

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À
MEDICINA E BIOLOGIA

**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**

Érika Ribeiro e Silva

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: Física
aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Érika Ribeiro e Silva

**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**

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. Dr. Iouri Borissevitch

RIBEIRÃO PRETO - SP
2010

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.

Silva, Érika Ribeiro.

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 /Érika Ribeiro e Silva; orientador Iouri Borissevitch – Ribeirão Preto, 2010.

115f. : il.

Dissertação (Mestrado)--Universidade de São Paulo, 2010.

1. Acridina Laranja. 2. Micelas. 3. Oxigênio molecular – Efeitos. 4. DNA.

Nome: SILVA, Érika Ribeiro e

Título: 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

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 este trabalho aos meus pais, à
minha irmã e ao meu namorado:
é impossível descrever o amor
que sinto por cada
um de vocês!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch, por me dar a oportunidade de trabalhar no Grupo de Fotobiofísica, pela confiança depositada e, acima de tudo, pelo enorme ensinamento ao longo desses anos.

Ao meu pai, minha mãe e minha irmã, por sempre estarem presentes em minha vida, mesmo que distantes, por serem o meu porto seguro, por nunca deixarem de acreditar em mim, pelo apoio e imenso amor. Sem vocês seria impossível a conclusão deste trabalho e por isso, serei eternamente grata.

Ao meu namorado Milton, pela companhia nos momentos de alegria, ajuda nos momentos de desespero, por sempre deixar tudo de lado para me ajudar e me fazer feliz. Meu amor por você é eterno!

Ao Wallance, primeiramente pela sincera amizade, pela ajuda na leitura de minha dissertação, pelas caronas e lanchinhos, por sempre estar disposto a me ajudar e pela companhia de cada dia.

Aos amigos de São José do Rio Preto, Glaucia e Vitor, pela enorme amizade.

Aos atuais e antigos integrantes do Grupo de Fotobiofísica, em especial: a Andreia, por sua amizade, ajuda e pelas boas conversas, a Marina, pela companhia nos almoços e horas vagas. Também ao Sérgio, Danilo, Gustavo (Pudimm) e ao Ernando.

Aos amigos de corredor, pelos momentos de descontração e risadas, em especial ao Jorge, Amanda, Jeam (mineiro), Éder, Flávio (buzina) e também ao Carlão.

Ao Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, pela ajuda na disponibilização de seu laboratório para a realização dos experimentos de fluorescência e espalhamento.

Ao Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco, por oferecer seu laboratório para a realização dos experimentos de detecção do oxigênio singleto. Ao Fernando, pelo acompanhamento e enorme ajuda nos experimentos.

Ao Prof. Dr. João Barros Valim, pela utilização de seu laboratório para a preparação de amostras saturadas com oxigênio.

A todos os professores do Departamento de Física e Matemática que de alguma forma me ajudaram em meu aprendizado.

À secretária da pós, Nilza.

À CAPES, pelo apoio financeiro através de bolsa de estudos.

À USP, pela infra-estrutura fornecida.

*“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências.
O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso
passará pela vida sem ver nada.”*

Albert Einstein

RESUMO

O Acridina Laranja é um corante catiônico da família de Acridinas. Além de ser utilizado como um agente fototóxico contra bactérias e parasitas, devido sua alta afinidade por estruturas biológicas, ele pode ser usado como um marcador fluorescente de compartimentos biológicos. Esta sua propriedade é também útil para o desenvolvimento de novos elementos micro e nanoeletrônicos. Ao ser irradiado, o corante pode sofrer fototransformação, causando uma série de transtornos, devido à perda da atividade ou o aumento de sua toxicidade, por exemplo. Por outro lado, a interação com estruturas nanoorganizadas pode alterar os mecanismos e as velocidades das fotoreações do fotossensibilizador. Isto torna importante o estudo da fototransformação do Acridina Laranja na sua interação com estruturas biológicas ou seus modelos. Neste trabalho foi realizado um estudo da dinâmica de fototransformação do corante Acridina Laranja na sua interação com DNA e micelas de SDS sob a ação da luz visível. O objetivo principal do trabalho foi avaliar o processo de fototransformação da Acridine Laranja na sua interação com sistemas micro/nanoorganizados de grande interesse biológico e médico tendo em vista sua possível aplicação prática. Para este estudo, utilizamos espectroscopia de absorção ótica UV-visível, espectroscopia de fluorescência estática e resolvida no tempo e espalhamento de ressonância de luz. Nos experimentos de fotólise do corante em soluções aquosas, observa-se que o Acridina Laranja sofre fototransformação sob a ação da luz visível. Os estudos mostraram que o Acridina Laranja se transforma mais rapidamente quando sua concentração é menor. Este efeito foi associado à formação de agregados em altas concentrações do composto. Na sua interação com DNA e micelas de SDS o Acridina Laranja também sofre fototransformação, sendo a velocidade de fotodecomposição mais baixa se comparar com as soluções aquosas. Os experimentos na presença e na ausência de oxigênio mostraram que as moléculas excitadas do Acridina Laranja transferem sua energia para oxigênio molecular formando o oxigênio singleto, que pode atacar as ligações duplas do sistema de conjugação π da estrutura do corante, contribuindo assim na sua fototransformação. De forma geral, podemos dizer que tanto as micelas de SDS como o DNA, podem dificultar o contato do Acridina Laranja e o oxigênio molecular, provavelmente, devido à alta viscosidade do ambiente onde o Acridina Laranja se encontra nesses sistemas ou devido à localização separada das moléculas de Acridina Laranja e do oxigênio dentro da estrutura de micelas e DNA.

Palavras-chave: Acridina Laranja, dinâmica de fototransformação, interação com DNA e SDS, efeito do oxigênio, métodos espectroscópicos.

ABSTRACT

Acridine Orange is a cationic dye of the Acridine family. Besides it being used as a phototoxic agent against bacteria and parasites it can be used as a fluorescent tag of biological compartments due to its high affinity for biological structures. This property appears also useful for the development of new micro and nano-electronic devices. Under visible light irradiation Acridine Orange is phototransformed, causing a lot of inconvenience due to the loss of activity or the increased toxicity, for example. On the other hand the interaction with nanoorganized structures can change the mechanisms and rates photoreactions of a photosensitizer. This makes important the study of phototransformation of Acridine Orange at its interaction with biological structures or their models. This work represents a study of the dynamics of Acridine Orange phototransformation at its interaction with DNA and SDS micelles under the action of visible light. The main objective of this study was to evaluate the process of Acridine Orange phototransformation at its interaction with micro/nanoorganized of great biological and medical interest in view of their possible practical application. In this study we used optical absorption UV-visible spectroscopy, static fluorescence and time resolved spectroscopies and resonance light scattering. In the experiments in aqueous solutions, it was observed that the Acridine Orange suffers phototransformation under the visible light. It was shown that Acridine Orange becomes faster when its concentration is lower. This effect was associated with the formation of aggregates at high concentrations of the compound. Acridine Orange at its interaction with DNA and SDS micelles, also is phototransformed, the phototransformation rate being lower as compared with aqueous solutions. Experiments in the presence and absence of oxygen showed that excited molecules of Acridine Orange transfer their energy to molecular oxygen, generating singlet oxygen, which can attack the double bonds of the dye π conjugation system, thereby contributing in its phototransformation. In general, we can say that both the SDS micelles as DNA, can block the contact of Acridine Orange and molecular oxygen, probably due to the high viscosity of the environment, where Acridine Orange appears in these systems, and/or due to the separate location of Acridine Orange and oxygen molecules within the structure of micelles and DNA.

Keywords: Acridine Orange, phototransformation dynamics, interaction with DNA and SDS, effect of oxygen, spectroscopic methods

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do corante Acridina Laranja.....	19
Figura 2. Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente..	23
Figura 3. Princípio básico da TFD: 1. Introdução do FS no paciente; 2. Tempo de incubação do FS e concentração do FS no tumor; 3. Irradiação da região com luz visível; 4. Destruição do tumor.	28
Figura 4. Reações fotofísicas do mecanismo da TFD. (adaptada de KONAN et al., 2002).	31
Figura 5. Curvas de energia potencial para interação de partículas.	34
Figura 6. 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).	35
Figura 7. Geometria de agregados de tipos H, J e HJ.	36
Figura 8. Ilustração do arranjo de moléculas de anfifílicas em água: (A) na interface água-ar e (B) no arranjo micelar.	38
Figura 9. Fórmula estrutural do SDS.....	39
Figura 10. Estrutura da molécula de DNA mostrando as regiões superficiais da molécula e as ligações fosfodiéster entre os fosfatos e pontes de hidrogênio, entre as bases.....	40
Figura 11. Reações do oxigênio singlete com moléculas biológicas.	42
Figura 12. Estruturas de Lewis para o oxigênio molecular.	42
Figura 13. Representação do estado fundamental e dos estados singlete e tripleto.	48
Figura 14. Gráfico demonstrativo da absorvância em função da concentração para o cálculo do coeficiente de absorção molar.	57
Figura 15. Representação esquemática do sistema laser pulsado Nd-YAG.....	60
Figura 16. Espectro de absorção do filtro com transmissão $\lambda \geq 410\text{nm}$	61
Figura 17. (A) Espectros de absorção óptica do AL em diferentes concentrações em soluções aquosas; (B) Razão entre as absorvâncias do espectro de absorção do AL em comprimentos de onda 490 nm (A490) e 475 nm (A475), em função da sua concentração, em soluções aquosas.	63
Figura 18. (A) Espectro de excitação de fluorescência do AL em água (B) Espectro de emissão da fluorescência do AL em água (C) Curva da cinética de decaimento da intensidade da fluorescência do AL em água.	64
Figura 19. Espectros de absorção óptica do AL $3,9 \times 10^{-5}\text{M}$ na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.....	65
Figura 20. Espectros de absorção óptica do AL $3,9 \times 10^{-5}\text{M}$ na ausência de O_2 , em função do tempo de irradiação.....	66
Figura 21. Decaimento da absorvância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 490\text{ nm}$ do monômero do AL na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	67

Figura 22. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 490$ nm do monômero do AL na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.	68
Figura 23. Ajuste monoexponencial da curva de decaimento $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 490$ nm do monômero do Acridina Laranja na concentração inicial $2,1 \times 10^{-5}$ M na presença de oxigênio, em função do tempo de irradiação.	69
Figura 24. Esquema simplificado proposto para a fototransformação do AL.	71
Figura 25. Intensidade de fosforescência do oxigênio singlete em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).	72
Figura 26. Esquema da fototransformação do AL levando em conta a formação de oxigênio singlete.	72
Figura 27. Espectros de absorção do $[AL] = 1 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	73
Figura 28. Absorbância em $\lambda = 500$ nm do $[AL] = 1 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	74
Figura 29. Espectros de absorção do $[AL] = 2 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	74
Figura 30. Absorbância em $\lambda = 500$ nm do $[AL] = 2 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	75
Figura 31. Espectros de absorção do $[AL] = 5 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	75
Figura 32. Absorbância em $\lambda = 500$ nm do $[AL] = 5 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	76
Figura 33. Espectros de absorção do AL $10 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	76
Figura 34. Absorbância em $\lambda = 500$ nm do $[AL] = 10 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.	77
Figura 35. Espectros de excitação da fluorescência do $[AL] = 5 \mu\text{M}$ em função da concentração de DNA.	78
Figura 36. Dependência da intensidade relativa de fluorescência do AL em $\lambda_{em} = 550$ nm devido à mudança do espectro de excitação do AL em função da concentração de DNA.	79
Figura 37. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL $1 \mu\text{M}$ com DNA.	80
Figura 38. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL $1 \mu\text{M}$ com $\lambda_{exc} = 462$ nm devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.	81
Figura 39. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL $2 \mu\text{M}$ com DNA.	81
Figura 40. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL $2 \mu\text{M}$ com $\lambda_{exc} = 462$ nm devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.	82
Figura 41. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL $5 \mu\text{M}$ com DNA.	82
Figura 42. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL $5 \mu\text{M}$ com $\lambda_{exc} = 462$ nm devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.	83
Figura 43. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL $10 \mu\text{M}$ com DNA.	83
Figura 44. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL $10 \mu\text{M}$ com $\lambda_{exc} = 462$ nm devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.	84
Figura 45. (A) Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo do AL $5 \mu\text{M}$ na sua interação com DNA em diferentes concentrações. (B) Em escala logarítmica.	84

Figura 46. Espectros de absorção ótica do AL 3,7 μM e DNA 25 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.	86
Figura 47. Espectros de absorção ótica do AL 3,7 μM e DNA 25 μM na ausência de O_2 , em função do tempo de irradiação.	87
Figura 48. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 493\text{nm}$ (5 μM) e 500nm (25 μM e 50 μM) da interação do AL com DNA na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.....	88
Figura 49. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 493\text{nm}$ (5 μM) e 500nm (25 μM e 50 μM) da interação do AL com DNA na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.....	89
Figura 50. Intensidade de fosforescência do oxigênio singleto da solução de AL e DNA 5 μM em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).	91
Figura 51. Espectros de absorção da interação do AL 5 μM com SDS em diferentes concentrações..	92
Figura 52. Absorbância em $\lambda = 490\text{nm}$ da interação do AL5 μM com SDS.	93
Figura 53. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL 5 μM com SDS.	94
Figura 54. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL 5 μM com $\lambda_{\text{exc}} = 462 \text{ nm}$ devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de SDS.	95
Figura 55. Espectros de excitação da fluorescência do $[AL] = 5\mu\text{M}$ em função da concentração de SDS, $\lambda_{\text{em}} = 550 \text{ nm}$	96
Figura 56. Espectros de espalhamento de luz pela soluções de AL 5 μM na ausência e na presença de SDS.....	97
Figura 57. Intensidade integral do espalhamento das soluções de AL 5 μM em função da concentração do SDS.....	97
Figura 58. Curvas cinéticas de decaimento da fluorescência do AL 5 μM em função de concentração de SDS.	98
Figura 59. Espectros de absorção ótica do AL 2,5 x 10 ⁻⁵ M e SDS 20mM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.	100
Figura 60. Espectros de absorção ótica do AL 2,5 x 10 ⁻⁵ M e SDS 20mM na ausência de O_2 , em função do tempo de irradiação.	101
Figura 61. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 496 \text{ nm}$ da interação do AL com micelas de SDS na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	102
Figura 62. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 496 \text{ nm}$ da interação do AL com micelas de SDS na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.....	102
Figura 63. Intensidade de fosforescência do oxigênio singleto da solução de AL e SDS 5 μM em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).	104
Figura 64. Intensidade de fosforescência do oxigênio singleto da solução de AL e SDS 20 μM em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).	105

Figura 65. *Intensidade de fosforescência do oxigênio singlete da solução de AL e SDS 100 μ M em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).* 105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	21
2.1 Fotofísica de uma molécula	22
2.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)	27
2.2.1 Aspectos históricos da TFD e efeitos fotodinâmicos.....	27
2.2.2 Princípios da Terapia Fotodinâmica	28
2.2.3 Mecanismos Fotoquímicos e Fotofísicos da Terapia Fotodinâmica	29
2.3 Agregação.....	32
2.3.1 Efeitos que influenciam a formação de agregados	33
2.3.1.1 Interação Eletrostática	33
2.3.1.2 Efeito hidrofóbico	34
2.3.1.3 Ligação de Hidrogênio (ou Pontes de hidrogênio)	35
2.3.1.4 Formação de complexos tipo π - π	35
2.3.2 Tipos de agregados.....	36
2.3.3 Efeito dos agregados sobre estados excitados e paramagnetismo	37
2.4 Surfactantes e Micelas	37
2.5 Ácido desoxirribonucléico (DNA)	39
2.6 Oxigênio molecular e oxigênio singleto	41
2.7 Implementação de estruturas nanoeletrônicas usando moléculas biológicas.....	43
3. OBJETIVOS	44
4. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS.....	46
4.1 Espectroscopia de absorção óptica.....	47
4.2 Espectroscopias de fluorescência e fosforescência	48
4.2.1 Espectroscopias contínuas de fluorescência e de fosforescência.....	49
4.2.2 Espectroscopias contínuas de fluorescência e de fosforescência com resolução temporal ...	49
4.2.2.1 Medidas da cinética de decaimento do estado S_1	50

4.2.3 Medidas do perfil de fosforescência do oxigênio singleto.....	51
4.3 Espectroscopia de Espalhamento de Ressonância da Luz (ERL)	53
5. MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1 Preparação das amostras	56
5.2 Cálculo do coeficiente de absorção molar do AL	56
5.3 Espectroscopia de absorção.....	57
5.4 Espectroscopias de Fluorescência e de Fosforescência	58
5.4.1 Espectroscopia contínua de fluorescência.....	58
5.4.2 Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal.....	58
5.4.3 Medidas do perfil de fosforescência do oxigênio singleto.....	59
5.5 Medidas da cinética de fototransformação do AL	60
5.6 Medidas de espalhamento de ressonância da luz	61
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
6.1 Estudos espectroscópicos do AL e da dinâmica de sua fototransformação em soluções aquosas homogêneas.....	63
6.1.1 Espectros de absorção óptica e de fluorescência	63
6.1.2 Dinâmica de fototransformação	64
6.2 Estudos espectroscópicos do AL e da dinâmica de sua fototransformação na sua interação com DNA	73
6.2.1 Espectros de absorção óptica e de fluorescência	73
6.2.2 Fluorescência estática e resolvida no tempo.....	79
6.2.3 Dinâmica de fotodecomposição na presença de DNA.....	85
6.3 Estudos espectroscópicos do AL e da dinâmica de sua fototransformação na sua interação com SDS.....	91
6.3.1 Espectros de absorção óptica	91
6.3.2 Medidas de fluorescência estática e com resolução temporal.....	94
6.3.3 Medidas de espalhamento de luz por ressonância.....	96
6.3.4 Medidas de fluorescência com resolução temporal	98
6.3.5 Dinâmica de fototransformação	99

7. CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111

1. INTRODUÇÃO

Os estudos das interações do corante Acridina Laranja (AL) com sistemas micro/nanoorganizados (DNA, membranas biológicas, modelos de membrana) são de grande interesse biológico e médico. O primeiro relato da ação fotodinâmica de um sistema biológico foi a fotoinativação do paramécio mediada por Acridina, relatada por Oscar Raab, em 1900. Durante o curso de seu estudo sobre efeitos do Acridina no protozoário causador da malária, Raab descobriu que a combinação de Acridina Vermelho e luz tinha um efeito letal na *Infusoria*, uma espécie de paramécio (ACKROYD et al., 2001). Corantes de Acridina são também usados como desinfetantes antibacterianos e antivírus, com suas ações antimicrobianas aumentadas substancialmente na presença de oxigênio e luz (KAPUSCINSKI et al., 1983; MAKAROV et al., 2006).

O Acridina Laranja (AL) é um corante da família das Acridinas (Figura 1) que possui características únicas, tais como: atividade antitumoral (TOMSON et al., 1974; NAKAMURA et al., 2008), fotossensibilidade (LE BAHERS et al., 2010; TOMSON et al., 1974; ISHIKAWA et al., 1984), fototoxicidade contra bactérias, parasitas e fungos (KUSUZAKI, K. et al., 2005). Outras aplicações relevantes deste corante incluem a visualização de compartimentos biológicos e medidas do gradiente de pH através da membrana (LE BAHERS et al., 2010; MANENTE et al., 2008). Além disso, o AL é um corante fluorescente que possui alta afinidade pelo DNA e RNA, tendo a capacidade de fluir rapidamente pelo citoplasma através da membrana celular, ligando-se a essas moléculas e também aos lisossomos, sendo por este motivo, utilizado como um marcador fluorescente específico de tais estruturas (BENVIN et al., 2007).

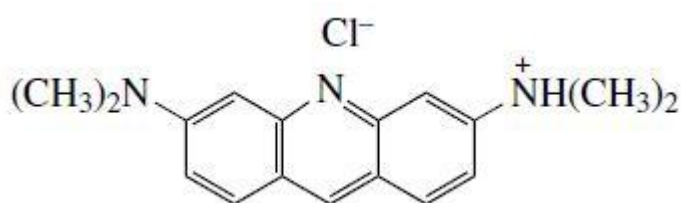


Figura 1. Fórmula estrutural do corante Acridina Laranja.

Mais recentemente, a coloração seletiva de células malignas resultou no uso do AL em microscopia de fluorescência, sendo fundamental no diagnóstico citológico esfoliativo do câncer cervical e vaginal (TOMSON et al., 1974; LICHA e OLBRICH, 2005).

Muitos estudos já apontaram que o AL possui propriedades adequadas para ser utilizado na Terapia Fotodinâmica do câncer. Em um desses estudos, descobriu-se que ele se acumula nos sarcomas músculo-esqueléticos e que, depois da iluminação dos tumores com luz

visível ou radiação com dose baixa de raios-X, o corante rapidamente exerce efeito seletivo citocida contra as células de sarcoma (KUSUZAKI et al., 2005).

O AL também é usado em análises biológicas, principalmente para entender os mecanismos de seu comportamento ligado ao DNA, como por exemplo, no fenômeno de fotoindução de processos de transferência de carga na dupla-hélice do DNA (KELLEY e BARTON, 1999). Além disso, complexos de DNA com moléculas orgânicas fotoativas são objetos promissores em Nanotecnologia, no desenvolvimento de elementos nanoeletrônicos e fotossensores de baixa dimensão (GU et al., 2002; KASUMOV et al., 2001; LEE et al., 2007; NOKHRIN, BARU, LEE, 2007; RAKITIN et al., 2001).

Todos estes fatos estimulam o interesse nos estudos da interação do AL com DNA. Mesmo que o problema já tenha sido estudado de forma profunda na década de 70 do século XX, (KUBOTA; Steiner, 1977) ele continua a atrair a atenção de pesquisadores, fato que se reflete nas diversas publicações atuais em revistas internacionais sobre este assunto.

Devido ao fato de o corante AL se ligar ao DNA através da membrana celular, é importante estudar os efeitos de sua interação com membrana e/ou modelos de membrana, tais como micelas, vesículas etc. Sob ação da luz visível, o AL pode sofrer fototransformações. Este processo pode ser importante para suas aplicações, pois:

- modifica as características do AL, prejudicando a sua utilização;
- os produtos de fototransformação podem ser tóxicos e perigosos nas aplicações biológicas e médicas.

As características do processo de fototransformação podem depender do ambiente onde o AL se encontra e da sua interação com outras moléculas e sistemas, como DNA e membrana celular, por exemplo. Entretanto estas características não estão ainda bem estabelecidas.

Neste trabalho apresentamos os resultados do estudo da dinâmica de fototransformação do AL em soluções aquosas homogêneas e sua interação com DNA e com dodecilsulfato de sódio (SDS), um surfactante que forma micelas carregadas negativamente. Os estudos foram realizados usando técnicas de espectroscopias de absorção óptica e de fluorescência, tanto na forma contínua quanto com resolução temporal. Os resultados foram analisados em função das concentrações do AL, DNA e SDS, tanto na ausência como na presença de oxigênio molecular. A formação de oxigênio singleto devido à transferência de energia do estado excitado tripleto do AL para o oxigênio molecular também foi demonstrada.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Fotofísica de uma molécula

Processos fotofísicos podem ser definidos como transições que convertem estados excitados uns com os outros ou estados excitados com o estado fundamental. Estes processos estão associados à absorção de radiação eletromagnética por uma molécula e à subsequente relaxação (TURRO, 1978). Estes processos são adequadamente explicados por um diagrama que mostra os níveis de energia da molécula e permitem analisar as transições envolvidas tanto nos processos de absorção quanto nos de relaxação.

Os fundamentos da fotofísica foram intensamente estudados e elaborados na década de quarenta do século passado. O principal passo para esclarecer tais processos foi apresentado pelo físico Alexander Jablonski. Em seu modelo original, Jablonski trata dos processos de absorção e relaxação de uma molécula baseando-se em um diagrama de energia de estados eletrônicos moleculares. O modelo inicial era muito diferente do que conhecemos atualmente, entretanto a sua grande contribuição foi atribuir a presença de um estado metaestável, que mais tarde veio a ser reconhecido como um estado tripleto.

A forma atual do diagrama de Jablonski representa o estado fundamental de uma molécula e seus estados excitados singletos e tripletos, conforme representado na Figura 2. Os nomes singlete e tripleto se justificam pela multiplicidade destes níveis que é dada através da expressão $2S + 1$, em que S é o número quântico de spin eletrônico total. Em um estado singlete, a soma dos spins de todos os elétrons da molécula (spin total) é nula ($S = 0$), enquanto que em um estado tripleto, os dois elétrons possuem os spins paralelos e $S = 1$.

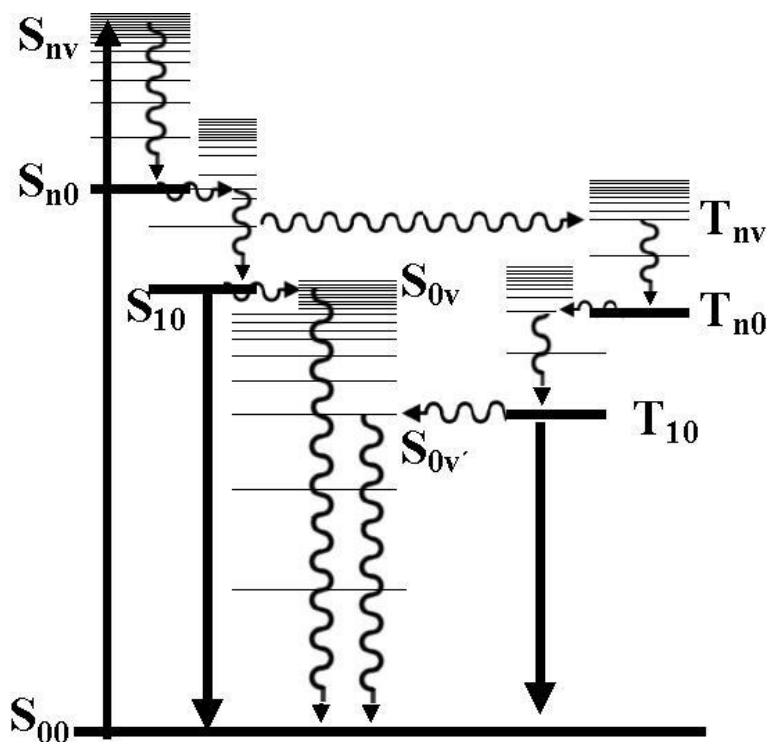


Figura 2. Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente.

No diagrama, os níveis de energia eletrônicos moleculares estão representados por linhas horizontais separadas verticalmente pela diferença de energia entre eles. A cada nível eletrônico estão associados níveis vibracionais (menores) e rotacionais (não mostrados), de maneira que os estados eletrônicos (n) e vibracionais (v) da molécula são indicados pelos índices subscritos como S_{nv} ou T_{nv} ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$; $v = 0, 1, 2, 3, \dots$). Conforme a distribuição estatística de Boltzmann, à temperatura ambiente, a grande maioria das moléculas se encontra nos níveis de menor energia vibracional S_{n0} e T_{n0} . O estado caracterizado pela menor energia eletrônica possível (S_{0v}), é denominado de estado fundamental e, à temperatura ambiente, o nível mais populado desse estado é S_{00} .

Os processos fotofísicos primários associados à absorção da luz por uma molécula e subsequente relaxação podem ser analisados da seguinte forma: quando um fluxo de fótons incide no material, suas moléculas podem absorver energia e sofrer uma transição do estado fundamental para um estado excitado. A transição pode acontecer entre diferentes estados eletrônicos, vibracionais ou rotacionais da molécula produzindo, em geral, uma transição eletrônica vibracional-rotacional. No diagrama da Figura 2 essas transições estão mostradas pelas setas retilíneas verticais, orientadas para cima.

A probabilidade da absorção de um fóton por um sistema quântico de dois níveis (1 e 2) é caracterizada pela seção de choque de absorção (σ_{12}), definida como a taxa de absorção de energia por moléculas no nível 1 para o nível 2 dividida pela intensidade da radiação incidente (I):

$$\sigma_{12}(\nu) = \frac{h\nu W_{12}(\nu)}{I} \quad (1)$$

em que $W_{12}(\nu)$ é a taxa de transição da absorção entre o estado 1 para o 2, que depende da frequência ν , e $h\nu$ é a energia da radiação incidente.

Transições entre estados eletrônicos que possuem a mesma multiplicidade de spin $S_m \rightarrow S_n$ ou $T_m \rightarrow T_n$ ($n > m$) são da ordem de 10^{-20} - 10^{-16} cm². Já, as transições entre os estados de spin diferente são proibidas pelas regras da seleção ($\Delta S = 0$) e por isso os valores característicos de σ para essas transições são aproximadamente 10^{-25} - 10^{-23} cm². Para transições entre estados vibracionais do mesmo estado eletrônico, os valores característicos são aproximadamente 10^{-22} cm².

Após a absorção da radiação, a molécula se encontra em um estado com excesso da energia e se ela não sofrer nenhuma reação ou “degradação”, encontrará alguma forma de perder esta energia e retornar ao estado fundamental S_{00} . Os processos de perda de energia entre dois estados eletrônicos podem ser: radiativos ou não radiativos. Os radiativos consistem na relaxação por emissão de radiação e são denominados de fluorescência e fosforescência, quando envolvem transições de $S_{10} \rightarrow S_{0v}$ e $T_{10} \rightarrow S_{0v}$, respectivamente. Geralmente são caracterizados por uma taxa (k_r) e na Figura 2 estão representados pelas setas retilíneas orientadas para baixo.

Os processos não-radiativos que ocorrem entre estados eletrônicos de mesmo spin, $S_n \rightarrow S_m$ ou $T_n \rightarrow T_m$ ($n > m$), são chamados de conversão interna (CI) e são caracterizados pela taxa k_{CI} . Aqueles que ocorrem entre estados de spin diferente $S_n \rightarrow T_m$ são denominados de cruzamento intersistemas (CIS) e são caracterizados pela taxa k_{CIS} . Devido à regra de seleção de spin, geralmente $k_{CI} \gg k_{CIS}$. Ambos os processos não-radiativos ocorrem de forma isoenergética entre os estados vibracionais dos estados inicial e final e são representados pelas setas onduladas horizontais.

Em um estado eletrônico a relaxação ocorre entre os níveis vibracionais de maior (S_{nv} ou T_{nv}) para os de menor energia finalizando no nível de energia menor possível (S_{n0} ou T_{n0}).

Este processo é denominado de relaxação vibracional e está ilustrado na figura 2 como setas onduladas orientadas de cima para baixo. Estes processos apresentam tempos característicos extremamente rápidos da ordem de picossegundos a femtossegundos.

Desta forma, após uma absorção $S_{00} \rightarrow S_{nv}$, ocorrerá uma rápida relaxação vibracional não radiativa de $S_{nv} \rightarrow S_{n0}$, seguida por uma conversão interna $S_{n0} \rightarrow S_{1v}$. Neste estado seguirá uma nova relaxação vibracional $S_{1v} \rightarrow S_{10}$. Em S_{10} as moléculas podem:

- i) relaxar de volta ao estado fundamental radiativamente, ou
- ii) não radiativamente sofrendo uma conversão interna $S_{10} \rightarrow S_{0v}$, ou ainda
- iii) não radiativamente sofrendo um cruzamento intersistemas $S_{10} \rightarrow T_{nv}$.

A relaxação do estado excitado S_{10} será governada por um decaimento, que leva em consideração todos os processos descritos previamente, que nos permite escrever a taxa de decaimento do estado singleto como a soma de todos estes processos da seguinte forma:

$$\frac{dn_{S_1}}{dt} = -(k_r + k_{nr} + k_{CIS})n_{S_1} \quad (2)$$

Considerando que a soma de todas estas taxas é a taxa do decaimento do estado S_{10} , podemos reescrever esta equação como:

$$\frac{dn_{S_1}}{dt} = -k_{S_1} n_{S_1} = -\frac{n_{S_1}}{\tau_{S_1}} \quad (3)$$

em que n_{S_1} é o número de partículas excitadas em um dado instante de tempo t após a excitação (absorção) e τ_{S_1} é o tempo de vida do estado S_{10} . Lembrando que $n_{S_1}(t) = n_{S_1}^0$, em $t = 0$, a integração desta equação fica:

$$n_{S_1}(t) = n_{S_1}^0 e^{-t/\tau_{S_1}} \quad (4)$$

Como consequência, tem-se um decaimento exponencial da população do estado S_{10} . O tempo de vida também pode ser considerado o tempo médio que uma molécula permanece no estado excitado e pode ser medido através de técnicas resolvidas no tempo.

