para serem empregadas em sistemas de detecção/quantificação de ácidos nucleicos devido ao aumento da intensidade de fluorescência (IF) das sondas na presença dos ácidos nucléicos, principalmente de DNA. A escolha de sondas baseadas no princípio *off-on* está relacionada ao menor grau de interferência que estas podem gerar na medição do sinal, visto que, moléculas que apresentam fluorescência no seu estado livre tem maior probabilidade de serem desativadas por espécies vizinhas, seja por colisões ou formações de espécies secundárias e ainda por causar danos na amostra a ser analisada, produzindo, por exemplo, substâncias radiculares em sistemas celulares em função da emissão contínua de radiação.

O princípio *off-on* é um modelo de análise muito aplicado por meio da técnica de fluorescência molecular, sendo denominado como sistema “desligado-ligado”. Esse tipo de sistema emprega uma sonda analítica, ou seja, uma molécula que emite fluorescência na presença de determinada espécie, geralmente aquela que não emite fluorescência intrínseca e não poder ser medida diretamente pela técnica (Figura 2) (ZIMMERMANN-DIMER; MACHADO, 2008; NARAYANASWAMY et al., 2014). Essa denominação *off-on* ocorre, principalmente, em análises que envolvem espécies biológicas, por exemplo na detecção/quantificação de DNA, em que a macromolécula e o ligante separadamente não apresentam sinal de fluorescência, pois estão no modo “desligado”, mas no momento em que essas espécies são colocadas em contato, irá possibilitar a interação e por consequência apresentar emissão de fluorescência (modo “ligado”).

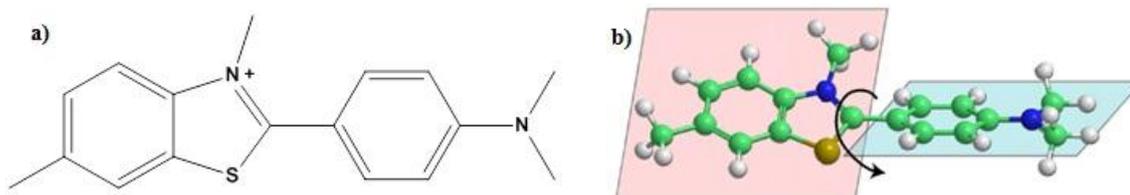
Figura 2 – Demonstração do sistema *off-on*. Modo desligado (*turn off*) somente o analito e modo ligado (*turn on*) analito na presença da sonda emitindo fluorescência.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Dentre as várias sondas analíticas fluorescentes encontradas na literatura, pode-se destacar a Tioflavina T (TT), uma molécula que apresenta em sua estrutura um núcleo benzotiazólico, que contém um grupamento metila ligado ao nitrogênio do anel, conferindo uma carga positiva fixa. Este núcleo é separado, por uma ligação simples do anel aromático que contém uma amina metilada (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura química da TT. a) Na forma de linhas; b) Na forma de linhas e bolas demonstrando a livre rotação da ligação simples.



Fonte: adaptado de BIANCALANA; KOIDE, 2010.

Essa molécula é muito utilizada em estudos para detectar e monitorar a formação de fibrilas proteicas, também denominada de amilóides, que são espécies responsáveis pela causa de doenças neurodegenerativas, a exemplo do mal de Alzheimer e mal de Parkinson. Além dessa aplicação, também podem ser encontrados estudos de interação formando compostos supramoleculares monitorados por fluorescência molecular, sendo um dos alvos de interesse, a interação com DNA e/ou RNA, onde esse tipo de interação provoca aumento na emissão de fluorescência podendo ser monitorada por esta técnica (MURUDKAR et al., 2012; SINGH et al., 2012; LIU et al., 2013).

Uma característica imprescindível da TT que chama atenção em diversos trabalhos e faz com que seja escolhida para ser empregada, está relacionada com seu movimento de rotação livre não radioativa no estado fotoexcitado, em função da ligação simples entre o carbono do núcleo benzotiazólico e o carbono do anel aromático. Essa característica

possibilita a TT apresentar baixo rendimento quântico (10^{-4}) em sistema aquoso, mas ao interagir com determinado analito, a exemplo de DNA, faz com que tal movimento de rotação livre seja dificultado, permitindo o alinhamento entre os orbitais pi (π) e assim aumentando a intensidade de emissão de fluorescência. Além disso, segundo o trabalho de Murudkar e colaboradores (2012), a TT quando comparada a outras espécies que são utilizadas em estudos com DNA, a exemplo do 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e brometo de etídio (EB), apresenta sinal de fluorescência pelo menos duas vezes maior.

Vários trabalhos encontrados na literatura realizaram estudos da TT com DNA do ponto de vista de interação, a exemplo do trabalho de Murudkar e colaboradores (2014) que aplicou técnicas de espectrofotometria na região do UV-vis e fluorescência molecular para observar a interação TT-DNA. Nas análises realizadas por UV-vis eles constataram a interação entre a sonda e macromolécula por meio do deslocamento batocrômico que foi confirmada pelo aumento de fluorescência na presença de concentrações crescentes de DNA. Além disso, calcularam a constante de ligação (K_b) por meio da equação modificada de Benesi-Hildebrand e obtiveram valores estimados em $3,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ na ausência de NaCl. Quanto ao modo de interação foi demonstrado que a interação TT-DNA acontece por dois modos de ligação: eletrostático e intercalação.

Já Ilanchelian e Ramaraj (2004) constataram a interação TT-DNA por espectrofotometria na região do visível através de efeito hipocrômico, diminuição da absorvância, e por fluorescência molecular ($\lambda_{\text{ex}} = 445 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 485 \text{ nm}$) por meio do aumento da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de DNA (tampão Tris 10 mM, pH = 8). A constante de ligação foi calculada pela equação modificada de Benesi-Hildebrand apresentando um valor de K_b de $3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ na ausência de NaCl. Em relação ao modo de ligação, os autores inferem que na verdade ocorrem dois tipos, um via interação eletrostática e outro via sulcos do DNA (*groove*).

Dessa maneira, observa-se que não há um consenso quanto ao segundo modo de ligação que ocorre e ainda a maioria dos estudos encontrados da interação entre TT e DNA não fazem determinação de ácidos nucleicos em amostras reais, assim como não fazem otimização do método para esses tipos de estudos.

Além desses trabalhos de TT-DNA, é possível também encontrar outros que fazem a síntese de possíveis sondas fluorescentes para detectar e determinar DNA em diferentes amostras sintéticas e/ou reais. Wu e colaboradores (2008) sintetizaram uma sonda baseada no núcleo de acridina, que foi analisada frente ao DNA por meio de espectrofotometria na região do UV-vis e fluorescência molecular ($\lambda_{\text{ex}} = 260 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 451 \text{ nm}$) (tampão Tris 50 mM e pH

= 7,2). Nesse caso, os estudos foram realizados por meio do processo *quenching*, em que a sonda livre apresenta sinal de fluorescência e com adição de DNA ocorre a supressão dessa fluorescência. O limite de detecção foi calculado em $0,0087 \text{ mg L}^{-1}$, faixa linear $0,05 - 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ para ctDNA, a constante de ligação foi estimada em $7,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e o modo de ligação avaliado admitiu que a interação sonda-DNA ocorreu via intercalação entre os pares de base da macromolécula.

Em um segundo trabalho realizado por Qiu e colaboradores (2008), estes também sintetizaram uma sonda fluorimétrica baseada no núcleo da acridona e realizaram estudos por meio de espectrofotometria (UV-vis) e fluorescência molecular ($\lambda_{\text{ex}} = 254 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 426 \text{ nm}$) (tampão fosfato 50 mM , $\text{pH} = 9$). Neste contexto, os estudos desenvolvidos foram realizados por meio do processo *on-off*, onde a sonda emite fluorescência, mas em contato com o analito (DNA) ocorre supressão de fluorescência, um indicativo da interação sonda-DNA. Em condições ótimas o método apresentou faixa linear de $1 - 20 \text{ mg L}^{-1}$ com limite de detecção de $0,020 \text{ mg L}^{-1}$. A constante de ligação foi estimada em $4,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e seu modo de ligação foi determinado como via *groove*.

Neste sentido, observa-se que a depender do tipo de estrutura da sonda, o modo de ligação e as propriedades analíticas diferem, mas também pelos exemplos relatados o emprego dessas sondas não são interessantes, visto que o λ_{ex} está na região do ultravioleta, o que provoca a produção de espécies indesejadas (radicalares) e também degradação de espécies presentes em meios biológicos (NARAYANASWAMY et al., 2014).

1.1 Características gerais do DNA

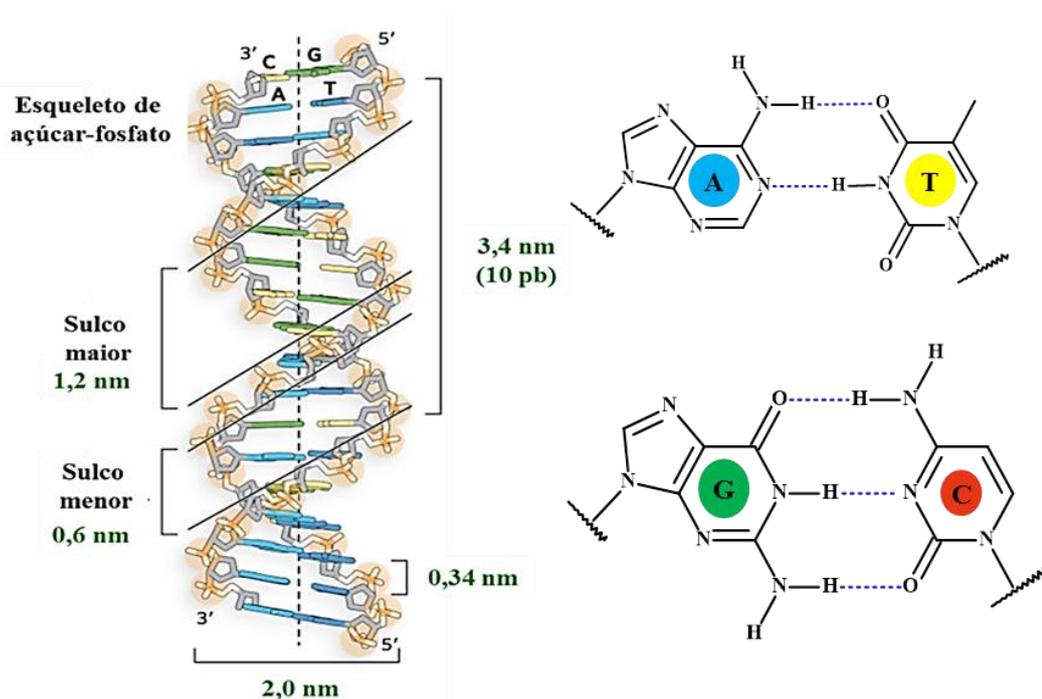
O conhecimento sobre a estrutura e organização dos ácidos nucleicos é de suma importância para diversos procedimentos analíticos. Sendo assim, o emprego de modelos de ácidos nucleicos como referencial também é importante, pois permite realizar estudos comparativos entre os diferentes procedimentos que são utilizados. De um modo geral, o DNA duplex é modelo mais utilizado em vários estudos e é aquele modelo de DNA que foi proposto por James Dewey Watson e Francis Crick, apresentando-se em sua organização duas cadeias helicoidais (fitas) que se entrelaçam formando uma dupla hélice (NELSON; COX, 2011).

O DNA é composto por unidades monoméricas menores denominadas nucleotídeos, no qual cada nucleotídeo é formado por uma base nitrogenada, um açúcar (pentose), monossacarídeo com cinco átomos de carbono e um grupamento fosfato. A diferença básica do DNA para o RNA ocorre em função do tipo de açúcar, em que no DNA é uma

desoxirribose e no RNA uma ribose, além do RNA apresentar apenas uma fita e ter uma base nitrogenada diferente (uracila) no lugar da timina.

Ainda no sentido da macromolécula DNA, a mesma organiza-se na sua parte externa da dupla fita por uma desoxirribose e os grupamentos fosfatos, enquanto na parte interna da dupla fita estão presentes as bases nitrogenadas (púricas e pirimidínicas) empilhadas (Figura 4). Sendo as bases púricas: adenina (A) e guanina (G) e as pirimidínicas: timina (T) e citosina (C). Cada fita do DNA é formada por uma combinação de quatro nucleotídeos ligados a desoxirribose e unidos por ligação do tipo fosfodiéster. Sendo a adenina (A) de uma fita ligada à timina (T) da outra fita por duas ligações de hidrogênio, enquanto a citosina (C) com a guanina (G) por meio de três ligações de hidrogênio (Figura 4), desse modo a organização sempre acontece aos pares de bases para o DNA desse modo: AT (TA) e CG (GC) (NAKAMOTO; TSUBOI; STRAHAN, 2008).

Figura 4 – Estrutura do DNA dupla fita e formação do pares de bases AT e CG.

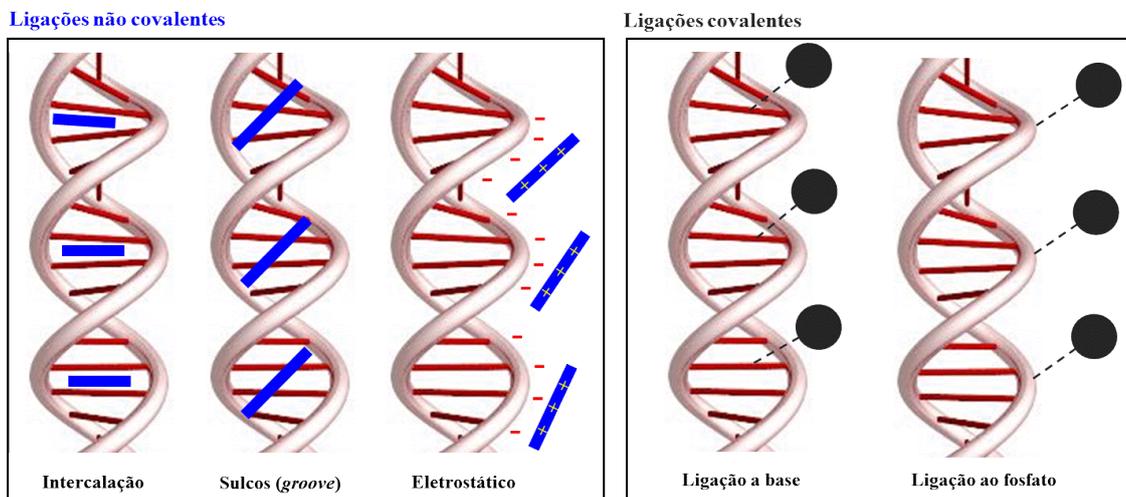


Fonte: SILVA, 2016.

O DNA por ser alvo de vários estudos encontrados na literatura, pode interagir com diferentes espécies por dois diferentes tipos, sendo elas: covalentemente (grupos fosfato ou bases do DNA), a exemplo da cisplatina [*cis*-diclorodiaminoplatina(II)] e agentes alquilantes (ciclofosfamida, bussulfam e as nitrosuréias) que apresentam atividade antitumoral (PUYO; MONTAUDON; POURQUIER; 2014). E por interação não covalente que se subdivide em:

interações eletrostáticas, intercalação e *groove*, sendo as duas últimas interações nos sulcos do DNA (Figura 5) (BARRA; NETTO, 2015).

Figura 5 – Exemplificação dos modos de interação (ligações covalentes e não covalentes) de compostos com DNA.

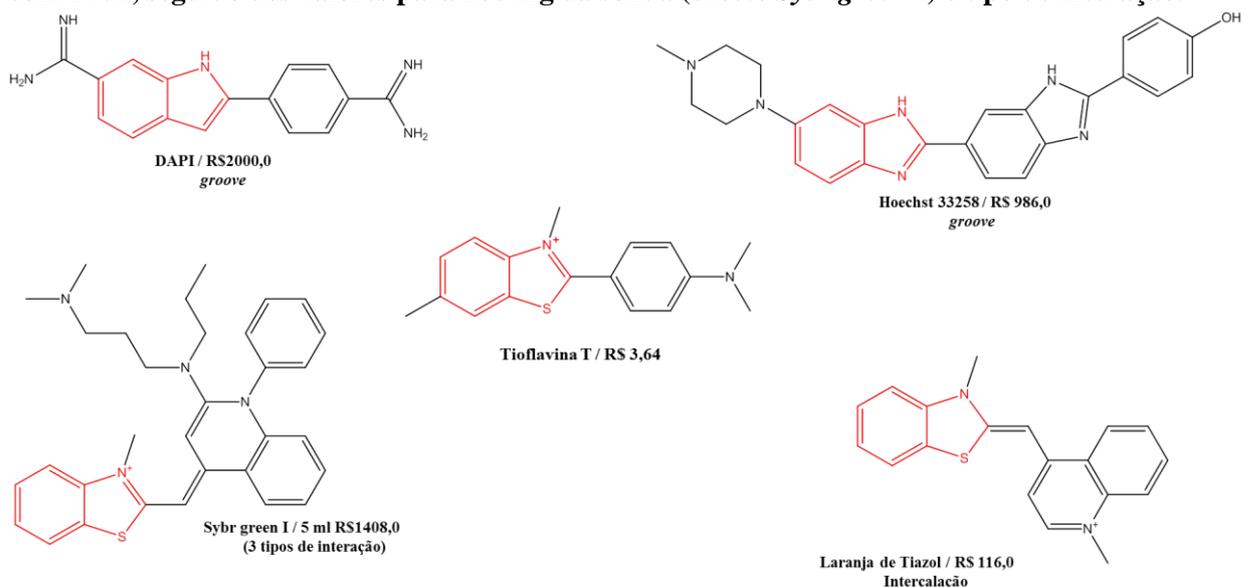


Fonte: SILVA, 2016.

