UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP-DEPARTAMENTO DE FÍSICA

ANDRÉ MIELE AMADO

AGREGAÇÃO DA ACRIDINA LARANJA EM SOLUÇÕES AQUOSAS
E NA INTERAÇÃO COM MICELAS DE SDS

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto-SP
2013

ANDRÉ MIELE AMADO

AGREGAÇÃO DA ACRIDINA LARANJA EM SOLUÇÕES AQUOSAS
E NA INTERAÇÃO COM MICELAS DE SDS

VERSÃO CORRIGIDA

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

Área de Concentração: Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Orientador: Prof. Tit. Iouri Borissevitch

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.
Agregação da Acridina Laranja em soluções aquosas e na interação com micelas de SDS / André Miele Amado
Orientador Iouri Borissevitch – Ribeirão Preto, 2013.
103 f. : il.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2013.

1. Acridina Laranja, 2.Surfactantes, 3.Dinâmica de agregação,
4.Corantes catiônicos.

Nome: AMADO, André Miele

Título: Agregação da Acridina Laranja em soluções aquosas e na sua interação com micelas de SDS

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

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação à minha família.
Difícil descrever em palavras
o quão importantes vocês
são para mim.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch minha imensa gratidão. Certamente sem a sua ajuda teria sido impossível terminar o mestrado. Maior que a dívida que tenho para com o senhor, eu o vejo como exemplo a ser seguido do que é ser professor.

Agradeço as professoras Ana Paula e Elizabeth que tão gentilmente me cederam o espectrofotômetro por correlação de fótons e me assessoraram por todo o processo.

Agradeço aos meus pais, por todo amor que me deram e por terem sempre acreditado em mim, mas também por toda a ajuda, inclusive financeira, sem esta teria sido impossível concluir este mestrado.

Agradeço ao meu irmão, grande amigo e companheiro, sempre presente nas horas mais difíceis.

Ao conterrâneo Gustavo, vindo daquelas terras de belas praias. Agradeço aos amigos Sérgio, Danilo, Ana Carolina, Rafael, André, Fernando e Mariana.

A todos do laboratório de Fotobiofísica, pelo apoio: Jonas, Elcio, Gustavo, Érika, Marina e Wallance.

À secretária da pós-graduação, Nilza.

Ao Departamento de Física.

À CAPES, pelo apoio financeiro parcial.

Não acredito que alguém nasça justo e sábio. Não que eu valorize o erro, é que conheço um segredo hermético: Quem nunca errou e sofreu não sabe Amar.

Amar é uma alquimia, que não se aprende em livros, mas a duras penas, sofrendo, fazendo sofrer. Mesmo machucado e com todos os motivos para parar, continuar seguindo em frente, perdendo, aprendendo e, quando menos se espera, descobre-se que já não é a mesma pessoa.

RESUMO

Esse trabalho apresenta um estudo experimental de agregação da Acridina Laranja (AL) em solução aquosa homogênea e na sua interação com o surfactante *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). Este estudo foi realizado com o objetivo de definir estruturas e características temporais de formação de agregados de compostos orgânicos com sistema desenvolvido de conjugação- π , usados como fotossensibilizadores e marcadores de estruturas biológicas, em sua interação com nanoestruturas heterogêneas. A informação sobre as características de agregação de fotossensibilizadores é importante devido à influência deste processo na eficácia de suas aplicações práticas, em particular na biologia e medicina. A AL foi escolhida como modelo devido aos seguintes motivos: AL é um composto bem conhecido e várias de suas características já estão bem estabelecidas na literatura; Possui alto rendimento quântico de fluorescência, alta fotoatividade, alta afinidade com estruturas biológicas (membrana celular, DNA e RNA, em particular), por isso a AL é amplamente usada como marcador fluorescente e fotossensibilizador em fototerapia; AL possui a tendência de formar agregados em solução aquosa; A agregação da AL modifica seus espectros de absorção e de fluorescência, diminui o tempo de vida e o rendimento quântico de seus estados excitados. Isso a torna um modelo útil para o estudo do fenômeno da agregação. Foram analisados os espectros de absorção óptica, de fluorescência e de espalhamento ressonante da luz em regime estático e em função do tempo, como também o espalhamento dinâmico da luz para várias concentrações de AL e de SDS. Observamos que: em soluções aquosas a AL forma agregados tipo H; O aumento da concentração de AL em soluções homogêneas induz o aumento do número de agregação; A presença do sal estimula a agregação devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas de AL; O SDS em concentrações acima de 60 μ M estimula a agregação da AL induzindo a formação de agregados mistos nAL+mSDS; A estrutura dos agregados

nAL+mSDS é flexível e instável; Os agregados mistos possuem uma dinâmica de transformações caracterizada por quatro componentes, a primeira com tempo característico < 36 s e os outros três com tempos que variam de minutos até algumas horas; A agregação diminui a intensidade da fluorescência da AL e aumenta a intensidade do ERL; Em altas concentrações o SDS diminui o número de agregação da AL chegando finalmente à sua forma monomérica ligada com os agregados e/ou micelas de SDS; Se comparado com a AL em solução aquosa homogênea, a ligação de monômeros da AL com micelas de SDS aumenta a intensidade da sua fluorescência; O estudo demonstra que a agregação afeta a eficácia dos fotossensibilizadores em aplicações. Tal fato deve ser tomado em consideração, especialmente devido à sua dinâmica prolongada, pois as características dos fotossensibilizadores se modificam continuamente durante o seu uso.

Palavras-chave: Acridina Laranja, Surfactantes, Dinâmica de agregação, Corantes catiônicos.

ABSTRACT

In this work we present an experimental study of Acridine Orange (AO) aggregation in homogeneous aqueous solutions and its interaction with a surfactant *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). The objective of this study was to define the structure and temporal characteristics of aggregates of organic compounds with developed π -conjugated system, used as photosensitizers and probes of biological structures, in its interaction with heterogeneous nano-structures. The information on photosensitizer aggregation characteristics is important as this process would affect its efficiency in practical applications, in biology and medicine, in particular. AO was chosen as a model for the following reasons: AO is a known compound with various characteristics well described in literature; AO has a high fluorescence quantum yield, high photoactivity, high affinity to biological structures (cell membrane, DNA and RNA, in particular), therefore, AO is widely used as a fluorescent marker and a photosensitizer in phototherapy; AO possesses a tendency to aggregate in aqueous solution. The aggregation of AO modifies essentially its absorption and fluorescence spectra, decreases the lifetime and quantum yield of its excited states. This makes AO a suitable model for studying the aggregation phenomenon. We have analyzed optical absorption, fluorescence and resonant light scattering spectra in the static mode and as a function of time as well as the dynamic light scattering for various AL and SDS concentrations. It was found that: in aqueous solutions AO forms H aggregates; The increase in concentration of AO in homogeneous solutions induces an increase in its aggregation number; The presence of salt stimulates aggregation due to decrease of electrostatic repulsion between AO molecules; The SDS concentrations above 60 μ M stimulate AO aggregation inducing the formation of mixed nAL + mSDS aggregates; Mixed nAL + mSDS aggregates are characterized by flexibility and

instability; Transformation dynamics of the mixed aggregates is characterized by four components, the first one with a characteristic time < 36 and the other three with times ranging from minutes to several hours; AO aggregation in a solution decreases its fluorescence and increases the resonant light scattering intensities; SDS at high concentrations reduces AO aggregation number until its monomeric form bound with SDS aggregates and / or micelles; AO monomers bound with SDS micelles possess higher fluorescence intensity as compared with that in homogeneous aqueous solutions. Our research shows that aggregation modifies efficacy of photosensitizers at their application. This has always to be considered especially due to its prolonged dynamics as the photosensitizer characteristics are modifying continuously during its application.

Keywords: Acridine Orange, Surfactant, Aggregation dynamics, Cationic Dye.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Curvas de energia potencial para interação entre partículas.	9
Figura 3.2: Sobreposição de nuvens de elétrons π durante agregação de duas moléculas na ausência (a) e (b) na presença de íons de sal, positivos ou negativos.	10
Figura 3.3: Esquema da formação de micelas e da mudança da tensão superficial em função da concentração do tensoativo, abaixo e acima da C.M.C.	11
Figura 3.4: Geometria de agregados de tipos H, J e HJ.	12
Figura 3.5: Diagrama das energias dos dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição.	13
Figura 3.6: Esquema de uma micela com íons e indicando três regiões distintas.	16
Figura 3.7: Fórmula estrutural da Acridina Laranja	18
Figura 3.8: Estrutura molecular do SDS.	20
Figura 6.1: Espectros de absorção da AL (conc. 50-510 μ M) em cubeta de caminho ótico reduzido (0,2 cm).	33
Figura 6.2: Espectros de absorção da AL (conc. 5-96 μ M) em cubeta de caminho ótico padrão (1 cm).	33
Figura 6.3: Relação entre os picos 468nm e 490nm para as concentrações de 5-96 μ M de AL.	34
Figura 6.4: Relação entre os picos 468nm e 490nm em cubeta de caminho ótico reduzido (0,2cm) para as concentrações de 50-510 μ M de AL.	35
Figura 6.5: Espectros de fluorescência da AL corrigida pela absorbância. Concentrações de 5-95 μ M e no comprimento de onda de excitação $\lambda=380$ nm.	36
Figura 6.6: Área sob o espectro da fluorescência da AL das concentrações de 5-95 μ M corrigidas pela absorbância da AL no comprimento de onda de excitação $\lambda=380$ nm.	36
Figura 6.7: Espectros da fluorescência da AL nas concentrações de 5-510 μ M e corrigidos pela absorbância no comprimento de onda de excitação $\lambda=380$ nm.	37
Figura 6.8: Área sob o espectro da fluorescência da AL das concentrações de 5-510 μ M corrigidas pela absorbância da AL no comprimento de onda de excitação $\lambda=380$ nm.	37
Figura 6.9: Espectros de excitação da AL monitorados no $\lambda_{Em}= 560$ nm. Concentração de AL 3-17 μ M.	38
Figura 6.10: Medidas do tempo de vida da AL com $\lambda_{Ex}= 460$ nm. Concentração de AL 3-	

35 μ M.	39
Figura 6.11: Espectro do ERL da AL nas concentrações de 5-96 μ M	40
Figura 6.12: Área sob a curva do espectro de espalhamento da AL das concentrações de 5-95 μ M.	40
Figura 6.13: Dados brutos antes da análise dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL, tempo total de análise.	42
Figura 6.14: Dados brutos antes da análise dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL, recorte da área selecionada da Figura 6.13.	42
Figura 6.15: Distribuição dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL por intensidade.	43
Figura 6.16: Distribuição dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL por número.	44
Figura 6.17: Índice de polidispersividade da AL nas concentrações de 10-400 μ M.	47
Figura 6.18: Dados da correlação para 15,61 μ M de AL.	48
Figura 6.19: Dados da correlação para 10,4 μ M de AL.	48
Figura 6.20: Espectro de absorção da AL na concentração de 400 μ M com a adição de NaCl (0-0,49M).	49
Figura 6.21: Espectro de absorção da AL na concentração de 54 μ M com a adição de NaCl (0-0,23M).	50
Figura 6.22: Relação entre os picos 472nm e 490nm, para a concentração de 400 μ M de AL e variando, a concentração de NaCl de 0-0,49M.	51
Figura 6.23: Relação entre os picos 472nm e 490nm, para a concentração de 54 μ M de AL e variando, a concentração de NaCl de 0-0,23M.	51
Figura 6.24: Espectro de fluorescência da AL na concentração de 400 μ M com a adição de NaCl 0-0,49M.	52
Figura 6.25: Área sob o espectro de fluorescência de 400 μ M AL e variando a concentração de sal 0-0,23M.	53
Figura 6.26: Espectro de espalhamento ressonante da luz da AL na concentração de 400 μ M com a adição de NaCl (0-0,49).	54
Figura 6.27: Área sob a curva do espectro do ERL da AL para a concentração de 400 μ M e variando a concentração de NaCl de 0-0,49M, os valores foram normalizados pelo 1º valor para efeito de comparação.	54
Figura 6.28: Espectro de espalhamento ressonante da luz da AL na concentração de 54 μ M	

com a adição de NaCl (0-0,23M). 55

Figura 6.29: Área sob a curva do espectro do ERL da AL para a concentração de 54 μM e variando a concentração de NaCl de 0-0,23M, os valores foram normalizados pelo 1º valor para efeito de comparação. 55

Figura 6.30: Espectro de absorção de 32 μM de AL com adição de 0-100 μM de SDS. 59

Figura 6.31: Relação entre os picos 490nm e 472nm para as concentrações de 14, 32 e 54 μM de AL com adição de 0-100 μM de SDS. 60

Figura 6.32: Espectro de absorção de 54 μM de AL em diferentes proporções de água/etanol. 60

Figura 6.33: Monitoramento do pico de absorção em 490nm da AL em 54 μM e em diferentes proporções de água/etanol. 61

Figura 6.34: Espectro de absorção da AL na conc. de 54 μM em concentrações de SDS de 0-10m Molar. 61

Figura 6.35: Relação entre os picos 490nm e 470nm para a AL na conc. de 54 μM em concentrações de SDS de 0-10 mMolar. 62

Figura 6.36: Absorção da AL no pico de 490nm e nas concentrações de 5-74 μM em concentrações de SDS de 0-10 mMolar. Os valores foram corrigidos pelo máximo de absorção. 62

Figura 6.37: Espectro da fluorescência da AL na concentração de 32 μM , com adição de SDS das concentrações de 0-10 mMolar e corrigidos pela absorbância 63

Figura 6.38: Área sob a curva do espectro de fluorescência para as concentração de 32 μM de AL, com adição de SDS das concentrações de 0-10 mMolar e corrigidos pela absorbância. 64

Figura 6.39: Espectro da fluorescência da AL nas concentrações de 5-73 μM , com adição de SDS das concentrações de 0-10 mMolar e corrigidos pela absorbância. 65

Figura 6.40: Espectro do ERL da AL na concentração de 74 μM e variando a concentração de SDS de 0-10 mM. 66

Figura 6.41: Área sob a curva do espectro do ERL da AL para a concentração de 74 μM e variando a concentração de SDS de 0-10 mM. Os valores foram normalizados pelo 1º valor para efeito de comparação. 66

Figura 6.42: Espectro de absorção da AL nas conc. de 5-12 μM . Os espectros foram normalizados pelo pico 267nm por conta da queda da intensidade pela diluição. 68

Figura 6.43: Área sob a curva do espectro do ERL da AL na concentração de 5 μM e variando a concentração de SDS de 0-10mM, os valores foram normalizados pela intensidade de espalhamento que não tinha SDS. 69

Figura 6.44: Área sob a curva do espectro do ERL da AL nas concentrações de 5-73 μM e variando a concentração de SDS de 0-10 mM. Intensidade normalizada pela intensidade de espalhamento que não tinha SDS. 69

Figura 6.45: Área sob a curva do espectro do ERL da AL nas concentrações de 5-73 μM e variando a concentração de SDS de 0-10 mM. 70

