

7.3 Fluorescência

As observações feitas com os métodos de absorção ótica e de dicroísmo circular dão uma idéia geral de como os BCD se comportam na presença de sal, DNA e os dois juntos. Através do método de fluorescência é possível estudar os BCD de um outro ponto de vista obtendo novas informações sobre as características do estado excitado singlete S_1 dos corantes. Os efeitos observados nessa parte dos experimentos são muito semelhantes para todos os BCD e contém grande quantidade de dados experimentais parecidos. Por esse motivo apresentamos aqui só os resultados obtidos no estudo do corante BCD 180⁰ como um exemplo dos resultados típicos obtidos para todos os corantes.

7.3a Análise dos efeitos do NaCl nos espectros de fluorescência dos BCD.

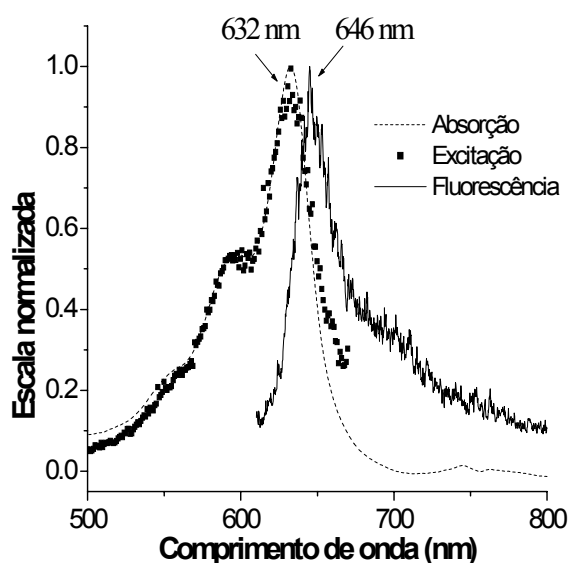


Gráfico 102 – Espectros normalizados de absorção, fluorescência e excitação para o monômero de $[BCD 180^0] = 2,11 \mu M$

Na ausência de sal o corante possui uma fluorescência fraca com rendimento quântico $\phi_{fl} = (1,8 \pm 0,2) \%$ na região espectral $610 < \lambda < 750$ nm com o máximo localizado em $\lambda_{max1} = 643$ nm. O espectro de excitação dessa fluorescência é igual ao da absorção na forma monomérica livre do corante (Gráfico 102). Baseando-se nesse fato concluímos que esta é a fluorescência dos monômeros livres do corante.

O gráfico 103 mostra as mudanças nos espectros de fluorescência dos BCD na presença de sal. A adição de NaCl diminui a intensidade de fluorescência mudando o perfil do espectro e deslocando o máximo para região do vermelho. A dependência do decaimento em função da concentração de NaCl é semelhante à diminuição do conteúdo dos monômeros de corante pela agregação estimulada pelo sal obtido na absorção ótica (Gráfico 104). Assim podemos relacionar essa queda da fluorescência com sua supressão pela agregação. O processo de supressão da fluorescência pela agregação é bastante típico [31,39,40], especialmente quando se formam os agregados tipo H. A formação de agregados é ligada com o aumento da participação dos processos não radioativos na dissipação de energia de excitação pelo movimento das moléculas do corante uma em relação à outra dentro dos agregados.

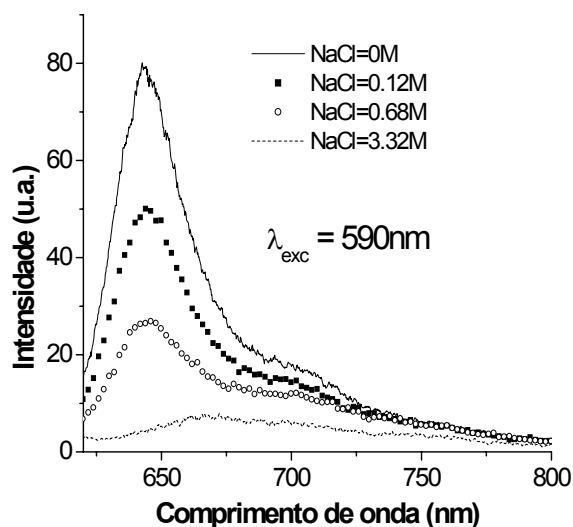


Gráfico 103 – Espectros de fluorescência do [BCD(180°)] = 1,65 μM em função de [NaCl].

