UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP-DEPARTAMENTO DE FÍSICA

André Miele Amado

**Estudos da agregação de corantes ciânicos em soluções aquosas homogêneas e na
presença de nanoestruturas**

Ribeirão Preto-SP
2017

ANDRÉ MIELE AMADO

Estudos da agregação de corantes cianícos em soluções aquosas homogêneas e na presença de nanoestruturas

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Orientador: Prof. Tit. Iouri Borissevitch

Ribeirão Preto-SP
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Amado, André Miele.

Estudos da agregação de corantes ciânicos em soluções aquosas homogêneas e na presença de nanoestruturas/ André Miele Amado; orientador, Iouri Borissevitch. –2017

116 f. : il.

Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2017

Versão original

1.Corantes ciânicos 2.Acridina laranja 3.Biscianinas 4.Agregação 5.Efeitos de pH e força iônica 6.Interação com estruturas nanoorganizadas.

Nome: AMADO, André Miele

Título: Estudos da agregação de corantes ciânicos em soluções aquosas homogêneas e na presença de nanoestruturas

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Agradecimentos

Impressiona-me a incrível capacidade da Natureza de se renovar, se reinventando desde uma grande nebulosa, berçário de estrelas, ao nível mais interatômico. No término dessa tese, fim desse ciclo e início de uma nova jornada, só desejo ter um pouco dessa capacidade da Natureza de se reinventar. Ser amanhã um homem melhor do que fui ontem.

Agradeço ao Dr. Iouri, o sábio vindo da Rússia, o velho mestre que me guiou nessa jornada.

Agradeço a minha família, especialmente, à dedicação incondicional da minha mãe, ao suporte do meu pai e o coleguismo do meu irmão.

Agradeço aos professores Dr.^a Galina Borissevitch, Dr. Galembeck, Dr.^a Ana Paula Ramos, Dr. Roberto Santana, Dr. Amando Ito, Dr. Luciano Bachman, Dr. Pietro Ciancaglini, Dr. Antônio José (Jabá), Dr. Marco Antônio e Dr. Caliri que me auxiliaram nessa jornada no universo da pesquisa científica.

Agradeço aos companheiros de laboratório e aos amigos que fiz nessa percurso. Mais uma vez agradeço à minha família. Também agradeço as dificuldades que tive durante o percurso, nunca bem-vindas, mas reconheço que estas atuaram como catalizador em minha jornada.

Ao Departamento de Física da USP de Ribeirão Preto, por fornecer as instalações e equipamentos para realização da minha pesquisa, mesmo nos horários mais esdrúxulos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado, projeto nº 33002029022P9.

À secretária da pós-graduação, Nilza.

RESUMO

Os corantes ciânicos (CC) são compostos orgânicos que possuem uma estrutura facilmente variável, permitindo obter-se as características fotofísicas desejáveis. Devido a sua alta afinidade por estruturas biológicas, baixa citotoxicidade no escuro, alta solubilidade em meio aquoso e fotoatividade os CC são considerados compostos promissores para aplicações no tratamento do câncer por terapia fotodinâmica (TFD). CC possuem uma forte tendência de se agregar em meio aquoso, que modifica suas características fotofísicas, reduzindo os rendimentos quânticos de fluorescência e do estado tripleto, diminuindo assim sua eficiência em suas aplicações como sonda fluorescente e na TFD, todavia, a agregação aumenta a eficiência da conversão da sua energia de excitação em calor, que é importante para sua aplicação na terapia por hipertermia (HT). Sendo introduzido num organismo o CC se encontra no ambiente onde ele vai interagir com sais e estruturas nano-heterogêneas (membrana celular, ácidos nucleicos etc.), interações que podem influenciar na sua agregação. Nesse trabalho investigamos o fenômeno da agregação dos CC em suas interações com sistemas nano-heterogêneos naturais (DNA) e sintéticos (micelas) em função da sua própria estrutura, da estrutura destes sistemas e da composição da solução: as concentrações do corante e do sistema nano-heterogêneo e a força iônica. Entre os CC, escolhemos como modelos a Acridina Laranja (AL) e os corantes com dois cromóforos (BCD) que se diferem pelo ângulo formado entre seus cromóforos. Utilizamos técnicas espectroscópicas estacionárias e com resolução temporal de absorção óptica, fluorescência, espalhamento ressonante e dinâmico da luz e fotólise por pulso relâmpago. Descobrimos que em soluções aquosas homogêneas os sais induzem a agregação dos CC. No caso da AL, os sais suprimem sua fluorescência pelo aumento da agregação da AL e pela formação de um exciplexo entre a AL em seu estado excitado singlete e o ânion do sal. A interação dos CC com estruturas nano-organizadas é complexa. Observamos que na interação do CC com o DNA aparecem várias espécies em equilíbrio, tais como monômeros de CC livres e ligados ao DNA, agregados de CC ligados ao DNA e agregados de DNA ligados com os monômeros de CC. A ligação da AL ao DNA reduz a probabilidade do contato da AL com outras moléculas. Contudo, na presença do DNA os sais reduzem a agregação da AL devido à redução da constante de ligação da AL com o DNA. Na presença do dodecil sulfato de sódio (SDS), observamos que em baixas concentrações este estimula a agregação do CC. O aumento da concentração de SDS induz a desagregação do CC. Identificamos que os agregados dos CC com SDS apresentam uma dinâmica que pode perdurar por diversas horas. Durante esse período os agregados trocam suas formas H e J. Investigamos uma possível aplicação prática da agregação numa terapia de HT, identificando que a agregação protege o CC da fotodecomposição e aumenta a eficiência da geração de calor. Os resultados obtidos são importantes para avaliar o potencial de aplicação do CC como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica, fotohipertermia e sondas fluorescentes em diagnóstico por fluorescência.

Palavras chave: Corantes ciânicos, acridina laranja, biscianinas, agregação, efeitos de pH e força iônica, interação com estruturas nano-organizadas.

ABSTRACT

Cyanine dyes (CD) are organic compounds that have an easily variable structure, thus allowing obtain desirable photophysical characteristics. Due to their high affinity to biological structures, low cytotoxicity in the dark, high solubility in aqueous medium and photoactivity the CD are promising materials for application as photosensitizers in cancer treatment by photodynamic therapy (PDT) and as fluorescence probes in fluorescence diagnostics (FD). CD have a strong tendency to aggregate in aqueous media, which modify their photophysical characteristics, reducing its fluorescence and triplet state quantum yields, thus decreasing their efficiency in applications in PDT and FD. At the same time, aggregation increases the probability of excitation energy conversion into heat, which is important for application in hyperthermia (HT) therapy. Being introduced into organism, CD will interact with salts and nano-heterogeneous structures (cell membrane, nucleic acids etc.). These interactions can affect its aggregation. In this work we have investigated the CD aggregation phenomenon at its interactions with natural (DNA) and synthetic (micelles) nano-heterogeneous systems in function of their own structure, structure of the nano-heterogeneous system and the solution characteristics like dye and nano-heterogeneous system concentrations and ionic strength. Among CD, we have chosen as models Acridine Orange (AO) and cyanine dyes with two chromophores (BCD) that differ by the angle between chromophores. Stationary and time-resolved optical absorption, fluorescence, resonant and dynamic light scattering spectroscopies and flash photolysis were used. We have found that in homogeneous aqueous solutions salts induce the CD aggregation. In the case of AO, the salts quench the AO fluorescence by increasing its aggregation and by forming an exciplex between the AO molecule in its singlet excited state and the salt anion. Interaction of CD with nano-organized systems is complex. We observed that at CD interaction with DNA there appear several species in equilibrium, such as CD monomers free and bound to DNA, CD aggregates bound to DNA and DNA aggregates bound to CD monomers. The aggregation of DNA molecules around AO monomers reduces the probability for AO contact with other molecules. In the presence of DNA salts reduce AO aggregation due to reduction of the AO binding constant to DNA. Sodium dodecyl sulfate (SDS) in low concentrations induces CD aggregation, while higher SDS concentrations stimulate CD disaggregation. The process of CD aggregation in the presence of SDS can continue for several hours. During this period, the form of aggregates may modify from H to J or from J to H depending on the dye structure. The irradiation of dye solutions with visible light increases the solution temperature. Aggregation protected CD from photodecomposition and increased heat generation. The results obtained may help in evaluation the potential of CD as photosensitizers in photodynamic therapy, photohyperthermia and fluorescent probes in fluorescence diagnostics.

Keywords: cyanine dyes, acridine orange, biscyanines, aggregation, pH and ionic strength effects, interaction with nano-organized structures

LISTA DE FIGURAS

4.1	Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente. Modificado de [37]. O símbolo Q representa os processos de geração de calor. Os estados meta-estáveis S_{10} e T_{10} podem gerar fotoreações e espécies de radicais livres.	6
4.2	Curvas de Stern-Volmer para as supressões dinâmicas e estática. As setas indicam o movimento da curva com o aumento da temperatura. Modificado de [43].	14
4.3	Curvas de energia potencial para interação entre partículas [8].	16
4.4	Sobreposição da nuvens de elétrons π durante agregação de duas oléculas na ausência (a) e na presença de íons de sal (b), positivos ou negativos [8].	17
4.5	Esquema da formação de micelas e da mudança da tensão superficial em função da concentração do tensoativo, abaixo e acima da C.M.C. [9].	18
4.6	Geometria de agregados de tipos H, J e HJ.	18
4.7	Diagrama das energias dos dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição. (a) Agregados J; (b) Agregados H; (c) Agregados mistos. As setas pequenas indicam a orientação do momento de dipolo, já as setas grandes representam as transições de maior e menor probabilidade, respectivamente, as contínuas e as tracejadas. Modificado de [44].	20
4.8	Esquema de uma micela com íons e indicando três regiões distintas.	22
4.9	Estrutura geral de um corante cianico simétrico [44].	23
4.10	Fórmula estrutural da Acridina Laranja.	25
4.11	Estrutura molecular dos três corantes cianicos com dois cromóforos a serem estudados, respectivamente, com ângulos de 180° (A), 150° (B) e 90° (C) entre os cromóforos.	26
4.12	Esquema dos níveis de energia para os BCDs, levando-se em conta as interações de tunelamento e dipolo-dipolo entre os cromóforos. 1-Simétrica e 2-Antisimétrica. [107]	28
4.13	Estrutura molecular do SDS.	30
4.14	Esquema básico do DNA, do artigo de Watson e Crick de 1953 (A) e (B) [120]. Nucleotídeo do DNA (C).	31
4.15	Estrutura esquemática da molécula de DNA com os sulcos maiores e menores indicados.	31
5.1	Diagrama de estados para um FS típico, mostrando a absorção, seguida por um cruzamento intersistema e consequente povoamento dos estados tripletos ($T_1 \rightarrow T_2$) e ($T_1 \rightarrow T_n$). Modificado de [134].	40
5.2	(1). Fonte da luz de análise (lâmpada ou laser); (2) e (4) sistemas óticos; (3) amostra; (5) monocromador; (6) fotomultiplicadora; (7) fonte de alta tensão; (8) registrador (osciloscópio digital); (9) analisador (computador); (10) fonte de corrente; (11) fonte de pulsos de luz de excitação (laser); (12) fonte de potência para pulsos de excitação.	43
6.1	Espectros normalizados de absorção dos BCDs com diferentes ângulos entre os cromóforos, solução aquosa. Modificado de [23].	44
6.2	Esquema do equipamento de irradiação.	48
7.1	Espectro de absorção da AL em tampão fosfato com $A/A_{490 \text{ nm}}$; inserção: Razão entre $A_{468 \text{ nm}}/A_{490 \text{ nm}}$ da AL em função da concentração da AL.	50
7.2	Absorção da AL em 490 nm em função da concentração da AL (A), integral da intensidade de fluorescência da AL em função da absorbância no comprimento de onda de excitação $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ (B) e espectro de fluorescência da AL em função da [AL] (C). Experimentos realizados pela ex-aluna Érika Ribeiro e Silva durante seu mestrado e gentilmente cedidos pela mesma.	51
7.3	Espectro da fluorescência da AL corrigidos pela absorbância em $\lambda_{\text{ex}}=380 \text{ nm}$ (A) e integral da intensidade de fluorescência da AL corrigida e em função da concentração de AL (B).	52
7.4	Espectro normalizado da excitação da AL monitorados em $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$ (A) e curvas do decaimento da fluorescência com $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ para várias concentrações de AL.	53
7.5	Integral da I_{RLS} da solução de AL em função da concentração da mesma.	53
7.6	A distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos da AL depende da concentração do corante: 0,65 μM (preto), 6 μM (vermelho) and 45 μM (azul) (A). Distribuição do tamanho da AL utilizando o método de análise Contin no modo número.	54

7.7	Espectro de absorção de 2,6 μM (A) e 55 μM (B) de soluções de AL em função da concentração de NaCl e da razão das absorbâncias $A_{490\text{ nm}}/A_{468\text{ nm}}$ das concentrações de AL de 2,6 μM (A) e 55 μM (B) em função das concentrações de LiBr, NaBr, KBr, LiCl, NaCl e KCl.	55
7.8	Dependência de Stern-Volmer para a intensidade de fluoerescência da [AL]=55 μM em relação a concentração de sal para vários sais.	56
7.9	Curvas de decaimento da fluorescência da AL para a concentração de 2,6 μM de AL para várias concentrações de KBr com $\lambda_{\text{ex}} = 460\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 530\text{ nm}$ (A). Depedência de Stern-Volmer para a supressão estática e dinâmica da fluorescência da AL pelo sal KBr (B).	58
7.10	Espectro de absorção das soluções de [AL] = 55 μM (A) e [AL] = 10 μM (B) e razões $A_{490\text{ nm}}/A_{470\text{ nm}}$ para a solução de [AL] = 55 μM (C) em função da concentração de NaI.	60
7.11	Espectro de absorção (A) e a razão das absorbância em 490 nm e 475 nm (B) da solução de 25 μM de AL em função da concentração de DNA em pH 6,8 em tampão fosfato (7,5 mM) na ausência de NaCl. [DNA ₁] e [DNA ₂] são parâmetros variáveis da equação (7.10).	64
7.12	Espectro de fluorescência (A) e integral da intensidade de fluorescência (B) para solução de 25 μM de AL em função de [DNA] em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5 mM na ausência de NaCl ($\lambda_{\text{ex}} = 420\text{ nm}$).	66
7.13	Espectro de absorção da AL (A) e absorbância em $\lambda = 500\text{ nm}$ (B) para a solução de 25 μM de AL em função da [DNA] em pH 6,8 e 7,5 mM de tampão fosfato na presença de 0,5 M de NaCl.	67
7.14	Espectro de fluorescência (A) e integral do espectro de intensidade da fluorescência (B) para solução de 25 μM de AL em função de [DNA] em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5 mM com 0,5 M de NaCl ($\lambda_{\text{ex}} = 420\text{ nm}$).	68
7.15	Intensidade de Espalhamento Ressonante da Luz (ERL) (A) e integral do espectro do ERL (B) para solução de [AL]=25 μM em função do [DNA] em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5mM na ausência e na presença de 0,5 M de NaCl.	70
7.16	Dependências da $\frac{1}{I-I_{\text{min}}}$ para com $\frac{1}{[\text{DNA}]}$ na ausência de NaCl (A) e na presença de 0,5 M de NaCl (B).	71
7.17	Perfil de decaimento da fluorescência da [AL]=5 μM na presença de [DNA] = 100 μM (A) e contribuição das componentes de decaimento dos tempos de vida curto (τ_1) e de longa-vida (τ_2) em função da concentração de DNA na ausência e na presença de 0,5M de NaCl (B).	72
7.18	Perfil normalizado do decaimento do estado tripleto de 2,7 μM de AL em solução desoxigenada ($\lambda_{\text{reg}} = 425\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ex}} = 532\text{ nm}$) na presença de 160 μM de DNA em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5 mM (A), resíduos da cinética de decaimento para o ajuste mono-exponencial (B). Medidas realizadas na ausência de NaCl.	75
7.19	Curvas de correlação do ECF para soluções de 50 nM de AL na ausência de DNA (A) e na presença de 1,0 μM de DNA (B).	77
7.20	Espectro de absorção de 32 μM de AL com adição de 0-100 μM de SDS (A). Razão entre os picos 490 nm e 472 nm para as concentrações de 14, 32 e 54 μM de AL com adição de 0-100 μM de SDS (B).	79
7.21	Espectro de absorção da [AL]=54 μM na presença de [SDS]=0-10 mM (A). Razão $\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{470\text{ nm}}}$ para a [AL]=54 μM na presença de [SDS]=0-10 mM (B).	80
7.22	(A) espectros de fluorescência da [AL]=32 μM na presença de [SDS]=0-10 mM corrigidos por $\lambda_{\text{ex}}=380\text{ nm}$ (A); (inserção A) área sob a curva dos espectros de fluorescência para [AL]=14-73 μM na presença de [SDS]=0-10mM, corrigidos por $\lambda_{\text{ex}}=380\text{ nm}$; (B) espectro de ERL da [AL]=14 μM na presença de [SDS]=0-10 mM; (inserção B) integral do espectro de ERL da [AL]=5-73 μM na presença de [SDS]=0-10 mM.	80

7.23	Espectros de absorção da [AL]=32 μM na presença de [SDS]=0,5 mM monitorado durante $\approx$ 12 horas (A). Espectro de absorção da [AL]=54 μM na presença de [SDS]=0,5mM monitorados durante 1,5 hora (B).	82
7.24	Variações temporais das absorbâncias $A_{268\text{ nm}}$ (A) e $A_{565\text{ nm}}$ (B) da [AL]=32 μM na presença do [SDS]=0,1 mM monitorados durante $\approx$ 10 horas.	83
7.25	Espectro do ERL da [AL]=32 μM monitorados durante $\approx$ 10 horas.	84
7.26	Intensidade integral dos espectros de ERL da [AL]=32 μM na presença de 50 μM (A) e 500 μM (B) de [SDS] monitorados durante $\approx$ 10 horas.	84
7.27	Espectros do ERL da [AL]=32 μM na presença do [SDS]= 32 μM em diferentes instantes de tempo.	85
7.28	Gráfico da temperatura em função do tempo para [AL]= 6,5 à 74 μM irradiada em 470 nm por até 50 minutos.	88
7.29	Espectro de absorção da [AL]=14 μM em função do tempo (A) e $A_{490\text{ nm}}$ normalizada da AL para as concentrações de 6,5 à 74 μM (B)	90
7.30	Espectros de absorção óptica normalizados do BCD180 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre $A_{633\text{ nm}}/A_{597\text{ nm}}$ em função da concentração de BCD (B). Modificado de [236].	91
7.31	Espectros de absorção óptica normalizados do BCD150 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre $A_{624\text{ nm}}/A_{590\text{ nm}}$ em função da concentração de BCD (B). Modificado de [236].	91
7.32	Espectros de absorção óptica normalizados em 618 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre as $A_{618\text{ nm}}/A_{576\text{ nm}}$ em função da concentração de BCD (B). Modificado de [236].	92
7.33	Espectros de absorção óptica normalizados em 502 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre as $A_{502\text{ nm}}/A_{475\text{ nm}}$ em função da concentração do BCD (B). Modificado de [236].	92
7.34	Espectro de absorção do [BCD180]=1,7 μM ao adicionar NaCl (A), $A_{632\text{ nm}}$ do BCD180 em função da concentração de NaCl (B), razão entre $A_{632\text{ nm}}/A_{596\text{ nm}}$ para o BCD180 em função do NaCl(C). Modificado de [237].	93
7.35	Espectro de absorção do [BCD90]=14 μM ao adicionar NaCl de 0,1-3 M.	93
7.36	Espectro de absorção do [BCD180]=12 μM ao adicionar NaCl de 0,1M.	94
7.37	Mudança no tempo nas $A_{700\text{ nm}}$ (A) e $A_{850\text{ nm}}$ (B) do [BCD180]=12 μM com a adição de 0,1 M de NaCl.	94
7.38	Espectros de absorção do [BCD180]= 2,3 μM com adição de [SDS]=0,2-20 mM (A). $A_{641\text{ nm}}/A_{594\text{ nm}}$ do BCD150 em função da concentração de SDS (B). Modificado de [236].	95
7.39	Espectros de absorção do [BCD150]=1,0 μM com adição de [SDS]=0,1-10 mM (A). $A_{632\text{ nm}}/A_{590\text{ nm}}$ do BCD150 em função da concentração de SDS (B). Modificado de [236].	95
7.40	Espectros de absorção do [BCD90]=0,7 μM com adições de [SDS]=0,2-20 mM (A). $A_{628\text{ nm}}/A_{581\text{ nm}}$ do BCD90 em função da concentração de SDS (B). Modificado de [236].	95
7.41	Dinâmica de agregação do [BCD180]=6 μM na presença de 6 μM de SDS, monitorados durante 3,5 minutos (A) e mudanças da $A_{675\text{ nm}}$ (A) e da $A_{560\text{ nm}}$ (B) durante 3,5 minutos.	97
7.42	Espectros de absorção do [BCD90]=15 μM na presença de 1000 μM de SDS em função do tempo, (A) e mudanças da absorbância $A_{509\text{ nm}}$ (B) monitorados durante 77 minutos.	98

LISTA DE ABREVIACES E ACRNIMOS

AL	Acridina laranja	SDS	Dodecil sulfato de sódio
CC	Corantes ciânicos	DNA	cido desoxirribonucleico
TFD	Terapia fotodinâmica	CMC	Concentra micelar crítica
HT	Hipertermia	FRET	<i>Frster Ressonance Energy Transfer</i>
BCD	Biscianinas	EDL	Espalhamento dinâmico da luz
CI	Converso interna	ERL	Espalhamento ressonante da luz
CIS	Cruzamento intersistemas	HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
FS	Fotossensibilizador	TPPS₄	Meso-tetrasulfonatofenil porfirina
PBS	Tampo fosfato-salino	CTAB	Surfactante brometo de cetil trimetil amônio
FLIM	Fluorescence lifetime imaging microscopy	ECF	Espectroscopia de correla de fluorescência
A	Adenina	C	Citosina
G	Guanina	T	Timina
FS	Fotossensibilizador	pH	(<i>potential of hydrogen</i>)  uma escala numérica do colog da concentra hidrogeninica do meio, indicando a acidez ou basicidade de uma solu aquosa
UV	Ultra-violeta	F	Flúor
Cl	Cloro	Br	Bromo
I	Iodo	Li	Lítio
Na	Sódio	K	Potássio

LISTA DE TABELAS

6.1	Algumas características espectroscópicas de três BCDs com diferentes ângulos entre os cromóforos. Retirado de [23].	44
7.1	Constante bimolecular da supressão da fluorescência da AL k_q ($M^{-1}s^{-1}$) $\times 10^{-9}$ em várias concentrações para diferentes sais e potencial de oxidação do anión do sal (E_{ox}).	57
7.2	Constantes da supressão bimolecular dinâmica k_{qd} ($M^{-1}s^{-1}$) $\times 10^{-9}$ da fluorescência da solução de $[AL]=2,6 \mu M$ por diferentes sais e potencial de oxidação do anión do sal (E_{ox}).	58
7.3	Constantes k_q e k_{qd} ($M^{-1}s^{-1}$) $\times 10^{-9}$ da fluorescência da AL pelo sal KBr, constants de supressão bimolecular em diferentes concentrações de AL em função do pH.	61
7.4	Concentrações características de DNA para agregação da AL ($[DNA]_1$) e desagregação ($[DNA]_2$) na ausência de NaCl.	64
7.5	Concentrações características de DNA para a desagregação da AL e ligação ao DNA ($[DNA]_2$) na presença de NaCl em função das concentrações de AL e NaCl.	69
7.6	Tempo de vida médio (τ) e constantes bimoleculares de supressão da fluorescência (k_{qfl}) e estado tripleto (k_{qt}) da solução de $2,7 \mu M$ de AL em função da concentração do DNA em pH 6,8 e 7,5 mM de tampão fosfato.	75
7.7	Concentrações aproximadas de SDS para o máximo da intensidade integrada de ERL (máximo de agregação) da AL em função da concentração da AL.	81
7.8	Tempos característicos da dinâmica de agregação para $[AL]=14-74 \mu M$ com $[SDS]=0.1-1mM$ pelo método de absorção ótica.	83
7.9	Tempos característicos das três componentes das curvas da cinética da $[AL]=32 \mu M$ com $[SDS]=50 \mu M - 1 mM$.	85
7.10	Aumento da temperatura máxima (T) alcançada para a AL em função da concentração da mesma, taxa de aumento da temperatura (k_1) para diferentes concentrações de AL e respectiva taxa de fotodecomposição (k_2) monitorada em 490 nm em função da concentração de AL.	89
7.11	BCDs com ângulos 90° , 150° e 180° em solução aquosa na presença de SDS indicando a presença ou não de dinâmica.	96

LISTA DE SÍMBOLOS

h	Constante de Planck	ν	Frequência do fóton
E_n, E_0	Energias dos estados excitado e do fundamental, respectivamente	A	Característica do material chamada “absorbância”, capacidade de absorver a luz num comprimento de onda definido.
I_{abs}	Intensidade da luz absorvida por um material	$\epsilon(\lambda)$	Coefficiente de absorção molar do material
I_0	Intensidade da luz que incide no material	$\lambda(nm)$	Comprimento de onda
c (M)	Concentração do absorvedor em Molar	l (cm)	Distância da propagação da luz dentro do material (caminho óptico)
S_{nv}, T_{nv}	Estados singletos e tripletos da molécula	k_{ci}	Taxas de conversão interna
k_{rfl}	Taxa da emissão de fóton da fluorescência	k_{cis}	Taxa de conversão intersistema
n_{S_1}	Número de partículas excitadas em um dado instante de tempo t após a excitação	t	Tempo
τ_{S_1}	Tempo de vida do estado S_{10}	τ_{T_1}	Tempo de vida do estado T_{10}
k_{rff}	Taxa da emissão de fóton da fosforescência	I_{fl}	Intensidade total da fluorescência emitida
ϕ_{fl}	Rendimento quântico da fluorescência	n	Índice de refração do meio
ν_0	Posição do máximo da banda de absorção	ϵ_t	Coefficiente de absorção molar de transição
ϵ_{max}	Coefficiente de absorção molar no máximo de absorção	D	Molécula doadora de energia
A_c	Molécula aceitadora ou supressora	K_f	Taxa da eficiência da transferência de energia pelo mecanismo de FRET
k	Coefficiente de orientação relativa entre o doador e o aceitador	r	Distância entre o doador e o aceitador
N	Número de Avogadro	F_D	Intensidade de fluorescência do doador normalizado
τ	Tempo de vida do estado excitado do doador na ausência do aceitador	K_D	Taxa de transferência de energia por Dexter
$\epsilon_a(\nu)$	Coefficiente de absorção molar do aceitador	$E_D(\nu)$	Espectro da emissão de doador integrado
L'	Constante de proporcional a soma dos raios de van der Waals do doador e do aceitador	O_2	Oxigênio molecular
$\epsilon_{na}(\nu)$	Coefficiente de absorção molar normalizado do aceitador	$[Q]$	Concentração de supressor
k_d	Constante bimolecular da supressão dinâmica do estado S_1 ou da fluorescência	ϕ'_{fl}, I'_{fl}	Rendimento quântico e a intensidade de fluorescência na presença de supressor
$k_{S_{10}}$	Constante de decaimento do estado S_1 na ausência de supressor	K_{SV}	Constante de Stern-Volmer
f_q	Coefficiente da acessibilidade do fluoróforo para o supressor	a	Soma do raio molecular
k_d'	Eficiência do processo de supressão		

D'	modificada Soma da difusão do fluoróforo e do supressor	N'	Número de moléculas por mM
k_{dmax}	Constante máxima de supressão dinâmica	r_f, r_q	Raios do fluóroforo e do supressor, respectivamente
D_f, D_q	Respectivos coeficientes de difusão do fluóroforo e do supressor	k_s	Taxa de formação de um complexo supressor-agregado, ou constante de equilíbrio de formação do complexo
$[FS]$	Concentração do FS	$[Q]$	Concentração do supressor
$[FS+Q]$	Concentração do complexo formado entre supressor e FS	$[FS]_0$	concentração total de FS
I_{fl_0}	Intensidades de fluorescência do FS na presença de supressor	ϵ_0	Constante dielétrica do meio
W_q	Energia eletrostática da interação de duas moléculas carregadas	Q	Carga do monômero
W_k	Energia de Keesom	U	Momento de dipolo do monômero
k_B	Constante de Boltzmann	T	Temperatura em Kelvin
W_L	Força de London ou força de dispersão	α	Polarizabilidade elétrica da molécula
J	Agregados com ângulo de 180° entre os monômeros, dispostos lado a lado	H	Agregados com ângulos de 0° entre os monômeros, ou seja, são dispostos em pilha
H_1, H_2	Hamiltonianas dos monômeros livres	H_d	Hamiltoniana do dímero
V_d	Operador da interação dipolo-dipolo	U_1, U_2	Operadores de momento de dipolo dos dois monômeros
$\nu_{\pm}$	Frequências de absorção	$D_{0a\pm}$	Momento de transição
θ	Ângulo entre os dipolos de transição dos monômeros 1 e 2	ΔE	energias de transição entre estados
m	Massa do elétron	N_e	Número de elétrons- π da molécula
L_c	Comprimento da caixa de potencial infinito (cadeia de conjugação- π)	c'	Velocidade da luz
H'_1, H'_2	Hamiltonianas de cada cromóforo	H_{BCD}	Hamiltoniana do BCD
V_{12}	Potencial de interação dipolo-dipolo	$\Psi_0, \Psi_{1ex}, \Psi_{2ex}$	Funções de onda das soluções da equação de Schroedinger
Φ_{10}, Φ_{20}	Funções de cada cromóforo no estado fundamental	Φ_{1ex}, Φ_{2ex}	Funções de cada cromóforo no estado excitado
E^+, E^-	energias do primeiro estado excitado pela solução simétrica e do segundo estado excitado pela solução anti-simétrica, respectivamente	E_{ex}	Energia do estado excitado de um cromóforo isolado
E_n^S, E_n^a	Estados simétrico e anti-simétrico	a, b	Meia largura do cromóforo e do heterociclo central da molécula, respectivamente
U_0	Altura da barreira potencial entre os cromóforos	E_{n0}	Energia da molécula com um cromóforo isolado
λ_1, λ_2	Comprimentos de onda dos picos do espectro de absorção do BCD da primeira e da segunda banda, respectivamente	ϵ_1, ϵ_2	Coefficientes de absorção molar dos máximos das bandas do espectro de absorção do BCD
I_r, I_{esp}, I_{tr}	Intensidades refletida, espalhada e transmitida, respectivamente.	A_i''	Constante
$\bar{\tau}$	Tempo de vida médio	$F(t)$	Função da detecção da fluorescência da amostra
$G(t)$	Função do pulso de luz de excitação	$f(t)$	Função de fluorescência da amostra

A'	Coefficiente de proporcionalidade	I_{at}	Intensidade da luz de ativação
n_p	índice de refração da partícula-espalhadora	V_{ag}	Volume do agregado
I_{ERLag}	Intensidade de espalhamento do agregado	n_{ag}	Número médio de agregação
K	Coefficiente de proporcionalidade	c_{ag}	Concentração dos agregados
V_m	Volume do monômero	V_{ag}	Volume médio dos agregados
D_i	Coefficiente de difusão	R_h	Raio hidrodinâmico da partícula
η_{vis}	Viscosidade do meio	I_D	Intensidade da luz que chega ao detector depois de espalhada pela partícula
$\vec{q}$	Vetor de espalhamento	B	Constante
I_1, I_2	Intensidades da luz após a absorção pelas respectivas espécies absorvedoras.	c_T	Concentração de moléculas no estado tripleto
ε_S	Coefficiente de absorção molar do estado singleto	I_{flcorr}	Intensidade de fluorescência corrigida
ε_T	Coefficiente de absorção molar do estado tripleto	$I_{fl exp}$	Intensidade de fluorescência obtida experimentalmente
$A_{\lambda exp}$	Absorbância da solução no comprimento de onda de excitação	τ_q	Tempo de vida da fluorescência na presença de sal
I_q	Integral da intensidade de fluorescência na presença de sal		
ΔG	Variação de energia livre do sistema devido a formação do exciplexo		

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
3 JUSTIFICATIVA	4
4 BASE CIENTÍFICA	5
4.1 Fotofísica de uma molécula orgânica	5
4.2 Agregação	14
4.3 Surfactantes e micelas	21
4.4 Objetos do estudo	23
5 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	33
5.1 Espectroscopia de absorção ótica de modo contínuo	33
5.2 Espectroscopia de fluorescência de modo contínuo	34
5.3 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo (tempo de vida)	34
5.4 Espalhamento ressonante da luz (ERL)	35
5.5 Espalhamento dinâmico da luz (EDL)	37
5.6 Flash-fotólise	39
6 MATERIAIS E MÉTODOS	44
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
7.1 Supressão da fluorescência da Acridina Laranja por sais em solução aquosa: efeitos da agregação e transferência de carga	49
7.2 Interação da Acridina Laranja com DNA: efeito da força iônica	61
7.3 Agregação da Acridina Laranja na presença de SDS em solução aquosa	78
7.4 Hipertermia da Acridina Laranja em solução aquosa sob irradiação luminosa	86
7.5 Investigação dos corantes ciânicos com dois cromóforos (biscianinas, BCD)	90
8 CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS	101
MATERIAL SUPLEMENTAR	115

1 INTRODUÇÃO

Os corantes ciânicos (CC) designam uma família de corantes orgânicos cujas características espectrais e energéticas, tais como a energia dos níveis eletrônicos, intensidade do pico de absorção, são determinadas pela presença em sua estrutura de uma cadeia de conjugação π desenvolvida, cujas características podem ser ajustadas variando-se o comprimento dessa cadeia. CC possuem diversas características desejáveis para aplicações em fotobiologia e fotomedicina, tais como altas intensidades de absorção óptica e da fluorescência, alta afinidade por estruturas biológicas, baixa citotoxicidade no escuro, estabilidade química e fotoquímica, boa solubilidade em meio aquoso e fotoatividade [1-5]. Devido a essas propriedades, os CC são amplamente utilizados como sondas fluorescentes em biologia e medicina [2-5] assim como fotossensibilizadores (FS) na terapia fotodinâmica [2,4,6-12].