Figura 6.46: Espectro de absorção da AL com concentração de 32 μM e com adição de 2500 μM de SDS durante $\approx 1,5$ hora. 75

Figura 6.47: Espectro de absorção da AL com concentração de 32 μM e com adição de 20 μM de SDS durante ≈ 3 horas. 75

Figura 6.48: Espectro de absorção da AL com concentração de 32 μM e com adição de 0,5 mM de SDS durante ≈ 12 horas. 76

Figura 6.49: Espectro de absorção da AL com concentração de 54 μM e com adição de 50 μM de SDS durante $\approx 1,5$ hora. 77

Figura 6.50: Variação temporal do λ_{abs} 268 nm da AL com concentração de 32 μM e com adição de 100 μM de SDS durante ≈ 10 horas. 78

Figura 6.51: Variação temporal do λ_{abs} 290 nm da AL com concentração de 32 μM e com adição de 100 μM de SDS durante ≈ 10 horas. 78

Figura 6.52: Variação temporal do λ_{abs} 565 nm da AL com concentração de 32 μM e com adição de 100 μM de SDS durante ≈ 10 horas. 79

Figura 6.53: Espectro de absorção da AL com concentração de 32 μM e com adição de 500 μM de SDS em diferentes instantes de tempo. 80

Figura 6.54: Variação temporal do λ_{abs} 490 nm da AL com concentração de 14 μM e com adição de 75 μM de SDS durante ≈ 11 horas. A seta indica o momento em que manuseamos a amostra. 81

Figura 6.55: Variação temporal do λ_{abs} 490 nm da AL com concentração de 75 μM e com adição de 75 μM de SDS durante ≈ 11 horas. A seta indica o momento em que manuseamos a amostra. 82

Figura 6.56: Espectro de ERL da AL com concentração de 32 μM e com adição de 50 μM de SDS durante ≈ 10 horas. 83

Figura 6.57: Espectro de ERL da AL com concentração de 32 μM e com adição de 50 μM de SDS durante ≈ 10 horas. 84

Figura 6.58: Área sob a curva do espectro do ERL da AL na concentração de 32 μM e com adição de 500 μM de SDS durante ≈ 10 horas. 84

Figura 6.59: Espectro de ERL normalizados pelo máximo da AL com concentração de 32 μM com a adição de 500 μM de SDS em diferentes instantes de tempo. 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	Acridina Laranja
CI	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistemas
CMC	Concentração micelar crítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDL	Espalhamento dinâmico da luz
ERL	Espalhamento ressonante da luz
FS	Fotossensibilizador
RNA	Ácido ribonucleico
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

n_{ag}, n e m	Número de agregação
W_q	Energia eletrostática
Q	Carga do monômero
ε_0	Constante dielétrica do meio
r	Distância entre os monômeros
W_k	Energia de Keesom
U	Momento de dipolo do monômero
k	Constante de Boltzmann
T	Temperatura em Kelvin
W_l	Força de London
h	Constante de Planck
ν	Frequência de absorção eletrônica
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, dispostos em pilha
HJ	Agregado tipo misto
H_d, H_1 e H_2	Hamiltonianos do dímero e dos monômeros livres 1 e 2, respectivamente
V	Operador que descreve a interação dipolo-dipolo
U_1 e U_2	Operadores de momento de dipolo dos monômeros 1 e 2
r_{12}	Distância entre os centros dos dipolos
D	Momento de transição
θ	ângulo entre os dipolos de transição
I_0	Intensidade da luz incidente
I_{abs}, I_r, I_{esp} e I_{tr}	Intensidades de luz absorvida, refletida, espalhada e transmitida.
E_{ex} e E_{fund}	Energias dos estados excitados e fundamental
c	Concentração da partícula
λ	Comprimento de onda da luz
ε	Coefficiente de absorção molar
A	Absorbância
l	Caminho ótico

$S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$	Estados excitados singletos
$T_1, T_2, \dots, T_n$	Estados excitados tripletos
k_{CI} e k_{CIS}	Taxas em que ocorrem os processos de CI e CIS, respectivamente
ϕ_f	Rendimento quântico da fluorescência
n_{abs} e n_f	Número de fótons absorvidos e emitidos por fluorescência, respectivamente
k_f	Constantes de decaimento radioativa e da fluorescência
I_f	Intensidade da luz emitida pela fluorescência
I_{at}	Intensidade da luz de ativação
n_0 e n_p	Índice de refração do meio e o índice de refração da partícula-espalhadora
V_{ag}	Volume da partícula/agregado
λ_{inc} e λ_{esp}	Comprimento da onda espalhada e da incidente
K	Coefficiente de proporção
λ_{max}	Comprimento de onda em que ocorre o máximo de absorção
I_{ERL} , I_{ERLag}	Intensidade de ERL da partícula e do agregado
c_{ag}	Concentração de agregados
V_m	Volume do monômero
D_i	Coefficiente de difusão
R_h	Raio hidrodinâmico da partícula/agregado
η_{vis}	Viscosidade do meio
t e Δt	Tempo e incremento no tempo
T	Tempo de medição
I	Intensidade da luz
$\vec{q}$	Vetor de espalhamento

LISTA DE TABELAS

- Tabela 6.1:** Distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras para as concentrações 10-400 μ M da AL, obtidas pelos modos de Intensidade e de Números do método Contin. 45
- Tabela 6.2:** Índice de polidispersividade da AL na concentração de 10-400 μ M. 46
- Tabela 6.3:** Distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras obtidas pelos modos de Intensidade e de Números do método Contin para as concentrações 100-400 μ M da AL na presença de NaCl a 0,5M. 56
- Tabela 6.4:** Distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras obtidas pelos modos de Intensidade e de Números do método Contin para 75 μ mol de AL em diferentes concentrações de SDS (0-1mM). 71
- Tabela 6.5:** Tempos característicos das três componentes das curvas cinéticas para [AL] (14-74 μ M) e [SDS] (0,1-1 mM). 79
- Tabela 6.6:** Tempos característicos das três componentes das curvas cinéticas para [AL] 32 μ M e [SDS] (50-1000 μ M). 85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA	4
3. BASE CIENTÍFICA	6
3.1 AGREGAÇÃO	6
3.1.1 Interações responsáveis pela formação dos agregados	7
3.1.2 Tipos de agregados	11
3.1.3 Os níveis de energia e os espectros de absorção ótica de agregados	12
3.2 SURFACTANTES E MICELAS	14
3.3 OBJETOS DO ESTUDO	18
3.3.1 Acridina Laranja (AL)	18
3.3.2 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)	19
4. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	21
4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓTICA DE MODO CONTÍNUO	21
4.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE MODO CONTÍNUO	23
4.3 ESPALHAMENTO DE RESSONÂNCIA DA LUZ (ERL)	24
4.4 ESPALHAMENTO DINÂMICO DA LUZ (EDL)	26
4.4.1 Algoritmo Contin	28
5. MATERIAIS E MÉTODOS	30
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
6.1 AL EM SOLUÇÃO HOMOGÊNEA	32
6.1.1 Absorção ótica em modo contínuo	32
6.1.2 Fluorescência em modo contínuo	35
6.1.3 Espalhamento ressonante da luz (ERL)	39
6.1.4 Espalhamento dinâmico da luz	41
6.1.5 Absorção ótica em modo contínuo da AL na presença de sal	49
6.1.6 Fluorescência em modo contínuo da AL na presença de sal	52
6.1.7 Espalhamento ressonante da luz da AL na presença de sal (ERL)	53
6.1.8 Espalhamento dinâmico da luz	56
6.2 MEDIDAS ESTÁTICAS DE AL+SDS	58
6.2.1 Absorção ótica em modo contínuo	58
6.2.2 Fluorescência em modo contínuo	63
6.2.3 Espalhamento ressonante da luz	65
6.2.4 Espalhamento dinâmico da luz	71
6.3 DINÂMICA DA AGREGAÇÃO DA AL+SDS	74
6.3.1 Absorção ótica em modo contínuo	74
6.3.1.1 Observação	80
6.3.2 Fluorescência em modo contínuo	82
6.3.3 Espalhamento ressonante da luz	82
7. CONCLUSÕES	88
7.1 EM SOLUÇÃO HOMOGÊNEA	88
7.2 NA PRESENÇA DE SDS	88
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	91
9. REFERÊNCIAS	92

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno de agregação é de grande importância na natureza. O elemento principal na arquitetura da célula viva, a membrana, é o resultado de agregação dos fosfolipídeos, que formam uma bicamada separando o interior da célula do ambiente exterior. Assim, podemos dizer que toda natureza viva existe devido ao fenômeno de agregação. Esse fenômeno é usado atualmente em várias áreas da ciência e de tecnologia moderna, inclusive em nanotecnologia, na produção de novos dispositivos nanoeletrônicos, sensores, etc.

Na medicina moderna o fenômeno de agregação compõe a base de transporte de fármacos no organismo (“drug delivery”). Além da importância para a medicina e a biologia, os estudos de agregação de compostos com conjugação π na sua interação com os sistemas biomiméticos, são importantes para as tecnologias modernas na produção dos dispositivos nanoeletrônicos (KELLEY; BARTON 1999; KASUMOV et al, 2001; RAKITIN et al, 2001), no desenvolvimento da técnica de lasers e nos limitadores da intensidade da radiação nas regiões UV e visível (CLAYS et al, 1993; WANG et al, 1997; SHIRK, 2000).

Entretanto a agregação pode fazer também o papel negativo. A agregação de proteínas, moléculas de colesterol ou, por exemplo, células de eritrócitos, têm várias consequências graves no organismo vivo, trombose etc.

Apesar de que o efeito de agregação está sendo estudado durante várias décadas, diversos aspectos teóricos e experimentais do problema ainda não foram bem estabelecidos e continuam atraindo a atenção dos pesquisadores.

Um agregado pode ser considerado como um aglomerado de algumas partículas, inclusive moléculas, que se juntam sem ligações químicas. Entretanto, destacamos que existem os agregados, onde os monômeros se ligam quimicamente, por exemplo, μ -oxo-

dímeros, que se formam através de uma ligação covalente formada por átomos de oxigênio com os átomos de Fe^{3+} . Os agregados que contêm partículas (ou moléculas) de tipo único são chamados homogêneos e aqueles que contem partículas de vários tipos são chamados mistos. Um agregado é caracterizado pela sua estrutura espacial (posição relativa de partículas dentro do agregado) e pelo número de agregação “ n_{ag} ” (o número médio de partículas no agregado).

Vários mecanismos são responsáveis pela agregação:

- 1- Interações eletrostáticas;
- 2- Formação de ligação de hidrogênio;
- 3- Formação de complexos tipo π - π ;
- 4- Interação hidrofóbica;

A modulação dessas interações de alguma maneira pode influenciar as características de agregado modificando seu número de agregação e/ou a sua estrutura espacial. Nesse aspecto torna-se importante o estudo da interação de compostos de interesse médico e biológico com sistemas biológicos (proteínas, DNA, membranas celulares, etc.) ou com sistemas modelo (micelas, vesículas, monocamadas de fosfolipídeos, etc.), pois pode induzir à formação de vários tipos de agregados ou, pelo contrario, à desagregação no organismo, afetando a eficácia do composto. Esse problema tem um interesse especial para os compostos com sistema desenvolvido de conjugação π na sua estrutura.

A presença do sistema π determina duas características intrínsecas dos compostos: intensa absorção ótica na região visível e relativamente alta hidrofobicidade. A primeira característica, que permite chamar esses compostos de “fotossensibilizadores” (FS), os torna promissores para aplicações na medicina como as sondas da fluorescência (se possuem a mesma) ou como FS na fotoquimioterapia (se possuem fototoxicidade). A segunda característica determina sua afinidade para os sítios hidrofóbicos nas proteínas, no DNA e nas

membranas celulares, assim como a sua tendência de agregar aos meios aquosos. Mesmo na forma iônica, quando esses compostos são solúveis em água, eles preservam essa tendência e demonstram as propriedades anfífilas.

As variações nas características do meio, por exemplo, aumento ou diminuição da força iônica ou do pH, modificam as interações eletrostáticas das moléculas de FS entre si e com sistemas biomiméticos, podendo assim modificar a probabilidade de agregação do FS.

Outra característica importante é a dinâmica de formação dos agregados, cujos tempos de formação já em soluções homogêneas podem, depende das condições, variar de milissegundos até horas (AGGARWAL; BORISSEVITCH 2006).

Entre os fotossensibilizadores os corantes da família das acridinas têm interesse especial, como será explicado abaixo. Nesse trabalho investigamos o processo de agregação do FS AL na sua interação com o SDS em soluções aquosas, em função das concentrações de ambos.

Baseando-se nas informações apresentadas optamos por definir o objetivo do trabalho logo em seguida.

2. OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O objetivo desse trabalho é estudar as características espectroscópicas e dinâmicas da agregação da Acridina Laranja em solução aquosa homogênea e na presença de tensoativo SDS em função das concentrações de AL e de SDS.

As informações sobre a agregação dos sistemas corantes catiônicos e tensoativos são importantes por vários motivos (YAO; KOBAYASHI; KIMURA, 2007). No entanto, existem poucas informações sobre a dinâmica deste processo, como no caso específico da AL, que pode atingir o equilíbrio em segundos ou em horas, dependendo de fatores como as concentrações de AL e SDS, da composição do meio e de perturbações cinéticas.

A AL possui diversas propriedades que permitem-na ser usada em diversas aplicações tanto em medicina e biologia quanto em diversas áreas técnicas. Ela pode agir como: composto antitumoral (KUSUZAKI et al., 2000, 2012); fotossensibilizador aplicado, por exemplo na terapia fotodinâmica (SATONAKA et al., 2011); marcador fluorescente das estruturas celulares (ZELENIN, 1999; BI et al., 2006; YUNJING; HANXI, 1999)] devido sua alta afinidade com essas estruturas e a capacidade de fluir rapidamente pelo citoplasma e atravessar com facilidade a membrana celular (SHAW; PAL, 2007; ROBBINS; MARCUS, 1963); indicador do pH em sistemas biológicos, em particular o gradiente do pH através da membrana (PALMGREN, 1991). Além disso, ela mostrou alta potencialidade para usos em eletrônica molecular e limitadores de UV/visível (LEE et al., 2007; AICH et al., 1999).

O estudo da interação da AL com sistemas nanoorganizados se justifica pela importância nas aplicações médicas e biológicas supracitadas. Em nosso caso particular, o estudo da interação entre AL e as micelas de *Sodium Dodecil Sulfate* (SDS) se justifica por:

- O SDS é um bom modelo de sistema nanoorganizado que mimetiza simplificada

a membrana celular (SIDOROWICZ et al., 2005; BORGES; BORISSEVITCH; TABAK; 1995).

