Universidade de São Paulo

Instituto de Física

**Efeitos de Solvente na Absorção Ótica e Fluorescência
do Ácido Aminobenzóico**

Marcelo Takara

Dissertação apresentada ao
Instituto de Física – USP para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Amando Siuti Ito

INSTITUTO DE FÍSICA

Serviço de Biblioteca e Informação

Tombo: 3578
ex. 2

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Amando Siuti Ito (FFCLRP)

Prof. Dr. Iouri Borissevitch (FFCLRP)

Prof. Dra. Carmen Silvia de Moya Partiti (IFUSP)

São Paulo
2001

Amando Siuti Ito
Armando Corbani Ferraz
Prof. Armando Corbani Ferraz
Presidente da Comissão de Pós Graduação

535.352

T136e

M

2001

Ex.2

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Takara, Marcelo

Efeitos de Solventes na Absorção Ótica e Fluorescência
do Ácido Aminobenzóico. São Paulo, 2001.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo
Instituto de Física - Departamento de Física Geral

Orientador: Prof. Dr. Amando Siuiti Ito
Área de Concentração: Física

Unitermos: 1. Ácido Aminobenzóico; 2. Fluorescência;
3. Absorção Ótica; 4. Efeitos de Solventes.

USP/IF/SBI-056/2001

Agradecimentos

Ao Prof. Amando não só pela paciência, compreensão e dedicação em orientar, mas sobretudo pela amizade e respeito mútuo, cultivada durante estes anos.

À Prof.^a Teresa, pelo interesse e pelas suas contribuições ao meu trabalho e sobretudo pela experiência didática adquirida durante a monitoria do seu curso.

Ao pessoal do laboratório de Química da FFCLRP – USP, em especial à Prof.^a Laura, pela atenção despendida.

Ao Prof. Luís Juliano da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP pela síntese das amostras utilizadas.

À Rozane, à Aninha e ao Roberto Lopes, que me acompanharam em minhas primeiras experiências, ainda na iniciação científica.

À Prof.^a Carla, pelo interesse demonstrado em meu projeto e também pela sua amizade.

À Fapesp e ao CNPq, pelo amparo financeiro ao projeto.

Aos colegas e também amigos Roberto e Eduardo, pela ajuda no laboratório e discussões sobre o trabalho, e ao Marcos pelo esforço na simulação computacional.

À minha amiga Cássia, pelas discussões e sobretudo pela valiosa ajuda na revisão final do texto, além dos jogos no CEPÊ, caminhadas na Serra e sessões de cinema com o pessoal da República “Casa da Mãe Joana”.

À turma da sala, Suely, Silvana, Lorena, Alberto, Renato, Mércia pelos bate-papos intermináveis e momentos de descontração.

Aos funcionários da secretaria da FGE, Dirce, Ivone e Alexandre, pela atenção com que sempre me atenderam.

A todos os amigos que fiz no grupo de biofísica, o pessoal do corredor, pelo clima de amizade e descontração que sempre prevaleceu nas festinhas do grupo.

Ao pessoal louco do dep. de física matemática, Mário, Zé, João e do dep. de física dos materiais, Vinícius, Fernando e todos aqueles que participaram dos maravilhosos "sarais étlicos".

Aos amigos e moradores da República "Casa da Mãe Joana", Fabinho, Blanes, Chico, Ha, Sybele, Patricia pela descontração nos momentos de stress.

E a minha Família, que apesar das dificuldades, sempre me amparou durante todo este tempo, e em especial o meu irmão Nelson e a minha Mãe, que sempre me incentivaram.

Resumo

O estudo das propriedades de absorção ótica e emissão fluorescentes do Ácido Orto-Aminobenzóico (o-Abz) em diferentes meios solventes tem por finalidade contribuir para a proposta de seu uso como sonda fluorescente extrínseca em proteínas e peptídeos. Observou-se nos diversos solventes um elevado rendimento quântico para o Abz, variando crescentemente de ~ 0.2 a ~ 0.7 , com a polaridade. Utilizando-se o modelo de Lippert, pudemos verificar que o Abz possui um momento de dipolo excitado maior do que aquele no estado fundamental, o que corrobora a observação de deslocamentos de Stokes tendendo para o vermelho nos picos dos espectros de emissão fluorescente, ante o aumento da polaridade do solvente. Esse comportamento no entanto se torna irregular quando o Abz se acha diluído em solventes como a água e os alcoóis. A análise dos dados sobre a posição dos máximos de absorção e emissão levou a indentificar dois tipos de efeitos de solvente: os gerais e os específicos. Os efeitos gerais foram analisados através da equação de Lippert, enquanto os específicos exigiram um conhecimento das características do solvente quanto à capacidade de formação de pontes de hidrogênio, o que foi possível por meio da tabela de parâmetros empíricos para solventes elaborada por Kamlet et al. Os desvios em relação aos efeitos gerais do solvente puderam ser atribuídos à formação de pontes de hidrogênio entre solventes doadores de prótons e o Abz. Nestes casos particulares, as pontes de hidrogênio geraram deslocamentos para o azul nos máximos do espectro de absorção ótica do Abz.

Abstract

The study of the optical absorption and fluorescence emission properties of ortho-aminobenzoic acid (o-Abz) in different environments aims to provide information concerning its use as an extrinsic fluorescent probe in proteins and peptides. It was observed high quantum yield for Abz in several solvents, varying from ~0,2 to 0,7, with the increase in the solvent polarity. Using the Lippert's model, we observed that Abz has an excited state dipole moment larger than that of the ground state, which agrees with the Stoke's shift to longer wavelengths, when increasing the polarity of the solvent. Such behaviour, however, becomes irregular when Abz is diluted in solvents like water and alcohols. The analysis of the measurements of optical absorption and fluorescence emission maxima lead us to identify two kinds of solvent effects: the general and the specific ones. The general effects were analyzed using the Lippert's equation, while the interpretation of the specific effects demanded a knowledge of the solvent features related to its hydrogen bonding capacity. This was done using a set of empirical parameters proposed by Kamlet et al. The deviations with respect to the general effects could then be attributed to hydrogen bond formation between hydrogen donor solvents and Abz. In such cases, the hydrogen bond formation generated blue shifts in the spectral position of the optical absorption bands of Abz.

ÍNDICE

1.Introdução

1.1 Abz.....	01
1.2 Efeitos de Solventes.....	02
1.2.1 Efeitos de solventes em espectros de emissão fluorescente...	03
1.2.2 Efeitos gerais e específicos dos solventes.....	04
1.2.3 Efeitos gerais de solventes: a equação de Lippert.....	05
1.2 Objetivos.....	13

2.Técnicas

2.1 Absorção Ótica e Fluorescência.....	14
2.2 Fluorescência com Resolução Temporal.....	16

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparo das Amostras.....	22
3.2 Absorção ótica.....	23
3.3 Fluorescência estática.....	24
3.4 Fluorescência com resolução temporal.....	25

4. Resultados e Análise de dados

4.1 Abz em diversos solventes.....	30
4.2 Efeitos gerais	
4.2.1 Aplicação do modelo de Lippert.....	31
4.3 Efeitos específicos	
4.3.1 Parâmetros empíricos da polaridade do solvente.....	40
4.3.2 A escala π^*	41
4.3.3 Efeitos específicos.....	43
4.3.4 Efeitos de solvente no rendimento quântico, tempos de vida médios e taxas de decaimento.....	46

4.4	Efeitos da variação do pH sobre o Abz.....	51
4.5	Abz ligado a peptídeos e derivados aminados	
4.5.1	Efeitos da variação da polaridade do solvente em compostos Abz-peptídeos.....	51
4.5.2	Efeitos da variação de pH em compostos Abz ligados a aminoácidos.....	63

5. Discussão e Conclusões

5.1	Abz e efeitos gerais.....	67
5.2	Abz e efeitos específicos.....	68
5.3	Efeitos de solventes no rendimento quântico.....	69
5.4	Efeitos de pH.....	70
5.5	Propriedades de Abz-aminoácidos.....	70
5.6	Conclusões.....	71

6.	Referências Bibliográficas.....	73
----	---------------------------------	----

7.	Bibliografia Recomendada.....	76
----	-------------------------------	----

1. Introdução

1.1 Abz

A espectroscopia de fluorescência, tanto em estado estacionário como resolvida no tempo, tem sido intensamente empregada em Biofísica (Lakowicz, 1986), permitindo o estudo de uma grande variedade de processos biologicamente relevantes, tais como a interação entre peptídeos e membranas, a ação de enzimas proteolíticas e as mudanças conformacionais que acompanham a atividade biológica de macromoléculas. Este tipo de estudo é possível sempre que a macromolécula possua um grupo fluorescente e que as propriedades fluorescentes desse grupo, que atua como uma sonda fluorescente, dependam de características do meio como polaridade, viscosidade, grau de ordenamento, etc.

Nos casos mais frequentes o aminoácido triptofano cumpre o papel de sonda fluorescente adequada, pois é um componente natural de peptídeos e proteínas. A posição espectral da emissão fluorescente, depende fortemente da polaridade do meio em que se encontra o triptofano. Em meio apolar, os efeitos de estabilização de níveis eletrônicos são tais que o máximo de emissão fluorescente se desloca para comprimentos de onda menores. Esse fato é utilizado para monitorar a interação entre peptídeos contendo triptofano e membranas modelo: em presença de micelas ou vesículas de moléculas anfifílicas, os espectros de fluorescência do triptofano mostram o deslocamento para o azul característico da passagem do aminoácido para ambientes de menor polaridade (Cavatorta *et al.*, 1989 e 1991, Ito *et al.*, 1993, Jain *et al.*, 1985, McKnight *et al.*, 1991, Surewicz and Epand, 1984, Yamamoto and Tanaka, 1972, Yamashita *et al.*, 1989). O deslocamento espectral na passagem do triptofano de um meio aquoso para um meio apolar ocorre simultaneamente a um aumento na intensidade de fluorescência, que reflete a diminuição da

ocorrência de desexcitação por processos colisionais com moléculas de água.

Quando peptídeos e proteínas não contêm o triptofano em sua estrutura primária, torna-se necessário agregar uma sonda fluorescente exógena à macromolécula, com o cuidado de se verificar se esse grupo estranho não interfere na sua atividade biológica. Uma dessas sondas é a molécula de ácido aminobenzóico (Abz), que tem sido empregada juntamente com a molécula de N-(2,4,dinitrofenil)-etilenodiamina (Eddnp) em estudos sobre a atividade de enzimas proteolíticas.

O ácido aminobenzóico pode ligar-se ao terminal amino de aminoácidos e peptídeos mantendo, em muitos casos, rendimento quântico elevado. Todavia, sua fluorescência é suprimida em peptídeos contendo o grupo Eddnp ligado ao terminal carboxila, devido à ocorrência de processos de transferência de energia. Dada a proximidade entre os dois grupos quando incorporados a um peptídeo, a fluorescência do Abz fica bastante reduzida. Se houver hidrólise no peptídeo em presença de uma enzima proteolítica, ocorre aumento da fluorescência, sendo o ensaio bastante sensível para se medir a atividade hidrolítica da enzima, bem como a afinidade entre o substrato e a enzima (Chagas *et al.*, 1991; Juliano *et al.*, 1990, Yaron *et al.*, 1979).

Em meio aquoso, o ácido aminobenzóico possui a banda de absorção centrada em 310 nm e apresenta emissão fluorescente com uma banda larga centrada em 396 nm. Seu rendimento quântico é alto, da ordem de 0,60. Verificou-se que, quando ligado ao terminal amino de peptídeos e aminoácidos, ocorrem deslocamentos de 5 a 8 nm na banda de absorção e de 20 a 30 nm na banda de emissão. Além disso, a fluorescência mantém-se elevada, desde que o primeiro resíduo da cadeia não seja nem a prolina (Hirata *et al.*, 1998), nem o triptofano (Ito *et al.*, 1998). Por outro lado, assim como o triptofano,

moléculas de Abz-aminoácidos apresentam mudanças na posição espectral, na intensidade de fluorescência e no tempo de vida do estado excitado, quando na presença de agregados anfifílicos como micelas de SDS. Essas observações levaram à proposta de que a fluorescência do Abz pode ser utilizada no monitoramento da interação entre peptídeos contendo Abz e membranas modelo (Turchiello *et al.*, 1998).

Apesar de haver um acúmulo de informações sobre propriedades fluorescentes do Abz, tanto da molécula isolada, como ligada a aminoácidos e peptídeos (Ito *et al.*, 1998), nota-se a falta de um estudo mais detalhado acerca das características fundamentais de absorção ótica e fluorescência do fluoróforo. Permanecem sem respostas, por exemplo, questões relacionadas à origem dos deslocamentos espectrais e mudanças de rendimento quântico quando da ligação entre o fluoróforo e o aminoácidos e peptídeos, e quando da interação com agregados anfifílicos.

