



Universidade Federal de Pelotas
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós-Graduação em Química

Dissertação

**Determinação das propriedades fotofísicas e fotoquímicas de
corantes fenotiazínicos em misturas binárias de
água/solvente orgânico.**

Luiza Rosimeri Romano Santin

Pelotas, março de 2014

LUIZA ROSIMERI ROMANO SANTIN

**Determinação das Propriedades Fotofísicas e Fotoquímicas de
Corantes Fenotiazínicos em Misturas Binárias de
Água/Solvente Orgânico.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área do conhecimento: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira

Co-Orientadora: Prof^a.Dr^a. Daniela Bianchini

Pelotas, março de 2014

A banca examinadora, abaixo assinada, _____ a Dissertação de Mestrado intitulada “**Determinação das propriedades fotofísicas e fotoquímicas de corantes fenotiazínicos em misturas binárias de água/solvente orgânico**”, de autoria de Luiza Rosimeri Romano Santin

Banca examinadora:

Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira (Orientador)

Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho (UFPel)

Prof^a. Dr^a. Daiane Dias (FURG)

Agradecimentos

A Deus por ter me dado força e perseverança para realizar este trabalho.

Aos professores Dr. Hueder Paulo Moises de Oliveira e Dra. Daniela Bianchini pela orientação e co-orientação, aprendizado, incentivo, confiança e amizade sempre presentes durante a realização deste trabalho.

A minha família pela compreensão, paciência e pelo apoio incondicional ao longo desta jornada.

Ao professor Dr. Amando Siuiti Ito (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto-SP) pela utilização do equipamento de tempo de vida com resolução temporal.

Aos Professores Dr. Maurício Baptista da Silva (Instituto de Química, USP, São Paulo-SP) e Dr. Adjaci Uchôa Fernandes (Unicastelo, São José dos Campos-SP) por terem cedido os corantes DMAM, Th, AA e AB.

Aos professores Dr. Wilker Caetano e Dr. Noboru Hioka (Departamento de Química, UEM, Maringá-PR) pela utilização dos equipamentos em seu laboratório e pelas sugestões e discussões sempre muito proveitosas.

Aos professores do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) e do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) pelos conhecimentos transmitidos durante a vida acadêmica.

Ao Diogo La Rosa (o aprendiz de feiticeiro) pela contribuição direta para a realização do trabalho.

Em especial para a Francielle (Fran) pelo apoio, amizade e contribuição direta para a realização deste trabalho.

A todos os companheiros de laboratório, atuais e aos que já concluíram: Lara Montenegro, Luana Vohlbrecht, Jordana Griep, Fabiele Collovini, Lara Loguercio, Gabriela Teixeira, Carolina Alves, Marony Gutierrez, Anderson Thesing, Gilsania Timm, Jordana Luft, Patrícia Bersch, Bruna Paiva e demais membros do grupo que de uma forma ou de outra, ajudaram na conclusão deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A Chamada Pública MCT/CNPq/MEC/CAPES - Ação Transversal nº 06/2011 - Casadinho/Procad - Processo nº 552197/2011-4.

Resumo

SANTIN, Luiza Rosimeri Romano. **Determinação das propriedades fotofísicas e fotoquímicas de corantes fenotiazínicos em misturas binárias de água/solvente orgânico**. 2014. 117f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O presente trabalho avaliou o comportamento do corante azul de metileno (AM) e seus análogos dissolvidos em misturas binárias de água/solvente orgânico com relação ao efeito da concentração do corante, dos substituintes presentes no corante e da polaridade do solvente. Observou-se que o aumento da concentração do corante no meio levou a um aumento na intensidade de absorção. Além disso, o aumento da concentração do corante em meio aquoso evidenciou o efeito de agregação dos corantes. De modo geral, o aumento da polaridade do solvente levou a um deslocamento batocrômico do comprimento de onda máximo de absorção da banda do monômero. Por outro lado, o aumento do grau de desmetilação dos grupamentos amino dos corantes conduziu a um deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda máximo de absorção do monômero em meio aquoso.

Os valores de tempo rotacional obtidos para o corante AM nos solventes puros seguem a ordem: τ_r acetoneitrila < τ_r etanol < τ_r glicérol. Este resultado está de acordo com a ordem de viscosidade dos meios: η acetoneitrila < η etanol < η glicérol. Assim, pode-se inferir que à medida que a viscosidade do meio aumenta, o tempo rotacional também aumenta, claramente influenciado pelo parâmetro viscosidade. Com relação ao tempo de vida de fluorescência dos corantes AM e 1,9-dimetil azul de metileno (DMAM) em misturas binárias de água/solvente orgânico, menores tempos de vida foram observados para as misturas contendo um maior teor de água, o que pode ser atribuído ao efeito da polaridade do solvente.

Abstract

SANTIN, Luiza Rosimeri Romano. **Determinação das propriedades fotofísicas e fotoquímicas de corantes fenotiazínicos em misturas binárias de água/solvente orgânico**. 2014. 117f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

This study has evaluated the behavior of the methylene blue (MB) and its analogues dissolved in binary mixtures of water/organic solvent with respect to the effect of the concentration of dyes, substituents on dye structures and polarity of solvents. It was observed that the concentration of dye in the medium leads to an increase in the intensity of absorption. Furthermore, the increase of the concentration of dye in aqueous medium has shown the effect of aggregation of dyes. In general, the increasing solvent polarity results in a bathochromic shift of the maximum wavelength of the absorption band of the monomeric specie. On the other hand, the increasing content of demethylation of the amino groups of dyes leads to a hypsochromic shift of the wavelength of absorption of the monomeric specie in aqueous medium.

The values obtained for the rotational time of the MB dye in pure solvents are in the following the order: τ_r acetonitrile $<$ τ_r ethanol $<$ τ_r glycerol. These results are in agreement with the order of the solvent viscosity: η acetonitrile $<$ η ethanol $<$ η glycerol. Thus, it was observed that the increasing rotational time is clearly influenced by the viscosity parameter. Concerning to the fluorescence lifetime of the MB and 1,9-dimethyl methylene blue (DMMB) in binary mixtures of water/organic solvent, lower lifetimes were observed for mixtures containing higher water content, which can be assigned to the effect of solvent polarity.

Sumário

Lista de Figuras	9
Lista de Tabelas	15
Lista de Abreviaturas e Siglas	16
1 – Introdução	18
1.1 - Corantes	18
1.1.1 – Corantes Fenotiazínicos	20
1.1.1.1 - Azul de Metileno (AM) e 1,9-dimetil azul de metileno (DMAM)	22
1.1.1.2 – Tionina (Th).....	24
1.1.1.3 – Azures	25
1.2 - Efeito solvente	25
1.3 - Agregação	31
1.4 - Técnicas de caracterização	35
1.4.1 – Espectroscopia molecular de UV-Vis.....	35
1.4.2 - Espectroscopia de Fluorescência.....	37
1.4.2.1 - Fluorescência Fotoestacionária	37
1.4.2.2 - Fluorescência Resolvida no Tempo: Técnica de Contagem de Fótons	41
1.4.2.3 - Anisotropia de fluorescência	43
2 - Objetivos	52
3 - Materiais e Métodos	54
3.1 - Materiais	54
3.2 - Metodologias	54
4 - Resultados e Discussão	58
4.1 - Absorção das misturas binárias dos corantes fenotiazínicos.....	58
4.1.1 - Azul de metileno	58
4.1.2 - 1,9-Dimetil Azul de Metileno	64
4.1.3 – Tionina	70
4.1.4 - Azures.....	75
4.1.4.1 - Azure A	75
4.1.4.2 – Azure B	81
4.2 - Tempo de Vida de Fluorescência	87
4.3 - Tempo Rotacional	91

4.4 – Resultados do Surfactante.....	97
5 – Considerações Gerais.....	102
6 – Conclusões	104
7 – Perspectivas Futuras.....	106
8 – Referências.....	108

Lista de Figuras

Figura 1 – Fórmula estrutural geral dos corantes fenotiazínicos.	21
Figura 2 – Fórmula estrutural dos corantes fenotiazínicos. (A) Azul de Metileno; (B) 1,9-Dimetil azul de metileno; (C) Tionina; (D) Azure A; (E) Azure B.	22
Figura 3 – (A) Representação esquemática do agregado tipo H do azul de metileno. (B) Representação esquemática do agregado tipo J do azul de metileno.	23
Figura 4 – Diagrama de energia de bandas de excitação de moléculas de dímero (A) Configuração paralela e ângulo interno plano. (B) Configuração oblíqua e ângulo interno não-planar.	33
Figura 5 – Ilustração dos agregados H e J de moléculas de corantes em água.	34
Figura 6 - Esquema da decomposição do espectro na forma Gaussiana.	35
Figura 7 - Atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente. O caminho óptico da solução absorvente é igual a b . P_0 representa o feixe incidente e P , o feixe após passar pela amostra.	36
Figura 8 - Diagrama de Jablonski.	39
Figura 9 - Conversão amplitude-tempo em um TAC.	42
Figura 10 - Representação esquemática dos planos de polarização da luz incidente e fluorescente para medidas de anisotropia de fluorescência.	44
Figura 11 - Sistema de coordenadas para a caracterização do momento de transição do fluoróforo – onde E é o plano de polarização da luz incidente, ME momento de dipolo de transição do fluoróforo e θE o ângulo formado entre os dois dipolos.	45

Figura 12 - Espectros de absorção de AM ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes meios.....58

Figura 13 - Razão dímero/monômero (D/M) para o AM em diferentes meios.59

Figura 14 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/acetonitrila. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.60

Figura 15 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.61

Figura 16 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/etanol. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.62

Figura 17 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/glicerol. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.63

Figura 18 - Espectros de absorção de DMAM ($5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes solventes.64

Figura 19 - Razão dímero/monômero (D/M) para o DMAM em diferentes meios.65

Figura 20 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/acetonitrila. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda

máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.
.....66

Figura 21 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.
.....67

Figura 22 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/etanol. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.
.....68

Figura 23 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/glicerol. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.
.....69

Figura 24 - Espectros de absorção de Th ($3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹) em diferentes meios. ...70

Figura 25 - Razão dímero/monômero (D/M) para a Th em diferentes meios.71

Figura 26 - Espectros de absorção de Th na mistura binária de água/acetoneitrila. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros de Th $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.72

Figura 27 – Espectros de absorção de Th na mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros

de Th $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.....73

Figura 28 – Espectros de absorção de Th na mistura binária de água/etanol. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de Th $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.....74

Figura 29 – Espectros de absorção de Th na mistura binária de água/glicerol. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de Th $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.....75

Figura 30 - Espectros de absorção do AA ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes meios. ...76

Figura 31 – Espectros de absorção do AA na mistura binária de água/acetonitrila. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AA $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AA em misturas com diferentes composições molares.77

Figura 32 – Espectros de absorção de AA nas mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.....78

Figura 33 - Espectros de absorção de AA nas misturas binárias de água/etanol. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AA $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.....79

Figura 34 - Espectros de absorção de AA nas misturas binárias de água/glicerol. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros

de AA $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.....	80
Figura 35 - Espectros de absorção de AB ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes solventes.	81
Figura 36 - Razão dímero/monômero (D/M) para o AB em diferentes meios.....	82
Figura 37 - Espectros de absorção de AB nas misturas binárias de água/acetonitrila. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AB em misturas com diferentes composições molares.	83
Figura 38 – Espectro de absorção de AB nas misturas binárias de água/dioxano. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AB em misturas com diferentes composições molares.	84
Figura 39 - Espectros de absorção de AB nas misturas binárias de água/etanol. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AB em misturas com diferentes composições molares.	85
Figura 40 – Espectros de absorção de AB nas misturas binárias de água/Glicerol. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AB em misturas com diferentes composições molares.	86
Figura 41 - Perfil de decaimento de fluorescência do DMAM ($1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes misturas de água/acetonitrila.....	87

Figura 42 - Relação entre o tempo de vida de fluorescência do AM e do DMAM em diferentes concentrações com a escala de polaridade E_T (30) e com a constante dielétrica (ϵ). Os solventes são: (a) acetonitrila, (b) etanol, (c) glicerol e (d) água. ...89

Figura 43 - Relação entre o tempo de vida de fluorescência do AM, em diferentes concentrações, com a viscosidade dos solventes: (a) acetonitrila, (b) etanol e (d) água. Inseto - Relação entre o tempo de vida de fluorescência do AM, em diferentes concentrações, com a viscosidade do solvente glicerol (c).92

Figura 44 - Tempo de vida rotacional do AM em diferentes concentrações e viscosidades das misturas binárias: (A) água/acetonitrila; (B) água/etanol; (C) água/glicerol.93

Figura 45 - Estruturas dos *clusters* observados nas misturas binárias: a) água/acetonitrila (1 molécula de acetonitrila para 21 moléculas de água), b) água/álcool (1 molécula de álcool para 20 moléculas de água).94

Figura 46 - Espectro de absorção do DMAM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com a adição de SDS. (A) Região pré-micelar. Inseto – Intensidade de absorção em $\lambda_{\text{abs}} 656 \text{ nm}$ vs [SDS], cuja curva foi ajustada pela Equação 34 e (B) Pós-micelar. . Inseto – Intensidade de absorção em $\lambda_{\text{abs}} 656 \text{ nm}$ vs [SDS], cuja curva foi ajustada pela Equação 34.98

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Transições características de alguns grupamentos presentes em cromóforos..	27
Tabela 2 - Valores de tempo de vida de fluorescência (τ ps) para o AM nas concentrações de $1 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹ , $5 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹ e $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ em misturas binárias de água/acetonitrila, água/etanol e água/glicerol.	88
Tabela 3 - Valores de tempo de vida de fluorescência (τ ps) para o DMAM nas concentrações de $1 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹ , $5 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹ e $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ em misturas binárias de água/acetonitrila e água/etanol.	88
Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos dos solventes - escala E _T (30), momento de dipolo (μ), constante dielétrica (ϵ), viscosidade absoluta (η) e índice de refração (n).	90
Tabela 5 - Valores de tempo rotacional (τ_r ps) para o AM nas concentrações de $1 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹ , $5 \cdot 10^{-6}$ mol.L ⁻¹ e $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol.L ⁻¹ em misturas binárias de água/acetonitrila, água/etanol e água/glicerol.	91
Tabela 6 - Constantes de ligação em SDS calculadas pela Equação 34 na região pré-micelar para os corantes em estudos em micelas de SDS a de 25°C.	99
Tabela 7 - Constantes de ligação em SDS calculadas pela Equação 34 na região pós-micelar para os corantes em estudos em micelas de SDS a de 25°C.	99

Lista de Abreviaturas e Siglas

AA – Azure A

AB – Azure B

AM – Azul de metileno

CI – Conversão interna

CIS – Cruzamento intersistemas

CMC - Concentração micelar crítica

DMAM – 1,9-dimetil azul de metileno

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPIBF - 1,3-difenilisobenzofurano

FS - Fotossensibilizador

HOMO - Orbital molecular ocupado de maior energia, do inglês *Highest Occupied Molecular Orbitals*

LUMO - Orbital molecular não ocupado de menor energia, do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbitals*

MDT – Momento dipolar de transição

nr – não-radiativo

PACT - quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana

PAM – poli(azul de metileno)

S₀ - estado fundamental

S₁ - estado excitado

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SI - Sistema Internacional

TFC – Técnica de contagem de fóton

TFD – Terapia fotodinâmica

Th – Tionina

TIC - Transferência intramolecular de carga

TICT - Transferência intramolecular de carga torcida

TMS - tetrametilsilano

ϕ = rendimento quântico de fluorescência

ϵ = coeficiente de extinção molar ou coeficiente de absorvidade molar

1 - Introdução

1 – Introdução

1.1 - Corantes

Os corantes são substâncias que absorvem energia em comprimentos de onda na região do visível. As transições que ocorrem na região do visível são de energia mais baixa do que aquelas que ocorrem na região do ultravioleta, o que significa que as transições na região do visível apresentam uma diferença de energia pequena entre o orbital molecular ocupado de maior energia (HOMO) e o orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO). Para que a transição eletrônica ocorra na região do visível, é necessária a absorção de energia em comprimentos de onda característicos, cujos valores são significativamente afetados pela presença de grupos funcionais - doadores ou retiradores de elétrons - e pela capacidade de deslocalização de carga na estrutura da molécula. Assim, substâncias que possuem um grande número de ligações conjugadas e que permitem a deslocalização de elétrons por toda sua estrutura, em geral, possuem cor. (Allinger, N. L.; et al. 1976; Solomons e Fryhle, 2008). Aproximadamente 10 mil compostos químicos coloridos são produzidos em escala industrial. Considerando o fato de absorverem luz em alguma região do espectro visível, alguns desses corantes são capazes de induzir ou participar de reações fotoquímicas (Machado, A.; E.; 2000).