- Em sistemas nanoorganizados encontra-se o fenômeno da agregação, que é de grande importância nos sistemas biológicos, cujos diversos aspectos teóricos e experimentais ainda não estão esclarecidos. Este fenômeno atrai um interesse especial para compreender como pela autoorganização de subunidades formam-se grandes estruturas com atividades biológicas (ROBINSON; LOFFLER; SCHWARZ, 1973).
- A agregação da AL pode ou não ser desejada dependendo da aplicação e é decisiva para uma boa eficiência.
- A AL é um bom modelo para o estudo do fenômeno da agregação (ROBINSON; LOFFLER; SCHWARZ, 1973).
- O estudo da agregação da AL em soluções aquosas já é bem conhecido (BLEARS; DANYLUK, 1966), entretanto, a agregação da AL em interação com sistemas nanoorganizados ainda tem diversos aspectos não solucionados. Entre esses aspectos a dinâmica de agregação é de interesse especial.

3.BASE CIENTÍFICA

3.1 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 (ISRAELASHVILI, 2011).

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; mudanças na anisotropia, tempo de difusão, etc. Tais fatores são essenciais para as aplicações do composto.

3.1.1 Interações responsáveis pela formação dos agregados

i. A interação eletrostática

A energia eletrostática da interação de duas moléculas carregadas é:

$$W_q = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad (3.1)$$

em que Q é a carga do monômero, ϵ_0 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:

$$W_k = \frac{U^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 kTr^6} \quad (3.2)$$

em que U é o momento de dipolo do monômero, k 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:

$$W_L = -\left(\frac{3}{4}\right) \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (3.3)$$

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 3.1)

Figura 3.1: Curvas de energia potencial para interação entre partículas (SCHARBELE, 2007).

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. Ligações de hidrogênio

As ligações de hidrogênio não são propriamente 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 de sobreposição de suas nuvens de elétrons π (Figura 3.2).

Figura 3.2: Sobreposição de nuvens de elétrons π durante agregação de duas moléculas na ausência (a) e (b) na presença de íons de sal, positivos ou negativos (SCHARBELE, 2007).

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 em que as moléculas de água além de provocarem a formação dos agregados têm mais um caminho para diminuir a energia do sistema, empurrar a parte hidrofóbica do tensoativo para a superfície do líquido, diminuindo assim a tensão superficial da solução aquosa (Figura 3.3).

Figura 3.3: Esquema da formação de micelas e da mudança da tensão superficial em função da concentração do tensoativo, abaixo e acima da C.M.C. (CHEVALIER; ZEMB, 1990).

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.

3.1.2 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 (KASHA, 1963; ANTONOV et al, 1999; JIMÉNEZ-MILLÁN et al, 2011; JAMES; ROBINSON, 1976):

- 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 3.4: 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 (AGGARWAL; BORISSEVITCH, 2006; SCHABERLE; KUZ'MIN; BORISSEVITCH, 2003; AUWERAER; SCHEBLYKIN, 2002; SHKLYAREVSKIY et al, 2002; BERLEPSCH; KIRSTEIN; BOTTCHE, 2002).

3.1.3 Os níveis de energia e os espectros de absorção ótica de agregados

O agregado da AL possui características espectrais e de estados excitados distintas do que a forma monomérica. Entre os fatores que influem nos níveis de energia temos a geometria espacial do agregado. Tal influência é devido a orientação relativa entre os dipolos dos monômeros (KASHA, 1963) que pode tanto deslocar o espectro para comprimentos maiores (Agregados do tipo J) quanto menores (Agregados do tipo H).

A explicação simplificada desse efeito é: 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 3.5a), 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 3.5b), 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 3.5: 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 (AGGARWAL, 2005)

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

$$H_d = H_1 + H_2 + V \quad (3.4)$$

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

$$V = \frac{(U_1 * U_2)}{r_{12}^3} - 3 \frac{(U_1 * r_{12})(r_{12} * U_2)}{r_{12}^5} \quad (3.5)$$

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:

$$v_+ = \frac{1}{h}(V_{0a} + V_{12}) \quad (3.6a)$$

$$v_- = \frac{1}{h}(V_{0a} - V_{12}) \quad (3.6b)$$

e

$$D_{0A_{\pm}} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \quad (3.7)$$

$$\sqrt{D_{0a}} = |\langle \varphi_{10} | U_1 | \varphi_{1a} \rangle| = |\langle \varphi_{20} | U_2 | \varphi_{2a} \rangle| \quad (3.8)$$

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 3.4-3.8.

3.2 SURFACTANTES E MICELAS

Surfactantes, também chamados tensoativos, 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 (DOMINGUEZ et al, 1997), eles têm aplicações bem diversas que vão desde uso para produtos de limpeza, higiene pessoal (HEALY et al, 1999), cosméticos (GHOSH; BLANKSCHTEIN, 2008; MAO et al, 2012) e outros produtos farmacêuticos (veículo, por exemplo) (PONGPEERAPAT et al, 2004), em cinética química ou equilíbrio (NCBI, 2012), eletroforese em gel (DULANEY; TOUSTER, 1970), cristalização de proteínas (GILLILAND; DAVIES, 1984) e bio-separação (DODEUR; JACQUET, 1980; LESSER et al, 1986).

As principais características do uso de tensoativos estão relacionadas à formação de estruturas organizadas, também conhecidos como micelas. Tal característica é devido a sua natureza anfifílica, isto é, possuem tanto uma região hidrofílica (solúvel em água) quanto uma região hidrofóbica (insolúvel em água, mas que é solúvel em solventes orgânicos e lipídios). A parte hidrofóbica, justamente por ser apolar não possui momento de dipolo permanente, entretanto, a parte hidrofílica pode possuir um momento dipolo permanente ou ser facilmente polarizada. Dependendo se o tensoativo possui 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 de grupos carregados) (KOSSWIG, 2000).

Em soluções aquosas os tensoativo 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 em resposta ao efeito hidrofóbico (CHEVALIER; ZEMB, 1990; MAIBAUM; DINNER; CHANDLER, 2004).

A CMC depende de características intrínsecas tais como estrutura do tensoativo, como, por exemplo, 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 (ROMANI et al., 2009). Por exemplo, a formação das micelas aproxima os grupos hidrofílicos gerando uma repulsão eletrostática que se opõe ao processo de micelização, a presença de 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.

As micelas são termodinamicamente estáveis e sob as mesmas condições apresentam as mesmas características, sendo assim facilmente reproduzíveis. Ainda que estável, 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. (PIASECKI; WIRTH, 1993)

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 3.6: Esquema de uma micela com íons e indicando três regiões distintas.

A estrutura das micelas possui três regiões distintas (Figura 3.6):

- (a) Região interna hidrofóbica, caracterizada por uma baixa constante dielétrica ϵ_0 de 2-4. Tal região é formada para afastar a parte apolar do tensoativo 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. Caracterizado por ϵ_0 de 5-18. 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 *18-81*, cuja distância varia de acordo com a força iônica do meio, em torno de 10 a 100 Å (um angstrom= 10^{-10} m) (TANFORD, 1980).

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 (GANDINI; YUSHMANOV; BORISSEVITCH, 1999; BORISSEVITCH et al, 1995; DE PAOLI; BORISSEVITCH; TEDESCO, 2002).

3.3 OBJETOS DO ESTUDO

3.3.1 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 história longa 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. Como exemplo podemos citar também a base de dados *Scirus* que somente em 2011 indexou 6 mil artigos sobre a AL e que possui mais de 63 mil artigos indexados ao total até a data de 18/09/2012.

Figura 3.7: 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 , solúvel em água, peso molecular de 265 g mol^{-1} , volume molar 227 cm^3 , apresenta-se sólida à temperatura ambiente e ponto de ebulição de 469°C a 760 mmHg e ponto de fusão $\approx 107^\circ\text{C}$ (CHEMSPIDER, 2012a).

Entre as aplicações da AL na biologia e medicina uma das principais é na

microscópica de fluorescência para detecção de microrganismos, sendo amplamente utilizada em laboratórios de pesquisa quanto em exames clínicos, devido a sua capacidade de colorir diferencialmente os microrganismos de materiais celulares.

A coloração fluorocromática de microrganismos utilizando Acridina Laranja foi descrita pela primeira vez por Strugger e Hilbrich em 1942 (STRUGGER; HILBRICH, 1942). Em 1956 Bertalanffy, e Armstrong observaram que a AL pode ser utilizada como marcador para DNA e RNA (ARMSTRONG, 1956; BICKIS; VON BERTALANFFY, 1956). Desde então tem sido amplamente utilizada na contagem bacteriológica\microbiana de solos (STRUGGER, 1948) e água (POLARD et al., 2011), assim como do sangue para exames clínicos (BURDASH et al, 1983). Coletando o escorrimento vaginal é possível utilizar a AL para a detecção do *Trichomonas vaginalis* (causador da tricomoníase) (COSTAMAGNA et al, 2000) e da *Gardnerella vaginalis* (causador da vaginose bacteriana) (BEGUM et al., 2011). É a técnica dominante na análise do bacilo da tuberculose devido à sua velocidade, simplicidade e confiabilidade do método (PETRENKO; SOROKULOVA, 2004).

A AL é um dos típicos intercaladores na estrutura do DNA e sendo excitado através de luz pode induzir mutações na estrutura do DNA e até destruir a molécula. A AL possui carga líquida +1 para o pH entre 6,0 e 10,0. Ou seja, a AL é um composto cujas características são já bem conhecidas e estabelecidas na literatura (NASIM; BRYCHCY, 1979; LYLES; CAMERON; RAWLS, 2001; GINJIRO, 1999).

3.3.2 Dodecil Sulfato de Sódio (SDS)

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

A fórmula molecular do SDS (Figura 3.7) é $C_{12}H_{25}NaO_4S$ e seu peso molecular é de

288,4 g/mol (CHEMSPIDER, 2012b). O SDS é carregado negativamente. Em temperatura ambiente na ausência de sal possui a CMC ≈ 10 mM e número de agregação ≈ 62 (NEUGEBAUER, 1994)

Figura 3.8: Estrutura molecular do SDS

O SDS é um conhecido anti-microbica e anti-virótico (PIRET et al., 2000), e emulsificante de gordura (MÉNDEZ-VELASCO; GOFF, 2012)]. Em alta concentração ele pode destruir a membrana celular, nesse processo o SDS isola as proteínas da membrana permitindo que esta seja analisada ou utilizada na reconstituição de sistemas bem definidos de lisossomas (LASH et al, 1983; SCHWENDENER et al, 1981; SZOKA; PAPAHAADJOPOULOS, 1980).

Devido a forte repulsão eletrostática entre as cabeças polares e curta cadeia hidrofóbica as micelas de SDS são bem flexíveis e permitem as moléculas de água penetrar na sua estrutura até a região hidrofóbica (TANFORD, 1980).

4. 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.

Para estudar a agregação da AL, utilizamos as técnicas de espectroscopia de fluorescência e de absorção ótica ambas de modo contínuo, espalhamento dinâmico da luz e espalhamento ressonante da luz. Segue uma breve descrição das técnicas e seus princípios.

4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓTICA DE MODO CONTÍNUO

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

$$I_0 = I_{abs.} + I_r + I_{esp} + I_{tr} \quad (4.1)$$

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.

A absorção significa que um fóton é absorvido por um átomo ou uma molécula. Após esta absorção, dependendo da energia absorvida, poderá ocorrer uma transição, levando o átomo ou molécula de seu estado de menor energia possível (estado fundamental ou *ground state*) para um estado mais energético (estado excitado ou *excited state*).

Os níveis energéticos nos átomos ou moléculas são quantizados, implicando que a absorção da luz será por linhas espectrais cuja posição na escala do espectro está definida pela condição:

$$h\nu = \Delta E = E_{ex} - E_{fund} \quad (4.2)$$

em que h é a constante do Planck, ν é a frequência do fóton, E_{ex} e E_{fund} são as energias dos

estados excitados e fundamental, respectivamente.

Na técnica de espectroscopia de absorção ótica de UV-Vis a radiação eletromagnética utilizada possui energia suficiente para que ocorram transições eletrônicas. O espectro de absorção ótica é a dependência da intensidade absorvida da luz incidente na amostra ou da absorbância da amostra em função do comprimento de onda ou da frequência da radiação incidente. A absorbância é definida pela lei de Lambert-Beer:

$$I_{tr} = I_0 * 10^{-\epsilon cl} \quad (4.3)$$

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I_{tr}} = \epsilon cl \quad (4.4)$$

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 ótico em cm, A é a absorbância e ϵ o coeficiente de absorção molar em $\text{Molar}^{-1}\text{cm}^{-1}$, que em função do comprimento de onda da luz λ é uma característica intrínseca de cada composto nas condições definidas do meio (pH, natureza do solvente, presença de outros compostos, etc.). ϵ é uma medida da probabilidade de uma dada transição eletrônica, que depende da sua estrutura eletrônica. Alterações na estrutura eletrônica da amostra alteram o ϵ , que se reflete experimentalmente nas mudanças do espectro de absorção ótica. Monitorando o espectro de absorção podemos deduzir se há mudanças na estrutura da molécula ou formação de fotoprodutos.

De (4.3) e (4.4) podemos deduzir a intensidade da luz absorvida pela amostra (I_{abs}):

$$I_{abs.} = I_0 - I_{tr} = I_0(1 - 10^{-\epsilon cl}) \quad (4.5)$$

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:

$$I_{tr} = I_0 * 10^{-(A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n)} = I_0 * 10^{-(\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2 + \epsilon_3 c_3 + \dots + \epsilon_n c_n)l} \quad (4.6)$$

4.2 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 (VALEUR, 2001). 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 ($S_1, S_2, S_3, \dots, S_n$) e mantém o seu *spin* oposto ao seu par que permaneceu no orbital fundamental (*ground state*). Ainda é possível ocorrer a mudança de *spin* passando a molécula para estado excitado tripleto ($T_1, T_2, \dots, T_n$). Desse estado a molécula também pode emitir um fóton pelo processo da fosforescência.

Outra possibilidade para molécula perder sua energia de excitação é transformá-la em calor por processos não radiativos que incluem duas etapas: transição isoenergética entre os níveis vibracionais de dois diferentes estados eletrônicos e consequente transição entre os níveis vibracionais do mesmo estado eletrônico (relaxação vibracional).

Os processos isoenergéticos que ocorrem entre estados eletrônicos de mesmo *spin* são chamados de conversão interna (CI), e aqueles que ocorrem entre os estados de *spin* diferente são denominados de cruzamento intersistemas (CIS). As taxas em que ocorrem os processos de CI e CIS são, respectivamente, k_{CI} e k_{CIS} . Usualmente, $k_{CI} \gg k_{CIS}$, devido a este último ser uma transição proibida pelas regras de seleção de *spin*.

Uma característica importante da fluorescência é seu rendimento quântico (ϕ_f) que pode ser definido como:

$$\frac{\text{número de fótons emitidos por fluorescência}}{\text{número de fótons absorvidos}} = \frac{n_{fl}}{n_{abs}} \quad (4.7)$$

$$\varphi_{fl} = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{ci} + k_{cis}} = \frac{I_{fl}}{I_{abs}} \quad (4.8)$$

Sendo k_{fl} , k_{ci} e k_{cis} as constantes da fluorescência, conversão interna e cruzamentos intersistema, respectivamente. I_{fl} e I_{abs} as intensidades da luz emitida pela fluorescência e daquela absorvida, respectivamente.