O tempo τ_{S_1} pode ser medido, por exemplo, através do decaimento da intensidade de fluorescência da amostra em função do tempo e, portanto, é comum chamar τ_{S_1} de “tempo de vida da fluorescência” (τ_f). Para moléculas orgânicas em soluções líquidas o tempo de vida τ_{S_1} é tipicamente da ordem de alguns nanossegundos.

De maneira análoga aos estados singletos, teremos os decaimentos tripleto $T_{nv} \rightarrow T_{n0}$, $T_{n0} \rightarrow T_{1v}$ e $T_{1v} \rightarrow T_{10}$. O decaimento final $T_{10} \rightarrow S_{0n}$ pode ser radiativo (fosforescência) ou não

radiativo através do cruzamento intersistemas. Devido ao fator de restrição de spin, os típicos tempos de vida do estado tripleto T_1 (τ_{T_1}) para moléculas orgânicas em sistemas líquidos são da ordem de micro- a milissegundos.

Outro parâmetro importante é a eficiência de uma amostra emitir fluorescência, também denominado por rendimento quântico da fluorescência (Φ_{fl}). O rendimento quântico da fluorescência é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos pelo material. Uma vez considerados os processos não radiativos que competem com a fluorescência, podemos definir a fração que representa a desexcitação através da fluorescência como:

$$\Phi_{fl} = \frac{k_r}{k_r + k_{CI} + k_{CIS}} \quad (5)$$

O rendimento quântico também pode ser expresso através do tempo de vida de fluorescência da seguinte maneira:

$$\Phi_{fl} = \frac{\tau_{S_1}}{\tau_r} \quad (6)$$

em que $1/\tau_r = k_r$ é a taxa de despopulação do estado S_1 pela fluorescência (taxa radiativa).

Por outro lado, podemos ainda ter a relação:

$$\Phi_{fl} = \frac{I_{fl}}{I_{abs}} \quad (7)$$

em que I_{fl} é a intensidade total da fluorescência, que pode ser calculada como a integral do espectro de fluorescência e I_{abs} é a intensidade de luz absorvida pela amostra no comprimento de onda de bombeio.

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

$$\Phi_T = \frac{k_{CIS}}{k_r + k_{CI} + k_{CIS}} \quad (8)$$

ou ainda, em termos dos tempos de vida:

$$\Phi_T = \frac{\tau_{S_1}}{\tau_{cis}} \quad (9)$$

Absorvendo os fótons nos estados excitados S_{10} e T_{10} , a molécula pode ser promovida aos estados de energias mais elevadas S_{nv} ou T_{nv} , respectivamente. Estes estados mais elevados irão relaxar aos estados iniciais S_{10} e T_{10} , como descritos previamente. Tripletos

mais elevados também podem ser populados pelo cruzamento intersistemas de uns estados mais elevados do singlete, caso os valores das taxas forem competitivas para a conversão interna e o cruzamento intersistemas nos estados superiores.

2.2 Terapia Fotodinâmica (TFD)

2.2.1 Aspectos históricos da TFD e efeitos fotodinâmicos

A luz vem sendo empregada no tratamento de doenças desde a antiguidade. Seu uso como agente terapêutico remonta a 3000 a.C., quando os egípcios a utilizavam para o tratamento de doenças na combinação de plantas e exposição solar (MARANHO, 2008).

No entanto, foi somente em meados de 1900 que Oscar Raab, orientado por von Tappeiner, relatou que a combinação de baixas concentrações de Acridina, na presença de luz, poderia rapidamente induzir a destruição de paramécios. Essa descoberta provou a existência de uma conexão entre a ativação de corantes pela luz e o resultado terapêutico.

Após Raab, as primeiras experiências visando à aplicação dos efeitos fotodinâmicos no tratamento de tumores em humanos foram realizadas em 1903 por Tappeiner e Jesionek que empregaram uma solução aquosa de eosina e luz no tratamento de carcinoma basocelular.

Em 1924, observou-se que moléculas de porfirinas podiam, na presença de luz, tornarem-se tóxicas para tecidos doentes. No período de 1960 a 1967, Lipson e colaboradores (LIPSON; BALDES, 1960), investigaram um acúmulo preferencial de um derivado hematoporfirínico (HpD) em tumores, utilizando camundongos e ratos e observaram que a incidência da luz proporcionou a regressão da doença. Subsequentemente, Lipson obteve sucesso no tratamento de uma paciente com câncer de mama usando HpD e irradiação seletiva do tumor com luz visível.

Em 1978, o Dr. Thomas Dougherty usou um derivado de hematoporfirina e, posteriormente, sua forma parcialmente purificada, o *Photofrin*®, para tratar efetivamente várias doenças malignas (DOUGHERTY et al., 1978). O isolamento de porfirinas e a subsequente descoberta das propriedades de localização preferencial em tumores, assim como os efeitos fototóxicos no tecido tumoral levaram ao desenvolvimento do diagnóstico do câncer pela fluorescência (DF), ou do inglês *Photodynamic Diagnostic* (PDD) e da Terapia Fotodinâmica (TFD), ou *Photodynamic Therapy*, (PDT) (DOUGHERTY et al., 1978, ACKROYD et al., 2001, BROWN.; BROWN; WALKER, 2004).

A partir dos trabalhos de Dougherty e sua equipe, a TFD passou a ser reconhecida como mais um tratamento para o câncer, tendo sido empregada com sucesso no tratamento de vários tipos de tumores. Thomas Dougherty foi um dos principais fundadores do mais avançado centro de Terapia Fotodinâmica, vinculado ao *Roswell Park Cancer Institute*, nos E.U.A. Dougherty estabeleceu um procedimento para o preparo de HpD e, por fim, desenvolveu um método que seguiu as normas estabelecidas pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o preparo do fotossensibilizador em larga escala.

Atualmente, a TFD está sendo testada em clínicas para o uso na oncologia – para o tratamento de vários tipos de tumores malignos, cânceres de cabeça e pescoço, cérebro, pulmão, pâncreas, próstata, mama e pele, entre outros (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003).

2.2.2 Princípios da Terapia Fotodinâmica

A TFD é uma modalidade de tratamento que envolve a administração de um fotossensibilizador (FS) e sua ativação por luz. O fotossensibilizador é um composto que não é ativo no seu estado fundamental e que absorve luz na região visível. O princípio TFD é introduzir no organismo do paciente o FS, e após certo tempo iluminar a região a ser tratada com luz (Figura 3); a luz ativa o FS, produzindo espécies ativas de oxigênio e radicais livres que destroem seletivamente as células-alvo.

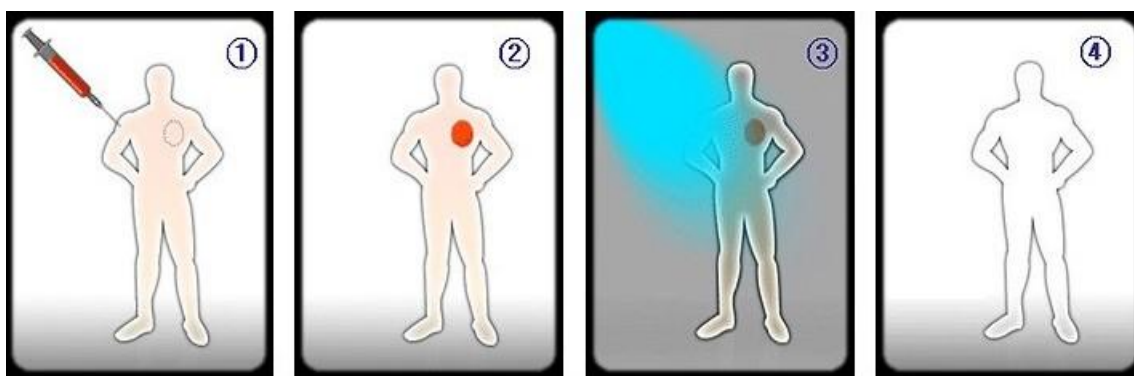


Figura 3. Princípio básico da TFD: 1. Introdução do FS no paciente; 2. Tempo de incubação do FS e concentração do FS no tumor; 3. Irradiação da região com luz visível; 4. Destruição do tumor.

Comparado com os métodos atuais de tratamento, a TFD possui a vantagem de ser um método mais efetivo e seletivo na destruição de células tumorais sem destruir as células vizinhas normais. A TFD é útil na Medicina, pois a ação da luz visível não causa danos aos

tecidos saudáveis, diferentemente dos métodos atuais de tratamento, tais como radioterapia e quimioterapia. Estes métodos, pela ausência de citotoxicidade seletiva, induzem profunda imunodeficiência, reduzindo assim a resistência do organismo do paciente (RUBIN, 1977). Além disso, a quimioterapia pode induzir diversos efeitos colaterais, como alopecia (queda de cabelo), vômitos, fragilidade de superfícies mucosas, lesões em válvulas cardíacas e ainda causar resistência nas células tumorais. A radioterapia pode induzir novas neoplasias devido à exposição às radiações ionizantes. Diferentemente, a TFD apresenta vantagens, pois é seletiva na destruição de células tumorais sem destruir as células vizinhas normais. Além disso, os FS usados em TFD não são tóxicos em seu estado não excitado (fundamental) e a irradiação com luz visível não produz danos para o organismo do paciente.

Comparada com outras terapias citotóxicas, a TFD tem a vantagem de dupla seletividade: não apenas o FS pode ser direcionado para as células ou tecido doente, mas também a luz pode ser precisamente focalizada no local da lesão. Se necessário, o procedimento pode ser repetido várias vezes, uma vez que não há efeitos tóxicos cumulativos e é, usualmente, não invasivo. Devido ao seu baixo risco, pode ser usado em pessoas idosas ou que estão debilitadas demais para serem submetidas a uma cirurgia.

Além disso, a TFD possui aplicações não-oncológicas, sendo utilizada para tratamentos dermatológicos e na inativação de microrganismos, técnica conhecida como inativação fotodinâmica.

O único efeito colateral de TFD é a sensibilização à luz do corpo do paciente, que é contornada evitando exposição à luz solar e luz interna muito intensa por um período de até 6 semanas, dependendo do FS.

2.2.3 Mecanismos Fotoquímicos e Fotofísicos da Terapia Fotodinâmica

O efeito fotoquimioterapêutico está baseado na produção de espécies ativas pela ação da luz visível que induzem a morte celular. Estas espécies são formadas devido à fotoexcitação das moléculas do FS através da luz.

Tipicamente, a luz aplicada é da região de 600 a 800 nm, chamada "janela terapêutica", onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes e a absorção desta irradiação por moléculas endógenas do sistema biológico é baixa. Entretanto, para o

tratamento de doença na superfície e tumores não maciços podem ser utilizados os FS que possuem a absorção na região espectral $\lambda < 600$ nm.

O FS, após absorver um fóton, sai de seu estado fundamental singlete (S_0) e é promovido a um estado singlete de maior energia (S_n), decaindo rapidamente por processos não radiativos ao mais baixo estado excitado singlete (S_1). Através do processo de cruzamento inter-sistemas, caracterizado pela inversão do spin eletrônico, a molécula do FS pode passar do estado S_1 para o estado excitado tripleto (T_1) caracterizado por um tempo de vida muito mais longo do que o estado S_1 (Figura 4).

O efeito fotodinâmico é baseado em dois mecanismos:

Mecanismo Tipo I: O composto fotoativo no estado S_1 ou T_1 pode, por reações de oxidação e redução com diferentes biomoléculas, ser foto-reduzido, que por transferência de um elétron à molécula de oxigênio, gera espécies reativas como peróxidos (ROO^\cdot), ânion superóxido (O_2^-), ânion radical hidroxila (OH^\cdot), etc, provocando a destruição da membrana ou de macromoléculas. Finalmente o fotossensibilizador volta para seu estado fundamental.

Mecanismo Tipo II: A molécula no estado T_1 transfere energia para a molécula de oxigênio cujo estado fundamental é tripleto (3O_2), formando oxigênio singlete (1O_2). O 1O_2 é a chave intermediária no processo fotodinâmico, sendo o principal responsável pela inativação da célula. Ele pode induzir várias reações com componentes moleculares da célula, tais como: DNA, proteínas, fosfolípidios da membrana celular, mitocôndrias, lisossomos, etc., tendo como o resultado a morte da célula e, de um modo geral, a destruição do tumor. O 1O_2 possui tempo de vida em água de aproximadamente $4\mu s$, e em sistemas biológicos, esse tempo é mais baixo, inferior a $0,04\mu s$ (BAGNATO, 2008). Em função disso, seu raio de ação é extremamente reduzido ($<0,02\mu m$), atuando apenas onde é produzido, fator importante para a TFD que tem como base o efeito fotodinâmico localizado.

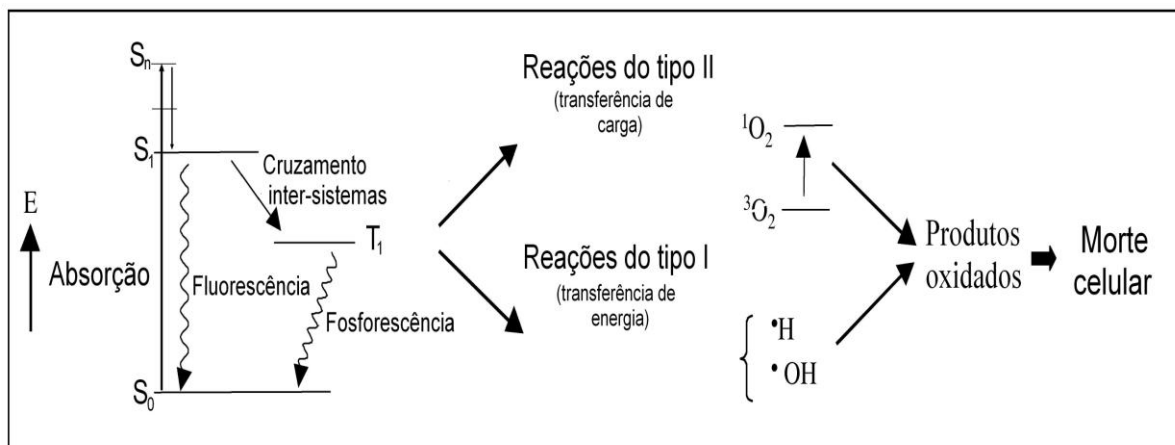


Figura 4. Reações foto-físicas do mecanismo da TFD. (adaptada de KONAN et al., 2002).

O fator que determina se irão ocorrer mecanismos do Tipo I ou do Tipo II é a competição entre o substrato e o oxigênio molecular pelo estado excitado do fotossensibilizador. Em sistemas atualmente usados em clínicas, a porcentagem de ocorrência do mecanismo tipo I é de aproximadamente 10% enquanto a ocorrência do mecanismo tipo II é de até 90% (BONNETT, 1995, BYRNE, 2004, TRIVEDI, 2000). Entretanto, este parâmetro pode variar dependendo das características do FS como da natureza do alvo da sua ação.

O estudo dos efeitos do ambiente nas características de um FS é essencial, especialmente os efeitos causados devido à presença de estruturas micro-organizadas, tais como DNA, proteínas e membranas celulares, principais estruturas com os quais os FS interagem no organismo (OLEINICK; EVANS, 1998).

Sob a ação da luz visível os FS podem ser transformados, por um lado perdendo sua fotoatividade e, por outro, formando os fotoprodutos que podem ser tóxicos para o organismo. A velocidade de fototransformação depende de vários fatores, tais como interação com estruturas do organismo (membranas celulares e biopolímeros) e reação com diversos compostos. Entre os últimos, o oxigênio molecular possui o interesse especial, pois:

- suprime efetivamente os estados excitados do FS, diminuindo assim, sua fotoatividade;
- o oxigênio singleto, formado devido a transferência da energia de estados excitados de FS para oxigênio molecular, pode induzir reações de oxidação das moléculas do FS.

2.3 Agregação

Um agregado pode ser considerado um aglomerado de partículas ou moléculas que se juntam sem ligação química. O agregado é caracterizado por sua estrutura espacial (posição relativa de partículas dentro do agregado) e pelo número de agregação n (número médio de partículas no agregado).

Os agregados podem ser homogêneos ou heterogêneos. Os homogêneos são constituídos de moléculas (monômeros) do mesmo composto que se unem formando agregados de diversos graus de agregação (dímeros, trímeros, quadrímeros, etc.), e os heterogêneos são os que incluem na sua estrutura moléculas diferentes. As propriedades eletrônicas e óticas dos agregados moleculares são diferentes daquelas dos seus monômeros constituintes.

Os estudos da agregação de compostos em sua interação com sistemas biológicos e biomiméticos são de grande importância para a Medicina e a Biologia, bem como para o desenvolvimento tecnológico. O fenômeno da agregação 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”).

Em particular, a agregação afeta a atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores, pois induz a redução dos rendimentos quânticos e tempos de vida dos estados excitados singleto e tripleto e, conseqüentemente, reduz a produção de oxigênio singleto. Os efeitos que são responsáveis pela formação de agregados são: efeito hidrofóbico, interação eletrostática, formação de pontes de hidrogênio e complexos- π .

A agregação apresenta um aspecto especial para os compostos com sistema desenvolvido de conjugação π na sua estrutura. A presença desse sistema 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

relativamente solúveis em água, eles preservam essa tendência e demonstram as propriedades anfifílicas.

2.3.1 Efeitos que influenciam a formação de agregados

2.3.1.1 Interação Eletrostática

Em agregados homogêneos formados por moléculas carregadas, estas sofrem repulsão eletrostática cuja energia é a energia Coulombiana:

$$W_Q = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (10)$$

em que Q é a carga do monômero, ϵ_0 é a constante dielétrica do meio e r é a distância entre os monômeros.

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

$$W_K = \frac{-U^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 kTr^6} \quad (11)$$

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

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

$$W_L = -\frac{3}{4} \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (12)$$

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 a $1/r^2$. Os dois atrativos, que são proporcionais a $1/r^6$, são mais eficientes nas distâncias curtas.

Além disso, nas distâncias muito curtas entre as moléculas, mais uma interação repulsiva se destaca 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 (Figura 5):

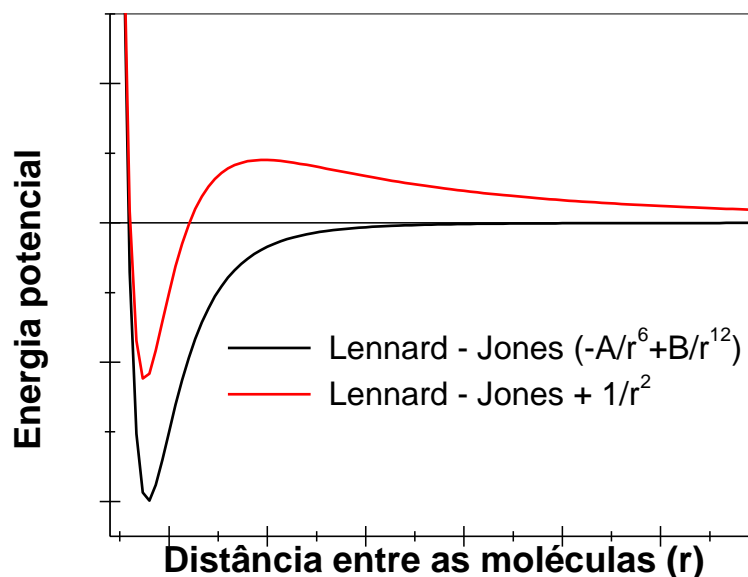


Figura 5. Curvas de energia potencial para interação de partículas.

Para se juntar e atingir o mínimo da energia potencial, as moléculas carregadas devem ultrapassar uma barreira potencial que existe devido à repulsão eletrostática.

2.3.1.2 Efeito hidrofóbico

Quando moléculas hidrofóbicas ou anfífilas que interagem fracamente com moléculas de água são introduzidas numa solução aquosa, estas quebram as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água alterando a sua estrutura. Esse processo é acompanhado pelo aumento da energia livre da solução. A tendência das moléculas hidrofóbicas é a de promover a associação das regiões não polares de duas moléculas, fazendo

com que o número de ligações hidrogênio quebradas diminua e, conseqüentemente, o aumento da energia livre se tornará relativamente menor. Esta é a descrição simplificada do efeito hidrofóbico. Este efeito é o principal na formação de membranas biológicas, micelas, vesículas, etc. Dependendo do tamanho e da hidrofobicidade das moléculas, essa interação pode ser considerada tanto de longo quanto de curto alcance.

2.3.1.3 Ligação de Hidrogênio (ou Pontes de hidrogênio)

A ligação de hidrogênio se forma entre uma molécula doadora (D-H) e uma aceitadora (A), envolvendo átomos eletronegativos conectados por um átomo de H. Para ocorrer esta ligação, os monômeros devem se aproximar para que as nuvens eletrônicas dos átomos que formam essa ligação se sobreponham. Esta interação é eficiente para distâncias curtas ($\sim 2\text{Å}$) e pode aumentar a profundidade do poço de energia, favorecendo a estabilização do agregado.

2.3.1.4 Formação de complexos tipo π - π

As moléculas com sistemas desenvolvidos de conjugação π são capazes de formar complexos através da sobreposição de suas nuvens de elétrons π (Figura 6):

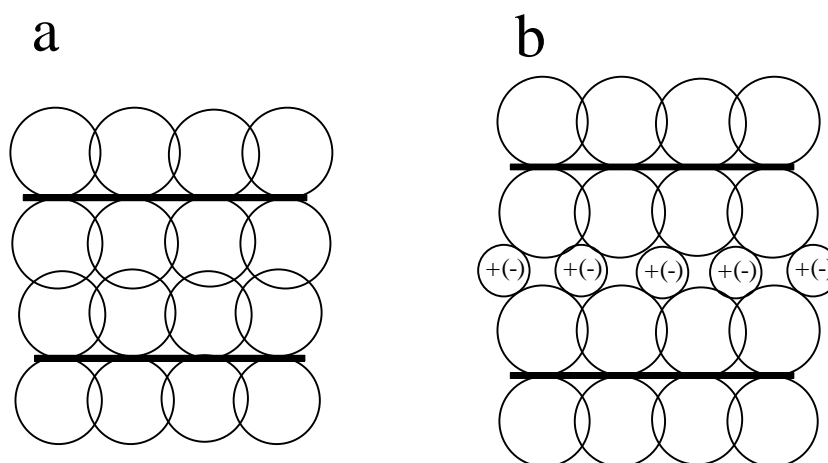


Figura 6. Sobreposição de nuvens de elétrons- π durante agregação de duas moléculas na ausência (a) e (b) na presença de íons de sal (positivos ou negativos).

Como no caso de pontes de hidrogênio, esse tipo de ligação também se torna eficiente somente nas distancias curtas.

2.3.2 Tipos de agregados

Na literatura são considerados dois tipos básicos de agregados de moléculas (KASHA, 1963):

- agregados do **tipo J** ou “**edge-to-edge**” cujo ângulo entre os monômeros é de 180° , e
- agregados do **tipo H** ou “**face-to-face**” cujo ângulo entre os monômeros é 0° .

A geometria desses tipos de agregados está representada na Figura 7:

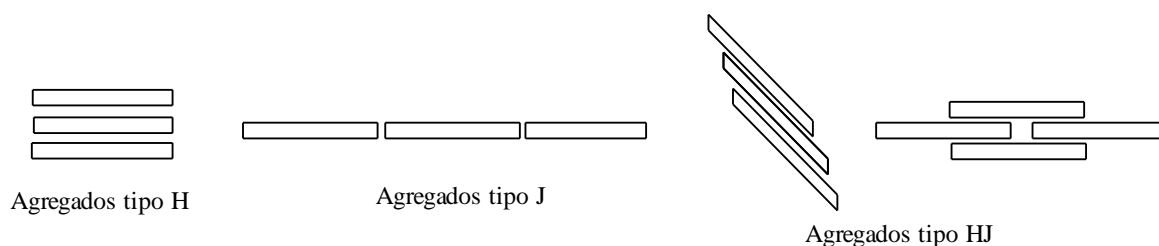


Figura 7. Geometria de agregados de tipos H, J e HJ.

Em muitos casos podem ser observados os agregados de tipo misto HJ, onde o contato “**face-to-face**” não é completo.

A estabilidade do agregado depende da sobreposição de nuvens de elétrons dos monômeros. Por isso os agregados H, que possuem maior possibilidade para essa sobreposição, deveriam estar mais estáveis. Contudo, vários fatores podem atrapalhar a formação de agregados do tipo H, favorecendo a formação dos mesmos do tipo J. A formação dos agregados do tipo J de diversos sistemas foi demonstrada experimentalmente e teoricamente (VAN DER AUWERAER; SCHEBLYKIN, 2002, SHKLYAREVSKIY, 2002, VON BERLEPSCH; KIRSTEIN; BOTTCHEER, 2002).

2.3.3 Efeito dos agregados sobre estados excitados e paramagnetismo

O rendimento quântico φ_T e o tempo de vida τ_T do estado tripleto do FS diminuem com o aumento de probabilidade dos processos não radioativos, CI e CIS, na perda da energia da excitação eletrônica. O mesmo podemos dizer sobre φ_{fl} e τ_{fl} , pois:

$$\varphi_{fl} = k_{fl} / (k_{fl} + k_{CI} + k_{CIS}) \quad (13)$$

$$\tau_{fl} = 1 / (k_{fl} + k_{CI} + k_{CIS}) \quad (14)$$

A agregação aumenta a probabilidade de CI e CIS (aumenta k_{CI} e k_{CIS}), diminuindo φ_{fl} , τ_{fl} , φ_T e τ_T . Isso pode influenciar a eficiência do composto na sua aplicação como sonda ou FS.

2.4 Surfactantes e Micelas

Tensoativos (ou surfactantes) são substâncias anfifílicas compostas por uma parte polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). A parte hidrofóbica, que não possui momento de dipolo permanente, é formada geralmente por uma longa cadeia hidrocarbônica com oito ou mais átomos de carbono. A parte hidrofílica ou “cabeça polar” possui geralmente um momento dipolo permanente ou pode ser facilmente polarizada (Figura 8). Essa parte pode, ou não, conter cargas. Com base nestas cargas, os tensoativos são classificados como aniônicos, catiônicos, não iônicos e zwitteriônicos.

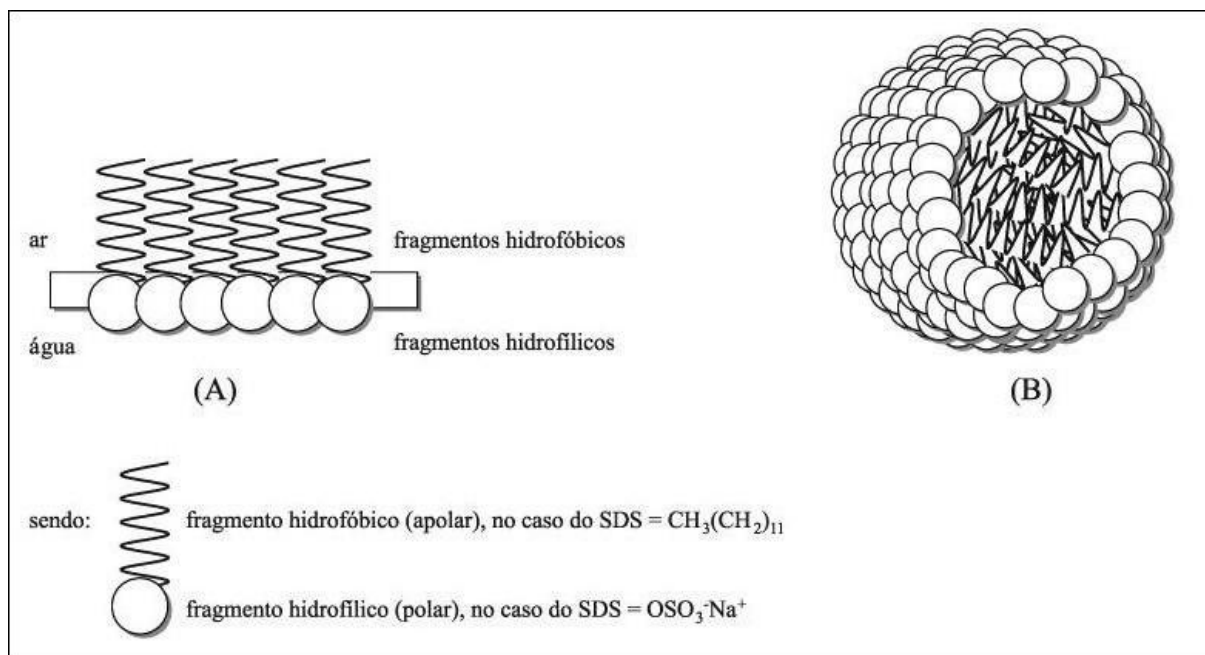


Figura 8. Ilustração do arranjo de moléculas de anfífilicos em água: (A) na interface água-ar e (B) no arranjo micelar.

Atingindo certa concentração, chamada concentração micelar crítica (CMC), os tensoativos formam agregados termodinamicamente estáveis com uma estrutura definida que recebem o nome de micelas. A CMC é definida como a concentração de tensoativos necessária para a formação de micelas. As micelas são caracterizadas por seu perfil espacial, tamanho e por um número de agregação, ou seja, uma quantidade média de monômeros necessários para a formação da micela (NEUGEBAUER, 1994). Estas características variam dependendo do pH, força iônica, presença de outras moléculas, etc.

O processo de formação de micelas envolve a participação de interações de diferente natureza (eletrostática, van der Waals, efeito hidrofóbico) que atuam de modo a estabilizar o complexo. Este processo é espontâneo e altamente cooperativo e ocorre como resposta às interações desfavoráveis entre a cadeia hidrofóbica do surfactante e a água.

A estrutura das micelas mimetiza a estrutura da membrana, tendo em vista basicamente a presença das seguintes regiões caracterizadas de acordo com a constante dielétrica (ϵ) (TANFORD, 1980):

a) região interna hidrofóbica, formada pela parte apolar (cadeia hidrocarbônica) da molécula do tensoativo. Essa região não contém água e é caracterizada por uma baixa constante dielétrica, $\epsilon = 2 - 4$;

b) região esférica superficial, formada pela parte polar do tensoativo e pelos contra-íons, caracterizada por $\epsilon = 5 - 18$ (camada de Stern);

c) região intermediária, entre a parte polar da micela e o meio aquoso homogêneo, caracterizada por um alto gradiente de constante dielétrica (entre 18 e 81) numa distância que varia entre 10 e 100 Å, dependendo da força iônica do meio. Esta camada recebe o nome de camada de Gouy-Chapman.

O SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) (Figura 9) é um tensoativo carregado negativamente. Sua CMC em soluções aquosas homogêneas com força iônica $< 0,1$ M está na faixa de 7 a 10 mM e o número de agregação é de aproximadamente 62 (SHINODA, 1963, ANGHEL; CIONAN, 1976).

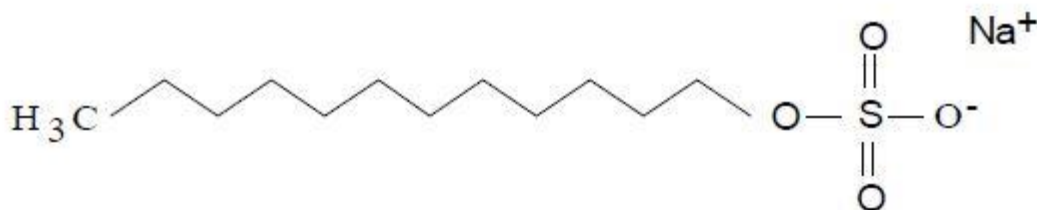


Figura 9. Fórmula estrutural do SDS.

2.5 Ácido desoxirribonucléico (DNA)

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é responsável pelo armazenamento e transmissão da informação genética. Devido à sua importância, o DNA é um dos principais alvos para matar as células.

A molécula de DNA consiste em duas cadeias de nucleotídeos dispostas em hélice em torno de um eixo. As moléculas de DNA são formadas por constituintes menores que se ligam entre si. Estes constituintes são compostos por: uma base nitrogenada, um açúcar (composto por 5 carbonos) e um fosfato. O que diferencia cada constituinte são as bases nitrogenadas, que são: guanina (G), citosina (C), adenina (A) e timina (T). Os constituintes formam uma fita de DNA através de ligações fosfodiésteres entre os fosfatos. As bases de cada cadeia situam-se dentro da hélice dupla, em planos paralelos entre si e perpendiculares ao eixo da hélice. Em

cada plano ou cadeia, a base de uma cadeia forma par com a base da cadeia complementar. Na dupla hélice, as bases unem-se através de pontes de hidrogênio, principais responsáveis pela estabilidade da hélice. Estas ligações formam os pares de bases A-T e G-C. As bases (hidrofóbicas) situam-se dentro da hélice, e os resíduos de desoxirribose (hidrofílicos) e de ácido fosfórico (ionizado e hidrofílico) localizam-se na periferia. Ao lado das pontes de hidrogênio que representam o elemento principal de união entre os dois filamentos polinucleotídicos da dupla hélice, a interação hidrofóbica das bases pareadas contribui para manter a estabilidade da hélice de DNA. Os grupos fosfóricos, carregados negativamente, permitem ao DNA combinar-se com moléculas carregadas positivamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2000).