Desde o início do século passado, sabe-se que os corantes são utilizados em histologia para a coloração de componentes celulares, podendo inativar microrganismos mesmo sob as condições de iluminação do microscópio. Na década de 30, foi mostrado que os vírus poderiam ser corados com os corantes fotossensíveis e no início da década de 60, foram relatados estudos quantitativos de inativação fotodinâmica de bactérias e vírus. O mecanismo de ação local e fototóxica em microrganismos depende acentuadamente do tipo de corante (Tuite e Kelly, 1993).

Os fotossensibilizadores fenotiazínicos têm sido utilizados na pesquisa foto-antimicrobiana por quase 80 anos. Nos últimos anos, houve um interesse crescente nos corantes fenotiazínicos devido à possibilidade de sua aplicação em terapia fotodinâmica (TFD) e na fabricação de biossensores, entre outros (Glusko, C. A.; et

al. 2011). O corante fenotiazínico azul de metileno (AM) foi o primeiro corante sintético usado como antisséptico na terapia clínica. Devido às suas propriedades fotofísicas, o azul de metileno em solução aquosa (AM^+), é frequentemente usado como um fotossensibilizador em reações induzidas por luz. Da mesma forma, os corantes Azure A (AA), Azure B (AB) e Tionina (Th), derivados desmetilados do AM, também são fotossensibilizadores promissores para TFD, tendo em vista que são mais estáveis em soluções aquosas quando comparados com AM^+ (Havelcová, et al. 2000). O principal alvo para ação biológica fotossensibilizada do AM e seus análogos é o ácido desoxirribonucleico (DNA). Tal ação fotodinâmica, normalmente na presença de oxigênio, pode prosseguir por inúmeras rotas ou envolver diretamente reações no estado excitado, como por exemplo, a transferência de elétrons ou a abstração de hidrogênio (Tuite e Kelly, 1993). Estudos com base no AM e seus análogos são particularmente importantes não apenas do ponto de vista da possibilidade de uso na TFD, mas também na fotodegradação de poluentes ambientais, no reconhecimento molecular e na modificação fotossensibilizada de DNA.

A TFD baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico e sensível à luz, seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. Na presença do oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador (FS) ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres, ou por transferência de energia ao oxigênio, levando à produção de oxigênio singlete. Ambos os caminhos podem levar à morte celular e à destruição do tecido doente (Perussi, J. R. 2007). O melanoma maligno representa cerca de 4% dos casos de câncer de pele e em 80% dos casos leva o paciente ao óbito, indicando assim a agressividade da doença. Quando o melanoma maligno é diagnosticado precocemente, a cirurgia pode ser a cura, porém, quando o melanoma maligno é diagnosticado em estágio avançado, este é inelegível à cirurgia. A TFD foi testada extensivamente para tumores de pele, mostrando-se eficaz para o carcinoma basocelular. Quanto ao corante, o AM tem mostrado resultados interessantes como FS para a TFD, apresentando-se como uma alternativa para pacientes com melanoma maligno que não são elegíveis para a cirurgia. O AM possui forte absorção de luz na região de 550-700 nm, com um máximo de absorção em 664 nm,

sendo esta uma vantagem importante em comparação com outros FS (Wagner, M.; et al. 2012).

Além das aplicações em TFD, o AM está sendo estudado como um fármaco promissor no tratamento da doença de Alzheimer e na síntese de polímeros condutores. No caso da doença de Alzheimer, o AM pode inibir a agregação da proteína tau e do peptídeo A β , retardando assim o progresso da doença (Sezgin, Z. et al. 2013). Quanto aos polímeros condutores, tem despertado grande interesse no ramo de células solares à base de polímeros para aplicação em eletrônica e em optoeletrônica. Os polímeros condutores podem ser sintetizados a partir de derivados de benzeno substituído, de complexos organometálicos ou compostos orgânicos que possuem heteroátomos. Um exemplo de polímero condutor sintetizado recentemente a partir de um corante é o poli(azul de metileno) (PAM), cuja estrutura ainda não foi completamente elucidada, mas já desperta interesse principalmente no ramo da biologia e medicina (Hichem, H.; et al. 2013).

1.1.1 – Corantes Fenotiazínicos

Fenotiazínico é um importante grupo de compostos heterocíclicos orgânicos, que têm uma variedade de aplicações médicas, biológicas e químicas. Eles são usados principalmente na coloração de substratos, coloração em estudos biológicos e médicos, sendo compostos promissores para aplicações como FS. As propriedades fotoquímicas e fotofísicas deste grupo de corantes têm sido demonstradas na literatura (Gilani, A.; G.; et al. 2013).

Os corantes fenotiazínicos caracterizam-se por apresentar uma estrutura tricíclica contendo nas posições 5 e 10, respectivamente, um átomo de enxofre e nitrogênio. A fórmula estrutural geral dos corantes fenotiazínicos está representada na Figura 1.

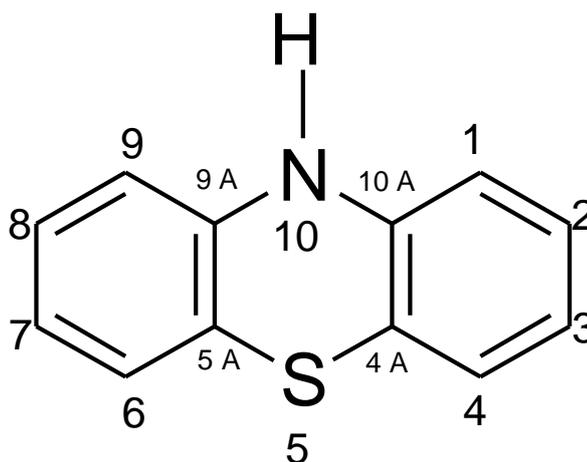


Figura 1 – Fórmula estrutural geral dos corantes fenotiazínicos.

FS comercialmente disponíveis com base no anel fenotiazínico têm encontrado considerável aplicação nos crescentes campos de TFD e quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT). O composto principal envolvido, o AM, é utilizado no tratamento de vários tipos de câncer (Wainwright, M.; et al. 2011).

A agregação dos corantes fenotiazínicos em solução é um fenômeno bem conhecido. A força de associação molecular nos corantes fenotiazínicos depende de vários fatores: concentração e estrutura do corante, temperatura, solvente, entre outros. Pesquisadores têm sugerido a formação de agregados maiores do que dímeros em solução e a presença destes, desempenha um papel importante em processos químicos e biológicos. As propriedades espectrais dos corantes fenotiazínicos são conhecidas por serem sensíveis à concentração e ao meio em que se encontram. Em solução aquosa, por exemplo, corantes fenotiazínicos apresentam agregados devido ao caráter hidrofóbico da estrutura molecular, sendo as suas propriedades ópticas fortemente influenciadas pelos fenômenos de agregação (Gilani, A. G.; et al. 2013). Sabe-se que estes fenômenos dependem fortemente da estrutura do corante. Dessa forma, os corantes fenotiazínicos (AM, AA, AB e Th) foram selecionados de acordo com o grau de metilação nos grupamentos amino, presentes nas posições 3 e 7 da estrutura geral (Figura 1), para estudar o efeito da metilação nos fenômenos de agregação dos corantes. O efeito da metilação nas posições 1 e 9 dos anéis aromáticos também foi estudado através do corante 1,9-dimetil azul de metileno (DMAM). Cabe salientar que todos estes possuem hidrogênio doador/aceitador e, portanto, é esperada a formação de ligação

de hidrogênio com solventes que apresentam hidrogênio de caráter doador/aceitador (Gilani, A. G.; et al. 2013). A estrutura molecular dos cinco corantes fenotiazínicos estudados neste trabalho estão mostradas na Figura 2.

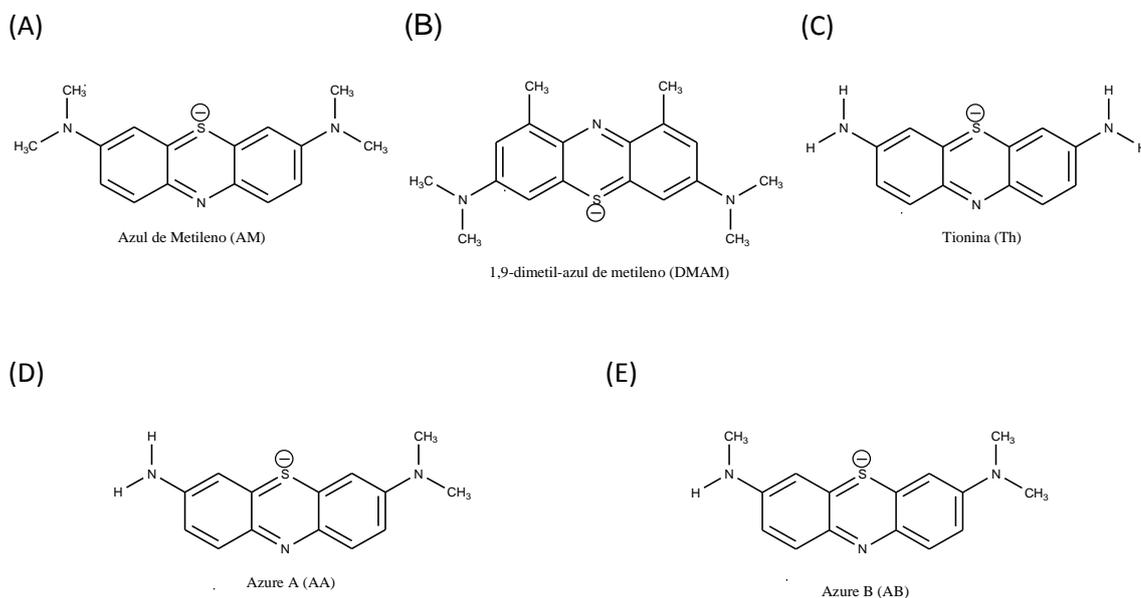


Figura 2 – Fórmula estrutural dos corantes fenotiazínicos. (A) Azul de Metileno; (B) 1,9-Dimetil azul de metileno; (C) Tionina; (D) Azure A; (E) Azure B.

1.1.1.1 - Azul de Metileno (AM) e 1,9-dimetil azul de metileno (DMAM)

O AM, mostrado na Figura 2A, é um corante fenotiazínico catiônico, cujas posições 3 e 7 da estrutura principal apresentam um grupamento amino dimetilado - $N(CH_3)_2$. Este corante pode ser obtido a um baixo custo e possui baixa toxicidade (Wagner, M.; et al. 2012). O espectro de absorção característico apresenta duas bandas principais em solução aquosa, em 293 nm (π - π^*) e 664 nm (n - π^*). A banda em 664 nm é atribuída à molécula do corante na forma monomérica (Heger, D.; 2005). Entretanto, dependendo do meio no qual se encontra, o AM pode apresentar uma banda correspondente a forma dimérica em aproximadamente 610 nm. Em meio aquoso, o AM apresenta um rendimento quântico de fluorescência (ϕ) de aproximadamente $\phi \sim 0,04$. Os coeficientes de extinção molar (ϵ) para as bandas centradas em 664 nm (monômero) e 610 nm (dímero) são $\epsilon \sim 7.10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon \sim 3.10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectivamente (Chen, J.; et al. 2010). O fenômeno de agregação

observado para o AM se deve à planaridade da sua estrutura, mesmo em baixas concentrações de corantes, associado à presença de substituintes hidrofílicos nos anéis hidrofóbicos do corante. Estes substituintes fazem interações intermoleculares com moléculas adjacentes do corante ou do solvente, o que determina o grau de agregação no meio. A agregação do tipo “face-a-face” (agregados do tipo H, Figura 3A) resulta em um deslocamento no $\lambda_{\text{máx}}$ para um comprimento de onda menor da banda espectral da transição π - π^* (deslocamento hipsocrômico), enquanto o arranjo “cabeça-de-cauda” (agregados do tipo J, Figura 3B), leva a um deslocamento no $\lambda_{\text{máx}}$ para maior comprimento de onda (deslocamento batocrômico). Os agregados do tipo-H são tipicamente observados em soluções aquosas do corante AM (Heger, D.; 2005).

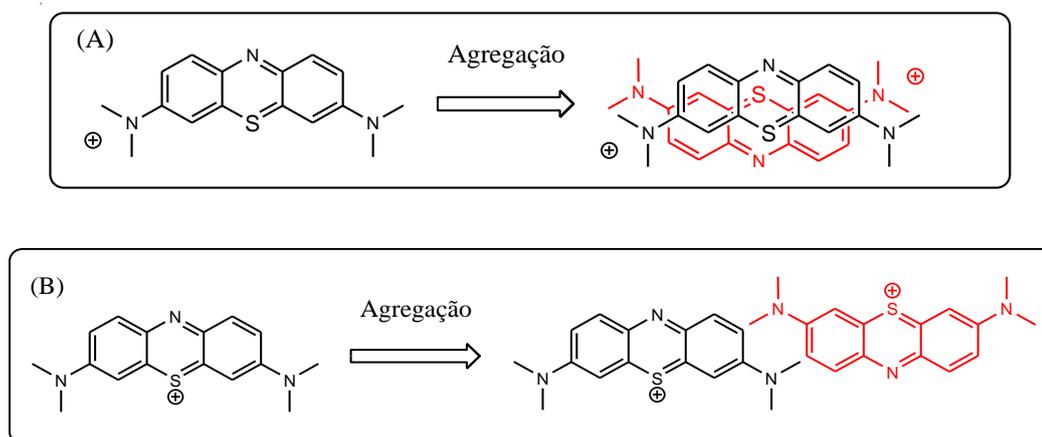


Figura 3 – (A) Representação esquemática do agregado tipo H do azul de metileno (Heger, D.; 2005). (B) Representação esquemática do agregado tipo J do azul de metileno.

O corante 1,9-dimetil azul de metileno (DMAM) ou azul de Taylor, mostrado na Figura 2B, é um derivado do AM e possui substituintes $-\text{CH}_3$ nas posições 1 e 9 dos anéis aromáticos. Em solução metanólica, apresenta um máximo de absorção em 650 nm (Wainwright, M., et al, 1997). O DMAM exibe um pequeno deslocamento hipsocrômico de absorção em comparação com o AM. No entanto, ambos fotossensibilizadores absorvem fortemente na “janela terapêutica” para TFD, entre 550 e 670 nm. Segundo Wainwright, M., et al, (1997), o DMAM apresentou um

rendimento de oxigênio singlete superior ao AM na oxidação *in vitro* do 1,3-difenilisobenzofurano (DPIBF) (Wainwright, M., et al, 1997).

1.1.1.2 – Tionina (Th)

A tionina (Th) é um corante fenotiazínico (Paul e Kumar, 2012) catiônico (You et al., 2012), o qual apresenta uma estrutura planar aromática (Chen, et al., 2011; Zhu, et al., 2012) idêntica ao AM, contendo átomos de nitrogênio e enxofre heterocíclicos. A diferença com relação ao AM encontra-se nos substituintes das posições 3 e 7 (Figura 2C) (Chen, et al., 2011; Paul, P et al., 2011), que são do tipo amina primária ($-NH_2$) (Paul, P et al., 2011), mais hidrofílicos (Chen, et al., 2011) do que os grupamentos amina metilados do AM.

O espectro de absorção da Th em solução aquosa apresenta duas bandas de absorção bem características. Uma banda em 283 nm na região do ultravioleta, correspondente às transições do tipo $\pi-\pi^*$ dos anéis aromáticos (Chen, et al., 2011) e outra em 600 nm, na região do visível (You et al., 2012; Chen, et al., 2011), correspondente às transições $n-\pi^*$ associadas a C=N (Chen, et al., 2011). Na banda centrada em 600 nm é observado um ombro em 585 nm. A banda em 600 nm é atribuída à forma monomérica e o ombro, é atribuído ao agregado na forma de dímero do tipo H (Ding, et al., 2008).