A agregação aumenta a probabilidade de perdas não radiativas por CI e CIS, pois aumenta as taxas k_{CI} e k_{CIS} (VAN DUUREN; GOLDSCHMIDT; SELTZMAN, 1969). Além disso, dentro do agregado aumenta-se a probabilidade de perdas não-radiativas por processo de relaxação vibracional devido às colisões com outras partículas/moléculas do agregado ou devido a supressão dos estados excitados por causa de transferência da energia entre os monômeros. O que resulta na diminuição dos rendimentos quânticos de fluorescência (φ_{fl}). Isso pode influenciar na eficiência da AL em suas aplicações como sonda fluorescente ou fotossensibilizador.

4.3 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 ótica da amostra.

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

$$I_{esp} = AI_{at} \frac{(n_0^4 C V_{ag}^2)}{(\lambda^4)} * \left(\frac{n_p^2 - n_0^2}{n_p^2 + n_0^2} \right) * (1 + \cos^2(\Theta)) = \frac{B}{\lambda^4} \quad (4.9)$$

Onde, A é coeficiente de proporção, I_{at} é a intensidade da luz de ativação, I_{esp} a intensidade da

luz espalhada, n_0 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:

$$\lambda = \lambda_{inc} = \lambda_{esp} \quad (4.10)$$

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:

$$n_p = n_0 \rightarrow I_{esp} = 0 \quad (4.11)$$

entretanto, devido ao movimento térmico das moléculas há flutuações de densidade e consequentemente variações locais do índice de refração n_0 produzindo espalhamento, ou seja, tanto na ausência quanto na presença de um soluto:

$$n_p \neq n_0 \rightarrow I_{esp} \neq 0 \quad (4.12)$$

Em soluções com espécies absorvedoras ocorrem dois efeitos (BORISSEVITCH et al, 1997):

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 de índice de refração da partícula-espalhadora. Tal efeito chama-se “espalhamento ressonante da luz”.

O índice de refração da partícula pode ser escrito como:

$$n_p^2 = \frac{1 + K(\lambda_{max}^2 * \lambda^2)}{\lambda^2 - \lambda_{max}^2} \quad (4.13)$$

Onde “K” é um coeficiente de proporção, $\lambda_{\max}$ é o comprimento de onda em que ocorre o máximo de absorção e λ é o comprimento de onda espalhada. Quando,

$$\lambda_{\max} \rightarrow \lambda; \quad n_p^2 \rightarrow \infty \quad (4.14)$$

$$\left(n_p^2 - n_0^2 \right) / \left(n_p^2 + n_0^2 \right) \rightarrow 1 \quad (4.15)$$

Este efeito pode ser ofuscado pela absorção, entretanto, o espalhamento é proporcional ao quadrado do volume das partículas-espalhadoras e no caso em que há formação 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}).

Seguindo a fórmula,

$$I_{ERLag} = K V_{ag}^2 c_{ag} = K c_{ag} V_m^2 n_{ag}^2 = K \left(\frac{c}{n_{ag}} \right) V_m^2 n_{ag}^2 = K c V_m^2 n_{ag} = I_{ERLm} n_{ag} \quad (4.16)$$

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 de agregados ($V_{ag} = V_m * n_{ag}$). Este método pode ser usado para estudos de agregação e avaliação do número médio de agregação.

4.4 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 fluido (movimento browniano) e podem ser caracterizadas por um “coeficiente de difusão” (D_i), quanto menor a partícula maior a sua velocidade de difusão no meio. O coeficiente de difusão translacional está relacionado com o raio hidrodinâmico da partícula (R_h) pela equação de Stokes-Einstein:

$$D_i = \frac{kT}{6\pi R_h \eta_{vis}} \quad (4.17)$$

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

Partículas menores causarão flutuações na intensidade de luz espalhada em espaços de tempos menores do que as partículas maiores. Desta forma, 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 (ENOKI, 2010).

$$I = \lim \frac{1}{T} \int I(t) dt \quad (4.18)$$

onde I é a intensidade da luz que chega ao detector, T 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 precisa ser maior que o tempo de flutuação e a função de correlação precisa ir para zero quando T aumenta. (MALVERN, 1996)

$$T \rightarrow \infty; \quad \langle I(T) \rangle \rightarrow 0 \quad (4.19)$$

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 ($\vec{q}$):

$$D_i = \left(\frac{1}{\tau_i} \right) q^{-2} \quad (4.20)$$

O vetor de espalhamento é definido como:

$$q = \left| \vec{q} \right| = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda} \quad (4.21)$$

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

No caso específico do detector posicionado num ângulo de 90° e utilizando um laser de He-Ne de $\lambda=632,8\text{nm}$, a eq. 4.21 resulta em:

$$q = \left| \vec{q} \right| = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda} = \frac{4\pi \sin(90^\circ/2)}{633 \times 10^{-9}} = 1,4 \times 10^7 \text{ m}^{-1} \quad (4.21b)$$

A partir do coeficiente de difusão (eq. 4.20) e igualando-se a equação de Stokes-Einstein (4.17) pode-se determinar o raio hidrodinâmico da partícula (R_h).

$$\frac{kT}{6\pi R_h \eta_{vis}} = \left(\frac{1}{\tau_i} \right) q^{-2} \rightarrow R_h = \frac{kT q^2 \tau_i}{6\pi \eta_{vis}} \quad (4.22)$$

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 4.22 obtemos:

$$R_h = (4,8 \times 10^{-5}) * \tau_i \quad \text{m/s} \quad (4.23)$$

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.

4.4.1 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 e as outras restantes são armazenadas e utilizadas para análises subsequentes (MALVERN, 2000). Ele ajusta a curva de correlação por uma distribuição de

exponenciais, nesse caso uma transformada inversa de Laplace (ENOKI, 2010).

Este é o método de análise mais 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. MATERIAIS E MÉTODOS

A Acridina Laranja foi adquirida da Sigma Aldrich com pureza de 90% e o Dodecil Sulfato de Sódio da Vetec Química Fina com pureza mínima de 90%. A concentração de AL foi controlada espectrofotometricamente usando $\varepsilon_{490\text{nm}} = 3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SILVA, 2010).

As soluções foram preparadas em tampão fosfato, com água padrão de qualidade Milli-Q, força iônica de 7,5 mM e pH de 6,8. Todos os experimentos foram realizados em temperatura $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$.

Para o monitoramento dos espectros de absorção ótica utilizamos os espectrofotômetros “Beckman Coulter DU 640” e “Amersham Ultrospec 2100 pro”. Para a aquisição dos espectros de espalhamento ressonante da luz e de fluorescência utilizamos um fluorímetro “Hitachi F-7000”. As amostras foram preparadas na hora da medição.

Para medir o espalhamento dinâmico 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 $\lambda = 632,8 \text{ nm}$. Para análise, utilizamos o algoritmo Contin. 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.

Basicamente, foram feitos três tipos de experimentos:

i.AL: Monitoramento da AL em diferentes concentrações utilizando os métodos de espectroscopia de absorção ótica 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 $510 \mu\text{M}$, para o experimento de espalhamento dinâmico da luz variamos a concentração de 10 à $400 \mu\text{M}$. Alguns experimentos foram realizados na presença de NaCl em concentrações de 0 até 0,5M. Em tal série de

experimentos, nosso propósito era observar a tendência intrínseca da AL de agregar e compreender este processo.

ii.AL+SDS: Mesmos métodos espectroscópicos que o anterior, sendo que agora monitoramos a AL em interação com o SDS. Nosso intuito era observar a interação da AL em um sistema nanoorganizado. Nessa série de experimentos, variamos as concentrações de AL (5-74 μM) e do SDS (25 μM -10mM), 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 fora 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.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AL EM SOLUÇÃO HOMOGÊNEA

6.1.1 Absorção ótica em modo contínuo

Nas figuras 6.1 e 6.2 estão apresentados os espectros de absorção da AL em função da sua concentração. Como podemos observar a Acridina Laranja possui 5 picos característicos, 230nm, 267nm, 290nm, 468nm e 490nm. Os três primeiros picos, de menor comprimento de onda estão associados com a transição do estado fundamental S_0 para segundo estado excitado singleto S_2 (transição $S_0 \rightarrow S_2$), enquanto que os dois últimos picos são decorrentes da transição $S_0 \rightarrow S_1$. É perceptível que com o aumento da concentração da AL há mudanças apenas nessa segunda região. Podemos observar com o aumento da concentração da AL uma diminuição relativa da intensidade do pico situado em 490nm em comparação com a intensidade do pico em 468nm. Esses dois picos atingem intensidades semelhantes em $\pm 90 \mu\text{M}$ (Figuras 6.3 e 6.4). Começando com trabalho de Sakoda e Kubota com co-autores (SAKODA; AKASAKA, 1972; KUBOTA; FUJISAKI, 1977), estes dois picos estão relacionados na literatura com os máximos da absorção da forma monomérica de AL em 490nm e do dímero da AL em 468nm. Devido sua carga entre as moléculas de AL deveria existir uma repulsão eletrostática, que deveria opor-se a dimerização. Kapuscinski afirma que essa dimerização tem natureza π - π (KAPUSCINSKI; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1983).

Figura 6.1: Espectros de absorção da AL (conc. 50-510 μM) em cubeta de caminho ótico reduzido (0,2 cm).

Figura 6.2: Espectros de absorção da AL (conc. 5-96 μM) em cubeta de caminho ótico padrão (1 cm).

Observando as Figuras 6.1 e 6.2, podemos verificar que a posição do máximo da banda de absorção do dímero está deslocada para comprimentos de onda menores do que o do monômero, por isso, podemos concluir que a estrutura do dímero é do tipo H.

Nas Figuras 6.3 e 6.4 podemos observar o aumento da intensidade do pico situado em 468nm em relação ao pico em 490nm conforme se aumenta a concentração de AL, indicando a tendência da AL de se agregar apenas aumentado sua concentração.

Figura 6.3: Razão entre as intensidades dos picos 468nm e 490nm para as concentrações de 5-96μM de AL.

Figura 6.4: Razão entre as intensidades dos picos 468nm e 490nm em cubeta de caminho ótico reduzido (0,2cm) para as concentrações de 50-510μM de AL.

6.1.2 Fluorescência em modo contínuo

Nas Figuras 6.5 e 6.7 estão apresentados os espectros de fluorescência da AL em função da sua concentração corrigidas em acordo com a fórmula $I_{corr}=I_{exp}/A_{ex}$ em que I_{corr} é a intensidade corrigida, I_{exp} é a intensidade obtida no experimento e A_{ex} é a absorbância no comprimento de onda de excitação, que nesse caso foi $\lambda_{ex}=380$ nm. Nas Figuras 6.6 e 6.8 mostramos as dependências de áreas sob os referentes espectros da fluorescência em função da concentração da AL.

Figura 6.5: Espectros de fluorescência da AL corrigida pela absorbância. Concentrações de 5-95 μM e no comprimento de onda de excitação $\lambda=380\text{nm}$.

Figura 6.6.: Área sob a curva da fluorescência da AL das concentrações de 5-95 μM corrigidas pela absorbância da AL no comprimento de onda de excitação $\lambda=380\text{nm}$.

Figura 6.7: Espectros da fluorescência da AL nas concentrações de 5-510 μ M e corrigidos pela absorbância no comprimento de onda de excitação $\lambda=380$ nm.

Figura 6.8.: Área sob a curva da fluorescência da AL das concentrações de 5-510 μ M corrigidas pela absorbância da AL no comprimento de onda de excitação $\lambda=380$ nm.

Como podemos observar, a intensidade corrigida de fluorescência da AL diminui conforme aumenta-se a concentração desta. Sabendo que a concentração aumenta a probabilidade de formação de agregados, resulta que o processo de agregação diminui a intensidade da fluorescência da solução.

O monitoramento dos espectros da excitação (Figura 6.9) da fluorescência mostrou que seu perfil não depende praticamente da concentração da AL e coincide com o espectro do seu monômero, obtido em concentrações baixas.

Figura 6.9: Espectros de excitação da AL normalizados pelo pico 497nm e monitorados no $\lambda_{Em} = 560nm$. [AL] 3-17 μM .

Podemos concluir que os agregados da AL não emitem radiação e a única espécie fluorescente presente na solução são monômeros da AL. Essa conclusão está em concordância com as medidas do tempo de vida da fluorescência que se mostrou invariante com a concentração da AL (Figura 6.10).

Figura 6.10: Medidas do tempo de vida da AL com $\lambda_{Ex}=460nm$. Concentração de AL 3-35 μM .

A diminuição drástica do rendimento quântico da fluorescência dos agregados em comparação com os monômeros significa que há um aumento da contribuição dos processos não-radiativos de dissipação.

Além da diminuição da intensidade da fluorescência foi observado o deslocamento do máximo dos espectros da fluorescência, associados com o efeito de filtro interno em altas concentrações da AL.

6.1.3 Espalhamento ressonante da luz

Na Figura 6.11 estão apresentados os espectros de espalhamento ressonante da luz das soluções da AL em diferentes concentrações em tampão fosfato. A Figura 6.12 apresenta a dependência da área sob os espectros de espalhamento em função da concentração da AL.

Figura 6.11: Espectro do ERL da AL nas concentrações de 5-96 μM

Figura 6.12: Área sob a curva do espalhamento da AL das concentrações de 5-95 μM .

Podemos verificar que a intensidade da luz espalhada cresce conforme aumenta-se a concentração de AL. Esse aumento da intensidade significa que o número de agregação aumenta com a concentração da AL. Baseado nisso podemos considerar que com o aumento da concentração na solução aparecem além de dímeros da AL seus agregados maiores. O aumento da intensidade da luz espalhada deveria ser ainda mais proeminente do que o detectado. Entretanto, por causa do efeito do filtro interno essa intensidade diminui devido a absorção pela solução em altas concentrações da AL (BORISSEVITCH et al, 1997). Tal análise está em conformidade com os espectros de absorção da AL apresentados na Figura 6.1 e 6.2.

6.1.4 Espalhamento dinâmico da luz

Tratando os dados obtidos pelo método de espalhamento dinâmico da luz podemos obter a informação sobre o tamanho das partículas por correlação entre os fótons que incidem sobre a amostra e os fótons que chegam ao detector, posicionando num ângulo fixo de 90° , como dissemos na seção 4.4. Existem três diferentes modos de análise, por Intensidade, por Número e por Volume. A análise por Intensidade é mais sensível às partículas espalhadoras de maiores tamanhos, enquanto que a análise por Número é mais sensível à quantidade de centros espalhadores. A análise por Volume requer fornecer previamente o índice de refração da amostra e não a utilizamos em nossos experimentos.

Figura 6.13: Dados brutos antes da análise dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL, tempo total de análise.

Figura 6.14: Dados brutos antes da análise dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL, recorte da área selecionada da Figura 6.13.

Nas Figuras 6.13 e 6.14 observamos os dados de correlação de fótons para a amostra de 0,4 mM de AL, podemos verificar que o tempo de correlação cai rapidamente no início e mais lentamente com o passar do tempo, o que mostra um perfil de decaimento multi-exponencial indicando que a amostra é polidispersa, ou seja, a AL em solução aquosa homogênea forma agregados de diferentes tamanhos.