O DNA possui carga efetiva negativa pela presença dos fosfatos e, por isto, moléculas de FS com carga positiva e com estrutura desenvolvida de conjugação π podem ser ligadas em sua superfície, devido à atração eletrostática entre suas cargas. Além disso, o FS pode intercalar-se no interior da estrutura da hélice, entre os planos formados pelos pares de bases, devido ao efeito hidrofóbico entre o interior do DNA e o sistema de conjugação π do FS. Este é o caso do AL, que é conhecido como um intercalador clássico (NASIM; BRYCHCY, 1979, LYLES; CAMERON; RAWLS, 2001; BENVIN et al. 2007).

A superfície do DNA é composta por duas regiões distintas que se diferenciam pela geometria. Tais regiões são denominadas de “*minor groove*” e “*major groove*”, sendo que a primeira forma uma cavidade menor e a segunda, uma maior (Figura 10):

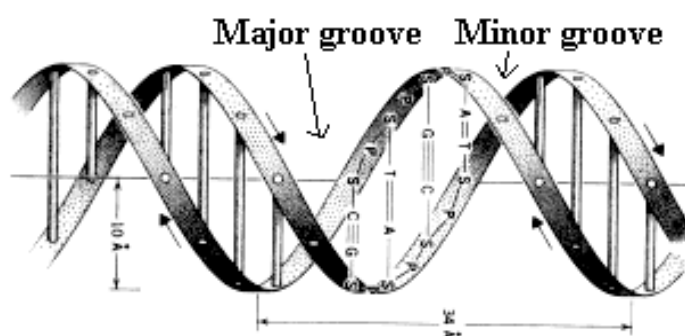


Figura 10. Estrutura da molécula de DNA mostrando as regiões superficiais da molécula e as ligações fosfodiéster entre os fosfatos e pontes de hidrogênio, entre as bases.

Quando compostos fotoativos se ligam na molécula de DNA, após serem irradiados, podem produzir espécies radiculares ou espécies ativas de oxigênio que irão interagir com as

bases podendo destruir o DNA; estes compostos também podem transferir sua energia diretamente para a molécula de DNA.

A interação com estruturas biológicas pode afetar nas características espectrais e nas probabilidades relativas dos processos de perda de energia da excitação dos FS. Foi mostrado que a interação dos FS com DNA pode induzir os seguintes efeitos:

1. Em baixas concentrações de DNA, quando a razão $[FS]/[DNA] > 1$, o DNA estimula a agregação dos FS. Por sua vez a agregação aumenta a probabilidade dos processos não radiativos de perda de energia dos FS, reduzindo drasticamente os rendimentos quânticos e os tempos de vida da fluorescência e do estado tripleto dos FS, diminuindo assim, sua fotoatividade.
2. Quando a razão $[FS]/[DNA] \approx 1$, a interação com DNA induz a desagregação dos FS, aumentando os rendimentos quânticos e os tempos de vida da sua fluorescência e do estado tripleto, aumentando sua fotoatividade.
3. Quando a razão $[FS]/[DNA] \ll 1$ a interação do FS com o DNA estimula a agregação do DNA ao redor das moléculas dos FS. A formação desses agregados diminui a probabilidade de contato das moléculas excitadas de FS com outras moléculas, em particular, com oxigênio molecular. Isto pode também reduzir sua fotoatividade.

Além disso, podem acontecer as reações diretas entre as moléculas do DNA e moléculas de FS excitadas. Todos esses fenômenos podem afetar o mecanismo e a cinética da fototransformação do FS.

2.6 Oxigênio molecular e oxigênio singleto

Como já foi citado anteriormente, uma molécula de FS no seu estado excitado tripleto pode transferir sua energia para uma molécula de oxigênio formando oxigênio singleto, que é um agente ativo responsável pelos mecanismos do tipo II no efeito fotodinâmico. O oxigênio singleto é quimicamente muito ativo, podendo reagir com diversas estruturas biológicas. Exemplos dessas reações se encontram na Figura 11.

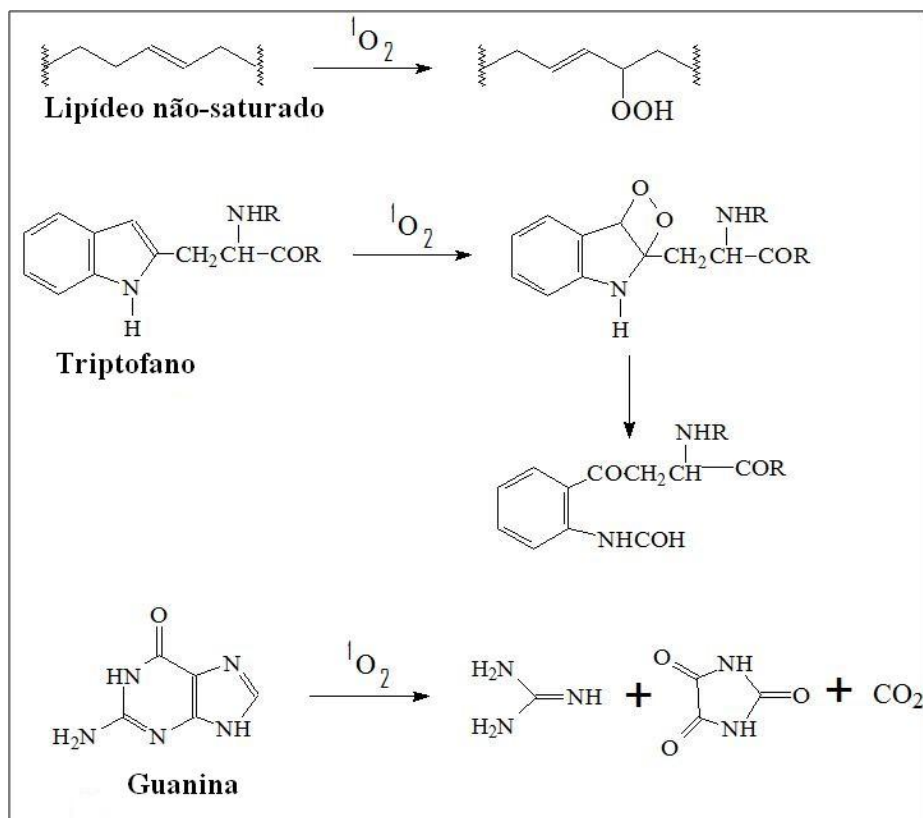


Figura 11. Reações do oxigênio singlete com moléculas biológicas.

O estado fundamental do oxigênio molecular é tripleto (3O_2), ou seja, ele possui dois elétrons não emparelhados nas duas órbitas diferentes. O oxigênio singlete (1O_2 ou $^1\Delta_g$) corresponde ao estado excitado do oxigênio molecular e possui todos os elétrons emparelhados (Figura 12). O estado $^1\Delta_g$ tem uma energia de apenas 23kcal acima do estado fundamental. A transição do estado excitado (1O_2) para o estado fundamental é proibida devido à diferença do estado de spin. Isto determina seu tempo de vida relativamente longo, que depende da natureza do ambiente. A transição $^1O_2 \rightarrow ^3O_2$ pode acontecer pela emissão de luz (fosforescência) com máximo do espectro em 1270 nm. Isto permite usar a espectroscopia de fosforescência resolvida no tempo para detectar a formação do oxigênio singlete.

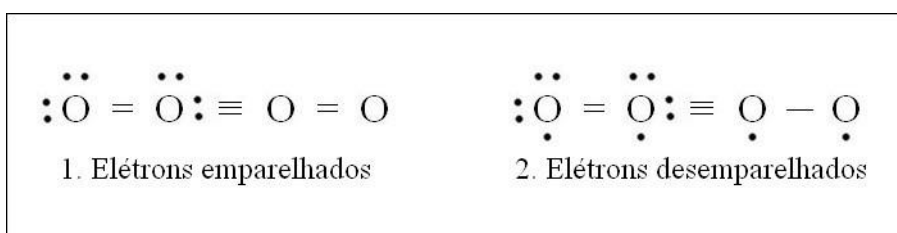


Figura 12. Estruturas de Lewis para o oxigênio molecular.

2.7 Implementação de estruturas nanoeletrônicas usando moléculas biológicas

A procura pela redução do tamanho de estruturas eletrônicas, tais como o transistor, por exemplo, fez com que muitos pesquisadores focassem suas pesquisas na manipulação de estruturas de micro- e nano escalas. Por outro lado, a natureza já controla e manipula componentes de micro- e nano escala usando o reconhecimento molecular de vários materiais biológicos, tais como DNA, RNA, proteínas, etc. Sendo assim, pesquisadores aplicaram este conhecimento para implementar nano/microestruturas usadas para detecção e diagnóstico, síntese de materiais e fabricação de novos sistemas eletrônicos (LEE et al., 2007).

O DNA é importante não apenas pela sua função genética, mas também por possuir um “esqueleto” para nanoestruturas e nanotecnologia. A utilização de moléculas de DNA em circuitos nanoeletrônicos é muito promissora. Sua auto-montagem e reconhecimento molecular possibilitam a ajuda em problemas de inter-elementos de fiação e posicionamento na escala nanométrica (RAKITIN et al., 2001). Além disso, sua estrutura em dupla-hélice o torna um bom candidato para o transporte de cargas em uma dimensão e a longas distâncias (200 nm) (GU et al., 2002; AICH et al., 1999).

Corantes orgânicos, ligados na superfície ou intercalados dentro da estrutura de DNA, quando excitados podem ser utilizados como doadores de elétrons, formando uma cadeia de condutividade (semicondutores orgânicos). Deste ponto de vista se tornam importantes os estudos da fototransformação destes corantes na sua interação com DNA.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é estudar a cinética das fototransformações do corante Acridina Laranja, produzidas pela ação da luz visível, na sua interação com DNA e surfactante carregado negativamente SDS, em função da sua própria concentração e concentrações do DNA e SDS, na presença e na ausência de oxigênio molecular. O alvo principal desse estudo foi verificar a ocorrência de fototransformação das moléculas na sua interação com sistemas biológicos micro/nanorganizados, acompanhada com a perda da sua fotoatividade, tendo em vista esclarecer o mecanismo de ação deste corante na sua aplicação em fotomedicina e nanofotoeletrônica.

4. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

Este capítulo aborda uma base científica para o entendimento dos procedimentos experimentais utilizados neste trabalho.

4.1 Espectroscopia de absorção óptica

Quando uma onda eletromagnética encontra uma molécula, ela pode ser espalhada (sua direção de propagação muda) ou pode ser absorvida (sua energia é transferida à molécula). A probabilidade relativa da ocorrência de cada processo é uma propriedade particular da molécula encontrada. Se a energia eletromagnética da luz é absorvida, a molécula é dita estar excitada ou em um estado excitado. A probabilidade de absorção, para uma molécula, num único comprimento de onda da luz incidente é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar para aquele comprimento de onda ($\epsilon(\lambda)$). Isto é mais facilmente definido em termos de como ele é medido. Se a luz de intensidade I_0 passa através de uma substância (que pode estar em solução) de espessura l e concentração molar C , a intensidade I da luz transmitida obedece à lei de *Beer-Lambert*:

$$I = I_0 10^{-\epsilon l C} \quad (15)$$

ou

$$\log(I / I_0) = -\epsilon l C \quad (16)$$

A quantidade $\log(I/I_0)$ é chamada de absorbância (A) e, assim, temos a forma mais conhecida da lei de *Beer-Lambert*:

$$A = \epsilon l C \quad (17)$$

O aparelho utilizado para medidas de absorção é o espectrofotômetro. Este aparelho consiste de uma fonte emissora de luz branca e através de um monocromador são selecionados comprimentos de onda definidos. O feixe de certo comprimento de onda incide sobre uma amostra e um sensor (que pode ser uma fotomultiplicadora ou um fotodiodo, entre outros) registra a intensidade de luz que atravessa a amostra.

4.2 Espectroscopias de fluorescência e fosforescência

A luminescência molecular é formalmente dividida em fluorescência e fosforescência, dependendo da natureza do estado excitado envolvido no processo. Se o estado excitado envolvido é singlete, no qual o spin do elétron no orbital excitado mantém sua orientação original, tem-se a fluorescência (Figura 13). Por outro lado, na fosforescência, a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado é invertida (estado excitado tripleto, T_n) (LAKOWICZ, 1999).



Figura 13. Representação do estado fundamental e dos estados singlete e tripleto.

Em consequência da retenção da orientação original, o retorno de uma população que se encontra no estado excitado singlete para o estado fundamental (que tem caráter singlete) é permitido e ocorre muito rapidamente, com tempo de vida na ordem de nanossegundos. A fosforescência, sendo um processo proibido pela regra de seleção de spin, tem tempo de vida muito mais longo (na faixa de microssegundos até minutos) e isso varia em função da temperatura e do ambiente onde a molécula se encontra.

As medidas de fluorescência e de fosforescência baseiam-se no registro de fótons emitidos pela amostra que acompanha o decaimento de um átomo ou molécula eletronicamente excitado para o estado fundamental.

A espectroscopia de fluorescência é muito sensível, já que no estado excitado os cromóforos são geralmente mais reativos do que no estado fundamental e, portanto, as perturbações físicas e químicas exercem uma grande influência sobre a emissão fluorescente e suas propriedades correlacionadas.

Geralmente, deseja-se obter tanto o espectro de excitação como o de emissão. Um espectro de emissão é a distribuição do comprimento de onda de emissão, medida com um

comprimento de onda constante de excitação. Inversamente, um espectro de excitação é a dependência da intensidade de emissão em um simples comprimento de onda (de maneira geral, o comprimento de excitação).

Medidas de fluorescência e fosforescência podem ser realizadas de forma contínua e com resolução temporal. A seguir, seguem as descrições de tais medidas.

4.2.1 Espectroscopias contínuas de fluorescência e de fosforescência

As espectroscopias contínuas utilizam um aparelho chamado espectrofluorímetro. Este aparelho possui uma fonte de luz contínua que produz um amplo espectro de energia. O feixe produzido pela fonte atinge o monocromador de excitação que transmite luz seletivamente em um estreito intervalo centrado em um comprimento de onda específico. A luz transmitida passa através de fendas ajustáveis que controlam a magnitude e a resolução, limitando a luz transmitida. A luz filtrada passa no centro da amostra originando emissão das moléculas da amostra. A luz emitida pela amostra entra no monocromador de emissão, posicionado a um ângulo de 90° do caminho da luz de excitação para eliminar o sinal de fundo e minimizar ruídos devido à luz que não foi absorvida. A luz emitida é então transmitida em um comprimento de onda específico e sai através de fendas ajustáveis, entrando, finalmente, no tubo fotomultiplicador onde o sinal é amplificado e é criada uma voltagem proporcional à intensidade emitida.

4.2.2 Espectroscopias contínuas de fluorescência e de fosforescência com resolução temporal

O tempo de vida de fluorescência (fosforescência) de uma substância geralmente representa um valor médio do tempo que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental. Medidas do tempo de vida podem revelar a taxa de transferência de energia e a taxa de reações no estado excitado, assim como revelar detalhes sobre as interações das moléculas com sua vizinhança. Como os tempos de vida de fluorescência e de fosforescência se encontram na faixa de nano- ou microssegundos, respectivamente, torna-se necessário o uso de dispositivos de alta velocidade e detectores adequados. Existem três métodos amplamente usados para medir tempos de vida: o método de

pulsos, o método estroboscópico e o método harmônico ou de modulação de fases. Neste trabalho, foi utilizado o método de pulsos, em que a amostra é excitada com um pulso de luz extremamente curto e é medido o intervalo de tempo transcorrido entre a absorção do pulso da luz incidente e a emissão de um fóton de fluorescência (fosforescência). Este método está escrito mais detalhadamente no próximo capítulo.

4.2.2.1 Medidas da cinética de decaimento do estado S_1

Considere a excitação de um fluoróforo com um pulso de luz infinitamente curto, resultando em uma população inicial (N_0) de fluoróforos no estado excitado. A taxa de decaimento da população inicialmente excitada é:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_{fl} + k_{CI} + k_{CIS})N(t) \quad (18)$$

em que $N(t)$ é o número de moléculas excitadas em um tempo t seguinte a excitação; k_{fl} é a constante radiativa e as não-radiativas (k_{CI} e k_{CIS}) são as constantes de perda de energia por fluorescência, conversão interna e por cruzamento intersistêmico, do estado S_1 para o estado T_1 . Sendo $N(t) = N_0$ em $t = 0$, a integração da equação (18) nos dá:

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau} \quad (19)$$

em que $\tau = (k_{fl} + k_{IC} + k_{CIS})^{-1}$ é o tempo de vida do estado excitado. Como consequência, esperamos que a intensidade de fluorescência $F(t)$, que é proporcional à população no estado excitado [$F(t) = g N(t)$], decaia exponencialmente.

4.2.3 Medidas do perfil de fosforescência do oxigênio singleto

Um dos métodos amplamente usados para determinar o rendimento quântico e o tempo de vida do estado 1O_2 ($^1\Delta_g$) do oxigênio molecular é medir sua fosforescência. O estado 1O_2 emite fosforescência na região do infravermelho, com máximo característico em 1270 nm.

O estado T_1 do AL suprimido pelo oxigênio molecular pode incluir outros mecanismos além de transferência de energia, tais como transferência de elétrons, que resulta na formação do ânion superóxido $\bullet O_2^-$.

Neste caso, a taxa de decaimento do estado tripleto é expressa pela seguinte equação:

$$\frac{d[T]}{dt} = -k_0[T] - (k_{q\Delta} + k_{q1})[T][O_2] = (-k_0 + k_q[O_2])[T] \quad (20)$$

em que k_0 é a constante de decaimento do tripleto na ausência de O_2 , k_q é a constante de supressão do estado tripleto do AL devido a transferência de energia com a formação do oxigênio singleto e k_{q1} é a constante da supressão do tripleto pelo oxigênio através de outros mecanismos.

A taxa de geração do 1O_2 é:

$$\frac{d[^1O_2]}{dt} = k_{q\Delta}[T][O_2] - k_{1O_2}[^1O_2] \quad (21)$$

em que k_{1O_2} é a constante de decaimento do 1O_2 .

A concentração do estado tripleto do fotossensibilizador em função do tempo é:

$$[T] = [T_0]e^{-t(k_0 + k_q[O_2])} \quad (22)$$

Uma vez que a concentração de $[O_2]$ é aproximadamente 10 vezes maior que do fotossensibilizador, podemos considerar $[O_2]$ constante nessa equação. Sendo assim, a concentração do oxigênio singleto pode ser escrita como:

$$[^1O_2] = \frac{k_{q\Delta}[T_0][O_2]}{k_{1O_2} - (k_0 + k_q[O_2])} \{ e^{-t(k_0 + k_q[O_2])} - e^{-tk_{1O_2}} \} \quad (23)$$

A primeira exponencial está associada à formação de $^1\text{O}_2$ devido à transferência de energia do tripleto para o oxigênio molecular, e a segunda reflete o decaimento de $^1\text{O}_2$ pela emissão da fosforescência.

A intensidade do máximo do espectro de fosforescência do $^1\text{O}_2$ ($I_{1\text{O}_2}$) é proporcional à sua concentração:

$$I_{1\text{O}_2} = K[{}^1\text{O}_2] \quad (24)$$

em que K é um coeficiente que leva em conta as características de equipamento. Substituindo a equação anterior de $^1\text{O}_2$ nesta, teremos:

$$I_{1\text{O}_2} = K \frac{k_{q\Delta}[T_0][\text{O}_2]}{k_{1\text{O}_2} - (k_0 + k_q[\text{O}_2])} \{ e^{-t(k_0 + k_q[\text{O}_2])} - e^{-tk_{1\text{O}_2}} \} \quad (25)$$

Excitando o fotossensibilizador através de um pulso de luz curto e intenso obtém-se uma curva e realizando o ajuste, calcula-se os tempos de acumulação e de decaimento do $^1\text{O}_2$. Do mesmo experimento obtém-se o rendimento quântico de formação do $^1\text{O}_2$:

$$\phi_{1\text{O}_2} = \frac{\int I_{1\text{O}_2}}{I_{abs}} \quad (26)$$

em que I_{abs} é a intensidade da luz absorvida pela amostra.

Aplicando o método com uma amostra padrão, o rendimento quântico de formação do $^1\text{O}_2$ pode ser obtido como:

$$\phi_{1\text{O}_2} = \frac{(1 - 10^{-A^P}) \int I^{A_{1\text{O}_2}}}{(1 - 10^{-A^A}) \int I^{P_{1\text{O}_2}}} \phi^{P_{1\text{O}_2}} \quad (27)$$

em que os índices A e P referem-se a amostra e padrão, respectivamente.

4.3 Espectroscopia de Espalhamento de Ressonância da Luz (ERL)

Esse método está baseado no fenômeno do aumento de espalhamento Rayleigh da luz próximo à região de absorção ótica da amostra (BORISSEVITCH et al., 1997).

Quando a energia eletromagnética passa dentro de uma amostra, ela pode ser espalhada. O espalhamento aparece pela interação entre o campo elétrico da onda, elétrons e núcleos das moléculas. Na teoria clássica, a onda produz vibrações dos elétrons da molécula que, por sua vez, emitem energia em todas as direções.

A intensidade da energia espalhada se determina pela equação de Rayleigh:

$$I_{esp} = A I_{in} (n_o^4 C V^2) / (\lambda^4) \frac{n^2 - n_0^2}{n^2 + n_0^2} (1 + \cos^2 \Theta) \quad (28)$$

em que A é coeficiente de proporção, I_{in} é a intensidade da luz incidente, I_{esp} é intensidade da luz espalhada, n_o é o índice de refração do ambiente onde a molécula se encontra, n é o índice de refração da molécula espalhadora junto com camadas de solvatação, C a é concentração de moléculas espalhadoras, V é o volume da partícula da molécula espalhadora junto com camadas de solvatação e $\lambda = \lambda_{in} = \lambda_{esp}$ é o comprimento de onda da luz incidente e espalhada.

Formalmente, no caso de solução homogênea:

$$n = n_0; I_{esp} = 0 \quad (29)$$

Se existem variações do n (solução heterogênea):

$$n \neq n_0; I_{esp} \neq 0 \quad (30)$$

Mas, em soluções homogêneas sempre existem também variações da densidade pelo movimento térmico das moléculas e, por isso, sempre aparecem flutuações locais do n_0 que produzem o espalhamento.

Na presença da absorção ótica dois efeitos aparecem:

1. Diminuição da intensidade de luz incidente e da espalhada pela absorção ótica de solução;
2. Crescimento da intensidade de luz espalhada pelo aumento do índice de refração de moléculas espalhadoras, quando o comprimento de onda da luz espalhada se aproxima do

comprimento de onda do máximo de absorção da molécula. Esse efeito se chama **“Espalhamento de ressonância da luz”**.

$$n^2 = I + K \left(\frac{\lambda_{máx}^2 \lambda^2}{\lambda_{máx}^2 - \lambda^2} \right) \quad (31)$$

em que K é um coeficiente de proporção, $\lambda_{máx}$ é o comprimento de onda do máximo de absorção e λ é o comprimento de onda da luz espalhada

$$\lambda \rightarrow \lambda_{máx} ; n^2 \rightarrow \infty \quad (32)$$

$$\frac{n^2 - n_0^2}{n^2 + n_0^2} \rightarrow 1 \quad (33)$$

Na teoria clássica esse efeito se explica pelo efeito de ressonância entre a frequência da onda incidente e a frequência própria das oscilações dos elétrons dentro da molécula.

Tendo em vista que a intensidade de espalhamento é proporcional à concentração e ao quadrado do volume das partículas espalhadoras, podemos concluir que, para os agregados, a intensidade deve ser proporcional ao número de agregação.

Assim:

$$I_{erl} = K V_{ag}^2 C_{ag} = K C_{ag} V^2 n^2 = K (C/n) V^2 n^2 = K C V^2 n = K_1 C n \quad (34)$$

em que K e K_1 são os coeficientes de proporcionalidade, n é o número médio de agregação, C_{ag} é a concentração de agregados, C é a concentração de monômeros, V é o volume do monômero e $V_{ag} = (V n)$ é o volume médio de agregados. Podemos ver que esse método pode ser usado para estudos de agregação e avaliação do número médio de agregação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Preparação das amostras

O corante Acridina Laranja foi obtido da *Sigma Aldrich*. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e as soluções foram preparadas em água purificada com sistema “Milli-Q”. As concentrações de AL foram determinadas através do coeficiente de absorção molar determinado experimentalmente (seção 5.2).

Foi também preparada uma solução estoque de SDS. A partir dela foi possível estudar a interação do corante com as micelas.

Para o estudo da interação do AL com DNA, foi utilizado DNA de timo de bezerro (*Worthington Biochemical Co (USA)*). Os experimentos com DNA foram feitos com tampão fosfato, em pH 6.8. O tampão consiste de NaH_2PO_4 (5.0 mM) e Na_2HPO_4 (2.5 mM) dissolvidos em água “Milli-Q”. A solução estoque de DNA foi preparada um dia antes do experimento e mantida a 4°C. A concentração de DNA foi obtida através do coeficiente de absorção molar $\epsilon_{260\text{ nm}} = 1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, determinado em pares de bases (PASTERNAK et al, 1993). A partir dessa solução estoque de DNA foram preparadas soluções de DNA e AL, em diferentes concentrações, para verificar suas interações.

5.2 Cálculo do coeficiente de absorção molar do AL

Para o cálculo do coeficiente de absorção molar do corante AL, utilizamos uma solução estoque de AL em água e, a partir dela, preparamos soluções em diferentes concentrações, chegando a concentrações bem baixas para excluir a influência das interações entre as moléculas e formação dos agregados do AL (excluindo essas interações, a dependência entre a absorbância e a concentração deve ser linear). Traçamos então um gráfico do pico de absorção (A) de cada solução em função da concentração de cada uma (Figura 14). Pela equação $A = \epsilon l C$, podemos verificar que o gráfico de $A \times C$ é uma reta que passa pela origem e o coeficiente angular desta reta nos fornece o valor do coeficiente de absorção molar ϵ .

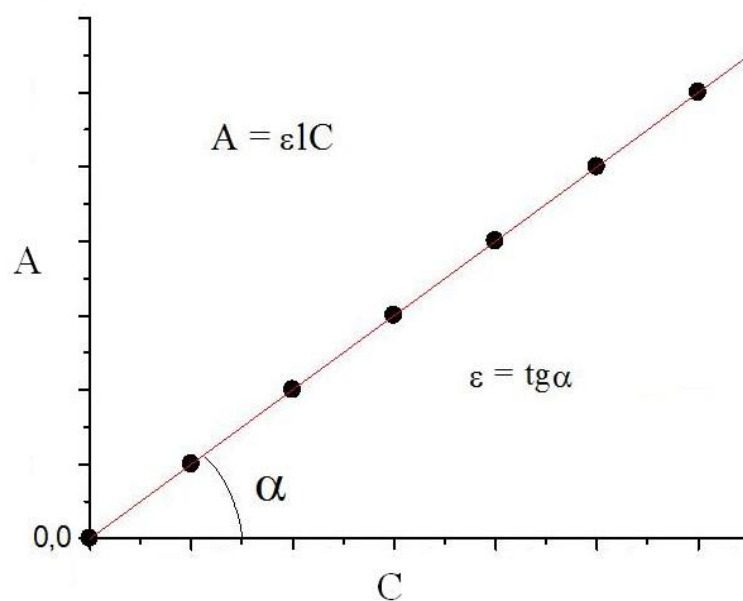


Figura 14. Gráfico demonstrativo da absorvância em função da concentração para o cálculo do coeficiente de absorção molar.

Devido à grande divergência dos valores do coeficiente de absorção molar do corante AL encontrados na literatura (GURRIERI et al, 1996, MAKAROV, 2006) decidimos determiná-lo neste trabalho. O valor médio obtido através de quatro experimentos independentes foi $\epsilon_{490} = 38750 \pm 2618 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Este valor se aproxima mais do valor encontrado por MAKAROV. Para experimentos com DNA, em que o AL foi preparado em solução tampão, também foi feito o cálculo do coeficiente de absorção molar. O valor encontrado foi $\epsilon_{490} = 35153 \pm 4495 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se compararmos os dois resultados, podemos observar que ambos estão bem próximos. Por motivo de convenção, utilizamos para todos os cálculos de concentração o valor calculado em água.

5.3 Espectroscopia de absorção

Neste trabalho usamos a técnica de espectroscopia de absorção para a análise do comportamento do corante AL em soluções aquosas e na presença de DNA e SDS, variando a concentração dos compostos. Também foi utilizada esta técnica nos estudos da cinética de fototransformação do AL em soluções aquosas e na presença de DNA e SDS, em função do

tempo de irradiação. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro *Beckman Coulter™ DU@640*, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de espessura.

5.4 Espectroscopias de Fluorescência e de Fosforescência

5.4.1 Espectroscopia contínua de fluorescência

As medidas de fluorescência estática foram realizadas em um espectrofluorímetro *Hitachi F-7000*, com uma lâmpada de xenônio de 150W, como fonte de luz. Foram realizadas medidas dos espectros de emissão de fluorescência e de excitação. O comprimento de onda de excitação utilizado para medidas dos espectros de emissão foi 462 nm. Já, o comprimento de onda de emissão utilizado para medidas dos espectros de excitação foi 550nm.

5.4.2 Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal

Os experimentos de fluorescência com resolução temporal foram realizados empregando um sistema baseado no método de correlação temporal de fótons únicos (*Time-correlated single photon counting - TCSPC*). A fonte de excitação é um laser pulsado *Tsunami 3950* (da *Spectra Physics*) de titânio-safira (*Ti:sapphire*) bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs* (*Spectra Physics*). No método de pulsos, que utilizamos neste trabalho, a amostra é excitada com um pulso de luz extremamente curto e é medido o intervalo de tempo transcorrido entre a absorção do pulso da luz incidente e a emissão de um fóton de fluorescência (fosforescência). Repetindo esta medida várias vezes será construído um histograma, cujo perfil reflete o perfil da intensidade da fluorescência (fosforescência) em função do tempo.

O laser de estado sólido tem uma saída de potência máxima de 10W no comprimento de onda de 532 nm. Ele é bombeado por um diodo *FCbar™*. O meio de ganho é o *Nd:YVO₄*. O cristal dobrador é de triborato de lítio (LBO), com tecnologia QMAD.

A frequência de pulsos gerada no *Tsunami* foi ajustada por um *Pulse Picker 3986* (*Spectra Physics*). A saída do laser é dada entre 850 e 930 nm. O comprimento de onda pode ser escolhido com o auxílio de geradores de harmônicos, como o *Flexible Harmonic Generator* (FHG), da *Spectra Physics*, que podem dobrar ou triplicar a frequência. O pulso de

excitação é direcionado para o espectrômetro *Edinburgh FL900*, com configuração em formato de L. O comprimento de onda de emissão é selecionado por um monocromador e os fótons emitidos são detectados por uma fotomultiplicadora refrigerada *Hamamatsu/C4878/* e são correlacionados temporalmente com os pulsos de excitação por meio de um conversor tempo-amplitude. A largura à meia altura da função da resposta do instrumento é tipicamente 0,2 a 0,5 ns. As medidas foram feitas com uma resolução temporal de 24ps por canal. O *software F900*, fornecido pela *Edinburgh Instruments*, foi utilizado para análise inicial dos dados de decaimento. A inspeção do ajuste dado pelo *software* foi feita pela observação dos gráficos dos resíduos e do parâmetro estatístico χ^2 (*qui-square*) reduzido.

Neste trabalho, esta técnica foi utilizada para estudar a cinética de decaimento do estado S_1 do AL na sua interação com DNA e SDS.