A Th geralmente é utilizada como fossensibilizador em processos fotográficos, componentes de laser e quimioterapia (Khayyat, et al. 2012). As propriedades fotofísicas do corante tionina estão bem documentadas. Em solução aquosa, a Th apresenta tempo de vida de fluorescência de 310 ps para excitação em 600 nm. Em solventes orgânicos, o tempo de vida de fluorescência da tionina aumenta para 450 ps em etanol e 760 ps em álcool *terc*-butílico, com um elevado rendimento quântico de fluorescência. A diferença entre os tempos de vida da tionina em água e álcool *terc*-butílico é muito grande, o que demonstra o efeito da polaridade do microambiente no decaimento do estado excitado. O corante tionina em meio aquoso mostra um decaimento da fluorescência correspondente a uma única exponencial, com um tempo de vida de 306 ± 20 ps (Viswanathan, K.; Natarajan., 1996) e um rendimento quântico de 0,05 (Lee e Mills, 2003).

1.1.1.3 – Azures

Os compostos azure apresentam uma estrutura molecular muito semelhante àquela do AM, com a diferença residindo no grau de metilação do grupamento amino na posição 3. Enquanto no AM este grupamento amino apresenta duas metilas ligadas ao átomo nitrogênio, $-N(CH_3)_2$, no AB apenas uma metila está ligada ao átomo de nitrogênio, $-NH(CH_3)$, e no AA ambas as metilas são substituídas por átomos de hidrogênio, $-NH_2$. Esta diminuição no grau de metilação do grupamento amino na posição 3 é responsável pelo deslocamento hipsocrômico nos valores de absorção máxima dos compostos em meio aquoso.

O AA (Figura 2D), um di-metil-tionina assimétrico, apresenta um máximo de absorção em 633 nm, um coeficiente de absorvidade molar de $57.500 M^{-1} cm^{-1}$ e um rendimento quântico de 0,56. Tem sido estudado como fotoquimioterápico contra carcinomas. Desperta interesse também nas indústrias de dispositivos eletrocromáticos, células solares, sensores ópticos e células fotovoltaicas (Paul, P.; Kumar, G. S.; 2013). O AB (Figura 2E), um azul de metileno mono-desmetilado, apresenta um máximo de absorção em 642 nm, um coeficiente de absorvidade molar de $43.000 M^{-1} cm^{-1}$ e um rendimento quântico de 0,47. É empregado no tratamento contra a malária, no diagnóstico de doenças relacionadas ao acúmulo de amilóide, no diabetes, no tratamento do vírus da gripe aviária, em infecções causadas por protozoários, em doenças virais, em associações patológicas tau-tau na doença de Alzheimer e no tratamento de infecções nas unhas (Paul, P.; Kumar, G. S.; 2013).

1.2 - Efeito solvente

A natureza das interações intermoleculares soluto-solvente (tais como íon-dipolo, dipolo-dipolo, dipolo-dipolo induzido, ligação hidrogênio, etc) tendem a alterar a diferença de energia entre o estado fundamental (S_0) e o estado excitado (S_1), o que produz efeitos profundos sobre as características dos espectros eletrônicos. Esses efeitos podem ser sentidos, sobretudo no formato e na posição das bandas de absorção e de emissão, assim como na intensidade de absorção (probabilidade de ocorrer a transição).

As interações intermoleculares de natureza polar entre o soluto e o solvente dependem do momento de dipolo (μ) dos estados fundamental e excitado, e da natureza do estado excitado formado. G.G. Stokes estudou esses efeitos, relatando que a diferença entre os números de onda relativos aos máximos de absorção e emissão de um dado composto em certo solvente é chamada de deslocamento de Stokes ($\Delta\bar{\nu} = \bar{\nu}_a - \bar{\nu}_e$). Esse parâmetro é uma medida do nível de relaxação sofrido pelos estados S_0 e S_1 de certa molécula em função das interações sofridas com o solvente (Lakowicz, 1999).

A mudança observada no espectro de absorção de um cromóforo devido à polaridade do solvente é conhecida pelo termo solvatocromismo. Um deslocamento hipsocrômico acompanhado pelo aumento da polaridade do solvente é conhecido como solvatocromismo negativo. Tanto o deslocamento hipsocrômico quanto o deslocamento batocrômico são dependentes da natureza da transição eletrônica sofrida pelo cromóforo (Valeur, 2001). Assim, quando há a possibilidade de ocorrer fortes interações polares no estado fundamental, deve-se esperar a ocorrência de um deslocamento batocrômico da banda de absorção à medida em que aumenta a polaridade do solvente. Se o estado excitado da molécula é π,π^* , o qual possui um momento de dipolo maior do que aquele observado para o estado fundamental, uma influência positiva é observada nas interações com solventes polares, acarretando em um deslocamento batocrômico da banda de emissão. Na Tabela 1 estão listados os principais cromóforos e suas transições características.

Tabela 1 – Transições características de alguns grupamentos presentes em cromóforos, adaptada da referência (Ribeiro, J. 2003).

Cromóforo	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ (dm ³ mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Transição
C-C	< 180	1000	σ, σ^*
C-H	< 180	1000	σ, σ^*
C=C	180	10000	π, π^*
C=C-C=C	220	20000	π, π^*
C=O	280	20	π, π^*
N=N	350	100	n, π^*
N=O	660	200	n, π^*
C=C-C=O	350	30	n, π^*
C=C-C=O	220	20000	n, π^*

O comprimento de onda de máxima absorção e o coeficiente de absorvidade molar dependem dos diferentes tipos de orbitais moleculares envolvidos na transição. Os orbitais moleculares originam-se principalmente da sobreposição dos orbitais atômicos s e p, subdividindo-se em três classes principais, os orbitais σ e π ligantes, os orbitais σ^* e π^* antiligantes e os orbitais n não-ligantes. As transições eletrônicas descritas na Tabela 1 envolvem a promoção de um elétron que ocupa o HOMO de natureza σ , π ou n, para o LUMO de natureza σ^* ou π^* (Valeur, 2001).

Uma interpretação do deslocamento de Stokes da banda $S_0 \rightarrow S_1$ em termos dos solventes deve levar em consideração: a) a mudança sofrida no momento de dipolo quando da excitação eletrônica; b) a diferença entre o momento de dipolo dos estados excitado e fundamental; c) mudanças ocorridas no momento de dipolo do soluto no estado fundamental, induzida pelo solvente; e d) o Princípio de Franck-Condon (Ribeiro, J. 2003):

- 1) Solute apolar em solvente apolar: nesse caso, somente forças de dispersão contribuem para a solvatação do soluto. Essas forças dependem do índice de refração, da intensidade da transição e do tamanho da molécula do soluto;
- 2) Solute apolar em solvente polar: na ausência de um momento de dipolo do soluto, não há uma orientação significativa das moléculas do solvente ao

redor das moléculas do soluto, sendo que desse modo, novamente dependente do índice de refração do solvente;

3) Soluto polar em solvente apolar: as forças que contribuem para a solvatação são forças dipolo-dipolo induzido e forças de dispersão. Se o momento de dipolo do soluto aumenta durante a transição eletrônica, o estado excitado de Franck-Condon é mais solvatado pela polarização dipolo-solvente, favorecendo um deslocamento batocrômico. No caso do deslocamento hipsocrômico, o estado excitado de Franck-Condon é menos solvatado;

4) Soluto polar em solvente polar: uma vez que a solvatação do estado fundamental resulta das forças dipolo-dipolo, nesse caso existe uma gaiola orientada pelo solvente ao redor do soluto, resultando em uma rede de estabilização do estado fundamental das moléculas do soluto. Se o momento de dipolo do soluto aumenta durante a transição eletrônica, o estado excitado de Franck-Condon é formado em uma gaiola de solvente orientado pelos dipolos do solvente. A melhor estabilização do estado excitado em relação ao estado fundamental, com o aumento da polaridade do solvente, resultará em um deslocamento batocrômico. Se o momento dipolar diminui durante a transição eletrônica, o estado excitado de Franck-Condon está em uma gaiola de solvente onde os dipolos orientados estão incorretamente dispostos para estabilizar de maneira eficiente o estado excitado.

A influência do solvente acarreta então deslocamentos dos espectros de absorção e emissão dos corantes, contribuindo para um maior ou menor valor de rendimento quântico de fluorescência. Segundo a literatura, a dependência dos valores obtidos para o tempo de vida em função da viscosidade e constante dielétrica do solvente indica que o processo de desativação do estado excitado dos corantes torna-se mais lento em meios mais viscosos. Este efeito está relacionado com a inibição parcial ou a maior fricção na rotação de grupos substituintes como $-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ e $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ desses sistemas. Outro fato a ser considerado é que sondas que apresentam grupamentos $-\text{NH}_2$ na estrutura podem apresentar processos de transferência de carga intramolecular, acarretando também mudanças nos valores de tempo de vida (de Oliveira, et al. 2003).

A teoria que considera que as mudanças no espectro de fluorescência podem ser interpretadas em termos dos efeitos gerais de solventes é muitas vezes insuficiente para explicar o comportamento detalhado de fluoróforos em uma

variedade de ambientes. Isto se deve ao fato dos fluoróforos geralmente apresentarem interações específicas com o ambiente, o qual pode mudar o espectro a níveis comparáveis com os efeitos gerais de solventes. Tais efeitos específicos dos solventes ocorrem em muitos fluoróforos e devem ser considerados na interpretação dos espectros de emissão. Devido à diversidade de interações solvente-fluoróforo, nenhuma teoria pode ser usada para descrever os espectros de solvente-dependente (Lakowicz, 1999).

Além das interações específicas de solvente-fluoróforo, muitos fluoróforos podem formar o estado de transferência intramolecular de carga (TIC) ou o estado de transferência intramolecular de carga torcido (TICT). Por exemplo, suponha que o fluoróforo contém um grupo doador e um grupo aceitador de elétron. Tais grupamentos podem ser aminas e carbonilas, respectivamente. A regra de Kasha, afirma que a emissão ocorre a partir do estado de mais baixa energia excitado. Na sequência da excitação, pode haver um aumento na separação de carga dentro do fluoróforo. O papel da polaridade do solvente não é só diminuir a energia do estado excitado devido o efeito geral do solvente, mas também conduzir ao estado que tem a menor energia. Em alguns casos, a formação do estado de TIC requer rotação de grupos no fluoróforo para formar o estado TICT. A formação do estado TIC ocorre em muitos fluoróforos e este efeito não é explicado pela teoria geral do efeito do solvente (Lakowicz, 1999).

Para compostos fortemente solvatocrômicos, os deslocamentos de comprimento de onda induzidos pelo solvente não podem ser explicados apenas em termos de uma mudança no momento de dipolo permanente durante a transição eletrônica. Nesse ponto, deve-se levar em consideração o chamado campo de reação, ou seja, o campo elétrico que surge entre um dipolo ideal não polarizável e o continuum dielétrico homogêneo, polarizável, no qual o dipolo está imerso e que afeta o momento dipolar do estado fundamental do soluto. Isto é, a interação das moléculas do soluto polar com o campo de reação induzido, devido ao momento de dipolo total das moléculas de solvente, causa uma alteração na estrutura eletrônica do cromóforo.

Há uma dependência linear do deslocamento de Stokes com o parâmetro de polaridade dos solventes (Δf), segundo a equação de Lippert-Mataga (Equação 1).

$$\Delta \bar{\nu} = \frac{2\Delta\mu^2}{cha^3} \Delta f$$

Equação 1

Na equação acima, $\Delta\mu^2$ é a diferença entre os quadrados dos momentos de dipolo da molécula no estado fundamental e excitado, a é o raio de Onsager da cavidade formada ao redor da molécula, c é a velocidade da luz no vácuo e h é a constante de Planck. A inclinação da reta depende da diferença do momento de dipolo da molécula antes e depois da excitação. Este fato indica que o momento de dipolo da molécula no estado excitado é um pouco maior que no estado fundamental. Os valores de Δf dependem da constante dielétrica (ϵ) do solvente e do índice de refração (n) do mesmo. Um elevado valor de n reduzirá a perda de energia, enquanto que um elevado valor de ϵ implicará em uma grande diferença entre $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_e$. O índice de refração depende do movimento dos elétrons dentro da molécula do solvente, que é extremamente rápido e pode ocorrer durante a absorção de luz. Já a constante dielétrica, é uma propriedade estática, que depende do movimento eletrônico e molecular, onde o último é a reorganização do solvente ao redor do fluoróforo no estado excitado (Valeur, 2001).

Existem outros parâmetros que podem ser correlacionados com o deslocamento de Stokes além do parâmetro de polaridade dos solventes (Δf), como a escala $E_T(30)$ que está relacionada com o solvatocromismo negativo do corante iodeto de 1-etil-4-metóxicarbonilpiridínio. Essa escala foi definida com escala Z por Kosower e é expressa em termos da energia de transição molar do 1-etil-4-metóxicarbonilpiridínio, medida em kcal mol^{-1} , podendo ser expressa pela Equação 2 (Lakowicz, 1999).

$$E_T = hc\bar{\nu}N = 2,859 \cdot 10^{-3} \bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) \equiv Z$$

Equação 2

Onde c é a velocidade da luz no vácuo, h é a constante de Planck e $\bar{\nu}$ é o número de onda do fóton que produz a excitação eletrônica. Tal escala apresentava várias limitações práticas, as quais foram corrigidas pelo uso do corante piridínio-N-fenóxibetaína, ou corante de Reichardt, como ficou conhecido. Essa nova escala ficou conhecida com Escala $E_T(30)$, sendo que este termo se refere à energia de transição do corante betaína n^o 30. A aplicação deste corante de Reichardt como

referencial para uma escala de polaridades está relacionada com seu elevado momento de dipolo, o que favorece o estudo de interações dipolo-dipolo e dipolo-dipolo induzido. Os valores de $E_T(30)$ são estimados com base na Equação 3, a seguir, sendo dispostos segundo uma escala adimensional e normalizada, considerando-se como referências a interação com a água e com o tetrametilsilano (TMS), recomendado pelo Sistema Internacional (SI).

$$E_T(30) = \frac{28591}{\lambda_{max}(nm)} \quad \text{Equação 3}$$

1.3 - Agregação

A maioria dos corantes forma agregados no estado fundamental (Kasha, et al. 1959; Patil, et al. 2000), mesmo em concentrações baixas (da ordem de 10^{-6} mol/L), dependendo da concentração de sais e da presença de agentes indutores de agregação, tais como micelas aniônicas, heparina e outros polieletrólitos, lipossomos e vesículas. A planaridade dos corantes é um fator que contribui para a aproximação e dimerização dos mesmos (Ohline et al. 2001; Zoratti e Szabò, 1995). A presença de ligantes hidrofóbicos na estrutura dos corantes também facilita a agregação em meios polares (Pelizzetti, et al, 1991).

Estudos mostraram que moléculas de AM formam agregados e que o comportamento fotofísico muda em função desta agregação no estado fundamental. Isto leva à diminuição da fluorescência e da produção de oxigênio singlete (Junqueira et al, 2002). É conhecido que a dimerização e os efeitos do meio alteram o processo de transferência de energia de estados tripletes para oxigênio molecular e outros supressores de estados tripletes (Oliveros et al, 1987; Kikteva et al, 1999; del Monte et al, 2000; Borba et al, 2000). Estudos Th e AM mostram alguns desses efeitos (Das e Kamat, 1999).

A agregação é um fenômeno comum envolvendo moléculas orgânicas em solução e este fenômeno pode ser acompanhado por técnicas espectroscópicas. Especialmente na absorção, a agregação destas moléculas (cromóforos) provoca desvio negativo na Lei de Beer, que também pode vir acompanhado da presença de bandas adicionais (Karns, et al. 1979; Brown, et al. 1980; Micali, et al. 1998), tanto à

esquerda quanto à direita da banda de monômeros. As primeiras variações espectrais são atribuídas à formação de dímeros que estão em equilíbrio com os monômeros. O agregado mais simples, dímero, é formado pela auto-associação de duas unidades de monômero. A presença de ponto isobéstico, quando é o caso, indica que o fenômeno envolvido acontece geralmente em uma etapa, em um equilíbrio simples entre monômeros e dímeros (Gilani, et al. 2013). Ao mesmo tempo em que a agregação afeta os espectros de absorção, ela também diminui a emissão de fluorescência do composto, em virtude do processo de autossupressão de energia do estado excitado (Kessel e Rossi, 1982; Margalit e Rotenberg, 1984; Khairutdinov e Serpone, 1999).