O principal responsável pelas transições eletrônicas no Abz é o anel benzílico, mas é de se esperar que os grupos carboxila e amino tenham papel fundamental nas propriedades eletrônicas do composto. Nesse contexto, torna-se importante desenvolver um estudo sistemático sobre o ácido aminobenzóico e alguns compostos Abz-aminoácidos. Estes compostos são mais simples que Abz-peptídeos, mas seu estudo pode auxiliar na compreensão das propriedades da sonda ligada a peptídeos.

Se, por um lado, compostos mais simples podem mimetizar as alterações na estrutura eletrônica do Abz, resultantes da ligação com aminoácidos e peptídeos, estudos envolvendo diferentes solventes também são bastante informativos acerca das propriedades óticas do Abz. Um fenômeno bastante conhecido é o da interação entre os momentos de dipolo de transição da molécula sob iluminação e o campo de reação produzido pela polarização do solvente. Como

resultado, as energias dos níveis eletrônicos são alteradas pelo solvente, produzindo mudanças nas energias das transições eletrônicas e a conseqüente dependência entre o chamado “deslocamento de Stokes” e o solvente. O “deslocamento de Stokes” é a diferença entre a energia da radiação absorvida e a energia da radiação emitida por fluorescência; Lippert (Lakowicz, 1986 *apud* Lippert, 1957, 1961, 1964; Mataga *et al*, 1956) desenvolveu um modelo relacionando esse deslocamento com propriedades de polarização do meio como a constante dielétrica e o índice de refração, resultando numa regra aplicada geralmente aos fluoróforos, segundo a qual ocorre um deslocamento para a região azul do espectro com a diminuição da polaridade do solvente.

1.2 Efeitos de Solventes

1.2.1 Efeitos de solventes em espectros de emissão fluorescente

O espectro de emissão fluorescente de muitos fluoróforos é sensível à polaridade do meio que o cerca. Tome-se como exemplo uma sonda fluorescente como o ANS (1-anilino-8-naphtalene-sulfonic-acid). Ao examinarmos o seu espectro de emissão fluorescente em solventes de diferentes polaridades, observaremos deslocamentos dos picos de emissão para comprimentos de onda menores (blue shift), conforme a diminuição da polaridade do solvente. Inversamente, observaremos deslocamentos do pico de emissão para comprimentos de ondas maiores (red shift), no caso de aumento nas polaridades dos solventes. Estes últimos deslocamentos (red shift), na maioria das vezes são acompanhados por decréscimos no rendimento quântico do fluoróforo.

Tais deslocamentos podem resultar tanto de interações do momento de dipolo do fluoróforo com os campos reativos induzidos pelo meio solvente, como também de interações químicas específicas entre o fluoróforo e uma ou mais moléculas do solvente.

1.2.2 Efeitos gerais e específicos dos solventes

O espectro de emissão de muitos fluoróforos, especialmente os que possuem componentes polares nos seus anéis aromáticos são conhecidos como sendo sensíveis às propriedades físicas e químicas dos solventes, e numerosos trabalhos têm sido publicados com o objetivo de explicar tais efeitos. No entanto, tais teorias são específicas para cada caso em particular, o que dificulta a adoção de um modelo abrangente. Assim, optamos aqui por uma aproximação mais simples onde os efeitos dos solventes nos espectros de fluorescência são arbitrariamente divididos entre os efeitos gerais e os específicos dos solventes. Por efeitos gerais entendemos aqueles dependentes do índice de refração (n) e da constante dielétrica (ϵ). Estes parâmetros físicos refletem a liberdade de movimento dos elétrons nas moléculas do solvente e o momento de dipolo destas moléculas. Já os efeitos específicos se referem às interações químicas específicas entre as moléculas do solvente e o fluoróforo, tais como as pontes de hidrogênio e as complexações. A separação dos efeitos nestas duas categorias é conveniente devido à diferente origem dos deslocamentos espectrais. Os efeitos gerais estarão sempre presentes, enquanto os efeitos específicos dependerão precisamente das estruturas químicas do solvente e do fluoróforo. Entretanto, é necessário ressaltar que a magnitude dos deslocamentos resultantes dos efeitos específicos freqüentemente excede àqueles devidos aos efeitos gerais, além do

que, efeitos específicos são comuns entre os fluoróforos comumente utilizados em pesquisas bioquímicas.

1.2.3 Efeitos gerais de solventes: a equação de Lippert

As interações entre as moléculas do solvente e o fluoróforo afetam a diferença de energia entre o estado fundamental e o excitado. Em uma primeira aproximação esta diferença de energia (em cm^{-1}) depende do índice de refração (n) e da constante dielétrica do solvente (ϵ), o que é descrito pela equação de Lippert, cuja dedução será mostrada adiante:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f \cong \frac{2}{hc} \left(\frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \right) \frac{(\mu^* - \mu)}{a^3} + \text{const} \quad (1.1)$$

Nesta equação, h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz, e a é o raio da "cavidade" onde se encontra o fluoróforo no solvente. ν_a e ν_f são respectivamente os números de onda da absorção e da emissão fluorescente. Embora esta equação seja apenas uma aproximação, existe uma razoável correlação entre a perda de energia calculada e a observada para solventes não-próticos. Por solventes não-próticos devemos entender aqueles que não possuem grupos hidroxilas, ou outros grupos capazes de "doar" ligações de hidrogênio. Termos de ordem maior são desprezados nesta equação. É instrutivo examinar os efeitos opostos de ϵ e n sobre o deslocamento de Stokes. Um incremento em n diminui esta perda, enquanto um incremento em ϵ resulta em um acréscimo em $\nu_a - \nu_f$. Esta diferença é explicada pelo princípio de Franck-Condon, e será discutida na dedução da Equação de Lippert (Lakowicz, 1983). Um incremento no índice de refração permite tanto o estado fundamental quanto o excitado a se

estabilizarem instantaneamente pelo movimento dos elétrons nas moléculas do solvente. Esta redistribuição eletrônica resulta em um decréscimo na diferença de energia entre os estados fundamental e excitado. Da mesma forma, após um incremento na constante dielétrica, ocorre também a estabilização dos estados fundamental e excitado. No entanto, o decréscimo de energia do estado excitado ocorre somente após a reorientação dos dipolos do solvente. Tal processo requer a movimentação de toda a molécula do solvente, não apenas dos elétrons. Logo, a estabilização dos estados fundamental e excitado do fluoróforo que dependem da constante dielétrica ϵ é temporalmente dependente, e a taxa da estabilização depende da temperatura e da viscosidade do solvente. Portanto, os estados excitados se deslocam para energias mais baixas em uma escala de tempo comparável ao tempo de reorientação do solvente. Na dedução da equação de Lippert que será feita mais adiante, assumiremos a relaxação do solvente como sendo um efeito anterior à emissão fluorescente. Na expressão 1.1, o termo entre parênteses é chamado de orientação de polarizabilidade (Δf). O primeiro termo $(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$ leva em conta os deslocamentos espectrais devidos tanto à reorientação dos dipolos do solvente como da redistribuição dos elétrons nas moléculas do solvente. O segundo termo $(n^2-1)/(2n^2+1)$ considera somente a redistribuição eletrônica. A diferença entre estes dois termos é responsável pelos deslocamentos espectrais oriundos da reorientação das moléculas do solvente. Conforme esta simples teoria, somente a orientação do solvente é substancialmente responsável pelo deslocamento de Stokes. A redistribuição eletrônica ocorre instantaneamente e ambos os estados, excitado e fundamental, são aproximadamente estabilizados por este processo. Conseqüentemente, a redistribuição eletrônica possui um efeito comparavelmente menor sobre o deslocamento de Stokes.

As interações físicas e químicas entre fluoróforo e as moléculas do solvente, responsáveis pelos efeitos gerais de solventes, são observadas na dedução da equação de Lippert:

$$hc\Delta\bar{\nu} = \frac{2\Delta f}{a^3} (\mu^* - \mu)^2 \quad (1.2)$$

onde $\Delta\bar{\nu}$ é diferença (em cm^{-1}) entre os números de onda da absorção e da emissão, Δf é a polarizabilidade de orientação, e μ^* e μ são os momentos de dipolos excitado e fundamental, respectivamente. De acordo com o princípio de Franck-Condon, o núcleo não se move durante o decorrer de uma transição eletrônica, e por outro lado os elétrons das moléculas do solvente se redistribuem durante este tempo. Além do mais, devido ao relativo tempo longo do estado excitado ($\sim 10^{-8}$ s), as moléculas do solvente podem se reorientar para a sua posição de equilíbrio em torno do estado excitado do fluoróforo anterior à emissão.

FIGURA 1.1: dipolo em um meio dielétrico.

A dedução parte da consideração de um dipolo puntual em um meio dielétrico contínuo (fig.1.1). A energia deste dipolo é dada por

$$E_{\text{dipolo}} = - \mu \cdot \mathbf{R} \quad (1.3)$$

onde $\mathbf{R}$ é o campo reativo induzido no dielétrico pelo dipolo. O campo reativo é paralelo e oposto à direção do dipolo, e é proporcional à magnitude do momento de dipolo:

$$R = \frac{2\mu}{a^3} f \quad (1.4)$$

Nesta equação f é polarizabilidade do solvente e a é o raio da "cavidade". A polarizabilidade do solvente é um resultado tanto da mobilidade dos elétrons no solvente como dos momentos de dipolos das moléculas do solvente. Cada um destes componentes possuem diferentes dependências temporais. A reorientação dos elétrons em solventes é essencialmente instantânea. Esta polarizabilidade de alta frequência $f(n)$ é uma função do índice de refração,

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (1.5).$$

A constante dielétrica determina a polarizabilidade do solvente, que inclui o efeito da reorientação molecular das moléculas do solvente. Devido ao tempo longo da orientação molecular, este componente é chamado de polarizabilidade de baixa frequência do solvente, sendo dado por

$$f(\varepsilon) = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} \quad (1.6)$$

A diferença destes dois termos é

$$\Delta f = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (1.7)$$

Tal diferença é denominada polarizabilidade de orientação. Se o solvente não possui momento de dipolo permanente, $\varepsilon \sim n^2$ e $\Delta f \sim 0$.

As interações de um fluoróforo com um solvente podem ser descritas em termos dos seus momentos de dipolo nos estados excitado e fundamental, e os campos reativos em torno destes dipolos. Tais campos podem ser divididos entre aqueles devidos aos fatores eletrônicos (R_e e R_e^*) e aqueles outros devidos à reorientação do solvente (R_r e R_r^*). Estes campos são

$$R_e = \frac{2\mu}{a^3} f(n), \quad R_e^* = \frac{2\mu^*}{a^3} f(n)$$

$$R_r = \frac{2\mu}{a^3} \Delta f, \quad R_r^* = \frac{2\mu^*}{a^3} \Delta f \quad (1.8)$$

Figura 1.2: Efeitos de campos de reação orientacional e eletrônica na energia de um dipolo em um meio dielétrico.