5.4.3 Medidas do perfil de fosforescência do oxigênio singlete

Nos experimentos de detecção do oxigênio singlete utilizou-se um sistema laser pulsado *Nd-YAG*, da *Continuum*, modelo *Surelite I-10*, pulso de 8 ns e frequência de repetição de 10 Hz. O equipamento (Figura 15) foi ajustado para utilização do terceiro harmônico, como fonte de excitação em 355 nm. A potência de trabalho utilizada foi de 30 mW por pulso, determinada a partir de um *power meter (Field Master of Coherent)* com uma cabeça de detecção de modelo *L-30V* alinhado ao receptáculo de amostra. Para leitura do espectro UV-vísivel foi utilizada uma lâmpada de tungstênio/halogênio de 400W. Os decaimentos do tipo exponencial foram detectados a partir de um monocromador *M300*, da *Bentham Instruments* acoplado a um detector fotovoltaico *Hamamatsu* modelo *R928P*. Os sinais foram então convertidos a partir de um osciloscópio digital *Tetronix TDS 340A* ligado diretamente ao microcomputador e, então, processado e analisado utilizando-se o software operacional da *Edinburg Analytical Instruments*. Para determinação dos decaimentos de fosforescência do 1O_2 em 1270 nm, utilizou-se um detector de fotodiodo de germânio modelo 823^a, da *North Coast Scientific Corporation*, operando à 77K. Adaptou-se um filtro de silício e uma lente converte como anteparos a íris da multiplicadora para excluir qualquer sinal residual de fluorescência para comprimentos de onda de emissão inferiores a 800 nm.

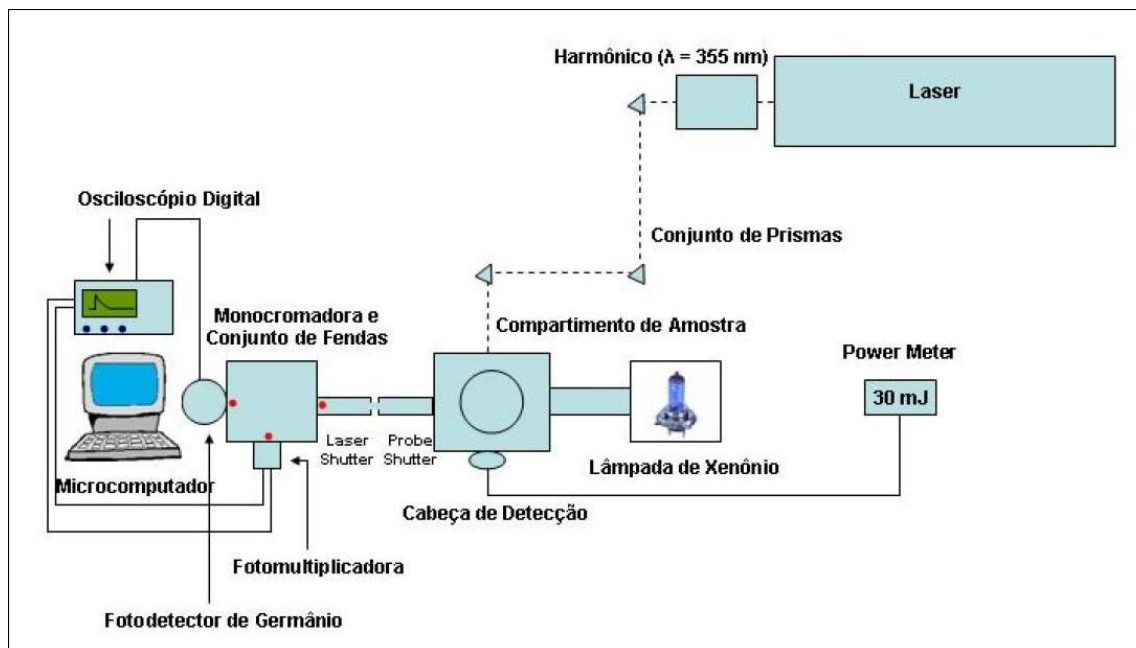


Figura 15. Representação esquemática do sistema laser pulsado Nd-YAG.

Neste trabalho esta técnica foi usada para obter a cinética de acumulação e de decaimento do oxigênio singlete formado pela transferência de energia do estado T_1 do AL para o O_2 . Para estas análises foram preparadas amostras de AL em soluções homogêneas e soluções de AL com DNA e SDS. As soluções foram saturadas com oxigênio durante um intervalo de 20 minutos, em constante agitação.

5.5 Medidas da cinética de fototransformação do AL

Para medir as cinéticas de fototransformação do AL, as amostras foram irradiadas com uma lâmpada de xenônio RLO XBO 75W / 2 – OSRAM acoplada a um filtro com um espectro de transmissão $\lambda \geq 410\text{nm}$ (Figura 16). A intensidade da luz branca foi de 550 mW/cm^2 e, na faixa $490 \pm 2 \text{ nm}$, a intensidade foi 40 mW/cm^2 . Para evitar efeitos de aquecimento da amostra, uma cubeta de quartzo de espessura 1 cm preenchida com água foi posicionada entre a fonte da irradiação e da amostra.

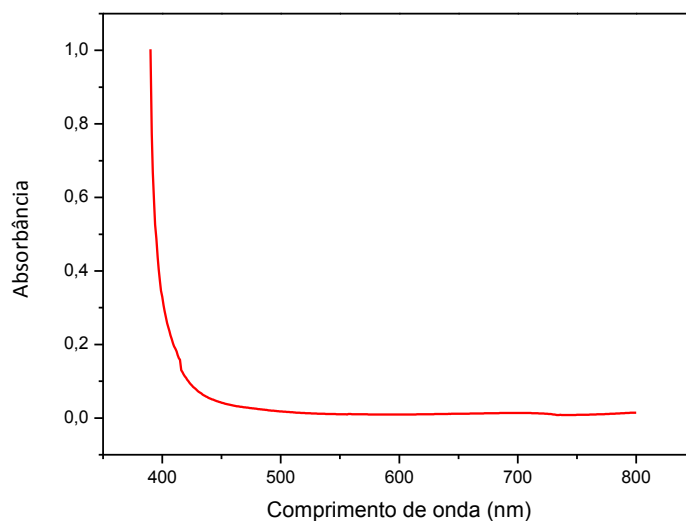


Figura 16. Espectro de absorção do filtro com transmissão $\lambda \geq 410\text{nm}$.

A cinética de fotodecomposição foi medida através do monitoramento dos espectros de absorção das amostras em função do tempo da irradiação. Os intervalos de tempo de cada irradiação variaram de acordo com a velocidade de decaimento da banda de absorção. Os espectros de absorção foram monitorados com espectrofotômetro *Beckman-Counter DU-640*, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de espessura.

Para verificar o efeito do oxigênio molecular, foram preparadas amostras desoxigenadas, obtidas com a inserção de nitrogênio comprimido durante um intervalo de tempo de aproximadamente 10 minutos, em constante agitação.

5.6 Medidas de espalhamento de ressonância da luz

Neste trabalho, utilizamos a técnica de espalhamento de ressonância da luz para verificar a formação de agregados do AL na sua interação com SDS. O aparelho utilizado foi o espectrofluorímetro *Hitachi F-7000* em regime de varredura sincrônica dos monocromadores de excitação e de emissão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Estudos espectroscópicos do AL e da dinâmica de sua fototransformação em soluções aquosas homogêneas

6.1.1 Espectros de absorção óptica e de fluorescência

A partir de soluções de diferentes concentrações de AL em soluções aquosas, realizamos medidas de absorção óptica a fim de verificar o seu comportamento. Os espectros desses experimentos estão apresentados na Figura 17(A) e a razão entre as absorbâncias dos dois picos (em 475 nm e 490 nm), pode ser visualizada na Figura 17(B).

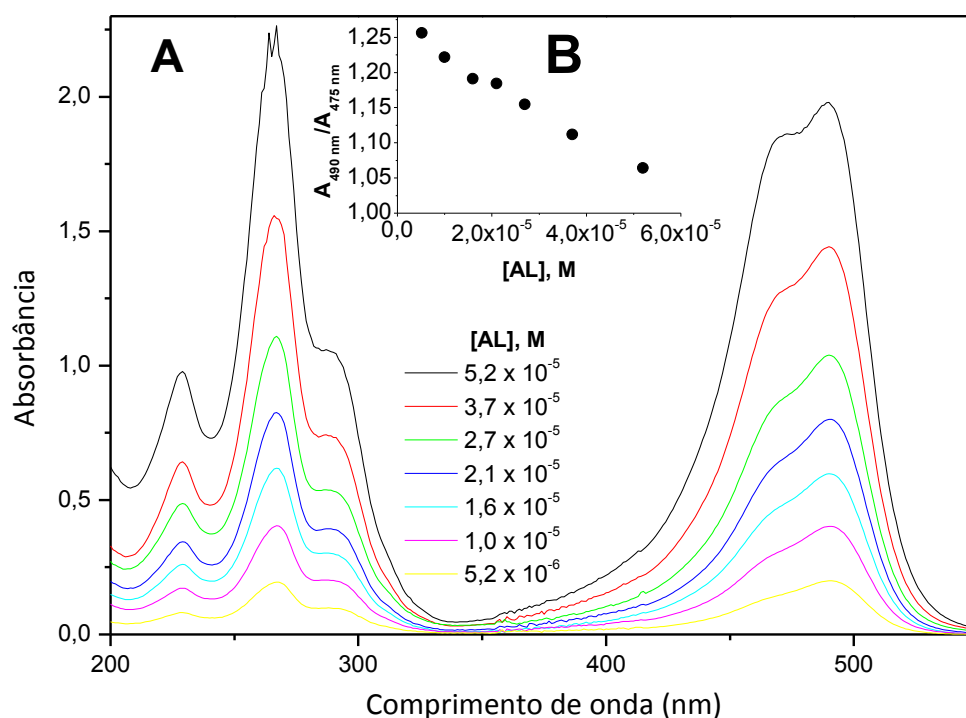


Figura 17. (A) Espectros de absorção óptica do AL em diferentes concentrações em soluções aquosas; (B) Razão entre as absorbâncias do espectro de absorção do AL em comprimentos de onda 490 nm (A_{490}) e 475 nm (A_{475}), em função da sua concentração, em soluções aquosas.

Podemos ver que o perfil dos espectros depende da concentração do AL. Assim, a absorção do ombro em $\lambda = 475$ nm relativamente aumenta em relação à absorção do pico em $\lambda = 490$ nm. O crescimento relativo da absorção em $\lambda = 475$ nm está associado na literatura com a formação de agregados do AL (OHTSU; NISHIDA; TSUDA, 1975) que por sua vez, apesar de ser bem solúvel em água, possui também certa hidrofobicidade, devido ao sistema desenvolvido de conjugação π na sua estrutura.

Os espectros de excitação e emissão de fluorescência do AL em água estão apresentados nas Figuras 18 (A) e (B), juntamente com a curva da cinética de decaimento de fluorescência (Figura 18 (C)).

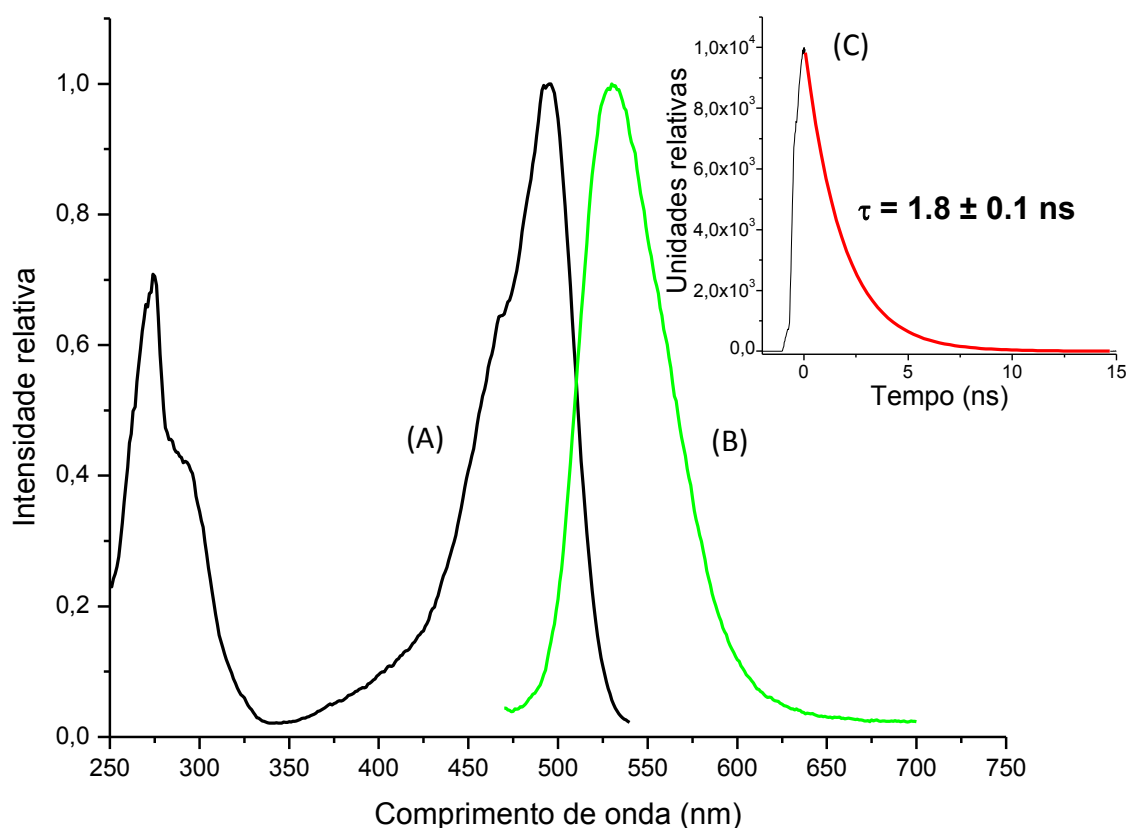


Figura 18. (A) Espectro de excitação de fluorescência do AL em água (B) Espectro de emissão da fluorescência do AL em água (C) Curva da cinética de decaimento da intensidade da fluorescência do AL em água.

O espectro de excitação apresenta um pico em 495nm, sendo este um valor bem próximo ao pico de absorção do corante (490nm), como já era de se esperar. O valor máximo da intensidade de fluorescência é em torno de 530nm.

6.1.2 Dinâmica de fototransformação

A irradiação das soluções homogêneas do AL com luz visível induz mudanças nos seus espectros de absorção, indicando a transformação do AL estimulada pela luz.

A fototransformação do AL foi estudada em função da concentração do corante. Para experimentos de AL em soluções aquosas, foram estudadas cinco diferentes concentrações,

sendo elas: $5,2 \times 10^{-5}M$, $3,9 \times 10^{-5}M$, $2,1 \times 10^{-5}M$, $1,0 \times 10^{-5}M$ e $5,2 \times 10^{-6}M$. Para cada medida, foram variados os tempos de irradiação de acordo com a velocidade de decaimento das bandas. As medidas de fotólise foram feitas na presença e na ausência de oxigênio molecular.

Nas Figuras 19 e 20, temos os espectros de absorção do AL ($3,9 \times 10^{-5}M$) em função do tempo de irradiação, na presença e na ausência de oxigênio molecular, respectivamente.

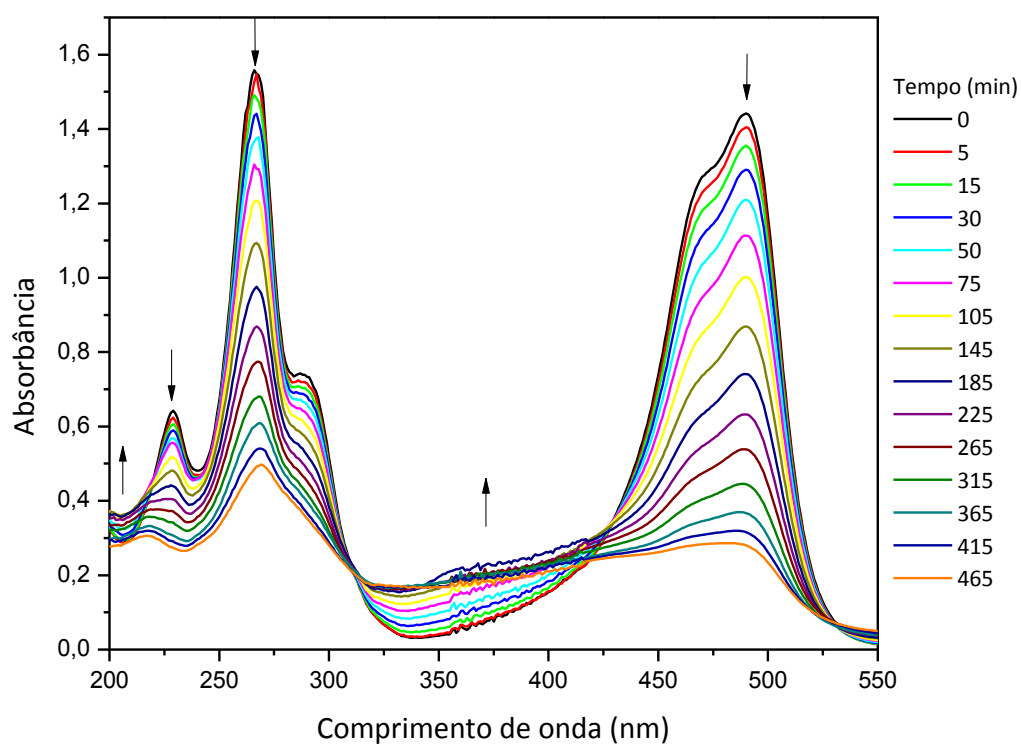


Figura 19. Espectros de absorção óptica do AL $3,9 \times 10^{-5}M$ na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.

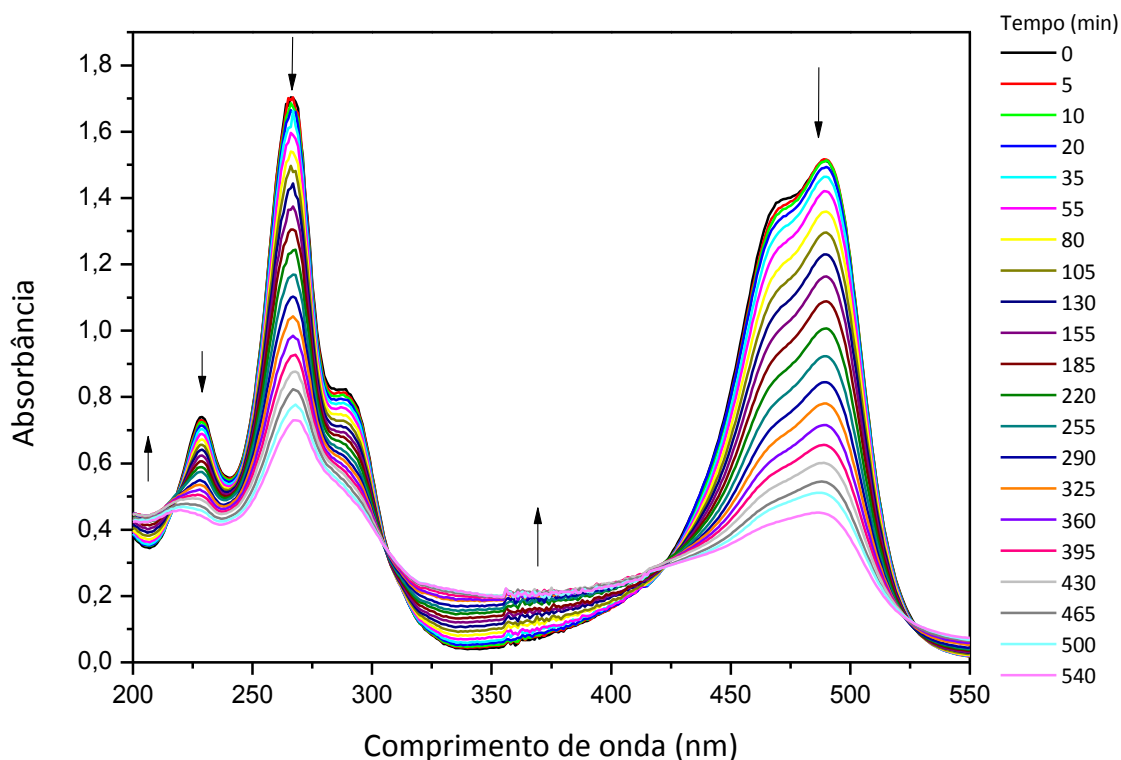


Figura 20. Espectros de absorção ótica do AL $3,9 \times 10^{-5} M$ na ausência de O_2 , em função do tempo de irradiação.

Observamos que o AL sofre fototransformação sob a ação da luz visível e isto foi observado para todas as concentrações estudadas. Observando os espectros nota-se também a presença de pontos isobésticos em torno de 310 e 420nm. Pontos isobésticos são intersecções múltiplas de uma família de curvas de absorção. Sua natureza é a seguinte: a absorção contínua (A) da solução durante a fototransformação de um composto é:

$$A = A_{AL} + A_{FP} = \varepsilon_{AL}C_{AL}L + \varepsilon_{FP}C_{FP}L \quad (35)$$

em que ε_{AL} e ε_{FP} são os coeficientes de absorção molar e C_{AL} e C_{FP} são as concentrações do AL e do fotoproduto, respectivamente, e L é o caminho óptico da amostra.

Mas $C_{AL} + C_{FP} = C_0$, que é a concentração inicial do AL (ou seja, antes da fotólise). Por isso:

$$A = \varepsilon_{AL}(C_0 - C_{FP})L + \varepsilon_{FP}C_{FP}L = \varepsilon_{AL}C_0L + (\varepsilon_{FP} - \varepsilon_{AL})C_{FP}L = A_0 + (\varepsilon_{FP} - \varepsilon_{AL})C_{FP}L \quad (36)$$

em que A_0 é a absorbância inicial da amostra (antes da fotólise). Em um comprimento de onda no qual $\varepsilon_{FP} = \varepsilon_{AL}$, temos que: $A = A_0$ e, assim, podemos dizer que não há mudança da absorção durante a fotólise. Assim, neste comprimento de onda aparece um ponto isobéptico que indica que somente duas espécies estão presentes dentro da amostra: AL e seu único fotoproduto. Se durante a fotólise se forma mais um produto, o ponto isobéptico não pode existir. Podemos considerar assim a formação de somente um produto durante a fotólise do AL nas soluções homogêneas.

A partir desses espectros, foram construídas curvas normalizadas de decaimento da absorbância do AL (em $\lambda=490$ nm) para todas as concentrações estudadas, em função do tempo de irradiação (Figura 21 e Figura 22):

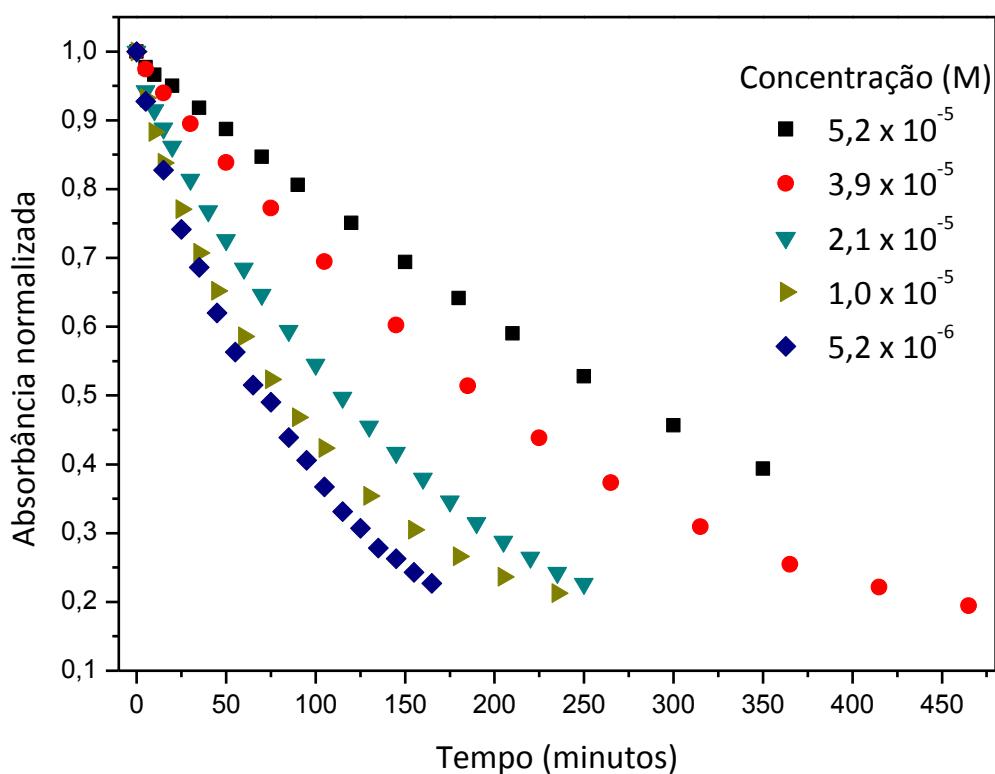


Figura 21. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda=490$ nm do monômero do AL na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

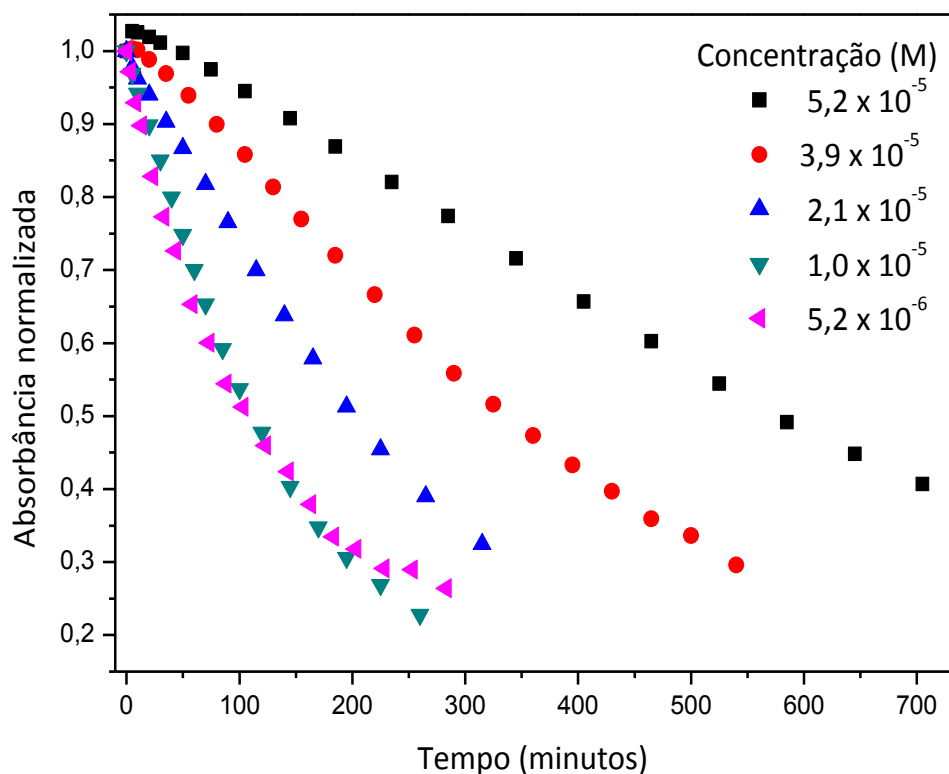


Figura 22. Decaimento da absorvância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 490$ nm do monômero do AL na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

A análise das curvas mostra que todas elas possuem caráter mono-exponencial (segundo um exemplo na Figura 23), ou seja, os perfis das curvas obtidas podem ser descritos pela equação:

$$A = A_0 e^{-t/\tau} \quad (37)$$

em que A é a absorção contínua, A_0 é a absorção inicial, t é o tempo de irradiação e τ é o tempo característico de decaimento da absorvância (tempo de clareamento).

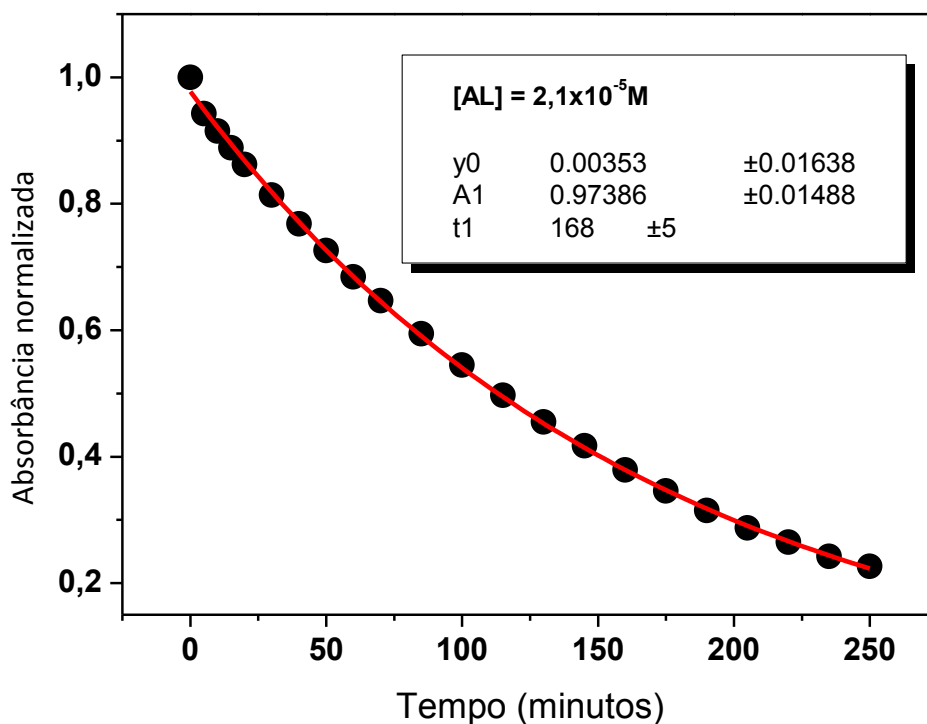


Figura 23. Ajuste monoexponencial da curva de decaimento $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 490$ nm do monômero do Acridina Laranja na concentração inicial $2,1 \times 10^{-5}$ M na presença de oxigênio, em função do tempo de irradiação.

Sabendo-se que a absorbância está relacionada com a concentração do composto pela equação (17), e substituindo a mesma na equação que descreve as curvas, teremos:

$$\varepsilon[AL]l = \varepsilon[AL_0]l e^{-t/\tau} \quad (38)$$

Assim, obtemos a equação (37) escrita em função da concentração do corante:

$$[AL] = [AL_0] e^{-t/\tau} \quad (39)$$

Derivando-se a equação (39) em relação ao tempo, obtemos:

$$V = \frac{d[AL]}{dt} = -\frac{[AL_0]}{\tau} e^{-t/\tau} \quad (40)$$

em que V é a velocidade de fototransformação em mol/tempo.

E assim, a velocidade inicial da fotólise (com $t = 0$) é dada por:

$$V_0 = -\frac{[AL_0]}{\tau} \quad (41)$$

Assim a velocidade inicial de fototransformação depende da concentração inicial do AL. Entretanto, a razão entre a velocidade inicial de fototransformação do corante em relação à concentração inicial do mesmo é uma constante que não depende da concentração inicial:

$$\frac{V_0}{[AL_0]} = \frac{1}{\tau} = k \quad (42)$$

em que τ e k são, respectivamente, o tempo característico e a constante característica de velocidade da fotólise, para dada concentração inicial do corante.

Os valores de τ , apresentados na Tabela 1, mostram que o tempo característico de clareamento diminui quando diminuimos a concentração do AL, ou seja, o AL se transforma mais rapidamente quando sua concentração é menor.

Tabela 1. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise do Acridina Laranja em solução aquosa (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

[AL] (M)	τ (min)	
	com O ₂	sem O ₂
$5,2 \times 10^{-5}$	626 ± 37	2911 ± 636
$3,9 \times 10^{-5}$	286 ± 12	878 ± 116
$2,1 \times 10^{-5}$	168 ± 5	484 ± 57
$1,0 \times 10^{-5}$	92 ± 3	152 ± 7
$5,2 \times 10^{-6}$	88 ± 4	105 ± 3

Associamos este efeito à formação de agregados do AL em suas altas concentrações, pois se sabe que a agregação aumenta a probabilidade de dissipação da energia de excitação pelos processos não radiativos, os quais podem competir efetivamente com o processo de fototransformação do AL. Os agregados do corante na solução sempre estão em equilíbrio com seus monômeros (que ainda não estão agregados). Estes monômeros se transformam sob ação da luz, diminuindo a concentração total do AL e novos monômeros saem dos agregados e também se transformam. Com essas considerações podemos apresentar o esquema simplificado de fototransformação do AL de seguinte forma:

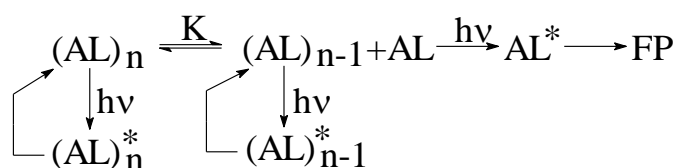


Figura 24. Esquema simplificado proposto para a fototransformação do AL.