Sendo assim, devido ao enfoque do trabalho estar relacionado apenas as interações não covalentes, somente esses tipos serão abordados. Neste sentido, as interações eletrostáticas (externa), são aquelas que ocorrem entre espécies carregadas positivamente com os grupamentos fosfatos carregados negativamente presentes na fita ou na superfície da molécula do DNA (Figura 5) (REHMAN, 2015). A interação via intercalação ocorre de um modo geral com uma molécula aromática ou aquela que possa apresentar vários núcleos aromáticos condensados, no qual irá adentrar entre os pares de bases do DNA de forma perpendicular ao eixo da hélice. Esse tipo de interação pode ser regido por diferentes forças intermoleculares a exemplo das ligações de hidrogênio, forças eletrostáticas e hidrofóbicas, além do empilhamento π dos grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e os grupos aromáticos do intercalante (MARTÍNEZ; CHACÓN-GARCÍA, 2005). Por fim, a interação via sulco(s) (*groove*) do DNA é aquela que envolve diretamente a interação entre o ligante e a superfície dos pares de bases, seja no sulco menor ou maior. Estes sulcos se diferem tanto no potencial eletrostático quanto na composição das bases. Dentre as várias espécies que interagem via *groove* pode-se inferir que a maioria são espécies que apresentam em suas estruturas núcleos aromáticos não condensados, unidos por tipos de ligações que permitem livre rotação, podendo citar alguns exemplos: Hoechst 33258, berenil e DAPI (ZHANG, HUANG, 2007; SALVIA, 2013).

Dessa maneira, sabendo-se as informações estruturais, a importância em diversos processos biológicos acerca das macromoléculas (DNA/RNA) e a possibilidade de estudo desses analitos por meio de uma sonda fluorescente, foi realizado este trabalho que visa o desenvolvimento de um método otimizado empregando a sonda fluorescente baseada no conceito *off-on* para determinar DNA/RNA em amostras biológicas. Neste contexto, foi escolhida a sonda Tioflavina T (TT) devido aos seguintes fatores: *i*) apresentar um núcleo similar a outras sondas encontradas na literatura e ser a de menor valor para aquisição (Figura 6). *ii*) os trabalhos encontrados que envolvem TT e DNA/RNA não fazem otimização de parâmetros químicos para detectar/determinar esses analitos e ainda estão voltados para estudos de interação, não demonstrando enfoque analítico e *iii*) não apresentar um consenso quanto ao modo de ligação preferencial (intercalação, *groove* e interação eletrostática).

Figura 6 – Estruturas dos tipos de sondas fluorimétricas encontradas em trabalhos de interação com DNA, seguido dos valores para 100 mg da sonda (exceto Sybr green I) e tipo de interação.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Desenvolver metodologia para avaliar a Tioflavina T (TT) como sonda espectroscópica para quantificação de ácidos nucleicos explorando o conceito *off-on*.

2.2 Específicos:

- a)* Otimizar condições experimentais para avaliar a interação TT e ácidos nucleicos afim de quantificá-los por espectrofluorimetria molecular na região do UV-vis;
- b)* Avaliar a cinética da reação nas condições otimizadas;
- c)* Avaliar parâmetros químicos, como: pH, tipo de tampão, concentração do tampão, força iônica e concentração da sonda;
- d)* Realizar estudos relativos à interação entre sonda e ácido nucleico estabelecendo valores de constante de ligação, número de pares de bases que se encontra uma molécula do ligante e modo preferencial de ligação;
- e)* Avaliar diferentes ácidos nucleicos quanto à origem e forma como ctDNA, stDNA e RNA, mediante interação com a sonda TT;
- f)* Avaliar possíveis interferentes quanto a resposta analítica do método;
- g)* Obter as principais figuras de mérito e aplicar/validar os resultados obtidos estatisticamente;
- h)* Aplicar o método desenvolvido para determinar/quantificar DNA extraído de plasma sanguíneo e ácidos nucleicos totais em amostras de saliva;

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes e Preparo das soluções

Os reagentes empregados para o desenvolvimento de todo o trabalho foram de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas em água ultrapura com resistividade específica de 18,2 M Ω cm, a partir de um sistema de purificação Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, USA).

O DNA (*Salmon tests*, stDNA) (Sigma), obtido a partir do esperma de salmão, foi utilizado como padrão analítico, modelo de ácido nucleico, para todos os estudos de otimização dos parâmetros físicos, químicos e avaliação da interação. Para o preparo da solução do referido DNA, foram pesados aproximadamente 10 mg do ácido nucleico, solubilizado inicialmente em tampão Tris (50 mM, pH = 7,4) e após a otimização dos parâmetros em tampão MES (10 mM, pH = 5). Em seguida, a solução do ácido nucleico foi colocada em repouso por 24 h a temperatura ambiente e após isso, colocada no banho de ultrassom (Quimis, modelo Q335D, Brasil), por 30 min, para garantir a solubilização do DNA e por consequência a homogeneidade da solução, por fim a mesma foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração a 4 °C (SAVARIZ et al., 2014).

Para o preparo do ligante (sonda analítica) Tioflavina T (Sigma) empregada para realização dos estudos de padronização e avaliação da mesma, foram pesados 0,0160 g da TT, na forma de sal de cloreto, solubilizado em cerca de 25 mL de água ultrapura, transferindo-se em seguida para um balão volumétrico de 50 mL. Logo após, a solução foi sonicada em banho de ultrassom por cerca de três minutos para a completa solubilização e, por fim avolumando-se para 50 mL. A partir dessa solução estoque (1 mM), 10 μ L da TT foram transferidos para um volume final de 2 mL em tubo de polietileno, perfazendo uma concentração final de 5 μ M da sonda.

O preparo da solução tampão Tris (50 mM, pH = 7,4) foi realizado pesando-se 1,2114 g de Tris (Sigma), solubilizando-se em água ultrapura. O ajuste para o pH = 7,4 foi realizado adicionando-se HCl (Merck). Por fim, a solução foi transferida para um balão volumétrico aferindo-se para o volume final de 200 mL.

A solução do tampão MES (10 mM, pH = 5) foi preparada pesando-se uma massa de 1,0861 g de MES (Sigma) dissolvendo-se em água ultrapura. Para o ajuste até pH = 5 foi utilizado HCl de maneira similar ao tampão Tris, HCl (Merck). Após o ajuste, o sistema resultante foi transferido para balão volumétrico de 500 mL, avolumando-se com água ultrapura.

Inicialmente, para avaliação de testes preliminares de interação macromolécula-ligante foi empregada a técnica de espectroscopia na região UV-vis. Nesse sentido, preparou-se estoque de stDNA (420 mg L^{-1}) e Tioflavina T (1 mM) como já mencionado anteriormente.

Para o ensaio da avaliação do melhor pH do meio, foi empregado tampão fosfato em diferentes pHs, sendo a solução do tampão (5 mM) preparada para cada valor de pH (2 - 8) pesando-se 0,0425 g de fosfato (Vetec) solubilizados em água ultrapura e seu pH ajustado com HCl (Merck) para meio ácido ou neutro e com NaOH (Vetec) para meio básico ou neutro, perfazendo um sistema final em um balão volumétrico com volume de 50 mL. Além desses estudos com tampão fosfato foram realizados também análises com diferentes pH e tipos de tampões simultaneamente, sendo eles: Tris, MES, HEPES, PIPES e MOPS (Todos Sigma-Aldrich). Para o preparo desses vários tampões foram empregadas as seguintes massas respectivamente: 0,0303 g, 0,0543 g, 0,0650 g, 0,0840 g e 0,0578 g. Solubilizados em água ultrapura, com ajuste dos pH empregando HCl (Merck) para meio ácido e NaOH (Vetec) para meio básico, avolumando-se com água ultrapura para um sistema final em balão volumétrico de 50 mL para cada tipo de tampão.

Para o estudo da melhor concentração do tampão a ser empregado após a escolha do pH e tipo de tampão, foi preparado tampão MES (pH = 5) nas seguintes concentrações: 2,5 / 5 / 10 / 25 / 50 e 100 mM. As suas massas medidas foram respectivamente: 0,0271 g, 0,0543 g, 0,1086 g, 0,2715 g, 0,5430 g e 1,0861 g, após esse procedimento, essas massas foram solubilizadas em água ultrapura em balões volumétricos para um volume final de 50 mL.

No estudo da força iônica, foram preparadas diferentes soluções de cloreto de sódio (NaCl) (Vetec) em tampão aquoso MES (10 mM, pH = 5) com as seguintes concentrações: 5 / 10 / 25 / 50 / 100 e 150 mM. Para o preparo dessas soluções foram utilizadas as seguintes massas respectivamente: 0,0146 g, 0,0292 g, 0,0730 g, 0,1460 g, 0,2920 g e 0,4383 g. Estas foram solubilizadas com água ultrapura e transferidas para seus respectivos balões volumétricos, avolumando-se para um volume final de 50 mL.

Para a análise da melhor concentração do ligante (sonda analítica) Tioflavina T (Sigma), foram escolhidas as seguintes concentrações para serem preparadas: 1 / 2,5 / 5 / 10 / 25 e 50 μM . Dessa forma, preparou-se uma solução estoque inicial (1 mM) pesando-se uma massa de 0,0160 g, solubilizados em água ultrapura sendo transferida para um balão volumétrico de 50 mL. A partir dessa solução, foram pipetados volumes específicos da sonda de acordo com as concentrações a serem avaliadas.

Na análise cinética e análise para cálculo da constante de ligação, foram preparadas apenas duas soluções: stDNA (420 mg L^{-1}) e Tioflavina T (1 mM), como já mencionado

anteriormente. A partir dessas soluções, foram pipetados diferentes volumes de acordo com as concentrações de stDNA a serem analisadas, enquanto da TT, foi pipetado um volume específico para atingir a concentração final de 5 μM .

Para o estudo do modo de ligação, preparou-se as soluções de berenil, brometo de etídio, stDNA e Tioflavina T. Para a solução de berenil (Sigma) foram pesados 0,0011 g sendo solubilizado em tampão MES (10 mM, pH = 5) para um volume final de 2 mL, perfazendo uma concentração de 1 mM. O brometo de etídio (Sigma) foi pesado de forma similar ao anterior, ou seja, com massa de 0,0011g solubilizados em tampão MES (10 mM, pH = 5) com volume final de 2 mL e fixando a concentração em 1,4 mM. A partir dessa solução foi preparado um segundo estoque de trabalho com a concentração de $1,0 \times 10^{-4}$ M.

Para realização dos experimentos envolvidos nas figuras de mérito foram preparadas as soluções de stDNA, ctDNA (DNA de *Calf thymus* - Sigma), obtido do timo do bezerro e RNA de torula (levedura) (Sigma). Essas soluções foram preparadas de maneira análoga, seguindo o mesmo procedimento do stDNA, ou seja, pesando-se 10 mg da macromolécula e solubilizando em tampão MES perfazendo concentração final de 420 mg L^{-1} , além disso, com exceção do RNA de torula os outros dois tipos de DNA foram colocados em repouso por 24 h, mas todos ficaram 30 minutos no banho de ultrassom.

No estudo dos possíveis interferentes do método foram empregadas as seguintes espécies de cátions: Na^+ , K^+ , Mg(II) , Ca(II) , Fe(III) , Zn(II) , Cu(II) , NH_4^+ e de ânions: Cl^- , F^- , SCN^- , HCO_3^- , SO_4^{2-} e NO_3^- , além das outras espécies, como: ureia, ácido linoleico, glicose, albumina e lisozima. Foram preparadas as seguintes soluções estoques e suas respectivas massas: NaCl (Vetec) – 0,5850 g (150 mM), KF (Jt Baker) – 0,0290 g (100 mM), MgSO_4 (Proquímios) – 0,1232 g (100 mM), NaHCO_3 (Reagen) – 0,0210 g (50 mM), FeCl_3 (Sigma-Aldrich) – 0,0811 g (100 mM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Luer) – 0,0386 g (10 mM), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) – 0,0125 g (10 mM), NH_4Cl (Vetec) – 0,0267 g (100 mM), Ureia (RP) – 0,0300 g (100 mM), NH_4SCN – 0,0380 g (100 mM), $\text{Ca(NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vetec) – 0,1180 g (100 mM), Na_2HPO_4 (Dinâmica) – 0,0710 g (100 mM) Ácido linoleico (Vetec) – 0,7011 g (0,5 M), Glicose (Sigma) – 0,0900 g, albumina (Sigma-Aldrich) – 0,0332 g ($1,0 \times 10^{-4}$ M) e lisozima (Sigma) – 0,0143 g ($1,0 \times 10^{-4}$ M).

Todas os reagentes foram solubilizados em água ultrapura para volume final de 5 mL, exceto a solução de zinco(II) que foi preparada em 15 mL e a de lisozima em 10 mL de água ultrapura e o ácido linoleico em 5 mL de etanol em função da concentração.

Por fim, no ensaio de recuperação foram preparadas as soluções de stDNA e Tioflavina T de acordo com o procedimento anterior e a amostra de saliva foi coletada por

meio de dois colaboradores, dos quais, foi coletado cerca de 3 mL de amostra, aguardou-se cerca de 10 minutos em repouso e em seguida foi adicionado 3 mL de tampão MES (10,0 mM, pH = 5) em cada tubo falcon de 15 mL, logo após, foi colocado na centrifuga em 4000 rpm por 15 min e foi aspirado apenas a parte fluída.

3.2 Equipamentos utilizados

Para realização dos estudos de desenvolvimento de metodologia e avaliação da interação por meio da técnica de fluorescência molecular foi empregado o espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) equipado com lâmpada de xenônio de 150 W de potência e com cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm.

Para realização das medidas espectrofotométricas desenvolvidas no trabalho, foi empregado um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Micronal (modelo AJX-6100PC, Brasil) equipado com cubetas de quartzo de 10 mm de caminho óptico.

Nos estudos que envolviam medição ou ajuste do pH utilizou-se um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro Gehaka (modelo PG 1800, Brasil). Já para as medidas das massas dos reagentes foram empregadas: balança analítica eletrônica Gehaka (AG 200, Brasil) com precisão de 0,1 mg e balança analítica Mettler Toledo-AG245 com precisão de 0,01 mg. Ainda nesse sentido, quando necessária a solubilização completa de alguns reagentes foi utilizado um banho de ultrassom (Quimis, modelo Q335D, Brasil).

3.3 Procedimentos

3.3.1 Determinação da concentração de stDNA (*salmon tests*) e ctDNA (*Calf thymus*)

Inicialmente, ambos tipos de DNA foram pesados em uma balança analítica para uma massa final de 10,0 mg e adicionado a determinado volume de tampão MES (10 mM, pH = 5) para uma concentração comum final de 420 mg L⁻¹, foi necessário determinar a concentração molar da solução estoque por meio do coeficiente de extinção molar que tem valor de 6600 L mol⁻¹ a partir do sinal de absorvância em 260 nm após diluição na proporção de 1:100, tanto para o stDNA, quanto para o ctDNA. Além disso, para avaliar se as soluções dos dois tipos de DNA estavam livres de proteínas, calculou-se a razão do sinal de absorvância a 260 e 280 nm (A_{260}/A_{280}), obtendo valores entre 1,8-1,9 (MURUDKAR et al., 2014).

3.3.2 Escolha do tipo de ácido nucleico (stDNA x ctDNA)

Para escolha do tipo de DNA utilizado nos estudos posteriores, foram preparadas as duas soluções dos referidos tipos de DNA (modo de preparo já mencionado) ambas para uma concentração inicial de 420 mg L^{-1} e a solução estoque de TT (1 mM). Desse modo, foram preparadas duas curvas analíticas ($n=8$), sendo a primeira com stDNA e a outra com ctDNA. Assim, para cada curva foram adicionados diferentes volumes dos referidos DNA variando seus incrementos de $0 - 64 \text{ mg L}^{-1}$. As medidas dos espectros de fluorescência do complexo formado foram realizadas em $\lambda_{\text{exc}} = 434 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$. A escolha do tipo de DNA a ser empregado nos estudos posteriores foi realizada por meio daquele que apresentou os mais altos sinais de emissão de fluorescência com pequenas variações de incrementos do DNA.