O empilhamento π dos sistemas conjugados de corantes é favorecido com base tanto a hidrofobicidade quanto na polarizabilidade do corante. Até o momento, a melhor descrição do comportamento de agregação de cromóforos de corantes é baseada na teoria Molecular do Exciton. A intensidade relativa das bandas de absorção pode fornecer informações sobre a estrutura do dímero em relação à sua geometria modelo mais simples (por exemplo, o espaçamento cromóforo e o arranjo espacial relativo dos momentos dipolares de transição das moléculas que formam dímeros). A agregação de corantes em solução ou na interface sólido-líquido é um fenômeno frequente em corantes químicos devido às interações intermoleculares de Van der Waals, que atuam como forças de atração entre as moléculas. Os agregados em solução exibem alterações distintas na banda de absorção, em comparação com as espécies monoméricas. A partir das mudanças no espectro, têm sido propostos vários padrões de agregação dos corantes em diferentes meios. Dois tipos de limitação de estruturas supramoleculares são formados e são referidos como agregados H e agregados J. Os processos de conversão de monômero em agregado J, durante a iniciação térmica e para o agregado H sob foto-excitação está esquematicamente mostrado na Figura 4 (Yazdani, O.; et al. 2012).

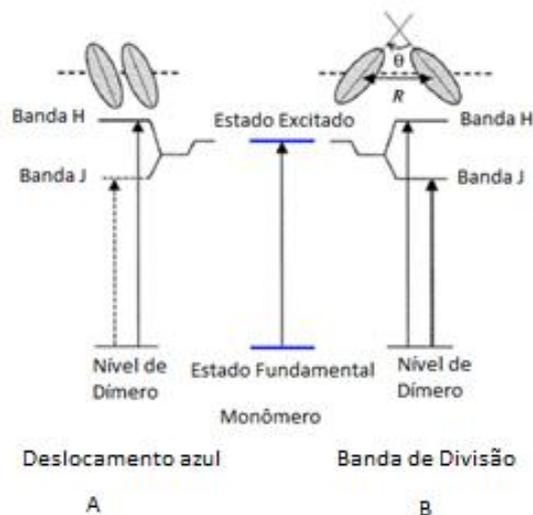


Figura 4 – Diagrama de energia de bandas de excitação de moléculas de dímero (A) Configuração paralela e ângulo interno plano. (B) Configuração oblíqua e ângulo interno não-planar, adaptada da referência Yazdani, O.; et al. 2012.

Os agregados J e H de corantes diferem no número e posição das moléculas. Moléculas de corante com dímeros tipo H são posicionadas de modo a formar uma estrutura tipo sanduíche e no caso de dímeros tipo J, as moléculas são posicionadas na sequência (Figura 5). A agregação de um corante leva a um forte acoplamento dos dipolos moleculares de transição, isto é, a interação eletrostática entre dipolos de transições moleculares dos cromóforos faz com que haja separação de níveis energéticos dos estados excitados das moléculas, enquanto que o estado fundamental do dímero permanece duplamente degenerado. De acordo com a teoria Molecular do Exciton, ou Teoria de Kasha, agregados J ou H podem ser formados dependendo do ângulo entre os dipolos de transição e do eixo molecular do agregado. Em agregados do tipo H, os cromóforos das moléculas participantes estão em dois planos paralelos, enquanto que em agregados do tipo J, estão no mesmo plano (estrutura linear) (Yazdani, O.; et al. 2012).

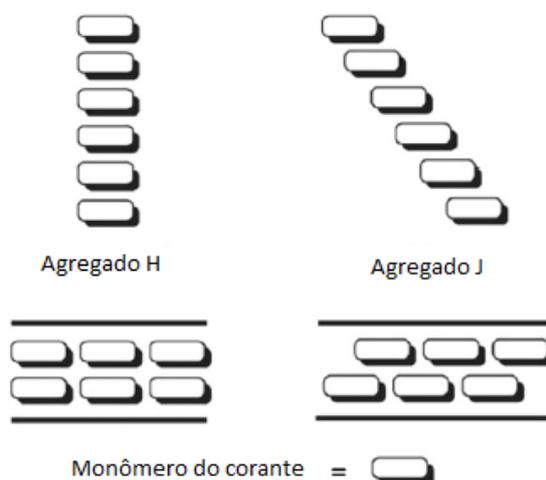


Figura 5 – Ilustração dos agregados H e J de moléculas de corantes em água, adaptada da referência Yazdani, O.; et al. 2012.

O ângulo entre os cromóforos foi obtido com base nas considerações descritas a seguir. Como pode ser analisada a partir da Figura 6, a banda intensa com forma Gaussiana foi centrada no máximo do espectro, a segunda banda de Gaussiana foi obtida subtraindo-se a primeira banda do espectro total. Partindo do princípio que a distância entre os dipolos permanece inalterada, o ângulo no dímero foi determinado a partir da relação entre as áreas do comprimento de onda longo (S_1) e o comprimento de onda curto (S_2) das duas bandas Gaussianas, $\tan^2(\theta/2) = S_1/S_2$. A diferença na energia dos níveis de divisão depende da interação de energia (U), entre as moléculas de corante nas espécies de dímeros. A energia de interação pode ser obtida considerando a metade da diferença existente entre a frequência máxima das bandas vizinhas: $U/\text{cm}^{-1} = (1/2)(\bar{\nu}_{\text{ombro}} - \bar{\nu}_{\text{máx}})$ (Yazdani, O.; et al. 2012).

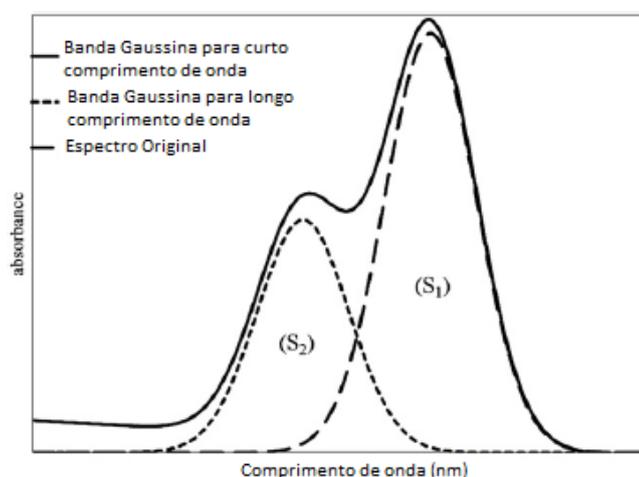


Figura 6 - Esquema da decomposição do espectro na forma Gaussiana, adaptado da referência Yazdani, O.; et al. 2012.

Um dos fatores que determinam o tipo de agregação é a presença de substituintes hidrofóbicos nos anéis das moléculas de corante. Corantes não substituídos geralmente favorecem agregados H uma vez que oferece mínima exposição à água. No entanto, os substituintes presentes em várias posições na estrutura de corante podem promover agregados J devido a fatores estereoquímicos e/ou eletrostáticos (Yazdani, O.; et al. 2012).

1.4 - Técnicas de caracterização

1.4.1 – Espectroscopia molecular de UV-Vis

Em uma banda de um determinado espectro de absorção, a posição e a intensidade são as principais características observadas. A posição da banda de absorção é determinada pelo comprimento de onda da radiação necessária para que a transição ocorra. Já a intensidade está relacionada à probabilidade da transição ocorrer. A probabilidade de transição para uma dada absorção pode ser relacionada à intensidade de absorção através do termo força de oscilador, sendo uma medida de probabilidade de transição (Lakowicz, 1999):

$$f = \frac{4,39 \times 10^{-9}}{n} \int \epsilon d\bar{\nu}$$

Equação 4

Onde n é o índice de refração do solvente, $d\bar{\nu}$ é a diferencial do número de onda e ϵ é o coeficiente de extinção molar.

Uma medida experimental da relação entre a absorção de radiação por um dado soluto e sua concentração em solução é fornecida pela lei de Lambert-Beer. À medida que a luz atravessa um meio contendo um analito que absorve, um decréscimo de intensidade ocorre na proporção que o analito é excitado (Skoog et al 2009).

A Figura 7 mostra a atenuação de um feixe paralelo de radiação monocromática quando este passa por uma solução absorvente de espessura de b cm e de uma determinada concentração em mols por litro.

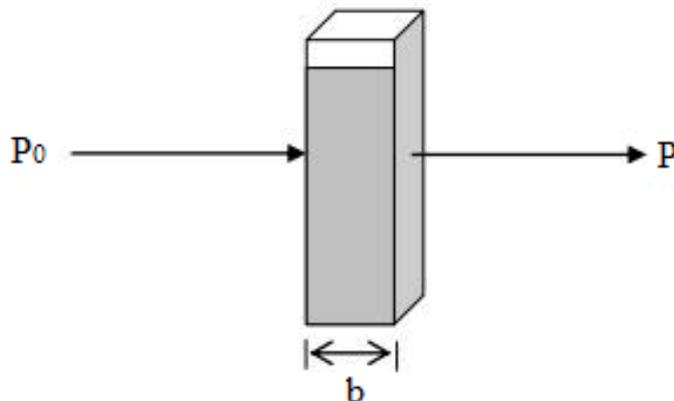


Figura 7 - Atenuação de um feixe de radiação por uma solução absorvente. O caminho óptico da solução absorvente é igual a b . P_0 representa o feixe incidente e P , o feixe após passar pela amostra (Adaptada da referência Skoog et al, 2009).

A potência radiante do feixe decresce de P_0 a P em virtude das interações entre os fótons e as partículas absorventes. A transmitância, T , da solução é a fração da radiação incidente transmitida pela solução e é dada pela Equação 5 (Skoog et al, 2009):

$$T = \frac{P}{P_0} \quad \text{Equação 5}$$

A transmitância é frequentemente expressa em porcentagem, denominada porcentagem de transmitância, mostrada na Equação 6 (Skoog et al, 2009):

$$\%T = \frac{P}{P_0} \times 100\% \quad \text{Equação 6}$$

Já a absorbância, *Abs*, de uma solução está relacionada com a transmitância de forma logarítmica, Equação 7, (Skoog et al, 2009):

$$Abs = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad \text{Equação 7}$$

Um espectro de absorção é um gráfico da absorbância *versus* o comprimento de onda, podendo, também, ser apresentado em forma de um gráfico da absorbância *versus* o número de onda ou a frequência (Skoog et al, 2009). A lei de Lambert-Beer, Equação 8, fornece uma medida experimental da relação entre a absorção de radiação por um dado soluto e sua concentração em solução, e estabelece uma relação entre a quantidade de radiação absorvida por uma espécie, sua concentração e o percurso percorrido pela radiação (Gilbert e Baggott, 1991):

$$Abs = \epsilon bc \quad \text{Equação 8}$$

Onde *Abs* é a absorbância da solução, ϵ é a absorvidade molar ou coeficiente de absorção molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) do composto, *c* é a concentração molar do soluto (mol L^{-1}) e *b* (cm) é o caminho óptico percorrido através da amostra. ϵ caracteriza a probabilidade de absorção de luz pela molécula em um dado comprimento de onda.

1.4.2 - Espectroscopia de Fluorescência

1.4.2.1 - Fluorescência Fotoestacionária

Uma molécula quando excitada pode sofrer colisões com as moléculas do meio circundante e ceder energia de forma não-radiativa. Por outro lado, em um processo de desexcitação, pode ocorrer uma emissão espontânea de luz com um tempo característico de 10^{-9} s. Esse processo denominado de fluorescência é um fenômeno que envolve a perda de energia de uma molécula no estado excitado por emissão de luz (Valeur, 2001). O processo de fosforescência, que ocorre após o cruzamento intersistemas (CIS), persiste durante intervalos de tempos maiores após a excitação e também é uma forma de radiação espontânea.

Os processos não-radiativos (nr) que competem com a fluorescência incluem a conversão interna (CI, ou seja, retorno ao seu estado fundamental sem emissão de fluorescência), cruzamento intersistema (seguida pela emissão de fosforescência), transferência de carga intramolecular, mudança conformacional, transferência de elétrons/prótons/energia e formação de excímeros/excipletoes (Valeur, 2001). Todos os processos citados anteriormente podem ser ilustrados pelo diagrama de Jablonski apresentado na Figura 8. Esse diagrama é o ponto de partida para a discussão dos processos envolvidos na absorção e emissão de luz e descreve os principais tipos de processos radiativos e não-radiativos após a absorção de luz.

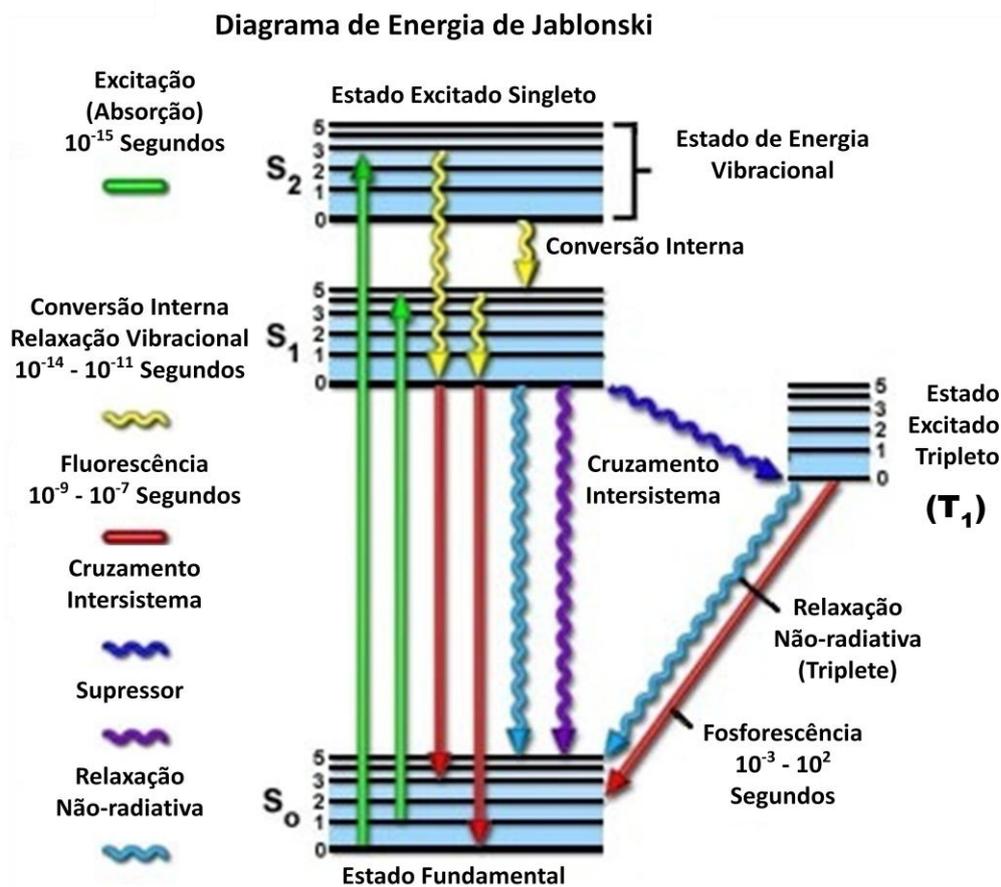


Figura 8 - Diagrama de Jablonski. Adaptada da referência <http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintr>

Estudos de espectroscopia de fluorescência variam de uma simples medição da intensidade de emissão em estado estacionário a sofisticadas medidas resolvidas no tempo (Royer, C.A.; 1995). Nesse método, a amostra é excitada no comprimento de onda de absorção, também conhecido como comprimento de onda de excitação, e a emissão é medida a um comprimento de onda maior denominado comprimento de onda de fluorescência (Skoog et al, 2009). A instrumentação da fluorescência fotoestacionária precisa ser capaz de medir intensidades de luz em vários comprimentos de onda de emissão da amostra e também permitir irradiação da amostra em vários comprimentos de onda definidos. A fluorescência é mensurada à 90° em relação ao feixe incidente (excitação), pois nesse caso não se está interessado na absorção da luz pela solução, todavia quer-se medir o brilho que a solução emitirá ao devolver energia luminosa ao ambiente (*i. e.*, fluorescer) (Sartori e Loreto, 2009). Esta geometria é arranjada de modo a minimizar o espalhamento

Raman e Rayleigh, eliminando a interferência da luz transmitida no sinal de fluorescência.