Figura 6.15: Distribuição dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL por intensidade.

Figura 6.16: Distribuição dos tamanhos pelo método Contin para 0,4mM de AL por número.

Na Figura 6.15 está apresentada a distribuição dos tamanhos das partículas de AL para a concentração de 0,4mM obtida pelo método Contin no modo de Intensidade. Já na Figura 6.16 temos a análise pelo modo de Número para a mesma concentração de AL. Podemos observar que a área da distribuição de tamanhos fornecida pelo modo de Intensidade igual 57120, que é bem maior que a área 24300 fornecida pelo modo de Número. O pico da distribuição por Intensidade, 42%, é quase duas vezes maior do que 25%, obtido pelo modo de Número. Isso nos indica que a AL forma agregados grandes, mas entre eles os principais responsáveis pelo espalhamento em quantidade são agregados bem menores.

Na Tabela 6.1 estão apresentados as distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras para diferentes concentrações da AL, obtidas pelos modos de Intensidade e de Números.

Tabela 6.1: Distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras para as concentrações 10-400 μ M da AL, obtidas pelos modos de Intensidade e de Números do método Contin

AL (μ M)		Análise por Intensidade				Análise por Número		
		%	Posição do Máximo (nm)	Largura (nm)		%	Posição do Máximo (nm)	Largura (nm)
400	A	100	1132,6	1297,1		100	482,4	577
267	A	100	1115,7	1764,5		100	422,5	565,4
	B	100	1335,4	1710,1		74,5	105,2	128,2
178	A	1,4	130,6	92		25,5	604,8	756,9
		98,6	972,6	821,4		61,2	128,3	109,7
	B	100	1277,9	2004,2		38,8	704,9	1087,3
						98	53,2	60,4
	C	1,7	124,8	154,6		2	556,6	573,5
		98,3	1371,9	1320,3		98	56,7	63,4
119	A	99,6	1582,1	2541,8		2	764,2	1041,7
79	A	100	1133,1	1649,1		99,9	32,6	35,8
	B	100	1367,6	2224,8		100	562,3	513,9
53	A	100	1135,2	1667,6		100	532,9	624,3
35	A	100	1135,2	1667,6		100	533,6	460,5
		3,1	292	47,2		99,9	680,3	1095,1
		73,4	904,5	878,5				
		4,8	8432,3	4498,9				
	B	18,7	61716,6	37033,8				
		3,4	203,3	137,9		91,2	150,3	176,6
		73,6	1857,5	1419,8		8,8	1310,4	1320,2
		23,1	60147,6	57361,7				
	C	80,5	2487,1	4922		100	26,5	29,3
		19,5	359724,2	385363				
23	A	59,8	927,3	1357,8		99,9	530,1	764,6
		40,2	38816,6	24893,6				
	B	64,7	1193,5	1917,9		100	472,8	763,3
16	A	35,3	110814,8	70950,8				
		68,4	943,8	1366,3		99,5	595,9	692
		11,8	6332,1	5466,5				
10	A	19,8	81858,8	54480,7				
		48,2	1091,4	1891,2		99,9	470,1	681,8
		25,5	19779,7	17452,1				
		26,4	286167,7	182290,8				

Podemos ver que o tamanho de partículas-espalhadoras é muito maior do que o tamanho do monômero da AL (≈ 5 Å, calculado computacionalmente pela sua estrutura química) indicando que o número de agregação da AL é maior do que 2. Entretanto, a distribuição desses tamanhos é bem ampla e não há uma correlação confiável entre a concentração da AL e dessa distribuição. Observamos também que para diferentes medidas da mesma amostra obtivemos resultados distintos. Esse comportamento do sistema pode ser

associado com a flexibilidade de agregados, ou seja, que seu tamanho não está bem definido, mas cresce e diminui com tempo o que dificultaria a análise de tamanho pelo método de espalhamento dinâmico que pressupõe que as análises estejam sendo realizadas em um sistema em equilíbrio.

Essa explicação está em concordância com a análise de índice de polidispersidade. O índice de polidispersidade indica o quão a amostra é polidispersa, este índice é fornecido após a análise computacional, no caso, pelo método Contin (Tabela 6.2 e Figura 6.17.). Ele varia de 0, para uma amostra monodispersa, a 1, para amostra bastante polidispersa. Na tabela 6.2 observamos que o índice de polidispersidade aumenta nas medições subsequentes na mesma concentração, mais uma vez indicado que há diferentes tamanhos de agregados e uma dinâmica entre eles.

Tabela 6.2: Índice de polidispersidade da AL na concentração de 10-400 μ M

Conc. de AL(μM)	Polidispersidade
400	0,778
267	0,682
267	1
178	0,663
178	0,99
178	1
119	1
79	0,626
79	0,921
53	0,55
35	0,863
35	1
35	1
23	0,974
23	1
16	1
10	1

Figura 6.17: Índice de polidispersidade da AL nas concentrações de 10-400μM.

Observamos também que para cada diluição os tempos de aquisição de dados foram crescendo consideravelmente. Observando os dados sobre os tempos de correlação, notamos que até a concentração de 15,6μM (Figura 6.18) temos uma queda rápida e atinge-se o zero, que está em acordo com a teoria, já na amostra de 10,4μM (Figura 6.19) demora-se muito para atingir o zero e ainda temos flutuação no final da curva. Isso mostra a instabilidade dos agregados que aumenta com a diminuição da concentração da AL. Acreditamos que para essa concentração da AL estamos saindo da região de sensibilidade do aparelho.

Figura 6.18: Dados da correlação para $16 \mu M$ de AL.

Figura 6.19: Dados da correlação para $10 \mu M$ de AL.

6.1.5 Absorção ótica em modo contínuo da AL na presença de sal

Nas Figuras 6.20 e 6.21 estão apresentados os espectros de absorção da AL na presença de diferentes concentrações do NaCl.

Figura 6.20: Espectro de absorção da AL na concentração de 400 μ M com a adição de NaCl (0-0,49M).

Figura 6.21: Espectro de absorção da AL na concentração de $54\mu\text{M}$ com a adição de NaCl (0-0,23M).

Podemos observar que a adição de sal aumenta a intensidade relativa do pico dos agregados em 472nm em comparação com o pico dos monômeros em 490nm (Figuras 6.22 e 6.23). Podemos afirmar assim que o sal estimula a agregação da AL.

Figura 6.22: Razão entre as intensidades dos picos 472nm e 490nm, para a concentração de 400μM de AL e variando, a concentração de NaCL de 0-0,49M.

Figura 6.23: Razão entre as intensidades dos picos 472nm e 490nm, para a concentração de 54μM de AL e variando, a concentração de NaCl de 0-0,23M.

Observamos também a diminuição geral da intensidade de absorção com o aumento da concentração do sal. Esse efeito mostra que os agregados possuem uma intensidade de absorção menor quando comparada com a dos monômeros.

6.1.6 Fluorescência em modo contínuo da AL na presença de sal

A adição de sal não modifica o perfil do espectro da fluorescência da AL (Figura 6.24), todavia, diminuindo sua intensidade (Figura 6.25). Este resultado está em concordância com a suposição de que o sal estimula a agregação da AL.

Figura 6.24: Espectro de fluorescência da AL na concentração de 400 μ M com a adição de NaCl 0-0,49M.

Figura 6.25: Área sob a curva da fluorescência de 400 μ M AL e variando a concentração de sal 0-0,23M.

6.1.7 Espalhamento ressonante da luz da AL na presença de sal

O fato que a adição de NaCl estimula a formação de agregados está também em acordo com as medidas dos espectros do espalhamento ressonante da luz. As Figuras 6.26-29 mostram o aumento da intensidade do espalhamento, que está associado com o aumento do tamanho das partículas-espalhadoras.

Figura 6.26: Espectro de espalhamento ressonante da luz da AL na concentração de $400\mu\text{M}$ com a adição de NaCl (0-0,49).

Figura 6.27: Área sob a curva do ERL da AL para a concentração de $400\mu\text{M}$ e variando a concentração de NaCl de 0-0,49M, os valores foram corrigidos pelo 1º valor para efeito de comparação.

Figura 6.28: Espectro de espalhamento ressonante da luz da AL na concentração de $54\mu\text{M}$ com a adição de NaCl (0-0,23M).

Figura 6.29: Área sob a curva do ERL da AL para a concentração de $54\mu\text{M}$ e variando a concentração de NaCl de 0-0,23M, os valores foram corrigidos pelo 1º valor para efeito de comparação.

6.1.8. Espalhamento dinâmico da luz

Na Tabela 6.3 estão apresentados as distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras para diferentes concentrações da AL na presença de 0,5M de NaCl, obtidas pelos modos de Intensidade e de Números.

Tabela 6.3: Distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras obtidas pelos modos de Intensidade e de Números do método Contin para as concentrações 100-400 μ M da AL na presença de NaCl a 0,5M

Análise por Intensidade					Análise por Número		
AL-Conc.		%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)	%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)
400 μM	A	90	491	550	100	400	410
		10	18471	11652			
	B	100	1142	1641	100	313	258
	C	7	201	152	92	172	189
		94	1386	1048	9	1343	1117
	D	6	174	110	90	132	177
		94	1579	946	10	1491	1641
	E	6	175	103	97	160	199
		94	1711	1058	3	1603	1902
	F	3	139	146	99	110	123
		97	1734	1120	1	1681	2093
300 μM	A	3	150	130	98	116	133
		97	1624	985	2	1586	1837
	B	7	238	263	100	22	24
		93	2066	2315			
	C	4	163	119	97	125	148
		96	1821	1137	3	1734	1934
200 μM	A	100	904	1299	97	58	55
					3	670	661
	B	100	1266	2105	100	25	27
	C	5	198	145	100	26	28
		95	1323	1029			
100 μM	A	12	321	195	100	39	42
		87	1037	600			
	B	4	163	188	100	25	26
		95	1235	1207			
	C	99	1499	2469	100	27	30

As medidas mostraram uma flutuação de valores, mas menor se comparada aos resultados obtidos na ausência de sal. Observamos também que a distribuição de tamanhos

dos agregados na presença do sal para várias concentrações de AL apresentam valores próximos, indicando uma fraca dependência da concentração da AL. A polidispersidade de todas as amostras fora máxima, mostrando que o sal não torna os agregados da AL mais estáveis do que na sua ausência.

6.2 MEDIDAS ESTÁTICAS DE AL+SDS

6.2.1 Absorção ótica em modo contínuo

A adição de SDS induz modificações complexas nos espectros de absorção da AL, as quais dependem da razão de concentrações da AL e de SDS. Podemos dividir tais mudanças em três fazes:

1. Como podemos observar nas Figuras 6.30 e 6.31 nas concentrações baixas de SDS ($\leq 60\mu\text{M}$) observamos o aumento da intensidade relativo da intensidade do pico de absorção do monômero, indicando que nessa faixa de concentrações o SDS estimula a desagregação da AL. Este efeito pode ser associado com a redução da constante dielétrica da solução induzida pelo surfactante em baixas concentrações (ROSEN; KUNJAPPU, 2012; HERZFELD; CORRIN; HARKINS, 1950). Realmente, o monitoramento do espectro de absorção da AL em mistura água/etanol em várias proporções (Figuras 6.32 e 6.33) mostrou que existe uma razão ideal para a solubilidade da AL. Essa faixa é caracterizada pela constante dielétrica menor do que a da água e maior do que a do etanol (MIDDLETON; SCHECHTER; JOHNSTON, 1990).
2. Na presença de SDS em concentração $> 60\mu\text{M}$ há uma diminuição relativa do pico de monômero da AL, mostrando que a AL agrega (Figuras 6.34 e 6.35).
3. A agregação domina numa faixa de concentrações de SDS, cujo limite depende da concentração de AL (Figura 6.36). Ao passar dessa fronteira domina o processo desagregação da AL, que pode ser identificado pelo aumento da intensidade relativa do pico localizado em 497 nm, que associamos com a absorção do monômero da AL ligado com SDS e a diminuição do pico em 472 nm, associado ao agregado.

Na faixa de concentrações de SDS, onde a agregação predomina, foi observada a dinâmica desse processo que será analisada posteriormente. Fora dessa faixa a dinâmica de agregação torna-se desprezível.

Além do aumento relativo da intensidade do pico de absorção em 468-472 nm, a agregação induz a diminuição total da intensidade da absorção e alarga o espectro (Figura 6.34).

Figura 6.30: Espectro de absorção de 32 μM de AL com adição de 0-100 μM de SDS.

Figura 6.31: Razão entre os picos 490nm e 472nm para as concentrações de 14, 32 e 54 μM de AL com adição de 0-100 μM de SDS.

Figura 6.32: Espectro de absorção de 54 μM de AL em diferentes proporções de água/etanol.

Figura 6.33: Razão entre as intensidades dos picos 490nm e 472nm para [AL] 54 μM em diferentes proporções de água/etanol.

Figura 6.34: Espectro de absorção da AL na conc. de 54 μM em concentrações de SDS de 0-10mMolar.

Figura 6.35: Razão entre as intensidades dos picos 490nm e 470nm para a AL na conc. de 54 μM em concentrações de SDS de 0-10 molar.

Figura 6.36: Absorção da AL no pico de 490nm e nas concentrações de 5-74 μM em concentrações de SDS de 0-10 molar. Os valores foram corrigidos pelo máximo de absorção.

6.2.2 Fluorescência em modo contínuo

Como já ressaltamos, a agregação aumenta a probabilidade dos processos de perda não-radiativa, conseqüentemente, diminuindo a intensidade de fluorescência da solução. Como podemos ver nas Figuras 6.37, 6.38 e 6.39, a adição de SDS na faixa de concentrações de dominância de agregação reduz a intensidade de fluorescência normalizada pela absorbância da AL no comprimento de onda de excitação, 380nm. Em concentrações de SDS maiores a intensidade da fluorescência começa a aumentar, ultrapassando o valor inicial na ausência de SDS. Esses resultados estão em concordância com a suposição que na indicada faixa de concentrações de SDS a AL agrega.

Figura 6.37: Espectro da fluorescência da AL na concentração de 32 μM , com adição de SDS das concentrações de 0-10 mMolar e corrigidos pela absorbância no $\lambda_{\text{Ex}}=380\text{nm}$.

Figura 6.38: Área sob a curva da fluorescência para as concentração de 32 μM de AL, com adição de SDS das concentrações de 0-10 mMolar e corrigidos pela absorbância no $\lambda_{\text{Ex}}=380\text{nm}$.

O SDS atinge a CMC em $\approx 10\text{mM}$, entretanto, este valor pode ser alterado por características do meio, como a presença de sais que reduzem-na (NEUGEBAUER, 1994). Como demonstrado na Figura 6.39, o máximo da intensidade de fluorescência é atingido em $\approx 7\text{mM}$ e, a partir de então, não há alterações significativas da intensidade de fluorescência, que é indicativo de que se atingiu a região da CMC (ROMANI et al., 2009).