3.3.3 Avaliação espectrofotométrica da interação macromolécula-ligante

Nessa avaliação foram fixados dois valores de concentração da sonda (Tioflavina T) $10 \text{ }\mu\text{M}$ (MURUDKAR et al., 2014) e $5 \text{ }\mu\text{M}$, sendo a sonda com a maior concentração titulada com diferentes incrementos de stDNA ($0 - 256 \text{ mg L}^{-1}$), enquanto a Tioflavina T de menor concentração com concentrações de stDNA ($0 - 128 \text{ mg L}^{-1}$). Desse modo, o procedimento geral ocorreu da seguinte maneira: foram colocados $20 \text{ }\mu\text{L}$ de Tioflavina T (1 mM) para um volume final de 2 mL, perfazendo uma concentração final de $10 \text{ }\mu\text{M}$ e $10 \text{ }\mu\text{L}$ do mesmo estoque da sonda para uma concentração final de $5 \text{ }\mu\text{M}$ em tubos diferentes, após isso, foram adicionados diferentes volumes de stDNA em seus respectivos tubos a depender da concentração de trabalho e por fim foi completado para 2 mL com tampão MES (10 mM, pH = 5). A solução resultante foi medida por espectrofotometria na faixa de $300 - 600 \text{ nm}$.

3.3.4 Estudo da largura das fendas (*slit*) de excitação e emissão

Nesse estudo foram avaliadas as larguras das fendas de excitação e emissão em função da emissão de fluorescência do complexo macromolécula-ligante formado. Dessa maneira, foram preparadas curvas analíticas com Tioflavina T numa concentração fixa de $5 \text{ }\mu\text{M}$ e foram adicionados diferentes incrementos de stDNA ($0 - 37,3 \text{ mg L}^{-1}$), assim empregando fluorescência molecular, foi feita a análise das fendas mantendo-se $\lambda_{\text{exc}} = 434 \text{ nm}$ e o $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$ e variou-se os valores das aberturas dos *slits* de excitação e emissão arbitrariamente de acordo com os seguintes valores (nm): 3×5 , 3×10 , 5×3 , 5×5 , 5×10 , 10×3 e 10×5 . A velocidade de varredura de todos os experimentos foi fixada em 400 nm min^{-1} e por meio

desse estudo foi escolhido o *slit* que apresentou a melhor sensibilidade para ser empregado nos estudos subsequentes.

3.3.5 Avaliação do pH do meio e tipo de tampão

Nessa avaliação, inicialmente empregou-se para análise do pH do meio, tampão fosfato 5 mM. Para isso, foram preparadas soluções desse tampão com diferentes valores de pH, na faixa de 2 – 8 com incrementos de 1 na escala de pH. Além disso, foram preparadas soluções estoques de stDNA e TT, e a análise do pH ótimo do meio foi realizada por meio de diferentes curvas padrões, com concentração fixa de TT em 5 μM e stDNA na faixa de 0 – 4 mg L^{-1} , sendo cada ponto das respectivas curvas avolumado com tampão fosfato de acordo com o pH a ser analisado. O critério para escolha do pH ótimo se deu por meio do coeficiente angular de cada curva analítica, que remete a sensibilidade do método e também em função do valor do sinal do branco analítico da curva (TT + tampão).

Além disso, foi realizado uma avaliação subsequente para diferentes tipos de tampão e conseqüentemente com seus respectivos valores de pH de trabalho. Desse modo, foram considerados os valores de pH de acordo com o $\text{pK}_a \pm 1$ e $\text{pH} = \text{pK}_a$ para cada espécie a ser analisada. A seguir são descritos os tipos de tampão com seus respectivos valores de pK_a à 25° C: Tris (8,0), MES (5,0), HEPES (7,5), PIPES (6,7) e MOPS (7,2) (Sigma-Aldrich buffer, 2016). Nesse sentido, as análises foram realizadas de acordo com cada valor de pH e tipo de tampão, ou seja, três curvas para cada espécie, mantendo-se a concentração fixa de TT, já mencionada, e adicionando-se diferentes incremento de stDNA 0 – 4 mg L^{-1} . Após a medida no espectrofluorímetro, os dados foram tratados e o pH ótimo e tipo de tampão foram escolhidos de acordo com o coeficiente angular da curva analítica e o valor do branco analítico.

3.3.6 Avaliação da concentração do tampão

Na avaliação da concentração do tampão foram realizadas seis curvas analíticas, sendo cada curva com concentração fixa de TT (5 μM), adicionando diferentes volumes de acordo incrementos de stDNA (0 – 4 mg L^{-1}) e na etapa final o sistema foi avolumado para 2,0 mL com tampão MES nas concentrações empregadas para a avaliação, ou seja, 2,5; 5, 10, 25, 50 e 100 mM. Assim, foi escolhida a condição que apresentou o maior coeficiente angular (sensibilidade) da curva analítica do método.

3.3.7 Estudo da força iônica do meio

Nesse estudo, foram realizadas medidas pela técnica de fluorescência molecular das curvas analíticas, com TT na mesma concentração fixa já mencionada no outro tópico e com adições de diferentes incrementos de stDNA ($0 - 4 \text{ mg L}^{-1}$), o sistema final foi avolumado com tampão MES (10 mM, pH = 5) e para cada avaliação da força iônica, antes de adicionar tampão para o volume final de 2 mL, foram adicionados diferentes volumes de NaCl, considerando as seguintes concentrações do sal no meio: 5, 10, 25, 50, 100 e 150 mM, além do sistema sem a presença do sal (NaCl).

Após esses procedimentos foram realizadas as medidas no espectrofluorímetro com $\lambda_{\text{exc}} = 434 \text{ nm}$ e o $\lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$ para obtenção dos espectros. A escolha da melhor concentração de NaCl no meio foi baseada no coeficiente angular (sensibilidade) da curva analítica.

3.3.8 Estudo da concentração do ligante (Tioflavina T)

Para esse estudo foi realizada a medida fluorimétrica de seis curvas analíticas com stDNA ($0 - 4 \text{ mg L}^{-1}$), dessa maneira, aspirava-se diferentes volumes da solução estoque de TT (1 mM) em que o volume final (2 mL) foi completado com o tampão MES. Assim, o ligante (TT) em cada ponto da curva de cada sistema tinha as seguintes concentrações: 1, 2,5; 5, 10, 25, e 50 μM . Após essas etapas, as medidas foram realizadas no espectrofluorímetro e a escolha da concentração do ligante se deu primeiramente pelo coeficiente angular da curva, e em segundo plano, em função do valor da razão da sensibilidade e do branco analítico (TT+tampão) em cada condição.

3.3.9 Análise da cinética e estabilidade da reação e cálculo da constante de ligação

Para análise da cinética de reação e de estabilidade foram realizadas duas medidas fluorimétricas em função do tempo. Sendo assim, dois pontos da curva foram medidos continuamente, o branco analítico da curva, ou seja, TT (5 μM) e tampão MES e o segundo ponto consistindo do ligante, um incremento de stDNA (1 mg L^{-1}) avolumando-se para 2 mL final com tampão MES. Na análise da cinética da reação os dois pontos foram medidos simultaneamente com o tempo de 0 – 120 min, enquanto que na estabilidade do complexo formado, os dois pontos também foram medidos simultaneamente na mesma faixa de tempo com intervalos de 5 e 10 minutos, porém com exposição à radiação direta, proveniente da lâmpada do equipamento durante toda a faixa de tempo de análise.

Para etapa do cálculo da constante de ligação, experimentalmente foram feitas três curvas padrões, uma com ausência de NaCl em todos os pontos da curva e as outras duas com a presença de 50 e 150 mM de NaCl. Além disso, a concentração de TT em 5 μM e com adições de incrementos de stDNA até observar a saturação do sistema. Para isso as concentrações de stDNA foram de 0 – 150 mg L^{-1} , após essa análise, as constantes de ligação foram calculadas por meio da equação modificada de Scatchard. (RODRIGUES et al., 2014).

3.3.10 Avaliação do modo de ligação

Na avaliação do modo de ligação, foram empregadas duas espécies para elucidar o tipo de interação, sendo elas: Brometo de etídio e berenil. Neste sentido foram montados dois sistemas avaliativos para cada espécie, um com ausência de NaCl e o outro na presença de 100 mM de NaCl. Para o sistema contendo brometo de etídio, o procedimento geral ocorreu da seguinte maneira: Foi adicionado um volume específico dessa espécie para uma concentração final de 2 μM ao volume de stDNA (6 μM) com diferentes incrementos de TT (2 – 60 μM) completando-se com tampão MES para volume final de 2 mL para realização da medida ($\lambda_{\text{exc}} = 525 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 591 \text{ nm}$). Já para o berenil o procedimento foi o seguinte: adicionado um volume de stDNA para concentração final de 15 μM ao volume de TT para concentração de 5 μM e diferentes volumes de berenil com incrementos variando de (0,1 – 2,5 μM) completando-se para 2 mL de volume final com tampão MES e realizando a medida fluorimétrica ($\lambda_{\text{exc}} = 434 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 488 \text{ nm}$). A informação do modo de ligação foi interpretada por meio do cálculo da constante de Stern-Volmer (K_{SV}) (RODRIGUES, et., 2014).

3.3.11 Figuras de mérito

Nesse estudo, para os cálculos dos parâmetros relacionados às figuras de mérito, tais como LOD, LOQ e RSD, foi preparada uma curva analítica com concentração de TT (5 μM) e diferentes concentrações de stDNA (0 – 4 mg L^{-1}), com dez pontos ($n = 10$), para um volume final de 2 mL completado com tampão MES (5 mM, pH = 5). De maneira similar, esse tipo de procedimento foi estendido para as macromoléculas: ctDNA e RNA de torula, onde para cada tipo de macromolécula foi obtida uma curva por fluorescência molecular. Sabendo-se que três pontos de cada curva foram preparados e medidos dez vezes ($N = 10$). Esses pontos de cada curva foram: o branco analítico, o segundo e o penúltimo ponto da curva analítica.

3.3.12 Análise dos possíveis interferentes

Nessa análise foram escolhidas diferentes espécies como possíveis interferentes de acordo com a matriz de amostra (saliva/plasma) que pretendeu-se analisar. Neste sentido, foi medida por fluorescência molecular uma curva analítica com TT e stDNA nas mesmas concentrações já citadas no item anterior, e com o diferencial em que foi escolhido um ponto (0,5 mg L⁻¹ de stDNA presente) dentro da curva para efeito comparativo sem interferente e com interferente. Assim, foram realizadas medidas pela mesma técnica de vários pontos que continham: TT, 0,5 mg L⁻¹ stDNA e volume específico do possível interferente de acordo com a concentração a ser utilizada, completando-se com tampão MES, para volume final de 2 mL.

3.3.13 Ensaio de recuperação

Para a realização do ensaio de recuperação, inicialmente foi construída uma curva analítica com TT e stDNA, com as mesmas concentrações aplicadas no estudo anterior (Figuras de mérito), por fluorescência molecular. A partir disso, três colaboradores doaram saliva, que foram coletadas de acordo com trabalhos encontrados na literatura (NAVAZESH; CHRISTENSEN, 2004; JOHN et al., 2004). Para aplicação do método, foram montados os sistemas para cada tipo de saliva cedida, e basicamente foram medidos quatro tubos em cada sistema, todos eles continham: TT, saliva diluída (100-200x) e tampão MES (10 mM, pH = 5), o diferencial para os quatro tubos estava relacionado a presença de stDNA adicionado, em que no primeiro tubo não tinha a presença do stDNA, no segundo foi adicionado 0,5 mg L⁻¹, no terceiro 1 mg L⁻¹ e no quarto 2 mg L⁻¹ de stDNA. Em seguida foram feitas as medidas no equipamento e observada a variação do sinal em cada ponto e calculada a concentração de DNA presente, por meio da equação da reta da curva analítica.

Antes desse experimento o método foi aplicado a uma análise também de uma amostra real (DNA - plasma sanguíneo) a fim de obter informações a respeito da resposta do mesmo. Neste sentido, aplicou-se a uma amostra de DNA extraído do plasma sanguíneo cedida pelo laboratório do professor Dr. Daniel Leite Goés Gitaí (UFAL), o DNA foi extraído de sangue humano (plasma) por meio do FlexiGene® Kit Qiagen. Para isso, aspirou-se 300 µL do sangue, aplicou-se nesse kit e por fim, o DNA extraído foi armazenado em tampão TRIS-HCl 10 mM pH = 8,5.

3.3.14 Tratamento estatístico dos dados

Para o tratamento estatístico dos resultados obtidos foram empregados o programa OriginLab versão 9.0 (Northampton, USA) e o Excel 2010 (Microsoft Office). Nas etapas de otimização dos diferentes parâmetros analíticos foi empregado principalmente como critério de escolha o coeficiente angular da respectiva curva analítica relacionada à determinada condição de estudo. A curva analítica avaliada foi construída com o mínimo de cinco pontos de acordo com a equação: $IF = aC_{DNA} + b$, em que IF é o valor de intensidade de fluorescência, C_{DNA} a concentração de DNA, a o coeficiente angular da curva analítica e b o coeficiente linear. Além disso, também foi calculado o coeficiente de correlação linear (r) que visa avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear. Um segundo critério adotado em algumas análises de otimização de parâmetros está relacionado com o coeficiente angular (a) da curva analítica e o sinal de fluorescência do branco analítico (B), para isso tem-se como referência o valor da razão a/B .

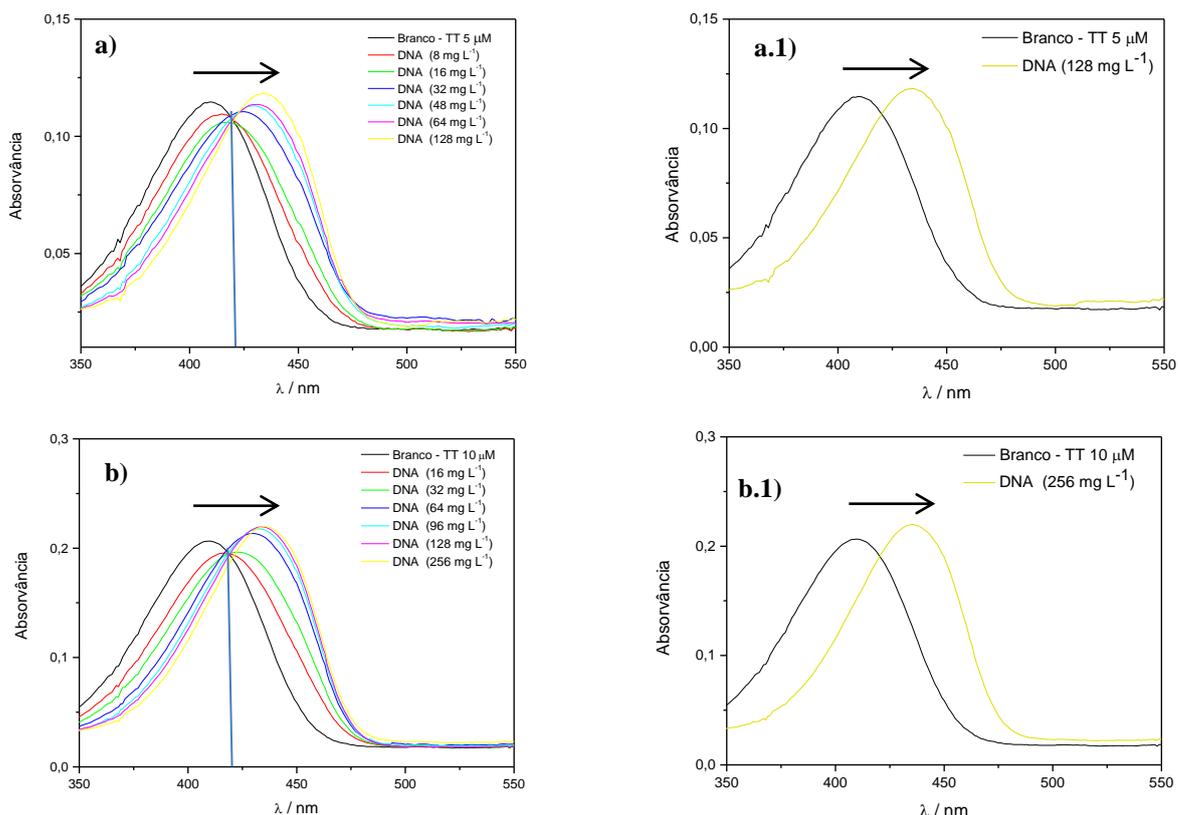
Os cálculos relativos aos limites de detecção (3σ) e de quantificação (10σ) foram realizados de acordo com as seguintes equações, $LOD = C_{branco} + 3sb/a_c$ e $LOQ = C_{branco} + 10sb/a_c$, onde C_{branco} = concentração relativa ao sinal do branco, sb equivale ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), enquanto a_c corresponde ao coeficiente angular da curva analítica empregada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a equação: $RSD = (sp/xp) \times 100$, onde sp equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão analítico dentro da faixa linear e xp corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($n = 10$) (MILLER; MILLER, 2005).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Avaliação da interação macromolécula-ligante por UV-vis

Inicialmente, foi analisado pela técnica de UV-vis, por meio de medidas de absorção, se o ligante TT interagia de fato com a macromolécula modelo de ácido nucleico, o stDNA. Apesar do trabalho de Murudkar e colaboradores (2014) empregar concentração de ligante de 10 μM , essa análise foi realizada com TT nas concentrações de 10 e 5 μM , em tampão TRIS (5 mM, pH =7,4) e incrementos crescentes de stDNA. Essa segunda concentração foi testada com a prerrogativa de diminuir a quantidade de ligante gasto e, conseqüentemente, a quantidade de stDNA. Os resultados podem ser observados na Figura 7.