A intensidade de fluorescência geralmente depende da intensidade da fonte de excitação. No caso de soluções diluídas, a intensidade de fluorescência (Equação 9) pode ser calculada pela Lei de Lambert-Beer:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon cb} \quad \text{Equação 9}$$

Onde I é a intensidade de excitação transmitida através da amostra, I_0 é a intensidade de excitação incidente na amostra, ε é o coeficiente de extinção molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c é a concentração molar (mol L^{-1}) da solução e b é o caminho óptico (cm).

Como a luz absorvida pode ser dada pela Equação 10:

$$I_A = I - I_0 \quad \text{Equação 10}$$

E a intensidade de fluorescência, I_F , por $I_A \phi_F$, onde ϕ_F é o rendimento quântico de fluorescência da amostra, a intensidade de fluorescência será dada pela Equação 11:

$$I_F = I_0 \Phi_F (1 - 10^{-\varepsilon cb}) \quad \text{Equação 11}$$

Quando a densidade óptica da amostra for baixa, $\varepsilon cb \leq 0,005$, a intensidade de fluorescência será dada pela Equação 12:

$$I_F = 2,303 I_0 \Phi_F \varepsilon cb \quad \text{Equação 12}$$

Assim, um gráfico da potência de fluorescência de uma solução *versus* a concentração das espécies emissoras deve ser linear para baixas concentrações (Skoog et al, 2009).

Outro parâmetro a ser definido é o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F), que é a razão entre o número de moléculas que fluorescem e o número total de

moléculas excitadas, ou a razão entre os fótons emitidos e os fótons absorvidos, dado pela Equação 13 (Skoog et al, 2009):

$$\Phi_F = \frac{n^\circ \text{ de moléc. fluorescentes por unidade de tempo e de volume}}{n^\circ \text{ de quanta absorvidos por unidade de tempo e de volume}} \quad \text{Equação 13}$$

Em medidas experimentais de Φ_F é necessário o uso de um padrão que apresente propriedades semelhantes às da espécie desconhecida. A relação matemática que permite obter o valor experimental do Φ_F empregando esse método é dada pela Equação 14:

$$\Phi_F = \left(\frac{Abs_p F n^2}{Abs F_p n_p^2} \right) \quad \text{Equação 14}$$

Onde o subscrito p refere-se ao padrão, Abs e Abs_p são, respectivamente, as absorções da amostra e do padrão nos respectivos comprimentos de onda de excitação, F é a área sob o espectro de emissão da amostra (F_p do padrão), n é o índice de refração do solvente no qual se encontra a amostra e n_p , do solvente no qual se encontra o padrão (Melo et al., 1994).

1.4.2.2 - Fluorescência Resolvida no Tempo: Técnica de Contagem de Fótons

A partir do conhecimento das taxas de decaimento do estado eletrônico excitado singlete de espécies moleculares em função do tempo é possível se determinar parâmetros de modelos cinéticos, informações relativas aos tempos de vida do estado excitado, bem como sua distribuição.

Uma técnica que tem sido amplamente utilizada é a técnica de contagem de fóton, TFC (*Time-Correlated Single Photon Counting*, TCSPC) para o monitoramento de fluorescência resolvida no tempo. Neste método, a amostra é excitada por um pulso de luz e fótons de excitação são correlacionados temporalmente com os fótons emitidos pela amostra. O princípio desta técnica baseia-se no conceito de que a distribuição de probabilidade de emissão de um fóton após o evento de excitação de uma amostra fluorescente é proporcional à distribuição de intensidade de

fluorescência no tempo para os fótons emitidos, como resultado da excitação da amostra.

Um histograma representando a probabilidade de distribuição é obtido através da contagem sucessiva de fótons correlacionados no tempo. Esse histograma é o resultado aditivo de um grande número de pulsos de excitação da amostra, sendo que cada contagem individual de fóton detectado está vinculada em, no máximo, a um pulso de excitação. Pulsos de saída, cuja amplitude é proporcional ao tempo entre os sinais de partida e de interrupção, geram uma diferença de potencial proporcional à diferença de tempo entre o evento da excitação e o de detecção do primeiro fóton, Figura 9. Este sinal elétrico de amplitude definida é enviado a um conversor analógico-digital, e então transferido a um determinado local de memória de um analisador de múltiplos canais, o que corresponde a uma contagem para aquele determinado valor.

A repetição deste procedimento para um elevado número de pulsos de excitação sobre a amostra resulta na acumulação de um histograma do número de contagens em função dos endereços de memória, representando o decaimento de fluorescência da amostra.

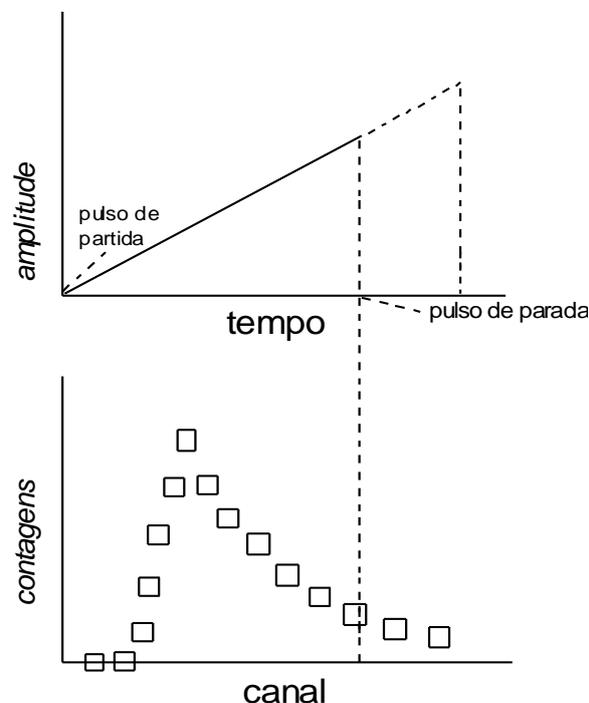


Figura 9 - Conversão amplitude-tempo em um TAC.

1.4.2.3 - Anisotropia de fluorescência

Polarização de fluorescência (ou anisotropia) é uma técnica de fluorescência baseada na difusão rotacional de uma molécula a partir da diferença na correlação de polarização da luz de excitação e emissão (Lakowicz, 1999). A luz é uma onda eletromagnética que consiste de um campo elétrico e um campo magnético perpendiculares entre si e à direção de propagação. No caso da luz natural, estes campos não têm orientação preferencial, mas para a luz polarizada linearmente, o campo elétrico oscila ao longo de uma dada direção (Valeur, 2001). Medidas de anisotropia são realizadas através da técnica de polarização da luz com o uso de polarizadores.

Em solução homogênea, moléculas fluorescentes (fluoróforos) em seu estado fundamental são orientadas aleatoriamente. Essas moléculas, quando iluminadas por luz polarizada, sofrem uma excitação seletiva. A fluorescência emitida após a excitação pode apresentar uma polarização diferente. A extensão dessa polarização pode ser descrita em termos de anisotropia, r , fornecendo informações a respeito do movimento do fluoróforo no sistema em estudo (Li et al., 1999).

Conforme a posição dos polarizadores têm-se diferentes intensidades de emissão. A intensidade de emissão, quando o polarizador está orientado paralelamente (\parallel) a direção de excitação, é i_{\parallel} . Já a intensidade medida quando o polarizador está orientado perpendicularmente (\perp) à excitação, é i_{\perp} (Elsherbiny et al., 2011, Gulp et al., 1989).

A anisotropia de fluorescência, r , pode ser calculada pela Equação 15 (Elsherbiny et al., 2011, Gulp et al., 1989, Valeur, 2001, Lakowicz, 1999):

$$r = \frac{i_{\parallel} - i_{\perp}}{i_{\parallel} + 2i_{\perp}} \quad \text{Equação 15}$$

A anisotropia é uma grandeza adimensional que não depende da intensidade da luz emitida ou da concentração do fluoróforo, sendo dependente da viscosidade, temperatura, forma e volume do fluoróforo e de interações específicas com o ambiente (Lakowicz, 1999).

Anisotropia e polarização são expressões para o mesmo fenômeno. O termo polarização, P , é definido pela Equação 16 (Lakowicz, 1999):

$$P = \frac{i_{\parallel} - i_{\perp}}{i_{\parallel} + i_{\perp}} \quad \text{Equação 16}$$

As Equações 15 e 16 podem ser interconvertidas usando as relações das Equações 17 e 18 (Lakowicz, 1999):

$$P = \frac{3r}{2+r} \quad \text{Equação 17}$$

$$r = \frac{2P}{3-P} \quad \text{Equação 18}$$

A Figura 10 mostra a disposição dos polarizadores e suas posições durante um ensaio de medidas de anisotropia.

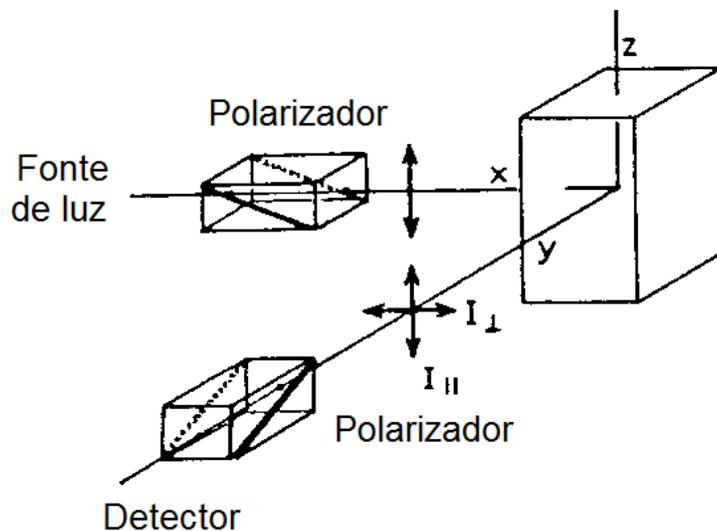


Figura 10 - Representação esquemática dos planos de polarização da luz incidente e fluorescente para medidas de anisotropia de fluorescência. Adaptado da referência Lakowicz, 1999.

Nessa representação, a amostra é polarizada com luz polarizada verticalmente e o vetor campo elétrico de excitação está orientado paralelamente ao eixo z.

moléculas não apresentam orientação preferencial é 0,4 (Piovesane et al., 2006). O deslocamento de emissão de dipolo por um ângulo, θ_E , a partir do eixo z resulta numa diminuição na anisotropia por um fator de $\frac{3\cos^2\theta_E-1}{2}$.

Como os momentos de dipolos de transição para absorção e emissão têm orientações fixas em cada fluoróforo, o ângulo entre estes momentos determinam a anisotropia máxima medida (Lakowicz, 1999). Considerando que os dipolos de absorção e emissão não são paralelos e possuem um ângulo β , um em relação ao outro, ocorre uma redução de anisotropia por um fator de $\frac{2}{5}$.

Assim, a anisotropia fundamental de um fluoróforo é dada pela Equação 19 (Lakowicz, 1999):

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta-1}{2} \right) \quad \text{Equação 19}$$

Esse termo, r_0 , é usado como referência à anisotropia observada na ausência de processos de depolarização, como, difusão rotacional ou transferência de energia. Para a maioria dos fluoróforos, β é diferente de zero e, por conseguinte, os valores de anisotropia são menores que 0,4. Quando $\beta = 54,7^\circ$, também chamado de ângulo mágico, a anisotropia fundamental é igual zero. Existem casos em que a anisotropia adquire valores negativos. O máximo valor negativo (-0,20) é encontrado quando $\beta = 90^\circ$ (Lakowicz, 1999).

Valores de anisotropia próximos a zero são facilmente obtidos para fluoróforos em soluções aquosas com tempos de vida perto de nanossegundos. Por outro lado, valores de anisotropia próximos a 1,0 são encontrados em fluoróforos presentes em filmes de poliméricos orientados (Lakowicz, et al. 1999).

Muitos fenômenos podem diminuir a anisotropia medida para valores abaixo daqueles preditos teoricamente. O fenômeno de despolarização de fluorescência acontece devido às mudanças durante o tempo de vida do estado excitado sofridos por alterações do momento de transição de absorção e emissão da sonda. A difusão rotacional é uma causa dominante de despolarização de anisotropia de fluorescência. Tal difusão ocorre durante o tempo de vida do estado excitado e desloca o dipolo de emissão da molécula emissora. Medidas deste parâmetro fornecem informações sobre o deslocamento relativo angular do fluoróforo entre os

tempos de absorção e emissão (Lakowicz, 1999). Em soluções fluidas, muitos fluoróforos podem rotacionar, aleatoriamente, várias vezes durante um tempo de vida da ordem de 1 a 10 ns. Por esta razão, moléculas em solução não viscosa tipicamente apresentam anisotropias próximas de zero (Lakowicz, et al. 1999). Transferência de excitação entre moléculas também acarretam uma diminuição da anisotropia. Macromoléculas intrinsecamente fluorescentes ou com grupamentos fluorescentes presos na cadeia também apresentam valores baixos de anisotropia (Valeur, 2001; Lakowicz, 1999).

Conforme a posição de polarização (vertical ou horizontal) têm-se diferentes intensidades de luz incidente, e por consequência, a rotação do polarizador de emissão muda a sensibilidade efetiva do canal de emissão. Para a excitação polarizada verticalmente a intensidade observada será dada pelas Equações 20 e 21 (Lakowicz, 1999):

$$i_{VV} = kS_V i_{\parallel} \quad \text{Equação 20}$$

$$i_{VH} = kS_H i_{\perp} \quad \text{Equação 21}$$

k é um fator de proporcionalidade para o rendimento quântico do fluoróforo, i_{VV} corresponde à excitação com polarização vertical e emissão polarizada verticalmente, i_{VH} corresponde à excitação com polarização vertical e emissão polarizada horizontalmente, e S_V e S_H são as sensibilidades do canal de emissão para as componentes vertical e horizontal, respectivamente, determinadas a partir do fator-G. O fator-G é um fator de proporcionalidade entre a sensibilidade do equipamento para luz polarizada verticalmente e horizontalmente (Prazeres et al., 2012), sendo definido pela Equação 22 (Quagliotto et al., 2009):

$$G = \frac{i_{HV}}{i_{HH}} \quad \text{Equação 22}$$

Onde i_{HV} e i_{HH} representam as intensidades polarizadas de emissão verticalmente e horizontalmente, respectivamente, obtidas pela excitação com luz polarizada horizontalmente (Quagliotto et al., 2009).

Dividindo-se as Equação (20) e (21) obtemos (Lakowicz, 1999):

$$\frac{i_{VV}}{i_{VH}} = \frac{S_V i_{\parallel}}{S_H i_{\perp}} = G \frac{i_{\parallel}}{i_{\perp}} \quad \text{Equação 23}$$

E as sensibilidades do canal de emissão podem ser calculadas pela Equação 24 (Quagliotto et al., 2009):

$$\frac{i_{HV}}{i_{HH}} = \frac{S_V}{S_H} \quad \text{Equação 24}$$

A anisotropia, Equação 25, pode então ser obtida por uma formulação alternativa (Prazeres et al., 2012, Quagliotto et al., 2009):

$$r = \frac{i_{VV} - G i_{VH}}{i_{VV} + 2G i_{VH}} \quad \text{Equação 25}$$

A técnica de decaimento de fluorescência baseia-se na excitação de um fluoróforo por um curto pulso de luz. O registro da intensidade de emissão de fluorescência é realizado como uma função do tempo, t . Os tempos de vida de fluorescência podem ser obtidos através da análise exponencial da curva de decaimento de intensidade de fluorescência, $f(t)$, que pode ser escrito da forma da Equação 26 (Elsherbiny et al., 2011):

$$f(t) = \sum_i \alpha_i \exp\left(\frac{-t}{\tau_i}\right) \quad \text{Equação 26}$$

Nesse caso τ_i e α_i são, respectivamente, o tempo de vida de fluorescência e um fator pré-exponencial (Reija et al., 2011, Giraud et al., 2010).