A presença na estrutura dos CC de uma cadeia de conjugação π também lhes confere uma hidrofobicidade relativamente alta e, devido a isso, lhes conferem uma forte tendência de se agregarem em meio aquoso. A agregação aumenta a probabilidade de dissipação da energia de excitação eletrônica pelos processos não radiativos, transformando-a em calor, diminuindo sua fluorescência e fotoatividade, acarretando na redução de sua eficiência como sonda ou fotossensibilizador [4,13-24]. Todavia, devido ao aumento da transformação da energia de excitação em calor, o fenômeno da agregação pode ser utilizado para a hipertermia. Apesar da fotoatividade e da hipertermia serem processos concorrentes, esses dois processos associados podem possuir um efeito sinérgico na fototerapia [25-36].

O fenômeno de agregação é complexo e envolve diferentes aspectos, como a probabilidade de agregação, número médio de agregação e estrutura espacial do agregado, que são afetadas pela concentração, pela força iônica e pH do ambiente e por interações com outras moléculas e, especialmente, com estruturas nano-heterogêneas. Em função desses parâmetros as características temporais de agregação podem variar de micro ou milissegundos até horas [16].

Tendo em vista aplicações biológicas e médicas, é de suma importância investigar as interações do CC em questão com sistemas biológicos, incluindo a agregação decorrente da interação com esses sistemas.

Nossa proposta neste doutorado foi de investigar os mecanismos e dinâmica da agregação dos CC em interação com sistemas nano-heterogêneos naturais e sintéticos. Nossa investigação consistiu em estudar o fenômeno da agregação sob diferentes fatores, tais como a própria geometria da molécula do corante, da estrutura dos sistemas nano-heterogêneos e do

pH e força iônica do ambiente. Como sistemas nano-heterogêneos utilizamos o DNA e as micelas de lauril sulfato de sódio (SDS). Investigamos o efeito de diferentes íons inorgânicos nas características fotofísicas dos CC e observamos que o tipo de íon presente em solução desempenha um papel importante. Além disso, fizemos alguns estudos pilotos *in vitro* sobre utilizar os CC para hipertermia.

Focamos nosso estudo entre diferentes CC: acridina laranja (AL) e biscianinas (BCD), estes últimos são corantes com um anel central e dois cromóforos cujas características são dependentes pelo ângulo formado entre seus cromóforos.

Os estudos foram realizadas com métodos espectroscópicos de absorção óptica e fluorescência, estacionários e resolvidos no tempo, espalhamento dinâmico e ressonante da luz.

Optamos por utilizar as referências de acordo com estilo Vancouver.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse trabalho foi investigar as características fotofísicas e processo de agregação dos CC: acridina laranja (AL) e corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD) na sua interação com os sistemas nano-heterogêneos. Foram estudados os efeitos da própria estrutura e concentração do corante, da arquitetura dos sistemas nano-heterogêneos e das características do ambiente: pH e presença de sais inorgânicos. Os estudos foram realizados com o intuito de elucidar os efeitos de agregação dos CC nas suas aplicações médicas e biológicas.

3 JUSTIFICATIVA

Os estudos de agregação dos CC são importantes pelos seguintes motivos:

- O processo de agregação modifica as características fotofísicas dos corantes, desempenhando um caráter crucial em aplicações práticas.
- As propriedades dos agregados de CC são sensíveis às condições do meio, assim como também a concentração do CC e presença de estruturas nano-heterogêneas.
- É importante estudar a agregação, especialmente, na presença de sistemas nano-heterogêneos devido aos alvos biológicos como o DNA, mitocôndria, a membrana celular e a própria célula serem exemplos de sistemas nano-heterogêneos organizados. Inserido dentro de um desses sistemas, o FS está num ambiente bastante distinto do que em uma solução aquosa homogênea e é de se esperar que suas propriedades sejam afetadas, entre elas, a agregação.
- A ligação de fotossensibilizadores com moléculas biológicas também pode alterar suas propriedades fotofísicas. O estudo da agregação pode ajudar a elucidar como melhorar a eficiência do fotossensibilizador, como também pode fornecer informações de como potencializar a especificidade deste, pois os processos de agregação e de ligação à alvos biológicos são processos similares.
- Uma investigação da interação do nosso FS com o DNA é importante devido ao primeiro ser um dos principais alvos na terapia fotodinâmica.
- O meio biológico é bastante rico em íons de sais. Investigar o comportamento fotofísico, a tendência e as características da agregação do FS sob diferentes forças iônicas permite elucidar o *modus operandi* do FS em meio biológico.

Embora existam vários estudos sobre o processo de agregação, até o momento, há uma falta de estudos sistemáticos sobre os detalhes do processo e diversos aspectos teóricos e experimentais do problema ainda necessitam de melhores esclarecimentos, especialmente, aqueles envolvendo a dinâmica de agregação. O que justifica os estudos mais detalhados dos mecanismos e da dinâmica de formação dos agregados de CC.

4 BASE CIENTÍFICA

4.1 Fotofísica de uma molécula orgânica

4.1.1 Absorção e emissão da energia eletromagnética

O processo fotofísico inicial de uma molécula é a absorção da energia luminosa na forma de um fóton. Depois da absorção do fóton a molécula passa do seu estado inicial (fundamental) para um dos seus estados excitados. A condição necessária para realizar essa absorção é a energia do fóton, $h\nu$, é igual à diferença entre as energias dos estados excitado, E_n , e do fundamental, E_0 :

$$h\nu = E_n - E_0 \quad (4.1)$$

em que h é a constante de Planck e ν é a frequência do fóton.

De acordo com a lei de Lambert-Beer a intensidade da luz, absorvida por um material, I_{abs} , é:

$$I_{abs} = I_0(1 - 10^{-A}) \quad (4.2)$$

em que I_0 é a intensidade da luz que incide no material e A é uma característica do material chamada “absorbância”, que é definida como

$$A = \varepsilon(\lambda)cl \quad (4.3)$$

onde $\varepsilon(\lambda)$ ($M^{-1}cm^{-1}$) é o coeficiente de absorção molar do material, que depende do comprimento de onda λ (nm), c (M) é a concentração do composto - absorvedor no material e l (cm) é distância da propagação da luz dentro do material (caminho óptico).

Formalmente, podemos dizer que devido a absorção de um fóton, a energia extra adquirida pela molécula irá promover um elétron da molécula do orbital fundamental para um orbital excitado.

Geralmente o estado fundamental de uma molécula está associado com um orbital que contém dois elétrons com spins desemparelhados. Este estado se chama singleto. Sendo promovido para um orbital excitado, o elétron mantém a orientação do seu spin, comportamento esquematizado nas regras quânticas de seleção. Ou seja, com grande probabilidade o estado excitado formado também deverá ser singleto. Entretanto, existe uma probabilidade do elétron mudar a orientação do seu spin. Nesse caso o estado formado chama-se tripleto.

Os nomes singleto e tripleto oriundam-se da multiplicidade destes níveis, dada através da expressão $2S + 1$, onde S é o número quântico de spin eletrônico total. Em um estado singleto a soma dos spins de todos os elétrons da molécula (spin total) é nulo ($S = 0$), enquanto que em um estado tripleto encontram-se dois elétrons com os spins paralelos e $S = 1$.

A molécula excitada perde sua energia através de processos radiativos e não radiativos, retornando no final do processo à seu estado fundamental. O processo de perda da energia está representado em detalhes no diagrama do Jablonsky.

4.1.2 Diagrama de Jablonsky

Figura 4.1. Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente. Modificado de [37]. O símbolo Q representa os processos de geração de calor. Os estados meta-estáveis S_{10} e T_{10} podem gerar fotoreações e espécies de radicais livres.

No diagrama de Jablonsky (figura 4.1) temos a representação do estado fundamental e dos estados excitados singletos e tripletos de uma molécula.

No diagrama, os níveis de energia eletrônicos moleculares estão representados por linhas horizontais separadas verticalmente pela diferença de energia entre eles. A cada nível eletrônico, estão associados níveis vibracionais (menores) e rotacionais (não mostrados), de maneira que os estados eletrônicos (n) e vibracionais (v) da molécula sejam indicados pelos índices subscritos como S_{nv} ou T_{nv} ($n = 0, 1, 2, 3, \dots; v = 0, 1, 2, 3, \dots$).

Conforme a distribuição estatística de Boltzmann, em temperatura ambiente a grande maioria das moléculas em solução líquida encontram-se no menor nível de energia vibracional possível, o estado S_{00} .

Após a absorção de energia a molécula encontra-se em um estado com excesso de energia, que ela perde através de processos radiativos ou não radiativos. Os radiativos consistem na relaxação por emissão de fóton e são denominados de fluorescência, quando envolve transições sem mudança de spin, tipo de $S_{10} \rightarrow S_{0v}$, e fosforescência quando o spin da molécula

muda na transição, tipo $T_{10} \rightarrow S_{0v}$ ou $S_{10} \rightarrow T_{0v}$.

Os processos não radiativos que ocorrem entre estados eletrônicos de mesmo spin, $S_n \rightarrow S_m$ ou $T_n \rightarrow T_m$ ($n > m$), são chamados de conversão interna (CI) e são caracterizados pela taxa k_{ci} . Aqueles que ocorrem entre os estados de spin diferente, $S_n \rightarrow T_m$, são denominados de cruzamento intersistemas (CIS) e são caracterizados pela taxa k_{cis} .

Transições entre estados de diferente multiplicidade de spin são transições tipicamente proibidas pela regra de seleção de spin, resultando em $k_{ci} \gg k_{cis}$. Ambos os processos não radiativos ocorrem de forma isoenergética entre os estados vibracionais. No diagrama de Jablonsky são usualmente representados por setas horizontais (figura 4.1).

Em um estado eletrônico excitado qualquer, tanto S_{nv} como T_{nv} pode haver a perda de energia por relaxação vibracional com tempos característicos extremamente rápidos, da ordem de femtossegundos à picossegundos, até atingir um meta-estado, usualmente S_{10} ou T_{10} . O processo de relaxação vibracional é ilustrado como uma seta vertical apontando para baixo. Nesse processo a energia de excitação da molécula é convertida em calor.

Numa molécula orgânica típica, temos os estados S_{10} ou T_{10} como estados meta-estáveis, alcinha devido ao tempo prolongado de vida destes, valendo salientar que o estado tripleto possui tempo muito mais longo que o singleto por conta de que é necessária uma conversão de spin para o elétron retornar ao estado singleto fundamental. Num desses estados meta-estáveis pode acontecer: a molécula perder energia radiativamente com emissão de um fóton e retornar ao estado fundamental; sofrer uma conversão interna de $S_{10} \rightarrow S_{0v}$; ou um cruzamento intersistemas $S_{10} \rightarrow T_{1v}$. Do estado T_{1v} a molécula sofre o processo de relaxação vibracional de $T_{1v} \rightarrow T_{10}$, cruzamento intersistemas de $T_{10} \rightarrow S_{0v}$. Nesse novo estado, após o processo de relaxação vibracional, a molécula retorna para seu estado fundamental S_{00} .

A relaxação do estado excitado S_{10} pode ser descrita pela soma das taxas da emissão de fóton da fluorescência (k_{rfl}), interconversão (k_{ci}) e cruzamento intersistema do estado S_1 para estado T_1 (k_{cis}):

$$\frac{dn_{S_1}}{dt} = -(k_{rfl} + k_{ci} + k_{cis})n_{S_1} = -k_{S_1}n_{S_1} = -\frac{n_{S_1}}{\tau_{S_1}} \quad (4.4)$$

sendo n_{S_1} o número de partículas excitadas em um dado instante de tempo t após a excitação;

$\tau_{S_1} = \frac{1}{k_{rfl} + k_{ci} + k_{cis}}$ é o tempo de vida do estado S_{10} . Sabendo que $n_{S_1}(t) = n_{S_1}^0$, em $t = 0$, a integração da equação 4.4 resulta em:

$$n_{S_1}(t) = n_{S_1}^0 e^{-t/\tau_{S_1}} \quad (4.5)$$

De maneira análoga, podemos escrever para o estado tripleto:

$$n_{T_1}(t) = n_{T_1}^0 e^{-t/\tau_{T_1}} \quad (4.6)$$

em que $\tau_{T_1} = \frac{1}{k_{rff} + k_{cis}}$ é o tempo de vida do estado T_1 , k_{rff} é da taxa da emissão de fóton da fosforescência e k_{cis} é a taxa de cruzamento intersistema do estado T_1 para estado S_0 .

Devido ao fator de restrição de spin, os valores típicos do τ_{T_1} para moléculas orgânicas em sistemas líquidos são da ordem de micro- a milissegundos. No caso de τ_{S_1} , os tempos são tipicamente da ordem de nanossegundos.

No caso do decaimento radiativo da molécula, podemos atribuir uma eficiência a este processo de emissão de fluorescência, também denominado por rendimento quântico da fluorescência (ϕ_{fl}). O rendimento quântico da fluorescência é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos pelo material. Uma vez considerados os processos não radiativos que competem com a fluorescência, podem ser definidos como a fração que representa a relaxação através da fluorescência:

$$\phi_{fl} = \frac{k_{rfl}}{k_{rfl} + k_{ci} + k_{cis}} \quad (4.7)$$

Também podemos definir ϕ_{fl} da seguinte maneira:

$$\phi_{fl} = \frac{\tau_{S_1}}{\tau_{rfl}} \quad (4.8)$$

em que $1/\tau_{rfl} = k_{rfl}$ é a taxa de decaimento do estado S_1 pelo processo de fluorescência (taxa radiativa). Outra maneira ainda de definir ϕ_{fl} , pode ser utilizando a intensidade total da fluorescência emitida I_{fl} , isto é, a integral do espectro de fluorescência e a intensidade de luz absorvida $I_{abs}(\lambda_{ex})$ pela amostra no comprimento de onda de excitação:

$$\phi_{fl} = \frac{I_{fl}}{I_{abs}(\lambda_{ex})} \quad (4.9)$$

A eficiência da formação do estado tripleto T_1 é a razão entre a taxa de cruzamento intersistemas entre estados S_1 e T_1 pela soma de todas as taxas de todos os processos que despovoam o estado metaestável T_1 :

$$\phi_T = \frac{k_{cis}}{k_{rfl} + k_{ci} + k_{cis}} = \frac{\tau_{S_1}}{\tau_{cis}} \quad (4.10)$$

Os valores de ε dependem da natureza da transição envolvida. Os ε típicos de transições entre os estados eletrônicos que possuem a mesma multiplicidade de spin $S_m \rightarrow S_n$ ou $T_m \rightarrow T_n$ ($m > n$) são da ordem de 10^4 - 10^5 M⁻¹cm⁻¹. Enquanto que transições entre os estados de spins

diferentes possuem valores característicos de ε de aproximadamente 10^{-3} - $10^{-6} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Existe uma relação entre τ_{S_1} e a intensidade de absorção, que pode ser apresentada de diferentes formas. Uma delas, bastante usual e prática é:

$$\frac{1}{\tau_{S_1}} = 2900n^2\nu_0^2 \int \varepsilon_t d\nu \quad (4.11)$$

sendo n o índice de refração do meio; ν_0 a posição do máximo da banda de absorção e ε_t o coeficiente de absorção molar de transição. A integral $\int \varepsilon_t d\nu$, corresponde a integral da banda de absorção. Sendo assim, para determinar o valor τ_{S_1} necessitamos ainda definir o valor da integral. Existe ainda uma forma mais simplificada e ainda menos exata para encontrar τ_{S_1} :

$$\frac{1}{\tau_{S_1}} \approx 10^4 \varepsilon_{max} \quad (4.12)$$

onde ε_{max} é o coeficiente de absorção molar no máximo de absorção.

4.1.3 Supressão dos estados excitados

A energia de excitação de uma molécula pode ser perdida devido à interação com outras moléculas, esta última chamamos de supressor. Os processos de supressão podem ocorrer por transferência de energia para o supressor, como mecanismos de Förster ou de Dexter, assim como podem ocorrer pelo aumento das taxas de decaimento não-radiativos estimulados pelo supressor, tal como acontece no caso da supressão paramagnética por íons de metais ou devido um reação entre a molécula do fluorôforo e a do supressor.

4.1.3.1 Supressão de longo alcance.

O mecanismo de transferência de energia ocorre em apenas uma etapa, podendo ser descrito como:

sendo D^* a molécula doadora de energia e presente num estado excitado, A_c a molécula aceitadora ou supressora no estado fundamental.

Alguns exemplos dos processos de transferência de energia por interação eletromagnética entre os elétrons do doador e aceitador, representados pelo primeiro termo da equação 4.13, são a transferência de energia por ressonância (*Resonance Energy Transfer*) ou transferência por mecanismo de Förster (*FRET-Förster Resonance Energy Transfer*). O mecanismo de FRET é bastante importante, podendo ser estimado segundo a equação:

$$K_f = \frac{9000k^2\phi_{fl}^2}{128\pi^5n^4Nr^6\tau_{s_1}} \int_0^\infty \frac{F_D(v)\varepsilon_a(v)}{v^4} dv \quad (4.14)$$

em que k é um coeficiente de orientação relativa entre o doador e o aceitador; ϕ é o rendimento quântico da fluorescência do doador na ausência de aceitador; n é o índice de refração relativo; N é o número de Avogadro; r é a distância entre o doador e o aceitador; τ_{s_1} é o tempo de vida do estado excitado do doador na ausência do aceitador; v é a frequência; F_D é a intensidade de fluorescência do doador normalizado; e $\varepsilon_a(v)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador para a frequência específica.

A transferência de energia por FRET é um processo puramente quântico, sem a emissão do fóton do doador e consequente captação pelo receptor, todavia, de forma simples podemos dizer que a integral que caracteriza a probabilidade desse processo corresponde a sobreposição dos espectros de emissão do doador com o de absorção do receptor.

O mecanismo de FRET é baseado em interações dipolo-dipolo entre os dipolos de transição do doador e do aceitador. Podemos averiguar pela equação 4.14 que a eficiência da transferência de energia cai com r elevado a sexta potência, exigindo uma proximidade entre o aceitador e doador não maior que 100 Å [38,39], sendo que opera de forma bem mais eficiente a distância menores que 50 Å. Ele é chamado de mecanismo de transferência de longa distância ou de longo alcance, pois não exige o contato entre o doador e o aceitador e é bastante efetivo nas distâncias maiores do que as dimensões das moléculas. O mecanismo de Förster é dominante para transições permitidas do tipo $S_1 \rightarrow S_0$ do doador em paralelo com a transição $S_0 \rightarrow S_1$ do aceitador.

4.1.3.2 Supressão de curto alcance.

O mecanismo de transferência por Dexter, também conhecido por transferência de energia à curta distância ou curto alcance, é efetivo a distâncias até 5 ou 6 Å [40], quando passa a valer o mecanismo de Förster. O mecanismo de Dexter consiste na troca de um elétron excitado de molécula de doador para um elétron da molécula do aceitador do seu estado fundamental. Sendo necessário a sobreposição das nuvens eletrônicas do doador com a do aceitador, isto é, quando o doador e o aceitador colidem ou estão acoplados.

Podemos definir a taxa de transferência de energia por Dexter como:

$$K_D = \frac{2\pi}{\hbar} e^{-\frac{2r}{L'}} \int_0^\infty E_D(v) \varepsilon_{na}(v) dv \quad (4.15)$$

em que L' é uma constante de proporcionalidade a soma dos raios de van der Waals do doador

e do aceitador; $E_D(\nu)$ e $\varepsilon_{na}(\nu)$ são o espectro da emissão de doador integrado e o coeficiente de absorção molar normalizado do aceitador, respectivamente.

Contudo, processos de transferência de energia entre estados tripleto, em que envolve transições “não permitidas”, o processo de Dexter passa a ser dominante. Podendo tais transferências entre tripleto ser descritos como:

É importante ressaltar que o oxigênio molecular é uma das poucas moléculas com estado fundamental tripleto, a transferência de energia do estado tripleto de fotossensibilizador para o oxigênio molecular constituindo uma das bases para a terapia fotodinâmica.

4.1.3.3 Supressão dinâmica ou colisional

A supressão da fluorescência pode acontecer pela colisão do fluoróforo com o supressor. Dito de outra forma, numa solução líquida os fluoróforos e os supressores estão difundindo segundo um movimento browniano. Uma vez no estado excitado, o fluoróforo pode colidir com uma outra molécula capaz de retirar sua energia de excitação, atuando como um supressor. Esse tipo de supressão se chama “supressão dinâmica”.

A supressão dinâmica é mais uma via não-radiativa para a perda da energia, consequentemente reduzindo a eficiência da emissão da fluorescência. Um dos exemplos típicos de supressor colisional é o O_2 , todavia há uma ampla gama de moléculas que podem atuar como supressor colisional.

O desenvolvimento de uma teoria geral de supressão dinâmica da fluorescência iniciou-se com o trabalho pioneiro de Weber e Lakowicz [41].

Na presença de um supressor a equação (4.7) deve ser reescrita da forma:

$$\frac{dn_{S_1}}{dt} = -(k_{rfl} + k_{ci} + k_{cisT} + k_d[Q])n_{S_1} = -(k_{S_1_0} + k_d[Q])n_{S_1} \quad (4.17)$$

em que k_d é uma constante bimolecular da supressão dinâmica do estado S_1 ou da fluorescência, $[Q]$ é a concentração de supressor e $k_{S_1_0}$ é o constante de decaimento do estado S_1 na ausência de supressor.

Nesse caso o rendimento quântico da fluorescência deve ser reescrito como:

$$\varphi'_{fl} = \frac{I'_{fl}}{I_{abs}(\lambda)} = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_{cis} + k_d[Q]} \quad (4.18)$$

em que φ'_{fl} e I'_{fl} são o rendimento quântico e a intensidade de fluorescência na presença de supressor.

Combinando as equações, 4.9 e 4.18, obtemos:

$$\frac{\varphi_{fl}}{\varphi'_{fl}} = \frac{I_{fl}}{I'_{fl}} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (4.19)$$

esta é a conhecida equação de Stern-Volmer. Aqui a constante de Stern-Volmer é $K_{SV} = \tau_{s_1} k_d$ onde τ_{s_1} é o tempo de vida do estado S_1 na ausência de supressor.

O termo k_d descreve a eficiência do processo de supressão, válido somente nos casos em que cada colisão do fluoróforo excitado com o supressor induz a supressão. Para os casos quando cada colisão não provoca necessariamente a supressão, temos que introduzir um coeficiente da acessibilidade do fluoróforo para o supressor (f_q) e uma constante bimolecular modificada:

$$k_d' = f_q k_d \quad (4.20)$$

O termo f_q é um número real positivo, que geralmente é menor do que 1. Entretanto, f_q pode ser maior do que 1 nos casos em um único supressor atua em mais de um fluoróforo simultaneamente [42].

k_d pode ser definido a partir da seguinte equação:

$$k_d = 4\pi a D' N' \quad (4.21)$$

em que D' é a soma da difusão do fluoróforo e do supressor. a é a soma do raio molecular, N' é o número de moléculas por mM [41].

A constante máxima de supressão dinâmica k_{dmax} , limitada pela difusão, pode ser definida como:

$$k_{dmax} = \frac{4\pi N}{1000} (r_f + r_q) (D_f + D_q) \quad (4.22)$$

em que N é o número de avogadro: r_f e r_q são os raios do fluoróforo e do supressor, respectivamente; D_f e D_q são os respectivos coeficientes de difusão do fluoróforo e do supressor.

A supressão dinâmica requer contato entre o supressor e o fluoróforo no estado excitado, possuindo uma dependência da concentração e da difusão. Fatores que modificam a difusão, por exemplo, a temperatura, impactará a eficiência desse processo. A supressão dinâmica reduz o rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência.

A teoria apresentada de supressão da fluorescência também é válida para a supressão do estado excitado tripleto T_1 (fosforescência).

4.1.3.4 Supressão estática.

A supressão estática é o resultado da formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor. Na supressão dinâmica o fluoróforo no estado excitado necessita encontrar o supressor, na supressão estática o supressor e o fluoróforo formam um complexo já no estado

fundamental, isto é, mesmo antes da excitação ocorrer. O complexo formado não apresenta fluorescência e tem propriedades ópticas distintas do que o fluoróforo, tais como o espectro de absorção próprio.

O supressor e o fluoróforo podem ser o mesmo tipo de molécula, como no caso da agregação dos FSs, que formam um complexo. O aumento da temperatura pode dificultar a formação de agregados.

Podemos definir a taxa de formação de um complexo supressor-agregado, ou constante de equilíbrio de formação do complexo, como:

$$k_s = \frac{[FS+Q]}{[FS][Q]} \quad (4.23)$$

em que $[FS]$ é concentração do FS; $[Q]$ a concentração do supressor e $[FS+Q]$ a concentração do complexo formado entre ambos. Entretanto, a concentração total de FS, $[FS]_0$, é fixa, e obedece a relação:

$$[FS]_0 = [FS] + [FS + Q] \quad (4.24)$$

assim podemos escrever a equação 4.23 como:

$$k_s = \frac{[FS]_0 - [FS]}{[FS][Q]} = \frac{[FS]_0}{[FS][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (4.25)$$

resultando em:

$$\frac{[FS]_0}{[FS]} = 1 + k_s[Q] \quad (4.26)$$

Caso assumamos que toda a supressão da intensidade fluorescência seja decorrente do processo de supressão estática, obtemos:

$$\frac{I_{fl_0}}{I_{fl}} = 1 + k_s[Q] \quad (4.27)$$

em que I_{fl_0} e I_{fl} são as respectivas intensidades de fluorescência na presença e na ausência de supressor.

A equação 4.27 para o processo estático é similar à equação de Stern-Volmer para o processo de supressão dinâmico (4.19). Ambas as supressões estáticas e dinâmicas diminuem a intensidade de fluorescência, mas se distinguem nas análises de fluorescência resolvida no tempo. O processo de supressão dinâmica reduz o tempo de vida da fluorescência (τ), enquanto que a supressão estática deixa-o inalterado, reduzindo apenas a amplitude da curva de decaimento da fluorescência.

Alternativamente, outros meios podem ser utilizados para distinguir ambos os processos, como analisar a supressão sob diferentes temperaturas. A temperatura tem efeito distinto sob cada um das supressões, dinâmica e estática. Com o aumento de temperatura,

aumenta-se os coeficientes de difusão e, portanto, aumentam também as taxas de supressão dinâmica. Em contraste, com o aumento da temperatura o complexo formado entre supressor e FS tende a ficar mais instável, e, por conseguinte, a supressão estática tende a ser menos eficiente.

Em alguns casos, a supressão é resultante de uma combinação de estático e dinâmico, resultando numa equação de Stern-Volmer combinada:

$$\frac{I_{fl_0}}{I_{fl}} = (1 + k_d[Q])(1 + k_s[Q]) = 1 + (k_d + k_s)[Q] + (k_d k_s)[Q]^2 \quad (4.28)$$

Figura 4.2. Curvas de Stern-Volmer para as supressões dinâmicas e estática. As setas indicam o movimento da curva com o aumento da temperatura. Modificado de [43].

4.2 Agregação

A palavra “agregado” deriva do latim *aggregare* e significa reunido, junto, aglomerado, com alguns outros significados específicos dependendo do caso. Em nosso caso, o fenômeno da agregação é a junção de partículas ou moléculas, formando um aglomerado sem se ligar quimicamente.

A formação de agregados é um processo comum para os compostos como o sistema de conjugação π . A agregação de um composto só ocorre quanto a energia de coesão entre suas moléculas constituintes do agregado é maior do que a energia da interação do seus monômeros com ambiente, dito de outra forma, termodinamicamente o agregado deve ser estável [44].

Os agregados são caracterizados pela sua estrutura espacial e pelo número de agregação. Pode haver diferentes graus de agregação e dependendo do número de partículas que formam o agregado recebe-se nomes específicos: dímero, trímero,..., oligômero. Pode haver agregados constituídos de moléculas do mesmo composto, dito homogêneo, ou por diferentes compostos, que são conhecidos como mistos.

O agregado não se mantém coeso pela formação de ligações químicas (existem exceções como o μ -oxo-dímeros), mas por outros mecanismos, que são:

- A interação eletrostática - um fator essencial, podendo atuar a favor

ou contra a formação de agregados.

- Formação de ligação de hidrogênio.
- Formação de complexos tipo $\pi - \pi$.
- Interação hidrofóbica.

A modulação dessas interações de alguma maneira pode influenciar a probabilidade de formação do agregado e/ou suas características, tais como o seu número de agregação e sua estrutura espacial. Como exemplo de alteração do meio temos a força iônica, o pH, a adição na solução de sistemas nanoorganizados como micelas, membranas celulares, biopolímeros (DNA, proteína) etc.

O agregado possui características distintas do que a sua forma monomérica: alterações nos espectros de absorção e fluorescência, isto é, a agregação altera as características energéticas do composto; diminuição do tempo de fluorescência e consequentemente do rendimento quântico, pois dentro do agregado aumenta-se a probabilidade de perdas não-radiativas da energia; mudanças na anisotropia, tempo de difusão, etc. Tais fatores são essenciais para as aplicações do composto.

4.2.1 Interações responsáveis pela formação dos agregados

i. A interação eletrostática

A energia eletrostática da interação de duas moléculas carregadas é:

$$W_q = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad (4.29)$$

em que Q é a carga do monômero, ϵ_d é a constante dielétrica do meio e r é a distância entre os monômeros. Esta interação entre as moléculas com cargas iguais sempre é repulsiva e diminui a probabilidade da agregação. A presença de íons de sais em solução pode “blindar” as partículas carregadas diminuindo a repulsão entre elas e, consequentemente, facilitando o processo de agregação.

Quando os monômeros possuem os momentos de dipolos permanentes a força entre eles depende da orientação relativa dos monômeros. Para os monômeros livres a força resultante é atrativa. A energia dessa interação, chamada de energia de Keesom, é:

$$W_k = \frac{U^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 k_B T r^6} \quad (4.30)$$

em que U é o momento de dipolo do monômero, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin.

Além dessas interações, entre duas moléculas ou dois átomos sempre existe uma força atrativa conhecida como “força de London” ou “força de dispersão”. A origem dessa força é a interação entre os dois dipolos, que cada partícula induz uma na outra. A expressão para esta energia de dispersão de London é:

$$W_L = -\left(\frac{3}{4}\right) \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (4.31)$$

em que h é a constante de Planck, ν é a frequência de absorção eletrônica e α é polarizabilidade elétrica da molécula.

Entre essas três interações, a repulsiva é de longo alcance, pois é proporcional à $1/r^2$. Os dois atrativos, que são proporcionais à $1/r^6$, são mais eficientes em distâncias curtas.

Além disso, nas distâncias muito curtas entre as moléculas, mais uma interação repulsiva se manifesta, devido, principalmente, à repulsão eletrostática entre os núcleos de átomos que compõem as moléculas. Essa interação repulsiva é proporcional a $1/r^{12}$.

A energia potencial da interação total pode ser apresentada pelo potencial de Lennard - Jones mais a energia da repulsão eletrostática (figura 4.3)

Figura 4.3. Curvas de energia potencial para interação entre partículas [8].

Dessa forma, para que se forme o agregado e se atinja o mínimo da energia potencial, os monômeros das moléculas carregadas devem ultrapassar uma barreira de potencial, que existe devido à repulsão eletrostática.

ii. Pontes de hidrogênio

As pontes de hidrogênio não são uma ligação química, mas uma interação que se forma

entre átomos eletronegativos de uma molécula e átomos de hidrogênios de outra. Para ser realizada os monômeros devem se aproximar para que as nuvens de elétrons dos átomos que estão interagindo entre si comecem a sobrepor-se. Essa interação é eficiente em distâncias curtas e pode produzir um poço de energia mais profundo, favorecendo a estabilização do agregado.

iii. Formação de complexos tipo $\pi - \pi$

As moléculas com sistemas desenvolvidos de conjugação π são capazes de formar os complexos através da sobreposição de suas nuvens de elétrons π (figura 4.4).

Figura 4.4. Sobreposição das nuvens de elétrons π durante agregação de duas moléculas na ausência (a) e na presença de íons de sal (b), positivos ou negativos [8].

Como no caso das ligações de hidrogênio, esse tipo de ligação é apenas eficiente em distâncias curtas.

iv. Interação hidrofóbica

Moléculas hidrofóbicas interagem fracamente com as moléculas de água. Em solução aquosa, elas quebram as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água, destruindo sua estrutura e consequentemente aumentando a energia livre da solução. Para abaixar a energia do sistema, tais moléculas hidrofóbicas são empurradas umas contra as outras, formando agregados e diminuindo assim a área superficial em que interagem com as moléculas de água diminuindo o número das ligações de hidrogênio quebradas e, consequentemente, diminuindo a energia livre do sistema. Isso é a descrição simplificada do efeito hidrofóbico.