Para apresentar os resultados de forma mais quantitativa é necessário desenvolver um modelo matemático adequado. Atualmente, estamos trabalhando em colaboração com o grupo de matemática do IFSC-USP para esta análise.

O estudo comparativo da fototransformação do AL na presença e na ausência do oxigênio molecular (Figuras 19 e 20) mostrou que, em toda faixa de concentração do AL, o tempo τ na presença do O_2 é sempre menor (Tabela 1), ou seja, o processo de fototransformação na presença de O_2 é mais rápido.

A perda de absorção pelo AL na região espectral visível, tanto na presença quanto na ausência de O_2 mostra que, sob ação da luz, o sistema de conjugação π da molécula se destrói. Sabe-se que o AL sob a ação da luz forma seu estado tripleto, cuja energia pode ser transferida para o O_2 , formando oxigênio singlete. Como já foi citado anteriormente, o oxigênio singlete tem alta capacidade de atacar as ligações duplas de uma molécula destruindo o seu sistema de conjugação π . Podemos supor que o aumento da velocidade de fototransformação do AL na presença de O_2 está associado com estes processos. Para confirmar esta suposição, tentamos detectar a formação do oxigênio singlete na excitação do AL. Na Figura 25 está mostrada a curva de intensidade de fosforescência do oxigênio singlete em função do tempo, após a excitação do AL.

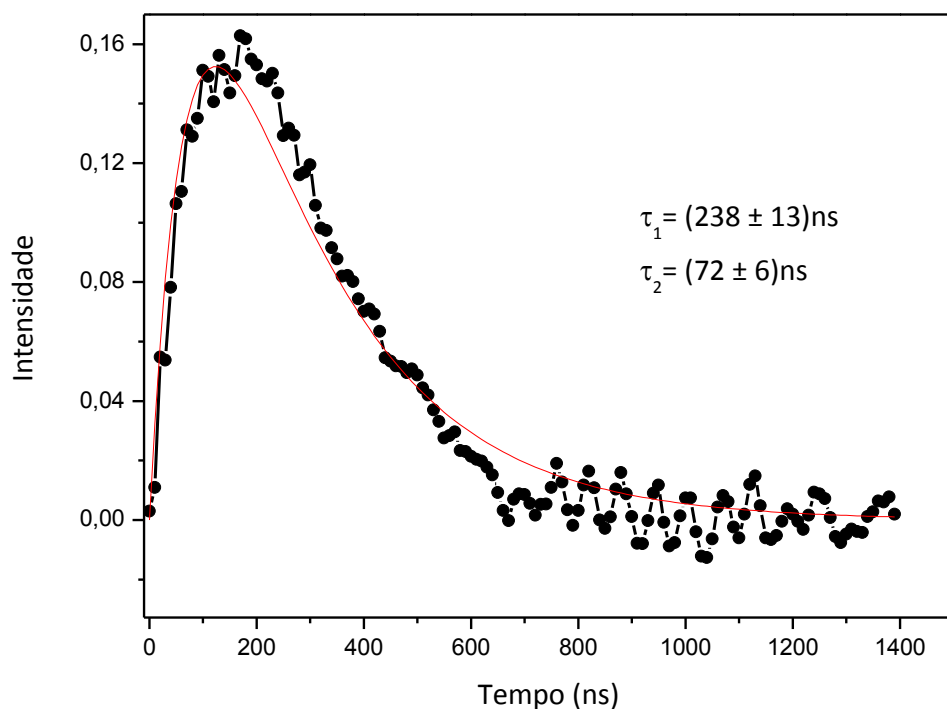


Figura 25. Intensidade de fosforescência do oxigênio singleto em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).

A curva tem um perfil típico de acumulação de oxigênio singleto no início, com tempo característico de aproximadamente 72 ns, e o decaimento com tempo de aproximadamente 240 ns. Baseando-se neste resultado podemos confirmar a participação do oxigênio singleto no processo de fototransformação do AL. Neste caso o esquema da fototransformação do AL pode ser esquematizado na forma:

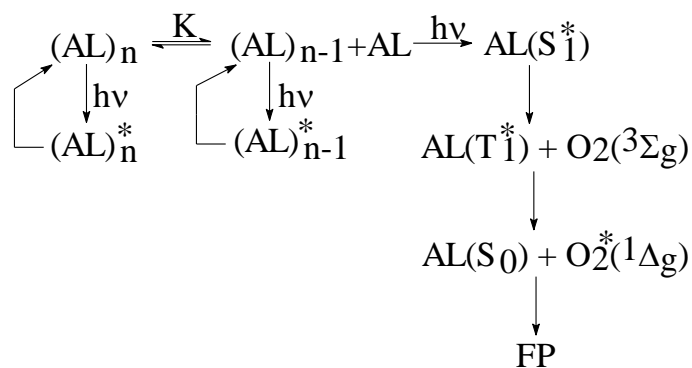


Figura 26. Esquema da fototransformação do AL levando em conta a formação de oxigênio singleto.

6.2 Estudos espectroscópicos do AL e da dinâmica de sua fototransformação na sua interação com DNA

6.2.1 Espectros de absorção óptica e de fluorescência

Obtivemos os espectros do AL em tampão e em diferentes concentrações de DNA. Foram estudadas quatro concentrações distintas de AL: $1\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$.

As figuras 27, 29, 31 e 33 mostram as mudanças dos espectros de absorção do AL em diferentes concentrações, em função da concentração do DNA. As figuras 28, 30, 32 e 34 apresentam as mudanças de absorbância do AL em $\lambda = 500\text{ nm}$, respectivas a estas concentrações do AL em função da concentração de DNA.

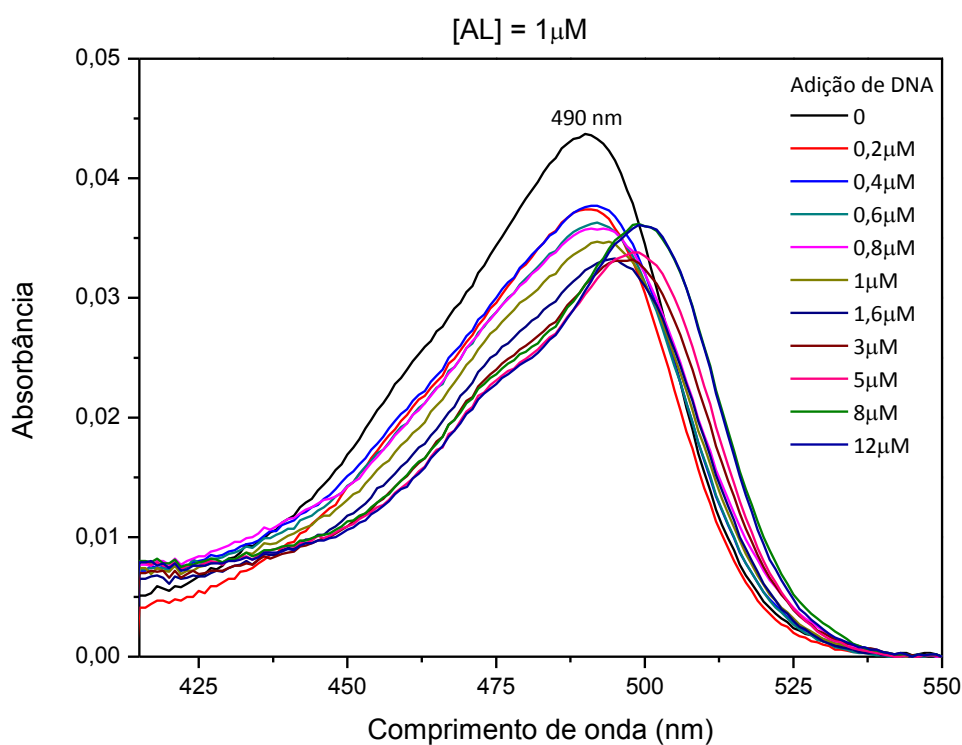


Figura 27. Espectros de absorção do $[\text{AL}] = 1\mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.

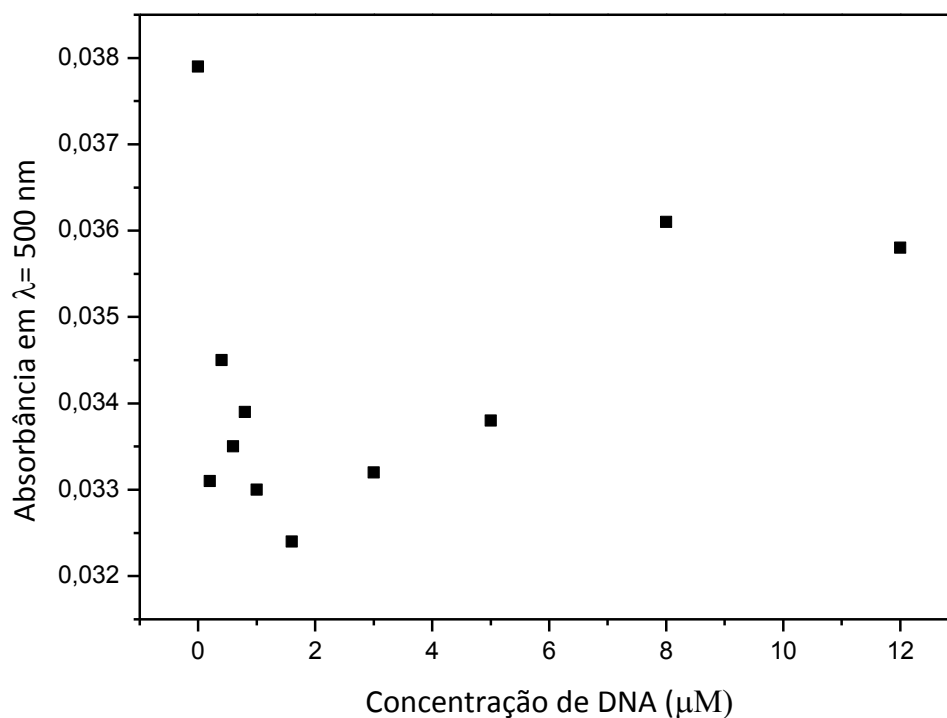


Figura 28. Absorbância em $\lambda = 500$ nm do $[\text{AL}] = 1 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.

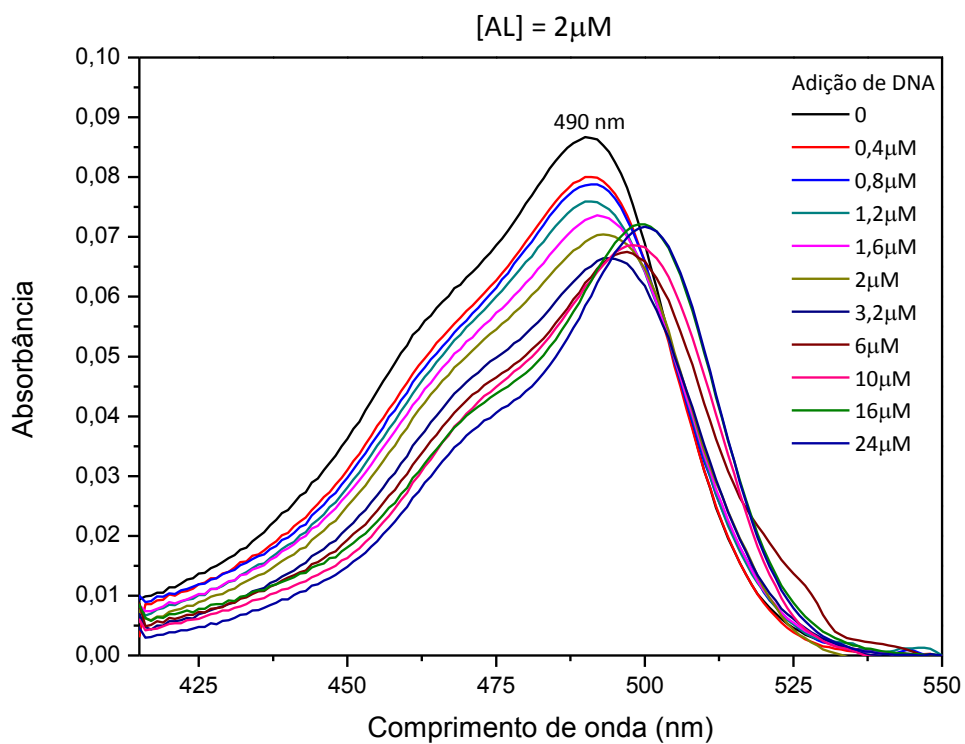


Figura 29. Espectros de absorção do $[\text{AL}] = 2 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.

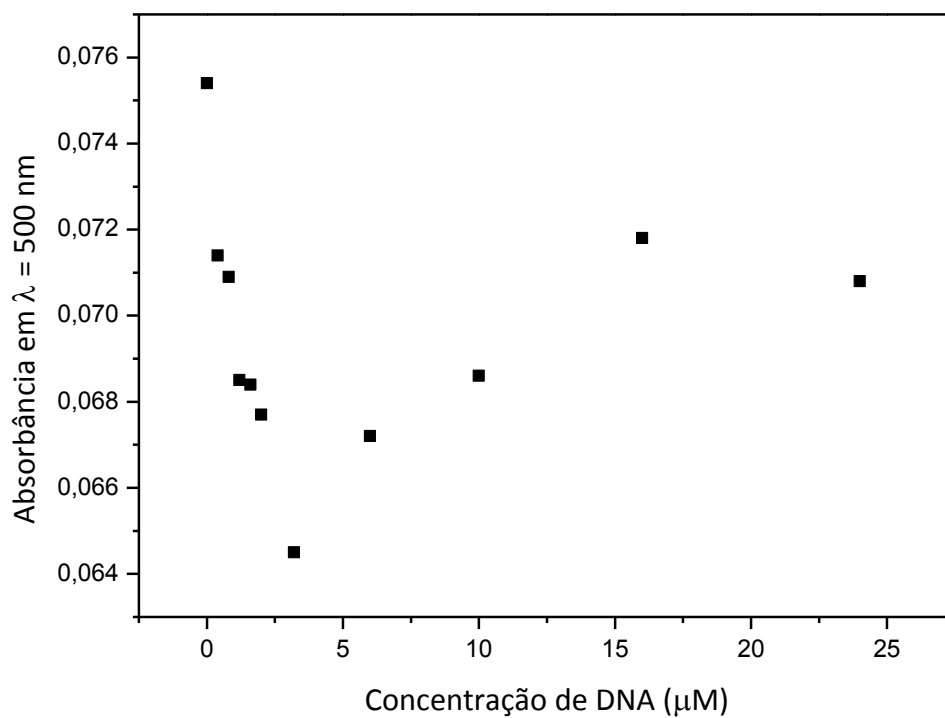


Figura 30. Absorbância em $\lambda = 500 \text{ nm}$ do $[\text{AL}] = 2 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.

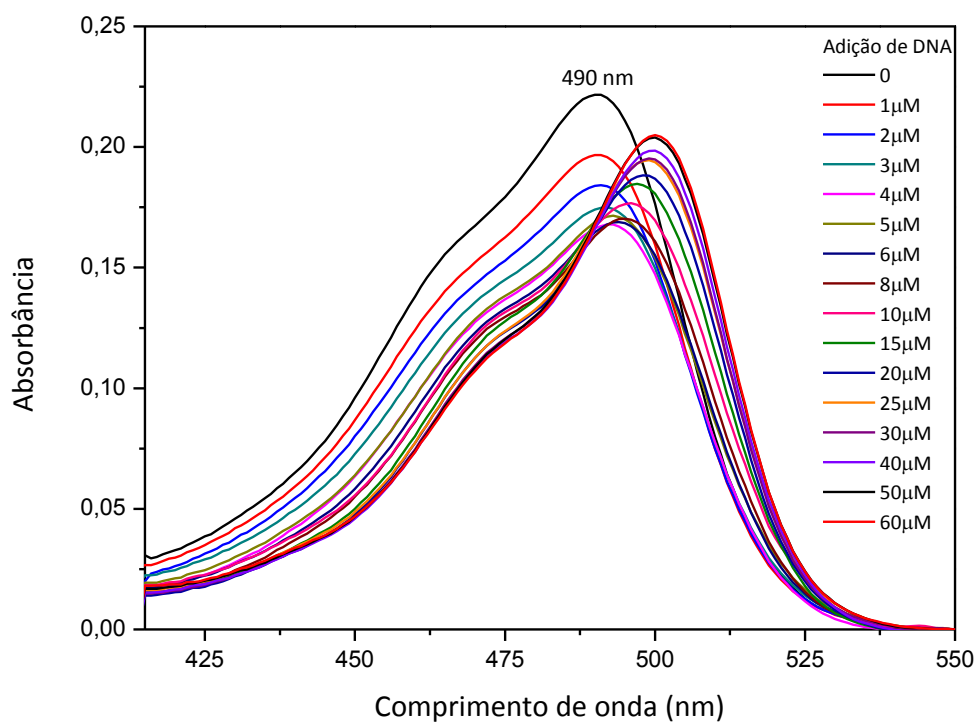


Figura 31. Espectros de absorção do $[\text{AL}] = 5 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.

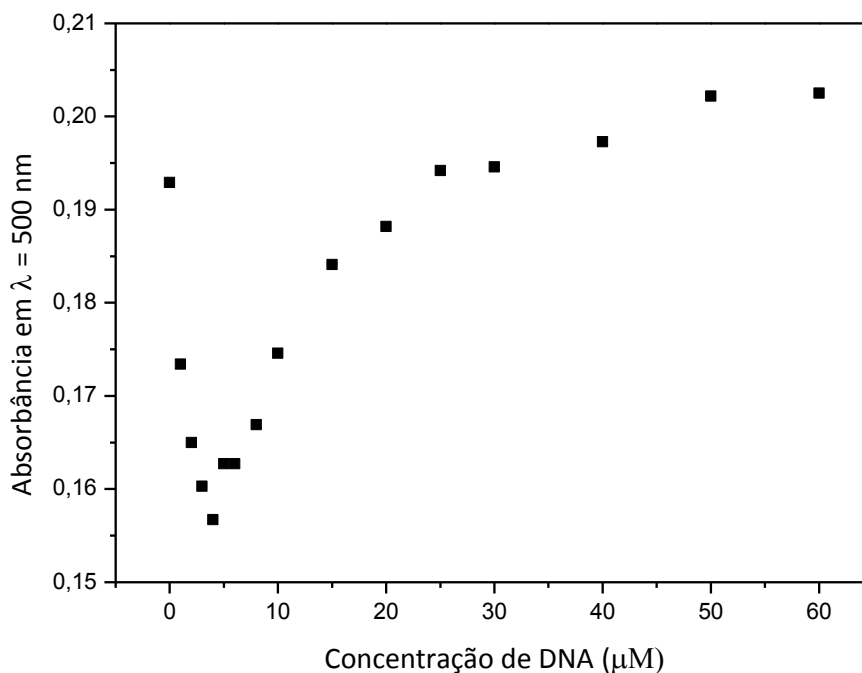


Figura 32. Absorbância em $\lambda = 500 \text{ nm}$ do $[AL] = 5 \mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.

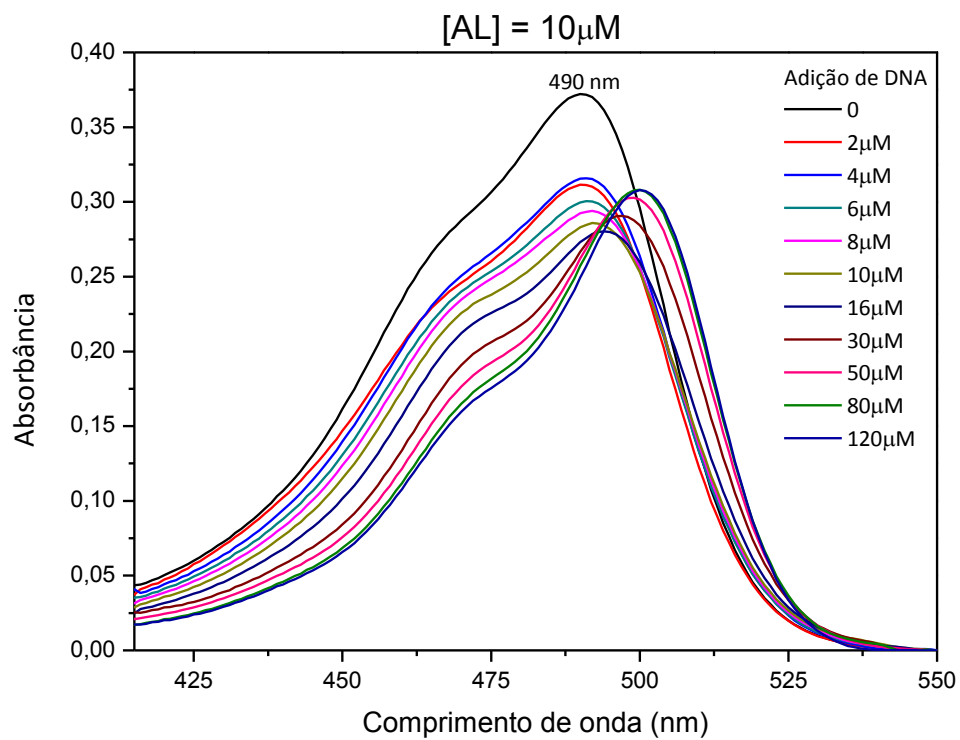


Figura 33. Espectros de absorção do AL 10 μM em função da concentração do DNA.

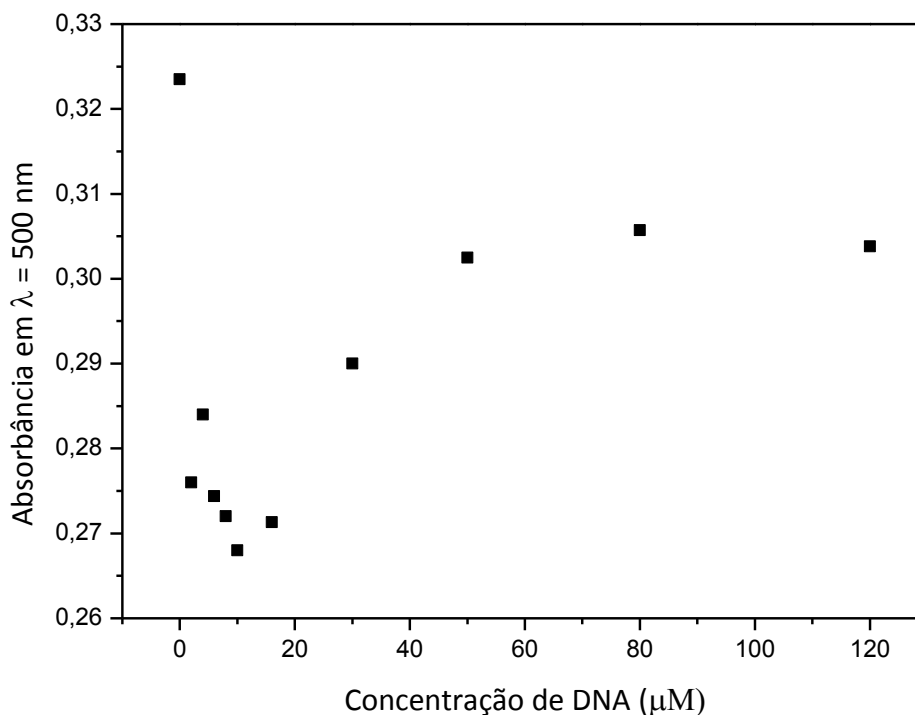


Figura 34. Absorbância em $\lambda = 500\text{nm}$ do $[AL] = 10\mu\text{M}$ em função da concentração do DNA.

Podemos observar que para todas as concentrações do AL, à medida que se acrescenta DNA, o pico de absorbância do AL em 490 nm diminui e desloca-se ao mesmo tempo para comprimentos de onda maiores (para o vermelho), alcançando finalmente o comprimento de onda de 500 nm.

Este comportamento dos espectros mostra que na solução existem no mínimo três espécies em equilíbrio. Sem o acréscimo de DNA observamos os monômeros de AL livres. Na presença de DNA em baixas concentrações, a absorbância diminui indicando a formação de agregados ligados ao DNA. Com o aumento da concentração do DNA os agregados tendem a se desagregarem formando, finalmente, os monômeros ligados ao DNA.

A posição do mínimo dos gráficos nas figuras 28, 30, 32 e 34 está associada com o máximo de agregação do AL. Pode-se ver que, com o aumento da concentração do corante, este ponto se desloca para maiores concentrações de DNA, deixando então a razão:

$$[\text{DNA}]_{\text{máximo de agregação}} / [\text{AL}] \approx 0,8 - 1$$

indicando que o máximo de agregação está atingido quando as concentrações do AL e do DNA são iguais.

A Figura 35 mostra os espectros de excitação de fluorescência do AL 5 μ M e sua interação com diferentes concentrações de DNA. Podemos fazer uma associação com os espectros de absorção e observar que a excitação (assim como a absorção), ao se acrescentar DNA em baixas concentrações, diminui até certo valor (indicando a presença de agregados). A partir de determinada concentração, os valores da intensidade de excitação começam a subir, demonstrando a desagregação e a formação dos monômeros do AL ligados ao DNA.

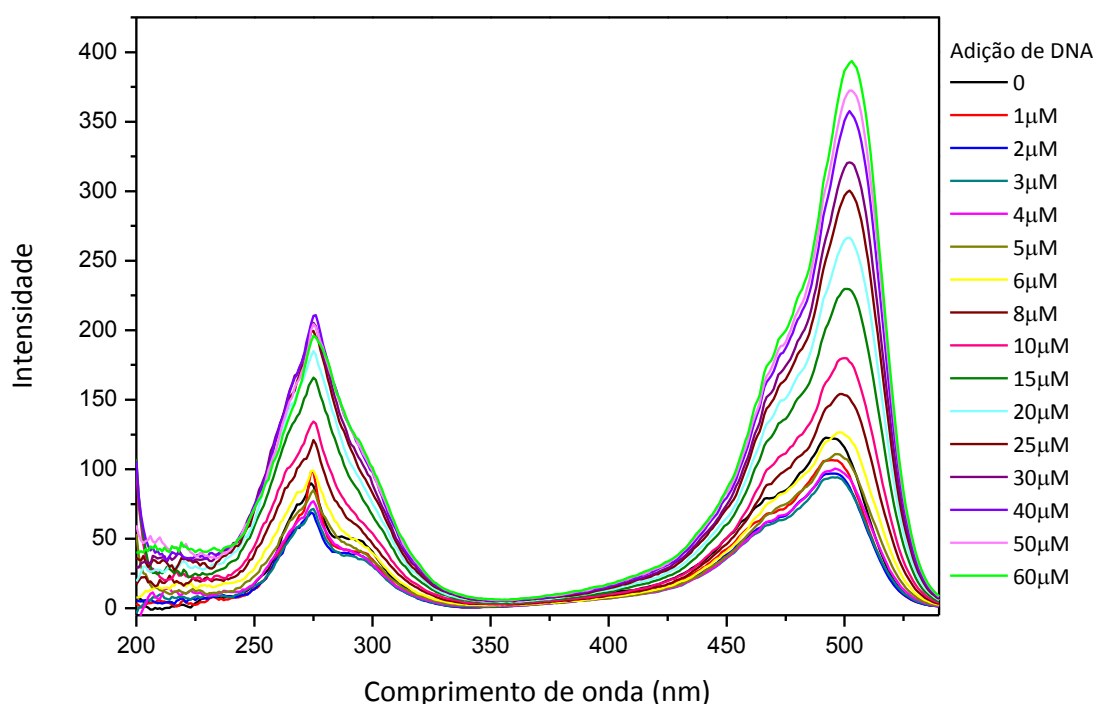


Figura 35. Espectros de excitação da fluorescência do $[AL] = 5\mu M$ em função da concentração de DNA,

$$\lambda_{em} = 550 \text{ nm.}$$

Podemos observar na Figura 36 que o mínimo da intensidade da fluorescência coincide com máximo de agregação, obtido pelos espectros de absorção continuando com razão:

$$[DNA]_{\text{m\u00e1ximo de agrega\u00e7\u00e3o}}/[AL] \approx 0,8 - 1$$

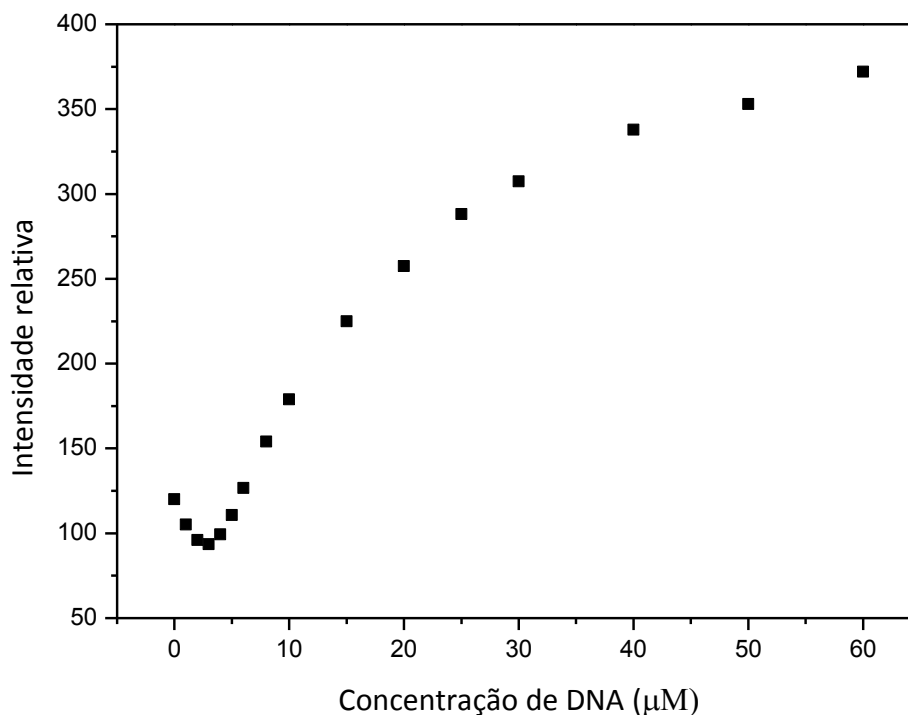


Figura 36. Dependência da intensidade relativa de fluorescência do AL em $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$ devido à mudança do espectro de excitação do AL em função da concentração de DNA.

6.2.2 Fluorescência estática e resolvida no tempo

Assim como foi feito nos experimentos de absorção ótica, realizamos medidas de fluorescência do AL na sua interação com DNA para as mesmas concentrações do corante estudadas anteriormente: $1\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$, $5\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$.

Os espectros de emissão de fluorescência foram corrigidos levando em conta as mudanças de absorção do AL com a mudança de concentração do DNA. Para isto, utilizamos a seguinte expressão:

$$I_{corrig} = I_{fluo} \frac{Abs_{[DNA]=0}}{Abs_{[DNA]}} \quad (43)$$

em que I_{corrig} corresponde à intensidade de fluorescência corrigida pela absorção ótica, I_{fluo} representa a intensidade de fluorescência experimental, $Abs_{[DNA]=0}$ representa o valor da absorvância no comprimento de onda de excitação (462 nm) sem a adição de DNA e $Abs_{[DNA]}$

representa o valor da absorbância neste mesmo comprimento de onda, com o valor respectivo da concentração de DNA.

As Figuras 37, 39, 41 e 43 mostram os espectros de emissão de fluorescência do AL em tampão e na presença de DNA. Inicialmente, sem o acréscimo de DNA, o espectro apresenta um valor máximo de intensidade de fluorescência em 528 nm. Posteriormente, podemos observar que a adição de DNA resulta em uma diminuição da intensidade de fluorescência, indicando a presença de agregados. Este efeito é mais acentuado para maiores concentrações do AL. Em altas concentrações de DNA há um efeito contrário, em que a intensidade de fluorescência começa a aumentar, atingindo valor máximo de intensidade de fluorescência na concentração máxima utilizada.

A partir dos espectros corrigidos de fluorescência foram construídos os gráficos da intensidade em função da concentração de DNA, (Figuras 38, 40, 42 e 44). Vale ressaltar que, neste caso, ao invés de ser utilizada a intensidade de fluorescência, optamos por usar o valor da integral sobre as curvas do espectro de emissão.