A figura 1.2 descreve tais campos durante o processo de excitação e emissão. Para a absorção de luz as energias dos estados fundamental e excitado são:

$$E^*(abs) = E_v^* - \mu^*R_r - \mu^*R_e^* \quad (1.9)$$

$$E(abs) = E_v - \mu R - \mu R_e \quad (1.10)$$

onde E_v representa os níveis de energia do fluoróforo no estado de vapor, não perturbado pelos solventes. A energia da luz absorvida é diminuída pelo campo de reação eletrônica induzido pelo estado de dipolo excitado (R_e^*). Isto ocorre porque os elétrons no solvente podem seguir a rápida mudança na distribuição eletrônica no fluoróforo. Por outro lado, a orientação das moléculas do solvente não se modifica durante a absorção de luz. Portanto, o efeito da polarizabilidade de orientação é dada por μR , e μ^*R_r , e contém somente os campos de reação de orientação do estado fundamental. Esta separação de efeitos é devida ao princípio de Franck-Condon. Lembrando que a energia é relacionada ao número de onda por $\bar{\nu} = \Delta E/hc$, a subtração de 1 em 9 leva à energia de absorção

$$hc\bar{\nu}_a = hc(\bar{\nu}_a)_v - (\mu^* - \mu)R_r - \mu^*R_e^* + \mu R_e \quad (1.11)$$

onde $hc(\bar{\nu}_a)_v$ é a diferença de energia para a amostra na fase de vapor onde os efeitos do solvente não estão presentes. Por uma consideração similar, pode-se obter a energia dos dois níveis eletrônicos para a emissão. Estes são

$$E^*(emis) = E_v^* - \mu R_r^* - \mu R_e^* \quad (1.12)$$

$$E(emis) = E_v - \mu R_r - \mu R_e \quad (1.13)$$

Para deduzir tais expressões nós assumimos que o solvente relaxa rapidamente em comparação ao tempo de vida do estado excitado, de forma que o campo de orientação inicial (R_r) se modifica para R_r^* antes da emissão. Mais uma vez usa-se o princípio de Franck-Condon. A frequência de emissão é obtida de

$$hc\bar{\nu}_f = hc(\bar{\nu}_f)_v - (\mu^* - \mu)R_r^* - \mu^*R_e^* + \mu R_e \quad (1.14)$$

Na ausência de efeitos ambientes pode-se esperar que $\nu_a = \nu_f$ para átomos na fase de vapor, e $\nu_a - \nu_f$ como sendo uma constante para moléculas complexas que sofrem relaxação vibracional. Portanto, subtraindo a equação 1.12 de 1.13 obtemos:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{1}{hc}(\mu^* - \mu)(R_r - R_r^*) + const \quad (1.15)$$

Substituição da equação (1.8) leva a equação de Lippert

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{-2}{hca^3}(\mu^* - \mu)(\mu\Delta f - \mu^*\Delta f) \quad (1.16)$$

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2\Delta f}{hca^3}(\mu^* - \mu)^2 \quad (1.17)$$

1.3 Objetivos

Apresentaremos nesta dissertação um estudo sobre as propriedades fundamentais relacionadas à absorção ótica e à fluorescência do ácido aminobenzóico. Investigamos as propriedades óticas do Abz em sua forma nativa e em compostos com a carboxila formando ligação amida. Esses compostos foram estudados em solventes de diferentes polaridades e diferentes capacidades de formação de ligações específicas por pontes de hidrogênio. Os resultados devem contribuir para o entendimento de observações relacionadas a propriedades óticas do Abz ligado em aminoácidos e peptídeos, como sua propriedade espectral de absorção e emissão, de rendimento quântico e tempos de vida. Esse entendimento é fundamental no contexto da utilização do Abz como sonda fluorescente no estudo de sistemas de interesse biológico.

Resumidamente, no capítulo 2 são apresentadas as técnicas de Absorção Ótica e Fluorescência utilizadas neste trabalho, sendo os detalhes experimentais mostrados no Capítulo 3, que trata de Materiais e Métodos. O capítulo 4 traz os resultados experimentais e uma análise dos efeitos gerais de solvente através da aplicação do modelo de Lippert. Através da escala de parâmetros empíricos de Kamlet-Taft é feita uma classificação dos solventes quanto à sua capacidade de formação de cada tipo de ligação de hidrogênio, permitindo identificar efeitos específicos oriundos de tais ligações. Um caso particular de efeitos específicos estudado foi aquele decorrente da variação do pH sobre a fluorescência do Abz. Foram também efetuados estudos sobre efeitos da polaridade do solvente e da variação do pH em compostos Abz-peptídeos. No Capítulo 5 apresentamos uma discussão e as conclusões do presente trabalho.

2. Técnicas

2.1 Absorção Ótica e Fluorescência

Não nos ocuparemos aqui com os detalhes acerca da dedução dos níveis de energia permitidos, mas faremos uma breve exposição dos modelos mais simples. Na física clássica, uma partícula pode possuir qualquer energia, mas na mecânica quântica, ao restringirmos uma partícula em uma “caixa”, verificamos que a energia passa a se restringir a certos níveis permitidos. Um modelo mais complexo (mas ainda simples, do ponto de vista químico) é o da molécula diatômica. Aqui cabe fazer uma distinção entre os diferentes níveis de energia que o sistema pode atingir. Para um dado estado, a energia potencial dependerá da distância entre os núcleos, tal qual mostrada pelas curvas representadas na figura 2.1. Em cada estado eletrônico, a molécula possui um conjunto de níveis de energia vibracional permitidos. Entre estes últimos, encontramos ainda os níveis de energia rotacionais.

Figura 2.1: Níveis de energia de uma molécula diatômica simples.

Este sistema simples nos permite demonstrar então aspectos mais importantes da espectroscopia de absorção óptica. As transições podem ocorrer entre os níveis eletrônicos, vibracionais e rotacionais da molécula. As transições que envolvem somente os níveis rotacionais se relacionam com a faixa das microondas, e as vibracionais envolvem o espectro infravermelho. Já transições eletrônicas abrangem o espectro UV visível e constituem o objeto de estudo das técnicas espectroscópicas de fluorescência e absorção óptica.

A absorção e a emissão de luz são ilustradas no diagrama de Jablonski (figura 2.2). Os estados eletrônicos são descritos pelas letras S0, S1, S2, e entre cada um destes, observamos a existência dos subníveis correspondentes à energia vibracional. Notemos que as transições entre os vários subníveis são verticais. O processo de absorção requer tempos da ordem de 10^{-15} segundos, tempos estes extremamente curtos, quando comparados àqueles necessários para os deslocamentos dos núcleos. Após a absorção do fóton, vários processos ocorrem, pois o fluoróforo pode se encontrar em níveis vibracionais mais altos em um mesmo nível eletrônico S1 ou S2. Tal molécula relaxa para seu nível vibracional mais baixo, ainda dentro do mesmo nível eletrônico, em um tempo da ordem de 10^{-12} segundos. Como o tempo de vida médio de um estado eletrônico excitado é da ordem de 10^{-8} segundos, tal processo de relaxação interna se completa antes da emissão fluorescente. São possíveis ainda, transições de um nível eletrônico para outro mais baixo, onde a perda da energia pode ocorrer pelo processo não radiativo de colisões com o solvente. Neste caso o processo é chamado conversão interna.

figura 2.2: diagrama de Jablonski.

Os fenômenos até aqui descritos se limitaram a aquelas transições entre estados singleto - singleto, mas podem ocorrer também entre singletos e tripletos, sendo o processo denominado cruzamento intersistemas. Como suas taxas de transição são muito baixas quando comparadas às anteriores, tais transições são ditas proibidas e a emissão daí decorrente é denominada fosforescência. Os tempos de vida podem ser da ordem de 10^{-6} segundos a até segundos. Embora a figura 2.1 não indique, vários outros processos podem influenciar a emissão fluorescente, como efeitos de solventes, relaxação de solventes, supressão e uma variedade de reações de estado excitado (Lakowicz, 1983). No presente trabalho, em particular, esmiuçaremos alguns detalhes acerca dos processos que envolvem a ação dos solventes.

2.2 Espectroscopia de Fluorescência com resolução temporal

O tempo de vida de fluorescência de uma substância usualmente representa o tempo médio em que a molécula permanece no estado

excitado, antes de retornar ao estado fundamental. Tal informação nos revela a frequência de encontros colisionais com agentes supressores, a taxa de transferência de energia, e a taxa de reações dos estados excitados, além das taxas de transições entre os estados. A natureza precisa dos decaimentos fluorescentes pode ainda revelar detalhes acerca das interações do fluoróforo com seu meio.

Existem dois métodos largamente utilizados nas medidas dos tempos de vida de fluorescência. Estes são o método pulsado e o método harmônico ou fase-modulado.

No método pulsado, a amostra é excitada com um breve pulso de luz e o decaimento da intensidade da fluorescência é medido. No método harmônico, a amostra é excitada com uma luz senoidalmente modulada, e utiliza-se o deslocamento de fase e a demodulação da emissão relativas à luz incidente, no cálculo do tempo de vida. No presente trabalho utilizamos o método pulsado, de forma que maiores detalhes são apresentados mais adiante.

2.2.1 Medidas de tempos de vida no método pulsado

Consideremos a excitação de um fluoróforo com um pulso de luz infinitamente curto (no tempo), resultando em uma população inicial (N_0) de fluoróforos nos estado excitado.

A taxa de decaimento da população inicialmente excitada é:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(\gamma + k)N(t) \quad (2.1)$$

onde

$N(t)$ = nº de moléculas excitadas em um tempo de τ após a excitação

γ = taxa de emissão

k = taxa de decaimento não-radiativo

Sendo $N(t) = N_0$ quando $t = 0$, integramos (1):

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau} \quad (2.2)$$

Onde $\tau = (\gamma + k)^{-1}$ é o tempo de vida do estado excitado.

Esperamos que a intensidade de Fluorescência $F(t)$ seja proporcional à população do estado excitado

$$F(t) = \gamma N(t) \quad (2.3)$$

O tempo de vida da fluorescência geralmente é igualado ao tempo necessário para que a intensidade decaia para $1/e$ de seu valor inicial, que é $(\gamma+k)^{-1}$. Alternativamente, o tempo de vida pode ser determinado da curva $\log F(t)$ versus t .

O tempo de vida pode também ser considerado como o tempo médio que um fluoróforo despende no estado excitado. Tal média é dada por

$$\langle t \rangle = \frac{\sum_i t_i N_i(t)}{\sum_i N_i(t)} \quad (2.4)$$

Para um grande número de fluoróforos e pequenos intervalos de tempo, esta soma se torna:

$$\langle t \rangle = \frac{\int_0^\infty t N(t) dt}{\int_0^\infty N(t) dt} = \frac{\int_0^\infty t e^{-t/\tau} dt}{\int_0^\infty e^{-t/\tau} dt} \quad (2.5)$$

O denominador é igual τ , e realizando a integração por partes, encontramos o numerador como sendo τ^2 . Portanto, para um decaimento exponencial, o tempo médio que um fluoróforo permanece no estado excitado é igual ao tempo de vida

$$\langle t \rangle = \tau \quad (2.6)$$

É importante notar que (2.6) não é verdadeiro para decaimentos mais complexos, tais como decaimentos multi-exponenciais ou não-exponenciais. Frequentemente, os decaimentos não são adequadamente descritos por uma forma monoexponencial. Nestes casos, os decaimentos observados geralmente são ajustados a uma soma de exponenciais.

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (2.7)$$

Onde α_i é um fator pré-exponencial representado a contribuição fracional para o decaimento temporalmente resolvido da componente com o tempo de vida τ_i . É importante perceber que dependendo da situação, as quantidades α_i e τ_i podem não ter significado físico. Um exemplo são os decaimentos não-exponenciais, comumente observados em fluoróforos suprimidos por transferência de energia em que sofrem relaxação de solvente. Assim, nem sempre podemos considerar α_i e τ_i como componentes isoladas da amostra, a menos que hajam indicações que corroborem com tal interpretação. Uma circunstância onde isso ocorre é aquela que envolve uma mistura de fluoróforos não interagentes. A mistura pode ser o resultado de vários fluoróforos diferentes ou um fluoróforo em diversos solventes. Cada valor τ_i representaria então uma espécie individual, e a intensidade fracional f_i de cada espécie é dada por

$$f_i = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i \tau_i} \quad (2.8)$$

2.2.2 Análise do decaimento resolvido no tempo da Intensidade de Fluorescência

O objetivo das medidas dos decaimentos resolvidos no tempo é determinar a função $F(t)$. Tal objetivo seria plenamente atingido, caso a excitação se desse através de um pulso infinitamente estreito, ou que cuja largura fosse muito menor do que o tempo de decaimento da amostra. Infelizmente, as larguras dos pulsos freqüentemente são comparáveis às dos tempos de decaimento. Devido a largura do pulso de excitação, o tempo zero não é definido, de forma que não podemos simplesmente encontrar o ponto $1/e$ para determinar os tempos de vida.

Geralmente mede-se a distribuição temporal $L(t)$ do pulso em uma experiência separada. Desde que o perfil da lâmpada varia com o tempo, tal medida dever ser feita dentro de um curto espaço de tempo antes ou após a medida do decaimento fluorescente. Utiliza-se para tanto, uma solução que espalha a luz. Podemos considerar o pulso da lâmpada como um grande número de pulsos estreitos a cada tempo t_i , com iguais larguras Δt , onde Δt é muito menor do que o tempo de decaimento observado. Cada pulso individual gera um outro pulso como resposta

$$R_i(t) = L(t_i) \Delta t F(t-t_i) \quad (t > t_i) \quad (2.9)$$

O tempo $(t-t_i)$ serve para nos lembrar que o tempo do decaimento é contado a partir do instante da excitação, que é t_i . Para $t < t_i$, subentende-se que $R_i(t)=0$. Faz se aqui uma mudança de variáveis $\mu=t-t_i$. O total do decaimento é somado sobre todos os pulsos:

$$R(t) = \sum_{i=0}^{I=I_f} L(t - \mu) F(\mu) \Delta \mu \quad (2.10)$$

Conforme Δt se aproxima de zero, tal soma se torna uma integral de convolução:

$$R(t) = \int_0^t L(t-\mu)F(\mu)d\mu \quad (2.11)$$

O trabalho agora passa a ser determinar $F(t)$ através da deconvolução de tal integral, conhecidos o decaimento experimental $R(t)$ e o perfil de excitação ou resposta instrumental $L(t-u)$. Para esse fim, o ajuste dos dados experimentais à função $F(t)$ será feita pelo método de mínimos quadrados.