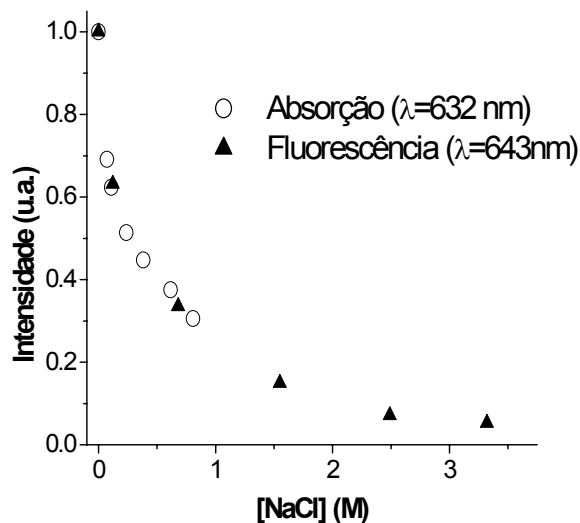


Gráfico 104 – Mudanças da intensidade de fluorescência do [BCD(180°)] = 1,65 μM em função de [NaCl].

7.3b Análise dos BCD na presença de DNA

O gráfico 105 mostra as mudanças nos espectros de fluorescência de BCD 180⁰ induzidos pela adição de DNA.

Inicialmente a adição de DNA induz o decaimento da fluorescência dos monômeros de corante e a formação de uma nova banda de fluorescência na região $650 < \lambda < 750$ nm com o máximo centralizado em $\lambda_{max2} = 694$ nm. O rendimento quântico dessa fluorescência é $\phi_{fl2} = (5,0 \pm 1,0)$ % e seu espectro de excitação é igual ao espectro de absorção dos agregados tipo J formados pela interação com DNA (Gráfico 106). Assim podemos considerar essa fluorescência como a dos agregados J do corante.

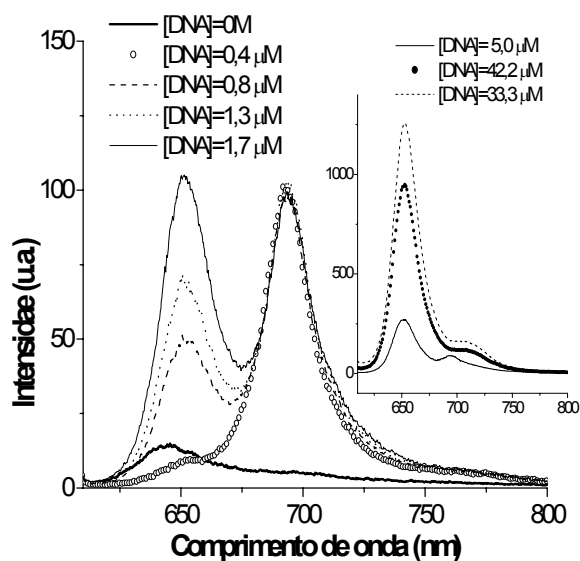


Gráfico 105 – Espectros de fluorescência do [BCD(180°)] = 2,11 μM em função de [DNA].

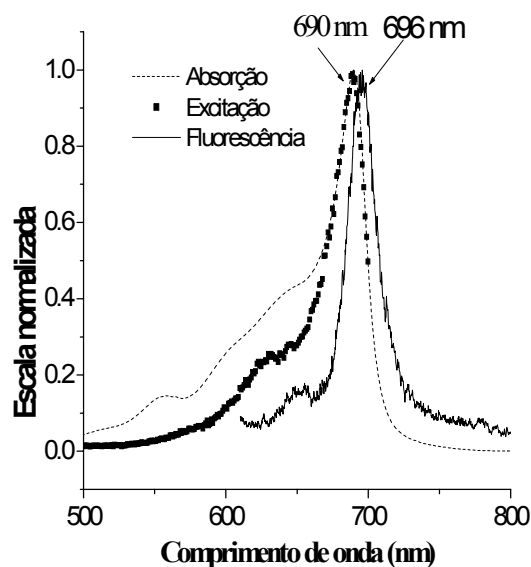


Gráfico 106 – Espectros normalizados de absorção, fluorescência e excitação para os agregados de BCD no DNA

O aumento da concentração de DNA induz a formação de uma nova banda localizada em $625 < \lambda < 759$ nm com o máximo centralizado em $\lambda_{\text{max}3} = 653$ nm. A intensidade dessa fluorescência cresce com o aumento da concentração de DNA e finalmente satura atingindo o valor do rendimento quântico $\phi_{f3} = (44 \pm 3) \%$ (Gráfico 107).