Medidas de decaimento total de anisotropia de fluorescência seguem a mesma linha, onde os resultados de anisotropia são coletados pela técnica de correlação temporal de fótons individuais no domínio do tempo. Nesta técnica os decaimentos da intensidade polarizada detectados $i_{\parallel}(t)$ e $i_{\perp}(t)$ são produtos de convolução de $i_{\parallel}(t)$ e $i_{\perp}(t)$ com a função-resposta do instrumento.

O decaimento de anisotropia de fluorescência $r(t)$, para um fluoróforo que apresenta um único tempo de correlação rotacional, é determinado pela medida dos

decaimentos das componentes da emissão polarizada verticalmente e horizontalmente dado pela Equação 27 (Valeur, 2001; Lakowicz, 1999):

$$r(t) = \frac{i_{\parallel}(t) - i_{\perp}(t)}{i_{\parallel}(t) + 2i_{\perp}(t)} = \frac{i_{\parallel}(t) - i_{\perp}(t)}{i(t)} \quad \text{Equação 27}$$

A intensidade total de fluorescência no tempo t é $i_{\parallel}(t) + 2i_{\perp}(t)$ (Li et al, 1999). Onde $i_{\parallel}(t)$ e $i_{\perp}(t)$ denotam os decaimentos de fluorescência polarizada com o polarizador de emissão paralelo e perpendicular, respectivamente, à direção de polarização da luz de excitação, o qual é perpendicular ao plano de excitação-emissão. Usando-se o fator-G, a anisotropia de fluorescência resolvida no tempo pode ser calculada pela Equação 28 (Giraud et al., 2010):

$$r(t) = \frac{i_{VV}(t) - Gi_{VH}(t)}{i_{VV}(t) + 2Gi_{VH}(t)} \quad \text{Equação 28}$$

O decaimento de anisotropia de fluorescência, $r(t)$, também pode ser calculado como uma soma de exponenciais de acordo com a Equação 29 (Giraud et al., 2010):

$$r(t) = \sum_n r_{0,n} \exp\left(\frac{-t}{\theta_n}\right) \quad \text{Equação 29}$$

Onde $r_{0,n}$ são as frações de anisotropia que decaem com tempo de correlação θ_n .

O decaimento de anisotropia pode ser compreendido em termos de suas componentes individuais. As intensidades polarizadas são dadas pelas Equações 30 e 31 (Gurp et al., 1989):

$$i_{\parallel}(t) = \frac{1}{3}f(t)[1 + 2r(t)] \quad \text{Equação 30}$$

$$i_{\perp}(t) = \frac{1}{3}f(t)[1 - r(t)] \quad \text{Equação 31}$$

Para essa equação, $f(t)$ é o decaimento de intensidade de fluorescência calculado pela Equação 26.

No caso simples de moléculas esféricas, a anisotropia, r , pode ser dada pela equação de Perrin, Equação 32 (Lakowicz, 1999):

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_F}{\theta_n} = 1 + 6D\tau_F \quad \text{Equação 32}$$

Onde r_0 é a anisotropia na ausência de rotação, τ_F é o tempo de vida médio de fluorescência, θ_n é o tempo de relaxação rotacional da sonda e D é o coeficiente rotacional de difusão. Se o tempo de relaxação rotacional for muito maior que o tempo de vida, então a anisotropia, (r), medida é igual a anisotropia inicial (r_0). O tempo de relaxação rotacional será dado pela Equação 33 (Giraud et al., 2010):

$$\theta_n = \frac{\eta V C f}{k_B T} \quad \text{Equação 33}$$

A viscosidade do meio é η , V é o volume hidrodinâmico da molécula, C é a medida do acoplamento entre a sonda e o solvente, f é um fator de configuração no caso da sonda não ser esférica, k_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura absoluta (Giraud et al., 2010).

2 - Objetivos

2 - Objetivos

2.1 Geral

Investigar as propriedades físico-químicas e fotofísicas do corante azul de metileno e de seus derivados em misturas binárias de água/solvente orgânico e em meio micelar.

2.2 Específicos

Avaliar a influência da composição das misturas binárias de água/solvente orgânico e da concentração dos corantes sobre os espectros de absorção UV-Vis dos corantes;

Determinar a anisotropia, o tempo de vida de fluorescência e o tempo rotacional dos corantes fenotiazínicos em misturas binárias de água/solvente orgânico;

Estimar a constante de ligação dos corantes fenotiazínicos por meio de adições do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS).

3 - Materiais e Métodos

3 - Materiais e Métodos

3.1 - Materiais

Os seguintes solventes foram empregados nas preparações ou nas medidas espectroscópicas: acetonitrila (J.T. Backer, grau HPLC), 1,4-dioxano (Vetec, P.A. ACS), etanol (J.T. Backer, grau HPLC), glicerol (Synth, P.A. ACS), e água milli-Q.

Foram utilizados os seguintes reagentes no decorrer deste trabalho: azul de metileno, 1,9-dimetil azul de metileno, tionina, azure A, azure B e o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS). O corante AM foi adquirido da Synth e os outros corantes, foram gentilmente cedidos pelos professores Dr. Maurício Baptista da Silva (Instituto de Química, USP, São Paulo-SP) e Dr. Adjaci Uchôa Fernandes (Unicastelo, São José dos Campos-SP).

Os espectros de absorção foram obtidos usando um espectrofotômetro UV-Vis da PerkinElmer Modelo Lambda 25. As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofotômetro de fluorescência da PerkinElmer modelo LS55. Algumas das medidas de emissão foram realizadas no espectrofluorímetro Cary-Eclipse.

3.2 - Metodologias

As soluções dos corantes analisadas neste trabalho foram obtidas a partir de uma solução estoque com concentração $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em água. Foram obtidos espectros de absorção dos corantes na região do UV-Vis e de emissão de fluorescência destes nas concentrações de $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes misturas binárias de água/solvente orgânico (acetonitrila, dioxano, etanol e glicerol).

Para a obtenção dos espectros de absorção molecular foram realizadas varreduras de 200 a 800 nm. O comprimento de onda de excitação utilizado para as medidas de fluorescência foi obtido a partir do comprimento de absorção máxima identificado nas medidas de absorção eletrônica no UV-Vis. Todas as medidas foram realizadas na temperatura de 20 °C.

As medidas de decaimento da intensidade de fluorescência foram obtidas pelo método de “*Single Photon Counting*”. Os pulsos foram obtidos com *laser*

Tsunami 3950 da *SpectraPhysics* de titânio-safira, bombeado por laser de estado sólido *Millenia Xs* (*SpectraPhysics*). A luz de saída deste *laser* possui potência integrada na faixa de 6,0 a 10,0 W. A frequência dos pulsos gerados no *Tsunami* foi ajustada por um *Pulse Picker* (3989 *SpectraPhysic*). Um selecionador de pulsos controlou a frequência de repetição desses pulsos e um gerador de segundos e terceiros harmônicos permitiu a obtenção de radiação *laser* na faixa desejada. No caso específico dos corantes fenotiazínicos, foi utilizado o terceiro harmônico, com excitação em 290 nm. Os pulsos *laser* de excitação foram correlacionados temporalmente com os pulsos de fluorescência emitidos pela amostra, usando para a detecção e coleta dos dados, um espectrômetro da *Edinburgh Instruments*. O espectrômetro possui um porta-amostra termostaticado por um banho de água circulante. Para as medidas de decaimento de anisotropia foi utilizado um compensador *Babinet-Soleil BSC* da *Halbo Optics* no feixe de excitação e um polarizador *P920* da *Edinburgh Instruments* de prisma *Glan-Tompson* no feixe de emissão. Os tempos de vida de fluorescência dos corantes fenotiazínicos foram determinados nas diferentes misturas binárias água/solvente orgânico na região de emissão monitorada entre 525 a 775 nm a 20 °C.

Determinação da constante de ligação (K_b) dos corantes em sistema micelar

Soluções aquosas dos corantes ($1,0 \cdot 10^{-6}$ e $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) foram tituladas com alíquotas de uma solução estoque do surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS), registrando-se o espectro de absorção para cada adição. Efetuaram-se os ajustes e correções necessárias decorrentes da diluição do corante e do surfactante. Os ajustes das curvas de ligação foram realizados a partir da Equação 34, adaptada de Caetano e Tabak (1999).

$$F = F_f + \frac{(F_0 - F_f)}{(1/K_b([S] - \text{cmc})^N) + 1} \quad \text{Equação 34}$$

Onde F é a intensidade de absorção/fluorescência; F_f é a intensidade de absorção/fluorescência do FS ligado ao surfactante; F_0 é a intensidade de absorção/fluorescência na ausência do surfactante; $[S]$ é a concentração do surfactante e N é o número de moléculas de surfactante por molécula de corante.

Após a adição do surfactante, o comportamento fotofísico do corante foi acompanhado pelo espectro de intensidade de absorção/fluorescência.

4 - Resultados e Discussão

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Absorção das misturas binárias dos corantes fenotiazínicos

Foram obtidos espectros de absorção dos corantes fenotiazínicos em diferentes concentrações do corante para misturas dos solventes: água/acetonitrila, água/dioxano, água/etanol e água/glicerol.

4.1.1 - Azul de metileno

Os espectros de absorção do AM em solventes com diferentes polaridades são apresentados na Figura 12. Observa-se que a banda do monômero (M), de maior intensidade, sofre um deslocamento batocrômico de 654 nm para 664 nm à medida que a polaridade do solvente diminui.

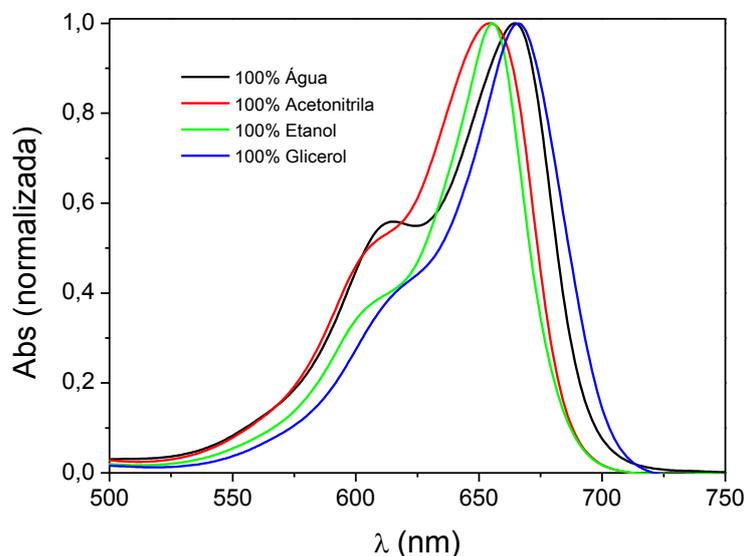


Figura 12 - Espectros de absorção de AM ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$) em diferentes meios.

Adicionalmente, observa-se a presença de uma banda de dímeros (D) em torno de 610 nm, o que caracteriza agregados do tipo H. A intensidade da banda do agregado foi mais acentuada em meio aquoso. Para avaliar melhor o processo de

agregação do AM nos diferentes meios construiu-se o gráfico da razão dímero/monômero (D/M), Figura 13. Verificou-se o favorecimento de processos agregacionais em meio aquoso, seguido pela acetonitrila. Nestes dois solventes, a razão D/M é maior do que aquela observada para os solventes etanol e glicerol.

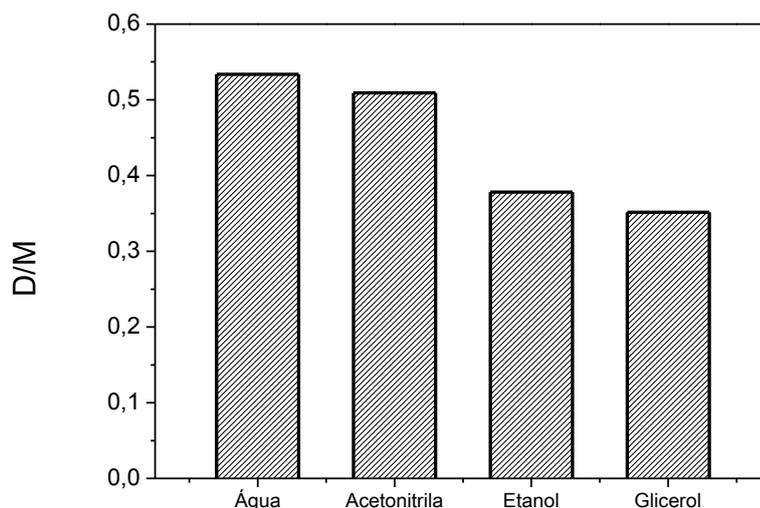


Figura 13 - Razão dímero/monômero (D/M) para o AM em diferentes meios.

Os espectros de absorção do azul de metileno foram obtidos em três diferentes concentrações, $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ao analisar as diferentes misturas água/solvente orgânico, mantendo fixa a proporção água/solvente orgânico e variando a concentração de AM, verificou-se um aumento na intensidade de absorção com o aumento da concentração de AM. Além disso, observou-se que, com o aumento da fração molar da água, houve uma diminuição na intensidade de absorção do AM. Com o aumento da fração de água, a banda em 610 nm, referente ao dímero (D), aparece com maior intensidade.

Os espectros de absorção do AM para as misturas binárias de água/acetonitrila são mostrados na Figura 14:

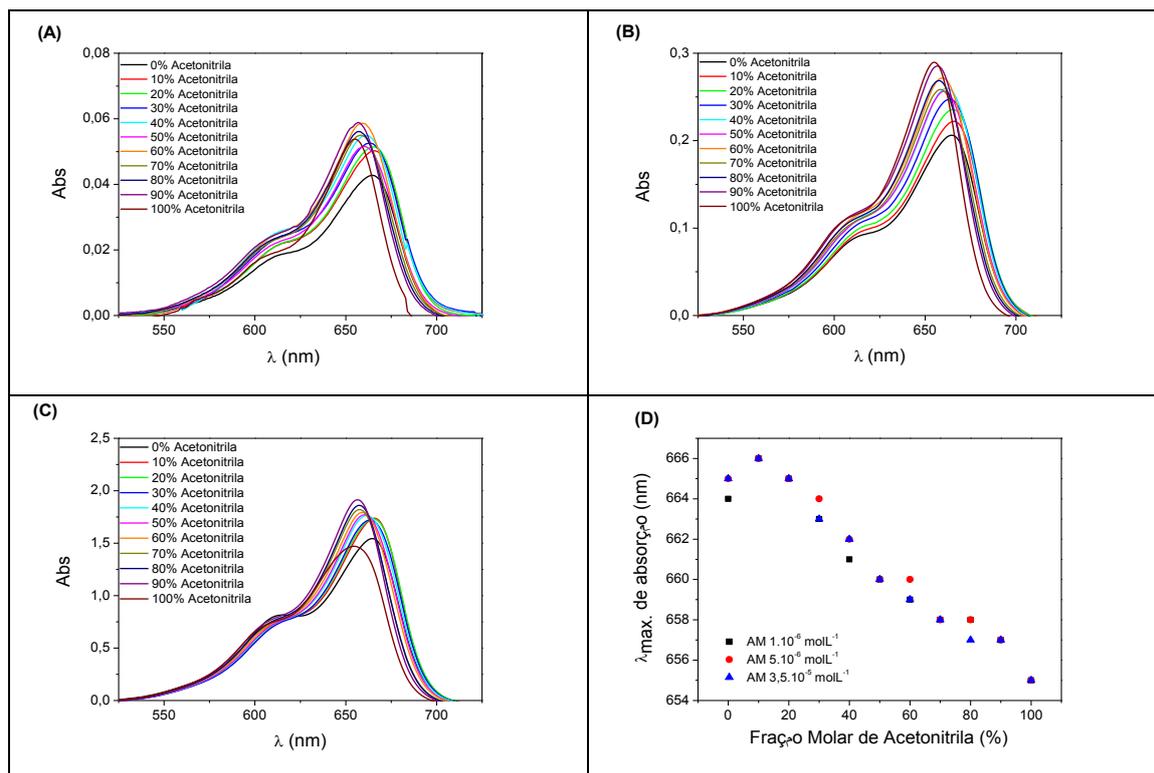


Figura 14 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/acetoneitrila. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.