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparo das Amostras

O Abz e seus derivados Abz aaminados e ligados a peptídeos foram sintetizados no laboratório de biofísica da Escola Paulista de Medicina – UNIFESP sob os cuidados do Prof. Luis Juliano. O procedimento experimental envolveu medidas de espectros de absorvância, fluorescência estática e temporal do Abz tanto isolado quanto dos derivados, em situações onde se procurou variar as condições do meio. As medidas foram realizadas em soluções aquosas a diferentes pH's, em solventes diversos e em misturas de alguns destes. Quando em solução aquosa, trabalhou-se com o pH próximo de 7,4, mantido através de soluções tampão de fosfato (10^{-2} M) ou hepes (10^{-2} M).

Nas medidas onde se desejou observar o comportamento do Abz ante variações do pH, acrescentou-se à amostra pequenos volumes de HCl concentrado para diminuir o pH, ou NaOH para aumentá-lo. Devido à alta concentração, os volumes de HCl ou NaOH acrescentados eram da ordem de unidades de μl , o que dentro do volume total da amostra ($\sim 2\text{ml}$), permitia desprezar um cálculo de correção da diluição do Abz na amostra. O pH foi monitorado através de um pHmeter Mettler Toledo 340.

Nas experiências feitas com o Abz diluído em solventes diferentes, foram preparadas soluções estoque de 10^{-3} M, que nas medições eram diluídas em concentrações que variavam de 10^{-5} M a 10^{-4} M. Já as misturas de solventes envolveram soluções binárias de água – dioxano e água – etanol. Nestas misturas trabalhou-se com a concentração de Abz fixada em $\sim 5 \times 10^{-5}$ M e partindo de uma solução totalmente aquosa, acrescentou-se volumes do outro solvente (etanol ou

dioxano). Para compensar a diluição e manter a concentração do fluoróforo constante, acrescentava-se também partes do estoque concentrado de Abz ao volume da amostra. Soluções puras possuem seus índices de refração e constantes dielétricas listados em Handbook, mas no caso de misturas de solventes, tais valores foram obtidos por outros meios. Os índices de refração puderam ser medidos em um refratômetro Carl Zeiss Jenna e as constantes dielétricas foram obtidas de curvas de calibração construídas a partir de dados obtidos da literatura. (Ramachandran, 1986)

Os solventes utilizados foram do tipo espectroscópico, à exceção da acetona, que era do tipo P.A. (para análise).

3.2 Absorção Ótica

As medidas de absorção óptica foram obtidas em um espectrofotômetro HP 8452A. Uma lâmpada de deutério é reponsável pela emissão de um feixe de luz, que após atravessar a amostra, incide sobre uma rede de difração, sendo posteriormente detetado por uma rede de diodos. A lâmpada de deutério possui um espectro de emissão que permite cobrir a região entre 190 nm e 820 nm. Após atravessar a amostra, a luz é decomposta nos seus vários comprimentos de onda e em cada um destes a intensidade da luz é medida pela rede de diodos. Ao dar início a uma medida, mede-se antes o espectro de absorção do solvente, e depois procede-se à medição do espectro do absorvedor diluído no mesmo solvente. O espectro do solvente, também chamado espectro "branco" passa a ser descontado dos espectros medidos das amostras absorvedoras. Embora não possua uma alta resolução instrumental (2 nm), o equipamento permite aquisições de dados rápidas e apresenta boa estabilidade.

figura 3.1: arranjo experimental do espectrofotômetro HP8452A.

As medidas foram sempre realizadas em cubetas de quartzo com caminho ótico de 1,0 cm, e concentrações de Abz e derivados variando de 10^{-5} M a 10^{-4} M. A Absorbância em tais concentrações variou de ~0,01 até valores próximos de 0,5. Nestas últimas circunstâncias tornava-se necessária aplicação de uma correção devido ao efeito de filtro interno.

3.3 Fluorescência Estática

Os espectros de fluorescência estática foram obtidos no espectrofluorímetro Fluorolog 3 – Jobin Yvon-Spex. Uma lâmpada de xenônio é responsável pelo feixe de luz que excita a amostra. A luz inicialmente emitida possui um espectro com uma larga banda que se estende de ~ 240 nm até ~ 700 nm, e com máximo em ~ 467 nm. Esta mesma luz tem o seu comprimento de onda selecionado por um monocromador de excitação e a sua intensidade é controlada através da regulação da abertura de uma fenda. Uma vez selecionado o comprimento de onda do feixe de luz, o mesmo incide agora sobre a amostra fluorescente em estudo, excitando-a. Após a desexcitação, é

observada a emissão de luz , que por sua vez terá também o seu comprimento de onda selecionado por um monocromador e a sua intensidade ajustada por uma fenda. Após passar por essas etapas, a luz emitida atinge uma fotomultiplicadora, cujos sinais são tratados por um conversor analógico-digital e enviados a um microcomputador, onde serão processados pelo software responsável pela operação do equipamento.

figura 3.2: Arranjo experimental do espectrofluorímetro estático.

As séries de medidas dos espectros de fluorescência estática eram sempre realizadas em conjunto com as da absorção ótica. Da observação dos máximos nos espectros de absorção é que se determinavam os comprimentos de onda para a excitação da amostra.

3.4 Fluorescência com resolução temporal

A técnica utilizada para a obtenção do decaimento da intensidade de fluorescência baseia-se no método de contagem de fóton único. Neste método a amostra é excitada por um pulso de luz e os fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos

pela amostra, obtendo-se o perfil de decaimento. A figura-3 apresenta um esquema genérico de um espectrofluorímetro com resolução temporal. O esquema está dividido em duas partes: *sistema de detecção e aquisição de dados e sistema de excitação*.

Sistema de detecção e aquisição de dados (figura-5): Uma fotomultiplicadora de partida (R3809U, Hamamatsu) detecta o pulso de excitação e envia o sinal para um conversor tempo-amplitude (TAC) que inicia a subida de uma rampa de tensão. Um pulso de luz emitido pela amostra fluorescente é detectado por uma fotomultiplicadora de parada (R3809U, Hamamatsu) que envia um sinal para o TAC interrompendo a rampa de tensão. O valor da tensão é proporcional ao tempo transcorrido entre a excitação e a emissão e um analisador multicanal (MCA) computa a ocorrência desse evento e o seu tempo correspondente. O processo repete-se a cada pulso de excitação e ao final de um número estatisticamente significativo de eventos (10^5 contagens) obtém-se um histograma descrevendo o decaimento temporal da fluorescência. (elementos ópticos e eletrônicos do espectrômetro OB900, Edimburg Instruments).

Sistema de excitação (figura 3.3): A fonte de excitação usada é um sistema que tem como ponto de partida um laser de Argônio (2060-10 SA, Spectra Physics) cujas transições 4p e 4s produzem diversas linhas entre 4545 a 5287 ângstroms. A luz de saída deste laser, com potência integrada na faixa entre 6.0 e 10.0 W, bombeia um laser de Titânio-safira (3950, Spectra Physics) que gera pulsos de laser na faixa compreendida entre 840 e 1000nm e com frequência máxima de repetição dos pulsos de 4MHz. Estes pulsos passam por um selecionador de pulsos (3980-25, Spectra Physics) que permite a operação em frequências, na faixa de 80 à 400kHz, mais adequadas ao método de contagem de fótons. Finalmente o laser passa por um gerador de terceiros harmônicos (GWN-23PL, Spectra Physics), de modo que o feixe emergente tem comprimentos de onda sintonizados

na região entre 280 e 333nm, com largura total na meia altura de 48 ps. Na excitação do Abz ajustou-se o comprimento de onda em uma região próxima a 305 nm, buscando-se sempre otimizar a taxa de contagens.

Figura 3.3: Diagrama do fluorímetro com resolução temporal

Figura 3.4: Sistema de excitação

Figura 3.5: Sistema de detecção e aquisição de dados

Nas medidas envolvendo tempos de vida, foram obtidas as curvas de decaimento total $R(t)$ e a do perfil da lâmpada $L(t)$. Como o interesse é observar a curva de decaimento “líquido” $F(t)$, sem o efeito causado pelo pulso de excitação, se torna necessário fazer a deconvolução da integral:

$$R(t) = \int_0^t L(t')F(t-t')dt' \quad (4.2)$$

Segue adiante uma típica medida realizada para uma amostra de Abz em água, com pH 7.4

figura: 3.6: Curva ajustada em escala logarítmica para o decaimento temporal do Abz. Superposto à curva do decaimento vemos também o pulso de excitação.

Figura 3.7: Função de autocorrelação residual da curva ajustada para o Abz.

A deconvolução da integral $R(t)$ para a obtenção de $F(t)$ é feita pelo próprio software de aquisição de dados e permite obter não só a curva $F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i}$ com seus respectivos parâmetros ajustados α_i e τ_i , como também visualizar a função de autocorrelação residual (fig. 12). Esta última função nos possibilita avaliar a qualidade do ajuste feito, pois apresenta os desvios observados entre os dados experimentais e a curva ajustada. Um valor de χ^2_{red} próximo a 1.0 e uma distribuição aleatória nos valores de resíduos como na figura 3.7 servirão como critérios para o julgamento da qualidade do ajuste.

4. Resultados e Análise de dados

4.1 Abz em diversos solventes

Nas figuras a seguir podemos observar algumas curvas normalizadas de absorbância (Figura 4.1) e de emissão fluorescente do Abz (Figura 4.2) nos diversos solventes, onde desde já, verificamos deslocamentos nos picos. Embora nem sempre seja o parâmetro mais adequado na determinação do grau de polaridade do solvente, usamos a constante dielétrica ϵ na avaliação dos deslocamentos espectrais dos vários solventes. Ainda que de forma grosseira, fazemos a associação direta de ϵ com a polaridade, considerando assim a água um solvente altamente polar e o ciclohexano fracamente polar.

Figura 4.1: Espectros normalizados de absorbância. Os solventes estão listados em ordem crescente de ϵ .

Se levarmos em conta o fato de que o aumento na polaridade do solvente tende a gerar deslocamentos para o vermelho em espectros de absorbância, observamos que com exceção dos alcoóis e da água, todos os demais solventes tendem a apresentar tal comportamento, com aumentos nos comprimentos de onda dos picos de absorção conforme o aumento da respectiva constante dielétrica ϵ . O mesmo fato se verifica em relação à emissão fluorescente.

Figura 4.2: Espectros de emissão fluorescente normalizados.

4.2 Efeitos Gerais

4.2.1 Aplicação do Modelo de Lippert

Os resultados das medidas de fluorescência e absorbância do Ácido orto-aminobenzóico em diferentes solventes nos diversos valores de constante dielétrica e índice de refração foram analisados tomando como ponto de partida o Modelo de Lippert. Espera-se que a sensibilidade deste fluoróforo ante a polaridade do solvente seja proporcional ao termo $(\mu^* - \mu)^2$, o qual deve permanecer constante. A partir dos valores de ϵ e n , calculamos a polarizabilidade de orientação molecular Δf , dada por (1.7) e usando os valores experimentais dos números de onda dos máximos de absorção ótica $\bar{\nu}_{abs}$ e emissão fluorescente $\bar{\nu}_{flu}$, determinamos a diferença $\bar{\nu}_{abs} - \bar{\nu}_{flu}$ entre os números de onda de absorção e emissão. Algumas das medidas presentes na tabela 4.1 foram obtidas na literatura (Mataga, 1963).

solventes	ϵ (const.diel.)	n (índ. de refr.)	Δf	$\nu_{abs}-\nu_{flu}$ (10^3 cm^{-1})
Ciclohexano	2.02	1.426	-0.002	3.7
Benzeno	2.284	1.5011	0.003	4.1
Dioxano	2.21	1.422	0.021	4.3
Monoclorobenzeno*	5.69	1.5241	0.143	4.5
n-butil-acetato*	5.07	1.394	0.171	4.5
Etil acetato *	6.08	1.372	0.202	4.7
Dmso	47	1.479	0.263	4.7
Acetona	20.7	1.3588	0.284	4.3
Etanol	24.55	1.3614	0.289	5.6
Acetonitrila	37.5	1.34423	0.305	4.6
Metanol	32.66	1.3284	0.309	5.8
Trifluoroetanol	27.68	1.2907	0.319	7.6
Água	78.3	1.333	0.320	6.9

Tabela 4.1 : Destes solventes utilizados na diluição do Abz, a água, o metanol, o etanol e o acetonitrilo são próticos. As medidas assinaladas com (*) foram obtidas da literatura.

figura 4.3 : Modelo de Lippert aplicado a vários solventes. Verifica-se o comportamento não linear dos solventes próticos.