Figura 7 – Espectro de absorvância da formação do complexo (Tris 5 mM, pH = 7,4, 25 °C). a) TT (5 μM) e stDNA (0 – 128 mg L^{-1}) e a.1) TT (5 μM) e stDNA (128 mg L^{-1}); b) TT (10 μM) e stDNA (0 – 256 mg L^{-1}) e b.1) TT (10 μM) e stDNA (256 mg L^{-1}).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Por meio dos resultados observados nos espectros acima, foi possível notar a formação do complexo TT-stDNA, pois, com a adição crescente de stDNA ocorreu o deslocamento do máximo comprimento de onda de absorção do complexo formado para maiores comprimentos de onda na faixa de 412 – 434 nm ($\Delta\lambda = 22$ nm), característico de efeito batocrômico.

Segundo Maskevich e colaboradores (2007) observaram que o efeito batocrômico é devido a diminuição da polaridade local em torno do ligante TT. Além disso, foi possível constatar que com o aumento da concentração da macromolécula surge um ponto isobéptico em 420 nm, indicando a presença de duas espécies de TT em solução, ligada e livre e ainda foi observado efeito hipocrômico com a adição de stDNA, isso se deve em função da forte interação entre TT e stDNA que acarreta mudanças conformacionais principalmente no DNA e, conseqüentemente, na absorvidade molar do complexo formado (MURUDKAR et al., 2014; SHAHABADI; HADIDI, 2012).

Nos espectros mostrados nas Figuras 7a.1 e 7b.1 tem-se a ideia mais clara do deslocamento que ocorre com adição crescente de stDNA e conseqüente formação do complexo, onde em preto é demonstrado a absorvância do ligante puro, ou seja, TT (5 e 10 μM), respectivamente e em amarelo os espectros do ligante na presença de stDNA 128 e 256 mg L^{-1} , respectivamente.

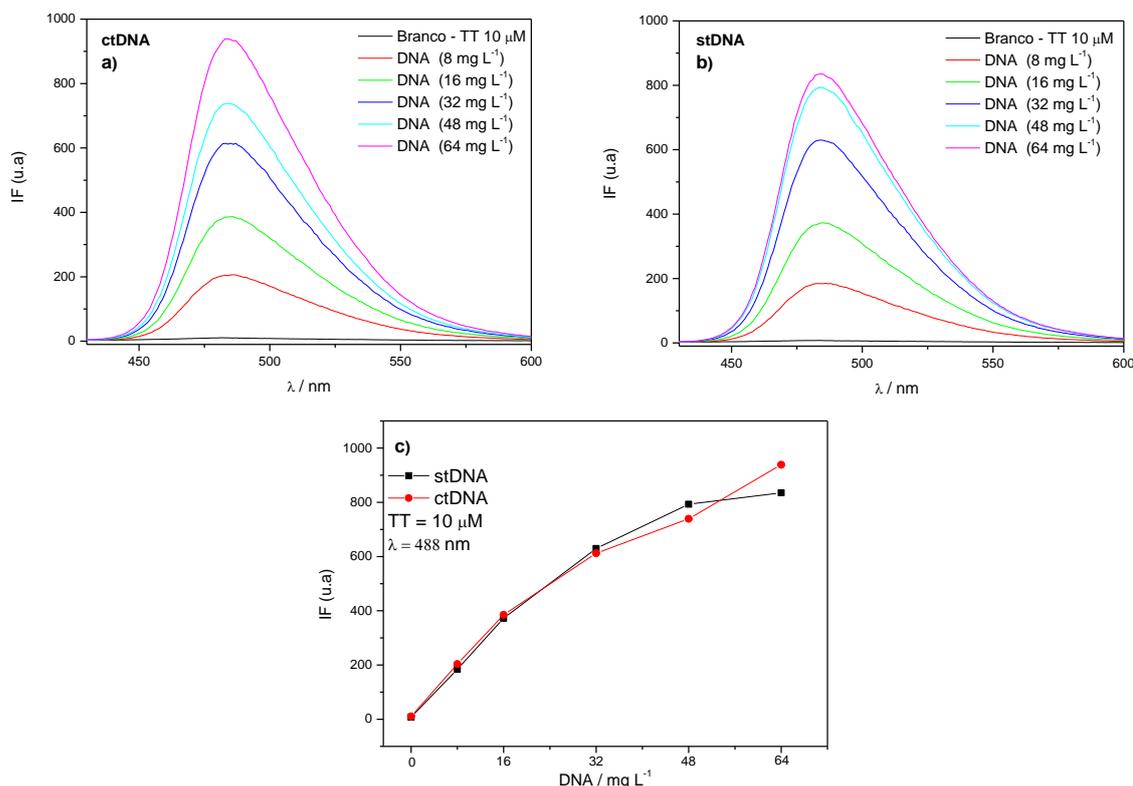
4.2 Avaliação do tipo de DNA a ser utilizado (stDNA x ctDNA)

O stDNA, DNA derivado do esperma do salmão, é uma macromolécula de fita dupla que pode ser classificada quanto a sua composição dos pares de bases da seguinte maneira: cerca de 41% de citosina-guanina (C-G) e 59% de adenina-timina (A-T). Já o ctDNA, DNA derivado do timo do bezerro, apresenta-se com 42% de C-G e 58% de A-T (Sigma-Aldrich ctDNA, 2016; Sigma-Aldrich stDNA, 2016). Quanto à composição dos pares de bases esses DNA, diferem em apenas 1%, entretanto, o principal diferencial está relacionado ao custo de aquisição dessas macromoléculas. De acordo com buscas realizadas no site da Sigma-Aldrich em março de 2017, 50 mg do stDNA custa em torno de R\$ 72,60, enquanto 50 mg do ctDNA R\$ 252,00. Neste sentido, em função do custo de aquisição e da disponibilidade desses tipos de macromolécula no laboratório de instrumentação em química analítica (LINQA), foi necessário avaliar o comportamento da TT (10 μM) frente esses dois tipos de DNA, afim de escolher o que apresenta melhor comportamento por meio da técnica de fluorescência molecular. Esse comparativo é demonstrado na Figura 8.

Ambas macromoléculas têm a mesma tendência e comportamento frente ao ligante quando observado pelo sinal de fluorescência, como mostrado nas Figuras 8a e 8b, ou seja, a intensidade de fluorescência (IF) da TT aumenta à medida que se aumenta a concentração da macromolécula, esse fato pode ser explicado devido a similaridade no percentual de pares de bases dos dois tipos de DNA. Isso pode ser melhor visualizado na Figura 8c em que os dois tipos de DNA são comparados no mesmo gráfico. Dessa forma, foi escolhido o stDNA para

análises subsequentes, devido seu custo de aquisição ser aproximadamente quatro vezes menor que o ctDNA, o que favorece uma das prerrogativas do desenvolvimento do trabalho que é reduzir os custos com aquisição de reagentes

Figura 8 – Espectros de fluorescência da TT (10 μM) (Tris 5 mM, pH = 7,4, 25 °C, *slit* 5x5) com adição de incrementos de a) ctDNA de 0 – 64 mg L^{-1} ; b) stDNA 0 – 64 mg L^{-1} ; c) gráfico comparativo da intensidade de fluorescência (IF) entre stDNA e ctDNA;



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Além disso, um fato de suma importância que explica esse fenômeno da interação analisada por fluorescência molecular se dá através das propriedades de cada espécie. Neste sentido, é sabido que tanto as macromoléculas (DNA e RNA) quanto a sonda analítica (TT) apresentam baixo sinal de fluorescência em solução, sendo a TT livre denominada no seu modo *off*, ou seja, “desligada”. Entretanto, ao interagir a sonda TT com a macromolécula (DNA), a sonda perde a livre rotação da ligação simples entre o núcleo benzotiazólico e o anel aromático, o que possibilita o alinhamento dos orbitais pí (π), aumentando a rigidez da molécula que leva a uma diminuição na velocidade de relaxamento não radioativo para o ponto onde o relaxamento por fluorescência tenha tempo para ocorrer. Com isso, o sistema passa a ter uma emissão de fluorescência melhorada chamada de modo *on* “ligado” (MURUDKAR et al., 2014; SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2005).

4.3 Estudo da otimização das larguras das fendas (*slit*) de excitação e emissão

A análise da abertura das fendas (*slit*) do equipamento (Espectrofluorímetro) é um estudo preliminar essencial para o desenvolvimento dos outros experimentos, pois através dessa escolha têm-se os melhores valores de intensidade do sinal de emissão de fluorescência para o sistema analisado. Além disso, essa variável influencia diretamente no sinal de emissão de fluorescência do complexo formado, pois o sinal de fluorescência é proporcional ao quadrado das larguras das fendas de excitação e de emissão. O emprego de fendas estreitas resulta numa maior resolução e menor ruído espectral, devido a precisão na seleção da radiação eletromagnética pelo equipamento, de modo complementar o uso de fendas largas produz o efeito contrário (LAKOWICZ, 2006).

Desse modo, o sistema TT (5 μM) com adição de incrementos de stDNA foi analisado e comparado por meio das equações das retas em diferentes valores de *slits* de excitação e emissão. Na Tabela 1, são demonstrados os valores dos *slits*, sabendo-se que, da esquerda para direita o primeiro valor corresponde à largura da fenda de excitação e o segundo número a largura da fenda de emissão, ambos, medidos em nanômetros (nm). Além disso, a Tabela 1 apresenta as equações das retas considerando os valores das concentrações do DNA em mol L^{-1} e mg L^{-1} .

As equações das retas estão acompanhadas de outros dados que são importantes para a compreensão geral da análise, são eles: n , que corresponde ao número de pontos empregado para construção da reta, r o coeficiente de correlação linear e F.L a faixa linear de acordo com a equação da reta.

Por meio da interpretação dos dados, em que o primeiro parâmetro de escolha ocorre em função do coeficiente angular da reta, que remete a sensibilidade do método, foi possível observar que dois valores de *slits* foram os que apresentaram os melhores coeficientes angulares, o 5x10 e o 10x5, desse modo, uma segunda análise foi necessária para efeito comparativo, a razão coeficiente angular (a) dividido pelo valor do branco analítico (B) que foi considerado TT em tampão. Esse valor mostra o quanto o sinal do branco pode influenciar nas análises, pois quanto maior o sinal do branco, mais próximo estará do sinal do primeiro ponto da curva, o que interfere na distinção entre esses sinais, comprometendo o procedimento analítico. Dessa maneira, os valores da razão a/B para os *slits* 5x10 e 10x5 ficaram muito próximos, 5 e 6 respectivamente, porém o *slit* 5x10 foi escolhido para emprego nas avaliações posteriores, pois apresentou valores de intensidade de sinal em cada ponto da curva superior ao outro *slit*.

Tabela 1 - Equações das retas para análise dos *slits* (Tris 5 mM, pH = 7,4, 25 °C); TT (5 µM) com incrementos de stDNA (0 – 37,3 mg L⁻¹).
 * a = coeficiente angular e B = branco analítico (curva mg L⁻¹).

Slit	Equação (mol L ⁻¹)	Equação (mg L ⁻¹)	Razão a/B*
3x5	IF = 19,8C _{DNA} (±0,6) + 11,7 (±5,0), N=13, r = 0,995 F.L= 2,5x10 ⁻⁷ – 1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	IF = 10,7C _{DNA} (±0,3) + 10,7 (±4,5), N=13, r = 0,995 F.L= 0,093 – 37,3 mg L ⁻¹	1,0
3x10	IF = 86,5C _{DNA} (±3,7) + 33,4 (±16,2), N=11, r = 0,992 F.L= 2,5x10 ⁻⁷ – 5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	IF = 46,7C _{DNA} (±1,8) + 30,4 (±14,3), N=11, r = 0,992 F.L= 0,093 – 18,7 mg L ⁻¹	1,5
5x3	IF = 20,7C _{DNA} (±0,7) + 11,6 (±5,4), N=13, r = 0,994 F.L= 2,5x10 ⁻⁷ – 1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	IF = 11,0C _{DNA} (±0,3) + 11,7 (±5,4), N=13, r = 0,994 F.L= 0,093 – 37,3 mg L ⁻¹	0,9
5x5	IF = 82,2C _{DNA} (±3,6) + 28,7 (±15,0), N=11, r = 0,991 F.L= 2,5x10 ⁻⁷ – 5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	IF = 44,2 C _{DNA} (±2,0) + 28,7 (±15,0) N=11, r = 0,991 F.L= 0,093 – 18,7 mg L ⁻¹	1,5
5x10	IF = 409,6C _{DNA} (±10,0) + 43,8 (±5,2), N=7, r = 0,998 F.L= 2,5x10 ⁻⁷ – 5x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	IF = 219,2C _{DNA} (±5,2) + 44,0 (±5,0), N=7, r = 0,998 F.L= 0,093 – 1,9 mg L ⁻¹	5
10x3	IF = 56,5C _{DNA} (±1,5) + 19,6 (±8,6), N=12, r = 0,996 F.L= 2,5x10 ⁻⁷ – 7,5x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	IF = 30,3C _{DNA} (±0,8) + 19,8 (±8,6), N=12, r = 0,996 F.L= 0,093 – 28 mg L ⁻¹	1,5
10x5	IF = 275,3C _{DNA} (±3,8) + 24,6 (±3,8), N=8, r = 0,999 F.L= 2,5x10 ⁻⁷ – 1,2 x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	IF = 147,4C _{DNA} (±2,0) + 24,7 (±3,8), N=8, r = 0,999 F.L= 0,093 – 4,6 mg L ⁻¹	6,0

Fonte: elaborado pelo autor, 2017

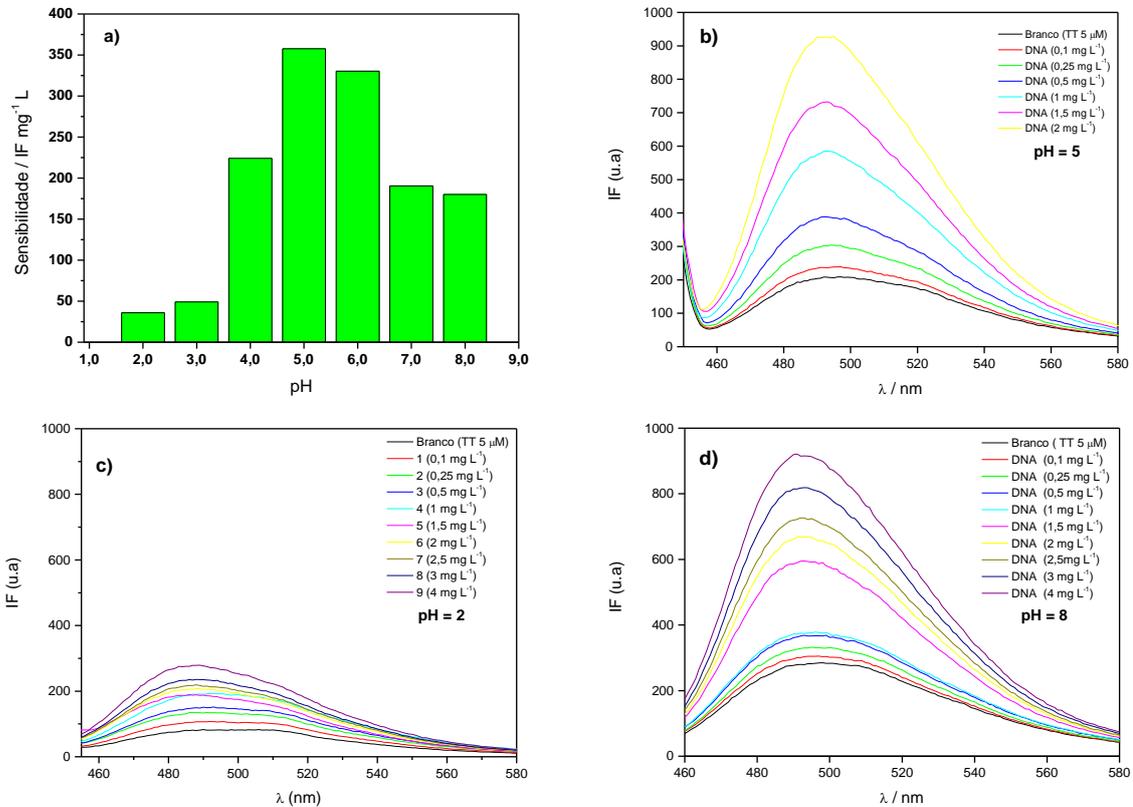
4.4 Estudo de otimização do pH e tipo de tampão

O espectro de fluorescência de moléculas que contém grupos funcionais ácidos ou básicos são pH dependentes, pois o rearranjo na carga elétrica acompanha excitação eletrônica. A acidez (ou basicidade) do estado excitado de uma molécula pode ser dramaticamente diferente daquela no estado fundamental e, por consequência, o rendimento quântico de um ácido e da sua base conjugada podem ser totalmente diferentes (GUIBAULT, 1990). Nesse sentido, a otimização do pH é de fundamental importância para estudos por meio de fluorescência molecular. Assim, inicialmente foram avaliados vários sistemas numa ampla faixa de valores de pH (2 – 8), para isso foi empregado o tampão fosfato (5 mM) que abrange esse intervalo (SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2005). Assim, foram geradas diversas curvas analíticas com variação de uma unidade na escala de pH, ou seja, os sistemas com os pH: 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8. A escolha do pH ótimo foi realizada de acordo com duas prerrogativas: a primeira, o coeficiente angular da curva analítica que remete à sensibilidade do método e a segunda, o valor do sinal de fluorescência do branco analítico, como mencionado em análises anteriores. Desse modo, na Figura 9 são apresentados os resultados referentes às curvas nos extremos da faixa de pH avaliado e a curva no pH = 5.