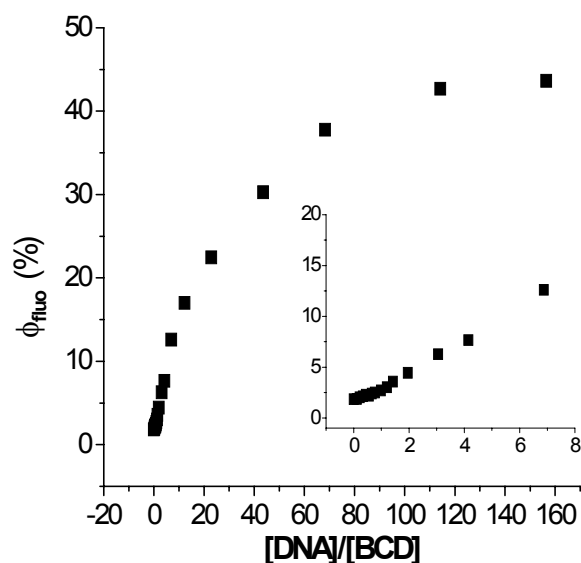


Gráfico.107.- Rendimento quântico da fluorescência do BCD 180⁰ em função da concentração de DNA

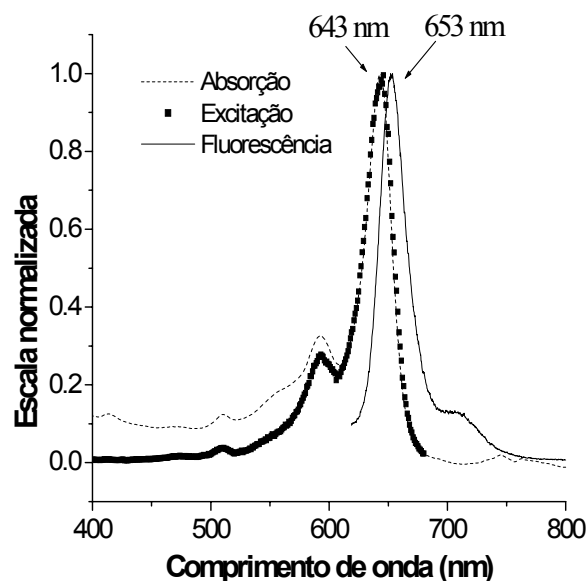


Gráfico 108 – Espectros normalizados de absorção, fluorescência e excitação para o monômero de BCD180⁰ ligado no DNA

O espectro de excitação dessa fluorescência é igual ao espectro de absorção da forma monomérica do BCD 180⁰ ligado com DNA (Gráfico 108).

Finalmente podemos concluir que, do mesmo modo que nos espectros de absorção ótica e dicroísmo circular, as mudanças nos espectros de fluorescência ocorrem em duas fases: primeiro, com a adição de DNA as bandas de fluorescência dos BCD têm suas intensidades sutilmente diminuídas, aparecendo uma banda deslocada para comprimentos de onda maiores, e acompanhada de mudança no seu perfil em relação à banda na ausência de DNA; segundo, com o aumento da concentração de DNA esta nova banda desaparece surgindo outra banda muito intensa deslocada para o vermelho em relação à banda dos monômeros.

Estes resultados mostram que os espectros de fluorescência também apontam para a ocorrência de 3 espécies diferentes na solução dependentes da concentração de DNA. Logo que é adicionado DNA nas soluções, os espectros mudam seu perfil inicial pela formação de agregados de

BCD na superfície das moléculas de DNA, como no caso da absorção ótica. Depois com o aumento da concentração se formam os complexos BCD-DNA que aumenta muito a intensidade de fluorescência dos BCD em relação à fluorescência dos monômeros.