Na figura 4.3, verificamos a linearidade no comportamento de $\Delta \bar{\nu}$ em relação à variação de Δf para o Abz diluído na maioria dos solventes, conforme o esperado pelo modelo de Lippert. No entanto, se observa que os dados em solventes como água, etanol e metanol apresentam desvios em relação ao previsto no modelo de Lippert. Como tais solventes são caracterizados por formarem pontes de hidrogênio atuando como doadores de prótons, torna-se clara então a observação de que este tipo de ligação deve ser responsável pelo desvio da relação linear. Embora não possuam grupos doadores de prótons, alguns dos solventes apróticos ainda assim são também capazes de formar pontes de hidrogênio, porém atuando como aceitadores de prótons, como é o caso do DMSO e o dioxano. Tal caracterização pode ser feita com base nos valores de α e β da tabela de parâmetros empíricos de Kamlet-Taft, como discutiremos adiante. Dessa observação conclui-se que tal tipo de ligação, onde o Abz atua

como doador de prótons, apresenta pouca relevância quanto aos efeitos específicos do solvente sobre o fluoróforo.

Utilizando somente os pontos relativos aos solventes que não são doadores de prótons e que não fogem da linearidade no gráfico da figura 4.3, procedemos ao ajuste de uma reta do tipo $Y = A \cdot X + B$. A partir do valor ajustado para o coeficiente angular A , podemos calcular a polarizabilidade de orientação ($\mu^* - \mu$) a partir da expressão de Lippert (4.1), onde estimamos o raio a da cavidade onde está inserida a molécula de Abz como sendo aproximadamente ~ 3 Angstroms.

Assim,

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2\Delta f}{hca^3} (\mu^* - \mu)^2 + \text{const.} \quad (4.1)$$

$$Y = A \cdot X + B \quad (4.2)$$

onde

$$Y = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f, \quad X = \Delta f, \quad A = \frac{2(\mu^* - \mu)^2}{hca^3} \quad \text{e} \quad B = \text{const.}$$

Os valores da polarizabilidade de orientação são dados em unidades de Debye (D), onde 4,8 D corresponde ao dipolo de uma unidade de carga separada por uma distância de 1 ângstrom.

No ajuste de reta realizado com os pontos experimentais referentes aos solventes apróticos na figura 4.3 foram obtidos os valores

$$A = (1.9 \pm 0.6) 10^3 \text{ cm}^{-1}/\text{D}^2 \quad \text{e} \quad B = (4.09 \pm 0.12) 10^3 \text{ cm}^{-1}.$$

Destes dados, calculamos

$$\mu^* - \mu = (2,3 \pm 0,4) \text{ D},$$

o que nos mostra que o estado excitado do Abz possui um momento de dipolo maior do que o do estado fundamental. Isso é coerente com a tendência dos fluoróforos em apresentarem deslocamentos espectrais para o vermelho, ante o aumento da polaridade do solvente (Reichardt, 1988).

Um tratamento igual a este, envolvendo também a aplicação do Modelo de Lippert-Mataga para o Ácido Aminobenzóico, encontra-se na literatura, tendo sido realizada por Noboru Mataga (Mataga, 1963), utilizando-se as formas isoméricas m- o- e p-. As medidas aqui feitas apresentaram pouca variação em relação às obtidas anteriormente por Mataga, o que corrobora o resultado aqui apresentado.

Uma verificação das condições de aplicação do Modelo de Lippert foi feita utilizando-se soluções binárias de água-dioxano e água-etanol, onde pudemos abranger uma faixa de valores intermediários para a constante dielétrica ϵ e índice de refração n , partindo de um solvente pouco polar (dioxano) para um altamente polar (água). Tais medidas foram feitas variando-se a proporção etanol - água e dioxano - água. Deve-se observar no entanto, que tais misturas compreendem solventes capazes de formar ligação de hidrogênio, o que nos faz prever desde já um possível comportamento não linear, diferentemente daquele previsto pela equação de Lippert. A mistura contendo etanol e água foi escolhida por serem dois solventes próticos, e a mistura dioxano e água por envolver um solvente prótico e outro aprótico.

Os valores do índice de refração nas diversas porcentagens das misturas foram medidas em um refratômetro Carl Zeiss Jenna. Quanto à constante dielétrica, seus valores foram obtidos extrapolando-se alguns números fornecidos pela literatura. (Ramachandran, 1986; Otsuki, 1996, 1997)

A figura 4.4 mostra que no gráfico $v_{abs} - v_{flu}$ versus Δf observou-se uma não linearidade no comportamento do Abz diluído na mistura dioxano - água.

Figura 4.4: Modelo de Lippert aplicado ao Abz diluído na mistura dioxano-água, onde a variação Δf é obtida nas diversas proporções.

Quando se aumenta a proporção de água na mistura água-dioxano, observa-se uma maior inclinação da reta tangente. A princípio, seria esperada a obtenção de uma reta, cujo coeficiente angular nos permitiria conhecer $(\mu^* - \mu)$. No entanto, ao acrescentarmos água à mistura, estamos incrementando a capacidade de formação de pontes de hidrogênio do tipo doador (Otsuki *et al*, 1996 (a)). Assim, ao se fazer as medidas de uma amostra de Abz em 100% de dioxano, o fluoróforo se encontra em um solvente não prótico. Na presença das moléculas de um solvente prótico, o fluoróforo deve sofrer modificações que alteram $(\mu^* - \mu)$. Esta passa a levar em conta os efeitos específicos induzidos pela “proticidade” do solvente (Otsuki *et al*, 1996 (b))

Segue adiante a outra série de medidas, relativa à mistura etanol-água. Desta vez, lidamos com uma mistura onde ambos os componentes são próticos. Conseqüentemente, o caráter prótico na mistura já se faz presente em todas as diferentes proporções etanol-água, de forma que, exceto pela variação da polaridade do solvente, o

fluoróforo não deve sofrer alterações significativas na sua estrutura molecular capazes de alterar os seus momentos de dipolo μ^* e μ . Isto se reflete no comportamento linear observado no gráfico da Figura 4.5.

Figura 4.5: Modelo de Lippert aplicado ao Abz diluído em diversas proporções da mistura água – etanol.

A título de comparação, podemos colocar as séries de medidas em água-etanol e água-dioxano em um mesmo gráfico e examinar os coeficientes angulares que determinam $(\mu^* - \mu)$.

Figura 4.6: Comparativo do Modelo de Lippert para Abz em água + dioxano (preto)(vide fig. 4.4) e água + etanol (vermelho).

Feitos os devidos cálculos de ajustes para uma função linear do tipo $y = A x + B$, obtemos os dados mostrados na tabela 4.2, que resumem os resultados obtidos para cada mistura de solventes. As incertezas foram calculadas através da correlação dos mínimos quadrados no ajuste da função linear.

Solventes	A ($10^3 \text{ cm}^{-1}/D^2$)	B (10^3 cm^{-1})
Etanol+Água	$14,0 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,11$
Dioxano+água I	$3,40 \pm 0,23$	$4,15 \pm 0,05$
Dioxano+água II	55 ± 10	-10 ± 3

tabela 4.2: resultados dos ajustes de reta aos pontos experimentais das figuras 6, 7 e 8.

Para o caso particular da mistura dioxano-água, tomou-se o cuidado de separar os dados experimentais em dois grupos. No grupo dioxano+água II (Δf entre 0.28 e 0.32) deve predominar o comportamento prótico do solvente, ao passo que no grupo dioxano+água I (Δf abaixo de 0.280) procurou-se tomar apenas as medidas onde a baixa percentagem de água ainda não era suficiente

para fazer da mistura um solvente totalmente prótico. O valor de m^* - m obtido neste intervalo (3,0 D) é comparável ao obtido anteriormente (2,3 D) usando dados de solventes apróticos da Fig. 4.3.

Os valores obtidos para a polarizabilidade de orientação $\mu^* - \mu$ (tabela 4.3) mostram a diferença resultante do fato de que etanol e dioxano têm comportamento distinto no que se refere à capacidade de doar ou aceitar prótons.

Solventes	$\mu^* - \mu$ (D)
Etanol+Água	$6,13 \pm 0,09$
Dioxano+água I	$3,02 \pm 0,10$
Dioxano+água II	$12,1 \pm 1,1$

Tabela 4.3: Resultados obtidos para $(\mu^* - \mu)$.

Verifica-se no gráfico 4.4, referente à mistura água-dioxano, a existência de uma certa linearidade em duas regiões distintas, sendo que acima de $\Delta f \sim 0.28$ podemos atribuir os efeitos à formação das pontes de hidrogênio da água com o Abz. Este tipo de ponte de hidrogênio, onde o Abz atua como aceitador de prótons, é tido como sendo o responsável pelo deslocamento para o azul que ocorre na absorção e na emissão fluorescente na água em comparação com os espectros em um meio apolar como o ciclohexano.

Já os resultados obtidos para a mistura água-etanol (fig. 4.5) apresentaram um comportamento sempre linear entre $\Delta \bar{\nu}$ e Δf , não apresentando em momento algum qualquer desvio em relação ao previsto pela equação de Lippert. Ambos os solventes são próticos, sendo que o etanol oferece ainda a possibilidade de atuar como aceitador de prótons em uma ligação de hidrogênio. Apesar da observação anterior de que tal tipo de ligação como aceitador pouco tem influenciado nos efeitos solvatocrômicos, esse duplo caráter do etanol pode levar a um comportamento distinto daquele observado na mistura do dioxano com a água.

4.3 Efeitos Específicos

4.3.1 Parâmetros empíricos de polaridade do solvente

A polaridade de um solvente é um termo comumente utilizado para relacionar a capacidade de um solvente na solvatação de uma carga dissociada ou uma espécie dipolar. Embora seja fácil estudá-lo qualitativamente, torna-se difícil expressá-lo quantitativamente. As tentativas de fazê-lo quantitativamente envolvem principalmente as propriedades físicas como constante dielétrica, índice de refração e momento de dipolo. Destas propriedades físicas, a considerada mais relevante é a constante dielétrica, a qual freqüentemente é tomada como um parâmetro inicial das características polares do solvente. No entanto, esta aproximação é costumeiramente inadequada, pois as teorias que o fazem tomam o solvente como um meio contínuo e não estruturado, não sendo composto de moléculas individuais com interações soluto-solvente próprias, e não levam em conta também interações específicas como pontes de hidrogênio e interações EPA/EPD (aceitador de pares de elétrons / doador de pares de elétrons) (Kamlet *et al*, 1971, 1973; Minesinger *et al*, 1977).

Foi então apresentada na literatura uma escala empírica de polaridade de solvente, baseada em um conveniente processo referência bem conhecido e sensível a solventes. Essa escala mostrou-se adequada para uma larga classe de outros processos dependentes de solventes, refletindo todas as possíveis interações soluto/solvente presentes nos processos influenciados por solventes (Kamlet *et al*, 1977).

4.3.2 A escala π^*

A escala π^* foi introduzida por Kamlet, Taft *et al*, e possui tal nome por ser derivada dos efeitos de solventes em uma conhecida transição eletrônica $\pi - \pi^*$ de uma variedade de nitroaromáticos (4-nitroanisole, N,N-diethyl-3-nitroaniline, 4-methoxy- β -nitrostyrene, 1-ethyl-4-nitrobenzene, N-methyl-2-nitro-p-toluidine, N,N-diethyl-4-nitroaniline e 4-dimethylaminobenzophenone). Os efeitos de solventes nos valores de $\nu_{\max}$ destes sete indicadores solvatocrômicos foram empregados na construção da escala π^* , que foi então expandida e refinada por múltiplas correlações de mínimos quadrados além da adição de novos indicadores solvatocrômicos. Deste modo, uma escala π^* média de polaridade de solventes havia sido estabelecida, com a medida da capacidade do solvente de estabilizar uma carga ou um dipolo em virtude de seu efeito dielétrico. Um intervalo normalizado de 0,00 (para o ciclohexano) até 1,00 (Dimetilsulfóxido) foi estabelecido para os valores de π^* . Nessa escala, um solvente como a água está classificado como altamente capaz de estabilizar cargas ou dipolos no soluto.

Além disso, definiram-se os parâmetros α e β que caracterizam, respectivamente, a capacidade do solvente de formar pontes de hidrogênio como doador de prótons e como aceitador de prótons (Kamlet *et al*, 1976(c),(d)).