Observando o gráfico da Figura 9a fica claro que o pH = 5 foi o que mostrou melhor sensibilidade, ou seja, maior coeficiente angular, superando em 8% o pH = 6. Esses resultados demonstraram que em pH > 6 a molécula de TT ($pK_a = 5,07$) (CAREY, F. A., 2011) apresentará apenas uma carga positiva em sua estrutura, diminuindo assim a interação eletrostática entre TT-stDNA, enquanto em pH < 5 o grupo dimetilânilínio estará na forma associada. A protonação desse grupo leva a uma desativação na emissão de fluorescência, pois o par de elétrons livre do nitrogênio que estaria conjugado com o anel aromático fica comprometido na ligação com H^+ , logo o grau de conjugação desse par de elétrons com o sistema π do anel diminui, explicando a diminuição da fluorescência (GUIBAULT, 1990).

Contudo, essa análise inicial possibilitou esclarecer qual o melhor valor de pH para o desenvolvimento do método, entretanto nota-se nas Figuras 9b, 9c e 9d que os sinais do branco analítico são muito altos e próximos ao primeiro ponto da curva analítica. Esse fato é devido ao tampão fosfato ($pK_1 (2,2)$, $pK_2 (7,2)$ e $pK_3 (12,7)$) apresentar carga negativa nos valores de pH analisados, isso leva a interação eletrostática entre o tampão fosfato e a sonda (TT) aumentando a rigidez da molécula e a intensidade de fluorescência (SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2005).

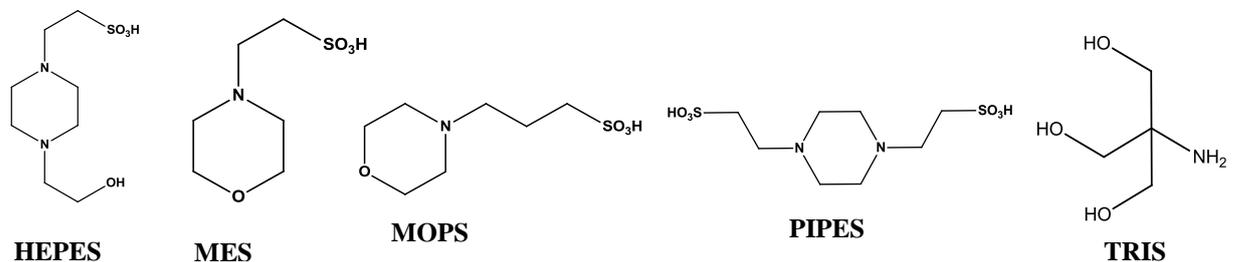
Figura 9 – a) Avaliação da sensibilidade analítica com a variação pH (2 - 8); Espectro TT 5 μM (tampão fosfato 5 mM) titulada com incrementos de: b) stDNA (0 – 2 mg L^{-1}) em pH = 5; c) stDNA (0 – 4 mg L^{-1}) em pH = 2; d) stDNA (0 – 4 mg L^{-1}) em pH = 8.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Com intuito de melhorar o sinal do branco analítico diferentes tipos de tampões orgânicos (Figura 10) e diferentes valores de pH foram testados. Os resultados dessa avaliação são mostrados na Figura 11.

Figura 10 - Estrutura das moléculas que compõe os sistemas tampão avaliados.

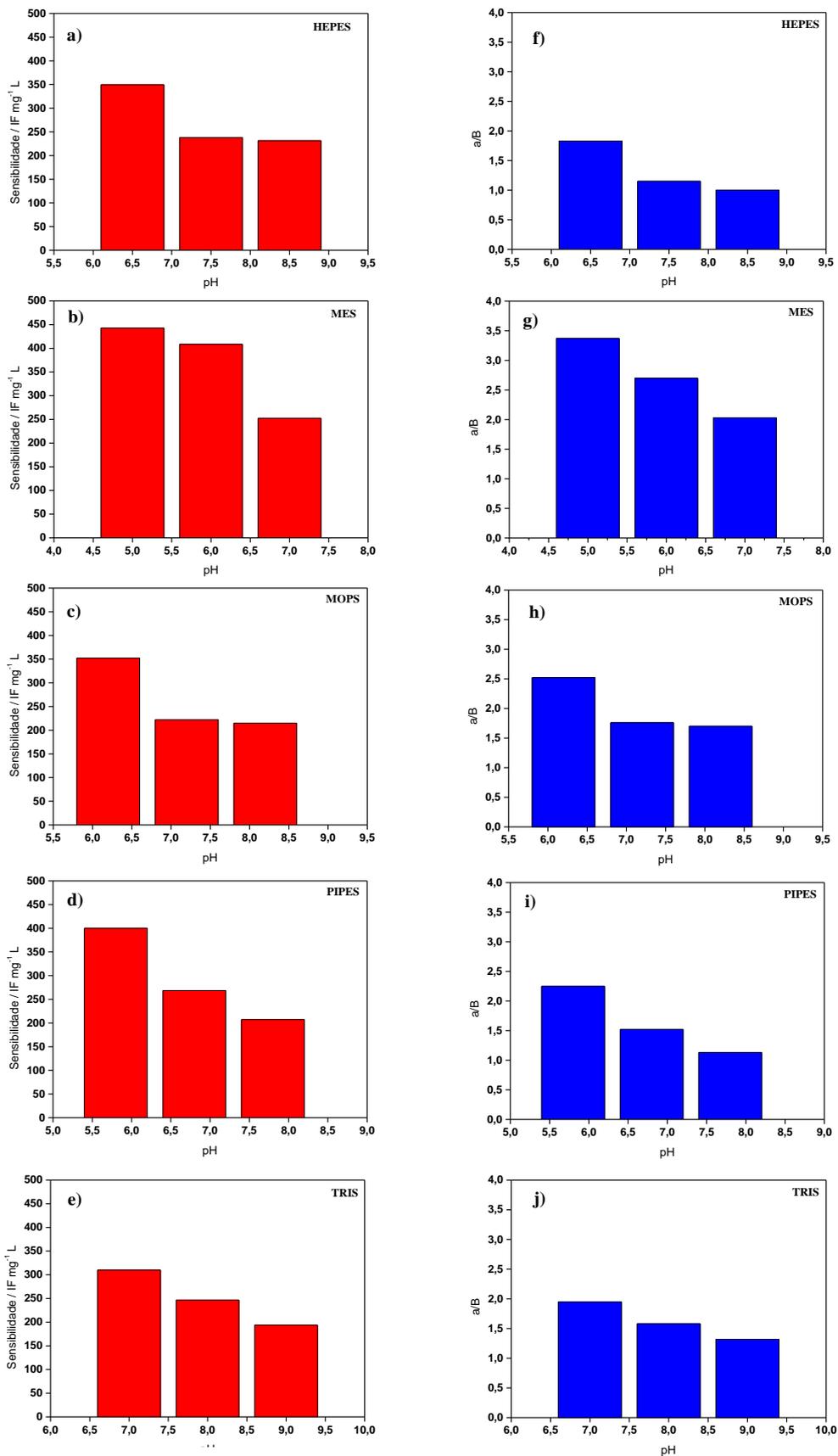


Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Observando os resultados obtidos com diferentes tampões e seus respectivos pH (Figura 11), considerando o pH de trabalho igual ao $\text{pK}_a \pm 1$, foi constatado que os melhores resultados, em termos de sensibilidade (barras vermelhas) foram atribuídos aos primeiros valores de pH tanto para o tampão MES quanto para o PIPES, pH = 5 e 5,7, respectivamente.

Entretanto, ao analisar a razão do coeficiente angular da curva pelo branco analítico (a/B , barras azuis), o tampão MES foi o que apresentou os maiores valores, apresentando uma maior sensibilidade e um branco analítico relativamente baixo em relação aos outros, neste sentido, o tampão MES, $\text{pH} = 5$ foi escolhido para realizar os estudos subsequentes.

Figura 11 – Avaliação do tipo de solução tampão na sensibilidade analítica (gráficos a; b; c; d; e) e razão a/B (gráficos f; g; h; i; j). Tampão 5 mM, TT 5 μ M, stDNA (0 – 4 mg L⁻¹), 25 °C.

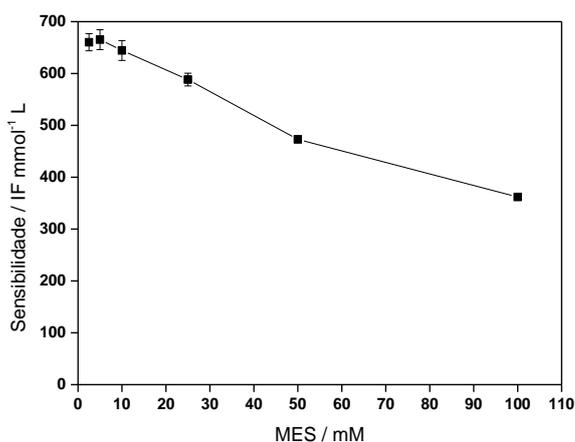


Fonte: elaborado pelo auto, 2017.

4.5 Avaliação da concentração do tampão

Após a escolha do pH e tipo de tampão que seriam utilizados, também foi necessário definir a concentração do tampão. Esse parâmetro é muito importante, pois o mesmo está relacionado com a capacidade do tampão manter o pH do meio mesmo com pequenas adições de ácido ou base. A depender do alvo em que esse método for aplicado, o tampão em concentração adequada ajudará a manter o pH inalterado, pois, levando em conta a equação de Henderson-Hasselbalch, a máxima capacidade tamponante ocorre quando o $\text{pH} = \text{pK}_a$, porém, este pode ser utilizado numa faixa de pH considerando o $\text{pK}_a \pm 1$ (SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2005). Na Figura 12 e são apresentados os resultados referentes a essa otimização em diferentes concentrações do tampão, para isso foi levado em consideração a sensibilidade do método ou coeficiente angular da reta.

Figura 12 – Efeito da concentração do MES (mM) na sensibilidade analítica (Tampão pH = 5, TT 5 μM , stDNA (0 – 4 mg L^{-1}), 25°C.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

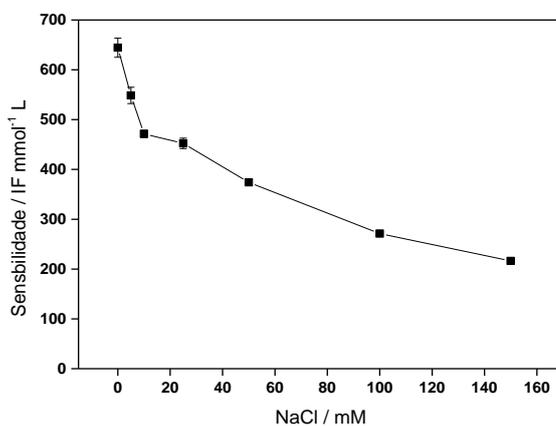
De acordo com os resultados observados acima, percebeu-se que com o aumento da concentração do tampão a sensibilidade/coeficiente angular do método diminui gradativamente, aproximadamente 45% da concentração 2,5 mM para 100 mM. Isso ocorre, pois, à medida que aumenta a concentração do tampão, aumenta também a força iônica do meio, ou seja, os íons derivados do tampão passam a competir com o ligante (TT), que também é carregado positivamente, pelo alvo (stDNA), essa competição acarreta a diminuição da interação TT-stDNA e consequente decaimento do sinal de emissão de fluorescência. Para maiores informações sobre as curvas analíticas que foram produzidas em função da concentração do tampão MES, consultar o APÊNDICE A1.

Desse modo, os melhores resultados, comparando em termos de valores mais altos de sensibilidade se deram para as concentrações do tampão de 2,5; 5 e 10 mM, sendo escolhida a concentração do tampão de 10 mM, pois como já explicado anteriormente quanto maior a concentração do tampão, maior a capacidade de resistir a variações de pH do meio (SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2005).

4.6 Estudo da força iônica

Com intuito de obter mais informações a respeito da natureza da interação da TT com stDNA, foi realizado o estudo do efeito do aumento da força iônica nas características espectrais do complexo por meio da adição de diferentes concentrações de cloreto de sódio (NaCl) ao meio reacional, a fim de avaliar se os íons presentes influenciariam na sensibilidade do método. Para isso, foram empregadas as seguintes concentrações de NaCl no meio reacional: 0, 5, 10, 25, 50, 100 e 150 mM, esta última concentração é considerada a máxima encontrado no corpo humano (célula) (DOUGLAS, 2006). Para cada concentração analisada foi preparada uma curva analítica e assim os resultados obtidos podem ser observados na Figura 13.

Figura 13 – Avaliação da concentração de NaCl (mM) na sensibilidade analítica (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μ M, stDNA (0 – 4 mg L⁻¹), 25°C).



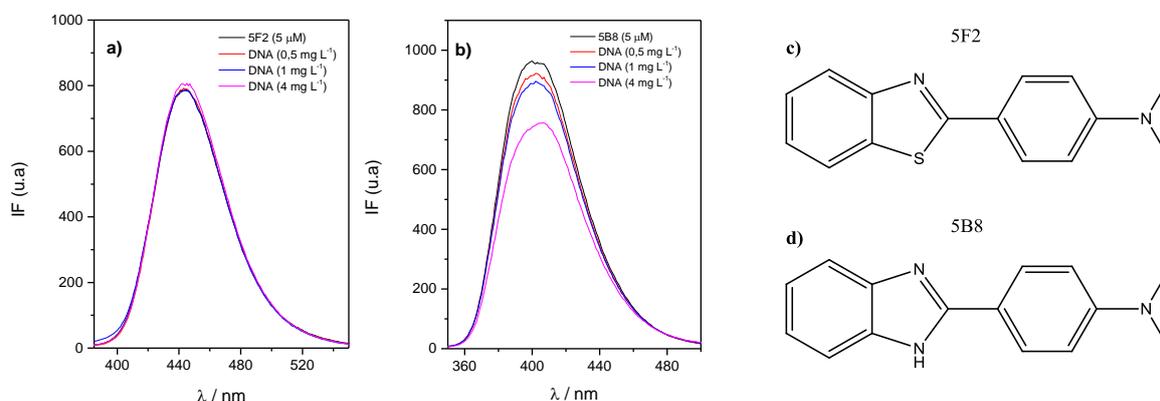
Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Foi possível observar na Figura 13 que a adição crescente de NaCl interfere diretamente na formação do complexo TT-stDNA, pois irá induzir mais efetivamente a interação dos grupamentos fosfato com os íons Na⁺ e a molécula da TT com Cl⁻. Por consequência, ocasionando a diminuição da sensibilidade do método. Entretanto, nota-se que ao adicionar 150 mM de NaCl o sistema ainda apresenta sensibilidade significativa, ou seja, uma quantidade remanescente de TT permanece ligada ao stDNA, isso indica que além da

interação eletrostática, a TT interage com a macromolécula por outro modo de interação, *groove* ou intercalação. Para maiores informações sobre curvas analíticas que foram produzidas, consultar o APÊNDICE A2.

Um estudo complementar para confirmar que a TT interage majoritariamente via eletrostática foi realizado. Para isto, empregou-se dois ligantes sintéticos 4-(benzo[d]tiazol-2-il)-N,N-dimetilanilina e 4-(benzo[d]imidazol-2-il)-N,N-dimetilanilina, denominados 5F2 e 5B8, respectivamente (Figuras 14c e 14d), que ambos tem praticamente a mesma estrutura da TT, com exceção do grupamento metila, que confere a carga positiva no nitrogênio do anel da TT. Os resultados desse estudo podem ser observados na Figura 14a e 14b.