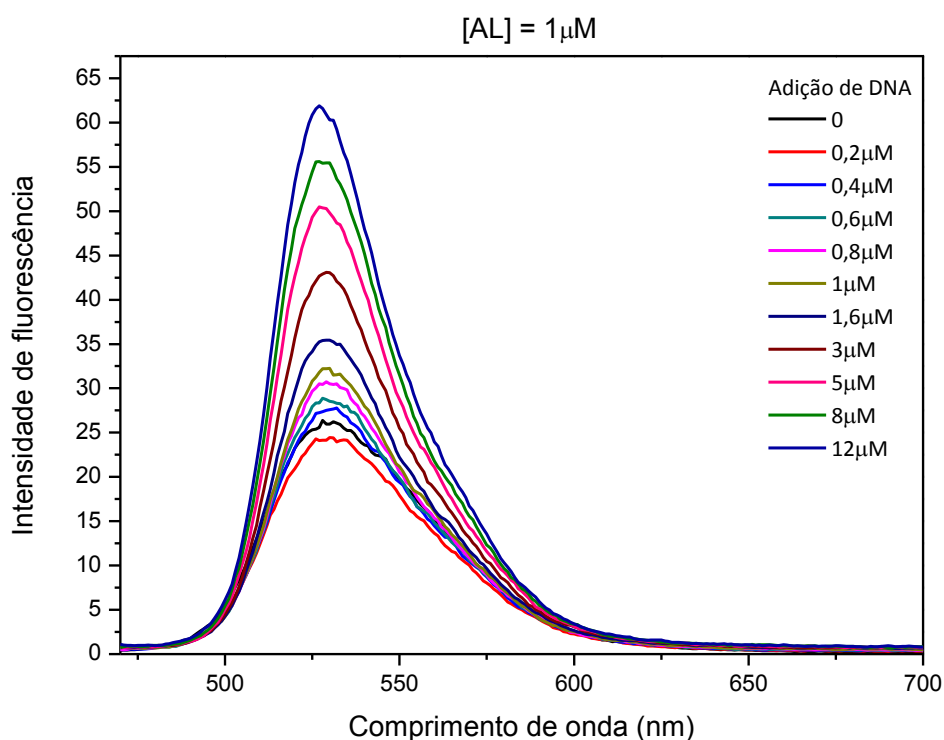


Figura 37. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL 1µM com DNA.

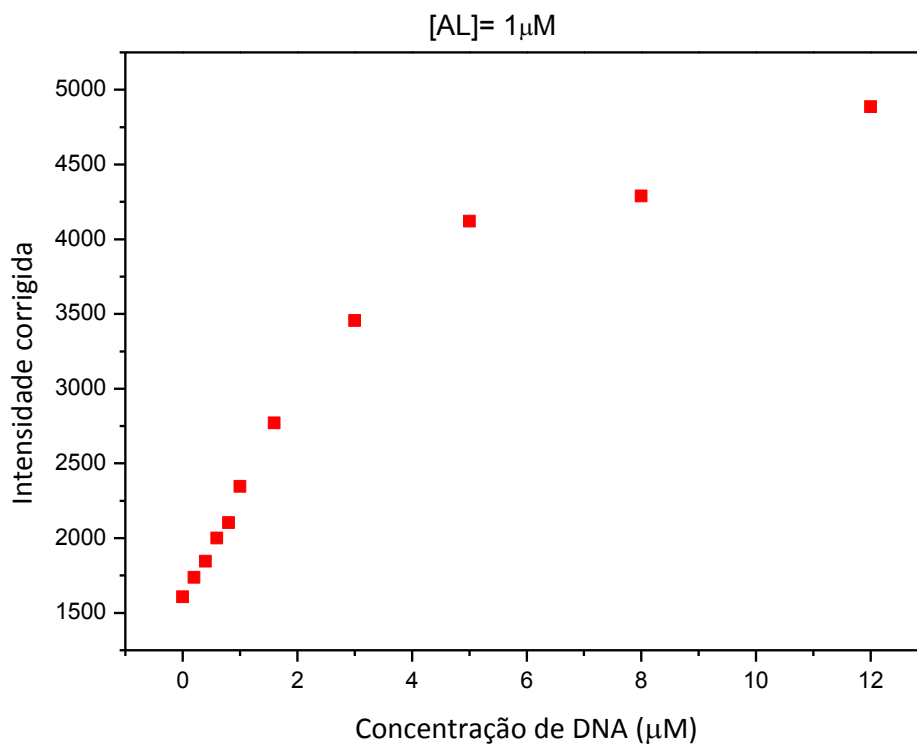


Figura 38. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL 1 μ M com $\lambda_{exc} = 462$ nm devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.

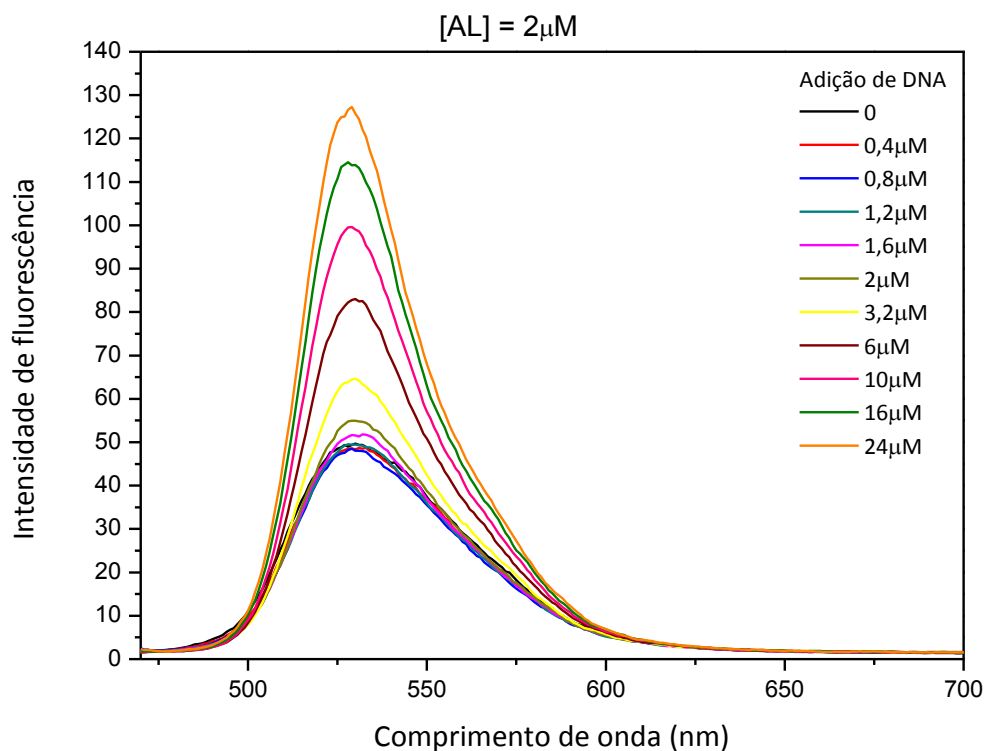


Figura 39. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL 2 μ M com DNA.

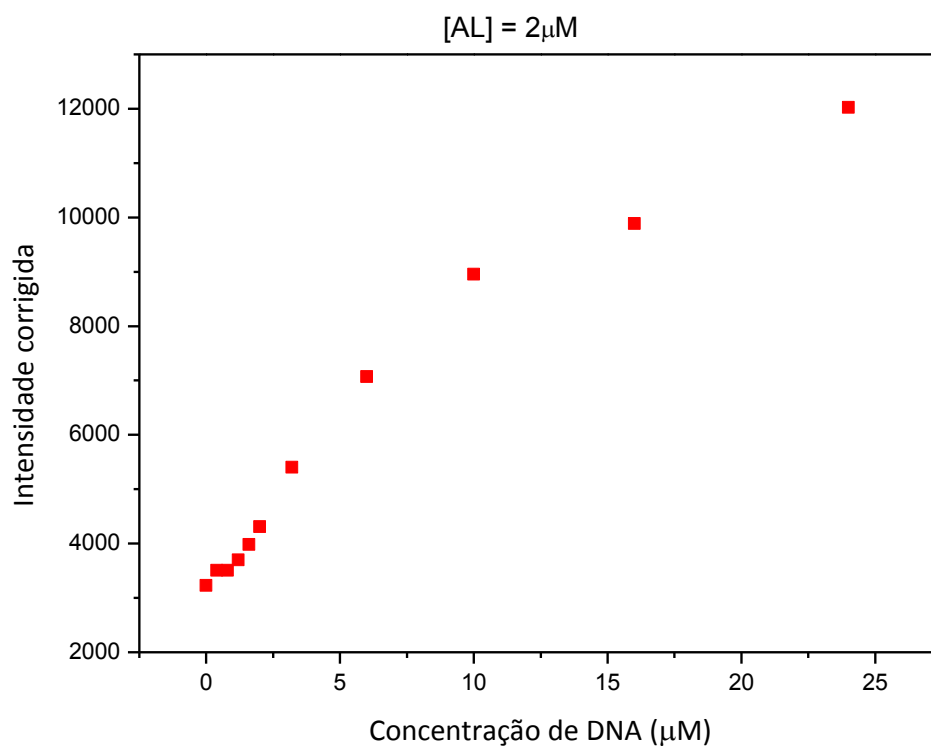


Figura 40. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL 2 μ M com $\lambda_{exc} = 462$ nm devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.

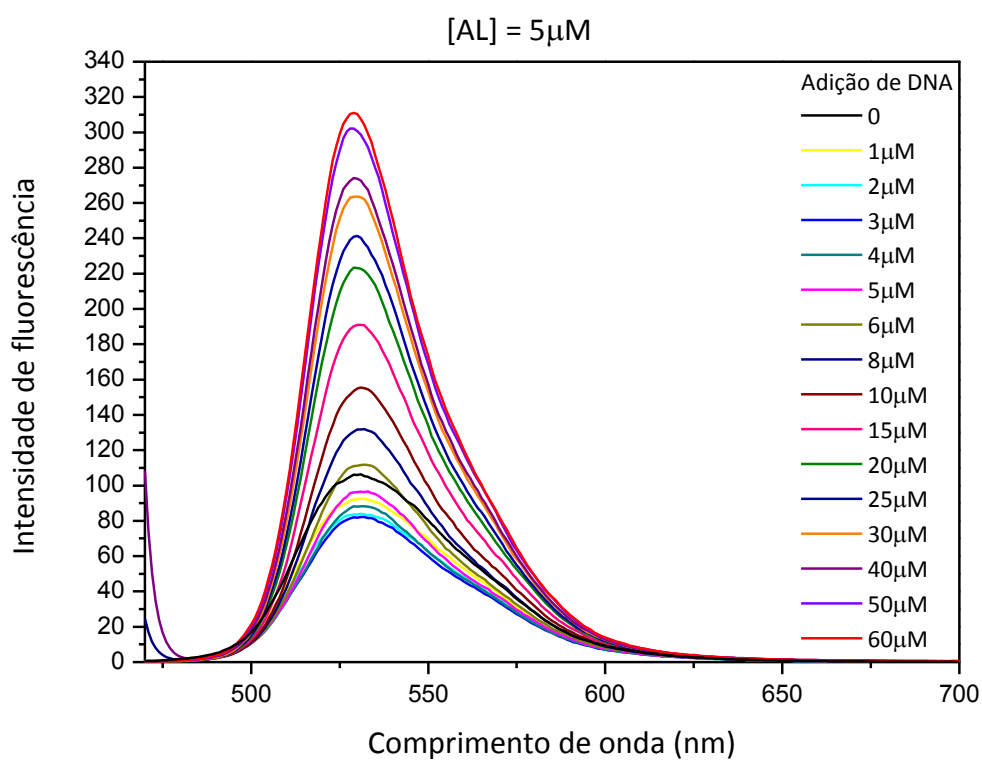


Figura 41. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL 5 μ M com DNA.

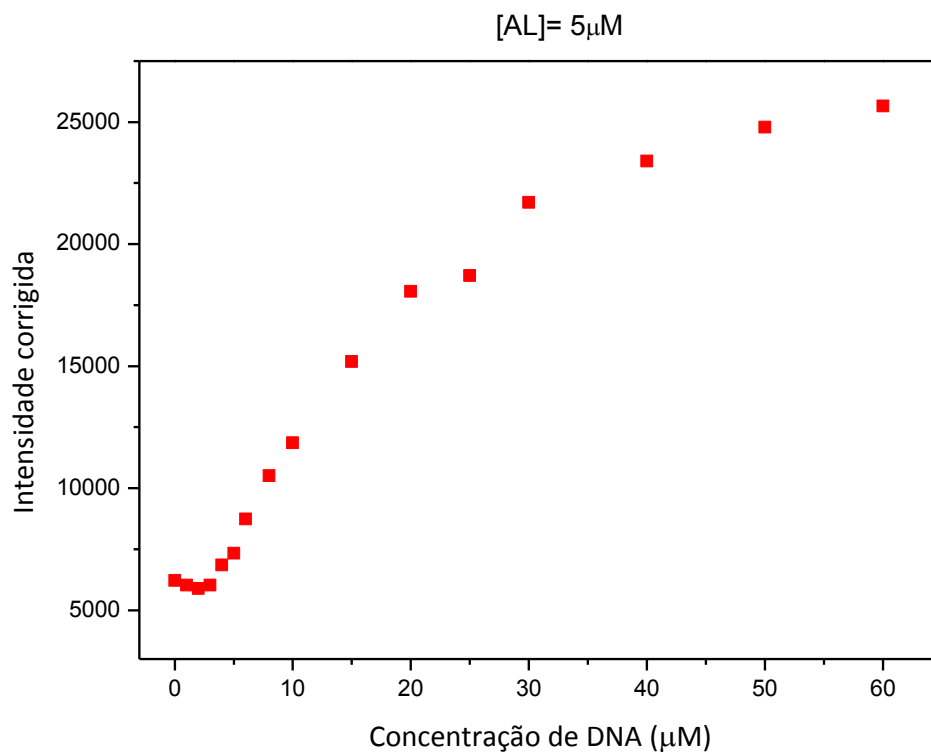


Figura 42. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL 5 μ M com $\lambda_{exc} = 462$ nm devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.

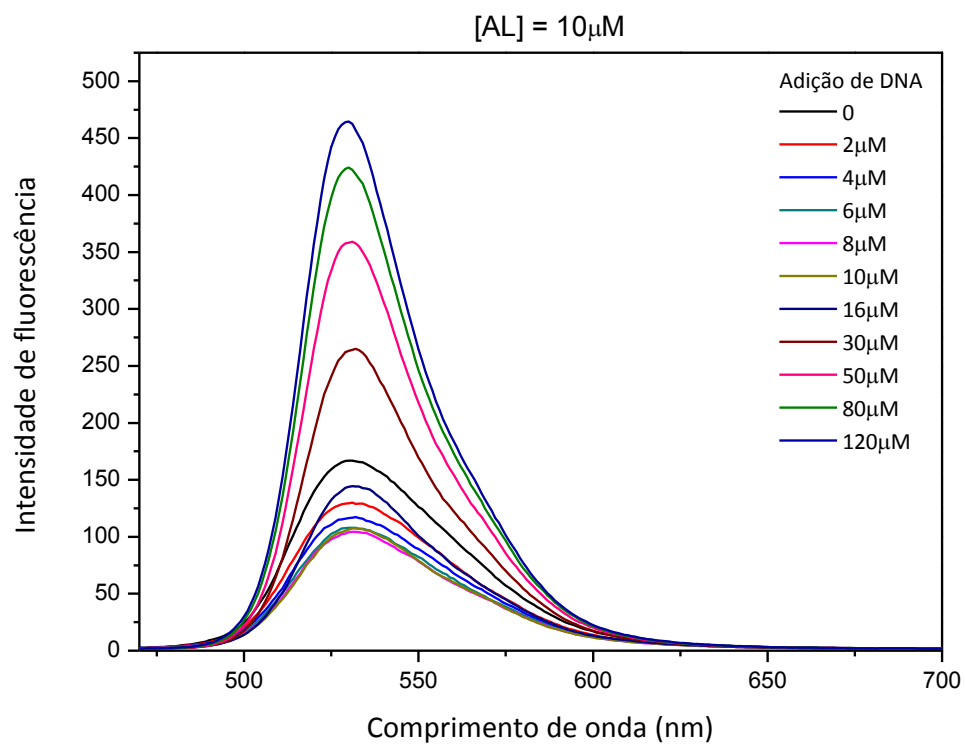


Figura 43. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL 10 μ M com DNA.

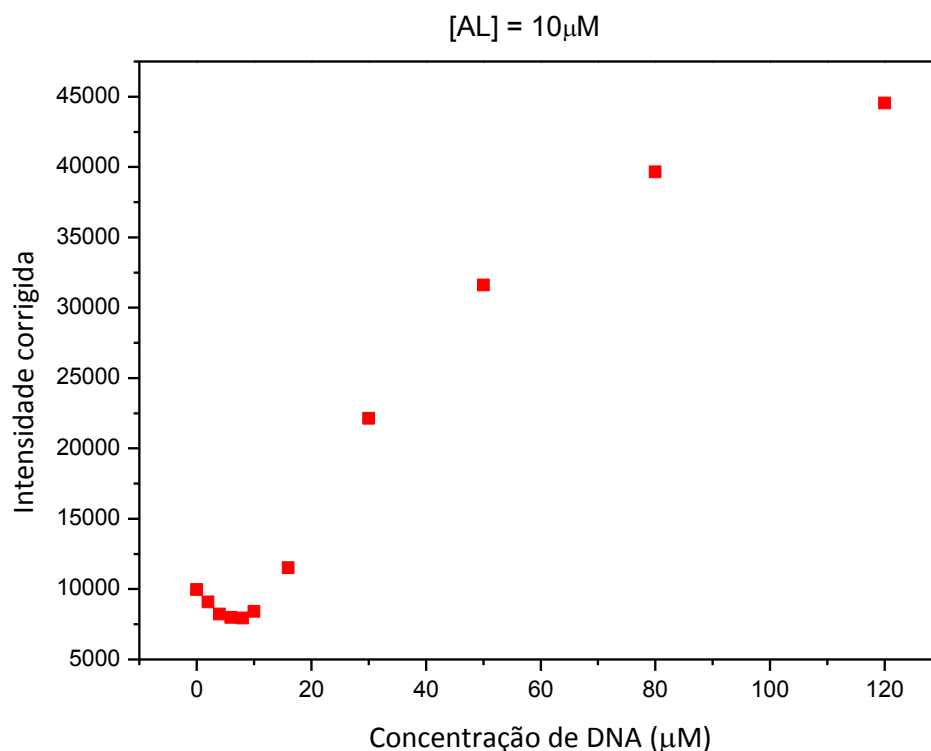


Figura 44. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL 10 μM com $\lambda_{exc} = 462 \text{ nm}$ devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de DNA.

Pode-se notar que o mínimo da intensidade de fluorescência é observado para a razão:

$$[\text{DNA}]_{\text{mínimo da fluorescência}} / [\text{AL}] \approx 0,8 - 1$$

coincidindo com o máximo de agregação, obtida dos espectros de absorção.

Para a concentração 5 μM de AL, realizamos experimentos de fluorescência resolvida no tempo. As curvas de decaimento estão nas figuras (A) e (B):

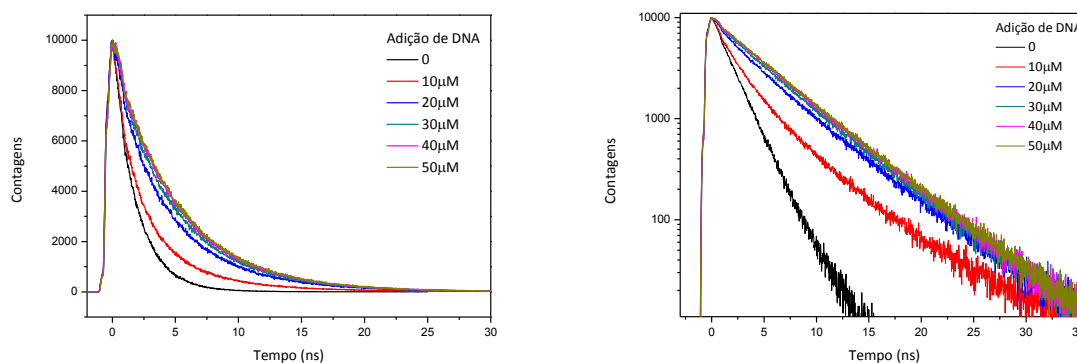


Figura 45. (A) Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo do AL 5 μM na sua interação com DNA em diferentes concentrações. (B) Em escala logarítmica.

A análise dos perfis de decaimento mostrou que, diferentemente da fluorescência em solução aquosa homogênea, na presença do DNA a cinética de decaimento da fluorescência possui caráter bi-exponencial. Uma componente possui um tempo de $\approx 1,8$ ns, que é igual ao tempo característico de decaimento de fluorescência em solução homogênea e, por isso, pode ser associado com a fluorescência de monômeros do AL não ligados ao DNA. A outra componente possui tempo $\approx 5,5$ ns. O conteúdo relativo dessa componente cresce, como pode ser observado na Tabela 2 conforme a concentração do DNA aumenta e o conteúdo da primeira componente cai. Por isso associamos a segunda componente com a fluorescência dos monômeros do AL ligados ao DNA. A ausência da terceira componente, que poderia ser associada com a fluorescência dos agregados do AL mostra que os agregados não possuem fluorescência.

Tabela 2. Tempos de decaimento de fluorescência do AL $5\mu\text{M}$ na sua interação com DNA.

[DNA](μM)	$\tau_1(\text{ns})$	A_1	$\tau_2(\text{ns})$	A_2
0	$1,8 \pm 0,1$	10000	--	0
10	$1,8 \pm 0,1$	7550 ± 100	$5,7 \pm 0,2$	2400 ± 200
20	$2,0 \pm 0,1$	3800 ± 100	$5,4 \pm 0,2$	6100 ± 100
30	$1,9 \pm 0,1$	2600 ± 200	$5,4 \pm 0,2$	7500 ± 100
40	$2,1 \pm 0,1$	2400 ± 200	$5,5 \pm 0,2$	7600 ± 100
50	$1,8 \pm 0,1$	1100 ± 300	$5,3 \pm 0,2$	9000 ± 100

6.2.3 Dinâmica de fotodecomposição na presença de DNA

Neste estudo, para evitar o efeito de agregação, usamos concentrações de DNA maiores do que do AL (a concentração de AL foi $3,7\mu\text{M}$ e as de DNA foram: $5\mu\text{M}$, $25\mu\text{M}$ e $50\mu\text{M}$). Um exemplo das mudanças dos espectros de absorção do AL $3,7\mu\text{M}$ e DNA $25\mu\text{M}$ em função do tempo de irradiação está mostrado nas Figuras 46 e 47 (tanto na presença como na ausência de oxigênio molecular). Nesse caso, no conjunto dos espectros não foram observados pontos isobésticos, e isto pode ser associado à formação de fotoprodutos

diferentes dos fotoprodutos em soluções homogêneas. Entretanto, devido à semelhança dos espectros finais de fotoprodutos em ambos os casos associamos esta ausência de pontos isobésticos à contribuição nos espectros da absorção própria do DNA.

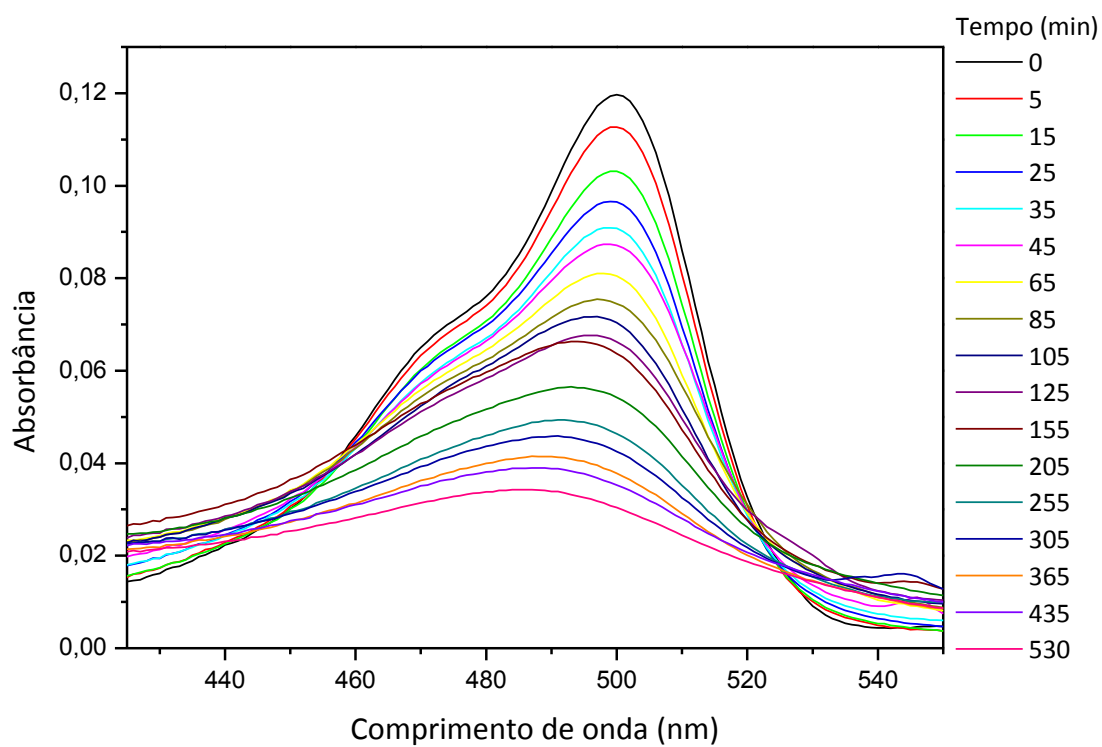


Figura 46. Espectros de absorção óptica do AL $3,7 \mu\text{M}$ e DNA $25 \mu\text{M}$ na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.

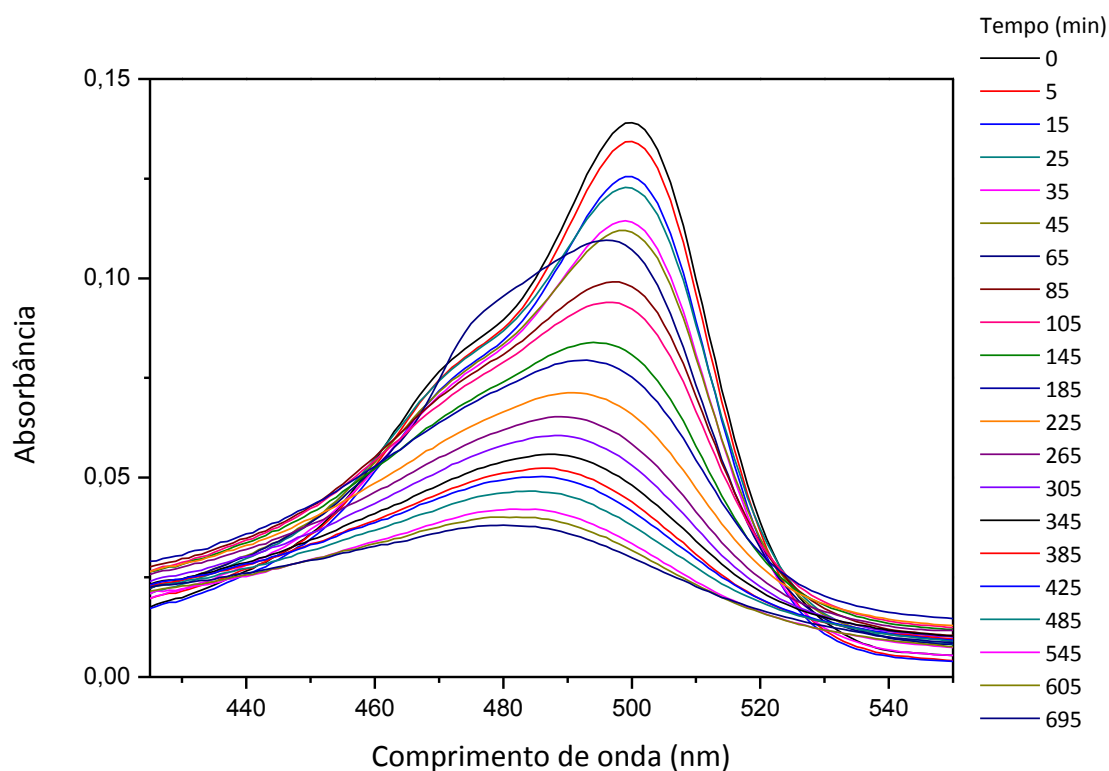


Figura 47. Espectros de absorção óptica do AL $3,7\mu\text{M}$ e DNA $25\mu\text{M}$ na ausência de O_2 , em função do tempo de irradiação.

A análise das mudanças dos espectros em função do tempo de irradiação mostrou que, semelhantemente às soluções homogêneas, as curvas cinéticas de decaimento da absorção na presença de DNA também possuem caráter mono-exponencial (Figuras 48 e 49). Assim, podemos usar o valor do tempo característico τ (como calculado para soluções homogêneas) para comparar os resultados com os obtidos em soluções homogêneas.

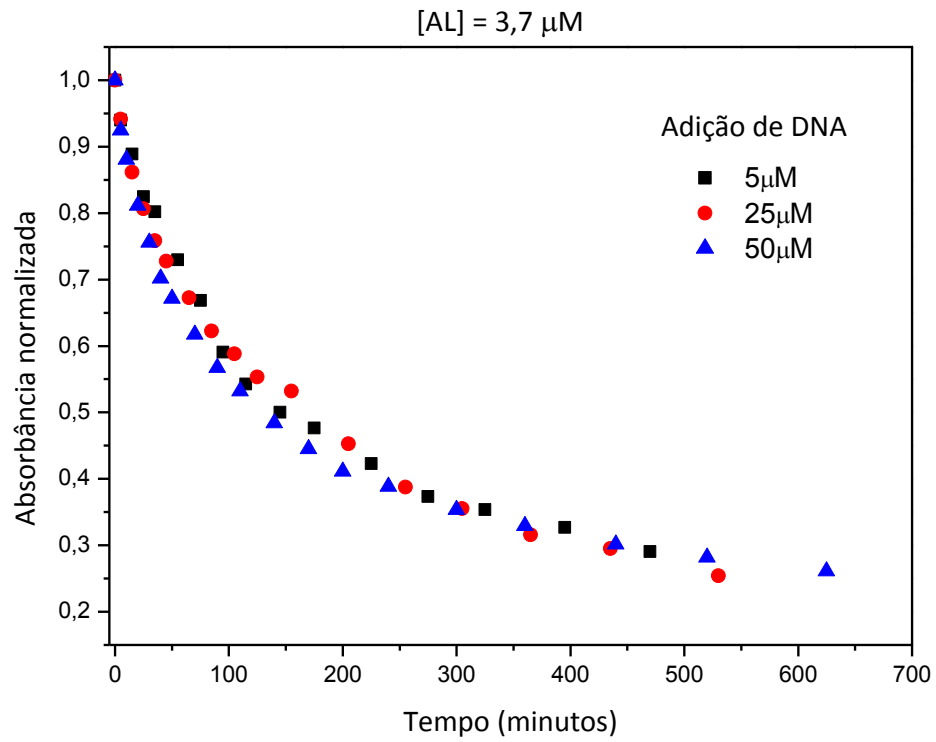


Figura 48. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 493 \text{ nm}$ ($5 \mu M$) e 500 nm ($25 \mu M$ e $50 \mu M$) da interação do AL com DNA na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

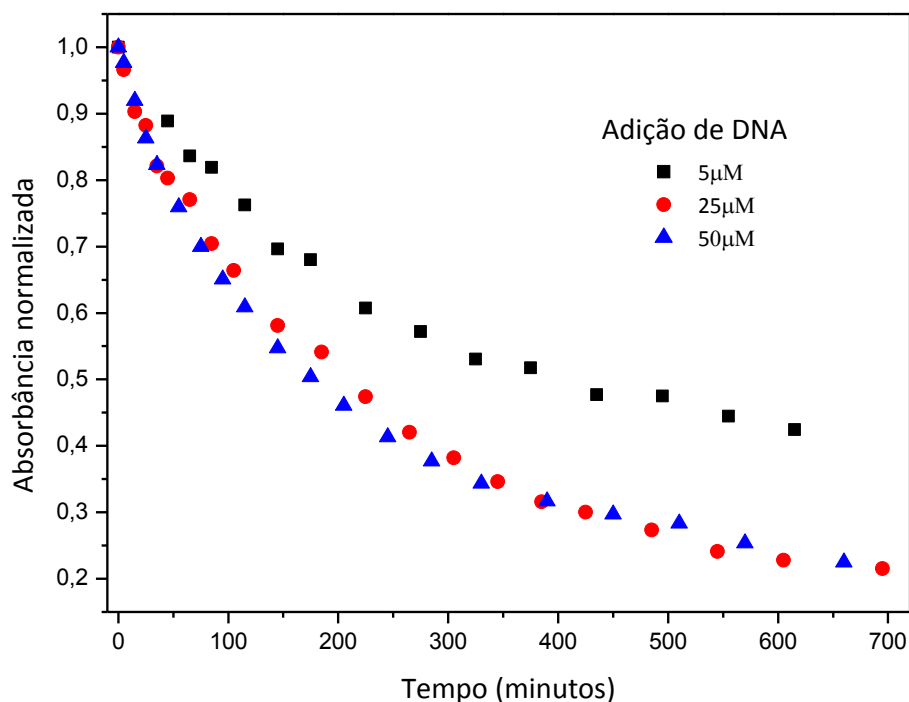


Figura 49. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 493\text{nm}$ ($5\ \mu\text{M}$) e 500nm ($25\ \mu\text{M}$ e $50\ \mu\text{M}$) da interação do AL com DNA na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Os tempos característicos obtidos pelo ajustes dos decaimentos se encontram na Tabela 3. Podemos observar pela tabela que na presença do DNA o processo de fototransformação do AL é mais lento do que em soluções homogêneas e praticamente não dependem da concentração do DNA. Apresentamos aqui possíveis explicações deste efeito:

- O AL intercalado dentro da estrutura do DNA fica no ambiente hidrofóbico. Isto pode mudar (diminuir) a velocidade de sua fototransformação.
- Se na sua fototransformação o AL se dissociar, os produtos de dissociação na presença do DNA ficam presos dentro da sua estrutura e é possível existir um processo de recuperação do AL que diminui a velocidade de sua fototransformação (“efeito de gaiola”).