Solventes	β	α	π^*
Ciclohexano	0.00	0.00	0.00
Etanol	0.77	0.83	0.54
1,4-dioxano	0.37	0.00	0.55
Benzeno	0.10	0.00	0.59
Metanol	0.62	0.93	0.60
Acetona	0.48	0.08	0.71
2,2,2-trifluoroetanol	0.00	1.51	0.73
Acetonitrila	0.31	0.19	0.75
Dimetil sulfoxido	0.76	0.00	1.00
Água	0.18	1.17	1.09

Tabela 4.4: Alguns valores da tabela de parâmetros empíricos de Kamlet-Taft. (Reichardt, 1990)

Classificaram-se como solventes próticos aqueles capazes de formar pontes de hidrogênio como doadores de prótons, sendo caracterizados então, dentro da classificação de Kamlet-Taft, conforme o valor de α próximo da unidade. Exemplos de solventes próticos são a água e os alcoóis, cujas hidroxilas acabam atuando como doadoras de prótons. Já os solventes apróticos são todos aqueles desprovidos de tal característica, o que no entanto não significa incapacidade de formar pontes de hidrogênio do outro tipo, como aceitadores de prótons. Certos solventes próticos, como a maioria dos alcoóis, são capazes de formar pontes de hidrogênio de ambos os tipos, enquanto alguns, como o TFE são incapazes de aceitar prótons, apresentando o parâmetro $\beta=0$.

Um caso interessante é o da anilina (Suppan e Ghoneim, 1997), que apresenta um deslocamento espectral para o azul no seu espectro de absorção óptica ao formar ponte de hidrogênio com a água. O que ocorre é uma transição do tipo $l - \pi^*$, onde l é um orbital do

Nitrogênio. O elétron situado no orbital l do Nitrogênio é promovido ao orbital delocalizado π^* , e nisso se verifica uma transferência de carga entre o substituinte N e o anel aromático da anilina. A formação da ponte de hidrogênio entre o solvente e o grupo amina da anilina estabiliza o estado fundamental, de forma que se torna necessária maior quantidade de energia para que ocorra a transição para o estado excitado.

4.3.3 Efeitos específicos

Os efeitos específicos podem ter como causas as formações de pontes de hidrogênio e de complexos de transferência de cargas. No presente trabalho, nos deteremos nas situações onde podemos identificar a existência das pontes de hidrogênio e o seu tipo. Fazendo uso da escala empírica (tabela 4.4) na caracterização da polaridade do solvente, analisamos o comportamento do Abz nos diversos solventes próticos e apróticos. Os solventes próticos, sendo doadores de prótons, tendem a formar pontes de hidrogênio com o Abz do tipo $R - H \cdots O$ ou $R - H \cdots N$, onde os átomos O e N pertencem à molécula do fluoróforo (Kamlet *et al*, 1975(a)). Dos solventes apróticos, alguns também são capazes de estabelecer pontes de hidrogênio, porém do tipo $R - O \cdots H$ ou $R - N \cdots H$, onde desta vez, o átomo de Hidrogênio pertence ao fluoróforo (Kamlet *et al*, 1975(b)). Se consultarmos a tabela contendo os parâmetros empíricos α e β (Reichardt, 1990), veremos que a água possui uma forte capacidade de formação de pontes do primeiro tipo, enquanto os alcoóis em geral (no presente caso metanol e etanol) conseguem formar tanto as do primeiro tipo quanto as do segundo tipo. Os solventes apróticos aqui utilizados foram o ciclohexano, dioxano, benzeno, acetonitrila e o DMSO, com

valores de α iguais ou próximos de zero. Os próticos foram o etanol, metanol e água, que apresentam valores de α próximos da unidade.

figura 4.7: Números de onda dos máximos de absorbância do Abz versus parâmetro de polaridade empírica π^* .

figura 4.8: Números de onda dos máximos de emissão fluorescente do Abz versus parâmetro de polaridade empírica π^* .

figura 4.9: Deslocamentos de Stokes do Abz versus parâmetro empírico de polaridade π^* .

Na figura 4.7 onde observamos o comportamento dos máximos de absorvância em função do parâmetro π^* , verificamos que o Abz apresenta pouca variação na posição espectral quando em solventes apróticos, mas tende a um deslocamento para o azul quando em solventes próticos.

No primeiro caso, seria de se esperar deslocamentos para o vermelho com o aumento na polaridade do solvente. A absorção ótica dos isômeros do Abz tem sido atribuída a transições onde ocorrem transferência de carga do resíduo anilina para o orbital anti-ligante do grupo carboxila. Devido ao caráter aceitador de elétrons do grupo carboxila ocorre o decréscimo da densidade do elétron π no grupo amino no estado eletrônico excitado. No caso particular do o-Abz, no entanto, a existência de uma ponte de hidrogênio intramolecular entre o grupo carboxila e o grupo amina pode causar uma delocalização eletrônica que diminui a separação de cargas dos substituintes (Mataga, 1963). A diminuição do momento de dipolo deve resultar em baixa interação do fluoróforo com solventes mais polares, e com isso

se observaria pouca variação nas posições espectrais ante as mudanças na polaridade do solvente.

Quanto ao deslocamento para o azul nos solventes próticos, tal comportamento é semelhante ao da anilina, descrito no capítulo anterior, onde pares isolados (orbital l) formam poderosas pontes de hidrogênio com solventes próticos tais como os alcoóis e a água. Estas pontes estabilizam o estado fundamental e levam as transições $l-\pi^*$ a apresentarem um deslocamento para o azul (Suppan, 1997).

Na figura 4.8 observamos que os solventes apróticos apresentam dependência linear entre o $\bar{\nu}$ de emissão e o parâmetro empírico π^* . Todavia, os alcoóis e a água desviam-se desse comportamento, e nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9 evidenciam-se os efeitos das ligações H, mostrando que os apróticos apresentam deslocamentos de Stokes linearmente dependentes de π^* enquanto que os próticos apresentam um comportamento diferente.

O caráter de formação de pontes de hidrogênio do tipo aceitador também está presente em alguns dos solventes apróticos, e no entanto, observamos que os deslocamentos espectrais verificados nestes ainda obedecem a uma certa linearidade ante a variação da polaridade. Disso se observa que as pontes de hidrogênio onde o Abz atua como aceitador de prótons são mais relevantes nas alterações estruturais responsáveis pelos deslocamentos espectrais.

4.3.4 Efeitos de solvente no rendimento quântico, tempos de vida e taxas de decaimento.

Nos cálculos de rendimento quântico do Abz, usamos como valor padrão para comparação o valor $\phi = 0,588$ obtido da literatura (Melhuish, 1961) para o Abz dissolvido em Etanol sob a concentração de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Nos cálculos da área integrada sob a curva do espectro

de fluorescência foram aplicadas ainda correções devidas ao efeito de filtro interno. Tal efeito costuma se pronunciar quando a Absorbância é alta o suficiente para atenuar o feixe de excitação quando este atinge o ponto médio da cubeta, donde se observa a emissão fluorescente da amostra. Uma vez atenuado o feixe de excitação, a fluorescência observada do ponto médio deverá estar atenuada pela mesma razão. Mas uma vez conhecido o coeficiente de extinção molar ϵ , podemos estimar a correção, pela seguinte fórmula (Van Holde, 1985):

$$I_{cor} = Ie^{\epsilon lc} \quad (4.3)$$

onde I_{cor} - Intensidade de fluorescência corrigida
 I - intensidade de fluorescência medida
 l - caminho óptico (0.5 cm)
 ϵ - coeficiente de extinção molar
 c - concentração do fluoróforo

Considerando-se a área integrada sob o espectro de fluorescência como sendo proporcional à intensidade no máximo de fluorescência, podemos aplicar a correção para a intensidade. Substituímos então a intensidade I e I_{cor} na fórmula (4.3) por A e A_{cor} , onde estes são, respectivamente, o valor para a área integrada sob o espectro e o mesmo valor já corrigido.

Outro cuidado se refere a observada instabilidade da lâmpada de Xe do Espectrofluorímetro. Em cada série de medidas foram tomados os espectros de emissão da lâmpada, o que permitiu estimar uma correção nas medidas envolvendo intensidades de fluorescência. A correção foi feita dividindo se os valores das áreas integradas sobre as curvas dos espectros de fluorescência pelas áreas sob os respectivos espectros da lâmpada.

A tabela (4.5) adiante resume os valores obtidos para o rendimento quântico ϕ nos solventes utilizados:

Solvente	ϕ	$\langle \tau \rangle$ (ns)
Etanol	0.588	7.6
Benzeno	0.389	6.3
DMSO	0.640	8.7
Acetonitrila	0.559	6.9
TFE	0.271	5.4
Ciclohexano	0.287	5.7
Acetona	0.311	ND
Água	0.745	8.7

Tabela 4.5: Valores de rendimento quântico do Abz diluído em diversos solventes.

Em experimentos onde se observou o comportamento do Abz em diversos solventes, foram medidos os tempos de vida médios τ 's e os rendimentos quânticos ϕ 's. Destas medidas, foi possível calcular a taxa de decaimento k devido as perdas por processos não radiativos, através da seguinte fórmula:

$$k = \frac{1}{\tau}(1 - \phi) \quad (4.4)$$

figura 4.10: tempos de vida médio de fluorescência do Abz versus parâmetro de polaridade empírica π^* .

figura 4.11 : rendimento quântico do Abz versus parâmetro de polaridade empírica π^* .

figura 4.12: taxa de decaimento fluorescente decorrente de processos não radiativos versus parâmetro de polaridade empírica π^* .

Observamos que os valores dos tempos de vida e dos rendimentos quânticos apresentam claramente uma variação crescente ante o aumento da polaridade do solvente. É importante notar que tal comportamento se torna irregular ante presença de solventes próticos. O comportamento descrito se aplica somente aos solventes apróticos, que foram a acetonitrila, o benzeno, o DMSO e o ciclohexano. Dos solventes próticos, foram utilizados o TFE, o etanol e a água. Outro fato verificado é a diminuição das perdas por processos não radiativos da energia do estado excitado do Abz, com o aumento da polaridade do meio solvente. Uma vez que no estado excitado o Abz apresenta um aumento no seu momento de dipolo, o aumento da polaridade do solvente parece favorecer a permanência do fluoróforo no seu estado excitado. Meios apolares tenderiam então a desestabilizar estados excitados do fluoróforo onde o momento de dipolo no estado excitado é maior do que no fundamental.

4.4 Efeitos da variação do pH sobre o Abz

Como apresentado anteriormente, há vários efeitos específicos do solvente influenciando as propriedades de absorção e emissão do Abz. Em meio aquoso o Abz apresenta mudança em sua estrutura eletrônica devido ao fato da água atuar como doador/aceitador de prótons. Desse modo, pode-se esperar que as propriedades de absorção e emissão do Abz dependam de fatores como o pH do meio.

Uma das características dos aminoácidos é a existência das formas zwitteriônicas, catiônicas e aniônicas dependentes do pH do meio (Voet e Voet, 1995). Talvez por possuir grupos amino e carboxila semelhantes aos de um aminoácido, o Ácido Aminobenzóico acaba também apresentando tal característica. A estrutura básica do Abz difere da estrutura típica de um aminoácido, por apresentar um anel benzílico no lugar do carbono α . Num aminoácido, ocorrem as protonações dos grupos amino e ácido carboxílico, nesta ordem, à medida em que diminuimos o pH. Adotando a nomenclatura comumente utilizada na denominação dos valores de pH correspondentes aos estados de protonação dos aminoácidos, denominaremos pK_1 e pK_2 , respectivamente, como relacionados aos valores de pH a partir do qual predominam as desprotonações do grupo carboxila e do grupo amino (Voet e Voet, 1995).

Fig.4.22: Para valores de pH maiores do que pK_2 , os grupos ácido carboxílico e amina do Abz se encontram desprotonados. Ao se diminuir o pH a valores próximos de pK_2 verifica-se a protonação do grupo amina. Abaixo de pK_2 começa a se verificar também a protonação do grupo ácido carboxílico.