Existe também o caso dos tensoativos (ou anfifílicos), que possuem na sua estrutura as duas partes: cauda apolar (hidrofóbica) e cabeça polar (hidrofílica). No caso dos tensoativos, as moléculas de água além de provocarem a formação dos agregados têm mais um caminho para diminuir a energia do sistema, formando ligações com a cabeça polar dos tensoativos,

levando-se a formação de um agregado cuja parte hidrofóbica está isolada da água pela parte hidrofílica, ou empurrar a parte hidrofóbica do tensoativo para a superfície do líquido, diminuindo assim a tensão superficial da solução aquosa (figura 4.5).

Figura 4.5. Esquema da formação de micelas e da mudança da tensão superficial em função da concentração do tensoativo, abaixo e acima da C.M.C. [9].

Essa interação faz o papel principal na formação das membranas biológicas, micelas, vesículas, etc. Dependendo do tamanho, da carga e da hidrofobicidade das moléculas, essa interação pode ser considerada tanto de longo quanto de curto alcance.

4.2.2 Tipos de agregados

Na literatura são considerados dois tipos básicos de agregados de moléculas, H e J, outros tipos de agregados podem ser apresentados como uma composição desses dois básicos [44-47]:

- Tipo J (*edge-to-edge*)- Agregados com ângulo de 180° entre os monômeros, dispostos lado a lado.
- Tipo H (*face-to-face*)- Agregados com ângulos de 0° entre os monômeros, ou seja, são dispostos em pilha.

Figura 4.6. Geometria de agregados de tipos H, J e HJ.

A estabilidade do agregado depende da sobreposição das nuvens de elétrons dos

monômeros. Por isso os agregados H, que possuem maior possibilidade para essa sobreposição, deveriam ser mais estáveis. Contudo, vários fatores podem atrapalhar a formação de agregados do tipo H, favorecendo a formação dos agregados do tipo J ou mistos. A formação dos agregados do tipo J de diversos sistemas foi demonstrada experimentalmente e teoricamente [19,23,48-51].

4.2.3 Os níveis de energia e os espectros de absorção óptica de agregados

Tipicamente os agregados dos corantes ciânicos possuem características espectrais e dos estados excitados distintas da sua forma monomérica. Por exemplo, apenas a disposição geométrica do agregado pode exercer uma influência nos níveis de energia devido à mudança provocada no ambiente. Um dos fatores desta influência é a orientação relativa entre os dipolos das moléculas constituintes do agregado [44], cuja interação pode ser de deslocar o espectro de absorção do agregado em relação ao monômero para comprimentos maiores (Agregados do tipo J) ou menores (Agregados do tipo H) dependendo da disposição espacial.

A explicação simplificada do deslocamento espectral pela geometria do agregado é de que para os agregados do tipo J, cujo ângulo entre os cromóforos é de 180° , os dipolos induzidos orientam-se de tal forma, que o pólo positivo de um deles fica próximo do pólo negativo do outro (figura 4.7a), diminuindo a energia de transição e deslocando a banda de absorção para comprimentos de onda maiores (efeito conhecido como *red shift*). Para os agregados do tipo H, que possuem ângulo de 0° , a onda eletromagnética induz dois dipolos paralelos, com cargas semelhantes próximas (figura 4.7b), por repulsão eletromagnética há o aumento da energia de transição, resultando num deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda menores (*blue shift*).

Figura 4.7. Diagrama das energias dos dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição. (a) Agregados J; (b) Agregados H; (c) Agregados mistos. As setas pequenas indicam a orientação do momento de dipolo, já as setas grandes representam as transições de maior e menor probabilidade, respectivamente, as contínuas e as tracejadas. Modificado de [44].

As energias dos dímeros podem ser encontradas a partir da equação de Schrödinger com a seguinte Hamiltoniana:

$$H_d = H_1 + H_2 + V_d \quad (4.32)$$

em que H_1 e H_2 são os Hamiltonianas dos monômeros livres, e V_d é um operador, que descreve a interação dipolo-dipolo.

$$V_d = \frac{(U_1 * U_2)}{r_{12}^3} - 3 \frac{(U_1 * r_{12})(r_{12} * U_2)}{r_{12}^5} \quad (4.33)$$

em que U_1 e U_2 são os operadores de momento de dipolo dos dois monômeros, chamados aqui de 1 e 2, respectivamente. r_{12} é a distância entre os centros dos dipolos.

Seguindo os critérios da mecânica quântica apenas duas funções de ondas satisfazem a equação de Schrödinger com esta Hamiltoniana em particular, dessa forma, as frequências de absorção e o momento de transição podem ser descritas como:

$$\nu_+ = \frac{1}{h}(V_{0a} + V_{12}) \quad (4.34a)$$

$$\nu_- = \frac{1}{h}(V_{0a} - V_{12}) \quad (4.34b)$$

e

$$D_{0a+} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \quad (4.35)$$

$$\sqrt{D_{0a}} = \langle \varphi_{10} | U_1 | \varphi_{1a} \rangle = \langle \varphi_{20} | U_2 | \varphi_{2a} \rangle \quad (4.36)$$

onde θ é o ângulo entre os dipolos de transição dos monômeros 1 e 2.

As intensidades relativas das bandas dos espectros de absorção dependem do ângulo entre os dipolos das moléculas, que formam os agregados, e podem ser calculadas pelas equações 4.32-4.36.

4.3 Surfactantes e micelas

Tensoativos, também chamados surfactantes ou anfifílicos, tratam-se de um neologismo, uma contração das palavras de língua inglesa “surface active agents”. Designam compostos que diminuem a tensão superficial na região interfásica: ar-água, óleo-água ou sólido-líquido.

Agentes tensoativos estão entre os produtos químicos mais versáteis [52], eles têm aplicações bem diversas que vão desde uso para produtos de limpeza, produtos de higiene pessoal [53], cosméticos [54] e produtos farmacêuticos (veículo, por exemplo) [55].

Uma aplicação importante dos tensoativos está relacionada à formação de estruturas organizadas, também conhecidas como micelas. Como já foi ressaltado, moléculas anfifílicas possuem na sua estrutura tanto uma região hidrofílica quanto uma região hidrofóbica. A parte hidrofóbica não possui momento de dipolo permanente, entretanto, a parte hidrofílica pode possuir um momento dipolo permanente ou ser facilmente polarizada. Dependendo se a cabeça polar do tensoativo possuir cargas ou não, são denominados de aniônicos (carga negativa), catiônicos (carga positiva), não-iônicos (neutro) e zwitteriônicos (a carga total é neutra, com a presença tanto de grupos negativos como de positivos) [56].

Em soluções aquosas, os tensoativos em baixas concentrações ficam na forma monomérica, e a partir de certa concentração micelar crítica (CMC) as regiões estruturais hidrofílicas e hidrofóbicas dinamicamente e espontaneamente associam-se formando grandes agregados moleculares de dimensões coloidais chamados de micelas [57,58].

A CMC depende de características intrínsecas tais como estrutura do tensoativo, tamanho da cadeia do hidrocarboneto, assim como de características do meio, como força iônica, pH, temperatura, ou presença de outros compostos que atuam reduzindo a força repulsiva dos grupos hidrofílicos das micelas [59]. Por exemplo, a formação das micelas aproxima os grupos hidrofílicos gerando uma repulsão eletrostática que se opõe ao processo de micelização, os íons de sais podem formar uma nuvem em torno da cabeça polar do tensoativo diminuindo a repulsão eletrostática entre suas moléculas e como resultado diminuindo a CMC [60].

As micelas são termodinamicamente estáveis e sob as mesmas condições apresentam as mesmas características, sendo assim facilmente reproduzíveis. Ainda que estáveis, as micelas não são estruturas estáticas, possuindo uma dinâmica de equilíbrio. Devido às suas estruturas únicas, micelas têm sido amplamente usadas em vasto leque de aplicações, que vão desde usos em indústrias, como em laboratórios para análise de compostos [61].

As micelas são uma classe de agregados e, da mesma forma que os agregados, são caracterizados pelas posições definidas das partículas constituintes, número de partículas e geometria.

Figura 4.8. Esquema de uma micela com íons e indicando três regiões distintas.

A estrutura das micelas possui três regiões distintas (figura 4.8):

(a) Região interna hidrofóbica, caracterizada por uma baixa constante dielétrica ϵ_0 de 2 a 4. Tal região está afastada da água e, por isso mesmo, iremos encontrar poucas moléculas de água nessa região.

(b) Região esférica superficial, também conhecida como camada de Stern, é a camada externa da micela formada pela parte polar do tensoativo e pelos contra-íons. Caracterizada por ϵ_0 de 5 a 18. Esta região é susceptível a formação de ligação de hidrogênio com a água.

(c) Camada de Gouy-Chapman, região compreendida entre a camada externa das micelas e o meio aquoso circundante. Caracterizada por um alto gradiente da constante dielétrica ϵ_0 de 18 a 81, cuja distância varia de acordo com a força iônica do meio, em torno de 10 a 100 Å (um angstrom= 10^{-10} m) [62].

Devido à presença dessas três regiões na sua estrutura, as micelas estão amplamente utilizadas como modelos simplificados da membrana celular, independentemente se possuem estrutura esférica diferente da estrutura de bicamada de fosfolípidos da membrana [63-65]. Além disso, foi demonstrado que a presença de regiões polares e hidrofóbicas na estrutura da micela permite utilizá-las no estudo de afinidade e localização de FS nas regiões de uma

membrana, caracterizada por diferentes constantes dielétricas [58]. O estudo dos FS com as micelas também serve como base para compreender as mudanças fotofísicas que ocorrem no FS devido às interações com a membrana celular.

A interação entre o FS e os surfactantes altera drasticamente a agregação de ambos, inclusive observamos a formação de agregados mistos AL-SDS, com uma cinética de formação e transformação de várias horas [66], que será detalhado no subcapítulo nº 7.3.

4.4 Objetos do estudo

4.4.1 Corantes ciânicos (CC)

Os corantes ciânicos (CC) designam uma família de compostos que possuem em sua estrutura uma cadeia polimetínea de conjugação π , atuando como grupo cromóforo com dois átomos de nitrogênio nas suas extremidades (figura 4.9).

Figura 4.9. Estrutura geral de um corante ciânico simétrico [44].

Variando-se o comprimento da cadeia de conjugação- π pode-se facilmente deslocar a posição do máximo do espectro de absorção óptica de CC [3,23,67]. Tal estrutura permite sintetizar CC que absorvem luz com alta efetividade na região espectral desejável, inclusive com comprimentos de onda maiores que 600 nm, ideal para utilização em Terapia Fotodinâmica (TFD) [68] na região chamada por janela fototerapêutica (compreendida entre 600 nm e 800 nm). Além disso, a estrutura linear dos CC e a presença de carga facilitam sua ligação com estruturas biológicas, tais como as membranas celulares, ácidos nucleicos e proteínas [4,22,23].

Os corantes ciânicos possuem diversas aplicações tais como marcadores de estruturas biológicas, sensibilizadores na TFD e em vários processos técnicos, como, por exemplo, fotografia ou nano-eletrônica [69], no desenvolvimento da técnica de lasers e nos limitadores da intensidade da radiação nas regiões UV e visível [70].

A presença do sistema de conjugação π determina a hidrofobicidade dos CC que aumenta sua afinidade para os sítios hidrofóbicos nas proteínas, no DNA e nas membranas celulares assim como sua tendência de agregar em meios aquosos.

O aumento do comprimento da cadeia de conjugação- π resulta numa maior flexibilização da estrutura do corante e uma maior probabilidade de ocorrer o processo de fotoisomerização da cadeia de conjugação- π . Ambos os processos afetam as características fotofísicas do corante, em particular, menores tempos de vida e rendimento quântico de seus estados excitados.

Devido à presença em sua estrutura de grupos laterais hidrofílicos, os CC são compostos parcialmente solúveis em água, demonstram propriedades anfifílicas e preservam a tendência de se agregar em solução aquosa, mesmo na forma iônica.

A estrutura dos CC permite que os elétrons se movam com certa liberdade dentro da cadeia de conjugação- π . Os CC possuem tipicamente uma alta absorção óptica, com um ε na faixa de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ na região do visível. Suas características espectrais podem ser descritas, com uma boa aproximação, utilizando o modelo de elétron livre preso numa caixa com paredes de potencial infinito [71]. Sendo assim, podemos quantizar as energias de transição entre estados:

$$\Delta E = \frac{h^2(N_e+1)}{8mL_c^2} \quad (4.37)$$

em que m é a massa do elétron; N_e é o número de elétrons- π da molécula; h é a constante de Planck e L_c é o comprimento da caixa de potencial infinito (cadeia de conjugação- π). A equação 4.37 também pode ser escrita em função do comprimento de onda λ .

$$\lambda = \frac{8mc'L_c^2}{h(N+1)} \quad (4.38)$$

sendo c' a velocidade da luz. Da equação 4.38, podemos notar que o comprimento de onda máximo de transição aumenta com o quadrado de L_c , isto é, a energia de transição é inversamente proporcional ao quadrado do tamanho da cadeia de conjugação, o cromóforo. Sendo esse o princípio que permite deslocar o máximo de absorção do FS para o comprimento desejado, como a janela fototerapêutica.

Os CC ao se ligarem a estruturas biológicas, como DNA, a membrana celular ou macromoléculas, tem um aumento de sua rigidez e, conseqüentemente, uma diminuição das taxas dos processos não radiativos e de fotoisomerização, um aumento dos rendimentos quânticos de fluorescência e de fosforescência, e dos tempos de vida dos estados excitados singletos e tripletos [23,67,72].

Investigamos as características espectrais de dois tipos de corantes ciânicos, Acridina Laranja e os corantes ciânicos com dois cromóforos (do termo inglês *biscyanines dyes*-BCD).

A AL foi um dos primeiros compostos a ser estudado para a terapia fotodinâmica [73]

sendo natural e acessível e ainda bastante utilizada em vários estudos. Possui uma estrutura planar e rígida sendo um bom candidato como modelo de CC.

Os BCDs se caracterizam por possuir dois grupos cromóforos separados por um anel central. Tal estrutura particular lhes conferem a possibilidade de ajustar seus espectros de absorção pela mudança do ângulo entre os grupos cromóforos e pelo aumento do comprimento da cadeia de conjugação- π [74,75].

4.4.1.1 Acridina Laranja (AL)

A Acridina Laranja (AL) é um corante catiônico da família das Acridinas. Esta família designa compostos orgânicos heterocíclicos com átomos de nitrogênio inclusos na sua estrutura.

A família da Acridinas tem uma longa história de aplicações na biologia e medicina. Por exemplo, Oscar Raab descobriu o fenômeno da fotossensibilidade e fez os primeiros estudos da fotoquimioterapia no início do século XX com Acridina Vermelha e Acridina Laranja. Existe uma vasta variedade de compostos sintéticos ou naturais da família das acridinas com conhecidas atividades terapêuticas e biológicas [76].

Derivados de Acridinas são utilizados para diversas enfermidades, desde câncer [77,78], Alzheimer [79], à infecções por protozoários [80,81] e bactérias [80,82-84]. Estudos recentes com AL carregadas à *exosomes* (vesículas oriundas de células) excitada em 466 nm demonstrou atividade contra câncer de pele do tipo melanoma [85], uma forma agressiva de câncer conhecidamente resistente à terapia fotodinâmica. Além das aplicações biológicas, as acridinas têm sido exploradas como dispositivos eletrônicos orgânicos e dispositivos híbridos orgânicos-inorgânicos [86], dispositivos de eletroluminescência [87,88] e diodos emissores de luz [89]. Especificamente, trabalhamos com a Acridina Laranja (AL).

Figura 4.10. Fórmula estrutural da Acridina Laranja.

O nome IUPAC da AL é *N,N,N',N'-Tetramethylacridine-3,6-diamine (Preferred IUPAC Name-PIN)*. Sua fórmula química é $C_{17}H_{19}N_3$, molécula com estrutura planar, possui um

sistema desenvolvido de conjugação π , parcialmente solúvel em água, peso molecular de 265 g. mol⁻¹, apresenta-se sólida à temperatura ambiente e ponto de ebulição de 469 °C a 760 mm Hg e ponto de fusão $\approx$ 107 °C [90].

A coloração fluorocromática de microrganismos utilizando Acridina Laranja foi descrita pela primeira vez por Strugger e Hilbrich em 1942 [91], desde então tem sido amplamente utilizada para esta finalidade. Em 1956, Bertalanffy, e Armstrong observaram que a AL pode ser utilizada como marcador para DNA e RNA [92,93]. Sendo amplamente utilizada na contagem bacteriológica de solos [94,95] e água [96], assim como do sangue para exames clínicos [97]. Como exemplo, podemos citar que coletando o escorrimento vaginal é possível utilizar a AL para a detecção do *Trichomonas vaginalis* (causador da tricomoníase) [98,99] e da *Gardnerella vaginalis* (causador da vaginose bacteriana) [100]. A detecção fluorocromática por AL é a técnica dominante na análise do bacilo da tuberculose, devido à sua velocidade, simplicidade e confiabilidade do método [101].

A AL é um dos típicos intercaladores na estrutura do DNA. Ao ser excitado através da luz pode induzir mutações na estrutura do DNA e até induzir o processo apoptótico. A AL possui propriedades que a tornam um composto antitumoral e fotossensibilizador aplicado na terapia fotodinâmica [17,102,103]. A AL possui carga líquida +1 para o pH entre 6,0 e 10,0. A AL é um composto cujas características são já bem conhecidas e estabelecidas na literatura [104-106].

4.4.1.2 Biscianina (BCD)

Os CC com dois cromóforos (BCD) são formados por dois cromóforos lineares separados por um heterociclo central. A estrutura do anel central determina o ângulo entre os cromóforos. Na figura 4.11 estão representados três BCDs com ângulos de 180°, 150° e 90°.

Figura 4.11. Estrutura molecular dos três corantes cianícos com dois cromóforos a serem estudados, respectivamente, com ângulos de 180° (A), 150° (B) e 90° (C) entre os cromóforos.

Em soluções aquosas os BCDs exibem uma intensa absorção óptica ($\epsilon=10^5$ M⁻¹cm⁻¹), fluorescência na região espectral entre 600 e 800 nm e um alto rendimento quântico do estado tripleto em soluções homogêneas [23,67]. A presença do nitrogênio em sua estrutura confere a

estes corantes uma carga efetiva positiva de +2 na região de pH entre 3 e 10, assim como a capacidade de formar ligações de hidrogênio com outras moléculas.

Mudando o ângulo entre os cromóforos é possível modificar o espectro de absorção dos BCDs. Em particular, os BCDs apresentam duas bandas de absorção na região do visível. As intensidades relativas dessas bandas depende do ângulo entre os cromóforos, sendo produto da interação entre estes via dois mecanismos, interação dipolo-dipolo e o tunelamento de elétron via anel central [67].

Podemos descrever o hamiltoniano da interação dipolo-dipolo, via mecanismo de Forster, como a soma dos hamiltonianos de cada cromóforo (H'_1 e H'_2) mais o potencial de interação dipolo-dipolo entre eles (V_{12}):

$$H_{BCD} = H'_1 + H'_2 + V_{12} \quad (4.39)$$

e

$$V_{12} = \frac{\mu_1 \mu_2}{R^3} - 3 \frac{(\mu_1 R_{12})(\mu_2 R_{21})}{R_{12}^5} \quad (4.40)$$

Podemos descrever as funções de onda das soluções da equação de Schroedinger para este sistema como o produto das funções de cada cromóforo no estado fundamental (Φ_{10} e Φ_{20}) e excitado (Φ_{1ex} e Φ_{2ex}):

$$\Psi_0 = \Phi_{10} \Phi_{20} \quad (4.41a)$$

$$\Psi_{1ex} = \Phi_{1ex} \Phi_{20} \quad (4.41b)$$

$$\Psi_{2ex} = \Phi_{10} \Phi_{2ex} \quad (4.41c)$$

Dadas as condições de simetria das funções de onda e as equações de auto estados e auto valores de energia desse sistema: $H_1|\phi_{1a}\rangle = E_a|\phi_{1a}\rangle$; $H_2|\phi_{2a}\rangle = E_a|\phi_{2a}\rangle$; $H_1|\phi_{10}\rangle = E_0|\phi_{10}\rangle$; e $H_2|\phi_{20}\rangle = E_0|\phi_{20}\rangle$, existem duas soluções:

$$\Psi_{E^+} = \frac{1}{\sqrt{2}}(\Psi_{1ex} + \Psi_{2ex}) \quad (4.42a)$$

$$\Psi_{E^-} = \frac{1}{\sqrt{2}}(\Psi_{1ex} - \Psi_{2ex}) \quad (4.42b)$$

$$E^+ = \langle \Psi_{E^+} | H_1 + H_2 + V_{12} | \Psi_{E^+} \rangle = E_{ex} + E_0 + V_{12} \quad (4.43a)$$

$$E^- = \langle \Psi_{E^-} | H_1 + H_2 + V_{12} | \Psi_{E^-} \rangle = E_{ex} + E_0 - V_{12} \quad (4.43b)$$

em que E^+ e E^- são as energias do primeiro estado excitado pela solução simétrica e do segundo estado excitado pela solução anti-simétrica, respectivamente; E_{ex} refere-se a energia do estado excitado de um cromóforo isolado.

Na situação em que não há interação entre os cromóforos, resulta em $V_{12} = 0$ e as energias dos estados são iguais, sendo estados degenerados.

Figura 4.12. Esquema dos níveis de energia para os BCDs, levando-se em conta as interações de tunelamento e dipolo-dipolo entre os cromóforos. 1-Simétrica e 2-Antisimétrica [107].

As energias do estado excitado devido ao efeito do tunelamento para as soluções simétricas e anti-simétricas podem ser calculada a partir de:

$$E_n^S = E_{n0} \left[1 - \frac{2c}{b-a} \left(\frac{1}{\sqrt{U_0}} + \frac{c}{aU_0} \right) \right] \quad (4.44a)$$

$$E_n^a = E_{n0} \left[1 - \frac{2c}{b-a} \left(\frac{1}{\sqrt{U_0}} - \frac{c}{aU_0} \right) \right] \quad (4.44b)$$

sendo que a e b correspondem a meia largura do cromóforo e do heterociclo central da molécula, respectivamente; U_0 é a altura da barreira potencial entre os cromóforos, E_{n0} corresponde a energia da molécula com um cromóforo isolado; E_n^S e E_n^a correspondem aos estados simétrico e anti-simétrico, respectivamente. A partir da figura 4.12 pode-se verificar que a energia da transição devido ao efeito do tunelamento para ambos os estados, simétrico e anti-simétrico, são menores do que a energia de transição para um cromóforo isolado.

O efeito conjunto da interação dipolo-dipolo e do tunelamento produz um desdobramento assimétrico dos níveis de energia, como demonstrado na figura 4.12. Devido a esse desdobramento o BCD possui duas bandas de absorção, uma deslocada para o azul e a outra para o vermelho, se comparado a uma molécula com apenas um cromóforo.

A probabilidade de transição do BCD depende da simetria espacial deste [23,67,108], assim, podemos escrever:

$$D_{0a\pm} = |\langle \Psi_0 | \mu_1 + \mu_2 | \Psi_{A\pm} \rangle|^2 = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \quad (4.45)$$

em que θ é o ângulo entre os cromóforos.

Podemos averiguar pela equação 4.45 que para um ângulo nulo temos apenas a banda de menor comprimento de onda. Para o ângulo de 180° , temos apenas a presença da banda de maior comprimento de onda. Quando o ângulo entre os cromóforos é de 90° , temos a presença das duas bandas, com intensidades similares.

A explicação qualitativa para esse efeito é de que, para o caso em que ângulo é igual a 0° , a onda eletromagnética incidente induz dipolos com o mesmo sentido nos dois cromóforos, que acabam indo contra a onda eletromagnética, necessitando de uma maior energia, ou seja, temos a presença apenas do menor comprimento de onda. Para o caso do ângulo de 180° entre os cromóforos, com a onda eletromagnética incidente cada um dos dois dipolos induzidos tem uma orientação diferente, resultando no polo negativo de um cromóforo alinhado com o polo positivo do outro, diminuindo a energia necessária para a transição e provocando um deslocamento da banda de absorção para maiores comprimento de onda.

Quando a onda eletromagnética incide no BCD com ângulo de 90° , o aparecimento de uma banda de maior comprimento de onda ou de menor dependerá da orientação relativa entre a onda eletromagnética e o BCD. Assumindo que em solução aquosa temos uma distribuição radial homogênea (sem uma preferência de orientação), teremos a presença das duas bandas com intensidades similares [23,67,108].

É possível determinar o ângulo entre os cromóforos do BCD pela análise dos espectros de absorção. Devido às interações do BCD com o meio esse ângulo pode mudar, por exemplo, devido a interação e presença de outras moléculas, membrana celular, proteínas, íons, assim como devido a outros efeitos: agregação, mudança de pH, etc. A mudança do ângulo entre os cromóforos é um indicativo de que o BCD está interagindo, permitindo adquirir informações sobre esta interação. O cálculo do ângulo segue a formula:

$$\cos(\theta) = \frac{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2} - 1}{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2} + 1} \quad (4.46)$$

em que λ_1 e λ_2 referem-se aos comprimentos de onda dos picos do espectro de absorção do BCD da primeira e da segunda banda, respectivamente; ε_1 e ε_2 são os coeficientes de absorção molar dos máximos das respectivas bandas [67].

Os BCDs possuem alta afinidade por biomacromoléculas e membranas celulares [23], bem como alta fotocitotoxicidade contra células cancerígenas [109].

4.4.2 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

O dodecil sulfato de sódio (em inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*, SDS) também conhecido por *Lauril Sulfato de Sódio* é um agente tensoativo aniônico.

A fórmula molecular do SDS (figura 4.13) é $C_{12}H_{25}NaO_4S$ e seu peso molecular é de 288,4 g/mol [110]. O SDS possui carga negativa de -1. Em solução em temperatura ambiente e na ausência de íons possui sua CMC ≈ 10 mM e número de agregação ≈ 62 [111].

Figura 4.13. Estrutura molecular do SDS.

O SDS é um conhecido anti-microbica e anti-virótico [112], e emulsificante de gordura [113]. Em alta concentração ele pode destruir a membrana celular, nesse processo o SDS isola as proteínas da membrana permitindo que estas sejam analisadas ou utilizadas na reconstituição de sistemas definidos de lisossomas [114-116].

Devido à forte repulsão eletrostática entre as cabeças polares e a curta cadeia hidrofóbica as micelas de SDS são bem flexíveis e permitem as moléculas de água penetrar na sua estrutura até a região hidrofóbica [62].

4.4.3 Ácido Desoxirribonucleico (DNA)

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é o responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética. Podemos atribuir o começo da pesquisa científica do DNA em 1944 com Avery, MacLeod e McCarty mostrando que o DNA é o material hereditário [117-119]. Dez anos após, Watson e Crick decifraram sua estrutura [120], sendo agraciados com o prêmio Nobel de Medicina em 1962.

A molécula de DNA consiste em duas cadeias de nucleotídeos dispostas num formato de dupla-hélice em torno de um eixo. As moléculas de DNA são formadas por constituintes menores, sendo estes formados por uma base nitrogenada, um açúcar desoxirribose e um grupamento fosfato. As bases nitrogenadas se dividem em guanina (G), adenina (A), citosina (C) e timina (T).

Figura 4.14. Esquema básico do DNA, do artigo de Watson e Crick de 1953 (A) e (B) [120]. Nucleotídeo do DNA (C).

A capacidade do DNA em ligar alguns tipos de compostos químicos na sua superfície ou através da intercalação dentro de sua estrutura é bem conhecida [121-123], assim como a alta afinidade de compostos catiônicos para as moléculas do DNA, como é o caso da AL. O DNA é um dos principais alvos da terapia fotodinâmica.

A superfície do DNA é composta por duas regiões distintas, que se diferenciam pela sua geometria, denominadas de sulco maior e sulco menor, que formam uma cavidade menor e outra maior, como indicado pelo respectivo nome [124,125].

Figura 4.15. Estrutura esquemática da molécula de DNA com os sulcos maiores e menores indicados.

A interação de compostos com o DNA depende de sua hidrofobicidade, de sua carga e de sua estrutura espacial (tamanho e geometria).

Os grupos fosfóricos do DNA são carregados negativamente, o que permite que compostos hidrofóbicos ou anfifílicos, de tamanho adequado, possam se intercalar entre as bases nitrogenadas no DNA, tais como a AL [68], por exemplo. Moléculas com carga positiva podem se ligar através da interação eletrostática na superfície da molécula de DNA. Estudos

mostram que a eletronegatividade das regiões na superfície do DNA, em solução aquosa, diminui conforme a seguinte ordem: G-C (sulco maior) >> A-T (sulco menor) >> G-C (sulco menor) >> A-T (sulco maior) [126]. Por isso, os compostos carregados ligam-se preferencialmente nos sítios da G-C (sulco maior) e A-T (sulco menor) [127].

Pela sua maior hidrofobicidade, a G-C (sulco maior) tem preferência para ligação de compostos com conjugação π , mas por razões estéricas, esse sítio pode ser menos acessível para grandes moléculas, quando comparado com a A-T (sulco menor).

5 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

As técnicas espectroscópicas baseiam-se nas interações que existem entre a radiação eletromagnética e a matéria, sendo os métodos laboratoriais mais comuns para caracterizar sistemas complexos.

Nesse trabalho utilizamos as técnicas de espectroscopia de fluorescência e de absorção óptica, ambas em modo contínuo e com a resolução temporal, espalhamento dinâmico da luz e espalhamento ressonante da luz. Segue uma breve descrição das técnicas e seus princípios.

5.1 Espectroscopia de absorção óptica de modo contínuo

Quando a luz passa por um meio transparente ela pode ser absorvida, refletida, espalhada e transmitida.

$$I_0 = I_{abs.} + I_r + I_{esp} + I_{tr} \quad (5.1)$$

em que I_0 é a intensidade da luz incidente, $I_{abs.}$, I_r , I_{esp} e I_{tr} são as intensidades absorvida, refletida, espalhada e transmitida, respectivamente.

Na técnica de espectroscopia de absorção óptica de UV-Vis a radiação eletromagnética utilizada possui energia suficiente para que ocorram transições eletrônicas, compreendendo a faixa de 190 à 1100nm. O espectro de absorção óptica é a dependência da absorbância A da amostra em função do comprimento de onda da luz incidente. Como já mencionado, a absorbância do material pode ser definida pela lei de Lambert-Beer:

$$I_{tr} = I_0 * 10^{-\epsilon cl} \quad (5.2)$$

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I_{tr}} = \epsilon cl \quad (5.3)$$

sendo I_0 a intensidade de radiação incidente, I_{tr} a intensidade da radiação transmitida, c a concentração da partícula absorvedora em Molar, l o caminho óptico em cm, A é a absorbância do material. ϵ é o coeficiente de absorção molar da molécula em $\text{Molar}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que depende do comprimento de onda da luz λ . Este último, é uma característica intrínseca de cada composto, dependendo da sua estrutura eletrônica, que por sua vez depende das condições do ambiente. Por isso, o ϵ pode depender do pH, natureza do solvente, presença de outros compostos, etc..

Alterações na estrutura eletrônica da amostra alteram o ϵ , que se reflete experimentalmente nas mudanças do espectro de absorção óptica. Monitorando o espectro de absorção podemos deduzir se há mudanças na estrutura da molécula ou formação de fotoprodutos, por exemplo.

De (5.3) ou (5.4) podemos deduzir a intensidade da luz absorvida pela amostra (I_{abs}):

$$I_{abs.} = I_0 - I_{tr} = I_0(1 - 10^{-\epsilon cl}) \quad (5.4)$$

Quando uma solução é composta por diferentes moléculas ou espécies absorvedoras que não reagem entre si, ou seja, cada uma mantém suas propriedades individuais, pode-se escrever a equação de Lambert-Beer como se cada composto ou espécie absorve a luz separadamente:

$$I_{tr} = I_0 * 10^{-(A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)} = I_0 * 10^{-(\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \epsilon_3 c_3 + \dots + \epsilon_n c_n)l} \quad (5.5)$$

5.2 Espectroscopia de fluorescência de modo contínuo

Luminescência é a emissão de luz por uma espécie eletronicamente excitada. A palavra luminescência vem do latim *lumen* (luz), foi introduzida pelo físico Eilhardt Wiedemann em 1888 [128]. Fluorescência e fosforescência são casos particulares de luminescência.

A fluorescência ocorre em espécies excitadas *singletos* (S_n), o elétron ao ser excitado é promovido para um orbital mais energético ($S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$) mantendo o *spin* do elétron excitado oposto ao *spin* do elétron que permaneceu no orbital fundamental (*ground state*).

A análise da fluorescência no modo estático constitui-se no estudo da dependência da intensidade da luz emitida:

- em função do comprimento de onda da luz emitida com o comprimento de onda fixo da luz incidente (espectro de emissão);
- em função do comprimento de onda da luz incidente com o comprimento de onda fixo da luz emitida (espectro de excitação);
- em função das condições do ambiente, incluindo a supressão da fluorescência;

5.3 Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo (tempo de vida)

A técnica de fluorescência é uma técnica bastante sensível e robusta para o estudo da interação e localização dos fluoróforos em macromoléculas ou biomembranas, assim como pode fornecer diversas informações sobre mudanças conformacionais, reações intermoleculares, formação de agregados, transferência de energia, distâncias moleculares, difusão rotacional, assim como revelar detalhes sobre o microambiente em que está inserido o fluoróforo. Apesar da técnica de fluorescência em modo estático ser bastante poderosa, essa técnica possui suas limitações, como não ser capaz de diferenciar processos de supressão da fluorescência estáticos de dinâmicos, por exemplo. Pode-se dizer que as técnicas de fluorescência estática e dinâmica são bastantes complementares.