Para confirmar essas hipóteses são necessários experimentos adicionais, que pretendemos realizar no futuro.

O efeito do oxigênio molecular nos experimentos na presença do DNA é semelhante aos experimentos em soluções homogêneas: na presença do O_2 a velocidade de

fototransformação é maior do que na sua ausência, o que mostra a participação do oxigênio no processo de fototransformação da AL e possível formação do oxigênio singlete.

Tabela 3. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise do Acridina Laranja com DNA (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

[DNA] (μM)	τ (min)	
	com O_2	sem O_2
0	80 ± 6	92 ± 6
5	120 ± 6	220 ± 10
25	140 ± 15	218 ± 9
50	104 ± 8	165 ± 6

Para verificar a formação do oxigênio, foram realizadas medidas da fosforescência. Tais medidas comprovaram que o oxigênio singlete se forma na presença do DNA (Figura 50).

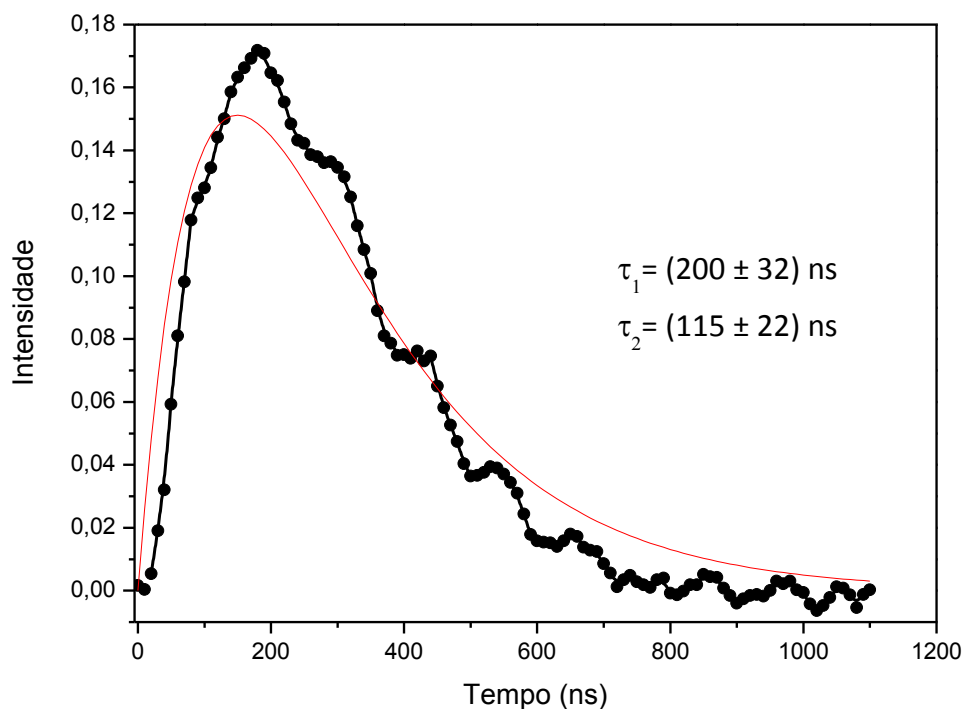


Figura 50. Intensidade de fosforescência do oxigênio singleto da solução de AL e DNA $5\mu\text{M}$ em 1270 nm . – Ajuste através da equação (25).

Entretanto, o tempo característico de sua acumulação (115 ns) é 1,6 vezes maior do que em soluções homogêneas (72 ns), enquanto que o tempo de decaimento é praticamente igual em ambos os casos (200 ns na presença de DNA e 238 ns em soluções aquosas). Este resultado mostra que a intercalação do AL dentro da estrutura do DNA protege as moléculas do corante contra o contato com o O_2 , diminuindo assim a velocidade da transferência de energia do estado tripleto do AL para o O_2 .

6.3 Estudos espectroscópicos do AL e da dinâmica de sua fototransformação na sua interação com SDS

6.3.1 Espectros de absorção óptica

A adição de SDS em solução aquosa do AL produz mudanças no seu espectro de absorção indicando a interação do AL com SDS.

Os espectros a seguir correspondem à interação do AL $5\mu\text{M}$ com SDS em diferentes concentrações:

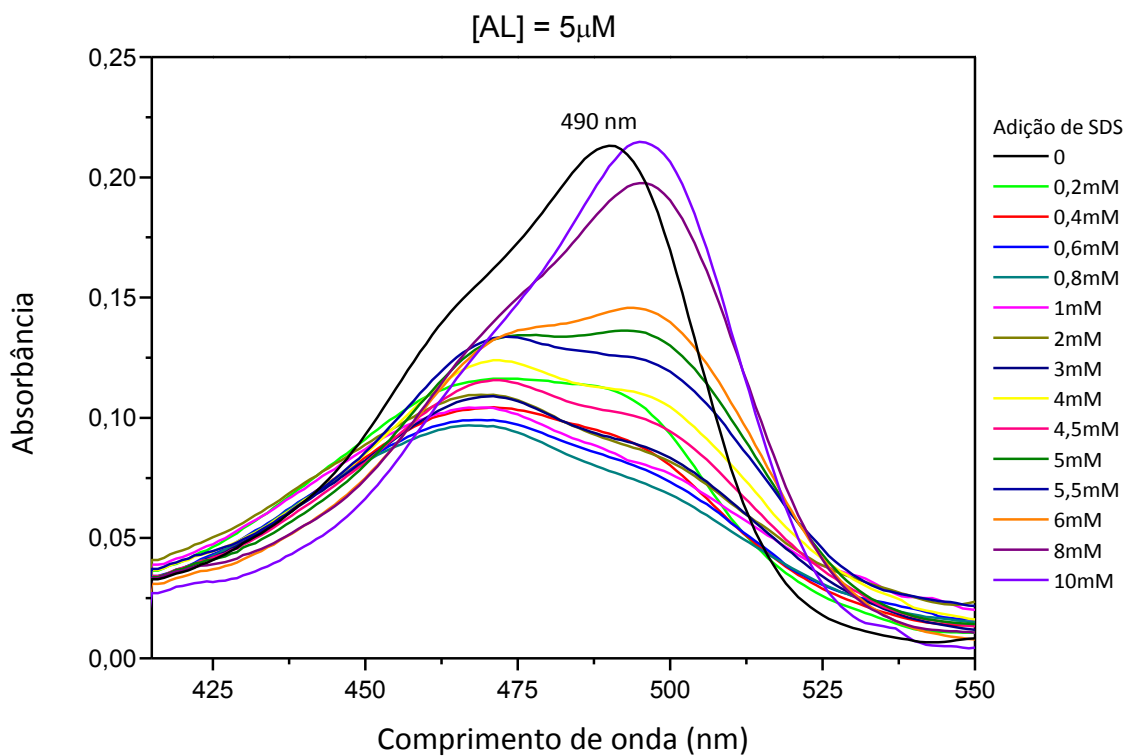


Figura 51. Espectros de absorção da interação do AL $5\mu\text{M}$ com SDS em diferentes concentrações.

A Figura 52 mostra a variação de absorbância do pico de 490 nm em função da concentração do SDS.

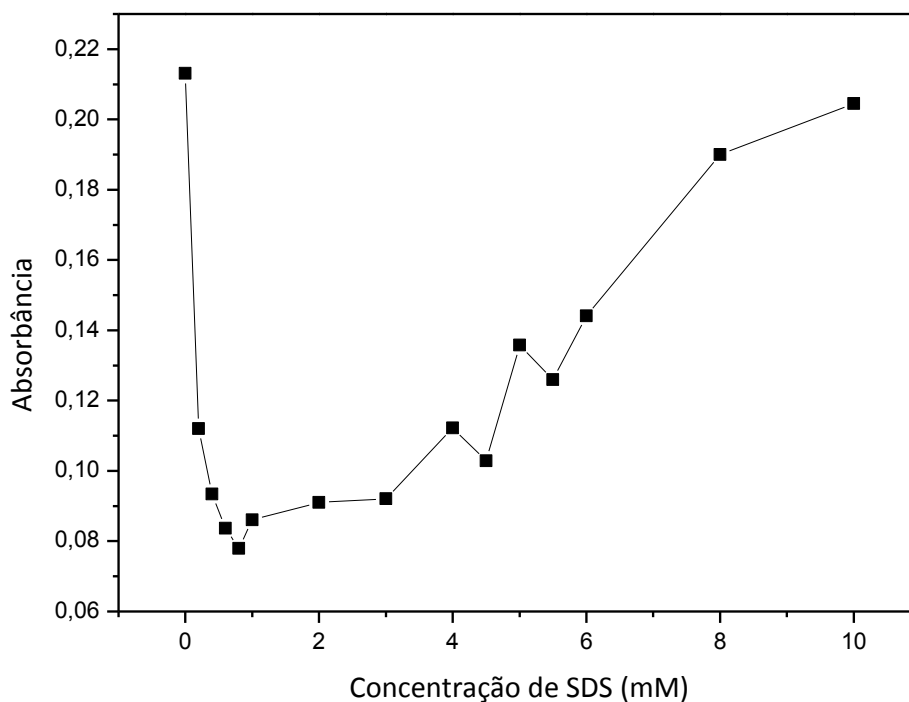


Figura 52. Absorbância em $\lambda = 490\text{nm}$ da interação do $AL5\mu\text{M}$ com SDS.

Analisando as Figuras 51 e 52, observa-se que a adição de SDS em baixas concentrações faz com que a absorção do AL diminua em toda a região do seu pico de absorção e o perfil do espectro muda. A intensidade relativa da absorção em $\lambda = 475\text{ nm}$, relacionada com absorção dos agregados de AL, aumenta em relação ao pico principal de absorção em 490 nm do monômero livre de AL. Com o aumento da concentração de SDS, a absorção começa crescer, a intensidade relativa de absorção em 475 nm diminui e aparece um pico em 496 nm que se satura quando a concentração de SDS atinge a CMC (10 mM).

Baseando-se nesses resultados podemos concluir que a presença de SDS em concentrações menores que a CMC estimula a formação de agregados de AL e, quando a concentração de SDS atinge a CMC o AL se desagrega, formando os monômeros ligados a micelas de SDS (estas conclusões estão de acordo com os resultados do estudo da fluorescência do AL e do espalhamento ressonante da luz em função da concentração de SDS que serão apresentados a seguir).

6.3.2 Medidas de fluorescência estática e com resolução temporal

Na Figura 53 estão apresentados os espectros de fluorescência do AL na presença de várias concentrações de SDS e na Figura 54 está mostrada a dependência da intensidade integral da fluorescência do AL em função da concentração do SDS.

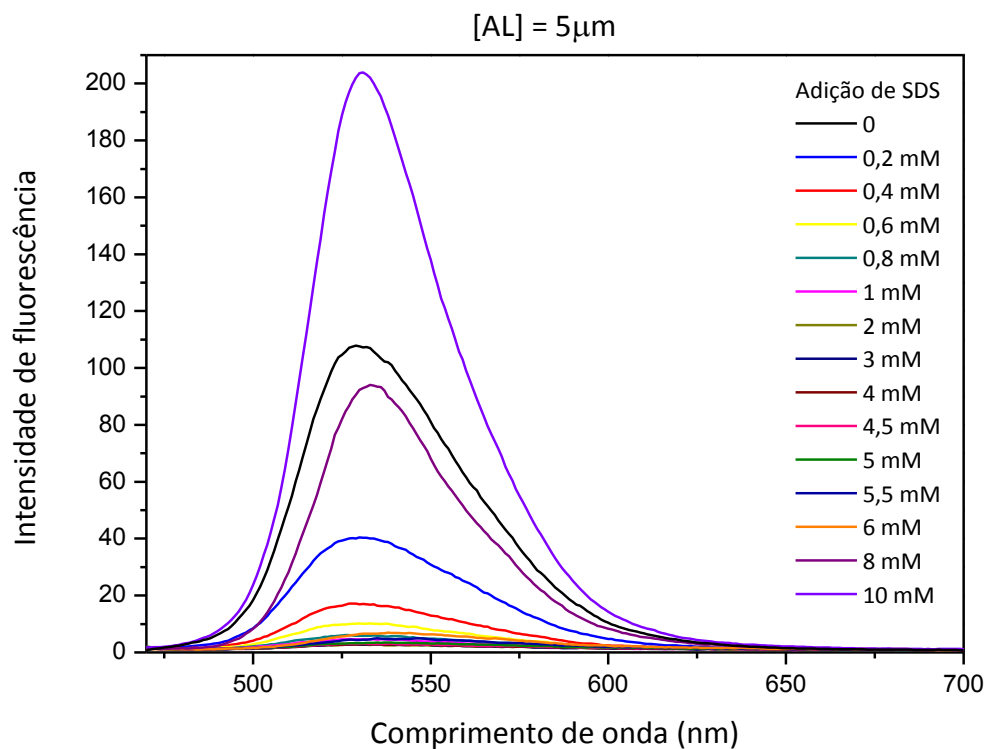


Figura 53. Espectros de emissão de fluorescência da interação do AL 5 μ m com SDS.

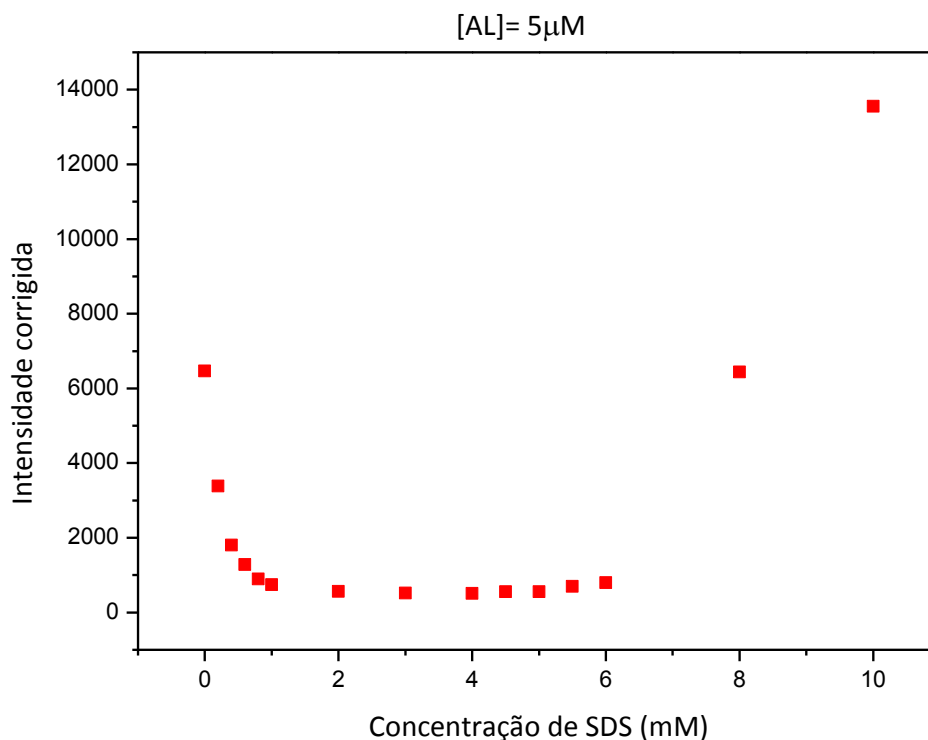


Figura 54. Dependência da intensidade corrigida de fluorescência do AL 5 μM com $\lambda_{exc} = 462 \text{ nm}$ devido à mudança do espectro de emissão do AL em função da concentração de SDS.

Podemos ver que no intervalo de concentrações de SDS de 1 até 6 mM, que coincide com o intervalo de formação dos agregados de AL (obtido através dos espectros de absorção), a intensidade de fluorescência do AL se torna praticamente desprezível e, com um maior aumento da concentração de SDS, a intensidade começa a aumentar, atingindo o máximo em $[\text{SDS}] = 10 \text{ mM}$.

O espectro de excitação da fluorescência na presença de SDS em várias concentrações (Figura 55) coincide com o espectro de absorção dos monômeros da AL, indicando que somente seus monômeros emitem a fluorescência.

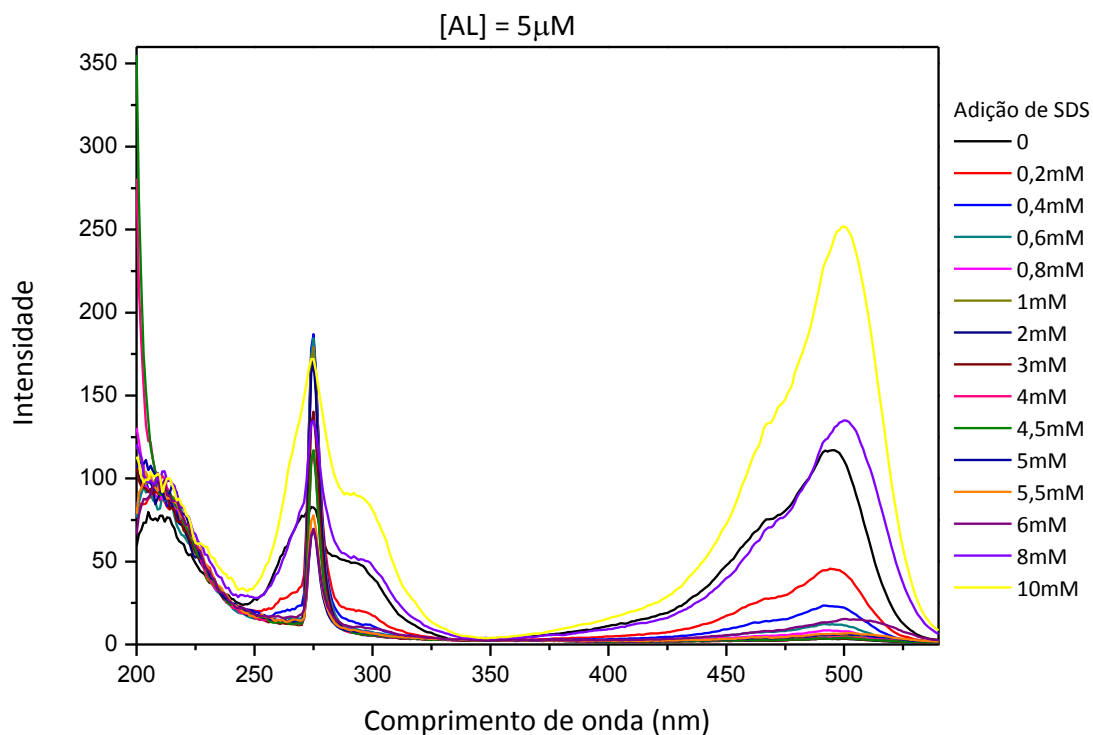


Figura 55. Espectros de excitação da fluorescência do [AL] = 5 μ M em função da concentração de SDS, $\lambda_{em} = 550$ nm.

6.3.3 Medidas de espalhamento de luz por ressonância

Na Figura 56 estão apresentados os espectros de espalhamento das soluções de AL na ausência e na presença de SDS e na Figura 57 está mostrada a dependência da intensidade integral desse espalhamento em função da concentração do SDS.

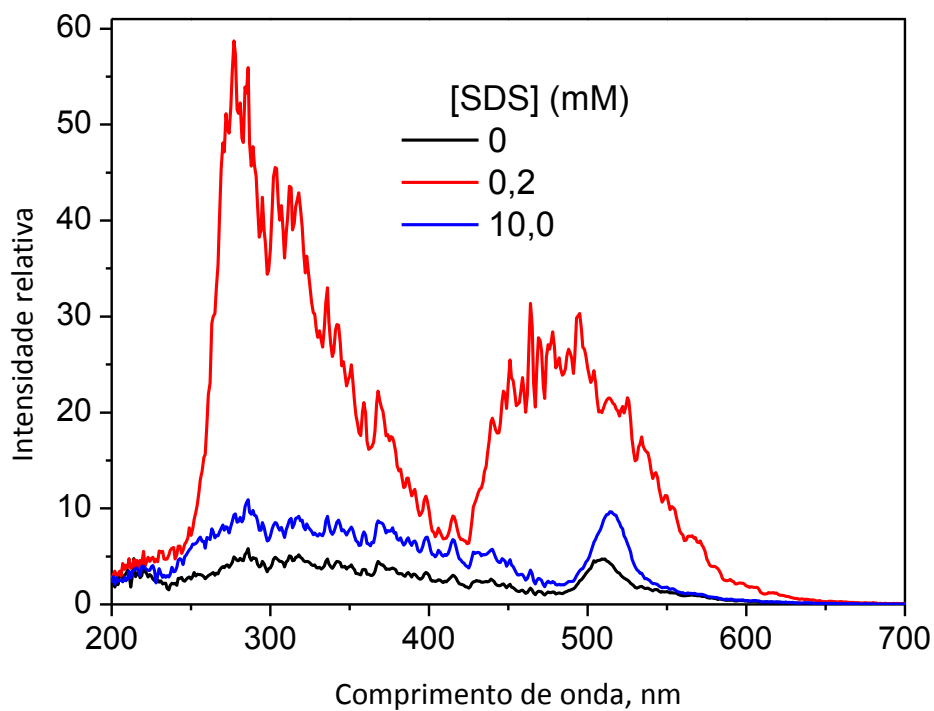


Figura 56. Espectros de espalhamento de luz pela soluções de AL $5\mu\text{M}$ na ausência e na presença de SDS.

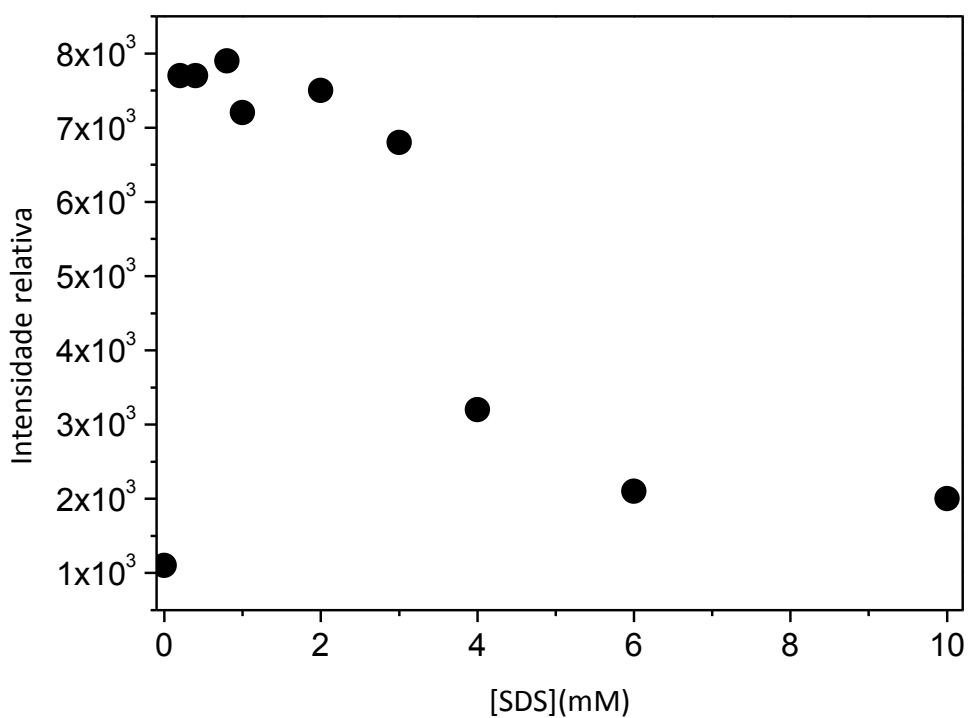


Figura 57. Intensidade integral do espalhamento das soluções de AL $5\mu\text{M}$ em função da concentração do SDS.

Podemos ver que no mesmo intervalo de concentrações de SDS na qual a fluorescência diminui (Figura 55), a intensidade do espalhamento aumenta drasticamente.

6.3.4 Medidas de fluorescência com resolução temporal

Os resultados dos experimentos de fluorescência resolvida no tempo para a concentração $5\mu\text{M}$ de AL na presença de várias concentrações de SDS estão mostrados na Figura 58 e na Tabela 4.

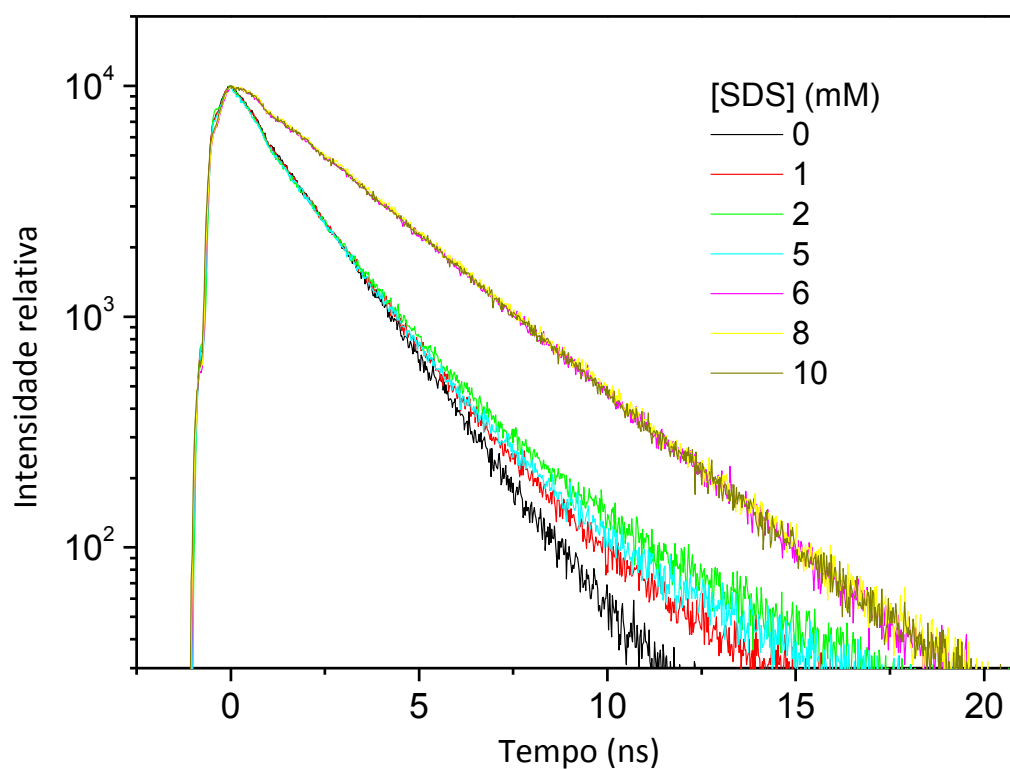


Figura 58. Curvas cinéticas de decaimento da fluorescência do AL $5\mu\text{M}$ em função de concentração de SDS.

Tabela 4. Tempos de vida e conteúdos relativos das componentes da cinética de decaimento da fluorescência do AL 5 μM em função da concentração de SDS.

[SDS] (mM)	$\tau_1(\text{ns})$	A_1	$\tau_2(\text{ns})$	A_2
0	$1,8 \pm 0,1$	10000	--	0
1	$1,6 \pm 0,1$	7900 ± 100	$2,9 \pm 0,2$	2000 ± 200
2	$1,7 \pm 0,1$	3800 ± 100	$2,8 \pm 0,2$	6000 ± 100
4	$1,8 \pm 0,1$	2500 ± 200	$2,9 \pm 0,2$	7400 ± 100
5	$1,7 \pm 0,1$	2200 ± 200	$3,0 \pm 0,2$	7600 ± 100
6	$1,8 \pm 0,1$	1100 ± 300	3,0	9000 ± 100
8	---	0	2,9	10100 ± 100
10	---	0	$3,2 \pm 0,2$	10050 ± 100

A análise de ambos mostra que, semelhantemente à fluorescência em solução aquosa na presença do DNA, a cinética do decaimento de fluorescência possui caráter bi-exponencial. Uma componente possui tempo $\approx 1,8$ ns, que é igual ao tempo característico do decaimento de fluorescência em solução homogênea e, por isso, pode ser associado à fluorescência de monômeros do AL livre. A outra componente possui tempo $\approx 3,0$ ns. O conteúdo relativo dessa componente cresce, como pode ser visto na tabela, quando a concentração de SDS aumenta, enquanto o conteúdo da primeira componente cai. Por isso associamos a segunda componente à fluorescência dos monômeros de AL ligados ao SDS.

6.3.5 Dinâmica de fototransformação

Os espectros nas Figuras 59 e 60 mostram a fotodecomposição do AL em várias concentrações na presença do SDS, tanto na presença como na ausência de O_2 . Para evitar efeitos de agregação utilizamos a concentração do SDS 20 mM, que é acima da CMC. A semelhança das mudanças espectrais na presença e na ausência do O_2 mostra que o O_2 não afeta os espectros de absorção nem do AL nem do seu fotoproduto. Pode-se ver também

claramente que, semelhantemente às soluções homogêneas durante a fototransformação do AL com SDS, aparecem vários pontos isobésticos. Como já foi explicado acima isto indica a formação de somente um fotoproduto do AL durante a fototransformação. Este fato apóia nossa sugestão que na interação com DNA, o AL também forma somente um fotoproduto. Entretanto, para confirmar esta sugestão precisamos realizar mais estudos, que planejamos realizar no futuro.