Na Figura 14(A), 14(B) e 14(C), observa-se a presença da banda adicional de dímero (D) em torno de 610 nm. A intensidade da banda de agregado é mais acentuada em frações com maior predominância de água. Este fato pode ser devido a características peculiares da água, sobretudo à sua grande tendência de formar ligações de hidrogênio. A alta polaridade conferida pela água ao sistema solvente tende a favorecer o surgimento de interações hidrofóbicas entre os monômeros do AM (Moreira, et al. 2010). Na Figura 14(D), o gráfico com os comprimentos de onda máximos do AM nas misturas de água/acetoneitrila, este último um solvente orgânico polar aprótico, mostra que de modo geral a banda do monômero sofre um deslocamento batocrômico, ou seja, para maior comprimento de onda, à medida que aumenta a polaridade da mistura. Em uma análise mais detalhada, observa-se esse fenômeno a partir da fração molar de 10% de acetoneitrila. Entre a fração molar de 0 e 10 % de acetoneitrila, observa-se um deslocamento hipsocrômico, sendo que esse

fenômeno pode ocorrer, segundo Thompson et al. (2006), pela maior inclusão de moléculas orgânicas nas cavidades da água.

Os espectros de absorção do AM para as misturas binárias de água/dioxano são mostrados na Figura 15:

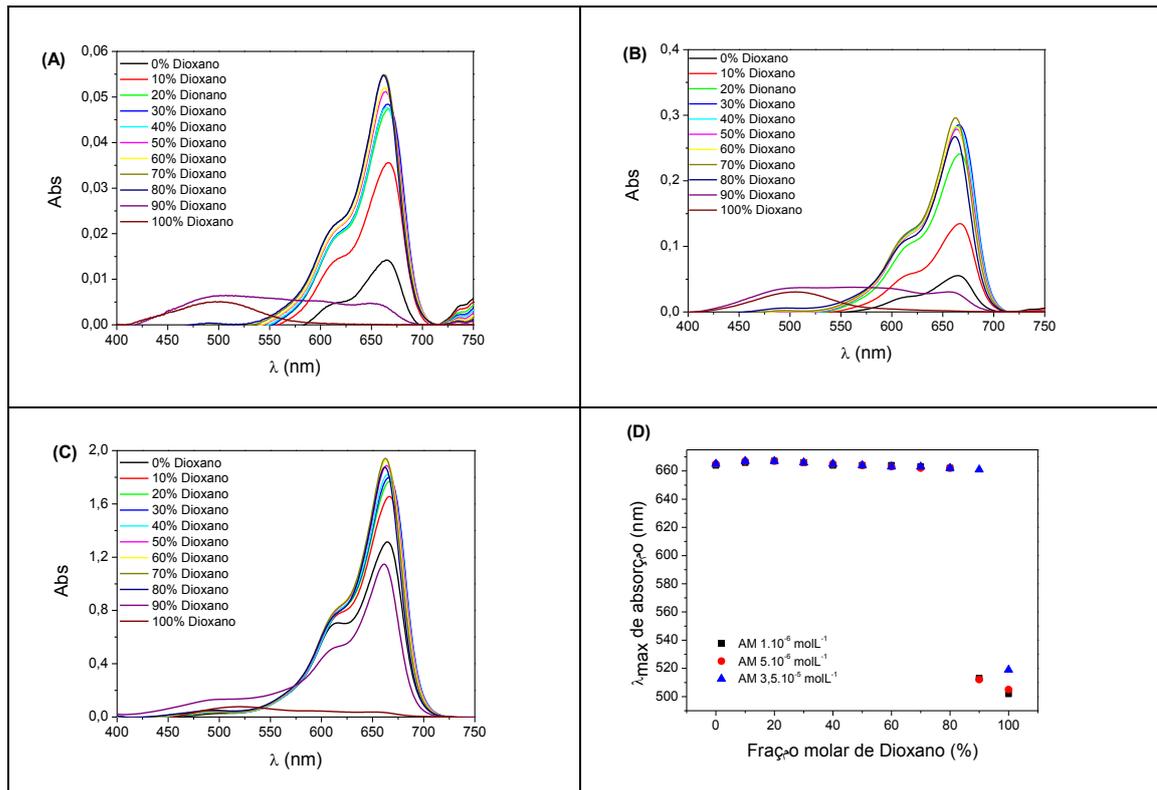


Figura 15 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.

Nas Figuras 15(A), 15(B) e 15(C) observa-se que à medida que aumenta a concentração da corante AM, torna-se mais pronunciada a banda do dímero em torno de 610 nm. A intensidade da banda de agregado é mais acentuada nas frações com maior predominância de água. Outro fator a ser levado em consideração foi que a fração de 100% de dioxano, mostrado na Figura 15(A-C), apresentou um decréscimo na intensidade de absorção para todas as concentrações de corante e o desaparecimento da banda de agregado. Além disso, pode ser observado na Figura 15(D), um deslocamento hipsocrômico da banda de absorção

de aproximadamente 150 nm. Esse comportamento pode ser atribuído ao fato do 1,4-dioxano, que deveria ser apolar de acordo com a sua constante dielétrica ($D \approx 2$), apresentar um comportamento "pseudo-polar" (Suppan, P.; 1990).

Os espectros de absorção do AM para as misturas binárias de água/etanol são mostrados na Figura 16:

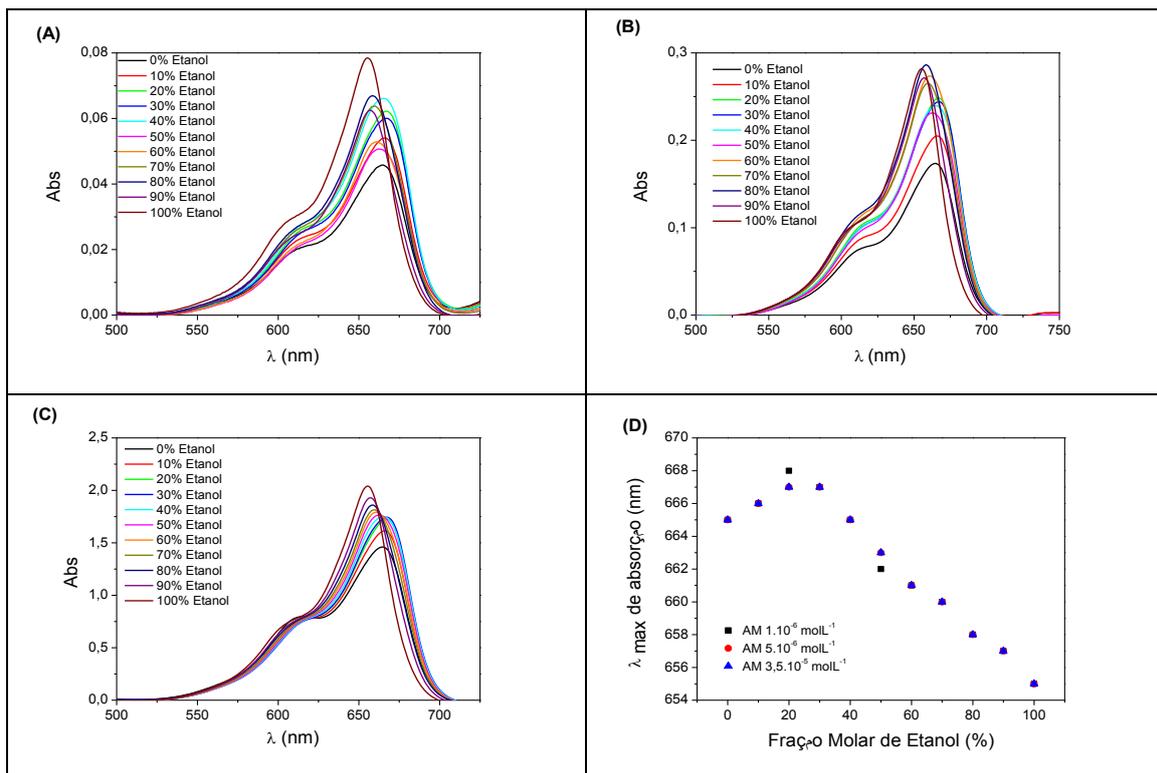


Figura 16 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/etanol. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.

A Figura 16(C) ilustra a relação entre a intensidade de absorção do AM e a quantidade de água presente na mistura de solventes água/etanol. Observa-se que a intensidade de absorção é maior em etanol puro. A intensidade de absorção diminui nas misturas de solventes com maior teor de água em virtude do processo de auto-agregação do corante (Moreira, et al. 2010).

Na Figura 16(D) observa-se que, à medida que a fração molar de etanol aumenta até 30%, ocorre um deslocamento de 2 nm para maiores comprimentos de

onda, ou seja há um deslocamento para a região do vermelho. A partir de 40% de etanol, observa-se que os comprimentos de onda máximos de absorção começam a diminuir, causando um deslocamento de 12 nm para a região do azul. Esse efeito pode ser devido ao aumento da viscosidade das frações molares. De acordo com os estudos de Nagasawa et al.(2005), o aumento da viscosidade até a fração molar de 20% de etanol é devido à formação dos *clusters* de álcool dentro da rede de ligações de hidrogênio de moléculas de água. A partir da fração molar de 30% de etanol, os *clusters* de álcool começam a aumentar, diminuindo assim, a viscosidade e o máximo de absorção para estas frações molares.

Os espectros de absorção do AM para as misturas binárias de água/glicerol são mostrados na Figura 17:

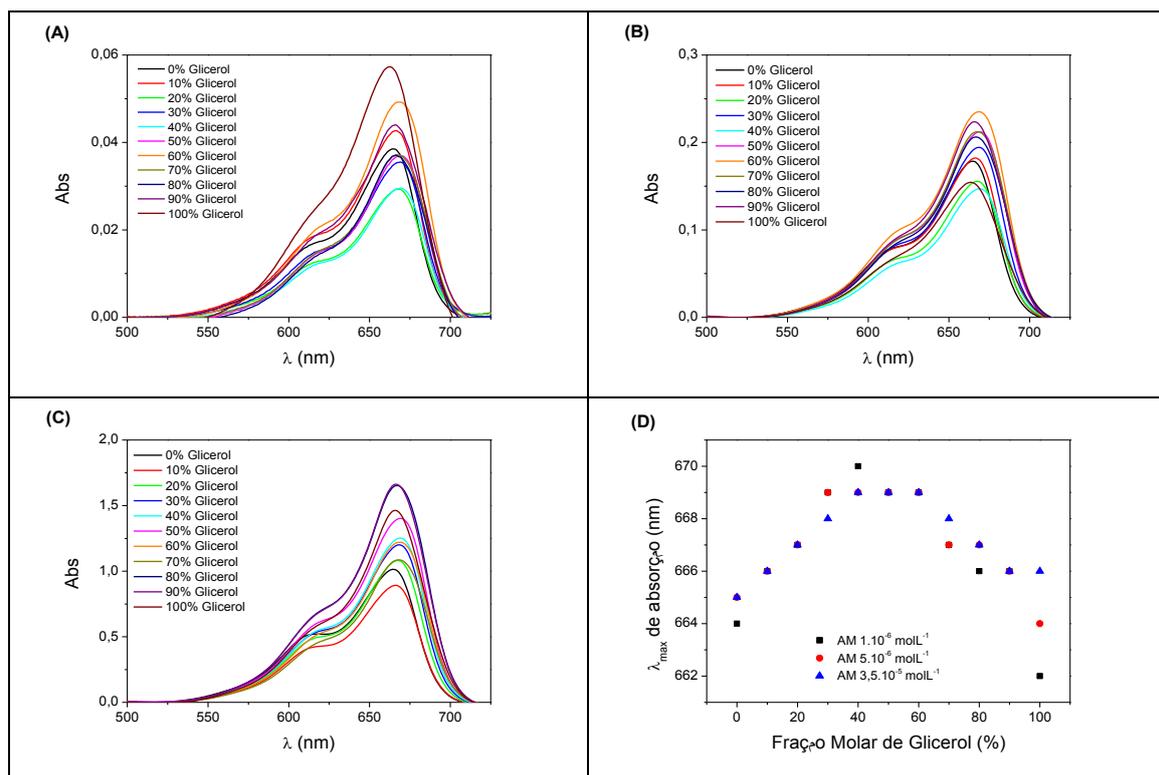


Figura 17 - Espectros de absorção de AM na mistura binária de água/glicerol. (A) Espectros de AM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AM em misturas com diferentes composições molares.

Na Figura 17(A), 17(B) e 17(C), observa-se a presença da banda de dímero (D) em torno de 610 nm, a qual é mais acentuada nas frações com maior predominância de água e com maior concentração de AM. A intensidade da banda de agregado não se apresenta tão acentuada na mistura água/glicerol quanto comparada com a mistura água/acetonitrila.

Observando os comprimentos de onda máximos de absorção das frações na mistura de água/glicerol, verificou-se que um aumento da fração molar do glicerol até 60% leva a um deslocamento batocrômico. À medida em que há predominância de glicerol na composição molar, observa-se um deslocamento hipsocrômico do comprimento de onda de absorção do corante.

4.1.2 - 1,9-Dimetil Azul de Metileno

Os espectros de absorção do DMAM em solventes de diferentes polaridades são apresentados na Figura 18. Observa-se que a banda de monômero (M) em meio aquoso apresenta um valor máximo de comprimento de onda em 648 nm. À medida em que a polaridade do solvente orgânico diminui, observa-se que a banda do monômero sofre um deslocamento batocrômico para 658 nm em relação ao meio aquoso.

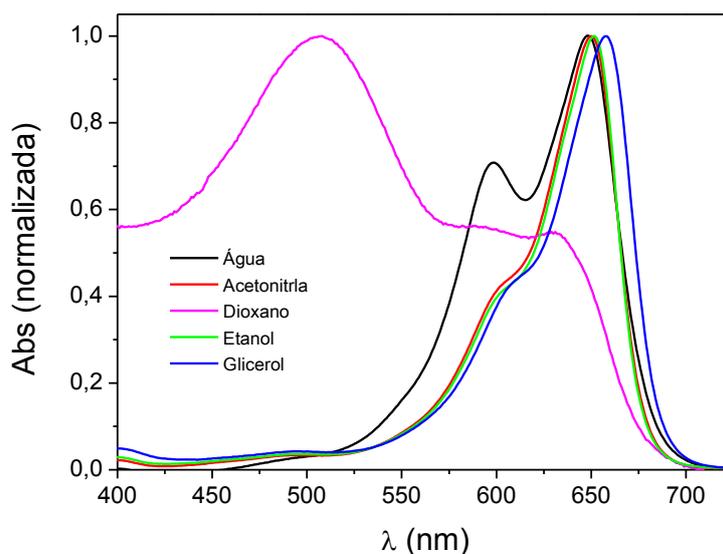


Figura 18 - Espectros de absorção de DMAM ($5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) em diferentes solventes.

A banda de dímeros nos espectros de absorção deste corante pode ser observada em torno de 593 nm. Do mesmo modo que foi observado para o AM, a intensidade da banda do agregado foi mais acentuada em meio aquoso, conforme mostra a razão D/M na Figura 19:

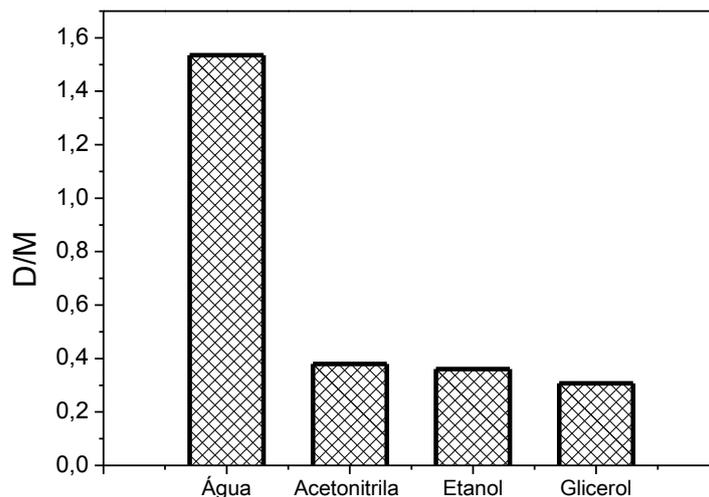


Figura 19 - Razão dímero/monômero (D/M) para o DMAM em diferentes meios.