Podemos definir a fluorescência resolvida no tempo como o decaimento exponencial do histograma dos tempos de fluorescência de uma espécie excitada. Cada espécie presente possui um decaimento do tempo de vida da fluorescência segundo uma exponencial. Um decaimento multi-exponencial é indicativo de que em solução há a presença de diferentes espécies fluorescentes, sendo assim, o perfil de decaimento é a somatória das monoexponenciais respectivas a cada espécie:

$$I_{fl} = A_1'' e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2'' e^{-\frac{t}{\tau_2}} + \dots + A_n'' e^{-\frac{t}{\tau_n}} \quad (5.6)$$

em que A_i'' e τ correspondem a amplitude e o tempo de vida de cada espécie, respectivamente; t ao tempo.

Nesse caso uma característica importante é o tempo médio de decaimento, definido como:

$$\bar{\tau} = \frac{\sum A_i'' \tau_i^2}{\sum A_i'' \tau_i} \quad (5.6a)$$

Em nossos estudos utilizamos o método de *single photon counting*, que consiste em excitar a amostra com uma luz pulsada, cuja largura do pulso tenha uma duração menor que o tempo de vida da amostra. O feixe de excitação é dividido em dois, permitindo que ao mesmo tempo que o aparelho emite a luz de excitação para a amostra, o outro feixe aciona uma rampa de tensão, sendo essa interrompida ao detectar a fluorescência da amostra. A amplitude da rampa é proporcional e linear com o tempo entre a excitação e a detecção da fluorescência da amostra, sendo a fluorescência detectada $F(t)$ uma função do pulso de luz $G(t)$ de excitação convoluída com a fluorescência da amostra $f(t)$ da amostra:

$$F(t) = \int_0^t G(t') f(t - t') dt' \quad (5.7)$$

A probabilidade de detecção do fóton é maior quanto maior for a intensidade de fluorescência emitida pela amostra. Repetindo-se o processo descrito, obtemos um histograma do número de ocorrências de detecção da fluorescência pelo tempo. Os tempos de vida são obtidos pela análise desse histograma pela equação 5.6.

5.4 Espalhamento ressonante da luz (ERL)

O método de espalhamento ressonante da luz (ERL) baseia-se no fenômeno do aumento de espalhamento Rayleigh da luz próximo à região de absorção óptica da amostra.

A intensidade da energia espalhada por partículas/moléculas será representada pela equação de Rayleigh:

$$I_{esp} = A' I_{at} \frac{(n^4 c V_{ag}^2)}{(\lambda^4)} * \left(\frac{n_p^2 - n^2}{n_p^2 + n^2} \right) * (1 + \cos^2(\Theta)) = \frac{B}{\lambda^4} \quad (5.8)$$

onde, A' é coeficiente de proporção, I_{at} é a intensidade da luz de ativação, I_{esp} a intensidade da luz espalhada, n o índice de refração do meio, n_p o índice de refração da partícula-espalhadora, c a concentração da partícula, V_{ag} o volume de partícula/agregado e λ é o comprimento da onda espalhada. Nesse caso, os comprimentos das ondas espalhada e da incidente são iguais:

$$\lambda = \lambda_{inc} = \lambda_{esp} \quad (5.9)$$

A *priori*, para uma solução homogênea na ausência de qualquer soluto o índice de refração do meio (n_0) em todo volume é constante, fazendo:

$$n_p = n \rightarrow I_{esp} = 0 \quad (5.10)$$

Entretanto, devido ao movimento térmico das moléculas há flutuações de densidade e consequentemente variações locais do índice de refração n , cujo efeito resulta num espalhamento mesmo na ausência de um soluto:

$$n_p \neq n \rightarrow I_{esp} \neq 0 \quad (5.11)$$

Em soluções com espécies absorvedoras ocorrem dois efeitos [13]:

1. A absorção tanto da luz de excitação quanto da espalhada pela espécie absorvedora em solução.
2. Caso o comprimento de onda da luz espalhada esteja próximo do comprimento de onda do máximo da absorção da partícula-espalhadora, observaremos um aumento de intensidade da luz espalhada decorrente do aumento do índice de refração da partícula-espalhadora. Tal efeito chama-se “espalhamento ressonante da luz”.

O índice de refração da partícula pode ser escrito como:

$$n_p^2 = \frac{1 + K(\lambda_{max}^2 * \lambda^2)}{\lambda^2 - \lambda_{max}^2} \quad (5.12)$$

Onde “ K ” é um coeficiente de proporcionalidade, λ_{max} é o comprimento de onda em que ocorre o máximo de absorção e λ é o comprimento de onda da luz espalhada. Quando,

$$\lambda_{max} \rightarrow \lambda; \quad n_p^2 \rightarrow \infty \quad (5.13)$$

$$(n_p^2 - n^2) / (n_p^2 + n^2) \rightarrow 1 \quad (5.14)$$

Este efeito pode ser ofuscado pela absorção, entretanto, o espalhamento é proporcional ao quadrado do volume das partículas-espalhadoras. Na presença de agregados este efeito é bastante significativo.

Devido a intensidade de espalhamento ser proporcional ao quadrado do volume das partículas-espalhadoras e linearmente proporcional à concentração das mesmas, podemos concluir que para os agregados a intensidade deve ser proporcional ao número de agregação (n_{ag}). Conforme a fórmula:

$$I_{ERLa_g} = KV_{ag}^2 c_{ag} = Kc_{ag} V_m^2 n_{ag}^2 = K \left(\frac{c}{n_{ag}} \right) V_m^2 n_{ag}^2 = Kc V_m^2 n_{ag} = I_{ERLm} n_{ag} \quad (5.15)$$

em que K é um coeficiente de proporcionalidade, n_{ag} é o número médio de agregação, c_{ag} é a concentração de agregados, c é a concentração de monômeros, V_m é o volume do monômero e V_{ag} é o volume médio dos agregados ($V_{ag} = V_m * n_{ag}$).

5.5 Espalhamento dinâmico da luz (EDL)

A técnica de espalhamento dinâmico da luz (EDL), do inglês *dynamic light scattering*, também conhecida como espectroscopia por correlação de fótons, mede o tamanho de partículas analisando-se flutuações da intensidade de luz espalhada em função do tempo. As partículas em solução movimentam-se aleatoriamente como consequência dos choques com as moléculas do fluído.

O movimento browniano das partículas espalhadoras pode ser caracterizado por um coeficiente de difusão (D_i). O coeficiente de difusão translacional está relacionado com o raio hidrodinâmico da partícula (R_h) pela equação de Stokes-Einstein:

$$D_i = \frac{kT}{6\pi R_h \eta_{vis}} \quad (5.16)$$

onde η_{vis} é a viscosidade do meio e T a temperatura em Kelvin.

Podemos observar pela equação de Stokes-Einstein de que quanto menor for a partícula, maior será a sua velocidade de difusão no meio, de forma que partículas menores causarão flutuações na luz espalhada em intensidades menores e em espaços de tempos mais curtos do que as partículas maiores.

Monitorando a intensidade da luz espalhada, podemos quantificar a difusão da partícula-espalhadora a partir de uma posição num instante t e correlacionar com a sua posição após Δt [129].

$$I_D = \lim_{t_m} \frac{1}{t_m} \int I_D(t) dt \quad (5.17)$$

onde I_D é a intensidade da luz que chega ao detector, t_m é o tempo de medição.

O movimento de partículas é um processo estocástico, por isso, para obter a função de correlação como média representativa, o tempo de medição t_m precisa ser maior do que o tempo de flutuação. Outra condição é de que a função de correlação necessita ir para zero quando t_m aumenta [130].

$$t_m \rightarrow \infty; \quad \langle I(t_m) \rangle \rightarrow 0 \quad (5.18)$$

A partir da análise da curva de correlação, obtemos o tempo de decaimento da partícula (τ_i). O coeficiente de difusão (D_i) pode ser obtido a partir de τ_i e do vetor de espalhamento ($\vec{q}$):

$$D_i = \left(\frac{1}{\tau_i} \right) q^{-2} \quad (5.19)$$

O vetor de espalhamento é definido como:

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda} \quad (5.19a)$$

sendo θ o ângulo de espalhamento e λ o comprimento de onda da luz espalhada, que no caso, é considerado igual ao da luz incidente.

No caso específico do detector posicionado num ângulo de 90° e utilizando um laser de He-Ne de $\lambda=632,8$ nm, a equação 5.19a resulta em:

$$q = |\vec{q}| = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda} = \frac{4\pi \sin(90^\circ/2)}{633 \times 10^{-9}} = 1,4 \times 10^7 \text{ m}^{-1} \quad (5.19b)$$

A partir do coeficiente de difusão (equação 5.16) e igualando-se a equação de Stokes-Einstein (5.22) pode-se determinar o raio hidrodinâmico da partícula (R_h).

$$\frac{kT}{6\pi R_h \eta_{vis}} = \left(\frac{1}{\tau_i} \right) q^{-2} \rightarrow R_h = \frac{kT q^2 \tau_i}{6\pi \eta_{vis}} \quad (5.20)$$

Substituindo os valores $k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J/K}$, η_{vis} da água a $25^\circ \text{C} = 8,9 \times 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, $T = (273 + 25) \text{ K}$ e $q^2 = 1,97 \times 10^{14} \text{ m}^{-2}$ na equação 5.20 obtemos:

$$R_h = (4,8 \times 10^{-5}) * \tau_i \quad \text{m/s} \quad (5.21)$$

Para obter o coeficiente de difusão a função de correlação precisa ser analisada, existem diferentes algoritmos para análise das curvas de correlação, para nossos experimentos escolhemos o algoritmo *Contin* de análise.

5.5.1 Algoritmo *Contin*

O algoritmo *Contin* foi escrito por Steven Provencher e é um programa de domínio público. Este método calcula doze possíveis distribuições, aquela que melhor se ajusta é automaticamente escolhida. As distribuições restantes são armazenadas e utilizadas para análises subsequentes [130]. Este algoritmo ajusta a curva de correlação como uma distribuição de exponenciais, seguindo uma transformada inversa de Laplace [129].

Este método de análise é bastante indicado para distribuições suaves, tal como análises de emulsões, ou quando uma alta resolução não é imprescindível. Sendo ideal para amostras heterodispersas, polidispersas e sistemas multimodais que não podem ser resolvidos com o método cumulante.

5.6 Flash-fotólise

O método de flash-fotólise, também conhecido por fotólise por pulso relâmpago, consiste em excitar a amostra por curtos pulsos de luz, ou por uma sequência de pulsos, enquanto as mudanças temporais de suas propriedades são monitoradas. Devido a necessidade de alta energia e curto espaço temporal dos pulsos, as lâmpadas de pulso ou lasers são utilizados como fontes [131-133].

Esta técnica foi desenvolvida pelos ingleses George Porter e Ronald Norrish no final da década de 40 [131,132]. A amostra ao ser excitada por um intenso e curto pulso de luz (*pump-probe*), leva a um grande número de moléculas promovidas à um estado excitado incluindo os estados tripleto (figura 5.1). Uma luz contínua de análise incide sob a amostra, monitorando a mudança de absorção da amostra, conforme esta volta do estado triplete ao estado fundamental.

Figura 5.1. Diagrama de estados para um FS típico, mostrando a absorção, seguida por um cruzamento intersistema e consequente povoamento dos estados tripletos ($T_1 \rightarrow T_2$) e ($T_1 \rightarrow T_n$). Modificado de [134].

Seja I_0 a luz incidente sob a amostra e I_1 a intensidade de luz transmitida. Considerando que inicialmente na amostra possuímos apenas a presença de uma única espécie absorvedora e esta presente no estado fundamental. Sob o pulso de excitação, haverá a formação de uma segunda espécie no estado tripleto e as espécies formadas do estado singlete rapidamente decairão. As espécies no estado tripleto e no estado fundamental possuem coeficientes de absorção distintos, permitindo a análise da mudança de absorção da amostra com a mudança de população. Sendo assim, da equação 5.5, temos duas equações, uma para as moléculas no estado fundamental e outra para as no estado tripleto. A primeira sendo:

$$I_1 = I_0 e^{-A_1} \quad (5.22)$$

Para o caso da segunda espécie:

$$I_2 = I_0 e^{-(A_2)} \quad (5.23)$$

em que I_0 , I_1 e I_2 são as intensidades do feixe iniciais, após a primeira espécie absorvedora e após a segunda espécie, respectivamente. Sendo A_1 e A_2 as absorbâncias das respectivas espécies.

Sabendo que I_2 é igual a $I_1 - \Delta I$ e $\Delta A = A_2 - A_1$, podemos escrever:

$$\frac{I_1}{I_1 - \Delta I} = e^{-\Delta A} \quad (5.24)$$

A partir do fato que a concentração inicial de moléculas no estado fundamental c_0 é igual a concentração total de moléculas, ε_s o coeficiente de absorção molar do estado singlete, c_T é a concentração de moléculas no estado tripleto e ε_T seu respectivo coeficiente de absorção molar, temos:

$$A_1 = \varepsilon_s c_0 \quad (5.25a)$$

$$A_2 = \varepsilon_s (c_0 - c_T) + \varepsilon_T (c_T) = \varepsilon_s c_0 + (\varepsilon_T - \varepsilon_s) c_T \quad (5.25b)$$

Da equação 5.25a e 5.25b, temos:

$$\Delta A = A_2 - A_1 = (\varepsilon_T - \varepsilon_S)c_T = B * c_T \quad (5.26)$$

Sendo B uma constante e sabendo que:

$$c_T = c_t(t) \quad (5.27)$$

Sendo t o tempo, obtemos:

$$\Delta A = B * c_t(t) \quad (5.28)$$

Nas equações 5.26, 5.27 e 5.28, existem os parâmetros não definidos c_T e ε_T . Para definir-los é necessário que se atinja a fase de saturação, em que $c_T = c_0$. Substituindo os valores obtemos:

$$\varepsilon_T = \frac{\Delta A(\lambda)}{c_0} \quad (5.29)$$

Podemos observar a partir da equação acima que $A \approx c_T$. O rendimento quântico de formação do estado tripleto ϕ_T é definido como o número de moléculas que sofreram CIS e passaram para o estado tripleto T_I (n_T) sobre o número de moléculas que absorveram luz no estado singlete S_I (n_S):

$$\phi_T = \frac{n_T}{n_S} = \frac{B_1(1-e^{-A_T(\lambda)})I_T(\lambda)}{B_2(1-e^{-A_S(\lambda)})I_S(\lambda)} \quad (5.30)$$

em que as intensidade I_T e I_S são as intensidades da luz incidente e de análise, respectivamente. A_T e A_S , suas absorbâncias respectivas.

ϕ_T pode ser definido ao se variar a a energia do pulso incidente e monitorar a variação da absorção T-T até sua fase de saturação, permitindo descrever uma relação linear entre a absorção diferencial (A_T) e a energia do pulso de excitação (E).

$$A_T(E) = (tg(\alpha))E \quad (5.31)$$

As constantes B_I e B_2 são características próprias de cada equipamento. Podemos contornar o problema de defini-las utilizando uma amostra padrão e aplicando as equações 5.30 e 5.31 :

$$\phi_T^x = \frac{tg(\alpha^x)}{tg(\alpha^p)} \phi_T^p \quad (5.32)$$

em que o índice p indica a amostra padrão e x a amostra de que se quer medir.

ϕ_T pode ser definido via os processos monomoleculares:

$$\phi_T = \frac{k_{CIS}}{k_f + k_{CI} + k_{CIS} + \sum k_{Sqi}[Q_i]} = \tau_S k_{CIS} \quad (5.33)$$

em que k_{Sqi} são as taxas de supressão do estado S_I pelos supressores Q_i .

Na presença de supressores (Q_i), a velocidade de desativação do estado tripleto pode ser descrita como:

$$\frac{d(T_1)}{dt} = -(T_1)(k_{fos} + k_{CIS} + \sum k_{Tqi}[Q_i]) \quad (5.34)$$

em que k_{CIS} é a taxa de de transição $T_1 \rightarrow S_0$, k_{fos} é a taxa de fosforescência, k_{Tqi} a taxa de supressão do estado T_1 pelos supressores Q_i .

Quando a concentração de $Q_i \gg T_1$, a dependência temporal de $[T]$ pode ser descrita como:

$$(T_1) = (T_1)_0 e^{-t(k_{fos} + k_{CIS} + \sum k_{Tqi}[Q_i])} \quad (5.35)$$

O tempo de vida do estado tripleto τ_T pode ser obtido do ajuste da equação 5.35 como:

$$\tau_T = \frac{1}{k_{fos} + k_{CIS} + \sum k_{Tqi}[Q_i]} \quad (5.36)$$

O método de flash-fotólise é bastante poderoso, podendo determinar características dos produtos com curtos tempos de vida produzidos pela luz pulsada tais como os espectros de absorção óptica, os rendimentos quânticos, os níveis de energia. Também é possível obter informação sobre os estados excitados eletrônicos, vibracionais e rotacionais, radicais livres, fotoisômeros, etc.

Apesar dos estados excitados serem bastantes transitórios (um tempo de vida curto), estes são importantes para a processos de transformações químicas devido as suas altas energias e configurações dos elétrons não estáveis. Radicais livres e estados excitados mais baixos (singletos e tripletos) são de maior importância, pois esses possuem tempos de vida relativamente longos, o que aumenta a probabilidade de suas reações com outros compostos. O método de flash-fotólise possibilita determinar a ordem de uma reação rápida, calcular suas constantes de velocidade e outras características cinéticas e termodinâmicas [131-133].

As características mais importantes do equipamento de flash-fotólise são: o tempo, a energia e a região espectral do pulso da luz de excitação, as quais podem ser escolhidas conforme as características do sistema a ser estudado. Para as soluções líquidas homogêneas os valores de tempos mais comuns estão na ordem de 10^{-3} até 10^{-8} s. Esses valores caracterizam os tempos de vida de estados excitados eletrônicos mais baixos, fotoisômeros, reações bimoleculares, ou seja, reações de radicais, transporte de energia, etc. Porém, podem existir tempos ainda mais curtos ($< 10^{-8}$ s), quando, por exemplo, é formado um complexo ou o sistema é micro-heterogêneo. Sendo esse o caso de várias soluções de polímeros, tanto líquidas como sólidas, mas especialmente é a situação dos sistemas biológicos.

Na figura 5.2 está esquematizado o aparelho de flash-fotólise com sistema de análise pela absorção óptica contínua:

Figura 5.2. (1). Fonte da luz de análise (lâmpada ou laser); (2) e (4) sistemas ópticos; (3) amostra; (5) monocromador; (6) fotomultiplicadora; (7) fonte de alta tensão; (8) registrador (osciloscópio digital); (9) analisador (computador); (10) fonte de corrente; (11) fonte de pulsos de luz de excitação (laser); (12) fonte de potência para pulsos de excitação.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

A AL e o SDS foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. e ambos com grau de pureza mínimo de 90% e utilizados sem purificação adicional. A concentração de AL em solução foi controlada espectrofotometricamente usando $\epsilon_{490\text{nm}} = 3,9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [15].

Os BCDs foram sintetizados pelo Dr. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciências da Ucrânia. O grau de pureza foi controlado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), espectroscopias de absorção óptica e de fluorescência [23,67].

Tabela 6.1. Algumas características espectroscópicas de três BCDs com diferentes ângulos entre os cromóforos. Retirado de [23].

	ϵ , coeficiente de absorção molar $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	$\lambda_{\text{máx abs}}$ nm	λ_{fl} nm
BCD 90°	$0,88 \times 10^5$	617	637
BCD 150°	$0,72 \times 10^5$	623	638
BCD 180°	$1,33 \times 10^5$	632	640

Figura 6.1. Espectros normalizados de absorção dos BCDs com diferentes ângulos entre os cromóforos, solução aquosa. Modificado de [23].

As amostras de DNA utilizadas foram as do timo de novilhos obtidas da Worthington Biochemical Co (USA).

Utilizamos os sais NaCl, NaBr, NaF, KBr, KCl, LiBr e LiCl, todos com grau de pureza mínimo de 99% e utilizados sem purificações adicionais.

Soluções estoques dos corantes AL e BCD foram preparadas. Todos os experimentos foram realizados utilizando tampão fosfato salino-PBS (NaH_2PO_4 5 mM + Na_2HPO_4 2,5 mM) em água de qualidade padrão Milli-Q e em pH 6,8, salvo aqueles da análise do efeito do pH. Foram analisados o efeito do pH para a AL nos pH 5,0; pH 7,0 e pH 7,5. O pH da solução foi ajustado com adições de alíquotas concentradas de soluções de NaOH e HCl. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (24 ± 2)°C.

Uma solução estoque de DNA foi preparada dissolvendo 10 mg de DNA em 1 ml de tampão fosfato, um dia antes da experiência e armazenada a 4 ° C. A concentração do DNA foi determinada por sua absorção óptica utilizando o coeficiente de absorção molar em tampão fosfato: $\lambda_{260\text{nm}} = 1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, expresso por concentração de pares de bases [22,135].

Nos experimentos de flash-fotólise, a concentração da AL foi mantida abaixo de 8 μM com o intuito de não ultrapassar a absorbância de 0,3.

Para os experimentos da interação da AL com o DNA utilizamos as técnicas de absorção óptica, fluorescência e ERL. Variamos a concentração da AL de 8 μM à 54 μM , resultando numa absorbância que variava entre 0,3 à 1,5. Os valores de força iônica foram escolhidos dentro do limite de concentrações de sal entre 7,5 mM à 0,5 M. A força iônica foi ajustada por adições de NaCl cristalino direto na solução. A titulação do DNA foi realizada por adições de uma solução estoque de DNA direto na cubeta de quartzo padrão de 1 cm contendo a solução de AL.

Os espectros de absorção foram monitorados num espectrofotômetro Beckman Coulter DU640 e um Amersham Ultrospec 2100 pro., enquanto que os experimentos de fluorescência de estado estacionário e ERL foram realizados no espectrofluorímetro Hitachi F-7000. Ajustamos a intensidade de fluorescência ($I_{fl\text{corr}}$) pela absorbância da solução no comprimento de onda de excitação ($A_{\lambda\text{exp}}$) de acordo com a seguinte equação:

$$I_{fl\text{corr}} = \frac{I_{fl\text{exp}}}{A_{\lambda\text{exp}}} \quad (6.1)$$

onde $I_{fl\text{exp}}$ é a intensidade de fluorescência obtida experimentalmente.

As características do tempo de vida da fluorescência da AL foram monitoradas no fluorímetro Spectra Physics e no microscópio de fluorescência PicoQuantMicroTime 200, também utilizado para determinar os coeficientes de difusão dos monômeros AL e do complexo AL + DNA utilizando a técnica ECF [136,137].

O decaimento da intensidade de fluorescência foi determinado utilizando a técnica de contagem de fóton único correlacionado no tempo. A fonte de excitação foi um laser *mode-locked* de Ti: Safira (Tsunami 3950), bombeado por um laser da Millennia X Spectra Physics, produzindo pulsos de meia largura de 5 ps com taxa de repetição de 8,0 MHz regulados pelo selecionador de pulso 3980 Spectra Physics. O laser foi sintonizado para fornecer uma saída em 940 nm. Um cristal BBO (GWN-23PL Spectra Physics) gerou um segundo harmônico em 470 nm dos pulsos de excitação, estes direcionados para o espectrômetro Edinburgh FL900, ajustado numa configuração em formato de L. Um monocromador selecionou o comprimento de onda em 530 nm da fluorescência da amostra, cujos fótons emitidos foram detectados por uma foto-multiplicadora de placa de microcanal Hamamatsu R3809U resfriado. Toda a função de resposta do instrumento é tipicamente da ordem de 100 ps.

O microscópio de fluorescência ECF/FLIM PicoQuantMicroTime 200 foi equipado com um *pinhole* de 50 μm , uma objetiva de imersão em água com amplitude de 60 $\times$ e abertura numérica de 1,2. O comprimento de onda de excitação foi de 470 nm a uma frequência de 40 MHz e potência de até 50 μW na objetiva. Utilizou-se um filtro passa-alta de 480 nm para filtrar a luz dispersa. A resolução do instrumento foi de 110 ps.

Os experimentos de flash-fotólise foram realizados utilizando pulsos de laser em 532nm, energia de 25 mJ fornecidos por um laser de Nd:YAG, que produziam pulsos com 3ns de duração. A absorção transitória obtida foi uma média de 64 disparos para cada perfil de decaimento.

Para medir o espalhamento dinâmico da luz utilizamos o espectrofotômetro por correlação de fótons Zetasizer 3000HSA, com o detector posicionado num ângulo de 90° e utilizando um laser de He-Ne de $\lambda=632,8$ nm. As curvas de correlação do EDL foram analisadas pelo algoritmo Contin, nos modos de “intensidade” e “número” [138,139]. Especificamente para os experimentos de espalhamento dinâmico, preparamos as amostras com um dia de antecedência com o intuito de evitar a dinâmica de agregação da AL. Para todos os outros experimentos as amostras foram preparadas na hora da medição.

Nos experimentos da dinâmica de agregação da AL, basicamente, foram feitos três tipos de experimentos:

i.AL: Monitoramento da AL em diferentes concentrações utilizando os métodos de espectroscopia de absorção óptica e de fluorescência em modo contínuo, espalhamento ressonante da luz e espalhamento dinâmico da luz, variando as concentrações de AL para os três primeiros experimentos de 5 à 510 μM . No

caso do experimento de espalhamento dinâmico da luz variamos a concentração de 10 à 400 μM . Alguns experimentos foram realizados na presença de NaCl em concentrações de 0 até 0,5 M. Em tal série de experimentos, nosso propósito era observar a tendência intrínseca da AL de agregar e compreender este processo.

ii.AL+SDS: Os mesmos métodos espectroscópicos que no caso anterior, sendo que agora monitoramos a AL em interação com o SDS. Nosso intuito era observar a interação da AL na presença de um sistema nano-heterogêneo. Nessa série de experimentos, variamos as concentrações de AL (5-74 μM) e do SDS (25 μM -10 mM), com exceção do experimento de espalhamento dinâmico da luz em que utilizamos uma única concentração de AL (75 μM) e variamos a concentração de SDS de 0 à 1 mM com a precaução de aguardar 24 horas para que a solução atingisse o equilíbrio, assim evitando a dinâmica de agregação da AL.

iii.Dinâmica da agregação da AL+SDS: Utilizamos os mesmos métodos espectroscópicos, com exceção do espalhamento dinâmico da luz. Cada solução foi monitorada durante longos períodos de tempos (até 15 horas) coletando até 300 espectros. Observamos que para certas concentrações de AL e de SDS havia uma dinâmica muito longa e viu-se a necessidade de uma análise mais detalhada de tal fenômeno. Nesse conjunto de experimentos monitoramos os espectros de absorção, da fluorescência e do espalhamento ressonante da luz variando as concentrações de AL na faixa 5-74 μM e as concentração do SDS na faixa 25 μM -5mM.

Os experimentos para investigar os efeitos de hipertermia da AL em solução aquosa sob irradiação de luz visível envolveu variar a concentração da AL de 6,5 μM até 74 μM com a absorbância do máximo da banda de absorção em $\lambda = 490 \text{ nm}$ variando entre 0,25 à 2.

Figura 6.2. Esquema do equipamento de irradiação.

Na figura 6.2 apresentamos o esquema utilizado para irradiação de amostra. A fonte de luz consistia num LED de 2 W com emissão máxima em 470 nm. O compartimento da amostra era termicamente isolado com poliestireno. Uma fenda de 0,5 cm de raio dava acesso a amostra. Utilizamos cubetas de quartzo de 1cm. O termopar empregado era do tipo K, isto é, consiste numa liga de cromel¹-alumel².

A temperatura foi registrada em modo diferencial, entre a cubeta com água e a com a amostra irradiada. Durante a irradiação a solução de AL foi mantida sob agitação contínua.

¹ Cromel: liga metálica composta de 90% de Níquel e de 10% de Cromo.

² Alumel: liga metálica composta de 95% de Níquel e de 5% de Alumínio.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Supressão da fluorescência da Acridina Laranja por sais em solução aquosa: efeitos da agregação e transferência de carga

Devido as propriedades adequadas da AL, como afinidade a várias estruturas biológicas, alto rendimento quântico da fluorescência e estado tripleto, a AL é utilizada como sonda fluorescente, indicador de pH intracelular e fotossensibilizador em TFD [140-150 e referências aí citadas]. Uma característica importante da AL é sua tendência de agregar mesmo em solução aquosa homogênea. A agregação afeta as características fotofísicas da AL reduzindo, em particular, o rendimento quântico e tempo de vida de seus estados excitados devido ao aumento da probabilidade da dissipação de energia por processos não-radiativos [19], o que acarretaria numa diminuição da eficiência da AL como sonda fluorescente ou fotossensibilizador.

Ao ser introduzida no organismo, a AL é dispersa num meio com alta força iônica, por exemplo, no plasma do sangue humano temos aproximadamente 0,36 M. A atração eletrostática entre os FS orgânicos carregados e os íons dos sais induz a formação de nuvens desses íons em torno desses compostos. Um dos efeitos é reduzir a repulsão eletrostática entre os FSs, estimulando a agregação e, dessa forma, afetando suas características físico-químicas [16,19,23,151,152]. Além disso, a interação com os íons dos sais pode também afetar tais características [16,19].

Dessa forma, a informação sobre os efeitos e mecanismos da ação dos sais nas propriedades dos FS são importantes tendo em vista suas aplicações práticas como diagnóstico por fluorescência e terapia fotodinâmica.

Neste seção apresentaremos um estudo espectroscópico do efeito de sais inorgânicos nas características espectrais e supressão da fluorescência em soluções aquosa homogênea utilizando a AL como modelo. O efeito do pH sob tais características também foi analisado.

7.1.1 Efeitos da concentração de AL em solução tampão na ausência de sal

7.1.1.1 Absorção óptica

O espectro de absorção óptica da AL (figura 7.1) mostra uma intensa absorção na região compreendida entre 350 nm e 550nm, com o máximo da banda centrado em 490 nm e um ombro em 468 nm

Desde os estudos de Sakoda *et al.* [153,154] e Kubota *et al.* [135,136,155-157], essa banda de absorção foi atribuída a transições entre o estado fundamental singlete S_0 e os dois níveis vibracionais do primeiro estado excitado S_1 da AL.

Com o aumento da concentração da AL há uma mudança do perfil dessa banda e induz um aumento relativo da intensidade de absorção em 468 nm, se comparado com a em 490 nm (figura 7.1).

Figura 7.1. Espectro de absorção da AL em tampão fosfato com $A/A_{490 \text{ nm}}$; inserção: Razão entre $A_{468 \text{ nm}}/A_{490 \text{ nm}}$ da AL em função da concentração da AL.

De acordo com Kapuncinsky, esse aumento foi associado com a dimerização da AL induzida pela formação de complexos π - π entre o sistema conjugação π das moléculas AL, a despeito da repulsão eletrostática das cargas positivas [137].

A sensibilidade do perfil do espectro de absorção da AL à concentração, mesmo a baixa, dificulta a determinação do coeficiente de absorção molar (ϵ) da AL, que varia em diferentes estudos de $63700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [158] a $17000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [159] (ver material suplementar). A Dr.a Érika Ribeiro e Silva durante o seu mestrado realizou os experimentos para determinação do $\epsilon_{490 \text{ nm}}$ da AL e relatamos abaixo esse procedimento.

A fim de eliminar os efeitos da concentração de AL, o valor de ϵ foi determinado em concentrações menores que $2,5 \times 10^{-6} \text{ M}$, onde a variação do perfil espectral é desprezível. Para esse propósito, uma cubeta de quartzo com 10 cm de caminho óptico foi utilizada em via de aumentar a absorbância e reduzir seus desvios.

O sal Hemi (Cloreto de zinco) AL ($1,0 \pm 0,1 \text{ mg}$) foi pesado numa balança microanalítica e dissolvido em 1 litro de água pura padrão Mili-Q. Todo o experimento fora executado em temperatura ambiente. A solução manteve-se sobre agitação contínua numa sala escura por duas horas. Preparamos oito soluções aquosas com volumes de 50 mL e concentrações distintas de AL. Construímos uma curva exibindo a dependência linear da absorbância em função da concentração da AL com o ponto zero como $[AL] = 0$ (figura 7.2A). Obtivemos o valor calculado de ϵ a partir de cinco experimentos independentes. Confirmamos a ausência da

agregação da AL com medidas da fluorescência (figura 7.2), em que observamos uma proporção linear entre a absorbância da AL (concentração da AL) e a intensidade de fluorescência. É sabido que a dimerização ou formação de agregados maiores, usualmente, reduzem a intensidade fluorescência [16,19,23,151,152]. Obtemos para o ϵ da AL o valor de $(39000 \pm 4000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$, este está de acordo com valores obtidos na literatura, como por exemplo em [137] que encontrou $43300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 7.2. Absorção da AL em 490 nm em função da concentração da AL (A), integral da intensidade de fluorescência da AL em função da absorbância no comprimento de onda de excitação $\lambda_{\text{ex}} = 490 \text{ nm}$ (B) e espectro de fluorescência da AL em função da $[AL]$ (C). Experimentos realizados pela ex-aluna Érika Ribeiro e Silva durante seu mestrado e gentilmente cedidos pela mesma.

7.1.1.2 Fluorescência

A intensidade da fluorescência da AL ($I_{\text{fl corr}}$) foi corrigida pela absorbância $A_{380 \text{ nm}}$ no comprimento de onda da excitação ($\lambda = 380 \text{ nm}$) de acordo com a equação:

$$I_{fl\ corr} = \frac{I_{fl\ exp}}{A_{380\ nm}} \quad (7.1)$$

Na figura 7.3A,B observamos que a intensidade de fluorescência da AL diminui com o aumento da concentração da AL.