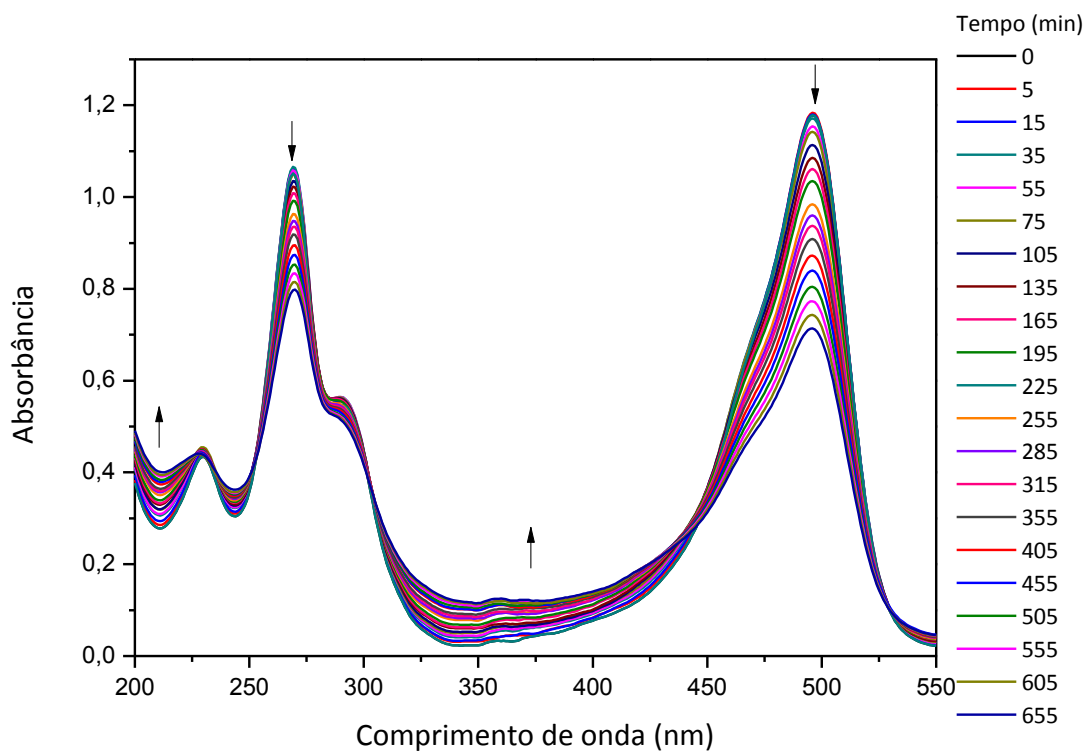


Figura 59. Espectros de absorção ótica do AL $2,5 \times 10^{-5}M$ e SDS 20mM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.

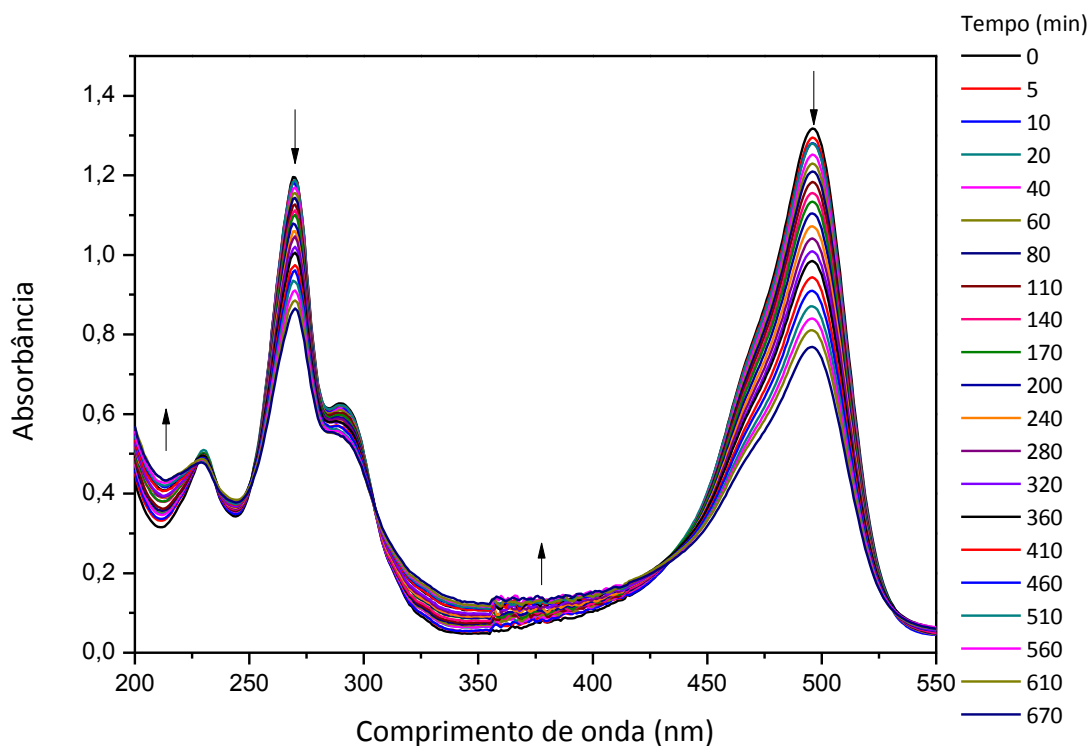


Figura 60. Espectros de absorção ótica do AL $2,5 \times 10^{-5}M$ e SDS 20mM na ausência de O₂, em função do tempo de irradiação.

Nas figuras 61 e 62 estão apresentadas as curvas de decaimento em função do tempo de irradiação da absorbância do AL em várias concentrações na sua interação com micelas de SDS na presença e na ausência do O₂. Os resultados dos ajustes dessas curvas de decaimento estão contidos na Tabela 5.

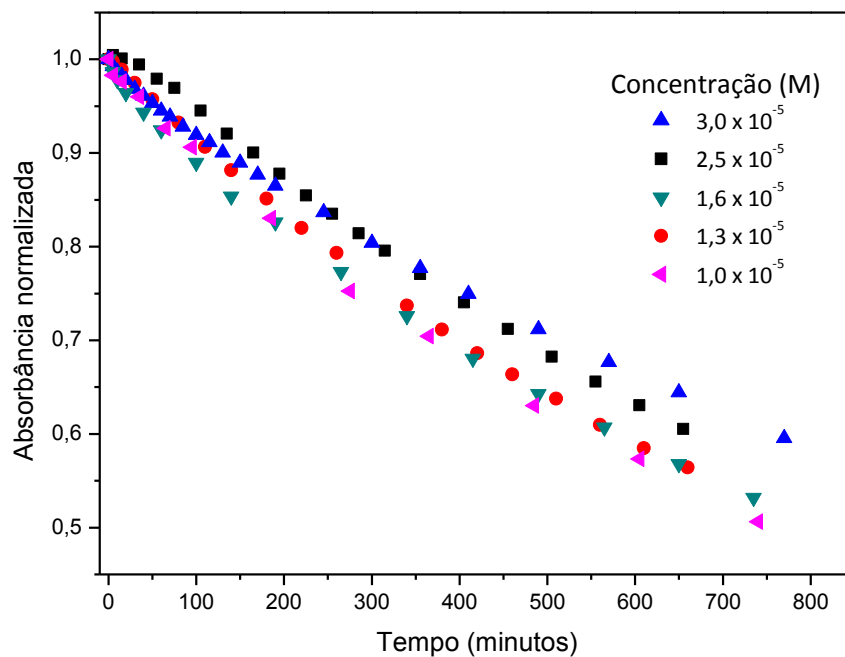


Figura 61. Decaimento da absorvância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 496$ nm da interação do AL com micelas de SDS na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

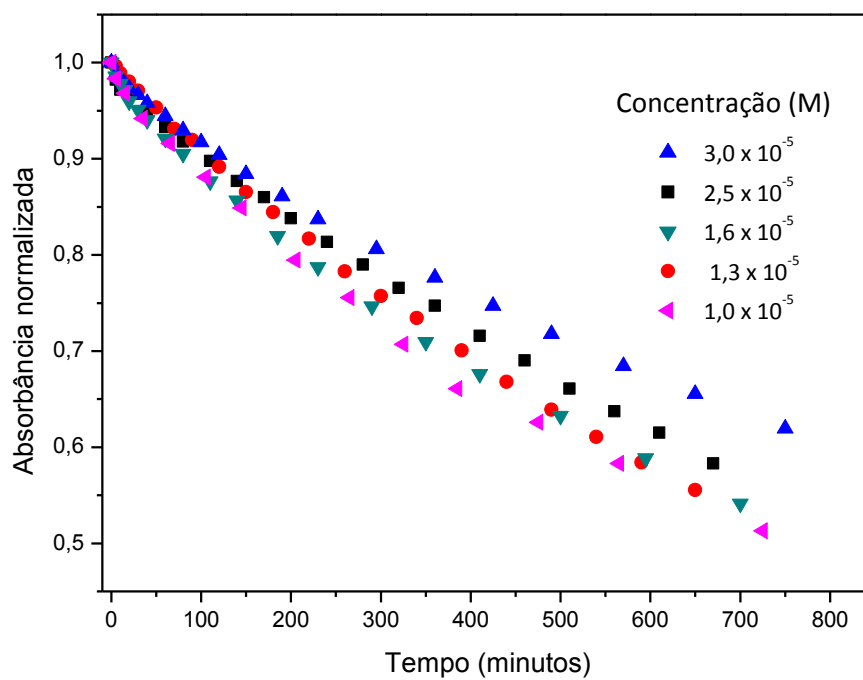


Figura 62. Decaimento da absorvância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 496$ nm da interação do AL com micelas de SDS na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Tabela 5. Valores das concentrações iniciais e tempos característicos da fotólise do Acridina Laranja com micelas de SDS 20mM (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

[AL](M)	τ (min)	
	com O ₂	sem O ₂
+ SDS 20mM		
3,0 x 10 ⁻⁵	1025 ± 62	811 ± 50
2,5 x 10 ⁻⁵	1948 ± 393	1084 ± 115
1,6 x 10 ⁻⁵	720 ± 58	635 ± 42
1,3 x 10 ⁻⁵	1088 ± 145	972 ± 36
1,0 x 10 ⁻⁵	813 ± 64	613 ± 43

Observando os dados da Tabela 5 podemos concluir que a interação com micelas de SDS diminui a velocidade de fototransformação do AL. Entretanto, não observamos qualquer dependência significativa da concentração do AL nessa velocidade. Um grande desvio experimental nos valores de τ pode ser associado com um tempo longo da irradiação, o que dificulta a estabilidade de parâmetros externos, tais como temperatura, durante o experimento. Um resultado interessante é que, diferente das soluções homogêneas e na presença do DNA, os tempos característicos da fotólise em experimentos com SDS são menores na ausência do O₂ do que na sua presença, um fato que ainda não conseguimos explicar e que necessita de estudos adicionais. Entretanto, os estudos de fosforescência do oxigênio singleto (Figuras 63, 64 e 65) mostraram que na presença de micelas o oxigênio singleto também se forma, mas o tempo característico da sua acumulação é maior do que nas soluções homogêneas e não tem dependência significativa com a concentração do SDS. Isto indica que, semelhantemente ao DNA, as micelas de SDS também diminuem a probabilidade dos contatos entre as moléculas de AL e do O₂. Este efeito pode ser associado à:

- maior viscosidade do ambiente nas micelas onde as moléculas do AL e do O₂ se encontram, se comparar com soluções homogêneas;
- localização preferencial das moléculas do AL e do O₂ nas regiões diferentes das micelas.
- diminuição da polaridade do ambiente onde o AL se encontra diminui a velocidade da sua fototransformação.

Para confirmar estas hipóteses precisamos também realizar estudos adicionais no futuro.

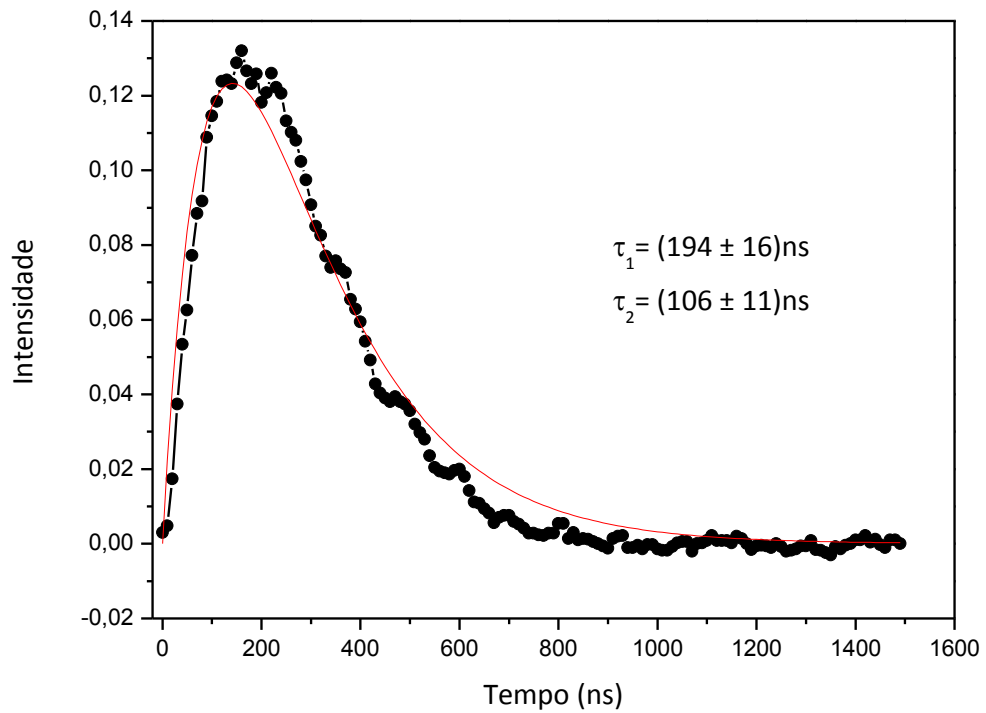


Figura 63. Intensidade de fosforescência do oxigênio singlete da solução de AL e SDS 5 μM em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).

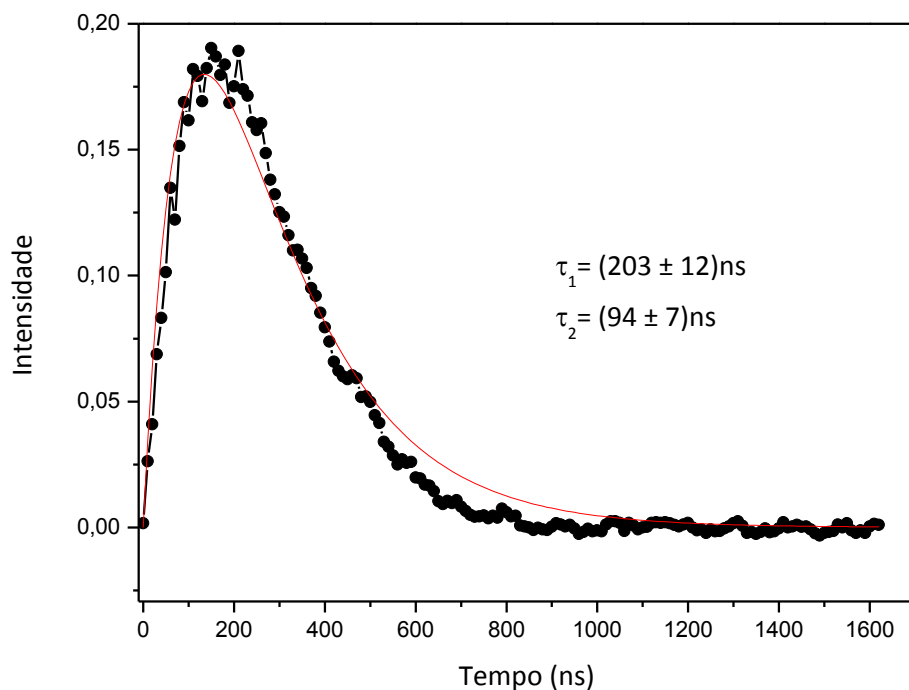


Figura 64. Intensidade de fosforescência do oxigênio singlete da solução de AL e SDS 20 μM em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).

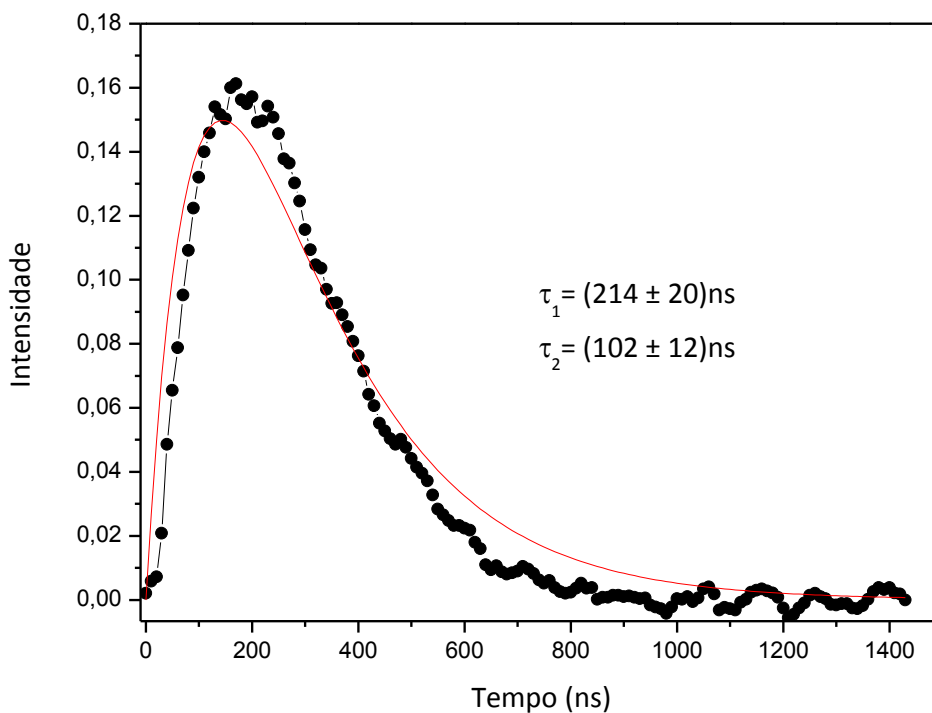


Figura 65. Intensidade de fosforescência do oxigênio singlete da solução de AL e SDS 100 μM em 1270 nm. – Ajuste através da equação (25).

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, podemos fazer uma comparação dos experimentos em soluções aquosas de AL, e experimentos de sua interação com sistemas nanoorganizados, como DNA e micelas de SDS.

Para experimentos de AL em soluções aquosas, podemos verificar que a variação da concentração do corante nos fornece uma informação sobre a presença de agregados. Isto se deve ao fato de o corante apresentar, simultaneamente, uma certa solubilidade em água, mas também hidrofobicidade devido ao sistema de conjugação π em sua estrutura. Nos experimentos de fotólise do corante em soluções aquosas, observa-se que o AL sofre fototransformação sob a ação da luz visível. Os tempos característicos de fototransformação encontrados a partir desses experimentos nos mostram que o AL se transforma mais rapidamente quando sua concentração é menor. Este efeito foi associado à formação de agregados em altas concentrações do composto. Consideramos que os agregados do AL não possuem fotoatividade e não se transformam sob ação da luz visível. Os monômeros, presentes na solução e em equilíbrio com os agregados, se transformam sob ação da luz, diminuindo a concentração total do AL, fazendo com que se possa observar a diminuição da absorvância nos espectros. Simultaneamente, novos monômeros saem dos agregados e também se transformam, gerando assim novas fototransformações. Experimentos com efeito do oxigênio complementaram estas análises, de forma que as moléculas do AL excitadas transferem sua energia para oxigênio molecular formando o oxigênio singlete que, por sua vez, pode atacar as ligações duplas do sistema de conjugação π da estrutura do AL e, assim, contribuir para a sua fototransformação. Experimentos de fluorescência resolvida no tempo indicaram que o decaimento da fluorescência do AL em soluções homogêneas tem caráter mono-exponencial com o tempo de vida do estado excitado de $1,8 \pm 0,1$ ns.

Nos experimentos da interação do AL com DNA, verificamos que, em solução, coexistem no mínimo três espécies em equilíbrio e isto pode ser verificado através das visíveis mudanças nos espectros de absorção e também na variação da intensidade de fluorescência. Estas espécies que se encontram em equilíbrio correspondem aos monômeros livres de AL, agregados ligados ao DNA e monômeros de AL ligados ao DNA. De forma geral, verificamos que o máximo de agregação ocorre quando as concentrações do AL e do DNA são iguais. A espectroscopia de fluorescência com resolução temporal mostrou que, diferentemente do que ocorre em soluções aquosas, o perfil do decaimento para a interação do AL e DNA é do tipo bi-exponencial. Uma componente de decaimento está relacionada aos monômeros de AL (que não estão ligados ao DNA) e a outra está relacionada aos monômeros de AL ligados ao DNA. A ausência de uma terceira componente (que poderia ser associada

aos agregados) nos comprova que os agregados não apresentam fluorescência. Os experimentos de dinâmica de fototransformação revelam que na presença de DNA, o processo de fotólise é mais lento, se comparado com experimentos em soluções homogêneas. Este efeito foi explicado pelos seguintes possíveis mecanismos:

- a intercalação do AL na estrutura do DNA, onde o AL fica preso, diminui sua velocidade de fototransformação devido ao “efeito de gaiola”;
- a diminuição da polaridade do ambiente onde a AL se encontra dentro da estrutura do DNA diminui a velocidade da sua fototransformação.

Semelhantemente aos experimentos em soluções homogêneas, diante da presença de oxigênio molecular, a velocidade de fototransformação é maior, mostrando a participação do oxigênio singlete no processo. Entretanto, os experimentos para detecção do oxigênio singlete mostram que a intercalação do AL dentro da estrutura do DNA protege as moléculas do corante contra o contato com O_2 , diminuindo assim a velocidade da transferência da energia do estado tripleto do AL para o O_2 .

Finalmente, os resultados dos experimentos da interação do AL com SDS mostram que a presença de SDS altera as características espectrais do AL da seguinte maneira: (i) em concentrações menores que a CMC, o SDS estimula a formação de agregados de AL (ii) em concentrações de SDS iguais à CMC, o AL se desagrega, formando monômeros ligados às micelas de SDS. Tais efeitos foram comprovados por todas as técnicas utilizadas (absorção ótica, fluorescência e espalhamento ressonante da luz). Os experimentos de fluorescência com resolução temporal apresentam um resultado semelhante aos estudos com DNA, no que diz respeito ao caráter bi-exponencial do decaimento. Uma das componentes está associada aos monômeros de AL e a outra aos monômeros de AL ligados ao SDS. A dinâmica de fototransformação nos forneceu os seguintes resultados da interação do AL com SDS: a presença de micelas diminui a velocidade de fototransformação, efeito semelhante ao observado no caso de DNA, que explicamos da mesma maneira. Não foi observada qualquer dependência significativa da concentração do AL neste processo. Este resultado pode ser entendido, lembrando que o efeito da concentração está associado com a agregação do AL. Entretanto, nos experimentos de fototransformação na interação com micelas de SDS, o AL foi totalmente desagregado em todas as concentrações utilizadas. Por isso, nesse caso, a velocidade de fototransformação não depende da concentração do AL. Além disso, diferentemente dos experimentos anteriores, na presença de SDS, foi observado que os tempos de fototransformação são menores na ausência do oxigênio molecular do que na sua presença, fato este que precisa ser explicado através de outros estudos. Independentemente, os

experimentos para a detecção do oxigênio singlete mostraram a formação deste, porém, o tempo característico de sua acumulação é maior do que nos experimentos em soluções homogêneas. As micelas, assim como o DNA, podem diminuir a probabilidade de contato do AL com o oxigênio molecular, devido à viscosidade do ambiente micelar e também à diferença na localização preferencial das moléculas do corante nas micelas.

Conclusões gerais

1. Sob a ação da luz visível, o Acridina Laranja sofre fototransformação, o que pode afetar nas suas aplicações práticas devido à perda da sua fotoatividade.
2. O processo de agregação diminui a velocidade de fototransformação do Acridina Laranja.
3. A interação com sistemas nanoorganizados, tais como DNA e micelas, estimula a agregação do Acridina Laranja, provavelmente devido à diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas do corante por causa da compensação de sua carga positiva com cargas negativas do DNA ou surfactante (SDS).
4. Ainda na ausência da agregação, a interação com estruturas nanoorganizadas diminui a velocidade de fototransformação do Acridina Laranja, o que pode ser explicado pelos seguintes possíveis mecanismos: a intercalação do AL na estrutura do DNA, onde o AL fica preso, diminui a sua velocidade de fototransformação devido ao “efeito de gaiola” e/ou a diminuição da polaridade do ambiente onde a AL se encontra dentro da estrutura do DNA diminuindo a velocidade da sua fototransformação.
5. O oxigênio molecular participa da fototransformação do Acridina Laranja na forma de oxigênio singlete, formado pela transferência de energia das moléculas do corante para oxigênio molecular.
6. A interação do Acridina Laranja com estruturas nanoorganizados produz um obstáculo para o contato entre as moléculas do corante e do oxigênio molecular.

Perspectivas futuras

Durante a execução dos estudos apresentados sentimos a necessidade de esclarecer vários aspectos da fototransformação do Acridina Laranja na sua interação com sistemas nanoorganizados. Para o esclarecimento desses aspectos é necessário fazer estudos adicionais que não conseguimos realizar dentro trabalho apresentado. Por isso planejamos no futuro realizar seguintes estudos:

1. Criar um modelo matemático adequado para o processo de fototransformação do Acridina Laranja na presença dos seus agregados.
2. Esclarecer o efeito de agregação no processo de fototransformação do Acridina Laranja na sua interação com sistemas nanoorganizados.
3. Estudar de forma mais profunda o efeito da estrutura dos sistemas nanoorganizados, em particular, sua carga, na sua interação com Acridina Laranja e no processo do seu fototransformação.
4. Esclarecer o efeito do oxigênio no processo de fototransformação do Acridina Laranja na sua interação com micelas.
5. Estudar de forma mais profunda o efeito da estrutura dos sistemas nanoorganizados na formação do oxigênio singleto, devido a sua interação com o Acridina Laranja.

A realização desses estudos pode dar informações importantes para o esclarecimento de mecanismos gerais da interação de fotossensibilizadores orgânicos com sistemas de micro- e nano escala de interesse médico, biológico e suas aplicações técnicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, Sheffield, v.74, n.5, p. 656–669, nov. 2001.

AICH et al. 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.

ANGHEL, D.; CIONAN, N. Critical micelle concentration (CMC) determination with the aid of liquid membrane electrode sensitive to dodecyl sulfate anion. **Colloid and Polymer Science**, v.254, p.114-115, 1976.

BAGNATO, V. S. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. 1ª Edição. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2008.

BENVIN, A. L. et al. Fluorescent DNA nanotags: Supramolecular fluorescent labels based on intercalating dye arrays assembled on nanostructured DNA templates. **Journal of the American Chemical Society**, v.129, n.7, p. 2025-2034, 2007.

BONNETT, R., Photosensitizers of the Porphyrin and Phthalocyanine Series for Photodynamic Therapy. **Chemical Society Reviews**, v.24, p.19-33, 1995.

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**, v.343, p.281-286, 1997.

BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **TheLancet Oncology**, v.5, n.8, p.497-508, 2004.

BYRNE, C. J. et al. The photodynamic therapy (TFD) anticancer activity of a range of porphyrin dimers and related compounds derived from hematoporphyrin. **Australian Journal of Chemistry**, v.57, n.11, p.1091-1102, 2004.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K.; Photodynamic therapy for câncer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.380-387, 2003.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. **Cancer Research**, New York, v.38, p. 2628-2635, 1978.

GU, J. et al. Self-assembled dye-DNA network and its photoinduced electrical conductivity, **Applied Physics Letters**, v.80, n.4, p. 688-690, 2002.

GURRIERI et al. Real-time imaging of the reorientation mechanisms of YOYO-labelled DNA molecules during 90° and 120° pulsed field gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v.24, n.23, p. 4759-4767, 1996.

HAMBLIN, M. R.; HASAN, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? **Photochemistry and Photobiology Sci.**, Boston, v.3, n.5, p.436-50, 2004.

ISHIKAWA, S. et al. Photodynamic Inactivation of Bladder Cancer Cells (MGH-UI) Sensitized with Acridine Orange and Irradiated by Argon Laser . **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. v.144, p.265-271, 1984.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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**, New York, v.32, n.24, p.3679-3694, 1983.

KASHA, M. Energy transfer mechanisms and molecular exciton model for molecular aggregates. **Radiation Research**, v.20, n.1, p.55-71, 1963.

KASUMOV, A.Y. et al. Proximity-induced superconductivity in DNA, **Science**, v.29, p. 280-282, 2001.

KELLEY, S. O.; BARTON, J. K. Electron transfer between bases in double helical DNA. **Science**, v.283, n.5400, p. 375-381, 1999.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Geneva, v.66, p.89-106, 2002.

KUBOTA, Y.; STEINER, R.F. Fluorescence decay and quantum yield characteristics of acridine orange and proflavine bound to DNA. **Biophysical Chemistry**. v.6, n.3, p. 279-289, 1977.

KUSUZAKI, K. et al. Clinical Outcome of a Novel Photodynamic Therapy Technique Using Acridine Orange for Synovial Sarcomas. **Photochemistry and Photobiology**, Kyoto, v.81, p. 705-709, jan. 2005.

LAKOWICZ, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Prenum Publishers, 1999.

LE BAHERS, T. et al. Acridine orange in a pumpkin-shaped macrocycle: Beyond solvent effects in the UV-visible spectra simulation of dyes. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**. Paris, v.954, p. 45-51, jan. 2010.

LEE, S. W. et al. "Bottom-up" approach for implementing nano/microstructure using biological and chemical interactions, **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.12; p.185-199, 2007

LICHA, K.; OLBRICH, C. Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, n.8, p.1087-1108, 2005.

LIPSON, R. L.; BALDES, E. J. The Photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate. **Archives Dermatologie**, v.82, p.508-16, 1960.

LYLES, M. B.; CAMERON, I. L.; RAWLS, H. R. Structural basis for the binding affinity of xanthenes with the DNA intercalators Acridine orange. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p.4650-4660, 2001.

MAKAROV, D. A.; KUZNETSOVA, N. A.; KALIYA, O. L. Regularities of the Photodestruction of Acridine Dyes in Aqueous Media. **Russian Journal of Physical Chemistry**, Moscow, v.80, n.2, p. 268-274, 2006.

MANENTE, S. et al. A comparison between the responses of neutral red and acridine orange: Acridine orange should be preferential and alternative to neutral red as a dye for the monitoring of contaminants by means of biological sensors. **Analytical Biochemistry**, v. 383, p.316-319, 2008.

MARANHO, D. S.; *Estudo da associação de complexos nitrosilos de rutênio liberadores de NO com o agente fotossensibilizador Zinco ftalocianina ZnPC em sistemas de liberação utilizados na Terapia Fotodinâmica*. 2008. 96p. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

NAKAMURA, T. et al. A new limb salvage surgery in cases of high-grade soft tissue sarcoma using photodynamic surgery, followed by photo- and radiodynamic therapy with acridine orange. **Journal of Surgical Oncology**, v.97, p.523–528, 2008.

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

NEUGEBAUER, J. A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, Calbiochem-Novabiochem International, 1994.

NOKHRIN, S.; BARU, M.; LEE, J. S. A field-effect transistor from M-DNA. **Nanotechnology**. v.18, p.1-5, 2007.

OHTSU, T.; NISHIDA, K.; TSUDA, K. Dye aggregations or crystals of acridine orange within natural fibres. **Progress in Colloid and Polymer Science**, n.58, p.136-140, 1975.

OLEINICK, N. L.; EVANS, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms. **Radiation Research Society**, v. 150, p.146–156, 1998.

PASTERNAK, R. F. et al. Porphyrin assemblies on dna as studied by resonance lightscattering technique. **Journal of American Chemical Society**, Pennsylvania, v.15, p. 5393–5399, 1993.

RAKITIN, A. et al. Metallic conduction through engineered DNA: DNA Nanoelectronic building blocks, **Physical. Review. Lettters**. v.86, n.16., p. 3670-3673, 2001.

RUBIN, P. *Manual de clínica oncológica: aspectos multidisciplinares* 4ª Edição, 1977, São Paulo: Ed. Sarvier.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Discovery Today**, Quebec, v.4, n.1, p. 507-517, 1999.

SHINODA, K.; T. NAKAGAWA, T.; TAMAMUSHI, B.; T. ISEMURA, T. Colloidal Surfactants; Some Physicochemical Properties, New York, 1963.

SHKLYAREVSKIY, O. et al. Magnetic field induced alignment of cyanine dye J-aggregates. **Journal of Chemical. Physics**. v.116, n.19, p.8407-8410, 2002.

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

TOMSON, S. H.; EMMETT, E. A.; FOX, S. H. Photodestruction of mouse epithelial tumors after oral acridine orange and argon laser. **Cancer Research**, v.34, p.3124-3127, 1974.

TRIVEDI, N. S., et al. Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. **Photochemistry and Photobiology**, v.71, n.5, p.634-639, 2000.

TURRO, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. 1978.

VAN DER AUWERAER, M.; SCHEBLYKIN, I. One-dimensional J-aggregates: Dependence of the properties of the exciton band on the model of the intermolecular coupling. **Chemical Physics**, v. 275, n.1-3, p.285-306, 2002.

VON BERLEPSCH, H.; KIRSTEIN, S.; BOTTCHEER, C. Effect of alcohols on J-aggregation of a carbocyanine dye, **Langmuir** **18**, v.20, p.7699-7705, 2002.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)