Curvas de decaimento da fluorescência do Abz foram efetuadas em diversos valores de pH. A maioria dos decaimentos foi ajustada a curvas bi-exponenciais. Em pH baixo, porém, foi necessário o ajuste a funções tri-exponenciais. De posse dos valores de α_i e τ_i , podemos calcular o tempo de vida médio $\bar{\tau}$ usando

$$\bar{\tau} = \frac{\sum \alpha_i \tau_i^2}{\sum \alpha_i \tau_i} \quad (4.3)$$

Os resultados obtidos para o Abz após os ajustes de curva se encontram na tabela a seguir. Em pH alto predomina o tempo de vida longo ($\tau \sim 8$ ns), o que confere com dados obtidos para pH neutro em outros trabalhos. (Souza, 2000; Ito *et al*, 1998)

pH	α_1	α_2	α_3	τ_1	τ_2	τ_3	τ_{medio}
1.35	1.32E-03	6.21E-02	1.34E-01	6.40E-09	9.88E-10	7.48E-11	1.45E-09
1.64	2.36E-03	5.91E-02	9.86E-02	3.70E-09	1.40E-09	7.84E-11	1.50E-09
1.9	1.06E-11	9.60E-02	7.08E-03	1.61E-09	1.16E-10	3.40E-09	2.36E-09
2.3	9.00E-02	4.10E-02		2.82E-09	1.53E-09		2.49E-09
2.77	1.07E-01	5.60E-02		3.61E-09	2.01E-09		3.19E-09
2.92	1.00E-01	5.20E-02		3.76E-09	1.91E-09		3.37E-09
3.15	6.60E-02	9.30E-02		5.02E-09	2.58E-09		3.94E-09
3.48	6.20E-02	1.07E-01		6.25E-09	2.73E-09		4.73E-09
4.11	1.00E-01	7.20E-02		8.07E-09	3.03E-09		6.99E-09
4.96	1.41E-01	2.00E-02		8.71E-09	3.95E-09		8.42E-09
5.5	1.32E-01	6.34E-03		8.70E-09	3.60E-09		8.60E-09
6.55	1.27E-01	9.82E-03		8.79E-09	6.57E-09		8.67E-09
6.95	1.46E-01	1.80E-02		8.53E-09	9.49E-09		8.65E-09
7.39	1.57E-01	3.26E-03		8.70E-09	1.83E-09		8.67E-09
7.89	1.30E-01	3.52E-03		8.74E-09	3.53E-09		8.68E-09
9.81	1.62E-01	4.70E-03		8.61E-09	1.26E-08		8.77E-09
10.69	1.59E-01	8.58E-03		8.84E-09	6.12E-09		8.75E-09

Tabela 4.6: Parâmetros ajustados para as curvas de decaimento multi-exponencial do Abz, em diversos pH's.

Os tempos de vida médios calculados podem ser colocados em um gráfico de $\bar{\tau}$ versus pH, de forma que possamos identificar as mudanças nos estados de protonação do Abz. (fig.4.14)

figura 4.14: Variações no tempo de vida médio do estado excitado do Abz provocadas por mudanças de pH.

As protonações nestes grupos causam alterações sensíveis nas taxas de decaimento, o que se reflete diretamente nas observações dos tempos de vida médio de estados excitados e do rendimento quântico. No gráfico da figura 4.14, verifica-se claramente, a existência de dois “degraus”, cada qual podendo ser associado às diferentes formas do Abz. Associamos o primeiro “degrau” com $pK_1 \sim 1,9$ e o segundo “degrau” com $pK_2 \sim 4,5$.

O mesmo efeito pode ser percebido ainda em uma outra série de medidas, agora envolvendo somente os rendimentos quânticos (Figura 4.15). Desta vez, o conjunto de medidas permite uma melhor visualização do “degrau” relativo ao pK_1 .

figura 4.15: Mudanças no rendimento quântico do Abz ante as variações do pH.

Ainda na figura 4.15, o rendimento quântico do Abz tende a zero, em pH extremamente baixo, o que pode ser uma clara indicação de que o Abz na sua forma catiônica deixa de ser fluorescente.

Juntamente com as variações nos tempos de vida e nos rendimentos quânticos, verificaram se ainda deslocamentos espectrais na absorção e na emissão fluorescente com as mudanças de pH (figuras 4.16 e 4.17).

Figura 4.16 : comprimentos de onda dos picos de absorção versus pH do Abz diluído em água.

Figura 4.17: comprimentos de onda dos picos de máxima emissão fluorescente versus pH do Abz diluído em água

Ao diminuirmos o pH, ocorre um deslocamento para o vermelho, tanto na absorção quanto na emissão fluorescente, em pH ~ 4,5, o

que corresponde ao pK_2 . Conclui-se de tais observações, que a protonação do grupo amina de certa forma gera deslocamentos espectrais para o vermelho. Devido à proximidade dos grupos carboxila e amina no Abz na sua forma Orto, pode ocorrer uma ponte de hidrogênio intramolecular entre estes grupos (Mataga, 1963). Como foi mostrado anteriormente, esta ligação intramolecular gera uma certa delocalização eletrônica entre os grupos amina e ácido carboxílico que reduz a separação de cargas entre estes. No estado excitado, esta delocalização deve se acentuar mais do que no fundamental, por causa do orbital eletrônico mais extenso, e pode ser a responsável pelo deslocamento para o vermelho na absorção. As pontes de hidrogênio entre as moléculas de um solvente prótico e o terminal carboxila devem competir com essas ligações intramoleculares, inibindo a sua formação. Dentro dessa possibilidade, em pH's baixos a protonação do grupo amina pode favorecer a formação de tais pontes intramoleculares, e conseqüentemente gerar o deslocamento para o vermelho.

Assim, em solventes apróticos ou em solução aquosa com pH abaixo de pK_2 , o Abz deve se apresentar como na figura 4.17b. Em uma solução aquosa com $pH > pK_2$ eliminaríamos a ponte de hidrogênio intramolecular e o deslocamento para o vermelho, e por outro lado as pontes de hidrogênio do tipo doador formadas com a amina ainda poderiam estar contribuindo para acentuar mais o deslocamento para o azul.

Figura 4.17b : A primeira ilustração mostra a formação de uma ligação intramolecular. Na segunda ilustração, temos a formação de pontes de hidrogênio formadas com a água.

4.5 Abz ligado a aminoácidos e derivados aminados

4.5.1 Efeitos da variação da polaridade do solvente em compostos Abz-aminoácidos

Neste capítulo analisamos os efeitos gerais e específicos do Abz quando este se acha ligado a peptídeos. Os compostos estudados foram o Abz ligado à fenilalanina (Abz-Phe-NH(CH₃)), à Leucina (Abz-Leu-NH(CH₃)), à Arginina (Abz-Arg-NH(CH₃)) e ao Ácido Glutâmico (Abz-Glu-NH(CH₃)). Destes aminoácidos, a Fenilalanina e a Leucina possuem carga líquida neutra no resíduo, enquanto a Arginina apresenta carga positiva e o Ácido Glutâmico uma carga negativa. (vide figuras 4.18, 4.19, 4.20, 4.21)

Fig 4.18: Abz-Phe-NH(CH₃). Não apresenta grupos carregados.

Fig 4.19: Abz-Leu-NH(CH₃). Não apresenta grupos carregados.

fig.4.20: O composto Abz-Arg-NH(CH₃) apresenta carga líquida positiva.

fig.4.21: O composto *Abz-Glu-NH(CH₃)* possui um grupo negativamente carregado.

Quando isolado, e em solução aquosa com pH próximo de 7, o Abz apresenta os comprimentos de onda de máxima absorção óptica e emissão fluorescente como sendo respectivamente $\lambda_{\text{abs}}=310 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{flu}}=398 \text{ nm}$.

Figura 4.22 : absorbância do *Abz-Phe-NH(CH₃)* sob pH 6.9.

figura 4.23: Espectro da emissão fluorescente do Abz-Phe-NH(CH₃) sob pH 6.9.

Nas figuras 4.22 e 4.23, onde observamos os espectros de absorção ótica e de emissão fluorescente do Abz-Phe-NH(CH₃) em pH 6.9, verificamos que ocorrem deslocamentos para o vermelho pois temos $\lambda_{\text{abs}}=316$ nm e $\lambda_{\text{flu}}=420$ nm.

A exemplo do que fora feito para o Abz isolado, analisamos o efeito geral do solvente em uma amostra de Abz ligado a um aminoácido através do Modelo de Lippert.

figura 4.24 : Gráfico comparativo com a justaposição dos resultados obtidos utilizando-se o modelo de Lippert, para o Abz e o Abz-Leu-NH(CH₃), em mistura água-dioxano.

No gráfico da figura 4.24 temos o resultado para o Abz-Leu-NH(CH₃) ante a variação da polaridade feita através das diferentes misturas de água e dioxano. Neste mesmo gráfico, confronta-se esse resultado com aquele obtido anteriormente para o Abz isolado. Observa-se que exceto pelo deslocamento constante, a forma da curva pouco se altera. Procedendo ao ajuste de reta aos pontos experimentais calculamos a diferença de momentos $\mu^* - \mu$, tal qual foi feito para o Abz isolado.

Amostra	$(\mu^* - \mu) \pm \sigma$ (D)
Abz	12.2 ± 0.9
Abz-leu-NH(CH ₃)	13.0 ± 1.6

Tabela 4.7: Resultados obtidos para $(\mu^* - \mu)$.

Os resultados apresentados na tabela 4.7 nos mostram a semelhança entre os comportamentos do Abz e do Abz-Leu-NH(CH₃). O fato de estar ligado a um aminoácido parece pouco alterar o comportamento do Abz diante das variações de polaridade do meio, e a mesma observação ainda se mantém quando aumentamos a presença da água nos solventes. Mesmo os efeitos específicos devidos ao caráter prótico da água pouco se alteram, embora o terminal carboxila do Abz se encontre ligado ao aminoácido. As mesmas observações feitas sobre a validade quanto ao uso do Modelo de Lippert no estudo dos efeitos de solventes sobre o Abz devem se aplicar aqui também para o Abz quando ligado a peptídeos.

4.5.2 Efeitos da variação de pH em compostos Abz ligados a aminoácidos

Diferentemente do que ocorre com o Abz isolado, os compostos do Abz com peptídeos apresentam apenas a protonação do grupo amina, quando diminuimos o pH a valores baixos. Não ocorre a protonação no grupo ácido carboxílico, uma vez que o átomo de O⁻, candidato à protonação, é eliminado ao se formar a ligação peptídica com o aminoácido. Assim, observamos apenas pK₂.

Fig. 4.25: Comparativo dos tempos de vida médios dos estados excitados de compostos Abz-Aminoácidos ante a variação do pH.

No gráfico comparativo dos tempos de vida médios versus pH da figura 4.26 verifica-se um o valor de pK_2 menor para o Abz-Arg-NH(CH₃), o intermediário para o Abz-Phe-NH(CH₃) e o pK_2 maior para o Abz-Glu-NH(CH₂). É possível que tais valores de pK 's, que se referem ao grupo amina do Abz estejam sendo influenciados pela presença dos grupos carregados nos resíduos dos aminoácidos ligados ao Abz. No composto Abz-Arg-NH(CH₃), o resíduo da Arginina possui uma carga positiva que pode repelir a presença de H^+ , e portanto inibir a protonação do grupo amina do Abz. Assim, torna-se necessária uma maior concentração de H^+ no solvente para que ocorra esta protonação, o que se traduz em um pK_2 menor. Quanto ao composto Abz-Glu-NH(CH₃), pode ocorrer o contrário. A carga negativa presente no resíduo do Ácido Glutâmico geraria uma certa afinidade por íons positivamente carregados, aumentando as chances de protonação do grupo amina.

Nas figuras que se seguem, analisamos também o comportamento dos máximos de absorção e emissão fluorescente dos mesmos compostos, com a variação do pH. Para permitir uma análise comparativa, acrescentamos também as medidas do Abz isolado, apresentadas anteriormente.

figura 4.26: comprimentos de onda dos picos de absorção versus pH.

Figura 4.27: comprimentos de onda dos picos de máxima emissão fluorescente versus pH.

Das figuras 4.26 e 4.27 é interessante notarmos que a variação de pH não acarreta deslocamentos espectrais significativos para os compostos Abz-aminoácidos, como os verificados para o Abz isolado. A protonação do grupo amina neste caso parece não ser capaz de alterar significativamente a estrutura eletrônica a ponto de modificar os níveis de energia. Dentro da suposição de que uma ponte de hidrogênio intramolecular entre os grupos amina e ácido carboxílico possa ser a responsável pelos deslocamentos espectrais do Abz isolado, poderíamos creditar a não ocorrência de tais deslocamentos nos espectros do Abz-aminoácidos à inexistência da ponte de hidrogênio intramolecular, devido a ligação peptídica com o aminoácido.

5. Discussão e Conclusões

5.1. Abz e efeitos gerais

Podemos tomar como referência para os estudos de efeitos de solvente o ciclohexano, que é aquele de menor constante dielétrica e, segundo os critérios de Kamlet e Taft (Kamlet *et al*, 1976(c),(d)) não atua nem como doador nem como aceitador de prótons, apresentando o menor valor na escala de polaridade. Em solventes apróticos como dioxano, benzeno, dmso, acetonitrilo, os espectros de absorção ótica mostram pequenos deslocamentos, de no máximo 3 nm, para o vermelho. Por outro lado, solventes que, independente dos valores de constante dielétrica, apresentam características de doadores de prótons, mostram grandes deslocamentos, de até 19 nm, para o azul, efeito semelhante ao observado para transições $l \rightarrow \pi^*$ em anilinas (Suppan e Ghoneim, 1997). No caso do Abz, a transição deve envolver uma transferência de carga entre o resíduo anilina e o ácido carboxílico (Mataga, 1963). Entretanto, essa mesma transferência de carga deve ser atenuada pela ponte de hidrogênio intramolecular formada entre os grupos amina e carboxila, resultando em um momento dipolar menor. Isso pode significar a diminuição na interação do fluoróforo com um solvente polar, o que pode ser observado na pouca sensibilidade das posições espectrais da absorção ante a polaridade do solvente.