O aumento na intensidade da fluorescência na formação da espécie BCD-DNA é, provavelmente, devido à maior rigidez adquirida pelas moléculas de BCD quando elas se ligam nas moléculas de DNA, que faz com que aumente o rendimento quântico de fluorescência em detrimento de outros processos não radioativos que ocorriam em maior intensidade pelo maior número de graus de liberdade das moléculas. Baseando-se nesse fato podemos esperar que o rendimento quântico do estado tripleto aumente também, como isso já foi observado em caso das porfirinas na sua interação com DNA [29]. Os resultados preliminares obtidos através da técnica de flash-fotólise apontam esse aumento. Por este motivo espera-se que a ligação com estruturas biológicas no organismo vá aumentar o rendimento quântico dos BCD e assim aumentar a produção do oxigênio singlete e efetividade do processo fotodinâmico.

7.3c Análise da fluorescência do BCD 180⁰ na presença de DNA e sal (NaCl)

Os gráficos de 109 a 110 mostram o comportamento da fluorescência dos BCD na concentração de sal de 0,2M com adição gradativa de DNA.

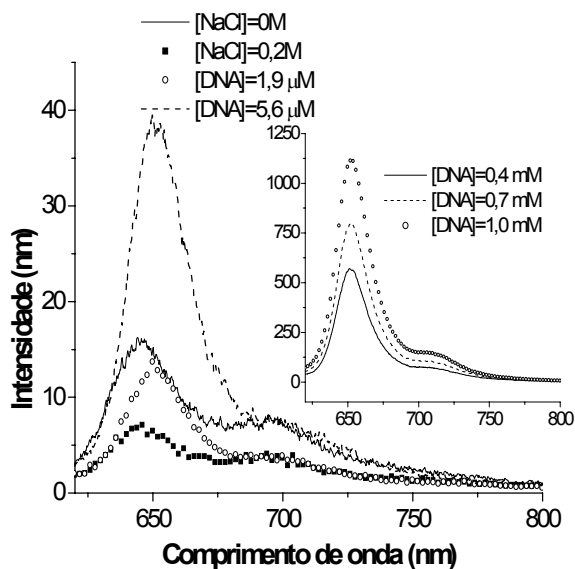


Gráfico 109 – Fluorescência pela concentração de DNA. $\lambda_{exc} = 600\text{nm}$. $[\text{NaCl}] = 0,2\text{M}$. $[\text{BCD}(180^\circ)] = 1,49 \mu\text{M}$

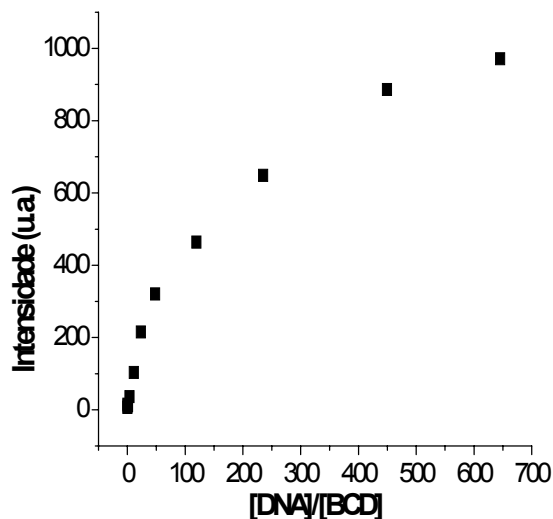


Gráfico 110 – Fluorescência pela concentração de DNA para $\lambda = 647 \text{ nm}$.

Com a adição de DNA a intensidade de fluorescência do corante, diminuída pela agregação que foi estimulada pelo sal, volta a crescer e atinge finalmente o rendimento quântico (42 ± 2 %), que é praticamente igual ao rendimento quântico do BCD na ausência do sal. Podemos concluir que, mesmo em altas concentrações de sal a interação com DNA faz com que ocorra a desagregação dos corantes e aumente o rendimento quântico da fluorescência até o mesmo nível que na ausência de sal. Nesse caso a fluorescência de agregados J foi muito fraca e difícil de identificar. Esse fato mostra que na presença do sal pela competição com a formação dos agregados tipo H o conteúdo dos agregados tipo J é menor que na ausência do sal.