Figura 6.39: Área sob a curva da fluorescência da AL para as concentração de 5-73 μM , com adição de SDS das concentrações de 0-10 mMolar e corrigidos pela absorbância no $\lambda_{\text{Ex}}=380\text{nm}$.

Entretanto, não observamos o aumento da intensidade da fluorescência para concentrações de $\text{SDS} \leq 60\mu\text{M}$, onde observamos a desagregação da AL através dos espectros de absorção.

6.2.3 Espalhamento ressonante da luz

Na Figura 6.40 estão apresentados os espectros do ERL da solução da AL para diversas concentrações de SDS. Pode-se observar a dependência complexa da intensidade de ERL da [SDS] (Figura 6.41).

Figura 6.40: Espectro do ERL da AL na concentração de $74 \mu\text{M}$ e variando a concentração de SDS de 0-10 mM.

Figura 6.41: Área sob a curva do ERL da AL para a concentração de $74 \mu\text{M}$ e variando a concentração de SDS de 0-10mM. Os valores foram corrigidos pelo 1º valor para efeito de comparação.

Inicialmente, podemos ver a intensidade do ERL aumentar com a adição de SDS, chegando até um pico. Esse aumento deve ser devido a agregação da AL, em acordo com os dados da absorção ótica e da fluorescência. O conseguinte aumento da concentração de SDS produz a redução da intensidade de ERL, até um momento que essa intensidade se torna relativamente constante, indicando a desagregação da AL.

Podemos observar (Figuras 6.44 e 6.45) que para baixas concentrações da AL a intensidade máxima do ERL aumenta com o aumento da concentração da AL indicando maior tamanho dos agregados para maior [AL]. Entretanto, acima de $[AL] > 32 \mu\text{M}$ observamos uma saturação da intensidade de ERL. A concentração de SDS em que a intensidade do ERL da AL atinge o máximo aumenta com o aumento da concentração da AL. Esses dois fatos indicam que a média dos tamanhos dos agregados da AL não ultrapassa um valor máximo. Do subcapítulo 4.4 (eq. 4.16) temos número médio de agregação $n_{ag} = \frac{I_{ERLag}}{I_{ERLm}}$. Comparando a intensidade inicial ERL (na ausência de SDS) com a intensidade máxima obtivemos o n_{ag} médio. Entretanto, lembrando que já na ausência de SDS a AL em altas concentrações se agrega, o que explica o valor alto da intensidade ERL para alta concentração de AL. Através dos espectros de absorção ótica detectamos que para $[AL] \leq 14 \mu\text{M}$ os agregados da AL em soluções homogêneas não se manifestam (Figura 6.42). Determinamos $n_{ag} \approx 6$ para $[AL] = 5 \mu\text{M}$ e $n_{ag} \approx 9$ para $[AL] = 14 \mu\text{M}$ (Figuras 6.43 e 6.44). Para concentrações maiores da AL tivemos que considerar o espalhamento ERL dos agregados já na ausência de SDS. O valor do n_{ag} de saturação obtido foi 15.

Diferentemente dos resultados de absorção ótica e da fluorescência, a faixa de concentrações em que há variabilidade da intensidade de ERL é muito mais estreita e a concentração de SDS em que o ERL atinge o mínimo não depende da concentração da AL

(Figuras 6.44 e 45), provavelmente, devido à sensibilidade da técnica de ERL à dimensão dos agregados. Como demonstrado por trabalhos prévios do nosso grupo (AGGARWAL, BORISSEVITCH, 2006), o espectro de absorção de agregados de diferentes tamanhos é igual, associado com a absorção de um monômero dentro do agregado. No caso da fluorescência a formação de qualquer agregado (dímero, trímero, etc) suprime a fluorescência da AL.

A intensidade de ERL depende do tamanho dos agregados e com o aumento da concentração de SDS acima da associada com o máximo da agregação (máximo da intensidade de ERL) os agregados da AL separam-se, formando novos agregados mistos AL-SDS, induzindo a diminuição brusca dos seus tamanhos e consequente redução da intensidade de ERL.

Figura 6.42: Espectro de absorção da AL nas conc. de 5-12 μM . Os espectros foram normalizados pelo pico 267nm por conta da queda da intensidade pela diluição.

Figura 6.43: Área sob a curva do ERL da AL na concentração de 5 μM e variando a concentração de SDS de 0-10mM, os valores foram corrigidos pela intensidade de ERL da solução de AL anterior a adição de SDS.

Figura 6.44: Área sob a curva do ERL da AL nas concentrações de 5-73 μM e variando a concentração de SDS de 0-10 mM. Os valores foram corrigidos pela intensidade de ERL da solução de AL anterior a adição de SDS.

Figura 6.45: Área sob a curva do ERL da AL nas concentrações de 5-73 μM e variando a concentração de SDS de 0-10 mM.

6.2.4 Espalhamento dinâmico da luz

Nesta série de experimentos, utilizamos a mesma concentração 75 μ mol de AL em diferentes concentrações de SDS. Na tabela 6.4 foram mostrados os resultados obtidos numa série de medições dando um nome para cada uma destas (A,B,C,D,...).

Tabela 6.4: Distribuições dos tamanhos de partículas-espalhadoras obtidas pelos modos de Intensidade e de Números do método Contin para 75 μ mol de AL em diferentes concentrações de SDS (0-1mM)

SDS Conc.	Amostra	Análise por Intensidade			Análise por Número		
		%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)	%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)
0 μ M	A	61	6544	12591	100	25	28
		39	103727	113927			
	B	10	904	511	100	24	26
		33	4379	4014			
		23	30890	18498			
		34	213510	191534			
0 μ M (48h)	A	100	11129	35070	100	41	45
	B	73	8933	27245	100	53	57
		27	418712	395230			
50 μ M	A	2	83	143	100	31	35
		38	3041	3521			
		61	39750	25057			
	B	3	123	208	100	27	30
		44	3359	1697			
		53	11168	12163			
	C	2	108	202	100	32	36
		25	2711	3614			
		39	26589	24371			
		34	396168	274643			
	D	3	191	178	100	29	32
		33	3621	6212			
		64	129161	140096			
	E	1	119	222	100	37	41
		40	4096	4802			
		58	155618	128153			
75 μ m	A	25	4590	11765	100	99	87
		76	168626	254790			
	B	2	126	225	100	36	41
		47	3554	4824			
		51	35483	29588			
	C	32	3664	6596	100	80	82
		68	153440	120796			

SDS Conc.	Amostra	Análise por Intensidade			Análise por Número		
		%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)	%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)
100 μ M	A	3	114	109	100	48	58
		73	3009	1980			
		24	47944	27717			
	B	2	124	164	100	68	78
		57	2527	2137			
		41	30967	25136			
	C	1	125	219	100	38	42
		77	4317	8859			
		22	210277	134980			
	D	2	106	174	100	41	47
		62	4149	6936			
		37	238263	139150			
	E	3	122	126	100	72	83
		61	3267	2510			
		37	23143	16984			
500 μ M	A	2	97	112	100	50	59
		54	2375	2391			
		44	34859	21040			
	B	2	114	128	100	46	54
		69	2809	2589			
		30	124490	120441			
	C	2	94	106	100	48	56
		66	3082	2825			
		32	121754	139059			
	D	3	120	151	100	60	68
		55	2559	2521			
		43	29262	32362			
	E	2	150	135	100	41	46
		70	3509	5729			
		28	90305	70371			

SDS Conc.	Amostra	Análise por Intensidade			Análise por Número		
		%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)	%	Posição do máximo (nm)	Largura (nm)
1000 μ M	A	6	174	117	98	124	150
		72	1547	1045	2	1381	1870
		22	34615	35232			
	B	5	173	227	99	97	111
		54	2165	2039			
		41	23117	14485			
	C	4	155	184	99	84	97
		69	1786	1840	1	1308	1019
		8	16496	9537			
		19	119703	132800			
	D	6	188	125	97	141	172
		72	1800	1088	3	1575	2057
		22	54857	34738			
	E	7,9	212,9	139,7	95,4	160	214
		68,9	1845,1	1082	4,6	1658	2045
		23,2	52348,6	31939,3			

Em todas as análises realizadas o índice de polidispersidade fora máximo, igual a 1. A posição do máximo e a largura da distribuição variaram consideravelmente com a concentração de AL. Podemos concluir que na presença de SDS os agregados da AL possuem uma alta dispersão dos tamanhos de partículas-espalhadoras, são flexíveis e instáveis mais do que na ausência de SDS.

6.3 DINÂMICA DA AGREGAÇÃO DA AL+SDS

6.3.1 Absorção ótica em modo contínuo

A flexibilidade dos agregados mistos $n\text{AL}+m\text{SDS}$ significa que sua estrutura espacial e os números de agregação n e m mudam no tempo. Este nos levou a analisar as características espectroscópicas das soluções AL+SDS em função do tempo para várias concentrações de SDS e da AL.

A adição de SDS, primeiramente, provoca uma mudança brusca na intensidade de absorção da Acridina Laranja independentemente das concentrações de SDS e da AL, esta mudança é mais rápida que o tempo de aquisição do espectrofotômetro usado ($>30\text{s}$). O perfil e a profundidade dessas mudanças dependem da relação entre as concentrações $[\text{AL}]/[\text{SDS}]$. Essas mudanças foram analisadas detalhadamente no sub-capítulo 6.2.1.

Não observamos as mudanças significativas em função do tempo nas concentrações de SDS menores que 50 ou maiores que $2500\mu\text{M}$, mesmo variando a concentração de AL (Figuras 6.46 e 6.47).

Figura 6.46: Espectro de absorção da AL com concentração de $32 \mu\text{M}$ e com adição de $2500 \mu\text{M}$ de SDS durante $\approx 1,5$ hora.

Figura 6.47: Espectro de absorção da AL com concentração de $32 \mu\text{M}$ e com adição de $20 \mu\text{M}$ de SDS durante ≈ 3 horas.

Na faixa de concentrações de SDS $50 \mu\text{M} \leq [\text{SDS}] < 2500 \mu\text{M}$ observamos mudanças tanto da intensidade quanto no perfil do espectro de absorção, mesmo para concentrações baixas de AL (Figuras 6.48 e 6.49). Essas mudanças têm um padrão prolongado, possuindo uma dependência temporal das concentrações de SDS e da AL e perdurando até diversas horas.

Figura 6.48: Espectro de absorção da AL com concentração de $32 \mu\text{M}$ e com adição de $0,5 \text{ mM}$ de SDS durante ≈ 12 horas.

Figura 6.49: Espectro de absorção da AL com concentração de $54 \mu\text{M}$ e com adição de $50 \mu\text{M}$ de SDS durante $\approx 1,5$ hora.

Analisando as mudanças de absorção ótica em função do tempo nos diferentes comprimentos de onda para a mesma amostra, observamos que o perfil das curvas possui a dependência com o comprimento de onda (Figuras 6.50-52).

Figura 6.50: Variação temporal do λ_{abs} 268 nm da AL com concentração de 32 μM e com adição de 100 μM de SDS durante ≈ 10 horas.

Figura 6.51: Variação temporal do λ_{abs} 290 nm da AL com concentração de 32 μM e com adição de 100 μM de SDS durante ≈ 10 horas.

Figura 6.52: Variação temporal do λ_{abs} 565 nm da AL com concentração de 32 μM e com adição de 100 μM de SDS durante ≈ 10 horas.

A análise dessas curvas mostrou que melhor ajuste para todas elas tem um caráter tri-exponencial cujos tempos característicos são iguais para mesma amostra e os coeficientes pré-exponenciais dependem do comprimento de onda.

A Tabela 6.5 apresenta os tempos característicos das três componentes das curvas cinéticas para diferentes concentrações de SDS e da AL.

Tabela 6.5: Tempos característicos das três componentes das curvas cinéticas para [AL] (14-74 μM) e [SDS] (0,1-1 mM)

[SDS]	[AL] (μM)	t_1 (min)	Δt_1 (min)	t_2 (min)	Δt_2 (min)	t_3 (min)	Δt_3 (min)
SDS 100 μM olar	14	1,26	0,55	39,75	2,63	320,06	25,36
	32	2,11	0,08	22,15	0,60	235,72	6,91
	74	2,16	0,06	19,29	0,60	208,49	7,51
SDS 500 μM olar	14	3,37	0,23	61,00	4,51	340,07	33,97
	32	1,77	1,78	24,18	1,43	320,49	4,26
	74	3,50	1,71	41,41	1,52	244,78	6,31
SDS 1000 μM olar	14	0,67	0,19	35,49	3,37	558,74	33,27
	74	2,94	1,29	38,89	2,26	393,79	7,71

Podemos observar que para mesma concentração de SDS o tempo t_1 (mais curto) possui a tendência de aumentar com o aumento da concentração da AL, sendo que os tempos t_2 e t_3 apresentam comportamento inverso.

Baseando-se nessa análise temporal podemos considerar que da espécie inicial formam sequencialmente quatro espécies. Para visualização, apresentamos na Figura 6.53 espectros em tempos diferentes, cada espectro apresenta perfil diferenciado e são produtos das várias espécies presentes na solução.

Figura 6.53: Espectro de absorção da AL com concentração de $32 \mu\text{M}$ e com adição de $500 \mu\text{M}$ de SDS em diferentes instantes de tempo.

Associamos essas espécies com a formação de diferentes tipos de agregados mistos que se transformam um em outro.

6.3.1.1 Observação:

Para série de experimentos que realizamos com concentração de SDS de 50 e $75 \mu\text{M}$ e com concentrações de AL de 14, 32, 50 e $75 \mu\text{M}$ tivemos bastante dificuldade de ajustar a

exponencial e os tempos que obtivemos não nos pareceram satisfatórios. Explicamos tal dificuldade pelo fato de que para baixas concentrações de SDS ou AL, a amostra fica bem mais sensível a perturbações e apenas o fato de manusearmos a cubeta modifica o decaimento exponencial, sendo que essa sensibilidade diminui conforme aumentamos as concentrações de AL ou SDS (Figuras 6.54 e 6.55).

Figura 6.54: Variação temporal do λ_{abs} 490 nm da AL com concentração de 14 μM e com adição de 75 μM de SDS durante ≈ 11 horas. A seta indica o momento em que manuseamos a amostra.

Figura 6.55: Variação temporal do λ_{abs} 490 nm da AL com concentração de 75 μ M e com adição de 75 μ M de SDS durante $\approx$ 11 horas. A seta indica o momento em que manuseamos a amostra.

6.3.2 Fluorescência em modo contínuo

Em toda região de formação dos agregados a fluorescência está suprimida inviabilizando a análise dos processos temporais por essa técnica.

6.3.3 Espalhamento ressonante da luz

As medidas dos espectros de ERL em função do tempo mostraram que nesse caso também existe uma dinâmica de transformação de partículas-espalhadoras (Figura 6.56).

Figura 6.56: Espectro de ERL da AL com concentração de $32 \mu\text{M}$ e com adição de $50 \mu\text{M}$ de SDS durante ≈ 10 horas.