O rendimento quântico da fluorescência (ϕ_{flX}) foi calculado seguindo a equação:

$$\phi_{flX} = \frac{\int I_{fl\ corr\ X}(\lambda) d\lambda}{\int I_{fl\ corr\ 0}(\lambda) d\lambda} \phi_{fl0} \quad (7.2)$$

onde $\int I_{fl\ corr\ X}(\lambda) d\lambda$ e $\int I_{fl\ corr\ 0}(\lambda) d\lambda$ são as integrais da intensidade de fluorescência nas concentrações de AL X e 2,0 μM , respectivamente, ϕ_{fl0} é o rendimento quântico da fluorescência da AL em 2,0 μM . Podemos observar que o ϕ_{flX} foi reduzido de 0,25 [135] para $[\text{AL}] = 2,0\ \mu\text{M}$ para 0,007 em 511 μM (figura 7.3B).

O deslocamento para o azul decorre do efeito de filtro interno da alta concentração da AL (figura 7.3A).

Figura 7.3. Espectro da fluorescência da AL corrigidos pela absorvância em $\lambda_{ex}=380\ \text{nm}$ (A) e integral da intensidade de fluorescência da AL corrigida e em função da concentração de AL (B).

O perfil do espectro de excitação da fluorescência da AL foi independente da concentração da AL (figura 7.4A) e coincide com o espectro de absorção do monômero da AL obtido em baixa concentração. Esse resultado é indicativo que apenas os monômeros da AL emitem fluorescência, enquanto que a fluorescência dos agregados é desprezível. O que está de acordo com os experimentos do tempo de vida da fluorescência que demonstraram a invariabilidade do tempo de vida da AL com o aumento da concentração de AL (figura 7.4B).

Figura 7.4. Espectro normalizado da excitação da AL monitorados em $\lambda_{\text{em}} = 560\text{ nm}$ (A) e curvas do decaimento da fluorescência com $\lambda_{\text{ex}} = 460\text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 530\text{ nm}$ para várias concentrações de AL.

7.1.1.3 Espalhamento ressonante da luz (ERL)

Para as soluções de AL, o aumento da I_{ERL} com a concentração de AL demonstra a agregação da AL (figura 7.5). Desafortunadamente, o pico da I_{ERL} é reduzido na região de absorção da AL devido ao efeito de filtro interno [160-162]. Mesmo com essa redução da I_{ERL} , observamos aumentos de três vezes da integral da intensidade e de cinco vezes da I_{ERL} em $\lambda = 340\text{ nm}$ com a variação da concentração da AL entre 5 – 100 μM , demonstrando que a AL forma agregados maiores que dímeros em solução aquosa homogênea.

Figura 7.5. Integral da I_{ERL} da solução de AL em função da concentração da mesma.

7.1.1.4 Espalhamento dinâmico da luz (EDL)

Os resultado de ERL foram corroborados pelos dados de EDL que indicam a formação de agregados de diferentes tamanhos. Por exemplo, para $[\text{AL}] = 0,4\text{ mM}$ (figura 7.6B), o número máximo de centros de espalhamento corresponde a um diâmetro do agregado de aproximadamente 300 nm, que é muito maior que o raio hidrodinâmico da AL do monômero

da AL ($\approx 6,92 \text{ \AA}$ [163]). Todavia, existem centros de espalhamento ainda maiores, indicando a existência de agregados ainda maiores mesmo em concentrações de AL relativamente baixas. O alto desvio experimental no mesmo experimento demonstra que a estrutura do agregado é instável e sensível a condições externas, como temperatura, concentração, vibração, etc. Outro fato a mencionar é que a técnica de EDL pressupõe uma amostra que não varie de tamanho durante o processo de medição, o que não é o caso dos agregados da AL.

Figura 7.6. A distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos da AL depende da concentração do corante: $0,65 \mu\text{M}$ (preto), $6 \mu\text{M}$ (vermelho) e $45 \mu\text{M}$ (azul) (A). Distribuição do tamanho da AL utilizando o método de análise Contim no modo número.

A figura 7.6A nos apresenta a distribuição dos diâmetros hidrodinâmicos dos centros espalhadores em solução aquosa contendo AL em diferentes concentrações. As análises foram executadas utilizando o modo de intensidade [138,139]. Os picos centrados em 35, 100 e 230 nm foram observados mesmo em concentrações de AL bastantes dilutas ($0,65 \mu\text{M}$), confirmando a presença de agregados da AL em solução mesmo à baixa concentração. A formação de agregados maiores com o diâmetro hidrodinâmico centrados em 390 e 1000 nm foram observados em concentrações de $6 \mu\text{M}$ e $45 \mu\text{M}$, respectivamente (figura 7.6A linhas vermelha e azul, respectivamente), sendo que nessas mesmas concentrações, distribuições com apenas um pico foram observadas.

A análise dos dados de EDL pelo modo número [138,139] é mais acurada para determinar a quantidade de centros espalhadores

Baseando-se nesses fatos, poder-se-ia concluir que os número de agregação da AL é maior que dois e aumenta com a concentração da AL. O deslocamento para o azul da absorção dos agregados em relação ao monômero indica a formação de uma estrutura dos agregados do tipo face-a-face (agregados H) [44].

7.1.2 Efeitos dos sais

7.1.2.1 Absorção óptica

A adição de sal reduz a absorbância da AL e muda o perfil do seu espectro, diminuindo a razão $A_{490\text{nm}}/A_{468\text{nm}}$ (Figure 5A-D) e, dessa forma, indica a agregação da AL a uma concentração fixa devido a interação com o sal. Este efeito foi observado mesmo a baixas concentrações, como $[AL] = 2,6 \mu\text{M}$ (figura 7.7A) e mostrou-se dependente da concentração de AL, aumentando com o aumento da mesma (figura 7.7B). A comparação entre os sais de NaCl, NaBr, KBr, KCl LiBr e LiCl mostrou que, relativamente, possuem o mesmo efeito no espectro de absorção da AL e independente da origem do sal (figura 7.7C,D)

Figura 7.7. Espectro de absorção de $2,6 \mu\text{M}$ (A) e $55 \mu\text{M}$ (B) de soluções de AL em função da concentração de NaCl e da razão das absorbâncias $A_{490\text{ nm}}/A_{468\text{ nm}}$ das concentrações de AL de $2,6 \mu\text{M}$ (C) e $55 \mu\text{M}$ (D) em função das concentrações de LiBr, NaBr, KBr, LiCl, NaCl e KCl.

7.1.2.2 Fluorescência

Nos experimentos de estado estacionário, observamos a supressão da fluorescência da AL pelos sais, tendo uma dependência linear de Stern-Volmer para todos os sais utilizados (figura 7.8).

Figura 7.8. Dependência de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência da [AL]=55 μM em relação a concentração de sal para vários sais.

Constante de supressão bimolecular (k_q) foi calculado seguindo as equações:

$$\frac{I_0}{I_q} - 1 = K_{sv}[Q] \quad (7.3)$$

$$k_q = \frac{K_{sv}}{\tau_{fl}} \quad (7.4)$$

onde I_0 e I_q são as integrais das intensidade de fluorescência da AL na ausência e na presença de sal, respectivamente; K_{sv} é constante de Stern-Volmer; $\tau_{fl} = 2,1 \pm 0,1$ ns é o tempo de vida da fluorescência da AL na ausência de sal (obtido nesse estudo).

Pode-se observar que os valores de k_q dependem da origem do ânion e aumenta na sequência $\text{F}^- \leq \text{Cl}^- < \text{Br}^- < \text{I}^-$, enquanto que o cátion pouco influencia (tabela 7.1). Por outro lado, k_q aumenta com a concentração da AL.

Tabela 7.1. Constante bimolecular da supressão da fluorescência da AL k_q ($M^{-1}s^{-1}$) $\times 10^{-9}$ em várias concentrações para diferentes sais e potencial de oxidação do ânion do sal (E_{ox}).

AL		F ⁻	Cl ⁻	Br ⁻	I ⁻
		--	$E_{ox} = 8,75 \text{ eV [181]}$	$E_{ox} = 8,25 \text{ eV [181]}$	$E_{ox} = 7,24 \text{ eV [181]}$
2,6 μM	Na ⁺	0,05 $\pm$ 0,05	0,03 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,01	
	K ⁺		0,03 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	
	Li ⁺		0,04 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,02	
10 μM	Na ⁺	0,19 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,03	21 $\pm$ 2
	K ⁺		0,23 $\pm$ 0,01	1,03 $\pm$ 0,04	
	Li ⁺		0,22 $\pm$ 0,01	1,08 $\pm$ 0,06	
25 μM	Na ⁺	0,17 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,01	1,34 $\pm$ 0,04	
	K ⁺		0,31 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,03	
	Li ⁺		0,28 $\pm$ 0,01	1,60 $\pm$ 0,07	
55 μM	Na ⁺	0,38 $\pm$ 0,01	0,55 $\pm$ 0,01	1,78 $\pm$ 0,07	19 $\pm$ 2
	K ⁺		0,59 $\pm$ 0,02	1,65 $\pm$ 0,08	
	Li ⁺		0,54 $\pm$ 0,02	1,75 $\pm$ 0,06	

A supressão da fluorescência da AL por sais pode estar associado com sua agregação estimulado pelos sais. Contudo, os experimentos de absorção óptica demonstram uma fraca dependência pelo tipo de ânion, enquanto que possui diferentes valores de k_q associado a diferentes ânions.

A constante de supressão dinâmica da fluorescência da AL, k_{qd} , foi obtida em experimentos resolvidos no tempo seguindo:

$$\frac{\tau_0}{\tau_q} - 1 = K_{svd}[Q] \quad (7.5)$$

$$k_{qd} = \frac{K_{svd}}{\tau_{fl}} \quad (7.6)$$

onde τ_0 e τ_q são os tempos de vida da fluorescência da AL na ausência e na presença de sal, respectivamente.

Os valores de k_{qd} são menores que os de k_q , obtidos em experimentos de modo estacionário (figura 7.9B, tabela 7.2), permanecendo invariante com o aumento da concentração da AL. Interessante notar que a baixas concentrações de AL, onde o efeito da agregação da AL é diminuto, os valores de k_q são próximos a k_{qd} .

Figura 7.9. Curvas de decaimento da fluorescência da AL para a concentração de 2,6 μM de AL para várias concentrações de KBr com $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 530 \text{ nm}$ (A). Dependência de Stern-Volmer para a supressão estática e dinâmica da fluorescência da AL pelo sal KBr (B).

Tabela 7.2. Constantes da supressão bimolecular dinâmica k_{qd} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) $\times 10^{-9}$ da fluorescência da solução de $[\text{AL}] = 2,6 \mu\text{M}$ por diferentes sais e potencial de oxidação do ânion do sal (E_{ox})

	F^-	Cl^-	Br^-	I^-
	--	$E_{\text{ox}} = 8,75 \text{ eV}$	$E_{\text{ox}} = 8,25 \text{ eV}$	$E_{\text{ox}} = 7,24 \text{ eV}$
Na^+	$0,02 \pm 0,02$	$0,011 \pm 0,002$	$0,35 \pm 0,02$	9 ± 1
K^+		$0,010 \pm 0,001$	$0,34 \pm 0,02$	
Li^+		$0,016 \pm 0,001$	$0,37 \pm 0,03$	

A diferença observada entre a constante de supressão estática da fluorescência total, k_q , e a constante de supressão dinâmica, k_{qd} , assim como a dependência de k_q com a concentração da AL demonstra a presença de, ao menos, dois mecanismos para a supressão da fluorescência da AL por sais. Assume-se que o aumento dos valores de k_q com o aumento da concentração da AL esteja associado com a agregação da própria AL estimulada pelo sal, cujo um dos efeitos é reduzir a intensidade de fluorescência da AL. Provavelmente, os sais induzem a agregação da AL pela formação de uma nuvem de contra-íons em torno das moléculas de AL, reduzindo a repulsão eletrostática entre elas [16,19,23,149,150]. Estamos assumindo que o principal fator é a carga dos sais, o tamanho dos íons devem exercer uma pequena influência apenas. Os dados de absorção óptica estão de acordo com essa hipótese.

Em baixas concentrações de AL, quando a agregação tem menor probabilidade de ocorrer, a supressão da fluorescência da AL ocorre majoritariamente pela interação dos monômeros da AL com os íons do sal. Neste caso, os valores de k_q dos experimentos de estado estacionário são próximos dos resultados obtidos para k_{qd} dos experimentos resolvidos no tempo. Esta proximidade também indica que há um padrão dinâmico de supressão, realizado

via colisões entre as moléculas de AL e os íons do sal. As moléculas da AL em solução aquosa em pH neutro apresenta carga líquida de +1. Sendo assim, sua interação com os cátions deve ser pequena por conta da repulsão eletrostática, o inverso ocorrendo com os ânions. Consequentemente, os valores de k_q e k_{qd} dependem da origem do ânion e são praticamente independentes da origem do cátion.

Os valores de k_q aumentam seguindo a diminuição do potencial de oxidação (tabelas 7.1 e 7.2). Este fato nos provê que a supressão pode estar ocorrendo pela transferência parcial de elétrons do ânion do sal para a AL em seu estado excitado (formação de exciplexo)

A sequência de reação pode ser descrita como:

onde $AL(S_1^*)^+$ representa a AL no estado excitado singleto; Q^- é o ânion do sal, $K_1 = k_1/k_{-1}$ é a constante de equilíbrio da formação do exciplexo $[AL^{\delta+} \dots Q^{\delta-}]^*$; k_1 e k_{-1} são as constantes de formação e separação do exciplexo; k_2 é a constante de desativação do exciplexo; e k_3 é a constante de separação do complexo desativado.

De acordo com a teoria de Rehm-Weller [164], k_q do estado excitado está relacionado com a participação de propriedades oxidativas e redutivas da molécula via formação de exciplexo seguindo:

$$\log(k_{qd}) = A - B\Delta G \quad (7.8)$$

onde A e B são constantes e ΔG é a variação de energia livre do sistema devido a formação do exciplexo. Nesse caso, ΔG é expresso como:

$$\Delta G = E_{ox} - E_{red}^* - C \quad (7.9)$$

onde E_{ox} é o doador (ânion do sal), potencial de oxidação; E_{red}^* é o potencial de redução do aceitador (AL em seu estado excitado); e C é a energia eletrostática livre da estabilização do exciplexo.

Para os sais com o mesmo cátion, o potencial E_{ox} da equação (7.9) varia de acordo com a origem do ânion, todos os outros parâmetros permanecendo invariantes. Consequentemente, para os sais com o mesmo cátion, o $\log(k_{qd})$ deve aumentar conforme o E_{ox} do ânion diminui.

Tais fatos confirmam nossa hipótese de que a fluorescência da AL por sais inorgânicos ocorrem via a formação de exciplexos entre a AL em seu estado excitado e como aceitador de elétrons e o ânion do sal como doador.

7.1.2.3 Efeitos do ânion de iodeto nas características espectroscópicas da AL

Em contraste com outros sais utilizados, os sais de iodeto (NaI e KI) desestimulam a agregação da AL, aumentando a razão $A_{490\text{ nm}}/A_{470\text{ nm}}$ (figura 7.10).

Figura 7.10. Espectro de absorção das soluções de [AL] = 55 μM (A) e [AL] = 10 μM (B) e razões $A_{490\text{ nm}}/A_{470\text{ nm}}$ para a solução de [AL] = 55 μM (C) em função da concentração de NaI.

A constante de supressão da fluorescência da AL k_q pelos sais de iodeto é muito maior do que se comparada com as dos outros sais e também independe da concentração da AL (figura 7.8, tabela 7.1). A constante de supressão dinâmica k_{qd} também é muito maior que a dos outros ânions (tabela 7.2). Contudo, a adição de sais de iodeto induzem a formação de uma nova banda de absorção com λ_{max} próximo à 350 nm (figura 7.10A,B). Os efeitos observados são provavelmente decorrentes da formação de um complexo de transferência de carga entre o ânion do iodeto e as moléculas de AL mesmo no estado fundamental (*ground state*) devido ao baixo potencial de oxidação do I⁻ ($E_{\text{ox}} = 7,24\text{ eV}$ [165]).

7.1.2.4 Efeitos do pH na supressão da fluorescência da AL

A AL é amplamente utilizada em aplicações como indicador fluorescente intracelular para pH [149,150]. Os efeitos do pH sobre a fluorescência da AL deve estar associada com a variação do estado de protonação. É razoável conjecturar que a variação do pH da solução pode influenciar a interação do ânion do sal com as moléculas de AL, mudando a agregação da AL e supressão da fluorescência desta devido a formação dos exciplexos. Sendo assim, analisamos o efeito do pH sob a supressão da fluorescência da AL por sais.

Entretanto, foi observado que o espectro de absorção da AL permanece praticamente invariável entre $3,0 < \text{pH} < 8,0$, também em acordo com os dados em [150]. Uma evidência que o estado de protonação da AL nesse escopo permanece constante.

O estudo de k_q e k_{qd} em pH 5,0; pH 7,0 e pH 7,5 demonstra que a supressão devido tanto a agregação quanto a formação de exciplexos é independente do pH dentro dos limites citados (tabela 7.3).

Tabela 7.3. Constantes k_q e k_{qd} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) $\times 10^{-9}$ da fluorescência da AL pelo sal KBr, constantes de supressão bimolecular em diferentes concentrações de AL em função do pH.

pH	k_q		k_{qd}
	[AL] = 25,0 μM	[AL] = 2,6 μM	
5,0	1,20 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,02	0,35 $\pm$ 0,02
7,0	1,25 $\pm$ 0,03	0,37 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,02
7,5	1,27 $\pm$ 0,03	0,39 $\pm$ 0,02	0,34 $\pm$ 0,03

Não obstante, acreditamos que os efeitos do pH sob a agregação da AL e a formação de exciplexos necessita de um estudo detalhado.

7.2 Interação da Acridina Laranja com DNA: efeito da força iônica

A Acridina Laranja é um corante orgânico aplicado em várias áreas, incluindo engenharia, medicina e biologia. Não obstante tenha sido amplamente investigada durante décadas, permanece um interesse, que reflete em centenas de publicações anuais sobre a AL (segundo a Web of Science³ e Scopus⁴).

Em particular, o estudo da interação da AL com DNA continua sendo de interesse devido as seguintes razões:

³ Web of Science. <http://apps.webofknowledge.com> Acesso em 19/11/2017

⁴ Scopus. <https://www.scopus.com/> Acesso em 19/11/2017

1) Acridinas são conhecidos intercaladores aromáticos de DNA [166 e referências aí citadas], possuindo efeitos mutagênicos e carcinogênicos podendo provocar morte celular [76,82,137,167,168];

2) Acridinas são conhecidos agentes ativos na terapia fotodinâmica contra o câncer [103,168-171], sendo o DNA um dos principais alvos de sua ação fotodinâmica;

3) A complexação da fita de DNA com intercaladores faz parte de um sistema complexo utilizado, entre outras coisas, no desenvolvimento de novas tecnologias como a eletrônica biomolecular [172-179].

São conhecidos dois mecanismos de ligação de moléculas ao DNA: a molécula ligando-se a superfície do DNA (ligação externa) e a molécula intercalando entre os planos de base do DNA. Em qualquer um dos casos, sempre acontece a ligação externa, pois esta precede a intercalação. As interações hidrofóbicas e eletrostáticas são os principais mecanismos para a ligação do FS com o DNA, sendo que condições externas como a força iônica, pH, entre outros, afeta-a. Por exemplo, já foi demonstrado que cátions de vários metais, incluindo aqueles com propriedades carcinogênicas e mutagênicas, induzem o deslocamento da AL do DNA [180,181].

A ligação do FS com biomacromoléculas cria impedimentos estéricos para o contato com moléculas de outras espécies, tal como supressores dos estados excitados [18,182]. Isto é, a ligação do FS com o DNA protege-a de ter sua energia suprimida por outras moléculas. Tal característica permite que, analisando a supressão dos estados excitados de um composto, se obtenha informações sobre os mecanismos de sua ligação com o DNA.

Nesse subcapítulo, retrataremos o estudo das características espectrais da AL e da supressão de seus estados excitados singletos (S_1^*) e tripletos (T_1^*) pelo radical estável nitroxyl, 2,2,6,6-tetramethyl-piperidine-N-oxyl (TEMPO), em sua ligação com o DNA, em função da concentração do DNA, tanto na presença quanto na ausência do sal cloreto de sódio (NaCl). Escolhemos o NaCl para esclarecer os detalhes de como o sal afeta a interação da AL com o DNA. Esse estudo foi realizado utilizando as técnicas de absorção óptica, fluorescência de estado estacionário e resolvida no tempo, ECF, LFP (laser flash fotólise) e ERL.

7.2.1 Efeitos do DNA nas características espectrais da AL na ausência de sal

Na ausência de DNA e NaCl, o espectro de absorção da AL na região visível é caracterizado pela absorção intensa em 490 nm com um “ombro” em 470 nm (figura 7.1).

Como já mencionado, desde os estudos pioneiros de Sakoda *et al.* [153,154] e Kubota *et al.* [135,136,155], relacionaram essa banda de absorção com as transição entre os estado fundamental singlete da AL, S_0 , para dois estados vibracionais do primeiro estado excitado singlete, S_1^* .

O aumento da concentração da AL muda o perfil dessa banda e demonstra um aumento relativo da intensidade próximo à 475 nm (A_{475}) se comparado com o em 490 nm ($A_{490\text{ nm}}$) (figura 7.1). Tais mudanças são devido a agregação da AL, em que o pico de absorção do agregado é responsável pelo aumento da absorção em 475 nm [15,135,136,153-155]. Sendo assim, as mudanças na razão $\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}}$ refletem a variação relativa da proporção de monômeros de AL, aumentando com a desagregação da AL e diminuindo na agregação.

Quando se adiciona o DNA, o espectro de absorção da AL sofre mudanças complexas (figura 7.11A), ocorrendo em dois estágios. Em concentrações relativamente baixas de DNA, o seu aumento ocasiona a diminuição da absorção da solução, diminuindo a razão $A_{490\text{ nm}}/A_{470\text{ nm}}$, alcançando seu menor valor em $[\text{DNA}]/[\text{AL}]=0,30\pm0,05$. Nesse estágio, o aumento do DNA aumenta a agregação da AL, alcançando seu ápice quando $[\text{DNA}]/[\text{AL}]=0,30\pm0,05$. Aumentando ainda mais a concentração de DNA, o espectro de absorção aumenta como um todo, o máximo de absorção e seu ombro são deslocados para 500 e 480 nm, respectivamente (figura 7.11A), também aumenta a razão $A_{490\text{ nm}}/A_{470\text{ nm}}$, demonstrando assim que nesse estágio o DNA induz a desagregação da AL. A dependência da absorção em função da concentração do DNA foi ajustada com êxito como uma bi-exponencial (figura 7.11B):

$$A = \left(\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}} \right)_0 \exp \left(- \frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_1} \right) + \left(\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}} \right)_\infty \left[1 - \exp \left(- \frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_2} \right) \right] \quad (7.10)$$

onde $\left(\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}} \right)_0$ e $\left(\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}} \right)_\infty$ são os valores da razão $\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}}$ na ausência de DNA e em seu excesso, respectivamente.

Figura 7.11. Espectro de absorção (A) e a razão das absorbância em 490 nm e 475 nm (B) da solução de 25 μM de AL em função da concentração de DNA em pH 6,8 em tampão fosfato (7,5 mM) na ausência de NaCl. $[\text{DNA}]_1$ e $[\text{DNA}]_2$ são parâmetros variáveis da equação (7.10).

O primeiro membro nessa equação $\left(\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}}\right)_0 \exp\left(-\frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_1}\right)$, descreve a redução do valor de $\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}}$, este associado à agregação da AL. O coeficiente $[\text{DNA}]_1$, que chamaremos condicionalmente de “constante de agregação”, caracteriza a probabilidade desse processo. O segundo membro da equação, $\left(\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}}\right)_\infty \left[1 - \exp\left(-\frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_2}\right)\right]$, descreve o aumento do valor de $\frac{A_{490\text{ nm}}}{A_{475\text{ nm}}}$, estando associado ao processo complexo de desagregação da AL e ligação na forma monomérica aos sítios de ligação do DNA, o coeficiente $[\text{DNA}]_2$ caracteriza esta probabilidade.

Essas concentrações características $[\text{DNA}]_1$ e $[\text{DNA}]_2$ aumentam com a concentração da AL (tabela 7.4).

Tabela 7.4. Concentrações características de DNA para agregação da AL ($[\text{DNA}]_1$) e desagregação ($[\text{DNA}]_2$) na ausência de NaCl.

$[\text{AL}], (\mu\text{M})$	Absorção		Fluorescência	
	$[\text{DNA}]_1$	$[\text{DNA}]_2$	$[\text{DNA}]_1$	$[\text{DNA}]_2$
8	$1,8 \pm 0,3$	16 ± 2	$2,0 \pm 0,2$	16 ± 2
25	5 ± 1	29 ± 4	6 ± 1	35 ± 4
42	10 ± 1	75 ± 8	15 ± 2	90 ± 9

Sendo assim, na presença do DNA consideramos a existência na solução de ao menos quatro espécies em equilíbrio: os monômeros de AL livre e agregados, os monômeros e agregados ligados ao DNA.

O complexo comportamento da AL na presença de DNA não pode ser descrito por apenas duas espécies. Na hipótese de assumirmos que somente duas espécies de AL em solução, livre e ligada ao DNA, com diferentes coeficientes de absorção molar (ε_f e ε_b). Tal hipótese resultaria que em qualquer comprimento de onda escolhido somente o aumento ou diminuição da absorbância inicial A_0 deveria ser observado com o aumento da concentração de DNA. Escrevendo a equação para a absorbância em um comprimento de onda qualquer e caminho óptico $l = 1$ cm:

$$A = \varepsilon_f ([AL]_0 - [AL]_b) + \varepsilon_b [AL]_b = \varepsilon_f [AL]_0 + (\varepsilon_b - \varepsilon_f)[AL]_b \quad (7.11)$$

onde $[AL]_0$ e $[AL]_b$ são as concentrações de AL total e ligada, respectivamente; $[AL]_b$, conseqüentemente, aumenta com o crescimento de [DNA].

No caso de $\varepsilon_f < \varepsilon_b$ observaremos um aumento da absorbância com o aumento de [DNA]. No caso contrário, $\varepsilon_f > \varepsilon_b$, observamos somente sua diminuição. Ressaltando que, para um comprimento de onda fixo, a adição de DNA induz a redução da absorção da AL. Adicionando mais DNA observaremos o crescimento da absorção, o que permite concluir que existem mais de duas espécies de AL presentes.

Logo, além da forma de agregados livres da AL existindo anteriormente em solução, o DNA em baixas concentrações estimula a formação de agregados de AL ligados a si, descrito pelo conjunto de equilíbrio:

onde $K_n = k_n/k_{-n}$ é a constante de equilíbrio e k_n , k_{-n} são as constantes elementares da enésima reação (n). Este efeito pode ser explicado pela redução da repulsão eletrostática entre as moléculas do corante no seu sítio de ligação eletronegativo das moléculas de DNA [23,65,126,135,152,154,183-189].

A espécie com $\lambda_{max} = 500$ nm, presente com o aumento ulterior da concentração de DNA, deve ser os monômeros de AL ligados formados devido à separação dos agregados de AL dos sítios de ligação pelo excesso de DNA.

A figura 7.12 apresenta o espectro de fluorescência da AL e a integral da intensidade de fluorescência em função da concentração de DNA.

Figura 7.12. Espectro de fluorescência (A) e integral da intensidade de fluorescência (B) para solução de 25 μM de AL em função de [DNA] em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5 mM na ausência de NaCl ($\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$).

Em baixa força iônica e na ausência de DNA, os monômeros de AL possuem uma fluorescência intensa com o máximo em $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$. A adição de DNA inicialmente reduz a intensidade de fluorescência (I_{flcorr}). Continuando a adição de DNA, I_{flcorr} aumenta. O valor mínimo da I_{flcorr} ocorre em $[\text{DNA}]/[\text{AL}] \approx (0,30 \pm 0,05)$, coincidindo com o valor observado nos experimentos de absorção óptica e estando associado com o ponto de maior presença de agregados da AL. A curva da integral da intensidade fluorescência pela concentração de DNA foi ajustada pela equação (7.13), sendo esta similar a equação (7.10):

$$I = I_0 \exp\left(-\frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_1}\right) + I_\infty \left[1 - \exp\left(-\frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_2}\right)\right] \quad (7.13)$$

onde I_0 e I_∞ são as intensidades de fluorescência na ausência e no excesso de DNA, respectivamente.

O ajuste dos dados experimentais da fluorescência com a equação 7.13 permite identificar os valores característicos para as concentrações $[\text{DNA}]_1$ e $[\text{DNA}]_2$ de DNA. Obtivemos valores próximos aos obtidos nos experimentos de absorção óptica, como pode-se observar na tabela 7.4.

Alguns artigos [188-192] explicam a redução da intensidade de fluorescência da AL e derivados da mesma na ligação com os sítios de DNA pela ligação do corante com os pares de guanina-citosina (G-C). Nos sítios G-C a fluorescência do corante é suprimido por sua interação com a guanina. Entretanto, esse único efeito não explica o aumento da fluorescência com o consequente aumento de DNA. Concordamos com as conclusões descritas em [135,154,193,194], de que a redução da fluorescência do corante é resultado de sua agregação estimulado pela interação com o DNA.

7.2.2 Efeitos do DNA nas características espectrais da AL na presença de sal

Na ausência de DNA, sais inorgânicos estimulam a agregação da AL, consequentemente reduzindo a razão $A_{490\text{ nm}}/A_{475\text{ nm}}$, descrito no subcapítulo anterior. Como exemplo citamos que o perfil do espectro de absorção para $[AL] = 25\text{ }\mu\text{M}$ (figura 7.13A, curva preta) claramente manifesta a agregação da AL. Sendo ainda que o sal suprime a fluorescência da AL de acordo com dois mecanismos: estimulando a agregação da AL e formação de complexos de transferência de carga (exciplexo) entre o estado excitado singlete S_1^* da AL e o ânion do sal [15].

De forma distinta do que no caso da ausência do sal, a adição de DNA à solução de AL na presença de NaCl induz apenas o aumento do valor de $A_{490\text{ nm}}/A_{475\text{ nm}}$, indicando a desagregação da AL. O deslocamento espectral do máximo de absorção para 500 nm (figura 7.13A) demonstra a ligação da AL ao DNA.

Figura 7.13. Espectro de absorção da AL (A) e absorbância em $\lambda = 500\text{ nm}$ (B) para a solução de $25\text{ }\mu\text{M}$ de AL em função da $[DNA]$ em pH 6,8 e 7,5 mM de tampão fosfato na presença de 0,5 M de NaCl.

A adição de DNA na presença de sal apenas aumenta a intensidade de fluorescência e induz um leve deslocamento do seu pico de 530 para 528 nm (figura 7.14A). Esse aumento pode estar associado com a desagregação da AL induzida por DNA como indicado pelos dados de absorção óptica e, provavelmente, pela proteção das molécula de AL contra o contato com os ânions do sal, impedindo a formação dos exciplexos.

Figura 7.14. Espectro de fluorescência (A) e integral do espectro de intensidade da fluorescência (B) para solução de 25 μM de AL em função de [DNA] em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5 mM com 0,5 M de NaCl ($\lambda_{\text{ex}} = 420 \text{ nm}$).

Na presença de NaCl, a dependência da absorbância e intensidade de fluorescência da AL com a concentração de DNA foi ajustada com êxito como uma monoexponencial para todas as concentrações de AL e sal analisadas (Fig. 3B, 4B):

$$\frac{A_{490\text{nm}}}{A_{475\text{nm}}} = \left(\frac{A_{490\text{nm}}}{A_{475\text{nm}}} \right)_0 + \left\{ \left(\frac{A_{490\text{nm}}}{A_{475\text{nm}}} \right)_\infty - \left(\frac{A_{490\text{nm}}}{A_{475\text{nm}}} \right)_0 \right\} \left[1 - \exp\left(-\frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_2} \right) \right] \quad (7.14)$$

$$I = I_0 + \{I_\infty - I_0\} \left[1 - \exp\left(-\frac{[\text{DNA}]}{[\text{DNA}]_2} \right) \right] \quad (7.15)$$

A presença nas equações acima (7.14) e (7.15) de apenas um membro dependente da concentração de DNA está em acordo com nossa suposição de que na presença de sal o DNA somente reduz a agregação da AL em favor dos monômeros ligados a diferentes sítios do DNA.

A concentração característica do DNA, $[\text{DNA}]_2$, é maior do que na ausência de sal e aumenta com as concentrações de sal e AL (tabela 7.5).

Tabela 7.5. Concentrações características de DNA para a desagregação da AL e ligação ao DNA ($[DNA]_2$) na presença de NaCl em função das concentrações de AL e NaCl.

$[AL]$, (μM)	$[NaCl]$, (M)	$[DNA]_2$, (μM)	
		Absorção	Fluorescência
8	0,05	16 $\pm$ 1	17 $\pm$ 2
	0,2	32 $\pm$ 1	35 $\pm$ 3
	0,5	61 $\pm$ 5	64 $\pm$ 15
10	0,5	77 $\pm$ 5	
25	0,05	40 $\pm$ 2	
	0,2	58 $\pm$ 2	
	0,5	140 $\pm$ 6	
42	0,5	135 $\pm$ 5	

Podemos concluir que o NaCl dificulta a ligação da AL ao DNA e diminui a agregação do corante. Tal suposição foi confirmada pelos resultados obtidos com a técnica de ERL.