Das medidas de fluorescência do Abz envolvendo solventes de diversas polaridades, observou-se que os máximos de emissão fluorescente vão desde 387 nm em ciclohexano até 400 nm em DMSO, que dos solventes apróticos é um dos mais polares. Os deslocamentos nos máximos de emissão, comparados com os valores referentes ao ciclohexano, são mais pronunciados que aqueles observados nos espectros de absorção, indicando uma grande influência do solvente

no estado excitado do Abz. Nos solventes próticos, os deslocamentos dos máximos de emissão, além de serem maiores do que os verificados nos solventes não próticos, são irregulares, pois ocorre um deslocamento para o azul no caso da água, mas também se verifica um deslocamento para o vermelho nos alcoóis. Não há uma relação direta entre parâmetros como constante dielétrica ou escala de polaridade de Kamlet e Taft e deslocamento do máximo de emissão fluorescente, indicando que outros efeitos além da polaridade do meio estão envolvidos na emissão fluorescente do Abz.

Aplicamos na interpretação de nossos resultados o modelo de Lippert que, valendo-se de uma abordagem semiclássica, tem sido empregado para explicar efeitos de solvente em espectros de absorção ótica e emissão fluorescente. Verificamos que a expectativa de uma dependência linear entre a diferença $\Delta\nu$ nos números de onda para absorção e emissão, que reflete o deslocamento de Stokes, e a polarizabilidade de orientação molecular Δf , foi observada apenas parcialmente pelo Abz nos vários solventes estudados. Os resultados, tanto aqueles obtidos em experimentos com solventes puros, como em misturas de solventes, evidenciaram que as propriedades de absorção e emissão do Abz são influenciados por interações específicas entre o fluoróforo e o solvente.

5.2. Abz e efeitos específicos

A outra forma de abordar os efeitos de solventes, utilizando a tabela de valores empíricos de polaridade de Kamlet-Taft, se mostrou mais interessante, ao permitir avaliar a capacidade dos solventes em gerar pontes de hidrogênio, especialmente aquelas onde o solvente atua como o doador do hidrogênio. Com isso, foi possível distinguir os efeitos diretamente decorrentes de variações na polaridade no solvente daqueles outros mais específicos, gerados por pontes de hidrogênio

entre a molécula do solvente e a do fluoróforo. Em solventes caracterizados como aceitadores de prótons segundo os parâmetros de Kamlet e Taft, como dioxano, benzeno, dmso, acetonitrila, observou-se um comportamento regular do Abz ante a variação da polaridade, ou seja, uma linearidade em relação à polaridade, nos deslocamentos espectrais, tanto de absorção óptica como na da fluorescência e mesmo de outras grandezas, como rendimento quântico e tempos de vida. Este comportamento se tornava anômalo quando se passava para solventes próticos; o que evidencia a observação de que as pontes de hidrogênio onde o solvente atua como doador tendem a gerar efeitos mais contundentes do que aquelas do tipo aceitador (Suppan e Ghoneim, 1997).

5.3. Efeitos de solvente no rendimento quântico

Quanto ao rendimento quântico, observou-se claramente o seu aumento, juntamente com os dos tempos de vida, ante uma variação positiva na polaridade. Solventes mais polares e com maior capacidade de doar prótons devem estabilizar os estados excitados cujos momentos de dipolo são maiores do que os dos estados fundamentais. Chama a atenção o elevado rendimento quântico do Abz, quando comparado a outros fluoróforos como o triptofano, este um componente natural de algumas proteínas e peptídeos. Enquanto o triptofano tem rendimento quântico ϕ por volta de 0.14 em água a pH = 7,4, o Abz sob a mesma circunstância apresentou $\phi = 0,75$. Tal fato, aliado a sua sensibilidade às mudanças de polaridade do solvente tem favorecido o seu uso como sonda fluorescente, uma vez que se queira detectar variações ambientais em torno da molécula em estudo (Turchielo, 1998).

5.4. Efeitos de pH

Um efeito específico promovido pela água é ilustrado pela dependência da fluorescência do Abz com o pH do meio. As propriedades de absorção e emissão do Abz alteram-se com a ligação de prótons aos grupos amina e carboxila. Assim, a monitoração de parâmetros como tempo de vida ou intensidade em função do pH do meio permitiu a determinação dos pK 's daqueles grupos, assim como a verificação da queda do rendimento quântico ante a diminuição do pH.

Experimentos em função do pH mostraram também que quando o grupo amino está protonado, as posições espectrais de absorção e emissão estão mais próximas de valores esperados quando prevalecem os efeitos gerais do solvente. Assim, a impossibilidade de receber prótons através do nitrogênio leva o Abz a apresentar um comportamento comparável ao do fluoróforo em meio aprótico.

5.5 Propriedades de Abz-aminoácidos

Quando ligado a aminoácidos, o Abz continua sensível a interações específicas com o solvente, conforme verificado nos experimentos em misturas de água e dioxano. A presença de grupos carregados vizinhos ao nitrogênio do Abz altera o pK do grupo amina, sugerindo que o fluoróforo inserido em peptídeos pode fornecer informações sobre as vizinhanças, como por exemplo o pH local.

Uma interessante verificação no Abz ligado a aminoácidos foi a ausência de deslocamentos espectrais, tanto na absorção ótica quanto na emissão, quando se variava o pH e ocorria a protonação do grupo amina. No Abz isolado, observou-se deslocamentos para o vermelho na absorção e na emissão, quando protonado o grupo amina. Destas últimas observações e daquelas envolvendo pontes de hidrogênio, fica evidente o importante papel exercido pelo grupo amina e o ácido

carboxílico dentro das transições eletrônicas responsáveis pela fluorescência do o-Abz.

5.6. Conclusões

O Abz é sensível a efeitos gerais apenas quando não há interação com solventes envolvendo a formação de pontes de hidrogênio. Nesse caso, devem predominar efeitos devido à formação de ponte de hidrogênio intramolecular entre os grupos amina e ácido carboxílico. Isto vale para solventes apolares, apróticos ou meio aquoso com pH baixo. (Figura 5.1). Além disso, processos de desexcitação envolvendo as pontes intramoleculares devem levar a uma diminuição de rendimento quântico e de tempo de vida do estado excitado.

Quando o solvente doa prótons deve predominar interação com o H do meio. A estrutura eletrônica é modificada e transições $1-\pi^*$ originam deslocamentos espectrais para o azul. O aumento da polaridade do solvente deve levar aos efeitos de estabilização do estado excitado que resultam em rendimento quântico alto e tempo de vida do estado excitado elevado.

Figura 5.1: (a) Formação de ponte de hidrogênio intramolecular em solventes apróticos. (b) Pontes de hidrogênio formadas com a água inibem a ligação intramolecular. (c) Protonação do grupo amina favorece a ligação intramolecular.

Apesar dos compostos Abz-aminoácido apresentarem comportamento espectral semelhante ao Abz isolado, apresentam

comportamento distinto quanto à dependência com o pH, por causa da ligação peptídica que deve impedir a formação de ponte intramolecular. Todavia, apesar do espectro não variar com pH, deve-se notar que o rendimento quântico e o tempo de vida dependem do pH, o que favorece o seu uso como sonda fluorescente na determinação do pK do grupo amino em Abz-aminoácidos.

6. Referências Bibliográficas

- Ito, A. S.; Turchiello, R. D.; Hirata, I. Y.; Cezari, M. H.; Juliano, L. "Fluorescent Properties of Amino Acids Labeled with Ortho-Aminobenzoic Acid". *Biospectroscopy*, 4, 6, 395-402, 1998.
- Kamlet, M.J.; Minesinger, R. R.; Kayser, E. G.. "Hydrogen Bonding by Hydroxylic Solvents to Aromatic Amines. Effects on Spectra and Relative Basicities of Some N-(4-Nitrophenyl)polymethylenimines". *J. Org. Chem.*, vol. 36, No. 25, 1971.
- Kamlet, M.J.; Kayser, E.G.; Eastes, J.W.; Gilligan, W. H.; "Hydrogen Bonding by Protic Solvents to Nitro Oxigens. Effects on Eletronic spectra of Nitro Derivatives". *Journal of the Am. Chem. Soc.*, 95:16, 5210, 1973.
- Kamlet, M.J.; Taft, R.W.. "The Solvatochromic Comparison Method. I. The β -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities". *Journal of the Am. Chem. Soc.*, 98:2, 377, 1976.
- Kamlet, M.J.; Taft, R.W.. "The Solvatochromic Comparison Method. 2. The α -Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities". *Journal of the Am. Chem. Soc.*, 98:10, 2886, 1976.
- Kamlet, M.J.; Abboud; J. L., Taft, R.W.. "The Solvatochromic Comparison Method. 6. The π^* Scale of Solvent Polarities". *Journal of the Am. Chem. Soc.*, 99:18, 6027, 1977
- Lakowicz, J.R. "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, cap.3, 1983.

- Mataga, N.; Kaifu, Y; Koizumi, M. "Solvent Effects upon Fluorescence Spectra and the Dipolemoments of Excited Molecules". B. CHEM. SOC. JPN 29: (4) 465-470 1956.
- Mataga, N. "Solvent Effects on the absorption an Fluorescence Spectra of Naphthylamines and Aminobenzoic Acids". Bul. of the Chem. Soc. of Jpn, Vol.6, No. 6, 654-662, June, 1963.
- Melhuish, W.H. "Quantum Efficiencies of Fluorescence of Organic Substances: Effects of Solvent and Concentration of the Fluorescent Solute". J. Phys. Chem - US, 65, (2), 229-235, 1961
- Minesinger, R. R.; Jones, M. E.; Taft, R.W.; Kamlet, M.J. "The Solvatochromic Comparison Method. 5. Spectral Effects and Relative Strengths of the First and Second Hydrogen Bonds by 4-Nitroaniline to Hydrogen Bond Acceptors Solvents". J. Org. Chem., Vol. 42, No. 11, 1977.
- Otsuki, S.; Taguchi, T. "Solvent-dependent photophysical properties of Phenothiazone Dyes as an optical probes". Bull. Chem. Soc. Jpn., 69, 2525-2531, 1996.
- Otsuki, S.; Taguchi, T. "Solvent-dependent photophysical properties of aminophenoxazone dyes as optical probes". J. of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 104 (1997) 189-195.
- Ramachandran, C.; Pyter R. A.; Mukerjee P.. J. Phys. Chem.,86,3198-3205, 1982.

Reichardt C.; "Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry". VCH, 1990.

Souza, E.S., Hirata, I.Y., Juliano, L. and Ito, A.S. "End-to-end distribution distances in bradykinin observed by fluorescence energy transfer ". Bioch. Biophys. Acta, in press, 2000.

Suppan, P.; Ghoneim N.. "Solvatochromism". The Royal Society of Chemistry, 1997.

Turchiello, R.F., Lamy-Freund, M.T., Hirata, I.Y., Juliano, L., Ito, A.S.. "Ortho-aminobenzoic acid as a fluorescent probe for the interaction between peptides and micelles". Biophysical Chemistry, 73, 217-225, 1998.

Voet, D.; Voet, J.G. "Biochemistry", second edition, cap. 2, John Wiley & Sons, 1995

Bibliografia recomendada

Bangal, P. R.; Chakravorti, S.; Mustafa G. "Excited state dynamics of 4(1H-Pyrrole 1-yl) benzoic acid and different environmental effects". J.

Bueno, W.A. "Ligação de Hidrogênio", McGraw-Hill do Brasil, 1978
of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry 113 (1998) 35-43.

Bueno, W.A. "Ligação de Hidrogênio", McGraw-Hill do Brasil, 1978

Cantor, C.R.; Schimmel, P.R.. "Biophysical Chemistry", vol.2, cap. 8.2, W.H.Freeman and Company, 1980

Davidov. A.S. "Biology and Quantum Mechanics", cap. 2, Pergamon Press, 1982.

Lippert, E.; Z. Elektrochem, Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 61, 962 (1957); Angew. Chem. 73, 695 (1961).

Lippert, E.; Die Medienabhängigkeit der Fluoreszenzfarbe, p.342 ff; International Symposium on Color Chemistry, 1964.

Van Holde, K. E.; "Physical Biochemistry", 2nd edition. Prentice Hall, 1985.