Figura 14 – a) Espectro da 5F2 b) Espectro da 5B8 com diferentes incrementos de stDNA (0 – 4 mg L⁻¹) para ambos; c) Estrutura da 5F2 e c) Estrutura da 5B8 . (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μM, stDNA (0 – 4 mg L⁻¹), 25 °C).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

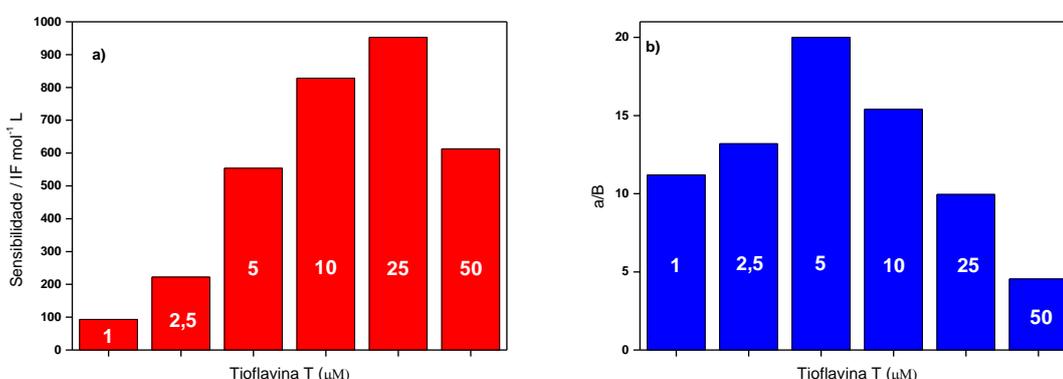
Por meio dos espectros de fluorescência da 5F2 e 5B8 com diferentes incrementos de stDNA (Figura 14a e 14b) foi possível observar que os ligantes não interagem com a macromolécula, pois caso essa interação fosse observada, deveria haver maior alteração no perfil espectral. Dessa maneira, comprova-se que a interação não ocorre com a ausência da carga positiva na sonda, confirmando que, de fato, a interação TT-stDNA ocorre em parte por atração eletrostática.

4.7 Avaliação da concentração da sonda (TT)

Após determinar diversos parâmetros necessários para otimização do método, buscando sempre a melhora da sensibilidade, o último ponto necessário para concluir essa etapa, foi a escolha da concentração ótima da sonda. Inicialmente, foi tido como referência o trabalho de Murudkar e colaboradores (2014) que utilizou a concentração do ligante em 10 μM, entretanto com a prerrogativa de diminuir a quantidade de ligante gasto e também

stDNA, estava sendo empregada a concentração de 5 μM para os estudos, sendo que em determinado ponto do trabalho observou-se que também era necessária uma análise mais detalhada quanto a essa concentração do ligante TT. Para isso, foram preparadas as curvas analíticas, em que as soluções preparadas foram medidas por fluorescência molecular, sendo cada sistema em estudo com as diversas concentrações de TT (1; 2,5; 5; 10; 25 e 50 μM) afim de obter um parâmetro que obedecesse às prerrogativas já mencionadas (sensibilidade elevada e sinal do branco analítico reduzido). Os resultados obtidos podem ser visualizados simplificadaamente na Figura 15.

Figura 15 – a) Efeito da concentração da Tioflavina T (μM) na sensibilidade analítica; b) razão coeficiente angular por branco analítico x concentração Tioflavina T (μM). (Tampão MES 10 mM, pH = 5, stDNA (0 – 4 mg L⁻¹), 25 °C).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

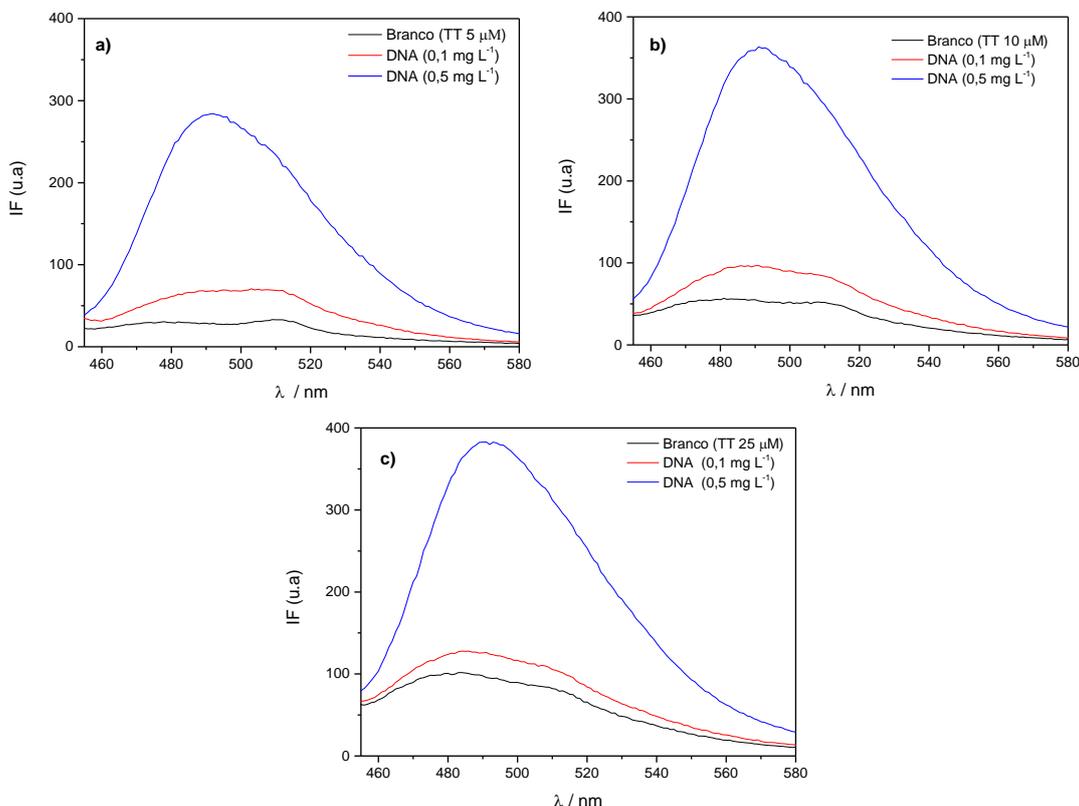
Observa-se na Figura 15a que com aumento da concentração do ligante, maior é a sensibilidade do método, esse comportamento é crescente até 25 μM , a partir dessa concentração ocorre uma diminuição bastante significativa na sensibilidade cerca de 36%, ocasionado pelo aumento da população de ligante no meio que leva a um aumento da repulsão entres eles, devido à carga positiva, diminuindo a interação com a macromolécula. Sendo assim, por meio dos resultados, a melhor concentração da sonda seria 25 μM , porém desde o início da otimização dos parâmetros, o sinal do branco analítico e, conseqüentemente, a razão a/B (coeficiente angular dividido pelo branco analítico) tem sido considerada. A concentração de 25 μM , como mostrado na Figura 15b, apresentou valor da razão a/B relativamente baixo quando comparado com a concentração de 5 μM .

Dessa forma, foi escolhida a concentração de 5 μM para sonda mesmo apresentando valor de sensibilidade abaixo das outras condições testadas, em contrapartida, essa condição foi beneficiada pelo valor da razão a/B. Essa comparação entre os espectros dos brancos

analíticos e alguns pontos da curva para as três melhores condições são mostradas na Figura 16.

Figura 16 – Espectros TT com incrementos de stDNA (0 – 0,5 mg L⁻¹) a) TT (5 μM); b) TT (10 μM); c) TT (25 μM). (Tampão MES 10 mM pH = 5, 25 °C).

b)



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Com isso, finalizou-se a otimização dos parâmetros experimentais. Passando-se agora para estudo cinético, de estabilidade, cálculo das constantes e modo de ligação, bem como para validação do método proposto.

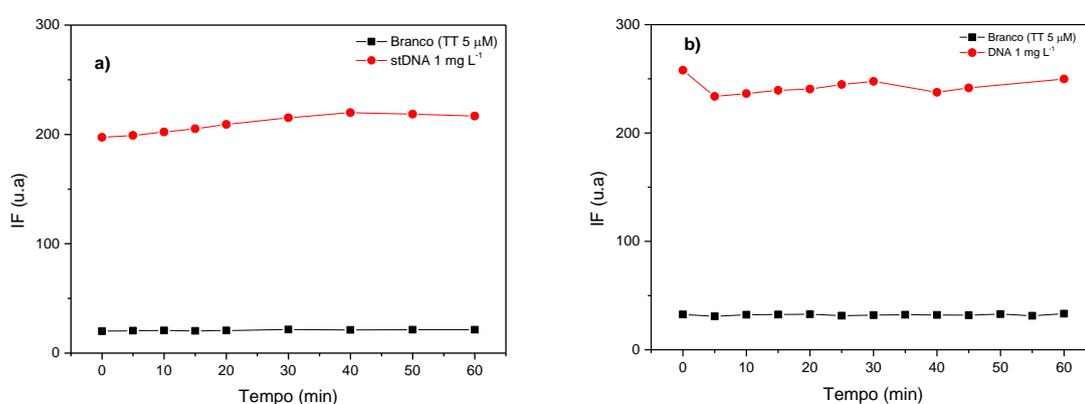
4.8 Estudo cinético, estabilidade e cálculo da constante de ligação (K_b)

Para o estudo cinético e de estabilidade, foram realizadas medidas pela técnica de fluorescência molecular em função do tempo. Dois pontos da curva analítica foram medidos nessa análise, o branco analítico (TT na presença de tampão MES, 10 mM, pH = 5) e o ponto com 1 mg L⁻¹ de DNA (TT com stDNA 1 mg L⁻¹ na presença do mesmo tampão MES). Para esses dois estudos foram realizadas medidas na mesma faixa de tempo (0 – 120 min), mas que devido ao perfil constante da IF, os gráficos apresentados são apenas com os dados até 60 min. Do ponto de vista experimental esses dois estudos tiverem um pequeno diferencial, em que no estudo da estabilidade essas medidas foram realizadas com o feixe de radiação do

equipamento ligado ininterruptamente, sabendo-se que a lâmpada de xenônio apresenta 150 W de potência. Já no estudo cinético foram realizadas medidas de 5 em 5 min. Os resultados do sinal de fluorescência em função do tempo dos estudos realizados são apresentados nas Figura 17a e 17b.

É possível observar na Figura 17a, que a reação acontece imediatamente e, além disso, o comportamento do complexo formado em termos de intensidade do sinal de fluorescência (IF) permaneceu praticamente inalterado.

Figura 17 – a) Gráfico do perfil do estudo cinético (IF x Tempo); b) Gráfico do perfil do estudo de estabilidade. (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μ M, stDNA 1 mg L⁻¹), 25 °C).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Ainda no sentido do estudo cinético, como essa avaliação não ocorre com exposição contínua à radiação, poderia também inferir complementarmente sobre a estabilidade do mesmo, indicando pela Figura 17a que esse comportamento do sinal de fluorescência permanece praticamente inalterado devido a eficiência da interação do complexo formado.

Na Figura 17b, é possível confirmar a afirmação relatada acima, pois nesse estudo de estabilidade, a intensidade de fluorescência do branco analítico permaneceu inalterada, indicando que, mesmo em exposição a radiação contínua da lâmpada do equipamento (150 W), o ligante TT em tampão MES (10 mM, pH = 5) não sofre mudanças físicas ou químicas a ponto de alterar sua intensidade de fluorescência.

De modo similar, o ponto da curva que contém a presença de 1 mg L⁻¹ de stDNA, além da própria TT (5 μ M) e o tampão MES (10 mM, pH = 5), não sofreu alteração acentuada (maior que 10%) em relação ao ponto inicial (0 min.), na resposta de emissão de fluorescência, apresentando-se como mais um indicativo de que o processo de interação TT-DNA ocorre eficientemente. (NARAYANASWAMY et al., 2014).

Após as avaliações realizadas de teste cinético e de estabilidade, a fim de inferir sobre a força ou eficiência da interação do complexo TT-DNA, foram realizados estudos de três

diferentes sistemas com o intuito de descobrir o patamar de resposta de fluorescência com o aumento da concentração de stDNA, ou ainda, denominado de curva de saturação do complexo formado. Desses três sistemas, um foi preparado na ausência de NaCl e os outros dois com presença de 50 e 150 mM do respectivo eletrólito. Esses estudos foram também realizados na presença de NaCl, pois é possível inferir sobre a interferência que o sal pode causar na interação TT-DNA e assim mensurar através da constante de ligação (K_b).

A constante de ligação K_b , foi calculada por meio da equação de Scatchard modificada (RODRIGUES et al., 2014) advinda de McGhee e von Hippel (1974), representada na equação 2 abaixo (ISLAM et al., 2015):

$$\frac{r}{C_f} = K_b(1-nr) \left\{ \frac{1-nr}{1-(n-1)r} \right\}^{(n-1)} \quad \text{equação 2}$$

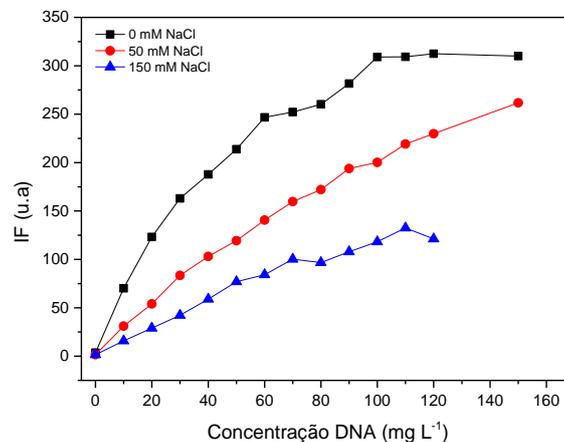
em que, K_b é a constante de ligação, n o número dos pares de bases que encontra uma molécula da sonda (TT), r a razão $c_b / [\text{ácido nucleico}]$, C_b (equação 3) a concentração do composto (TT) ligado e C_f (equação 4) a concentração do composto livre.

$$C_b = \frac{I_{F,0} - I_F}{I_{F,0} - I_{F,B}} \times C_{total} \quad \text{equação 3}$$

$$C_{total} = C_f + C_b \quad \text{equação 4}$$

Por meio dessas equações foi possível obter os valores das constantes de ligação nos diferentes experimentos, na ausência e presença de NaCl. O comportamento da intensidade de fluorescência desses sistemas são demonstrados na Figura 18.

Figura 18 - Gráfico de IF em função da concentração de stDNA (0 - 150 mg L⁻¹), (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μM, 25 °C).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Observando-se o perfil da intensidade do sinal de fluorescência, na presença e ausência de NaCl, mais uma vez é notável que o sal provoca a redução da IF em função da competição com a macromolécula e o ligante, sendo assim, o cálculo para a constante de ligação do sistema contendo 150 mM não foi realizado devido esse sistema não atingir o patamar ou saturação mesmo utilizando em altas concentrações da macromolécula (stDNA).

Para outras condições, o cálculo da constante de ligação (K_b) e o número pares de bases que encontra uma TT (n) são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2- Avaliação da constante de ligação K_b e número de bases (n) que contém uma molécula de TT na presença de NaCl (mM). Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μ M, stDNA (0 - 150 mg L⁻¹), 25 °C).

Composto (ligante)	Concentração NaCl (mM)	K_b (10 ⁵ L mol ⁻¹)	n
Tioflavina T	0	4,4 (\pm 0,5)	10 \pm 1
	50	3,4 (\pm 0,6)	24 \pm 2

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

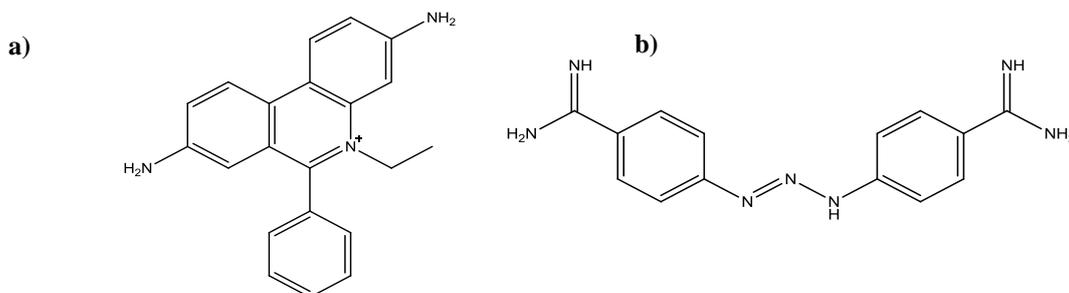
Foi possível notar (Tabela 2) e mais uma vez confirmar que a presença de NaCl na solução desfavorece a interação TT-DNA diminuindo a constante de ligação, e aumentando número pares de bases (n) que encontra uma molécula de TT, por não ter o ligante interagindo com a macromolécula, ou seja, na ausência de sal a cada 10 pares de bases temos uma molécula de TT presente, já na presença de 50 mM de sal a cada 24 pares de bases encontramos uma molécula da sonda (RODRIGUES et al., 2014). Além disso, fazendo-se um comparativo do método proposto com outros trabalhos que empregaram TT como sonda para DNA, as constantes de ligação são menores, a exemplo do trabalho de Murudkar e colaboradores (2014) que obtiveram valor estimado em $3,9 \times 10^3$ M⁻¹ e o trabalho de Ilanchelian e Ramaraj (2004) com um valor de K_b de $3,0 \times 10^4$ M⁻¹, ambos na ausência de NaCl. Demonstrando que a otimização de parâmetros químicos influencia diretamente na interação TT-DNA, ou seja, melhorando-a.

4.9 Avaliação do modo de ligação

Após os estudos da força iônica e dos cálculos das constantes de ligação em diferentes condições foi possível inferir que o ligante (TT) interage com a macromolécula via atração eletrostática, porém percebeu-se nas análises citadas anteriormente que um segundo tipo de interação não covalente também estava ocorrendo, visto que mesmo a elevadas concentrações de NaCl o sistema apresentava intensidade de sinal de fluorescência significativa. Assim, foram realizadas avaliações com o intuito de determinar o segundo tipo de interação (modo ligação) do ligante frente à macromolécula (stDNA). Para isso, empregaram-se estudos de

competição com sondas (Figura 19) que já tem seu modo de ligação estabelecido na literatura, a exemplo do brometo de etídio (EB), ligante que interage via intercalação e o berenil, que interage via *groove* (SAVARIZ et al., 2014; SALVIA et al., 2015; PALCHAUDHURI; HERGENROTHER, 2007).