7.2.3 Espalhamento Ressonante da Luz da AL

Na ausência de sal, o DNA em baixas concentrações aumenta a intensidade ERL da AL (figura 7.15A,B). Esse aumento confirma nossa hipótese de que a interação com o DNA estimula a agregação da AL, também respaldado pelos dados de absorção óptica e fluorescência. A adição subsequente de DNA reduz a intensidade do ERL, indicando a desagregação da AL em favor dos monômeros da AL ligados ao DNA. Adições posteriores de DNA induzem um aumento gradativo da intensidade de ERL devido ao crescimento do número moléculas de DNA. Na presença de sal, somente esse aumento gradual foi observado (figura 7.15B), demonstrando que nesse caso o DNA não estimula a agregação da AL.

Figura 7.15. Intensidade de Espalhamento Ressonante da Luz (ERL) (A) e integral do espectro do ERL (B) para solução de $[AL]=25 \mu\text{M}$ em função do $[DNA]$ em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5 mM na ausência e na presença de 0,5 M de NaCl.

A redução da probabilidade de ligação da AL ao DNA deve se refletir na constante de equilíbrio K_1 , diminuindo-a. Para confirmar essa hipótese, calculamos as constantes de ligação da AL com DNA na ausência e na presença de NaCl.

A constante K_1 foi calculada usando a seguinte equação [195]:

$$\frac{1}{I-I_{min}} = \frac{1}{I_{max}-I_{min}} + \frac{1}{I_{max}-I_{min}} \times \frac{1}{K_1[DNA]} \quad (7.16)$$

onde I é a integral da intensidade de fluorescência da AL atual para uma concentração de AL fixa e variando-se a concentração de DNA; I_{min} e I_{max} as integrais da intensidade de fluorescência da AL na ausência de DNA e em seu excesso, respectivamente.

A equação 7.16 pode ser utilizada para soluções com apenas duas espécies do FS presentes em equilíbrio: monômeros ligados e livre, com uma concentração inicial de monômeros conhecida. Todavia, a agregação torna a concentração inicial de monômeros indefinida. Mais ainda, a agregação introduz erros no cálculo da constante de ligação, reduzindo seu valor devido à redução da concentração inicial de monômeros, podendo esse efeito ser observado em [14]. Sendo assim, a equação (7.16) pode ser aplicada somente em concentrações de AL extremamente baixas, quando sua agregação é desprezível. Com o intuito de excluir os efeitos da agregação, conduzimos experimentos com $[AL] = 1,0 \mu\text{M}$, cuja agregação é mínima. Nesse experimento específico, utilizamos uma cubeta de caminho óptico de 10 cm, para melhorar a resolução das medidas de absorção óptica. Na figura 7.16 apresentamos as dependências lineares de $\frac{1}{I-I_{min}}$ para com $\frac{1}{[DNA]}$.

Figura 7.16. Dependências da $\frac{1}{I-I_{min}}$ para com $\frac{1}{[DNA]}$ na ausência de NaCl (A) e na presença de 0,5 M de NaCl (B).

Na presença de $[NaCl] = 0,5 \text{ M}$ o valor de K_I reduz-se 24 vezes, confirmando nossa hipótese acima.

A redução da constante de ligação com o aumento da força iônica deve estar associado com a interação eletrostática entre os íons do sal, aos centros carregados do DNA e a pequenas moléculas interagindo com o DNA. Logo, a fita dupla do DNA tem menor estabilidade à baixa força iônica por conta de maiores interações repulsivas entre os grupos fosfatos e enfraquecimento das interações entre as bases nitrogenadas, desestabilizando a fita dupla e facilitando a intercalação de pequenas moléculas. Por outro lado, a ligação na superfície precede a intercalação e os efeitos repulsivos entre os cátions do sal aglomerados próximos aos sítios negativamente carregados do DNA pode reduzir a probabilidade de ligação à superfície de pequenas moléculas positivamente carregadas por conta da repulsão eletrostática. O deslocamento efetivo de pequenas moléculas de AL por cátions de metais, incluindo Na^+ , dos sítios de ligação do DNA foi já demonstrado [180,181]. Efeitos do sal similares aos observados nesse estudo também foi reportado para porfirinas positivamente carregadas e biscianinas com DNA [18,23,70,152].

7.2.4 Cinéticas do decaimento da fluorescência

Na ausência de DNA, as cinéticas de decaimento da fluorescência da AL tanto na ausência quanto na presença de NaCl apresentam-se como monoexponencial com o tempo de vida $\tau_0 = 1,8 \pm 0,2 \text{ ns}$.

Na presença de DNA, as cinéticas de decaimento da fluorescência da AL possui um caráter bi-exponencial em ambas situações, tanto na presença quanto na ausência de NaCl.

$$I = I_1 e^{-t/\tau_1} + I_2 e^{-t/\tau_2} \quad (7.17)$$

Os tempos de vida das componentes são $\tau_1 = 1,8 \pm 0,2$ ns e $\tau_2 = 5,4 \pm 0,5$ ns (figura 7.17). A contribuição da componente de tempo de vida curta reduziu-se com o aumento da concentração de DNA (figura 7.17B), tendo sido calculada como $I_1/(I_1 + I_2)$, enquanto que a contribuição da componente do tempo de vida longo, calculada como $I_2/(I_1 + I_2)$, aumentou. Efeito semelhante fora observado na presença de NaCl.

Figura 7.17. Perfil de decaimento da fluorescência da $[AL]=5 \mu M$ na presença de $[DNA] = 100 \mu M$ (A) e contribuição das componentes de decaimento dos tempos de vida curto (τ_1) e de longa-vida (τ_2) em função da concentração de DNA na ausência e na presença de 0,5 M de NaCl (B).

O comportamento bi-exponencial da cinética de decaimento não pode estar associado com a presença de agregados da AL, sendo que os tempos de vida dos estados excitados dos agregados são sempre mais curtos que o tempo de vida dos monômeros livres do corante [19,20].

É conhecido que a molécula de DNA possui sítios de ligação na superfície que podem ser colocados na ordem de sua eletronegatividade, como G-C (sulco principal) $\geq$ A-T (sulco menor) $\gg$ G-C (sulco menor) $\geq$ A-T (sulco principal). O caráter bi-exponencial da cinética de decaimento da fluorescência da AL pode estar associado com a ligação da molécula de AL ligando-se a dois tipos distintos de sítios de DNA, tal como os pares G-C e A-T, por exemplo [166,188-192]. Contudo, nesse caso haveria o aumento simultâneo da concentração de ambos os sítios G-C e A-T com o aumento da concentração de DNA. De fato, o processo de ligação da AL à dois sítios distintos pode ser descrito com as seguintes constantes de equilíbrios:

onde $DNA(GC)$ e $DNA(AT)$ são dois tipos de sítios de ligação, sendo K_1 e K_2 as constantes de equilíbrio para o primeiro e segundo tipo, respectivamente.

Uma simples análise desse conjunto demonstra que a razão entre as concentrações das moléculas de AL ligadas ao primeiro $[AL \dots DNA(GC)]$ e ao segundo sítio $[AL \dots DNA(AT)]$ pode ser descrito como:

$$\frac{[AL \dots DNA(GC)]}{[AL \dots DNA(AT)]} = \frac{K_1}{K_2} \quad (7.20)$$

Demonstrando que as contribuições dos sítios $[AL \dots DNA(GC)]$ e $[AL \dots DNA(AT)]$ são independentes da concentração de DNA.

A AL pode se ligar tanto na superfície do DNA quanto se intercalar entre seus pares de bases [76,82,137,154,166,167], possibilitando que, hipoteticamente, os tempos de vida estejam associados com a AL ligada à superfície do DNA ou intercalada. Nesse caso, a reação seguiria o seguinte esquema:

Porém, nesse caso a razão $\frac{[AL \dots DNA]_{intercalado}}{[AL \dots DNA]_{superfície}} = K_2$ também seria independente da concentração de DNA.

Nenhum dos mecanismos apresentados consegue explicar a dependência da concentração de DNA da curva de decaimento da fluorescência.

Associamos a primeira componente com o monômero de AL e a segunda com o monômero ligado ao DNA. As contribuições das componentes mudam de forma mais gradativa na presença do sal do que na sua ausência, confirmando a diminuição de K_1 devido à competição do sal com a AL pelos sítios do DNA.

7.2.5 Supressões da fluorescência e do estado tripleto da AL

Por meio do radical livre TEMPO como supressor do estado excitado, conseguimos determinar as constantes de supressão bimolecular da fluorescência (k_{qf}) e do estado tripleto

(k_{qT}) da AL em função da concentração do DNA.

Nos experimentos de fluorescência, utilizamos o seguinte procedimento:

1. Nos experimentos de estado estacionário com uma concentração fixa de DNA, a constante supressão de Stern-Vomer K_{SV} foi determinada seguindo a equação:

$$\frac{I_0}{I_q} - 1 = K_{SV}[Q] \quad (7.22)$$

onde I_0 e I_q são as intensidade de fluorescência integradas na ausência e na presença do supressor, respectivamente; e $[Q]$ é a concentração do supressor.

2. Dos valores de K_{SV} , k_{qfl} foi determinado da seguinte equação:

$$k_{qfl} = \frac{K_{SV}}{\langle \tau \rangle} \quad (7.23)$$

onde $\langle \tau \rangle$ é o tempo de vida médio da fluorescência da AL na ausência do supressor, calculado como [19]:

$$\langle \tau \rangle = \frac{(I_1 \tau_1^2 + I_2 \tau_2^2)}{(I_1 \tau_1 + I_2 \tau_2)} \quad (7.24)$$

onde τ_1 e τ_2 são as componentes do tempo de vida, I_1 e I_2 são suas amplitudes relativas.

Observamos que na ausência do NaCl, houve uma redução de 6,0 vezes no valor de k_{qfl} com o aumento da concentração de DNA de 0 à 46 μM . Na presença de 0,2 M de NaCl, k_{qfl} foi reduzido 4,3 vezes com [DNA] aumentando de 0 à 160 μM (tabela 7.6).

Tabela 7.6. Tempo de vida médio (τ) e constantes bimoleculares de supressão da fluorescência (k_{qfl}) e estado tripleto (k_{qT}) da solução de 2,7 μ M de AL em função da concentração do DNA em pH 6,8 e 7,5 mM de tampão fosfato.

$[NaCl] = 0 \text{ M}$				$[NaCl] = 0,2 \text{ M}$			
$[DNA],$ M	$\tau,$ ns	$k_{qfl}^*,$ $M^{-1}s^{-1}$	$k_{qT}^*,$ $M^{-1}s^{-1}$	$[DNA],$ M	$\tau,$ ns	$k_{qfl}^*,$ $M^{-1}s^{-1}$	$k_{qT}^*,$ $M^{-1}s^{-1}$
0	1,9	$1,2 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^9$	0	1,9	$1,3 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^9$
$4,7 \times 10^{-6}$	1,8	$0,8 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^{-5}$	2,1	$1,2 \times 10^{10}$	$7,0 \times 10^8$
$2,4 \times 10^{-5}$	4,5	$0,3 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^7$	$8,5 \times 10^{-5}$	4,2	$0,4 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^8$
$4,6 \times 10^{-5}$	4,5	$0,2 \times 10^{10}$	$3,0 \times 10^7$	$1,6 \times 10^{-4}$	4,9	$0,3 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^8$

^{*)} Erro de definição é de 10%

O efeito do DNA é muito mais pronunciado na supressão do estado tripleto da AL. A dinâmica do decaimento do estado tripleto da AL na presença do DNA já foi estudada por [183]. Foi demonstrado que o tempo de vida do tripleto (τ_T) aumenta com o crescimento de $[DNA]$, sendo o perfil da curva de decaimento sempre mono-exponencial (figura 7.18). Esse efeito decorre da dinâmica de equilíbrio entre as moléculas de AL excitadas e não-excitadas, livres e ligadas. Com base de que o tempo de vida do estado tripleto é cinco ou seis ordens de magnitudes maior do que o tempo de vida do estado singleto, o sistema é capaz de alcançar o equilíbrio durante o tempo de vida do estado tripleto.

Figura 7.18. Perfil normalizado do decaimento do estado tripleto de 2,7 μ M de AL em solução desoxigenada ($\lambda_{reg} = 425 \text{ nm}$, $\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$) na presença de 160 μ M de DNA em pH 6,8 e tampão fosfato de 7,5 mM (A), resíduos da cinética de decaimento para o ajuste mono-exponencial (B). Medidas realizadas na ausência de NaCl.

A constante de supressão bimolecular do estado tripleto da AL, k_{qT} , para uma concentração fixa de DNA foi calculada a partir da equação:

$$k_T = k_{T0} + k_{qT}[Q] \quad (7.25)$$

onde $k_{T0}=1/\tau_{T0}$ e $k_T=1/\tau_T$ são as constantes de decaimento do tripleto na ausência e na presença do supressor, respectivamente; sendo $[Q]$ a concentração do supressor.

Na tabela 7.6, pode-se verificar que na ausência de NaCl o aumento da concentração de DNA de 0 para 46 μM provoca uma redução de 33 vezes de k_{qT} , enquanto que na presença de 0,2 M de NaCl, essa redução é somente de uma ordem de magnitude com o aumento da concentração de DNA de 0 para 160 μM .

A redução de k_{qfl} e k_{qT} com o aumento da concentração de DNA pode estar associada com uma maior viscosidade da solução. Todavia, realizamos medidas da viscosidade da solução utilizando um viscosímetro de fluxo demonstraram que o efeito do DNA sob a viscosidade da solução era desprezível até $[\text{DNA}] = 300 \mu\text{M}$, concentração maior do que a dos experimentos de supressão.

Pode-se supor que a redução de k_{qfl} e k_{qT} com o aumento da concentração de DNA pode ser indicativo da agregação do DNA em torno das moléculas de AL. A agregação do DNA estimulada pela ligação da AL pode se tornar uma barreira para o contato do supressor com as moléculas de AL, diminuindo a eficiência da supressão dos estados excitados da AL. Efeito similar já fora descrito para supressão dos estados excitados das porfirinas [18].

A agregação do DNA estimulada pela interação com outras moléculas está bem documentada [196-200], mais ainda, esse efeito é fundamental para a aplicação do DNA em novas tecnologias [172-177].

O maior tempo de vida do estado tripleto, se comparado com o tempo de vida do singleto, decorre de que a supressão do estado tripleto ser mais susceptível a ser suprimida. A ligação com o DNA protegeria o corante do supressor. Na presença do sal, a ligação da AL com o DNA é reduzida, requerendo assim um maior concentração de DNA para alcançar os mesmos valores de k_{qfl} e k_{qT} .

Para averiguar tal hipótese, conduzimos experimentos utilizando a técnica de ECF, baseada na função de auto-correlação $G(\tau)$:

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \delta F(t+\tau) \rangle}{\langle \delta F(t) \rangle^2} \quad (7.26)$$

onde $F(t)$ e $F(t + \tau)$ são as intensidades de fluorescência para os momentos t e $(t + \tau)$, respectivamente.

O coeficiente de difusão D foi determinado de acordo com [201]. Utilizamos os tempos de vida médio definidos segundo a equação (7.24). Para obter os coeficientes de difusão, os dados foram processados pelo sistema operacional (SymPhoTime, PicoQuant). Dos valores de D , o raio hidrodinâmico R_H para o monômero da AL e o complexo AL+DNA foi calculado a partir da equação de Stokes-Einstein.

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (7.27)$$

onde k é constante de Boltzmann; e η a viscosidade da solução.

Os dados da ECF demonstram a presença de três tipos de partículas na solução da AL na ausência e na presença de DNA (figura 7.19). De forma distinta à técnica de espalhamento dinâmico da luz (EDL), a técnica de ECF somente detecta as partículas fluorescentes. Com o auxílio de um filtro óptico de transmitância $\lambda > 480$ nm, somente partículas contendo AL foram observadas.

Figura 7.19. Curvas de correlação da ECF para soluções de 50 nm de AL na ausência de DNA (A) e na presença de 1,0 μ M de DNA (B).

O raio hidrodinâmico $R_H = (1,0 \pm 0,2)$ nm determinado para a partícula na ausência de DNA é próximo ao raio do monômero da AL $R_H = 0,692$ nm observado por [163,202], o que nos permite associá-lo com o monômero da AL livre. O raio $R_H = (460 \pm 50)$ nm determinado, característico de moléculas de DNA [203,204], pode ser associado com AL ligada com moléculas de DNA [204]. Foram observadas partículas com $R_H = (900 \pm 100)$ nm, que é duas

vezes maior que o complexo AL-DNA mencionado. Acreditamos que este resultado pode estar associado com agregados de DNA formados devido à ligação da AL com o DNA. A equação (7.27), aplicada para calcular os raios hidrodinâmicos, foi criada supondo partículas de formato esférico, que não é o caso do complexo AL-DNA. Sendo assim, só podemos afirmar que houve um aumento de duas vezes do raio hidrodinâmico efetivo das partículas espalhadoras e permanecendo indefinido o número de agregação do DNA.

Finalmente, de acordo com o conjunto de equilíbrio para baixas concentrações de DNA, o equilíbrio entre monômeros de AL ligados e livres e os agregados de AL deve se apresentar como:

$$[AL \dots DNA] = K_1 [AL] * [DNA] \quad (7.28)$$

$$[2AL \dots DNA] = K_2 [AL] * [AL \dots DNA] = K_1 K_2 [AL]^2 * [DNA] \quad (7.29)$$

$$[nAL \dots DNA] = (\prod_{i=1}^n K_i) [AL]^n * [DNA] \quad (7.30)$$

O aumento da concentração de DNA estimula a desagregação da AL em favor dos monômeros de AL ligados ao DNA. O aumento consequente da concentração de DNA induz a agregação do DNA em torno dos monômeros de AL, esses ligados ao DNA, de acordo com a série de equilíbrio:

Formalmente, foi demonstrado que a presença de sais inorgânicos em soluções aquosas homogêneas estimula a agregação da AL [15]. Entretanto, na presença de DNA os efeitos do sal são opostos. O NaCl reduz a agregação da AL induzida pela interação com o DNA, reduzindo a probabilidade de ambos, AL e DNA, agregarem.

7.3 Agregação da Acridina Laranja na presença de SDS em solução aquosa

As ações de compostos bioativos nas células são intermediadas pela sua interação com a membrana celular. Por esse motivo, o estudo das interações da AL com membranas celulares é de especial interesse. Devido à complexidade da estrutura da membrana, modelos simplificados desta são amplamente utilizados. Entre esses modelos, as micelas se apresentam como uma boa candidata para mimetizar as características estruturais da membrana [205-207]. Nesse sub-capítulo investigamos a interação da AL com o SDS, identificando uma dinâmica que pode perdurar até várias horas. Apesar da interação da AL com o SDS ter sido extensivamente estudado, encontramos pouca informação na literatura sobre essa dinâmica

prolongada.

7.3.1. Caracterização espectroscópica da agregação do sistema AL+SDS

Os espectros de absorção da AL em solução homogênea está bem documentado e discutido na literatura e já foram analisados e caracterizados na sessão anterior (veja sessão 7.1). As mudanças espectrais provocadas pela interação da AL com o SDS já foram observadas, começando com os trabalhos pioneiros de Robinson [47, 208] e Moulik [209].

A adição de SDS induz mudanças complexas nos espectros de absorção da AL, fluorescência e espalhamentos ressonante da luz. Tais mudanças são dependentes da razão $[SDS]/[AL]$. Podemos estabelecer três diferentes estágios da interação do SDS com a AL [figura 7.20]:

1. Em concentrações baixas de SDS ($\approx 60 \mu M$), em razões $[SDS]/[AL] \leq 1$, ou até uma molécula de SDS para uma de AL, observamos o aumento relativo do pico da AL relacionado à sua forma monomérica em relação ao pico referente ao agregados, sendo este um indicativo de que em baixas concentrações o SDS induz a desagregação da AL. Este efeito pode estar associado à redução da constante dielétrica da solução induzido pelo tensoativo em baixas concentrações [210,211]. Essa hipótese foi confirmada analisando os espectros de AL em soluções mistas com diferentes proporções de água com etanol (figura 7.21).
2. Em concentrações de SDS entre uma molécula de SDS para uma de AL e cinquenta moléculas de SDS para uma de AL ($1 \leq [SDS]/[AL] \leq 50$), o SDS induz a agregação da AL.
3. Em concentrações de SDS acima de cinquenta moléculas de SDS para uma de AL ($[SDS]/[AL] \geq 50$), inicia um processo de desagregação da AL, atingindo uma população da sua forma monomérica ainda maior do que na ausência de SDS.

Figura 7.20. Espectro de absorção da $[AL]=54 \mu M$ na presença de $[SDS]=0-10 \text{ mM}$ (A). Razão $\frac{A_{490 \text{ nm}}}{A_{470 \text{ nm}}}$ para a $[AL]=54 \mu M$ na presença de $[SDS]=0-10 \text{ mM}$ (B).

Figura 7.21. Espectro de absorção da $[AL] = 32 \mu M$ em diferentes proporções de água/etanol (A) e razões entre as intensidades de absorbância dos picos 472 nm e 490 nm da $[AL] = 54 \mu M$ em diferentes proporções água/etanol.

Nas figuras 7.22A,B estão representados os espectros de fluorescência e de ERL da AL na presença de SDS. O espectro do ERL da AL aumenta com a formação dos agregados, devido a partículas maiores espalharem mais luz.

Figura 7.22. (A) espectros de fluorescência da $[AL] = 32 \mu M$ na presença de $[SDS] = 0-10 \text{ mM}$ corrigidos por $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$ (A); (inserção A) área sob a curva dos espectros de fluorescência para $[AL] = 14-73 \mu M$ na presença de $[SDS] = 0-10 \text{ mM}$, corrigidos por $\lambda_{ex} = 380 \text{ nm}$; (B) espectro de ERL da $[AL] = 14 \mu M$ na presença de $[SDS] = 0-10 \text{ mM}$; (inserção B) integral do espectro de ERL da $[AL] = 5-73 \mu M$ na presença de $[SDS] = 0-10 \text{ mM}$.

O espectro de fluorescência da AL diminui com a formação dos agregados, devido ao agregado aumentar as taxas de decaimento não-radiativo. Podemos observar pelas figuras apresentadas que ambas as técnicas demonstram a formação de agregados com baixas adições de SDS até o valor de $[SDS] \approx 3 \text{ mM}$. Pela técnica de fluorescência, figura 7.22A, podemos observar que o efeito de desagregação da AL induzido pelo SDS satura em $\approx 7 \text{ mM}$, não havendo mudanças significativas acima desse valor.

O SDS atinge sua CMC por volta de $\approx 10 \text{ mM}$. Tal valor pode ser modificado devido as

características do ambiente, como a presença de sais [111]. Nesta situação, podemos supor que atingimos a CMC partir de ≈ 7 mM.

O valor máximo da integral da intensidade de fluorescência da AL na presença de SDS chega a ser 50% maior para as concentrações de AL 14 μ M e 32 μ M e 100% maior para as concentrações de AL 57 μ M e 73 μ M, quando comparadas com o valor na ausência de SDS (figura 7.22A, inserção). Esse efeito é devido à maior agregação da AL em maiores concentrações (figura 7.22A, inserção). Assim, na presença de micelas de SDS o efeito de desagregação é maior comparado ao caso das baixas concentrações de AL.

A intensidade de ERL da AL aumenta com a concentração da mesma, atingindo seu apogeu com as concentrações de SDS segundo a tabela 7.7. Também podemos observar que a concentração de SDS necessária para atingir o máximo de agregação da AL+SDS aumenta com a concentração de AL, todavia, não de forma linear.

Tabela 7.7. Concentrações aproximadas de SDS para o máximo da intensidade integrada de ERL (máximo de agregação) da AL em função da concentração da AL.

[SDS], μ M	[AL], μ M
500	5
650	14
1000	32
1125	54
1200	73

Segundo a equação 7.32, podemos identificar o valor médio do número de agregação n_{ag} da AL.

$$n_{ag} = \frac{I_{ERLag}}{I_{ERLm}} \quad (7.32)$$

onde I_{ERLag} e I_{ERLm} são as intensidades integradas de ERL do agregado e do monômero de AL, respectivamente.

Utilizando a equação 7.32 encontramos um $n_{ag} \approx 6$ e 11 para as concentrações de AL de 5 μ M e 14 μ M, respectivamente. Para as concentrações de 32 μ M à 73 μ M encontramos o mesmo n_{ag} , de aproximadamente 15, indicando um limite para o tamanho dos agregados. É importante ressaltar que com o aumento da concentração de AL o efeito de filtro interno torna-se bastante intenso, absorvendo a luz espalhada e contribuindo assim para subestimar o valor do n_{ag} calculado.

7.3.1.1 Dinâmica da agregação do sistema AL+SDS

O processo de formação dos agregados possui uma dependência temporal complexa que pode ser ajustada por uma função tri-exponencial, demonstrando a formação sequencial de quatro formas distintas de agregados. Os tempos característicos de agregação variam de segundos à horas. O ajuste das curvas como tri-exponencial nos indica que há mais de um processo ocorrendo no agregado com o tempo. Podemos supor que a estrutura espacial do agregado muda com o tempo, assim como há mudanças no número de agregação.

A adição de SDS, primeiramente, causa uma mudança abrupta na intensidade de absorção da AL, tal mudança acontece em tempos menores do que o tempo de aquisição do espectrofotômetro que é de aproximadamente 40s. O perfil e a profundidade da mudança depende da razão entre as concentrações $[SDS]/[AL]$.

Figura 7.23. Espectros de absorção da $[AL]=32 \mu M$ na presença de $[SDS]=0,5 mM$ monitorado durante ≈ 12 horas (A). Espectro de absorção da $[AL]=54 \mu M$ na presença de $[SDS]=0,05 mM$ monitorados durante 1,5 hora (B).

Analisando as mudanças no espectro de absorção em função do tempo em diferentes comprimentos de onda, encontramos que o perfil das curvas possui uma dependência com o comprimento de onda (figura 7.24).

Figura 7.24. Variações temporais das absorbâncias $A_{268 \text{ nm}}$ (A) e $A_{565 \text{ nm}}$ (B) da $[AL]=32 \mu\text{M}$ na presença do $[SDS]=0,1 \text{ mM}$ monitorados durante ≈ 10 horas.

Os três tempos característicos das curvas da dinâmica de agregação são os mesmos para qualquer comprimento de onda analisado, todavia, os fatores pré-exponenciais são dependentes do comprimento de onda do qual está sendo realizada a análise. Na tabela 7.8 apresentamos as três componentes características das curvas cinéticas da AL+SDS para diferentes concentrações de AL e SDS monitoradas pela técnica de absorção óptica.

Tabela 7.8. Tempos característicos da dinâmica de agregação para $[AL]=14\text{-}74 \mu\text{M}$ com $[SDS]=0,1\text{-}1 \text{ mM}$ pelo método de absorção óptica.

[SDS]	[AL], (μM)	t_1 , (min)	t_2 , (min)	t_3 , (min)
100 μM	14	$1,3 \pm 0,6$	40 ± 3	320 ± 30
	32	$2,11 \pm 0,08$	$22,2 \pm 0,6$	236 ± 7
	74	$2,16 \pm 0,06$	$19,3 \pm 0,6$	208 ± 8
500 μM	14	$3,4 \pm 0,2$	61 ± 5	340 ± 34
	32	2 ± 2	24 ± 1	320 ± 4
	74	4 ± 2	41 ± 2	245 ± 6
1000 μM	14	$0,7 \pm 0,2$	35 ± 3	560 ± 30
	74	3 ± 1	39 ± 2	394 ± 8

Observamos que os tempos t_1 e t_2 não possuem mudanças significativas com as mudanças de concentrações da AL e SDS. Entretanto, o tempo t_3 diminui com o aumento da concentração da AL para a mesma concentração do SDS, além disso, t_3 aumenta com o aumento da concentração do SDS para mesma concentração da AL.

A partir da análise temporal identificamos que a espécie inicial do agregado forma

quatro espécies sequencialmente.

A dinâmica de transformação dos agregados, como descrito anteriormente para o caso da técnica de absorção óptica, sob a adição inicial de SDS induz um aumento abrupto da intensidade de ERL. Tal mudança acontece num período de tempo menor que o tempo de aquisição do aparelho. Após a rápida mudança inicial, a dinâmica continua perdurando por diversas horas, como demonstrado na figura 7.25 em que monitoramos a amostra por aproximadamente 10 horas.

Figura 7.25. Espectro do ERL da $[AL]=32 \mu M$ monitorados durante ≈ 10 horas.

A análise da curva cinética do ERL (figuras 7.26A,B) mostra que a dinâmica de agregação para a mesma concentração da AL depende da concentração do SDS.

Figura 7.26. Integral dos espectros de intensidade de ERL da $[AL]=32 \mu M$ na presença de $50 \mu M$ (A) e $500 \mu M$ (B) de $[SDS]$ monitorados durante ≈ 10 horas.

Apresentamos na figura 7.27 os espectros de ERL de uma única amostra de AL+SDS em diferentes instantes de tempo.

Figura 7.27. Espectros do ERL da $[AL]=32 \mu M$ na presença do $[SDS]=32 \mu M$ em diferentes instantes de tempo.

Divergindo dos resultados obtidos na técnica de absorção óptica, após 30 minutos os espectros de ERL são relativamente semelhantes.

A análise das curvas cinéticas mostra a presença de três tempos, semelhante ao caso da absorção óptica. Na tabela 7.9 apresentamos os valores característicos dos tempos das curvas cinéticas da dinâmica de agregação em diferentes concentrações de SDS para a mesma concentração de $[AL]=32 \mu M$.

Tabela 7.9. Tempos característicos das três componentes das curvas da cinética da $[AL]=32 \mu M$ com $[SDS]=50 \mu M$ - 1 mM.

[SDS]	t_1 , min	t_2 , min	t_3 , min
50 μMol	2 ± 1	12 ± 1	173 ± 6
100 μMol	2 ± 1	17 ± 1	250 ± 10
500 μMol	4 ± 1	89 ± 1	600 ± 100
1000 μMol	4 ± 1	200 ± 20	--

Semelhante aos dados de absorção óptica, a componente temporal t_1 não apresenta uma dependência significativa com a concentração de SDS. Os tempos t_2 e t_3 aumentam com o aumento da concentração de SDS. A influência da concentração de SDS é muito mais pronunciada na técnica de ERL, chegando a uma diferença de aproximadamente 15 vezes para a componente t_2 e 4 vezes para a componente t_3 do que na técnica de absorção óptica, em que a diferença não excedeu 2 vezes.

Os resultados aparentemente divergentes dos tempos da cinética obtidos entre as duas

técnicas, absorção e ERL, podem ser explicados analisando o fundamento de cada técnica, isto é, o que cada uma das técnicas está monitorando.

i) O espectro de absorção óptica é sensível para a geometria espacial do agregado, como as mudanças da estrutura do agregado de H para HJ ou mesmo J. O surgimento do pico de absorção deslocado para comprimentos de onda maiores ($\lambda \approx 550$ nm, figura 7.23) é um indicativo de uma mudança na estrutura espacial do agregado. Nesse caso, o tamanho do agregado possui pouca influência nas mudanças do espectro de absorção, sendo fundamental o micro-ambiente em que o corante está inserido. Mudanças na estrutura espacial do agregado não exigem o contato com outros agregados e, portanto, tem uma fraca dependência com a concentração.

ii) O espectro da intensidade do ERL é sensível ao tamanho do agregado e à diferença do índice de refração entre o meio e a partícula espalhadora. Os espectros de ERL da AL+SDS não apresentam uma mudança significativa do perfil após 30 minutos. Todavia, há mudanças da intensidade, indicando que as mudanças do índice de refração das partículas espalhadoras tem um papel secundário. A dinâmica monitorada é sobretudo devido às mudanças no tamanho dos agregados. Ambos os fenômenos foram observados, de aumento e de diminuição dos agregados. Os tempos t_1 e t_2 apresentaram uma dependência relativa majoritariamente à concentração de [SDS]. A terceira componente temporal, t_3 , é para todas as concentrações de SDS uma diminuição do tamanho do agregado. Esse processo torna-se mais lento com o aumento da concentração de SDS.

7.4 Hipertermia da Acridina Laranja em solução aquosa sob irradiação luminosa

7.4.1. Introdução

Uma hipertermia (HT) localizada consiste na elevação da temperatura local do tecido alvo. Esse aumento pode induzir processos celulares no tecido que resultam na morte celular. Outros fatores como tempo e duração do tratamento também são relevantes. Mesmo gerando uma HT localizada, temperaturas iguais ou acima de 42°C podem induzir a morte dos tecidos sadios marginais ao tumor aquecido [212] e temperaturas acima de 46° podem causar indesejadas necroses do tecido circundante [213]. Resultando que para o tratamento através da HT necessitamos de apenas um pequeno e localizado aumento de temperatura.

As células neoplásicas são mais sensíveis ao aumento de temperatura do que as células sadias [214], principalmente as células das áreas menos vascularizadas do tumor [215]. Isso é uma característica interessante para aplicar HT juntos com o tratamento através da terapia

fotodinâmica (TFD).

A TFD é uma técnica não invasiva baseada na ativação de um FS por luz, que é preferencialmente não-tóxico em seu estado base, previamente administrado ao paciente, com a característica de acumular-se preferencialmente no tecido maligno [216-218]. A TFD pode ser aplicada no tratamento de diversas lesões malignas ou não-malignas [219-221]. A TFD associada à hipertermia (HT) apresenta efeito sinérgico, aumentando a resposta ao tratamento [25,28,35,36,215,222-229].

Estudos recentes demonstraram a possibilidade de utilizar corantes orgânicos complexados à polímeros irradiados com luz infra-vermelha para aplicação de HT [230-232]. Os estudos pioneiros de [25,33,214,215,223,228,233] demonstram a possibilidade de utilizar corantes orgânicos para TFD excitados com intensa luz infra-vermelha para máximo efeito térmico da HT pela absorção associada do corante e da água constituinte do tecido [214,224,234,235].