Como já foi mostrado no sub-capítulo 6.2.3 a adição inicial de SDS induz um aumento brusco da intensidade do ERL. Depois disso observamos os processos mais lentos das mudanças da intensidade do ERL.

Os experimentos foram realizados para concentração da AL $32 \mu\text{M}$ com as concentrações de SDS 50, 100, 500 e $1000 \mu\text{M}$. Para concentrações de SDS 50 e $100 \mu\text{M}$ observamos somente diminuição da intensidade de ERL. Para [SDS] 500 e $1000 \mu\text{M}$ observa-se uma fase inicial de aumento da intensidade para em seguida ocorrer uma diminuição (Figuras 6.57e 6.58).

Figura 6.57: Área sob a curva do ERL da AL na concentração de 32 μM e com adição de 50 μM de SDS durante ≈ 10 horas.

Figura 6.58: Área sob a curva do ERL da AL na concentração de 32 μM e com adição de 500 μM de SDS durante ≈ 10 horas.

A análise das curvas cinéticas mostrou que, à semelhança das análises de absorção ótica, têm melhor ajuste tri-exponencial.

A Figura 6.59 apresenta os espectros normalizados da intensidade de ERL para as mesmas concentrações de SDS e da AL e nos mesmos intervalos de tempo do que aqueles apresentados para os espectros de absorção ótica (Figura 6.53).

Figura 6.59: Espectro de ERL normalizados pelo máximo da AL com concentração de $32 \mu\text{M}$ com a adição de $500 \mu\text{M}$ de SDS em diferentes instantes de tempo.

Diferentemente dos espectros de absorção ótica, depois de 30 minutos os espectros de ERL são relativamente semelhantes.

Na Tabela 6.6 estão apresentados os valores dos tempos característicos dos componentes exponenciais das curvas cinéticas para várias concentrações de SDS.

Tabela 6.6: Tempos característicos das três componentes das curvas cinéticas para $[AL] 32 \mu\text{M}$ e $[SDS]$ (50-1000 μM).

[SDS]	t_1	Δt_1	t_2	Δt_2	t_3	Δt_3
50 μMol	2	1	12	1	173	6
100 μMol	2	1	17	1	246	10
500 μMol	4	1	89	1	568	104
1000 μMol	4	1	200	21	678	950

Podemos ver que, diferentemente dos tempos obtidos pelos espectros de absorção ótica, os tempos t_2 e t_3 aumentam com o aumento da concentração de SDS. A influência da concentração de SDS é muito mais acentuada para o ERL que atinge ≈ 15 vezes para tempo t_2 e 4 vezes para tempo t_3 , quando que para dados de absorção ótica essa diferença não ultrapassa 2 vezes. O tempo t_1 não demonstrou uma dependência significativa da [SDS].

Há uma divergência entre os tempos obtidos pelas técnicas de absorção ótica e ERL, para elucidar, temos que observar o que estamos monitorando em cada técnica. Os espectros de absorção ótica são modificados pela geometria espacial dos agregados, por exemplo, passando da estrutura inicial dos agregados H para os agregados HJ ou até agregados J. Essas mudanças podem se confirmar pelo aparecimento de um pico de absorção deslocado para comprimentos de onda maiores ($\lambda \approx 550$ nm, Figuras 6.48, 6.49 e 6.53). Nesse caso as mudanças espectrais possuem pouca dependência em relação ao tamanho dos agregados. Isso significa que para sua modificação um agregado não necessita o contato com outros e por isso apresenta dependência fraca da concentração.

Os espectros de ERL são modificados pelo volume do agregado e a diferença entre os índices de refração do meio e da partícula-espalhadora devido à re-conformação geométrica do agregado. Por exemplo, nas micelas não há uma mudança brusca no índice de refração entre o meio e sua superfície devido à presença da camada de Gouy-Chapman, espalhando menos a luz do que os agregados do surfactante não organizados como micela. Observamos, entretanto, que os espectros de ERL não apresentam mudanças tão significativas de perfil, mas na intensidade. Isso significa que para os espectros de ERL da mistura AL+SDS a mudança do índice de refração da partícula-espalhadora possui papel secundário, quando que o volume do agregado apresenta um papel preponderante. Nesse caso o aumento ou

diminuição da intensidade de ERL são devido ao aumento ou a diminuição do tamanho de agregados, respectivamente, que deve depender da concentração dos reagentes. Como observado, a diminuição da intensidade caracterizada pelo tempo t_3 , que está associada com a diminuição do tamanho dos agregados. Esse processo se torna mais lento quando a concentração de SDS aumenta, observado experimentalmente.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos tirar as seguintes conclusões sobre o comportamento da Acridina Laranja nas soluções aquosas homogêneas e na presença do surfactante SDS:

7.1 EM SOLUÇÃO HOMOGÊNEA

1. Em soluções aquosas homogêneas a AL possui a tendência de se agregar.
2. Diferente dos resultados apresentados na literatura, a AL forma não somente os dímeros, mas agregados de tamanhos diferentes.
3. Os agregados da AL são bem flexíveis, seus tamanhos são bastante dispersos e variam no tempo.
4. A interação com sal estimula a agregação da AL, provavelmente devido à diminuição da repulsão eletrostática entre moléculas da AL, por causa da formação das nuvens de contra-íons ao redor das moléculas da AL.
5. Os agregados da AL, formados na presença de sal, também são flexíveis e possuem tamanhos dispersos.
6. A agregação produz a mudança do espectro de absorção da solução, indicando a formação dos agregados tipo H da AL.
7. O processo de agregação da AL suprime a fluorescência devido ao aumento da probabilidade dos processos não radiativos da dissipação da energia da excitação.

7.2 NA PRESENÇA DE SDS

1. A presença de SDS em concentrações $<60\mu\text{M}$ estimula a desagregação da AL, efeito observado pela técnica de absorção ótica, porém não detectado pelas técnicas de espalhamento ressonante da luz ou de fluorescência. Provavelmente este efeito está associado

com a redução da constante dielétrica do meio aquoso na presença de SDS.

2. O SDS em concentrações acima de $60\mu\text{M}$ estimula a agregação da AL induzindo a formação de agregados mistos nAL+mSDS.

3. Os agregados nAL+mSDS se caracterizam pela flexibilidade e instabilidade.

4. Com o aumento da concentração do SDS, este induz a diminuição do número de agregação da AL chegando finalmente na sua forma monomérica ligada com os agregados e/ou micelas de SDS.

5. A agregação diminui a intensidade da fluorescência da AL e aumenta a intensidade do ERL.

6. A ligação de monômeros da AL com micelas de SDS aumenta a intensidade da sua fluorescência se comparada com a solução aquosa homogênea.

7. A intensidade de ERL das partículas AL (monômero)+SDS (micela) é menor que a de agregados mistos nAL+mSDS.

8. Os agregados mistos possuem uma dinâmica de transformação caracterizada por quatro componentes exponenciais, o primeiro apresenta um tempo menor que 36 segundos e as outras três componentes variam de minutos até várias horas.

9. Tais componentes exponenciais mostram que na solução de AL+SDS existem, no mínimo, quatro formas de agregados mistos nAL+mSDS que se formam sucessivamente.

10. Estas diversas formas de agregados se diferem tanto por sua estrutura espacial quando pelo número de agregação.

11. A dinâmica de agregação depende da razão entre $[\text{AL}]/[\text{SDS}]$

Para finalizar, concluímos que nosso estudo demonstra que a agregação da AL pode durar diversas horas dependendo da concentração do SDS, os agregados possuem características distintas em relação ao monômero e os agregados mistos nAL+mSDS se

modificam continuamente durante o processo do seu uso e tal dinâmica deve ser tomada em consideração nas aplicações da AL.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar de encontrarmos na literatura uma extensiva pesquisa sobre o comportamento da AL, identificamos uma dinâmica de transformação de agregados mistos pouco explorada. Como os detalhes do mecanismo da agregação dos compostos com sistema de conjugação π desenvolvido ainda não estão esclarecidos, pretendemos continuar essas investigações desenvolvendo as seguintes atividades:

1. Definir a natureza das formas de agregados mistos nAL+mSDS.
2. Utilizar a técnica de “Stopped-Flow” para analisar a interação da AL com SDS que acontece em tempos menores que 36s.
3. Utilizar a técnica de “Fotólise por pulso relâmpago” para analisar os efeitos da interação da AL com sistemas nanoorganizados e íons nos rendimentos quânticos e tempos de vida dos seus estados excitados.
4. Analisar a interação da AL com outros tipos de surfactantes (catiônicos, não-iônicos e zwitteriônicos)
5. Monitorar a interação da AL com DNA e vesículas.
6. Realizar mesma série de experimentos com outros objetos com sistemas de conjugação π desenvolvidos.

9. REFERÊNCIAS

AICH, P.; LABIUK, S. L.; TARI, L. W.; DELBAERE, L.J.; ROESLER, W.J.; FALK, K. J.; STEER, R. P.; LEE, J. S. **M-DNA: A Complex Between Divalent Metal Ions and DNA which Behaves as a Molecular Wire.** Journal of Molecular Biology, v. 294, p. 477-485, 1999. PMID: 10610773

AGGARWAL, Lucimara Perpétua Ferreira. **Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS4 e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos do pH e da força iônica.** 2005. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-02062005-101952/>>. Acesso em: 2012-09-26.

AGGARWAL, L. P. F.; BORISSEVITCH, I. E. **On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions Successive formation of H and J aggregates.** Spectrochimica Acta Part A 63, p. 227–233, 2006.

ANTONOV, L.; GERGOV, G.; PETROV, V.; KUBISTA, M.; NYGREN, J. **UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water.** Talanta, 49(1), p. 99–106, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18967580>

ARMSTRONG, J. A. **Histochemical differentiation of nucleic acids by means of induced fluorescence.** Experimental Cell Research, 11(3), p. 640–643, 1956. DOI:10.1016/0014-4827(56)90173-2

AUWERAER, M. VAN DER; SCHEBLYKIN, I. **One-dimensional J-aggregates: Dependence of the properties of the exciton band on the model of the intermolecular coupling.** Chem. Phys. vol. 275 (1-3), p. 285-306, 2002.

BEGUM, N.; MUAZZAM, N.; SHAMSUZZAMAN, S.; CHOWDHURY, A.; RASHID, A.; ISLAM, D. **Diagnosis of Bacterial Vaginosis by Acridine Orange Staining and its Comparison to Conventional Methods and Association of Gardnerella vaginalis with**

Bacterial Vaginosis. Bangladesh Journal of Medical Microbiology, 4(1), p. 37–42, 2011. DOI:10.3329/bjmm.v4i1.8468

BERLEPSCH, H. V.; KIRSTEIN, S.; BÖTTCHER, C. **Effect of Alcohols on J-Aggregation of a Carbocyanine Dye.** Langmuir, 18 (20), p. 7699-7705, 2002. DOI: 10.1021/la0203640

BI, S.; QIAO, C.; SONG, D.; TIAN, Y.; GAO, D.; SUN, Y.; ZHANG, H. **Study of interactions of flavonoids with DNA using acridine orange as a fluorescence probe.** Sensors and Actuators B: Chemical, 119(1), p. 199–208, 2006. DOI:10.1016/j.snb.2005.12.014

BICKIS, I.; VON BERTALANFFY, L. **Identification of cytoplasmic basophilia (ribonucleic acid) by fluorescence microscopy.** The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society, 4(5), p. 481–93, 1956. DOI:10.1177/4.5.481

BLEARS, D. J.; DANYLUK, S. S. **The Aggregation of Acridine Orange in Aqueous Solution.** Journal of the American Chemical Society, 88 (5), p. 1084-1085, 1966. DOI: 10.1021/ja00957a058

BORGES, C. P. F.; BORISSEVITCH, I. E.; TABAK, M. **Charge- and pH-dependent binding sites of dipyridamole in ionic micelles: A fluorescence study.** Journal of Luminescence, 65(2), p. 105–112, 1995. DOI:10.1016/0022-2313(95)00052-R

BORISSEVITCH, I. E.; BORGES, C. P. F.; YUSHMANOV, V. E.; TABAK, M. **Localization of dipyridamole molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1238(1), p. 57–62, 1995. DOI:10.1016/0005-2736(95)00112-G

BORISSEVITCH, I. E.; TOMINAGA, T. T.; IMASATO, H.; TABAK, M. **Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin.** Analytica Chimica Acta, 343(3), p. 281–286, 1997.

DOI:10.1016/S0003-2670(97)00038-X

BURDASH, N. M.; MANOS, J. P.; BANNISTER, E. R.; WELBORN, A L; **Acridine orange staining and radiometric detection of microorganisms in blood cultures.** Journal of clinical microbiology, 17(3), p. 463–5, 1983.

CHEVALIER, Y.; ZEMB, T. **The structure of micelles and microemulsions.** Reports on Progress in Physics, 53(3), p. 279–371, 1990. DOI:10.1088/0034-4885/53/3/002

CHEMSPIDER. **Acridine Orange CSID:56136**, Royal Society of Chemistry, Londres, Inglaterra, 2012a. Disponível em <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.56136.html>
Acesso em 2012-12-12

CHEMSPIDER. **Sodium dodecyl sulfate CSID:8677**, Royal Society of Chemistry, Londres, Inglaterra, 2012b. Disponível em [http:// www.chemspider.com/Chemical-Structure.8677.html](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.8677.html)
Acesso em 2012-12-12

CLAYS, K.; HENDRICKX, E.; TRIEST, M.; VERBIEST, T.; PERSOONS, A.; DEHU, C.; BRÉDAS, J. L. **Nonlinear optical properties of proteins measured by hyper-rayleigh scattering in solution.** Science, 262(5138), p. 1419-1422, Nov 26, 1993. PMID: 17736822

COSTAMAGNA, Sixto Raul, et al. **La coloración fluorescente con naranja de acridina y el PAP: validación de ambas técnicas para la detección de Trichomonas vaginalis.** Parasitol. día [online]. Vol.24, n.3-4, p. 112-114, 2000. ISSN 0716-0720. DOI: 10.4067/S0716-07202000000300008.

DE PAOLI, V. M.; DE PAOLI, S. H.; BORISSEVITCH, I. E.; TEDESCO, A. C. **Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH2 associated with micelles and DNA.** Journal of Alloys and Compounds, 344(1-2), p. 27–31, 2002. DOI:10.1016/S0925-8388(02)00299-2

DODEUR, M.; JACQUET, M. A. **Interactions of insolubilized lectins with membrane**

glycoproteins in presence of detergents. Journal of Chromatography A, Volume 195, Issue 2, p. 197-203, 1980. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)96810-9

DOMINGUEZ, A.; FERNANDEZ, A.; GONZALEZ, N.; IGLESIAS, E.; MONTENEGRO, L. **Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques.** Journal of Chemical Education, 74(10), p. 1227, 1997. DOI:10.1021/ed074p1227

DULANEY, J. T.; TOUSTER, O. **The solubilization and gel electrophoresis of membrane enzymes by use of detergents.** Biochimica et Biophysica Acta. 196(1), p. 29-34, 1970. DOI: 10.1016/0005-2736(70)90162-8 PMID:4312697

ENOKI, Thaís Azevedo. **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. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/43/43134/tde-20012011-155955/>>. Acesso em: 2012-10-03.