Figura 19 – Estrutura dos competidores: a) brometo de etídio e b) berenil.



Fonte: elaborado pelo autor, 2017

Desse modo, para inferir sobre o segundo modo de ligação, adotou-se a estratégia de acordo com a análise do *quenching*, que é denominado como qualquer processo em que ocorre diminuição de intensidade de fluorescência de uma espécie (WANG et al., 2015). Esse processo pode ser mensurado calculando-se a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) (equação 5)

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad \text{equação 5}$$

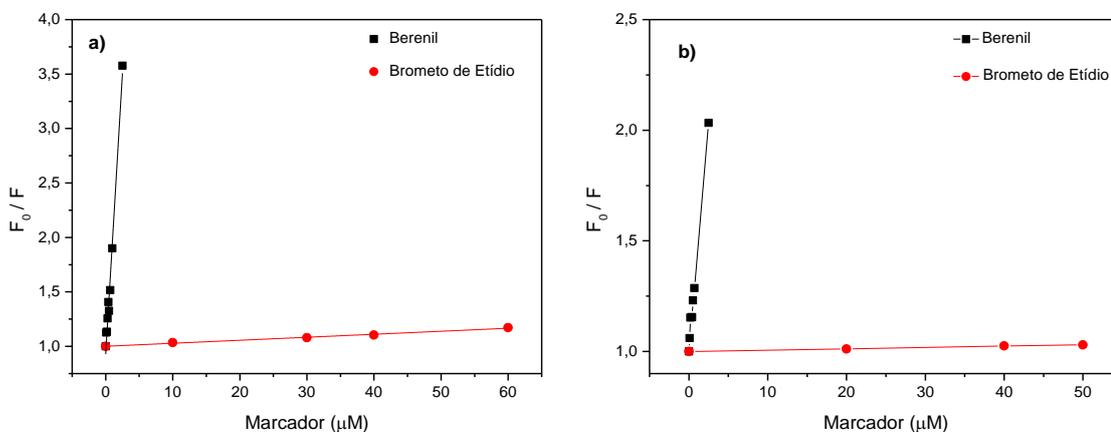
em que, F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e na presença de stDNA, respectivamente, $[Q]$ é a concentração do *quencher* (espécie que desativa o fluoróforo inibindo sua emissão de fluorescência) e K_{SV} a constante de Stern-Volmer. Os resultados dos cálculos de K_{SV} para os sistemas com berenil e brometo de etídio na presença e ausência de NaCl são demonstrados na Tabela 3, assim como o estudo comparativo entre as duas sondas são vistos na Figura 20.

Tabela 3 - Constante de Stern-Volmer na ausência e presença de NaCl (100 mM) para brometo de etídio (EB) e berenil. (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μ M, stDNA 6 μ M, 25 °C).

Marcador	K_{SV} (10^5 L mol^{-1}) (Sem NaCl)	K_{SV} (10^5 L mol^{-1}) (NaCl 100 mM)
Brometo de etídio	$0,030 \pm 0,001$	$0,0060 \pm 0,0003$
Berenil	$10,0 \pm 0,4$	$4,0 \pm 0,1$

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Figura 20 – Gráfico comparativo entre brometo de etídio e berenil por K_{SV} . a) Na ausência de NaCl (b) Na presença de NaCl (100 mM). Estudo com berenil foi feito: TT 5 μ M, stDNA 15 μ M, berenil (0,1 – 2,5 μ M); (Estudo com EB: EB 2 μ M, stDNA 6 μ M, TT (2 – 60 μ M).



Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Percebe-se por meio dos valores de K_{SV} que o modo de ligação ocorre via *groove*, pois ao comparar a Tabela 3 e a Figura 20 os resultados demonstram que o berenil desloca a TT que está interagindo com a macromolécula, indicando a competição pelo mesmo local de interação. Além disso, uma segunda informação pode ser também analisada pelo perfil estrutural do ligante que de acordo com Shi e colaboradores (2006), em que compostos que interagem via *groove* apresentam centros positivos, derivados de grupamentos aminos e ainda não apresentam alto grau de planaridade, a exemplo de DAPI, distamicina, netropsina, Hoechst 33342 e berenil, neste sentido a Tioflavina T apresenta um centro positivo derivado do grupamento amino e ainda não apresenta alto grau de planaridade, indicando que esse ligante tem fortes indícios de também interagir via *groove*.

4.10 Figuras de mérito

Após a otimização de todos os parâmetros (físicos e químicos) do método analítico espectrofluorimétrico proposto, com o intuito de validar o mesmo, foram preparadas três curvas analíticas com diferentes padrões, sendo eles: stDNA, ctDNA e RNA. Para as três curvas utilizaram-se os mesmos valores de concentrações (0 – 4 mg L^{-1}), concentração de TT (5 μ M) e tampão MES (10 mM, pH = 5). Sendo que em cada curva, três pontos (branco analítico, segundo ponto e penúltimo ponto da curva) foram preparados 10 vezes (dez soluções) e por consequência, cada ponto medidos 10 vezes.

Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) foram calculados em função dos sinais de fluorescência. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado para valores de concentração no segundo e penúltimo ponto da curva, visto que são também as

regiões com maiores erros instrumentais. Assim, foram realizados os cálculos dos parâmetros relacionados as figuras de mérito e os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados dos cálculos das figuras de mérito. FL – faixa linear. (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 µM, 25°C).

Ácido nucleico	FL, mg L ⁻¹	Curva IF = aC _{DNA/RNA} + b	r	RSD, %	LOD, mg L ⁻¹	LOQ, mg L ⁻¹
stDNA	0,1 - 1,5	IF = 558(±19)C _{DNA} + 53(±14)	0,997	1,2 – 3,7	0,012	0,030
ctDNA	0,25 – 3	IF = 278(±4)C _{DNA} + 65 (±6)	0,999	0,9 – 3,7	0,080	0,150
RNA	0,25 – 3	IF = 314(±10)C _{RNA} + 58 (±18)	0,996	0,5 – 3,2	0,073	0,120

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Pelos resultados observados na Tabela 4 é possível inferir que tanto a macromolécula empregada ctDNA e RNA foram as espécies que tiveram a faixa linear mais larga (mg L⁻¹), o RNA apresentou sensibilidade maior que o ctDNA, possivelmente devido à maior probabilidade de interação, pois como RNA apresenta-se na forma de fita simples, e o acesso as bases do RNA é facilitado (NELSON, COX, 2011). Já o DNA de salmão foi o que apresentou a menor faixa linear e também a maior sensibilidade ou coeficiente angular, sendo então escolhido como padrão para aplicação do método proposto.

4.11 Análise dos possíveis interferentes

Nessa análise, foram realizadas medidas de fluorescência molecular de espécies que poderiam influenciar negativamente ou positivamente no método. Para tanto, elas foram escolhidas de acordo com a matriz (amostra: saliva ou plasma sanguíneo), na qual pode-se aplicar o método proposto. Neste sentido, foram selecionados dois tipos de amostras, saliva e plasma sanguíneo.

As espécies então escolhidas totalizaram vinte possíveis interferentes, sendo elas: Na⁺, K⁺, Mg(II), Fe(III), Zn(II), Cu(II), NH₄⁺, Ca(II), Cl⁻, F⁻, SO₄²⁻, SCN⁻, NO₃⁻, HCO₃⁻, HPO₄⁻, ureia, ácido linoleico, glicose, albumina e lisozima (BISHOP; FODEY; SCHOEFF, 2005; TURELL et al., 2009; DOUGLAS, 2006). As concentrações empregadas nas análises, primeiramente foram aquelas encontradas nas condições de normalidade fisiológica, mas como as amostras para serem aplicadas no método devem ser diluídas devido a sua coloração e viscosidade, foi considerado de modo geral um grau de diluição entre 100-200x, com exceção do Fe(III) e das proteínas albumina e lisozima que foram diluídas 2000, 1000x,

4000000x respectivamente, por terem apresentado maior grau de interferência, ou seja, maior que 5% em relação a IF de referência.

O parâmetro de referência para indicação da espécie que não influenciou na interação TT-DNA ou determinação de ácidos nucleicos totais foi por meio da recuperação da macromolécula (stDNA), considerando uma margem de $\pm 5\%$, geralmente aplicadas em procedimentos analíticos que utilizam concentrações (mg L^{-1}). Assim, foi medido um sistema na ausência do possível interferente, contendo $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de stDNA, $5 \text{ }\mu\text{M}$ de TT e tampão MES (10 mM , $\text{pH} = 5$), e na presença dos possíveis interferentes. Cada interferente foi adicionado ao seu respectivo tubo, contendo as mesmas condições citadas anteriormente e concentração final mostrada na Tabela 5 considerando as determinadas diluições.

Tabela 5 – Dados referentes ao estudo dos possíveis interferentes. (Tampão MES 10 mM , $\text{pH} = 5$, TT $5 \text{ }\mu\text{M}$, stDNA ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

Interferentes	Concentração normalidade fisiológica	Concentração empregada da espécie para análise	Fator de Diluição	% (recuperação em stDNA)
Na^+	150 mM	1 mM (23 mg L^{-1})	150	95,5
K^+	5 mM	$50 \text{ }\mu\text{M}$ ($1,95 \text{ mg L}^{-1}$)	100	100,6
Mg(II)	1,5 mM	$10 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,25 \text{ mg L}^{-1}$)	150	99,9
Fe(III)	2 mM	$1,0 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,055 \text{ mg L}^{-1}$)	2000	96,0
Zn(II)	$14 \text{ }\mu\text{M}$	$0,2 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,010 \text{ mg L}^{-1}$)	70	101,1
Cu(II)	$44 \text{ }\mu\text{M}$	$0,5 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,030 \text{ mg L}^{-1}$)	88	100,9
NH_4^+	6 mM	$30 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,54 \text{ mg L}^{-1}$)	200	99,1
Ca(II)	2,5 mM	$25 \text{ }\mu\text{M}$ (1 mg L^{-1})	100	96,7
Cl^-	150 mM	1 mM ($35,5 \text{ mg L}^{-1}$)	150	95,5
F^-	$10 \text{ }\mu\text{M}$	$50 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,95 \text{ mg L}^{-1}$)	-	100,6
SO_4^{2-}	0,5 mM	$10 \text{ }\mu\text{M}$ ($1,0 \text{ mg L}^{-1}$)	50	99,9
SCN^-	2 mM	$20 \text{ }\mu\text{M}$ ($1,16 \text{ mg L}^{-1}$)	100	99,5
NO_3^-	5 mM	$50 \text{ }\mu\text{M}$ ($3,10 \text{ mg L}^{-1}$)	100	96,7
HCO_3^-	27 mM	$540 \text{ }\mu\text{M}$ (33 mg L^{-1})	50	95,6
HPO_4^{2-}	1 mM	1 mM (96 mg L^{-1})	-	97,0
Ureia	4 mM	$40 \text{ }\mu\text{M}$ ($2,4 \text{ mg L}^{-1}$)	100	99,0
Ác. linoléico	5 mM	$25 \text{ }\mu\text{M}$ ($7,0 \text{ mg L}^{-1}$)	200	99,8
Glicose	6 mM	$60 \text{ }\mu\text{M}$ ($10,8 \text{ mg L}^{-1}$)	100	99,5
Albumina	1 mM	25 nM ($0,16 \text{ mg L}^{-1}$)	4000000	104,9
Lisozima	$7 \text{ }\mu\text{M}$	7 nM ($0,10 \text{ mg L}^{-1}$)	1000	104,4

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Sendo assim, por meio da Tabela 5 é possível observar que utilizando as concentrações de acordo com os determinados fatores de diluição dos possíveis interferentes,

o percentual de recuperação obtido de stDNA teve o valor muito próximo de 100% ou obedecendo a margem de $\pm 5\%$.

De modo complementar, as espécies (Fe(III), albumina e lisozima) que utilizaram os maiores valores de fator de diluição foram as que apresentaram maiores influências, sejam elas positivas ou negativas, na intensidade de fluorescência do complexo TT-stDNA. O Fe(III) em estudos de interação é citado como uma espécie capaz de provocar *quenching*, devido a formação de complexo não fluorescente (HUA; XIAN; FEN, 2003). Com ctDNA esse íon apresenta constante de ligação na faixa de $2,3 \times 10^{11}$ a $4,8 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, pH = 7,4, mas empregando análises gráficas por estudos cinéticos, espectroscópicos e separação por coluna cromatográfica (NETTO; FERREIRA; AUGUSTO, 1991). Sendo assim, para o método proposto o respectivo íon irá interagir com a macromolécula e competir com a molécula de TT mesmo pelo mesmo local de interação, o que provocará a diminuição de IF, pois não irá ocorrer interação TT-DNA.

Já as macromoléculas albumina e lisozima podem citadas em dois estudos respectivamente. Primeiro, por meio do trabalho de Sen e colaboradores (2009), no qual infere que a albumina pode interagir com a sonda, impedindo a interação da mesma com DNA, mas essa proteína ao interagir com a TT tem seu sinal de emissão de fluorescência amplificado, possivelmente em função da formação de fibrilas proteicas ou ainda de regiões de interação na proteína que permitam um comportamento similar quando comparado ao DNA. E o segundo, no caso da lisozima, também poderão ocorrer o mesmo procedimento e como a TT também responde, irá ocasionar o aumento do sinal de fluorescência do sistema, interferindo na aplicabilidade do método (VUS et al., 2015).

4.12 Ensaio de recuperação

Neste ensaio, o método foi avaliado com intuito de obter informações a respeito de seu desempenho frente a amostras reais. Inicialmente, realizou-se análise de uma amostra de DNA extraído de plasma sanguíneo, a qual indicou concentração de $51,5 \pm 3,0 \text{ mg L}^{-1}$ determinada por UV-vis. A concentração obtida pelo método proposto foi de $57 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ (stDNA) e $48,5 \pm 2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (ctDNA) indicando que o método apresentou resultado 97-114% concordante com valor de referência.

Uma vez que o método foi aplicado para quantificação de DNA extraído e mostrou-se efetivo, foi realizado ensaio de recuperação em amostras mais complexas, para tanto, empregou-se amostras de saliva bruta nesta avaliação. As amostras de saliva coletadas foram diluídas em tampão MES (10 mM, pH = 5) e analisadas nas condições já estabelecidas. O

primeiro sistema era isento de stDNA, e perfazia uma solução apenas com TT (5 μM), saliva diluída e o respectivo tampão, o que possibilita a determinação da quantidade de ácidos nucleicos totais presente nas amostras. Os três outros sistemas continham as mesmas espécies citadas anteriormente, mas adicionalmente, concentrações crescentes de DNA, possibilitando avaliar possíveis efeitos de matriz no método proposto. Sendo assim, os resultados desse estudo são demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultados da recuperação do DNA.

Amostra	DNA adicionado (mg L^{-1})	DNA determinado (mg L^{-1}) / stDNA	% recuperação	DNA determinado (mg L^{-1}) / ctDNA	% recuperação
Saliva 1	-	0,18	-	0,12	-
	0,5	0,53	70	0,52	80
	1	0,85	67	0,90	78
	2	1,52	67	1,70	79
Saliva 2	-	0,17	-	0,12	-
	0,5	0,56	78	0,56	89
	1	0,89	72	0,95	83
	2	1,54	68	1,72	80
Saliva 3	-	0,16	-	-	-
	1	0,90	74	-	-
	2	1,65	75	-	-
	3	2,60	81	-	-

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

Dessa forma, é demonstrado na Tabela 6 o estudo para três amostras de saliva. Para saliva 1 e 2 aplicou-se uma faixa de stDNA e ctDNA adicionado entre 0,5 e 2 mg L^{-1} , mas com intuito de avaliar se poderia ocorrer a melhoria na porcentagem de recuperação, aplicou-se na saliva 3 uma faixa de stDNA ente 1 – 3 mg L^{-1} e como demonstrado permaneceu na média de 80% de recuperação. De um modo geral, o método proposto apresenta percentual de recuperação satisfatório, podendo-se inferir que mesmo para o grau de complexidade das amostras, devido à presença de outras espécies na saliva, foi possível obter recuperações de 67 – 89%.