Investigamos a possibilidade de utilizar a característica de agregação dos corantes cianícos para gerar HT localizada. Observamos que a agregação aumenta a eficiência da conversão fototérmica e protege o corante da fotodegradação. A possibilidade de utilizar um FS com absorção na janela fototerapêutica permite uma maior penetração da luz, assim como um aquecimento mais delimitado devido ao corante se localizar preferencialmente no tumor, inclusive possibilitando escolher o alvo celular como a mitocôndria, membrana celular ou DNA, sendo uma característica mais vantajosa do que utilizar uma fonte de luz no infra-vermelho que aquece toda a região incidente da luz.

Escolhemos a AL como nosso modelo devido a esta estar bem caracterizada na literatura e ser capaz de formar agregados mesmo em sistemas homogêneos. A agregação afeta as características fotofísicas da AL, reduzindo, em particular, o rendimento quântico e tempo de vida dos seus estados excitados devido ao aumento da probabilidade da dissipação da energia por meios não-radiativos, principalmente na forma de calor. A TFD e a HT são dois processos competitivos para a dissipação da energia dos estados excitados da AL, todavia, estas duas terapias associadas possuem efeito sinérgico no tratamento contra o câncer.

Nesse subcapítulo apresentamos um estudo *in vitro* demonstrando como uma característica não-desejada dos FS como a agregação pode potencialmente ser aplicada para gerar calor, permitindo assim um tratamento localizado de HT associado à TFD. Em nosso experimento utilizamos uma fonte de irradiação luminosa em $\lambda=470$ nm de excitação da AL para geração de calor.

7.4.2. Hipertermia da AL-resultados e discussão

A agregação da AL aumenta com a concentração. Demonstramos em trabalhos anteriores que a AL encontra-se predominantemente na forma monomérica na concentração de 5 μM [15]. Iniciamos nossos estudos com a hipótese de que o aumento da agregação protege o corante da fotodegradação e aumenta a eficiência de geração de calor.

Os rendimentos quânticos e os tempos de vida da fluorescência (ϕ_f , τ_f) e do estado tripleto (ϕ_T , τ_T) de uma molécula podem ser apresentados da seguinte forma:

$$\phi_f = k_f / (k_f + k_{CI} + k_{CIS1}) \quad (7.33)$$

onde k_f , k_{CI} e k_{CIS1} são as taxas de fluorescência, conversão interna (CI) e conversão intersistema (CIS), respectivamente.

$$\phi_T = \frac{k_{CIS1}}{k_{CI} + k_f + k_{CIS1} + \sum_i k_{qi} [Q_i]} \quad (7.34)$$

onde k_q e $[Q]$ são a taxa de supressão e a concentração do supressor, respectivamente.

$$\tau_f = 1 / (k_f + k_{CI} + k_{CIS1}) \quad (7.35)$$

$$\tau_T = 1 / (k_{CIS2} + \sum k_{qi} [Q]_i) \quad (7.36)$$

A agregação aumenta a probabilidade de CI e CIS, aumentando as taxas de k_{CI} e k_{CIS} , consequentemente reduzindo ϕ_f , τ_f , ϕ_T e τ_T e aumentando a parte da energia de excitação, que se transforma em calor, induzindo o aumento da temperatura da região irradiada e com o FS.

Na figura 7.28 apresentamos o aumento da temperatura provocada pela AL irradiada em função do tempo.

Figura 7.28. Gráfico da temperatura em função do tempo para $[AL] = 6,5$ à $74 \mu\text{M}$ irradiada em 470 nm por até

50 minutos.

As concentrações de AL de 6,5 e 14 μM apresentam um curva de aquecimento bastante semelhantes. Possivelmente por conta do efeito de fotodegradação ser bastante intenso nessas baixas concentrações, devido a AL estar predominantemente em sua forma monomérica. Outra possibilidade é de que a perda da energia por meios radiativos seja a principal via de desexcitação do FS. Ou ainda de que estejamos no limite de resolução da detecção do aparelho.

Também podemos observar na figura 7.28 que mesmo na maior concentração analisada, a de 74 μM , podemos observar o efeito da fotodecomposição do FS pela diminuição da temperatura nos tempos mais longos.

As curvas de aquecimento aumentam com a elevação da concentração da AL. A análise empírica mostra que a dependência temporal da temperatura está em acordo com a equação:

$$y = A_{10} - A_{10}e^{-k_1 t} \quad (7.37)$$

Tabela 7.10. Aumento da temperatura máxima (T) alcançada para a AL em função da concentração da mesma, taxa de aumento da temperatura (k_1) para diferentes concentrações de AL e respectiva taxa de fotodecomposição (k_2) monitorada em 490 nm em função da concentração de AL.

[AL], (μM)	T, ($^\circ\text{C}$)*	k_1 , (min^{-1}) **	k_2 , (min^{-1}) ***
6,5	0,6 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 5	5,5 $\pm$ 0,1
14	0,7 $\pm$ 0,2	3 $\pm$ 1	8,0 $\pm$ 0,1
31,5	1,1 $\pm$ 0,1	5 $\pm$ 1	19,3 $\pm$ 0,9
54	1,6 $\pm$ 0,1	8 $\pm$ 1	73 $\pm$ 5
74	1,8 $\pm$ 0,1	7 $\pm$ 1	220 $\pm$ 60

*Aumento da temperatura relativo à temperatura do ambiente (25 $^\circ\text{C}$).

** $y = A_{10} - A_{10}e^{-k_1 t}$ (7.37)

*** $y = A_{20}e^{-k_2 t}$ (7.38)

A análise das curvas de aquecimento indica que a agregação auxilia a transformação da energia de excitação em calor, resultando numa maior eficiência para geração de calor.

Na figura 7.28 para todas as concentrações analisadas observamos uma diminuição da temperatura após atingir um *plateau*. Tal redução de temperatura é consequência da fotodecomposição da AL. A análise das curvas de fotodecomposição indicam que a agregação aumenta os tempos da taxa de fotodecomposição da AL, isto é, a agregação protege a AL da fotodecomposição.

Na figura 7.29A apresentamos os espectros de absorção da AL em função do tempo. O

espectro de absorção da AL é a composição do monômero da AL, seus agregados e o fotoproduto formado. Na figura 7.29B apresentamos a variação da $A_{490\text{nm}}$ normalizada da AL para as concentrações de 6,5 à 74 μM . Essas curvas foram ajustadas como mono-exponencial, segundo a equação (7.38).

$$y = A_{20}e^{-k_2t} \quad (7.38)$$

Figura 7.29. Espectro de absorção da $[AL]=14 \mu\text{M}$ em função do tempo (A) e $A_{490 \text{ nm}}$ normalizada da AL para as concentrações de 6,5 à 74 μM (B).

7.5 Investigação dos corantes cianicos com dois cromóforos (biscianinas, BCD)

7.5.1 Espectros de absorção óptica de BCD em solução tampão.

Nessa sessão apresentamos os resultados obtidos pela Érika Ribeiro e Silva e publicados na sua tese de doutorado [236]. Essa parte é necessária para comparar com os resultados obtidos na presença de sal e de SDS.

Os espectros normalizados de absorção óptica do BCD180 em solução tampão são apresentados na figura 7.30A. O corante apresenta uma banda principal em seu espectro, com pico centrado em 633 nm e um ombro em 597 nm. Na figura 7.30B, é apresentado a razão entre as absorbâncias nestes comprimentos de onda ($A_{633 \text{ nm}}/A_{597 \text{ nm}}$) em função da concentração de BCD. Observa-se que o aumento da concentração do corante provoca um aumento relativo da absorção em 597 nm em comparação com a absorção em 633 nm.

Figura 7.30. Espectros de absorção óptica normalizados do BCD180 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre $A_{633\text{ nm}}/A_{597\text{ nm}}$ em função da concentração de BCD (B). Modificado de [236].

O pico em 633 nm está associado com a absorção do monómero do corante. O pico em $\lambda=597\text{ nm}$ está associado com os agregados de corante. A posição desse pico em comprimentos de onda menores que o do monómero indica a formação de agregados H (deslocamento do espectro para o azul).

Na figura 7.31 são apresentados os espectros normalizados (A) e a razão entre as absorbâncias dos picos em função da concentração do BCD150 (B) em tampão PBS.

Figura 7.31. Espectros de absorção óptica normalizados do BCD150 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre $A_{624\text{ nm}}/A_{590\text{ nm}}$ em função da concentração de BCD (B). Modificado de [236].

Semelhante ao BCD180, o pico em 624 nm do BCD150 está associado com a absorção do monómero do corante. A figura 7.31 demonstra a razão entre os picos 624 e 590 nm, indicando que há um aumento relativo da banda em 590 nm, ou seja, há a formação de agregados do tipo H nas altas concentrações do corante.

O BCD90 apresenta duas bandas principais de absorbância: uma delas possui um pico em 502 nm, com um ombro em 475 nm e a outra possui um pico em 618 nm, com um ombro em 576 nm. Nas figuras 7.32A e 7.33A, seguem os espectros de absorção normalizados, respectivamente em, 618 nm e em 502 nm. Ao lado (figuras 7.32B e 7.33B), seguem as razões entre os picos: $A_{618 \text{ nm}}/A_{576 \text{ nm}}$ e $A_{502 \text{ nm}}/A_{475 \text{ nm}}$.

Figura 7.32. Espectros de absorção óptica normalizados em 618 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre as $A_{618 \text{ nm}}/A_{576 \text{ nm}}$ em função da concentração de BCD (B). Modificado de [236].

Figura 7.33. Espectros de absorção óptica normalizados em 502 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações (A), razão entre as $A_{502 \text{ nm}}/A_{475 \text{ nm}}$ em função da concentração do BCD (B). Modificado de [236].

A razão entre as absorbâncias dos picos das duas bandas (figuras 7.32B e 7.33B) demonstra um aumento relativo do ombro em 576 nm e do ombro em 475 nm, indicando a formação de agregados H em altas concentrações do corante.

Nessas condições não observamos uma dependência temporal da agregação.

7.5.2 Agregação das biscianinas na presença do sal

A adição do NaCl diminui a razão entre as absorbâncias do pico de monômero em

relação ao do agregado para os BCD180 e BCD90. Isso significa que, de forma semelhante a AL, o sal induz a formação de agregados H do BCD (figuras 7.34 e 7.35).

Figura 7.34. Espectro de absorção do $[BCD180]=1,7 \mu M$ ao adicionar NaCl (A), $A_{632 \text{ nm}}$ do BCD180 em função da concentração de NaCl (B), razão entre $A_{632 \text{ nm}}/A_{596 \text{ nm}}$ para o BCD180 em função do NaCl(C). Modificado de [237].

Figura 7.35. Espectro de absorção do $[BCD90]=14 \mu M$ ao adicionar NaCl de 0,1-3 M.

7.5.2.1 Dinâmica de agregação de BCD180 na presença de sal

Depois da adição do NaCl observamos a mudança do espectro de absorção da BCD180 que durou 18 horas. Na figura 7.36 colocamos alguns dos espectros em instantes distintos de tempos ao adicionar sal em concentração de 0,1 M.

Figura 7.36. Espectro de absorção do $[BCD180]=12 \mu\text{M}$ ao adicionar NaCl de 0,1 M.

As curvas cinéticas das mudanças espectrais indicam a existência de duas componentes temporais no processo de agregação do corante.

Figura 7.37. Mudança no tempo nas $A_{700 \text{ nm}}$ (A) e $A_{850 \text{ nm}}$ (B) do $[BCD180]=12 \mu\text{M}$ com a adição de 0,1 M de NaCl.

Não observamos uma dinâmica para o BCD90.

7.5.3 Agregação de biscianinas na presença de SDS

A análise dos espectros de absorção do BCD com adição de alíquotas da solução estoque

de SDS demonstra que, de forma semelhante a AL, a presença de SDS em baixas concentrações estimula a agregação dos BCDs. O posterior aumento da concentração de SDS desagrega-os (figuras 7.38-7.40).

Figura 7.38. Espectros de absorção do [BCD180]=2,3 μM com adição de [SDS]=0,2-20 mM (A). $A_{641 \text{ nm}}/A_{594 \text{ nm}}$ do BCD180 em função da concentração de SDS (B). Modificado de [236].

Figura 7.39. Espectros de absorção do [BCD150]=1,0 μM com adição de [SDS]=0,1-10 mM (A). $A_{632 \text{ nm}}/A_{590 \text{ nm}}$ do BCD150 em função da concentração de SDS (B). Modificado de [236].

Figura 7.40. Espectros de absorção do [BCD90]=0,7 μM com adições de [SDS]=0,2-20 mM (A). $A_{628 \text{ nm}}/A_{581 \text{ nm}}$ do BCD90 em função da concentração de SDS (B). Modificado de [236].

O máximo de agregação, correspondente ao vale nos gráficos (figuras 7.38B-7.40B), não depende significativamente da estrutura do corante. Observamos que o máximo de agregação está subordinado à concentração do SDS, acontecendo para $[\text{SDS}] \approx 0,1-0,2 \text{ mM}$.

7.5.3.1 Dinâmica de agregação de biscianinas na presença de SDS

Apenas observamos a dinâmica de agregação dos BCDs na presença de SDS para os BCD180 e BCD90, em algumas concentrações de SDS (tabela 7.11).

Tabela 7.11. BCDs com ângulos 90°, 150° e 180° em solução aquosa na presença de SDS indicando a presença ou não de dinâmica.

	BCD 90	BCD 150	BCD 180
SDS, μM (Não apresentou dinâmica)	6, 50, 550, 1550, 3050, 5050, 10000	300, 600	36
SDS, μM (Presença de Dinâmica)	1000		6, 1000

Para o BCD180, depois da adição de SDS tanto nas concentrações de 6 μM (figura 7.41) e 1 mM, o espectro de absorção desloca-se para a região do azul, indicando a formação de agregados H do corante. Logo em seguida, observamos a transformação desses agregados H para os do tipo J (figura 7.41). Efeito semelhante foi observado na interação da porfirina negativa do meso-tetrasulfonatofenil porfirina (TPPS₄) com surfactante catiônico brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) [238].

Figura 7.41. Dinâmica de agregação do [BCD180]=6 μ M na presença de 6 μ M de SDS, monitorados durante 3,5 minutos (A) e mudanças da $A_{675 \text{ nm}}$ (B) e da $A_{560 \text{ nm}}$ (C) durante 3,5 minutos.

Para o BCD90, a adição de [SDS]=1,0 mM induz inicialmente a formação dos agregados J do corante, que em seguida transformam-se em agregados do tipo H (figura 7.42). O tempo de transformação foi aproximadamente duas ordens de grandeza maior do que para o BCD180. Tais disparidades devem estar associadas com as distintas estruturas dos corantes.

Figura 7.42. Espectros de absorção do [BCD90]=15 μM na presença de 1000 μM de SDS em função do tempo, (A) e mudanças da absorbância $A_{509 \text{ nm}}$ (B) monitorados durante 77 minutos.

Baseando-se nos resultados obtidos podemos concluir que o processo de agregação dos BCDs possui características semelhantes com aquele da AL em soluções homogêneas, na presença do sal e de estruturas nano-heterogêneas. Entretanto, para os BCDs observamos uma dependência temporal de agregação na presença de NaCl, que não foi observada para a AL. Possivelmente, a dependência temporal da dinâmica de agregação da AL com o NaCl é extremamente rápida.

8 CONCLUSÕES

Investigamos o fenômeno da agregação dos corantes ciânicos AL e BCD em interação com sistemas nano-heterogêneos naturais e sintéticos e sob diferentes fatores, como a estrutura do corante, pH e força iônica. Também analisamos como o tipo de íons inorgânicos afeta as características fotofísicas dos CC. Entre nosso estudos, também realizamos uma investigação do efeito hipertérmico dos CC sob irradiação luminosa.

Baseando-se nos resultados obtidos podemos concluir:

- Os corantes ciânicos nas soluções aquosas homogêneas se agregam. O número de agregação aumenta com a concentração do corante.
- A adição de sais inorgânicos nas soluções aquosas homogêneas de corantes estimula a agregação dos mesmos.
- No caso da AL, os sais suprimem sua fluorescência por dois mecanismos: devido a indução da agregação da AL e via transferência parcial de elétrons do ânion do sal para a molécula de AL em seu estado excitado singlete, formando um exciplexo.
- Para os BCD180 e BCD90 a adição do NaCl induz a formação de agregados H, de forma análoga a observada com a AL. Após a adição do sal, observamos uma mudança do espectro de absorção do BCD180 que perdurou 18 horas. As curvas cinéticas das mudanças espectrais indicam a existência de duas componentes temporais associadas com a transformação dos agregado H em J.
- A interação dos corantes com DNA é um processo complexo, possuindo várias espécies em equilíbrio, tais como monômeros do corante livres e ligados ao DNA, agregados do corante ligados ao DNA e agregados do DNA ligados com os monômeros do corantes.
- A agregação reduz os tempos de vida e de rendimento quântico dos estados excitados do corante. Por outro lado, o excesso de DNA estimula a desagregação dos corantes e aumenta os tempos de vida e de rendimento quântico dos seus estados excitados.
- Especificamente para a AL, podemos concluir que sua ligação com o DNA reduz a probabilidade do seu contato com outras moléculas.
- Os íons dos sais competem com a AL pelos sítios de ligação do DNA, diminuindo a constante de ligação da AL com o DNA, resultando numa redução da agregação da AL estimulada pelo DNA.
- O SDS em baixas concentrações estimula a agregação dos corantes. O posterior aumento

da concentração de SDS desagrega-os.

- O processo de agregação possui uma dinâmica de transformação que depende da estrutura do corante e da razão $[SDS]/[corante]$.
- A dinâmica de agregação para a AL está caracterizada por quatro componentes exponenciais, a primeira com tempos mais curtos do que o tempo de aquisição de nosso espectrofotômetro (36 segundos), as outras três componentes variam de alguns minutos até várias horas. A existência de três componentes exponenciais indica a presença de ao menos quatro tipos de agregados formados em sucessão. Estas três formas distintas de agregados diferem tanto por sua estrutura espacial assim como por seu número de agregação.
- No caso do BCD180, a adição de SDS desloca o espectro de absorção para a região do azul, indicando a formação de agregados H do corante, para em seguida, esses agregados H transformarem-se para os do tipo J. Já para o BCD90, com a adição de $[SDS]=1,0$ mM observamos a formação inicial dos agregados J do corante, que se transformam em agregados do tipo H, com um tempo de transformação de aproximadamente duas ordens de grandeza maior do que para o BCD180.

Em nossos estudos do efeito hipertérmico da AL irradiada com luz visível observamos o aumento da temperatura provocada pela AL irradiada. A análise dos espectros de absorção da AL em diferentes instantes de tempo assinala que a agregação protege a AL da fotodecomposição, revelando que a agregação do FS auxilia na transformação da energia de excitação em calor. Esses estudos indicam que é possível utilizar um FS orgânico em TFD associada com HT.

De forma geral, podemos concluir que os corantes ciânicos introduzidos no organismo do paciente como fotossensibilizadores ou sondas fluorescentes podem sofrer mudanças das suas características fotofísicas devido à processos da sua agregação e desagregação estimulados pela interação com sais e estruturas nano-heterogêneas (membrana celular, ácidos nucleicos, etc). Isso poderia afetar sua eficiência nestas aplicações. Por exemplo, a agregação das moléculas de DNA ao redor dos monômeros do corante reduz a probabilidade de transferência da energia de excitação do mesmo para o oxigênio molecular, afetando sua eficiência como fotossensibilizador na terapia fotodinâmica e como sonda fluorescente no diagnóstico por fluorescência.

REFERÊNCIAS

- [1] Dempsey GT, et al. Photoswitching Mechanism of Cyanine Dyes. *Journal of the American Chemical Society*. 2009; 131(51):18192–3.
- [2] Waggoner AS. Dye Indicators of Membrane Potential. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*. 1979; 8(1):47–68.
- [3] Levitus M, Ranjit S. Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 2011; 44(1):123–51.
- [4] Mishra A, et al. Cyanines during the 1990s: A Review. *Chemical Reviews*. 2000; 100(6):1973–2012.
- [5] Shindy H. Basics, Mechanisms and Properties in the Chemistry of Cyanine Dyes: A Review Paper. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 2012 ; 9(4):352–60.
- [6] Henderson BW, Dougherty TJ.. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*, 55(1), pp.145–157. 1992;
- [7] Oleinick, NL, Evans HH. The Photobiology of Photodynamic Therapy: Cellular Targets and Mechanisms. *Radiation Research*, 150(5), p.S146. 1998;
- [8] Bacellar I, Tsubone T, Pavani C, Baptista M. Photodynamic Efficiency: From Molecular Photochemistry to Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015; 16(9):20523–59.
- [9] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004; 1(4):279–93.
- [10] Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2005; 2(2):91–106.
- [11] Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1997; 39(1):1–18.
- [12] Plaetzer K, et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. *Lasers in Medical Science*. 2009; 24(2):259–68.
- [13] Borissevitch IE, et al. Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin. *Analytica Chimica Acta*. 1997; 343(3):281–6.
- [14] Borissevitch IE, et al. Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation. *Journal of Luminescence*. 1996; 69(2):65–76.
- [15] Amado AM, et al. Quenching of acridine orange fluorescence by salts in aqueous solutions: Effects of aggregation and charge transfer. *Journal of Luminescence*. 2016; 178:288–94.
- [16] Aggarwal LPF, Borissevitch IE. On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2006; 63(1):227–33.
- [17] Clerc S, Barenholz Y. A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe. *Analytical biochemistry*. 1998; 259(1):104–11.
- [18] Borissevitch IE, Gandini SC. Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-

methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 1998; 43(2):112–20.

[19] Aggarwal LPF, Baptista MS, Borissevitch IE. Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2007; 186(2–3):187–93.

[20] Gonçalves PJ, et al. Excited-state dynamics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin J-aggregates. *Optical Materials*. 2012; 34(4):741–7.

[21] Borissevitch IE, et al. Changes in porphyrin nonlinear absorption owing to interaction with bovine serum albumin. *Applied optics*. 2000; 39(24):4431–5.

[22] Amado AM, et al. Acridine orange interaction with DNA: Effect of ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2017; 1861(4):900–9.

[23] Schaberle FA, Kuz'min VA, Borissevitch IE. Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2003; 1621(2):183–91.

[24] Gehlen MH, Berci Fo P, Neumann MG. Fluorescence quenching of acridine orange by aromatic amines in cationic, anionic and non-ionic micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 1991; 59(3):335–40.

[25] Christensen T, Wahl A, Smedshammer L. Effects of haematoporphyrin derivative and light in combination with hyperthermia on cells in culture. *British Journal of Cancer*. 1984; 50(1):85–9.

[26] Gottfried V, Kimel S. Temperature effects on photosensitized processes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1991; 8(4):419–30.

[27] Henderson BW, et al. Interaction of photodynamic therapy and hyperthermia: tumor response and cell survival studies after treatment of mice in vivo. *Cancer research*. 1985 Dec;45(12 Pt 1):6071–7.

[28] Hirschberg H, et al. Enhanced cytotoxic effects of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy by concurrent hyperthermia in glioma spheroids. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004; 70(3):289–99.

[29] Kelleher DK, et al. Combined hyperthermia and chlorophyll-based photodynamic therapy: tumour growth and metabolic microenvironment. *British Journal of Cancer*. 2003; 89(12):2333–9.

[30] Kimel S, et al. Demonstration of synergistic effects of hyperthermia and photodynamic therapy using the chick chorioallantoic membrane model. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1992; 12(4):432–40.

[31] Levendag PC, et al. Interaction of interstitial photodynamic therapy and interstitial hyperthermia in a rat rhabdomyosarcoma—A pilot study. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*. 1988; 14(1):139–45.

[32] Prinsze C, et al. Potentiation of hyperthermia-induced haemolysis of human erythrocytes by photodynamic treatment. Evidence for the involvement of the anion transporter in this synergistic interaction. *The Biochemical journal*. 1991; 277 Pt 1(Ccl):183–8.

[33] Waldow SM, Henderson BW, Dougherty TJ. Enhanced tumor control following sequential treatments of photodynamic therapy (PDT) and localized microwave hyperthermia in vivo. *Lasers in Surgery and Medicine*. 1984;4(1):79–85.

[34] Waldow SM, Henderson BW, Dougherty TJ. Potentiation of photodynamic therapy by heat: effect of sequence and time interval between treatments in vivo. *Lasers in surgery and medicine*. 1985;5(2):83–94.

- [35] Wang S, et al. Plasmonic Copper Sulfide Nanocrystals Exhibiting Near-Infrared Photothermal and Photodynamic Therapeutic Effects. *ACS Nano*. 2015 Feb 24;9(2):1788–800.
- [36] Yanase S, et al. Hyperthermia enhances the antitumor effect of photodynamic therapy with ALA hexyl ester in a squamous cell carcinoma tumor model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2012; 9(4):369–75.
- [37] Jabłoński A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature*. 1933;131(3319):839–40.
- [38] Patterson GH, Piston DW, Barisas BG. Förster Distances between Green Fluorescent Protein Pairs. *Analytical Biochemistry*. 2000; 284(2):438–40.
- [39] Deniz AA, et al. Single-pair fluorescence resonance energy transfer on freely diffusing molecules: Observation of Forster distance dependence and subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(7):3670–5.
- [40] Faure S, Stern C, Guillard R, Harvey PD. Role of the Spacer in the Singlet–Singlet Energy Transfer Mechanism (Förster vs Dexter) in Cofacial Bisporphyrins. *Journal of the American Chemical Society*. 2004; 126(4):1253–61.
- [41] Lakowicz JR, Weber G. Quenching of fluorescence by oxygen. Probe for structural fluctuations in macromolecules. *Biochemistry*. 1973 Oct;12(21):4161–70.
- [42] Parra GG, et al. Quantum dot effects upon the interaction between porphyrins and phospholipids in cell membrane models. *Eur Biophys J*. 2016; 45(3):219–27.
- [43] Mark Brandt, Ph.D., Professor of Department of Chemistry and Biochemistry Rose-Hulman Institute of Technology Quenching processes-Introduction to spectroscopy [Personal homepage on internet]. Disponível em: https://www.rose-hulman.edu/~brandt/Fluorescence/Quenching_processes.pdf acesso em 11/04/2017
- [44] Kasha M. Energy Transfer Mechanisms and the Molecular Exciton Model for Molecular Aggregates. *Radiation Research*. 1963; 20(1):55.
- [45] Antonov L, et al. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta*. 1999;49(1):99–106.
- [46] Jiménez-Millán E, et al. Self-assembly of acridine orange into H-aggregates at the air/water interface: Tuning of orientation of headgroup. *Langmuir*. 2011; 27(24):14888–99.
- [47] James AD, Robinson BH. Self-aggregation of N(10)-alkyl derivatives of acridine orange and their interaction with cationic and anionic surfactants. *Advances in Molecular Relaxation Processes*. 1976 Sep;8(4):287–304.
- [48] Vranken N, et al. Influence of the Deposition Method on the Topography and Spectroscopy of J-Aggregates of a Thiocarbocyanine Dye Adsorbed to a Langmuir Film. *Langmuir*. 2002; 18(22):8407–17.
- [49] Van der Auweraer M, Scheblykin I. One-dimensional J-aggregates: Dependence of the properties of the exciton band on the model of the intermolecular coupling. *Chemical Physics*. 2002; 275(1–3):285–306.
- [50] Von Berlepsch H, Kirstein S, Böttcher C. Effect of Alcohols on J-Aggregation of a Carbocyanine Dye. *Langmuir*. 2002; 18(20):7699–705.
- [51] Shklyarevskiy IO, et al. Magnetic field induced alignment of cyanine dye J-aggregates. *The Journal of Chemical Physics*. 2002; 116(19):8407.
- [52] Domínguez A, et al. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *Journal of Chemical Education*. 1997; 74(10):1227–31.
- [53] Healy CM, et al. The effect of a sodium lauryl sulfate-free dentifrice on patients with recurrent oral ulceration.

Oral diseases. 1999; 5(1):39–43.

[54] Ghosh S, Blankschtein D. The role of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles in inducing skin barrier perturbation in the presence of glycerol. *International Journal of Cosmetic Science*. 2008; 17;30(1):73–73.

[55] Pongpeerapat A, Itoh K, Tozuka Y, Moribe K, Oguchi T, Yamamoto K. Formation and stability of drug nanoparticles obtained from drug/PVP/SDS ternary ground mixture. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2004; 14(6):441–7.

[56] Kosswig K. Surfactants. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2000. p. 431–505.

[57] Maibaum L, Dinner AR, Chandler D. Micelle Formation and the Hydrophobic Effect. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2004; 108(21):6778–81.

[58] Chevalier Y, Zemb T. The structure of micelles and microemulsions. *Reports on Progress in Physics*. 1999;53(3):279–371.

[59] Romani AP, et al. Spectrofluorimetric determination of second critical micellar concentration of SDS and SDS/Brij 30 systems. *Journal of Fluorescence*. 2009; 19(2):327–32.

[60] Israelachvili JN. *Intermolecular and surface forces*. 3rd ed, Academic press, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos, 2011. ISBN 978-0-12-375182-9.

[61] Piasecki DA., Wirth MJ. Reorientation of acridine orange in a sodium dodecyl sulfate monolayer at the water-hexadecane interface. *The Journal of Physical Chemistry*. 1993; 97(29):7700–5.

[62] Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*. 2^a Ed., Wiley, New York, 1980.

[63] Gandini SCM, et al. Interaction of the Tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin with Ionic Surfactants: Aggregation and Location in Micelles. *Langmuir*. 1999; 15(19):6233–43.

[64] Borissevitch IE, et al. Localization of dipyrindamole molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges. *BBA - Biomembranes*. 1995; 1238(1):57–62.

[65] De Paoli VM, et al. Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH2 associated with micelles and DNA. *Journal of Alloys and Compounds*. 2002; 344(1–2):27–31.

[66] Amado AM. *Agregação da acridina laranja em soluções aquosas e na interação com micelas de SDS* [dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto; 2013. doi:10.11606/D.59.2013.tde-17042013-095936..

[67] Schaberle FA, Galembeck SE, Borissevitch IE. Computational study of steric and spectroscopic characteristics of bi-chromophoric cyanine dyes: Comparison with experimental data. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009; 72(4):863–7.

[68] Ormond A, Freeman H. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. *Materials*. 2013 Mar 6;6(3):817–40.

[69] Rakitin A, et al. Metallic Conduction through Engineered DNA: DNA Nanoelectronic Building Blocks. *Physical Review Letters*. 2001; 86(16):3670–3.

[70] Shirk JS. Protecting the War Fighter's Vision In a Laser-Rich, Battlefield Environment. *Optics and Photonics News*. 2000; 11(4):19.

[71] Shalhoub GM. Visible Spectra Conjugated Dyes: Integrating Quantum Chemical Concepts with Experimental Data. *Journal of Chemical Education*. 1997; 74(11):1317.

- [72] Borisevich IE, Kuzmin VA., Mikhailenko FA, Dyadyusha GG. Triplet state of bis-cyanine dyes. In Proc. Acad. Sci. USSR. 1976, Vol. 228, No. 1-3, pp. 448-451.
- [73] Raab O. On the effect of fluorescent substances on infusoria. *Z Biol*, v. 39, p. 524, 1900.
- [74] Borissevitch I. Influence of resonance interaction on absorption spectra of dyes with two chromophores. *Doklady Physics and Chemistry*, 1978. 241: 743-746.
- [75] Kuzmin VA, et al. Effect of Cleavage of Biscyanine Dye Triplet Levels. *Doklady Akademii Nauk Sssr*, 1976, 229(1): 131-134.
- [76] Zhang B, Li X, Li B, Gao C, Jiang Y. Acridine and its derivatives: a patent review (2009 – 2013). *Expert opinion on therapeutic patents*. 2014; 24(6):647–64.
- [77] Van Duuren BL, Sivak A, Katz C, Melchionne S. Tumorigenicity of acridine orange. *British Journal of Cancer*. 1969; 23(3):587–90.
- [78] Martine Demeunynck BSP, Franck Charmantray BSP, Alain Martelli BSP. Interest of Acridine Derivatives in the Anticancer Chemotherapy. *Current Pharmaceutical Design*. 2001; 7(17):1703–24.
- [79] Csuk R, Barthel A, Raschke C, Kluge R, Ströhl D, Trieschmann L, et al. Synthesis of monomeric and dimeric acridine compounds as potential therapeutics in Alzheimer and prion diseases. *Archiv der Pharmazie*. 2009; 342(12):699–709.
- [80] Mesa-Valle CM, et al. Activity and mode of action of acridine compounds against *Leishmania donovani*. antimicrobial agents and chemotherapy. 1996; 40(3):684–90.
- [81] Wainwright M. The use of dyes in modern biomedicine. *Biotechnic & Histochemistry*. 2003; 78(3–4):147–55.
- [82] Wainwright M. Acridine: a neglected antibacterial chromophore. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001 ; 47(1):1–13.
- [83] Denny W. Chemotherapeutic Effects of Acridine Derivatives. *Medicinal Chemistry Reviews*. 2004; 1(3):257–66.
- [84] Ungar J, Robinson FA. Investigation of the antibacterial and toxic action of certain acridine derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1944; 80(3):217 LP-232.
- [85] Iessi E, et al. Acridine Orange/exosomes increase the delivery and the effectiveness of Acridine Orange in human melanoma cells: A new prototype for theranostics of tumors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2017 Jan 6;32(1):648–57.
- [86] Lux A, et al. Organic electronic device comprising an organic semiconducting material. U.S. Patent No. 8,686,139. 2014.
- [87] Stoessel P, et al. Dihydroacridine derivatives and the use thereof as materials for organic electroluminescence devices. U.S. Patent Application n. 14/358,824, 2012.
- [88] Lin C, et al. Organic compound and organic electroluminescence device employing the same. U.S. Patent n. 8,173,274, 2012.
- [89] Kahle K, et al. Use of acridine derivatives as matrix materials and/or electron blockers in oleds. U.S. Patent n. 8,384,068, 2013.
- [90] Chemspider. Acridine orange CSID: 56136, Royal Society of Chemistry, Londres, Inglaterra. Disponível em <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.56136.html> Acesso em 05/05/2017.