GANDINI, S.; YUSHMANOV, V.; BORISSEVITCH, I. **Interaction of the tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin with ionic surfactants: aggregation and location in micelles.** Langmuir, (20), p. 6233–6243, 1999. Disponível em: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la990108w>

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, 30(1), p. 73–73, 2008. DOI:10.1111/j.1468-2494.2007.00401_1.x

GILLILAND, G. L.; DAVIES, D.R. **Protein crystalization: The growth of large-scale single crystals.** Methods in Enzymology. Volume 104, p. 370-381, 1984. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)04104-5

GINJIRO, M. **The cytocidal effects of photodynamic therapy with acridine orange in**

mouse osteosarcoma cells in vitro. Journal of Kyoto Prefectural University of Medicine, Vol.108, n°.5, p. 587-602, 1999. ISSN:0023-6012

HEALY, C. M.; PATERSON, M.; JOYSTON-BECHAL, S.; WILLIAMS, D. M.; THORNHILL, M. H. **The effect of a sodium lauryl sulfate-free dentifrice on patients with recurrent oral ulceration.** Oral diseases, vol. 5(1), p. 39–43, 1999. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1601-0825.1999.tb00062.x/abstract>
DOI: 10.1111/j.1601-0825.1999.tb00062.x

HERZFELD, S. H.; CORRIN, M. L.; HARKINS, W. D. **The Effect of Alcohols and of Alcohols and Salts on the Critical Micelle Concentration of Dodecyl ammonium Chloride.** The Journal of Physical and Colloid Chemistry, vol. 54 (2), p. 271-283, 1950. DOI: 10.1021/j150476a010

ISRAELACHVILI, Jacob N. **INTERMOLECULAR AND SURFACE FORCES.** 3rd ed, Academic press, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos, 2011. ISBN 978-0-12-375182-9

JAMES, A. D. ; ROBINSON, B. H. **Self-aggregation of N(10)-alkyl derivatives of acridine orange and their interaction with cationic and anionic surfactants.** Advances in Molecular Relaxation Processes 8, no. 4, p. 287-304, 1976. DOI: 10.1016/0001-8716(76)80033-8

JIMÉNEZ-MILLÁN, E.; GINER-CASARES, J. J.; MUÑOZ, E.; MARTÍN-ROMERO, M. T.; CAMACHO, L. **Self-assembly of Acridine Orange into H-aggregates at the air/water interface: tuning of orientation of headgroup.** Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 27(24), p.14888–14899, 2011. DOI:10.1021/la2030236

KAPUSCINSKI, J.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. **Interactions of acridine orange with nucleic acids. Properties of complexes of acridine orange with single stranded ribonucleic acid.** Biochemical pharmacology, vol. 32(24), p. 3679–3694, 1983. DOI:10.1016/0006-2952(83)90136-3

KASHA, M. **Energy transfer mechanisms and molecular exciton model for molecular**

aggregates, Radiat. Res., vol. 20 (1), p.55-71, 1963.

KASUMOV, A.Y.; KOCIAK, M.; GUERON, S.; REULET, B.; VOLKOV, V.T.; KLINOV, D.V.; BOUCHIAT, H. **Proximity-induced superconductivity in DNA**. Science, vol. 291(5502), p. 280-282, 2001. DOI: 10.1126/science.291.5502.280

KELLEY, S.O.; BARTON, J.K. **Electron transfer between bases in double helical DNA**. Science, vol. 283(5400), p. 375-381, 1999. DOI: 10.1126/science.283.5400.375

KOSSWIG, Kurt. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Alemanha, 2000. DOI: 10.1002/14356007 ISBN: 3527306730

KUBOTA, Y.; FUJISAKI, Y. **Fluorescence of 9-aminoacridine bound to polynucleotides**. Bulletin of the Chemical Society of Japan, Japão, vol. 50, nº 1, p. 297-298, 1977.

KUSUZAKI, K.; AOMORI, K.; SUGINOSHITA, T.; MINAMI, G.; TAKESHITA, H.; MURATA, H.; HASHIGUCHI, S.; ASHIHARA, T.; HIRASAWA, Y. **Total tumor cell elimination with minimum damage to normal tissues in musculoskeletal sarcomas following photodynamic therapy with acridine orange**. Oncology, vol. 59(2), p.174–180, 2000. DOI: 10.1159/000012156 PMID: 10971178

KUSUZAKI, K., et al. **Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity**. Current pharmaceutical design, vol. 18(10), p. 1414–1420, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22360555>
DOI: 10.2174/138161212799504812

LASCH, J.; BERDICHEVSKY, V. R.; TORCHILIN, V. P.; KOELSCH, R.; KRETSCHMER, K. **A method to measure critical detergent parameters. Preparation of liposomes**. Analytical biochemistry, vol. 133, no. 2, p. 486-491, 1983. DOI: 10.1016/0003-2697(83)90114-8

LEE, S. W.; CHANG, W. J.; BASHIR, R.; KOO, Y. M. **“Bottom-up” approach for**

implementing nano/microstructure using biological and chemical interactions. Biotechnology and Bioprocess Engineering, vol. 12; p. 185-199, 2007. DOI: 10.1007/BF02931092 ISSN: 1226-8372

LESER, M. E.; WEI, G. ; LUISI, P. L.; MAESTRO, M. **Application of reverse micelles for the extraction of proteins.** Biochemical and biophysical research communications, vol. 135(2), p. 629-635, 1986. DOI : 10.1016/0006-291X(86)90039-2 PMID: 3964264

LYLES, M. B.; CAMERON, I. L. **Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA.** Biophysical chemistry, vol. 96(1), p. 53–76, 2002.

MAIBAUM, L.; DINNER, A. R.; CHANDLER, D. **Micelle Formation and the Hydrophobic Effect.** The Journal of Physical Chemistry B, vol. 108(21), p. 6778–6781, 2004. DOI:10.1021/jp037487t

MALVERN. **Manual 0149 ZETASIZER 1000HS/3000HS-size measurement.** 2. ed. Malvern Instruments Ltd., United Kingdom, 2000.

MALVERN. **Manual 0152 ZETASIZER 1000/2000/3000-PCS Theory.** 1.1. ed. Malvern Instruments Ltd., United Kingdom, 1996.

MAO, G.; FLACH, C. R.; MENDELSON, R.; WALTERS, R. M. **Imaging the distribution of sodium dodecyl sulfate in skin by confocal Raman and infrared microspectroscopy.** Pharmaceutical research, vol. 29(8), p. 2189–201, 2012. DOI:10.1007/s11095-012-0748-y

MÉNDEZ-VELASCO, C.; GOFF, H. D. **Fat structure in ice cream: A study on the types of fat interactions.** Food Hydrocolloids, vol. 29(1), p. 152–159, 2012. DOI:10.1016/j.foodhyd.2012.02.002

MIDDLETON, M. A.; SCHECHTER, R. S.; JOHNSTON, K. P. **Dielectric properties of anionic and nonionic surfactant microemulsions.** Langmuir, vol. 6(5), p. 920–928, 1990.

DOI:10.1021/la00095a006

NASIM, A.; BRYCHCY T. **Genetic effects of acridine compounds**. Mutation Research, vol. 65, p. 261-288, 1979.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION-NCBI. **Sodium Dodecyl Sulfate**. Estados Unidos, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68012967>>. Acesso em: 2012-10-03.

NEUGEBAUER, J. **A guide to the properties and uses of Detergents in biology and biochemistry**. 5ª Ed., Calbiochem-Novabiochem International, California, USA, 1994.

PALMGREN, Michael Gjedde. **Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: Mechanism and limitations**. Analytical Biochemistry, Volume 192, Issue 2, p. 316-321, 1991. ISSN: 0003-2697 DOI: 10.1016/0003-2697(91)90542-2.

PETRENKO, V. A; SOROKULOVA, I. B. **Detection of biological threats. A challenge for directed molecular evolution**. Journal of microbiological methods, vol. 58(2), p.147–168, 2004. DOI:10.1016/j.mimet.2004.04.004

PIASECKI, D. A.; WIRTH, M. J. **Reorientation of acridine orange in a sodium dodecyl sulfate monolayer at the water-hexadecane interface**. The Journal of Physical Chemistry, vol. 97(29), p. 7700–7705, 1993. DOI:10.1021/j100131a045

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**. Journal of clinical microbiology, vol. 38(1), p.110–119, 2000.

POLARD, T.; JEAN, S.; MERLINA, G; LAPLANCHE, C.; PINELLI, E.; GAUTHIER, L. **Giemsa versus acridine orange staining in the fish micronucleus assay and validation for use in water quality monitoring**. Ecotoxicology and environmental safety, vol. 74(1), p. 144–149, 2011. DOI:10.1016/j.ecoenv.2010.08.005

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**. STP pharma sciences, vol. 14, No. 6, p. 441-447, 2004. ISSN : 1157-1489.

RAKITIN, A.; AICH, P.; PAPADOPOULOS, C.; KOBZAR, Y.; VEDENEEV, A.S.; LEE, J.S.; XU, J.M. **Metallic conduction through engineered DNA: DNA nanoelectronic building blocks**. Phys. Rev. Lett, vol. 86(16), p. 3670-3673, 2001.

ROBBINS, E.; MARCUS, P. I. **Dynamics of Acridine Orange-Cell Interaction. I. Interrelationships of Acridine Orange Particles and Cytoplasmic Reddening**. The Journal of cell biology, vol. 18(2), p. 237–50, 1963. Disponível em:
http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2106306&tool=pmcentrez&render_type=abstract

ROBINSON, B. H.; LOFFLER, A.; SCHWARZ, G. **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, vol. 69, p. 56-69, ed. The Royal Society of Chemistry, 1973. doi:10.1039/f19736900056

ROMANI, A. P, et al. **Spectrofluorimetric determination of second critical micellar concentration of SDS and SDS/Brij 30 systems**. Journal of fluorescence, vol. 19(2), p. 327–32, 2009. DOI:10.1007/s10895-008-0420-4

ROSEN, M. J.; KUNJAPPU, J. T. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-0-470-54194-4 DOI:10.1002/0471670561

SAKODA, M. H. K.; AKASAKA, K. **Kinetic studies on acridine orange-DNA interaction. A branched mechanism involving intercalation and outside "dimerization"**. J Biochem., vol. 71(5), p.891-896, 1972.

SATONAKA, H., et al. **Acridine orange inhibits pulmonary metastasis of mouse**

osteosarcoma. Anticancer research, vol. 31(12), p. 4163–4168, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22199275>

SCHABERLE, F. A.; KUZ'MIN, V. A.; BORISSEVITCH, I. E. **Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, vol. 1621(2), p. 183–191, 2003. DOI:10.1016/S0304-4165(03)00057-6

SCHÁBERLE, Fábio Antonio. **Efeitos do meio e da interação com DNA e Micelas nas características espectrais dos corantes cianícos com dois cromóforos.** 2007. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-17092007-211526/>>. Acesso em: 2012-09-26.

SCHWENDENER, R.A., et al. **n-Alkylglucosides as detergents for the preparation of highly homo-geneous bilayer liposomes of variable sizes (60-240 nm phi) applying defined rates of detergent removal dialysis.** Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 100, p. 1055, 1981.

SHAW, A. K.; PAL, S. K. **Fluorescence relaxation dynamics of acridine orange in nanosized micellar systems and DNA.** The journal of physical chemistry. B, vol. 111(16), p. 4189–4199, 2007. DOI:10.1021/jp067156r

SHIRK, James S. **Protecting the war fighter's vision in a laser-rich, battlefield environment.** Optics and Photonics News 11, no. 4, p. 19-23, 2000. DOI: 10.1364/OPN.11.4.000019

SHKLYAREVSKIY, O.; BOAMFA, M. I.; CHRISTIANEN, P. C. M.; TOUHARI, F.; VAN KEMPEN, H.; G, DEROOVER, P. CALLANT; MAAN, J. C. **Magnetic field induced alignment of cyanine dye J-aggregates.** J. Chem. Phys. vol. 116 (19), p. 8407-8410, 2002.

SIDOROWICZ, A.; MORA, C.; JABŁONKA, S.; POŁA, A.; MODRZYCKA, T.; MOSIĄDZ, D.; MICHALAK, K. **Spectral properties of two betaine-type cyanine dyes in surfactant micelles and in the presence of phospholipids**. Journal of Molecular Structure, vol. 744-747, p. 711–716, 2005. DOI:10.1016/j.molstruc.2004.12.053

SILVA, Érika Ribeiro e. **Estudo da cinética e dos mecanismos de fototransformação do corante Acridina Laranja na sua interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível**. 2010. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59135/tde-17032011-113009/>>. Acesso em: 2013-01-01.

STRUGGER, S.; HILBRICH, P. **Die fluoreszenzmikroskopische unterscheidung lebender und toten bakterienzellen mit hilfe der akridinorange-färbung**. Dtsch Teirärztl Wochenschr vol. 50, p. 121–130, 1942.

STRUGGER, S. **Fluorescence microscope examination of bacteria in soil**. Canadian Journal of Research, vol. 26c(2), p. 188-193, 1948. DOI: 10.1139/cjr48c-019

SZOKA, JR. F.; PAPAHA DJOPOULOS, D. **Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes)**. Annual review of biophysics and bioengineering, vol. 9(1), p.467-508, 1980. DOI: 10.1146/annurev.bb.09.060180.002343 PMID: 6994593

TANFORD, C. **The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes**. 2ª Ed., Wiley, New York, 1980.

VALEUR, Bernard. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. Wiley, Weinheim, Germany, 2001. ISBNs: 3-527-29919-X (Hardcover); 3-527-60024-8 (Electronic).

VAN DUUREN, B.L.; GOLDSCHMIDT, B.M.; SELTZMAN, H.H. **Interaction of mutagenic and carcinogenic agents with nucleic acids**. Ann. N.Y. Acad. Sci., vol. 153 (A3),

p. 744-751, 1969.

WANG, M. M.; ESENER, S. C.; MCCORMICK, F. B.; ÇOKGÖR, I.; DVORNIKOV, A. S.; RENTZEPIS, P. M. **Experimental characterization of a two-photon memory.** Optics letters, vol. 22(8), p. 558-560, 1997. DOI: 10.1364/OL.22.000558

YAO, H.; KOBAYASHI, S.; KIMURA, K. **Self-assembly of acridine orange dye at a mica/solution interface: formation of nanostripe supramolecular architectures.** Journal of colloid and interface science, Vol. 307(1), p. 272–279, 2007. DOI:10.1016/j.jcis.2006.11.030

YUNJING, L.; HANXI, S. **Study on Acridine Orange dimer as a new fluorescent probe for the determination of protein.** Analytical Communications, vol. 36(4), p. 135–137, 1999. DOI:10.1039/a900601j

ZELENIN, A. **Acridine orange as a probe for cell and molecular biology.** Fluorescent and luminescent probes for biological Activity. Acad. Press., London, 2^a Ed., p. 117–135, 1999. ISBN:9780124478367. DOI:10.1016/B978-012447836-7/50011-7