Quanto à concentração de ácidos nucleicos totais expressos em função da concentração de stDNA, as amostras de saliva e seus respectivos fatores de diluição (FD), de 100 (saliva 1) e 200 vezes (salivas 2 e 3) apresentaram concentração 18, 24 e 32 mg L^{-1} , respectivamente. Desse modo, quando essas concentrações são comparadas com alguns trabalhos encontrados na literatura, que determinaram DNA extraído de saliva por espectrofotometria, a exemplo de Khare e colaboradores (2014) que determinou DNA total

obtendo 48,4 mg L⁻¹, Quinque e colaboradores (2006) DNA total 11,4 mg L⁻¹ e Nunes e colaboradores (2012) em 84 mg L⁻¹ de DNA extraído por um kit denominado Oragene™, observou-se que o método proposto apresenta valores na mesma ordem de grandeza. Assim, levando em consideração que as variações na concentração de DNA podem estar associadas à alimentação, forma de obtenção de saliva, carga bacteriana e entre outros fatores (NAVAZESH; CHRISTENSEN, 2004; JOHN et al., 2004) o método proposto mostrou-se efetivo.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo foi aplicada, inicialmente, a espectroscopia na região do UV-vis para indicar a interação TT-DNA, porém, a técnica majoritária empregada no desenvolvimento do trabalho consistiu na técnica de espectrofluorimetria. Diante disso, observou-se que o perfil espectral por fluorescência molecular entre ctDNA e stDNA, era praticamente idêntico, devido à similaridade das % dos pares de bases, sendo escolhido o stDNA em função do seu menor custo de aquisição.

Pela análise dos *slits* (largura das fendas) do espectrofluorímetro, observou-se melhores valores de coeficiente angular para os *slits* 5x10 (219,2) e 10x5 (147,4), considerando a curva em mg L^{-1} , contudo ainda foi necessário analisar uma segunda prerrogativa (a/B), no qual os valores das razões foram 5 e 6, respectivamente. Porém, como os valores obtidos foram muito próximos, a definição da escolha ocorreu de fato pela sensibilidade, submetendo-se assim a escolha do *slit* 5x10.

Na etapa de otimização de parâmetros químicos foi avaliado inicialmente o pH do meio empregando o tampão fosfato na faixa de pH = 2 a 8, demonstrando o melhor valor de coeficiente angular para pH = 5, porém como este apresentou interferência espectral, foram avaliadas outras espécies de tampão biológico que não apresentam tal fato. Neste sentido, os resultados demonstraram que este mesmo valor de pH e o tipo de tampão MES, foram os que apresentaram melhor sensibilidade e valor na razão coeficiente angular sobre o branco analítico, sendo então, esta considerada a melhor condição.

A concentração do tampão MES também foi avaliada e os melhores resultados em termos de sensibilidade ocorreram entre 2,5 e 10 mM, mas o valor de 10 mM foi escolhido por ter maior eficiência em manter o pH do meio.

Pelos estudos da força iônica do meio (0 – 150 mM de NaCl) constatou-se que o aumento da concentração desses íons provoca diminuição na sensibilidade do método. Tal fato evidenciou que a interação TT-DNA ocorre via atração eletrostática, mas que mesmo assim ainda ocorre um segundo tipo de interação.

Nos estudos da concentração do ligante (TT), os três melhores valores obtidos em termos de sensibilidade foram 5, 10 e 25 μM , porém a concentração do ligante TT (5 μM), mesmo sendo menor valor entre os três (Figura 15) foi a escolhida, devido ao valor da razão a/B ter sido relativamente o maior.

Nas condições otimizadas, foi realizada análise cinética sendo possível inferir que a reação sonda-DNA/RNA é imediata podendo ser medida em até 120 minutos. Já na análise de

estabilidade os resultados demonstram que quando o sistema foi exposto a uma radiação constante advinda do equipamento, durante 120 minutos, a interação TT-DNA permanece praticamente estável.

Na análise do modo de ligação, dois competidores foram empregados para elucidar o segundo tipo de interação (EB/intercalante e berenil/*groove*). Os resultados demonstraram que quando adicionado berenil, houve deslocamento do ligante TT pelo DNA, indicando que o segundo modo de ligação ocorre via *groove*.

Na validação do método entre as espécies analisadas stDNA, ctDNA e RNA, os melhores resultados em termos de sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação ocorreram para a macromolécula stDNA, sendo ela escolhida como padrão para ser empregada no estudo do desenvolvimento e aplicação do método.

Através dos resultados observados para possíveis interferentes, constatou-se que a maioria dessas espécies avaliadas não causaram variação no sinal de fluorescência maior que 5% em relação à referência, apenas: Fe (III), albumina e lisozima, as quais tiveram de ser diluídas mais vezes para não causar interferências significativas.

Por fim, foi determinada a concentração de uma amostra de DNA extraído de plasma sanguíneo e se obteve precisão na determinação entre 97-114%. Já no ensaio de recuperação, foi avaliada a capacidade do método em recuperar stDNA/ctDNA adicionado à matriz (saliva). Os resultados apresentaram porcentagem de recuperação entre 67 – 89%, indicando que o método é robusto mesmo na presença de outras espécies na amostra real.

Em suma, o método fluorimétrico desenvolvido para determinação de ácidos nucleicos presentes em amostras biológicas (saliva e plasma), apresentou-se sensível, de fácil operação e boa reprodutibilidade.

REFERÊNCIAS

- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. **Revista Virtual de Química**, Ago., 2015.
- BIANCALANA, M.; KOIDE, S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. **Biochimica et Biophysica Acta**, USA, v.1804, p. 1405-1412, Jul., 2010.
- BISHOP, M.L.; FODEY, E.P.; SCHOEFF, L.E. **Clinical Chemistry: principles, procedures, correlations**. 5.ed. Filadelfia. Lippincott Williams E Wilkins, 2005.
- CAREY, F. A., **Química Orgânica**. 7.ed. São Paulo: bookman, 2011.
- DOUGLAS, C. R., **Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- FILHO, Luiz da Silva Góes, **Caracterização e estudos cinéticos de albumina tratada com espécies reativas derivadas de óxidos de nitrogênio: espectroscopia de absorção e fluorescência**. 2005. Dissertação (Mestrado em Física) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- GUIBAULT, G. G., **Practical Fluorescence**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1990.
- HARRIS, D.C.; **Análise Química quantitativa**, 6ª Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- HUA, Z. G.; XIAN, J. H.; FEN, Y. B. A Sensitive Fluorescence Quenching Method for the Determination of Iron (II) with 1,10-Phenanthroline. **Chinese Journal of chemistry**, China, v. 21, n. 3, p. 301-304, Mar., 2003.
- ILANCHELIAN. M.; RAMARAJ. E. Emission of thioflavin T and its control in the presence of DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Índia, v. 162, p. 129-137, Jul., 2004.
- ISLAM, M. M., et al. Thermodynamics and kinetic studies in the binding interaction of cyclic naphthalene diimide derivatives with double stranded DNAs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Japão, v. 23, p. 4769–4776, Jun., 2015.

JOHN, M. A. R., et al. Interleukin 6 and interleukin 8 as potential biomarkers for oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, EUA, v. 130, p. 929-935, Ago., 2004.

KHARE, P. et al. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. **Journal of Forensic Dental Sciences**, Índia, v. 6, n.2, p. 81-85, Ago., 2014.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3.ed. Baltimore: Springer, 2006.
LIU, L. et al. Selective recognition of ds-DNA cavities by a molecular rotor: switched fluorescence of thioflavin T. **Molecular Biosystems**, China, v. 9, p. 2512-2517, Jul., 2013.

NAVAZESH, M.;CHRISTENSEN, C. M., A comparison of whole mouth resting and stimulated salivary measurement procedures. **Journal of Dental Research**, EUA, v. 61, p. 1158-1162, Out., 1982.

MASKEVICH, A. A., et al. Spectral Properties of Thioflavin T in Solvents with Different Dielectric Properties and in a Fibril-Incorporated Form, **Journal of Proteome Research**, Bielorrússia, v. 6, p. 1392-1401, Fev., 2007.

MARTÍNEZ, R.; CHACÓN-GARCÍA, L. The Search of DNA-Intercalators as Antitumoral Drugs: What it Worked and What did not Work. **Current Medicinal Chemistry**, México, v. 12, p. 127-151, 2005.

McGHEE, J. D., von HIPEPEL. P.H. Theoretical Aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. **Jornal of Molecular Biology**, USA, v. 86, p. 469-489, Jun., 1974

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5. ed. England: Pearson, 2005.

MURUDKAR, S., et al. Ultrafast molecular rotor based DNA sensor: An insight into the mode of interaction. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Índia, v. 295, p. 17-25, Ago., 2014.

MURUDKAR, S., et al. Ultrafast molecular rotor: an efficient sensor for premelting of natural DNA. **Chemical Communications**. Índia, v. 48, p. 5301-5303. Mar., 2012.

NAKAMOTO, K.; TSUBOI, M.; STRAHAN, G. D. **Drug–DNA Interactions: Structures and Spectra**. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2008.

NARAYANASWAMY, N., et al. A Thiazole Coumarin (TC) Turn-On Fluorescence Probe for AT-Base Pair Detection and Multipurpose Applications in Different Biological Systems. *Scientific Reports*, Índia, v. 4:6476, Ago., 2014.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5ed, São Paulo: Sarvier, 2011.

NETTO, L. E. E.; FERREIRA, A. M. C.; AUGUSTO, O., Iron(III) binding in DNA solutions: Complex formation and catalytic activity in the oxidation of hydrazine derivatives. *Chemico-Biological Interactions*, Brasil, v. 79, p. 1-14, Fev., 1991.

NUNES, A. P., et al. Quality of DNA extracted from saliva samples collected with the Oragene DNA self-collection kit. *Medical Research Methodology*. v. 12 , p. 60-65, Mai.,2012

PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current Opinion in Biotechnology**, EUA, v. 18, p. 497-503, Nov., 2007.

PUYO, S.; MONTAUDON, D.; POURQUIER, P. From old alkylating agents to new minor *groove* binders. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, França, v. 89, p. 43–61, Jul., 2014.

QIU. B., et al. Synthesis of *N*-4-butylamine acridone and its use as fluorescent probe for ctDNA. **Biosensors and Bioelectronics**, China, v. 24, p. 1281-1285, Ago., 2008.

QUINQUE, D., et al. Evaluation of saliva as a source of human DNA for population and association studies. **Analytical Biochemistry**, Alemanha, v. 353, n. 2, p. 272-277, Jun., 2006.

REHMAN, S. U., et al. Studying non-covalent drug–DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Índia, v. 576, p. 49-60, Mai., 2015.

RODRIGUES, A. R. O., et al. Benzothienoquinolines: New one-pot synthesis and fluorescence studies of their interaction with DNA and polynucleotides. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Portugal, v. 294, p. 20–30, Ago., 2014.

SAVARIZ, F.C., et al. Synthesis and antitumor activity of novel 1-substituted phenyl 3-(2-oxo-1,3,4-oxadiazol-5-yl) β -carboline and their Mannich bases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Brasil, v.22, p. 6867–6875, Out., 2014.

SALVIA, M., et al. Thiazotropsin aggregation and its relationship to molecular recognition in the DNA minor *groove*. **Biophysical Chemistry**, México, v.179, p. 1–11, Abr., 2013.

SEN, P., et al., Interactions of thioflavin T with serum albumins: Spectroscopic analyses. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Índia, v. 74, p. 94-99, Set., 2009.

SHAHABADI, N.; HADIDI, S. Spectroscopic studies on the interaction of calf thymus DNA with the drug levetiracetam. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Iran, v. 96, p. 278–283, Mai., 2012.

SHI, X., et al. Stability analysis for double-stranded DNA oligomers and their noncovalent complexes with drugs by laser spray. **Journal of Mass Spectrometry**, Japão, v. 41, p. 1086-1095, Mai., 2006.

Sigma-Aldrich buffer, disponível em: < <http://www.Sigmaaldrich.com/life-science/core/bioreagents/biological-buffers/learning-center/buffer-reference-center.html>>, Acesso em: 29 de setembro de 2016.

Sigma-Aldrich ctDNA, disponível em:
<<http://www.Sigmaaldrich.com/catalog/product/Sigma/d1501?lang=pt®ion=BR>>, Acesso em: 05 de outubro de 2016.

Sigma-Aldrich stDNA, disponível em:
<<http://www.Sigmaaldrich.com/catalog/product/Sigma/d1626?lang=pt®ion=BR>>, Acesso em: 05 de outubro de 2016.

SILVA, Marina de Magalhães. **Interação entre compostos biologicamente ativos e ctDNA (*calf thymus*): uma abordagem espectroscópica**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

SINGH, P. K., et al. Probing the DNA–ionic liquid interaction using an ultrafast molecular rotor. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Índia, v. 246, p. 16-22, Out., 2012.

SKOOG, et al. **Fundamentos de química analítica**. 8.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.

Thermofisher probes, disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/fluorescent-probes.html>>, Acesso em: 15 de Outubro de 2016.

TURELL, L., et al. Oxidation of the albumin thiol to sulfenic acid and its implications in the intravascular compartment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Uruguai, v. 42, p. 305-311, Fev., 2009.

WANG, Q., et al. Study on the interaction characteristics of cefamandole with bovine serum albumin by spectroscopic technique. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, China, v. 136, p. 321–326, Out., 2015.

VUS, K., et al., Thioflavin T derivatives for the characterization of insulin and lysozyme amyloid fibrils in vitro: Fluorescence and quantum-chemical studies. **Journal of Luminescence**, Ucrânia, v. 159, p. 284-293, Mar., 2015.

WU, M., et al., Synthesis of a novel fluorescent probe based on acridine skeleton used for sensitive determination of DNA, **Talanta**, China, v. 75, p. 995-1001, Jan., 2008.

ZHANG, Y.; HUANG, K. The influence of the hydrated metal cations binding to adenine-N7 or adenine-N3 on the hydrogen bonding in adenine–thymine base pair: A comparative study. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, China, v. 822, p. 57–64, Jul., 2007.

ZIMMERMANN-DIMER, L.M.; MACHADO, V.G. Quimiossensores cromogênicos e fluorogênicos para a detecção de analitos aniônicos. **Química Nova**, Brasil, v. 31, n. 8, p. 2134-2146, Nov., 2008.

APÊNDICE A

APÊNCIA A1 - Equações das retas com diferentes concentrações do tampão MES. (pH = 5, TT 5 μ M, stDNA (0 – 4 mg L⁻¹), 25 °C).

Concentração tampão MES (mM)	Equações
2,5	IF=660,3(\pm 16,5) C_{DNA} - 4,2 (\pm 12,7) N=6 Branco analítico = 21,4 – Fluorescência $r = 0,999$ F.L= 0 – 1,5 mg L ⁻¹
5	IF =665,3(\pm 19,2) C_{DNA} - 10,5 (\pm 14,8) N=6 Branco analítico = 22,74 – Fluorescência $r = 0,998$ F.L= 0 – 1,5 mg L ⁻¹
10	IF =644,40(\pm 19,2) C_{DNA} - 6,4 (\pm 14,8) N=6 Branco analítico = 21,8 – Fluorescência SD=25,0 $r = 0,998$ F.L= 0 – 1,5 mg L ⁻¹
25	IF =588,4(\pm 12,3) C_{DNA} + 3,0 (\pm 9,5) N=6 Branco analítico = 24,0 – Fluorescência $r = 0,999$ F.L= 0 – 1,5 mg L ⁻¹
50	IF =473,0(\pm 6,0) C_{DNA} + 15,0 (\pm 5,6) N=6 Branco analítico = 30,3 – Fluorescência $r = 0,999$ F.L= 0 – 2,0 mg L ⁻¹
100	IF =361,8(\pm 4,4) C_{DNA} + 18,3 (\pm 5,7) N=8 Branco analítico = 32,6 – Fluorescência $r = 0,999$ F.L= 0 – 2,5 mg L ⁻¹

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.

APÊNCIE A2 – Equações das retas com diferentes concentrações de NaCl (mM). (Tampão MES 10 mM, pH = 5, TT 5 μ M, stDNA (0 – 4 mg L⁻¹), slit 5x10, 25 °C).

Força iônica (NaCl), mM	Equação
0	IF =644,4(\pm 19,2) C_{DNA} - 6,4 (\pm 14,8) N=6 Branco analítico= 21,8 – Fluorescência SD=25,0 R=0,998 F.L= 0 – 1,5 mg L ⁻¹
5	IF =548,6(\pm 16,3) C_{DNA} + 0,8 (\pm 12,5) N=6 Branco analítico= 29,8 – Fluorescência SD=21,2 R=0,998 F.L= 0 – 1,5 mg L ⁻¹
10	IF =471,4(\pm 7,0) C_{DNA} + 11,5 (\pm 7,3) N=7 Branco analítico= 22,3 – Fluorescência SD=13,2 R=0,999 F.L= 0 – 2 mg L ⁻¹
25	IF =452,3(\pm 10,4) C_{DNA} + 0,6 (\pm 10,8) N=7 Branco analítico= 22,4 – Fluorescência SD=19,4 R=0,998 F.L= 0 – 2 mg L ⁻¹
50	IF =374,1(\pm 5,0) C_{DNA} + 7,6 (\pm 6,6) N=8 Branco analítico= 23,2 – Fluorescência SD=12,4 R=0,999 F.L= 0 – 2,5 mg L ⁻¹
100	IF =271,2(\pm 2,0) C_{DNA} + 19,8 (\pm 3,2) N=9 Branco analítico= 22,3 – Fluorescência SD=6,3 R=0,999 F.L= 0 – 3 mg L ⁻¹
150 mM	IF =216,30(\pm 2,80) C_{DNA} + 13,30 (\pm 4,50) N=9 Branco analítico= 22,8 – Fluorescência SD=8,8 R=0,999 F.L= 0 – 3 mg L ⁻¹

Fonte: elaborado pelo autor, 2017.