- [91] Strugger S; Hilbrich P. Die fluoreszenzmikroskopische unterscheidung lebender und toten bakterienzellen mit hilfe der akridinorange-färbung. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift vol. 50, p. 121–130, 1942.
- [92] Armstrong JA. Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence. *Experimental Cell Research*. 1956;11(3):640–3.
- [93] Von Bertalanffy L, Bickis I. Identification of Cytoplasmic Basophilia (Ribonucleic Acid) By Fluorescence Microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1956;4(5):481–93.
- [94] Strugger S. Fluorescence microscope examination of bacteria in soil. *Canadian Journal of Research*. 1948 Apr;26c(2):188–93.
- [95] Gongalsky KB, et al. Diversity of the soil biota in burned areas of southern taiga forests (Tver oblast). *Eurasian Soil Science*. 2016; 49(3):358–66.
- [96] Polard T, et al. Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2011;74(1):144–9.
- [97] Burdash NM, Manos JP, Bannister ER, Welborn AL. Acridine orange staining and radiometric detection of microorganisms in blood cultures. *Journal of clinical microbiology*. 1983 Mar;17(3):463–5.
- [98] Radonjic I V., et al. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2006; 126(1):116–20.
- [99] Greenwood JR, Kirk-Hillaire K. Evaluation of acridine orange stain for detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *Journal of clinical microbiology*, v. 14, n. 6, p. 699, 1981.
- [100] Begum N, et al. Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Acridine Orange Staining and its Comparison to Conventional Methods and Association of *Gardnerella vaginalis* with Bacterial Vaginosis. *Bangladesh J Med Microbiol*. 2011;4(1):37–42.
- [101] Petrenko VA, Sorokulova IB. Detection of biological threats. A challenge for directed molecular evolution. *J Microbiol Methods*. 2004; 58(2):147–68.
- [102] Zhang X, Liu T, Li Z, Zhang X. Progress of photodynamic therapy applications in the treatment of musculoskeletal sarcoma (Review). *Oncol Lett*. 2014; 8(4):1403–8.
- [103] Pitchaimani A, et al. Photochemotherapeutic effects of UV-C on acridine orange in human breast cancer cells: potential application in anticancer therapy. *RSC Adv*. 2014; 4(42):22123–8.
- [104] Kusuzaki K, et al. Photodynamic inactivation with acridine orange on a multidrug-resistant mouse osteosarcoma cell line. *Jpn J Cancer Res*. 2000; 91(April):439–45.
- [105] Nasim A, Brychey T. Genetic effects of acridine compounds. *Mutat Res Genet Toxicol*. 1979; 65(4):261–88.
- [106] Lyles MB, Cameron IL. Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA. *Biophys Chem*. 2002; 96(1):53–76.
- [107] Scháberle FA. Efeitos do meio e da interação com DNA e Micelas nas características espectrais dos corantes cianícos com dois cromóforos [tese]. Ribeirão Preto, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto; 2007. doi:10.11606/T.59.2007.tde-17092007-211526.
- [108] Borisevich YE, Kuz'min VA, Renge IV. Effect of π -electron conjugation of the chromophores on the reactivity of the triplet states of dyes with two chromophores in electron-transfer reactions. *Russian Chemical Bulletin*. 1981; 30(8), 1465-1470.

- [109] Murakami LS, et al. Photocytotoxicity of a cyanine dye with two chromophores toward melanoma and normal cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2015; 1850(6):1150–7.
- [110] Chemspider. Sodium dodecyl sulfate CSID:8677, Royal Society of Chemistry, Londres, Inglaterra. Disponível em [http:// www.chemspider.com/Chemical-Structure.8677.html](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8677.html) Acesso em 05/05/2017.
- [111] Neugebauer J. A guide to the properties and uses of Detergents in biology and biochemistry. 5ª Ed., Calbiochem-Novabiochem International, California, USA, 1994.
- [112] Piret J, et al. In vitro and in vivo evaluations of sodium lauryl sulfate and dextran sulfate as microbicides against herpes simplex and human immunodeficiency viruses. *J Clin Microbiol*. 2000; 38(1):110–9.
- [113] Méndez-Velasco C, Goff HD. Fat structure in ice cream: A study on the types of fat interactions. *Food Hydrocoll*. 2012; 29(1):152–9.
- [114] Korenbrot JJ. Ion transport in membranes: incorporation of biological ion-translocating proteins in model membrane systems. *Annu Rev Physiol*. 1977; 39:19–49.
- [115] Szoka F, Papahadjopoulos D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annu Rev Biophys Bioeng*. 1980; 9(1):467–508.
- [116] Razin S. Reconstitution of biological membranes. *Biochim Biophys Acta - Rev Biomembr*. 1972; 265(2):241–96.
- [117] McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: ii. effect of desoxyribonuclease on the biological activity of the transforming substance. *Journal of Experimental Medicine*. 1946; 83(2):89–96.
- [118] McCarty M. Purification and properties of desoxyribonuclease isolated from beef pancreas. *The Journal of General Physiology*. 1946; 29(3):123–39.
- [119] Avery OT. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type iii. *Journal of Experimental Medicine*. 1944; 79(2):137–58.
- [120] Watson JD, Crick FHC. The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1953; 18:123–31.
- [121] Sehlstedt U, et al. Interaction of cationic porphyrins with DNA. *Biochemistry*. 1994; 33(2):417–26.
- [122] Nussbaum JM, Newport MEA, Mackie M, Leontis NB. structure-specific binding and photosensitized cleavage of branched DNA three-way junction complexes by cationic porphyrins. *Photochem Photobiol*. 1994; 59(5):515–28.
- [123] Sari MA, et al. Interaction of cationic porphyrins with DNA: importance of the number and position of the charges and minimum structural requirements for intercalation. *Biochemistry*. 1990; 29(17):4205–15.
- [124] Lehninger L, Nelson DL, Cox MM. *Princípios de bioquímica*. Ed. Sarvier, 2ª ed, 2000.
- [125] Daune M. *Molecular biophysics: structures in motion*. Oxford university press, 1999.
- [126] Lavery R, Pullman B. The Dependence of the Surface Electrostatic Potential of B-DNA on Environmental Factors. *J Biomol Struct Dyn*. 1985; 2(5):1021–32.
- [127] Kuroda R, Tanaka H. DNA–porphyrin interactions probed by induced CD spectroscopy. *J Chem Soc, Chem Commun*. 1994; 0(13):1575–6.
- [128] Valeur B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley, Weinheim, Germany, 2001. ISBNs:

3-527-29919-X (Hardcover); 3-527-60024-8 (Electronic).

- [129] Enoki TA. Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos. 2010. Dissertação (Mestrado em Física) - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- [130] Malvern. Manual 0149 ZETASIZER 1000HS/3000HS-size measurement. 2. ed. Malvern Instruments Ltd., United Kingdom, 2000.
- [131] Porter G. Flash Photolysis and Spectroscopy. A New Method for the Study of Free Radical Reactions. *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1950; 200(1061), pp.284–300.
- [132] Norrish RGW, Porter G. Chemical Reactions Produced by Very High Light Intensities. *Nature*. 1949; 164(4172), pp.658–658.
- [133] Borissevich IE, Tatikolov AS, Kuzmin VA. The flash photolysis device with 1.5 s time duration. *High Energy Chemistry* 5. 1978; 474-476.
- [134] Gonçalves PJ. Estudos das características fotofísicas da porfirina mesotetrasulfonatofenil (TPPS4): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB. 2006. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- [135] Kubota Y, Steiner RF. Fluorescence decay and quantum yield characteristics of acridine orange and proflavine bound to DNA, *Biophysical Chemistry*. 6 (1977) 279–289.
- [136] Murakami K, et al. Equilibrium and kinetic studies of the dimerization of acridine orange and its 10-alkyl derivatives., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 59 (1986) 3393–3397.
- [137] Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Interactions of acridine orange with nucleic acids. Properties of complexes of acridine orange with single stranded ribonucleic acid., *Biochemical Pharmacology*. 32 (1983) 3679–94.
- [138] Provencher SW. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, *Computer Physics Communications*. 27 (1982) 229–242.
- [139] Brown W, Stepanek P. Viscoelastic relaxation in semidilute and concentrated polymer solutions, *Macromolecules*. 26 (1993) 6884–6890.
- [140] De S., Girigoswami A. Fluorescence resonance energy transfer - a spectroscopic probe for organized surfactant media, *Journal of Colloid and Interface Science*. 271 (2004) 485–95. doi:10.1016/j.jcis.2003.10.021.
- [141] De S., Girigoswami A., Mandal A.K. Energy transfer—a tool for probing micellar media, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 59 (2003) 2487–2496. doi:10.1016/S1386-1425(03)00043-X.
- [142] Lakshmipraba J., et al. DNA/RNA binding and anticancer/antimicrobial activities of polymer-copper(II) complexes., *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 109 (2013) 23–31. doi:10.1016/j.saa.2013.02.020.
- [143] Pérez-Flores L., et al. Effect of spermine conjugation on the interaction of acridine with alternating purine-pyrimidine oligodeoxyribonucleotides studied by CD, fluorescence and absorption spectroscopies., *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 69 (2008) 1089–96. doi:10.1016/j.saa.2007.06.008.

- [144] Pierzyńska-Mach A., Janowski P. A., Dobrucki J.W. Evaluation of acridine orange, LysoTracker Red, and quinacrine as fluorescent probes for long-term tracking of acidic vesicles., *Cytometry. Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*. 85 (2014) 729–37. doi:10.1002/cyto.a.22495.
- [145] Sánchez-Carrasco S., et al. Study by optical spectroscopy and molecular dynamics of the interaction of acridine-spermine conjugate with DNA., *Biophysical Chemistry*. 133 (2008) 54–65. doi:10.1016/j.bpc.2007.12.003.
- [146] Sedláček O., et al. Polymer conjugates of acridine-type anticancer drugs with pH-controlled activation, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 20 (2012) 4056–4063. doi:10.1016/j.bmc.2012.05.007.
- [147] Separovic D., et al. Combining anticancer agents photodynamic therapy and LCL85 leads to distinct changes in the sphingolipid profile, autophagy, caspase-3 activation in the absence of cell death, and long-term sensitization, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 409 (2011) 372–377. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.091.
- [148] Xu DD., et al. Photodynamic therapy induced cell death of hormone insensitive prostate cancer PC-3 cells with autophagic characteristics, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 10 (2013) 278–287. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.01.002.
- [149] Palmgren MG. Acridine Orange as a Probe for Measuring pH Gradients across Membranes: Mechanism and Limitations, *Analytical biochemistry* 192 (1991), 316-321.
- [150] Han J., Burgess K. Fluorescent Indicators for Intracellular pH, *Chem. Rev.*, 110(5) (2010), 2709–2728. doi: 10.1021/cr900249z.
- [151] Dixon DW., Steullet V. Dimerization of tetracationic porphyrins: ionic strength dependence., *Journal of Inorganic Biochemistry*. 69 (1998) 25–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9606936> (accessed August 21, 2014).
- [152] Gandini S.C., et al.. Binding of the Mn(III) complex of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin to DNA. Effect of ionic strength., *Journal of Inorganic Biochemistry*. 73 (1999) 35–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10212993> (accessed August 21, 2014).
- [153] Akasaka K., Sakoda M., Hiromi K. Kinetic studies on acridine orange-DNA interaction by fluorescence stopped-flow method, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 40 (1970) 1239–1245. doi:10.1016/0006-291X(70)90928-9.
- [154] Sakoda M., Hiromi K., Akasaka K., Kinetic studies on acridine orange-DNA interaction. A branched mechanism involving intercalation and outside “dimerization”., *Journal of Biochemistry*. 71 (1972) 891–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5073327>.
- [155] Miura M., Kubota Y., Studies of the Interaction of Sodium Polyphosphates with Acridine Orange, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 40 (1967) 466–472. doi:10.1246/bcsj.40.466.
- [156] Kubota Y., Omura N., Murakami K. A stopped-flow kinetic study of the solubilization of acridine orange and its 10-alkyl derivatives into the micelle of sodium dodecyl sulfate., *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 64 (1991) 814–820. doi:10.1246/bcsj.64.814.
- [157] Motoda Y., Kubota Y. Delayed Excimer Fluorescence of Acridine Orange Bound to DNA, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 52 (1979) 693–696. doi:10.1246/bcsj.52.693.
- [158] Falcone R.D., et al. Acid–Base and Aggregation Processes of Acridine Orange Base in n -

- Heptane/AOT/Water Reverse Micelles, *Langmuir*. 18 (2002) 2039–2047. doi:10.1021/la011411b.
- [159] Brignoli C.A., DeVoe H. Least-squares computer analysis of dye absorption spectra. Acridine orange dimerization equilibrium, *The Journal of Physical Chemistry*. 82 (1978) 2570–2575. doi:10.1021/j100513a007.
- [160] Borissevitch I.E. More about the inner filter effect: corrections of Stern–Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher, *Journal of Luminescence*. 81 (1999) 219–224. doi:10.1016/S0022-2313(98)00063-5.
- [161] Parker C.A., Barnes W.J. Some experiments with spectrofluorimeters and filter fluorimeters, *The Analyst*. 82 (1957) 606. doi:10.1039/an9578200606.
- [162] Parker C.A., Rees W.T. Fluorescence spectrometry. A review, *The Analyst*. 87 (1962) 83. doi:10.1039/an9628700083.
- [163] Sharma V.K., et al. Excited state characteristics of acridine dyes: acriflavine and acridine orange, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 59 (2003) 1799–1804. doi:10.1016/S1386-1425(02)00440-7.
- [164] Rehm D., Weller A. Kinetics of Fluorescence Quenching by Electron and H-Atom Transfer, *Isr. J. Chem.*, 8 (1970) 259–271. doi: 10.1002/ijch.197000029.
- [165] Cheng X., et al. Vertical ionization energies of halogen anions in solution, *Science China Chemistry*. 53 (2010) 1316–1321. doi:10.1007/s11426-010-3177-y.
- [166] Tomita G., Fluorescence-excitation spectra Acridine Orange-DNA and -RNA systems, *Biophysik*, 4 (1967) 23-29.
- [167] Janočková J., et al., Inhibition of DNA topoisomerases I and II and growth inhibition of HL-60 cells by novel acridine-based compounds, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 76 (2015) 192–202. doi:10.1016/j.ejps.2015.04.023.
- [168] Fotia C., et al., Acridine Orange is an Effective Anti-Cancer Drug that Affects Mitochondrial Function in Osteosarcoma Cells, *Current Pharmaceutical Design*. 21 (2015) 4088–4094. doi:10.2174/1381612821666150918144953.
- [169] Ginjiro M., Kawaramachi K., Agar T., The cytotoxic effects of photodynamic therapy with acridine orange in mouse osteosarcoma cells in vitro. *Journal of Kyoto Prefectural University of Medicine* 108.5 (1999): 587-602.
- [170] Kusuzaki K., et al., Translational Research of Photodynamic Therapy with Acridine Orange which Targets Cancer Acidity, *Current Pharmaceutical Design*. 18 (2012) 1414–1420. doi:10.2174/138161212799504812.
- [171] Satonaka H., et al., Acridine orange inhibits pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma, *Anticancer Research*. 31 (2011) 4163–4168.
- [172] Ke Y, et al. Two design strategies for enhancement of multilayer–DNA-origami folding: underwinding for specific intercalator rescue and staple-break positioning. *Chemical Science*. 2012; 3(8):2587.
- [173] Schlichthaerle T, et al. DNA nanotechnology and fluorescence applications. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016; 39:41–7.
- [174] Pinheiro AV, et al. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nature Nanotechnology*. 2011; 6(12):763–72.
- [175] Kelley SO., Electron Transfer Between Bases in Double Helical DNA, *Science*. 283 (1999) 375–381. doi:10.1126/science.283.5400.375.

- [176] Kasumov AY., Proximity-Induced Superconductivity in DNA, *Science*. 291 (2001) 280–282. doi:10.1126/science.291.5502.280.
- [177] Gu J., et al., Self-assembled dye-DNA network and its photoinduced electrical conductivity, *Applied Physics Letters*. 80 (2002) 688. doi:10.1063/1.1435805.
- [178] Guenther DC., et al., Invader probes: harnessing the energy of intercalation to facilitate recognition of chromosomal DNA for diagnostic applications, *Chem. Sci.* 6 (2015) 5006–5015. doi:10.1039/C5SC01238D.
- [179] Albinsson B., Hannestad JK., Börjesson K., Functionalized DNA nanostructures for light harvesting and charge separation, *Coordination Chemistry Reviews*. 256 (2012) 2399–2413. doi:10.1016/j.ccr.2012.02.024.
- [180] Richardson CL., et al., Metal mutagens and carcinogens effectively displace acridine orange from DNA as measured by fluorescence polarization, *Environmental Mutagenesis*. 3 (1981) 545–553. doi:10.1002/em.2860030506.
- [181] Prusik T., et al., Effect of metal ions on the luminescence of Acridine dyes bound to DNA, *Photochemistry and Photobiology*. 31 (1980) 315–321. doi:10.1111/j.1751-1097.1980.tb02547.x.
- [182] Borissevitch IE., Tominaga TT., Schmitt CC., Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 114 (1998) 201–207. doi:10.1016/S1010-6030(98)00216-0.
- [183] Geacintov NE., et al., Dynamics of the binding of acridine dyes to DNA investigated by triplet excited state probe techniques. *J. Phys. Chem.* (1981) 85 (24): 3608–3613. doi:10.1021/j150624a018
- [184] Schreiber JP., Daune MP., Fluorescence of complexes of acridine dye with synthetic polydeoxyribonucleotides: A physical model of frameshift mutation, *Journal of Molecular Biology*. 83 (1974) 487–501. doi:10.1016/0022-2836(74)90509-9.
- [185] Kubota Y., Fujisaki Y., Fluorescence of 9-aminoacridine bound to polynucleotides. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 50.1 (1977): 297–298.
- [186] Duortail G., Mauss Y., Chambron J., Quantum yields and fluorescence lifetimes of acridine derivatives interacting with DNA, *Biopolymers*. 16 (1977) 1397–1413. doi:10.1002/bip.1977.360160703.
- [187] Kubota Y., et al., Fluorescence decay studies of the DNA-3,6-diaminoacridine complexes, *Biophysical Chemistry*. 19 (1984) 25–37. doi:10.1016/0301-4622(84)85003-6.
- [188] Löber G., The fluorescence of dye-nucleic acid complexes, *Journal of Luminescence*. 22 (1981) 221–265. doi:10.1016/0022-2313(81)90022-3.
- [189] Weisblum B., De Haseth PL., Quinacrine, a chromosome stain specific for deoxyadenylate-deoxythymidylaterich regions in DNA., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 69 (1972) 629–32.
- [190] Michelson AM., Monny C., Kovoov A., Action of quinacrine mustard on polynucleotides, *Biochimie*. 54 (1972) 1129–1136. doi:10.1016/S0300-9084(72)80017-8.
- [191] Kittler L., et al., 352 - Redox processes during photodynamic damage of DNA III. Redox mechanism of photosensitization and radical reaction, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 7 (1980) 503–511. doi:10.1016/0302-4598(80)80009-2.
- [192] Tubbs RK., Ditmars W.E., Van Winkle Q., Heterogeneity of the interaction of DNA with acriflavine, *Journal of Molecular Biology*. 9 (1964) 545–557. doi:10.1016/S0022-2836(64)80226-6.

- [193] Duuren BL., Goldschmidt B.M., Seltzman H.H., The interaction of mutagenic and carcinogenic agents with nucleic acids, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 153 (1969) 744–757. doi:10.1111/j.1749-6632.1969.tb11786.x.
- [194] Gandini SC., et al., Aggregation of meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin in its free base, Fe(III) and Mn(III) forms due to the interaction with DNA in aqueous solutions: Optical absorption, fluorescence and light scattering studies, *Journal of Luminescence*. 78 (1998) 53–61. doi:10.1016/S0022-2313(97)00278-0.
- [195] Tabak M., Borisevitch IE., Interaction of dipyradamole with micelles of lysophosphatidylcholine and with bovine serum-albumin - fluorescence studies, *BBA* 1116(3) (1992) 241–249. doi: 10.1016/0304-4165(92)90017-O
- [196] Burak Y., Ariel G., Andelman D., 2004. Competition between condensation of monovalent and multivalent ions in DNA aggregation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(1–2), pp.53–58.
- [197] Burak Y., Ariel G., Andelman D., 2003. Onset of DNA Aggregation in Presence of Monovalent and Multivalent Counterions. *Biophysical Journal*, 85(4), pp.2100–2110.
- [198] Kuramochi H., Yonezawa Y., 2003. Effects of ATP, Mg²⁺ and a mixture of the two on the formation of large DNA aggregates induced by spermidine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95(3), pp.225–230.
- [199] Kuramochi H., Yonezawa Y., 2001. Formation of Large DNA Aggregates Induced by Spermidine. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92(2), pp.183–185.
- [200] Pelta J., Livolant F., Sikorav J.L., 1996. DNA Aggregation Induced by Polyamines and Cobalt hexamine. *Journal of Biological Chemistry*, 271(10), pp.5656–5662.
- [201] Magde D., Elson EL., Webb WW., Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization, *Biopolymers*. 13 (1974) 29–61. doi:10.1002/bip.1974.360130103.
- [202] Shaw AK, Pal SK, Fluorescence relaxation dynamics of acridine orange in nanosized micellar systems and DNA, *Journal of Physical Chemistry B*. 111 (2007) 4189–4199. doi:10.1021/jp067156r.
- [203] Fujimoto BS, et al., Effects of different cations on the hydrodynamic radius of DNA, *Biophysical Journal*. 67 (1994) 304–308. doi:10.1016/S0006-3495(94)80481-3.
- [204] Araki S., et al., Hydrodynamic radius of circular DNA is larger than that of linear DNA, *Chemical Physics Letters*. 418 (2006) 255–259. doi:10.1016/j.cplett.2005.10.115.
- [205] Borissevitch IE, et al. Z. Binding and Location of Dipyradamole Derivatives in Micelles: the Role of Drug Molecular Structure and Charge. *Zeitschrift für Naturforschung C, Journal for Biosciences*. 51/7–8 (1996) 578–590.
- [206] Gonçalves PJ, et al. Effects of interaction with CTAB micelles on photophysical characteristics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2006;181(2–3):378–84.
- [207] Louro SRW, Nascimento OR, Tabak M. Charge- and pH-dependent binding sites for dibucaine in ionic micelles: a fluorescence study. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1994;1190(2):319–28.
- [208] Robinson BH, White CN, Mateo C. Dynamics of small molecule-micelle interactions. A stopped-flow investigation of the kinetics of absorption of acridine (and related) dyes into anionic micelles, and the characterization of surfactant-dye interactions. *Adv Mol Relax Process*. 1975;7(4):321–38.
- [209] Moulik SP, Ghosh S, Das AR. Interaction of acridine orange monohydrochloride dye with sodiumdodecylsulfate, (SDS) cetyltrimethylammoniumbromide (CTAB) and p-tert-octylphenoxypolyoxy ethanol

- (Triton X 100) surfactants. *Colloid Polym Sci.* 1979;257(6):645–55.
- [210] Herzfeld SH, Corrin ML, Harkins WD. The Effect of Alcohols and of Alcohols and Salts on the Critical Micelle Concentration of Dodecylammonium Chloride. *J Phys Colloid Chem.* 1950;54(2):271–83.
- [211] Rosen M, Kunjappu JT. Characteristic Features of Surfactants. In: *Surfactants and Interfacial Phenomena*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2012. p. 1–38.
- [212] Freddi S, et al. A Molecular Thermometer for Nanoparticles for Optical Hyperthermia. *Nano Lett.* 2013;13(5):2004–10.
- [213] Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjug Chem.* 2011;22(10):1879–903.
- [214] Chen W. Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: an in vivo efficacy study. *Cancer Lett.* 1996;98(2):169–73.
- [215] Levendag PC, et al. Interaction of interstitial photodynamic therapy and interstitial hyperthermia in a rat rhabdomyosarcoma—A pilot study. *Int J Radiat Oncol.* 1988;14(1):139–45.
- [216] Bapat SA. Human ovarian cancer stem cells. *Reproduction.* 2010;140(1):33–41.
- [217] Siboni G, et al. Specificity of photosensitizer accumulation in undifferentiated versus differentiated colon carcinoma cells. *Cancer Lett.* 2003;196(1):57–64.
- [218] Sibani SA, et al. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy. Part 2: systemic carrier platforms. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008;5(11):1241–54.
- [219] Alexiades-Armenakas M. Laser-mediated photodynamic therapy. *Clin Dermatol.* 2006;24(1):16–25.
- [220] Kübler AC. Photodynamic therapy. *Med Laser Appl.* 2005; 20(1):37–45.
- [221] Huang Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. *Technol Cancer Res Treat.* 2005; 4(3):283–93.
- [222] Glassberg E, et al. Hyperthermia potentiates the effects of aluminum phthalocyanine tetrasulfonate-mediated photodynamic toxicity in human malignant and normal cell lines. *Lasers Surg Med.* 1991;11(5):432–9.
- [223] Henderson BW, Waldow SM, Potter WR, Dougherty TJ. Interaction of photodynamic therapy and hyperthermia: tumor response and cell survival studies after treatment of mice in vivo. *Cancer Res.* 1985;45(12 Pt 1):6071–7.
- [224] Kelleher DK, et al. Enhanced effects of aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy through local hyperthermia in rat tumours. *Br J Cancer.* 2003;89(2):405–11.
- [225] Lin J, et al. Photosensitizer-loaded gold vesicles with strong plasmonic coupling effect for imaging-guided photothermal/photodynamic therapy. *ACS Nano.* 2013;7(6):5320–9.
- [226] Mang TS. Combination studies of hyperthermia induced by the neodymium: Yttrium-Aluminum-Garnet (Nd:YAG) laser as an adjuvant to photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 1990;10(2):173–8.
- [228] Waldow SM, Henderson BW, Dougherty TJ. Hyperthermic potentiation of photodynamic therapy employing photofrin I and II: Comparison of results using three animal tumor models. *Lasers Surg Med.* 1987;7(1):12–22.
- [229] Wang S, et al. Single continuous wave laser induced photodynamic/plasmonic photothermal therapy using photosensitizer-functionalized gold nanostars. *Adv Mater.* 2013;25(22):3055–61.
- [230] Song X, et al. J-aggregates of organic dye molecules complexed with iron oxide nanoparticles for imaging-guided photothermal therapy under 915-nm light. *Small.* 2014;10(21):4362–70.

- [231] Song X, et al. Nano-assemblies of J-aggregates based on a NIR dye as a multifunctional drug carrier for combination cancer therapy. *Biomaterials*. 2015;57:84–92.
- [232] Lim CK, et al. Phthalocyanine-aggregated polymeric nanoparticles as tumor-homing near-infrared absorbers for photothermal therapy of cancer. *Theranostics*. 2012;2(9):871–9.
- [233] Mang TS, Dougherty TJ. Time and sequence dependent influence of in vitro photodynamic therapy (PDT) survival by hyperthermia. *Photochem Photobiol*. 1985 Nov;42(5):533–40.
- [234] Chen WR, et al. Chromophore-enhanced in vivo tumor cell destruction using an 808-nm diode laser. *Cancer Lett*. 1995;94(2):125–31.
- [235] Chen WR, et al. Photothermal effects on murine mammary tumors using indocyanine green and an 808-nm diode laser: An in vivo efficacy study. *Cancer Lett*. 1996;98(2):169–73.
- [236] Silva ER. Estudo da cinética e dos mecanismos da fototransformação de corantes ciânicos com dois cromóforos em interação com sistemas biomiméticos sob a ação da luz visível [tese]. Ribeirão Preto: FFCLRP, USP, 2015. doi:10.11606/T.59.2015.tde-02102015-164515.
- [237] Schäberle FA. Estudo das características espectroscópicas dos corantes ciânicos com dois cromóforos na interação com DNA: efeitos da força iônica [dissertação]. Ribeirão Preto: FFCLRP, USP, 2002. doi:10.11606/D.59.2002.tde-02112002-144416.
- [238] Gonçalves PJ, et al. Effects of interaction with CTAB micelles on photophysical characteristics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin. *J Photochem Photobiol A Chem*. 2006; 181(2–3):378–84.

MATERIAL SUPLEMENTAR

1. Coeficiente de absorção molar (ϵ) da AL em solução aquosa na literatura

- $\lambda_{492\text{nm}}=1,70 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em tampão de HCl-citrato de sódio em pH 4,00 e 25 °C. [R.D. Falcone, N.M. Correa, M.A. Biasutti, J.J. Silber, Acid–Base and Aggregation Processes of Acridine Orange Base in n - Heptane/AOT/Water Reverse Micelles, *Langmuir*. 18 (2002) 2039–2047. doi:10.1021/la011411b.]
- $\lambda_{490\text{nm}}=2,04 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em água destilada. [L. Antonov, G. Gergov, V. Petrov, M. Kubista, J. Nygren, UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water., *Talanta*. 49 (1999) 99–106. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18967580>.]
- $\lambda_{492\text{nm}}=3,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em água destilada. [M.E. Lamm, D.M. Neville, The Dimer Spectrum of Acridine Orange Hydrochloride, *The Journal of Physical Chemistry*. 69 (1965) 3872–3877. doi:10.1021/j100895a039.]
- $\lambda_{489\text{nm}} = 3,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em solução aquosa. [D. a. Makarov, N. a. Kuznetsova, O.L. Kaliya, Regularities of the photodestruction of acridine dyes in aqueous media, *Russian Journal of Physical Chemistry*. 80 (2006) 268–274. doi:10.1134/S0036024406020270.]
- $\lambda_{505\text{nm}}=3,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em solução tampão (1 mM ácido cacodílico + 0,2 mM HCl) e pH 6,7. [A. Stone, D. Bradley, Aggregation of cationic dyes on acid polysaccharides I. Spectrophotometric titration with acridine orange and other metachromatic dyes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 148 (1967) 172–192. doi:10.1016/0304-4165(67)90293-0.]
- $\lambda_{470\text{nm}} = 4,33 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em água destilada à 25 °C. [J. Kapuscinski, M. Kimmel, Thermodynamical model of mixed aggregation of intercalators with caffeine in aqueous solution, *Biophysical Chemistry*. 46 (1993) 153–163. doi:10.1016/0301-4622(93)85022-A.] e [J. Kapuscinski, Z. Darzynkiewicz, M.R. Melamed, Interactions of acridine orange with nucleic acids. Properties of complexes of acridine orange with single stranded ribonucleic acid., *Biochemical Pharmacology*. 32 (1983) 3679–94. doi:10.1016/0006-2952(83)90136-3.]
- $\lambda_{492\text{nm}}=5,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 1mM HCl. [L. Costantino, G. Guarino, O. Ortona, V. Vitagliano, Acridine orange association equilibrium in aqueous solution, *Journal of Chemical & Engineering Data*. 29 (1984) 62–66. doi:10.1021/jc00035a021.]
- $\lambda_{492\text{nm}}=5,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em solução tampão (1mM ácido cacodílico + 0,2 mM HCl) em pH 6,7. [A.L. Stone, D.F. Bradley, Aggregation of Acridine Orange Bound to Polyanions: The Stacking Tendency of Deoxyribonucleic Acids, *Journal of the American Chemical Society*. 83 (1961) 3627–3634.

doi:10.1021/ja01478a020.]

- $\lambda_{492\text{nm}} = 5,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em tampão fosfato de $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ em 99,95% de D_2O , pH = 7,0. [D.B. Davies, L.N. Djimant, A.N. Veselkov, ^1H NMR investigation of self-association of aromatic drug molecules in aqueous solution. Structural and thermodynamical analysis, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*. 92 (1996) 383. doi:10.1039/ft9969200383.]
- $\lambda_{492\text{nm}} = 6,0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em tampão fosfato em pH = 6.9, usando $1 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$. [B.H. Robinson, A. Löffler, G. Schwarz, Thermodynamic behaviour of acridine orange in solution. Model system for studying stacking and charge-effects on self-aggregation, *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases*. 69 (1973) 56. doi:10.1039/f19736900056.]
- $\lambda_{492\text{nm}} = 6,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [L. Costantino, O. Ortona, R. Sartorio, L. Silvestri, V. Vitagliano, Association equilibria of some 10-N-alkyl 3,6-bis dimethylamino acridinium salts in aqueous solution, *Advances in Molecular Relaxation and Interaction Processes*. 20 (1981) 191–198. doi:10.1016/0378-4487(81)80013-1. Cited from E. Miethke, V. Zanker, Lumineszenzmessungen an verschiedenen Acridinorange-Derivaten, *Z.physik.Chem. neue Folge*. 18 (1958), p. 375-390. doi: 10.1524/zpch.1958.18.5_6.375.]
- $\lambda_{493\text{nm}} = 6,37 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em $0,32 \text{ mM HCl}$, pH 3,5 à 25°C . [C.A. Brignoli, H. DeVoe, Least-squares computer analysis of dye absorption spectra. Acridine orange dimerization equilibrium, *The Journal of Physical Chemistry*. 82 (1978) 2570–2575. doi:10.1021/j100513a007.]