Comparando-se as Figuras 13 e 19, observa-se que os processos agregacionais em água são muito mais favorecidos para o DMAM do que para o AM. Além disso, a relação D/M para o DMAM é muito maior em água do que nos solventes orgânicos. Este comportamento está relacionado com a estrutura do DMAM, cujos átomos de hidrogênio das posições 1 e 9 do AM foram substituídos por grupos $-CH_3$, aumentando assim a hidrofobicidade do corante e a sua solubilidade nos solventes orgânicos.

Os espectros de absorção do 1,9-dimetil azul de metileno foram obtidos nas concentrações $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ao analisar as diferentes misturas água/solvente orgânico, mantendo fixa a proporção água/solvente orgânico e variando a concentração de DMAM, verificou-se um aumento na intensidade de absorção com o aumento da concentração de 1,9-dimetil azul de metileno. Além disso, observou-se que com o aumento da fração molar de água, houve uma diminuição na intensidade de absorção do DMAM. Com o aumento da fração de água, nota-se que a banda nas proximidades de 593 nm, referente aos

dímeros (D), aparece com maior intensidade. Na concentração de $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a banda referente ao dímero em meio aquoso apresenta maior intensidade em relação a banda de monômero.

Ao analisar as intensidades de absorção do DMAM com as intensidades do AM, observa-se que DMAM apresentou maior intensidade de absorção. Esse fato está associado à sua estrutura molecular mais hidrofóbica.

Os espectros de absorção do DMAM para as misturas binárias de água/acetoneitrila são mostrados na Figura 20:

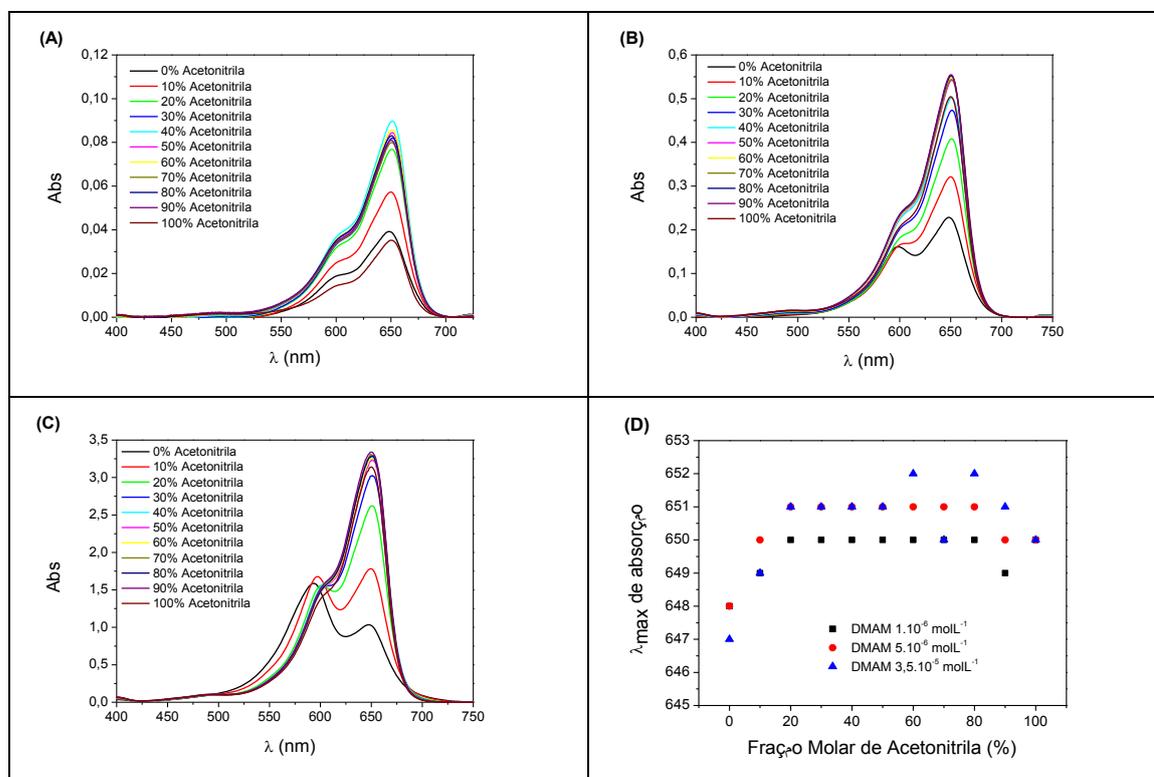


Figura 20 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/acetoneitrila. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.

Na Figura 20(A), 20(B) e 20(C), observa-se que à medida que aumenta a concentração da corante DMAM, aumenta também a banda do dímero. Na concentração de $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ torna-se evidente que o fenômeno de agregação é dependente do meio, ou seja, do solvente, visto que a banda do dímero é mais

intensa do que a banda do monômero na fração 100% de água. Na Figura 20(D), observa-se que ocorre um deslocamento batocrômico com a diminuição da polaridade do meio.

Os espectros de absorção do DMAM para as misturas binárias de água/dioxano são mostrados na Figura 21:

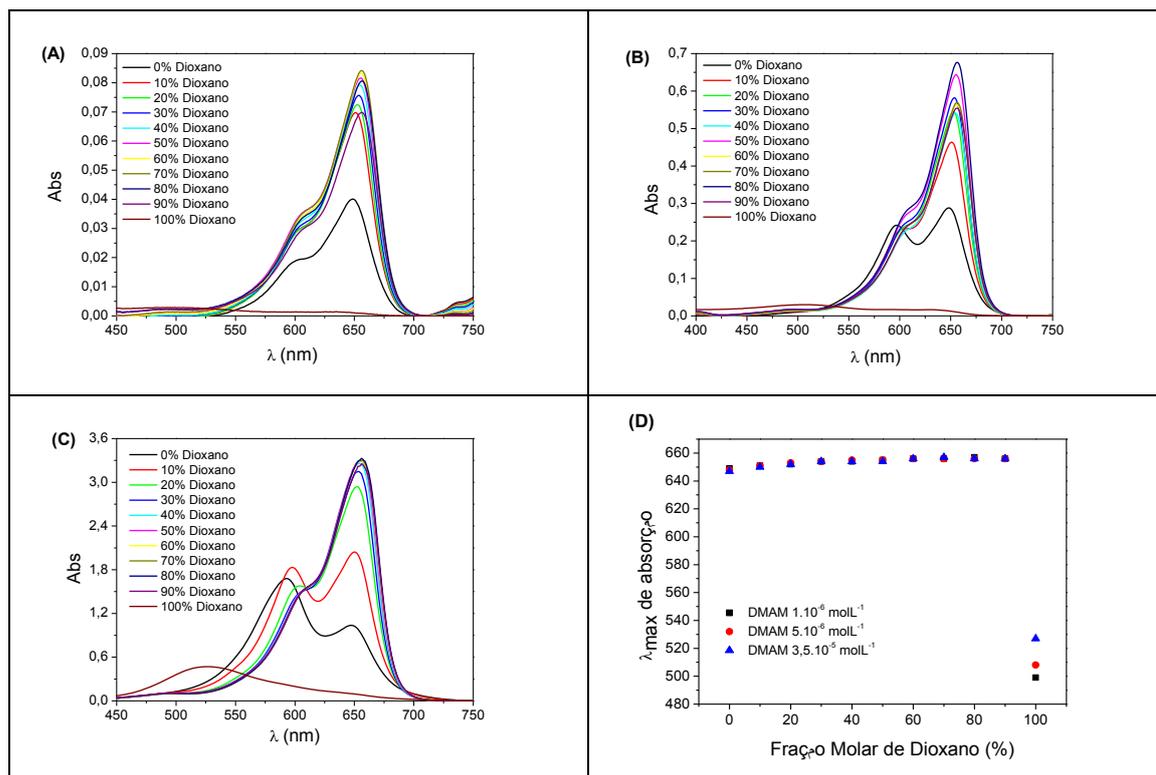


Figura 21 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.

Na Figura 21(A), 21(B) e 21(C), observa-se que à medida que aumenta a concentração da corante DMAM, aumenta também a intensidade da banda de dímeros. Na concentração de $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, na ausência do solvente orgânico, a banda do dímero apresenta uma maior intensidade do que a banda do monômero. Por outro lado, para a fração contendo 100% de dioxano, observa-se um decréscimo na intensidade de absorção e um deslocamento para menor comprimento de onda, o

que pode ser atribuído ao comportamento "pseudo-polar" do 1,4-dioxano (Suppan, P.; 1990).

Os espectros de absorção do DMAM para as misturas binárias de água/etanol são mostrados na Figura 22:

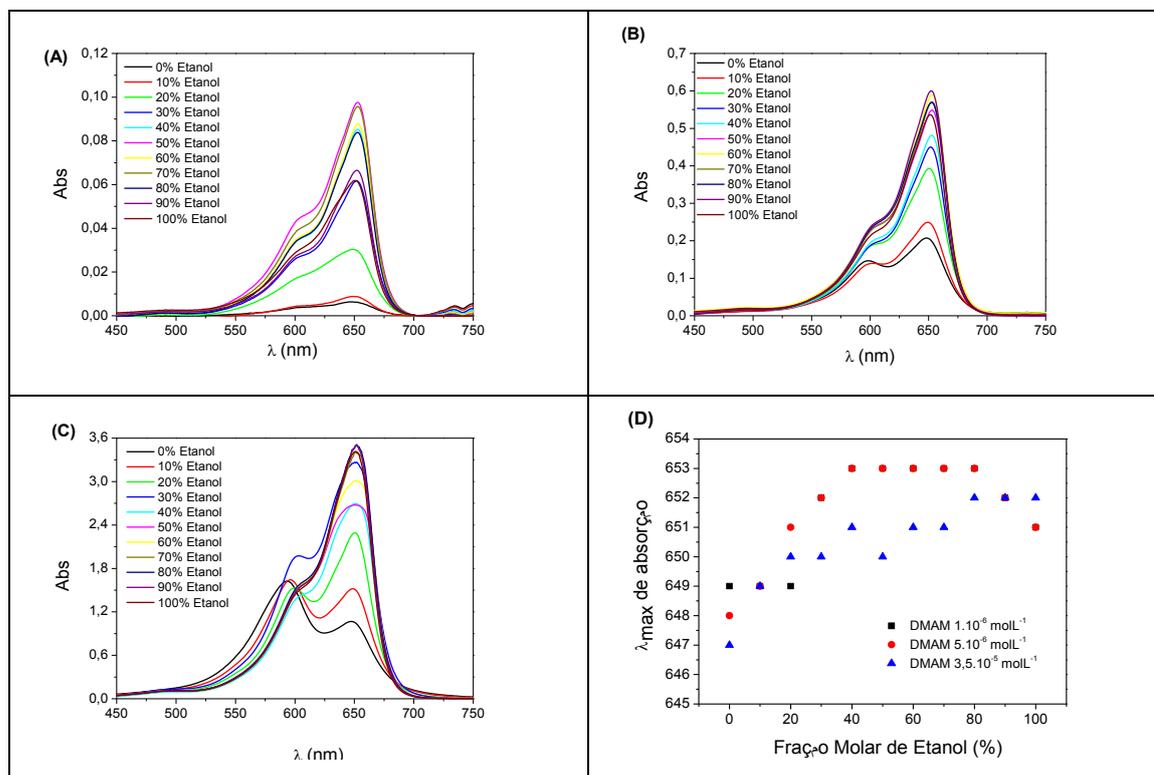


Figura 22 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/etanol. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.

Na Figura 22(A), 22(B) e 22(C), observa-se que à medida que aumenta a concentração da corante DMAM aumenta a intensidade de absorção e a banda do dímero também fica mais evidente. Na concentração de $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a banda de dímero é claramente observada até a fração molar de 30% de etanol. Na Figura 22(D) observa-se que com a diminuição da polaridade do meio há um deslocamento batocrômico do máximo de absorção das misturas. Este fato também foi observado para as misturas de água/acetonitrila.

Os espectros de absorção do DMAM para as misturas binárias de água/glicerol são mostrados na Figura 23:

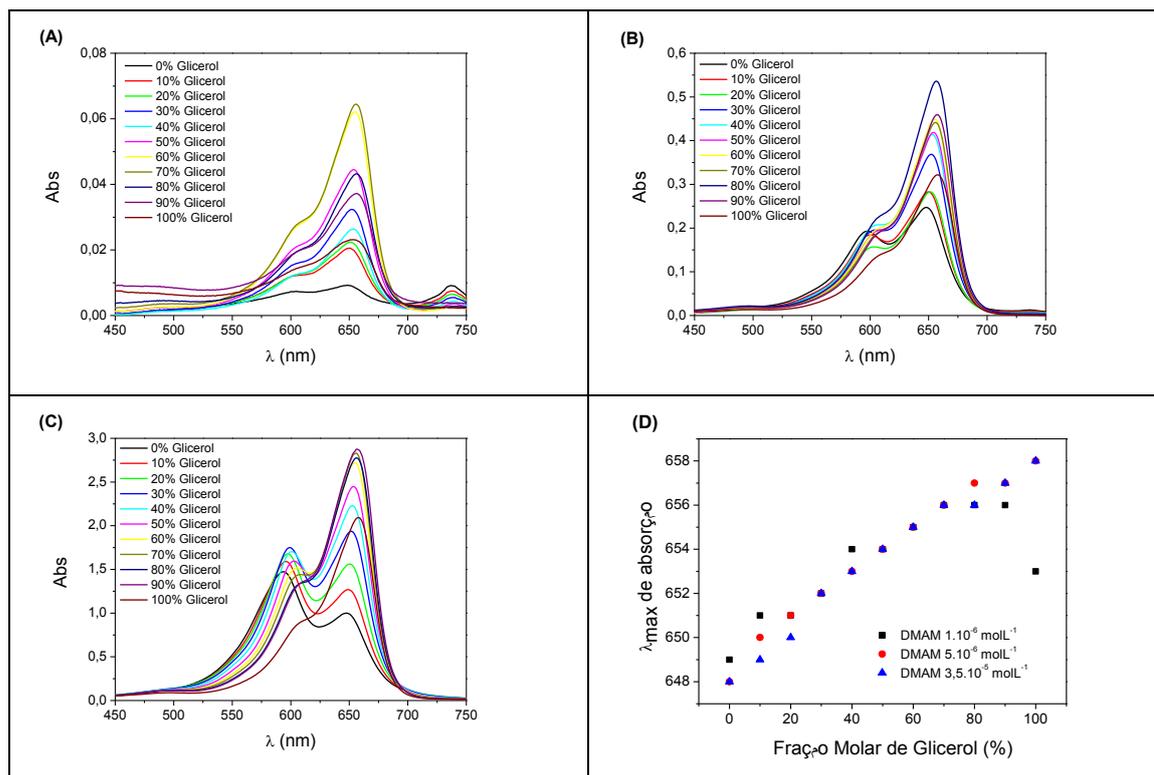


Figura 23 - Espectros de absorção de DMAM na mistura binária de água/glicerol. (A) Espectros de DMAM $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de DMAM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de DMAM $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do DMAM em misturas com diferentes composições molares.

Ao analisar as Figuras 23(A), 23(B) e 23(C) fica evidenciado que o fenômeno da agregação do DMAM esta diretamente ligado à variação da concentração do mesmo no meio.

A alteração da polaridade da mistura de solventes foi obtida adicionando-se uma quantidade maior de solvente orgânico. Ao analisar as Figuras 23(B) e 23(C), observa-se que para composições menores do que 60% e 40% de água, respectivamente, há uma região onde o DMAM estabiliza-se em sua forma monomérica. Quando adiciona-se mais água, o DMAM exibe com maior intensidade a banda nas proximidades 593 nm.

Com a adição de solvente orgânico, o ambiente torna-se favorável ao DMAM na forma monomérica, manifestado pelo aumento da banda em 648 nm. Neste ponto, as absorvâncias em 593 nm sofrem diminuições de intensidade, enquanto que em 648 nm atinge o valor de absorvância máximo esperado para o DMAM em

solvente orgânico. Ao adicionar-se água, em quantidade adequada, a banda de 593 nm é restabelecida e a intensidade da banda em 648 nm diminui.

4.1.3 – Tionina

Os espectros de absorção da Th em solventes com diferentes polaridades são apresentados na Figura 24. Observa-se que a banda do monômero em 598 nm sofre um deslocamento batocrômico em meio polar prótico (etanol e glicerol). Considerando a acetonitrila, um meio polar aprótico, observa-se um deslocamento hipsocrômico em relação ao meio aquoso.

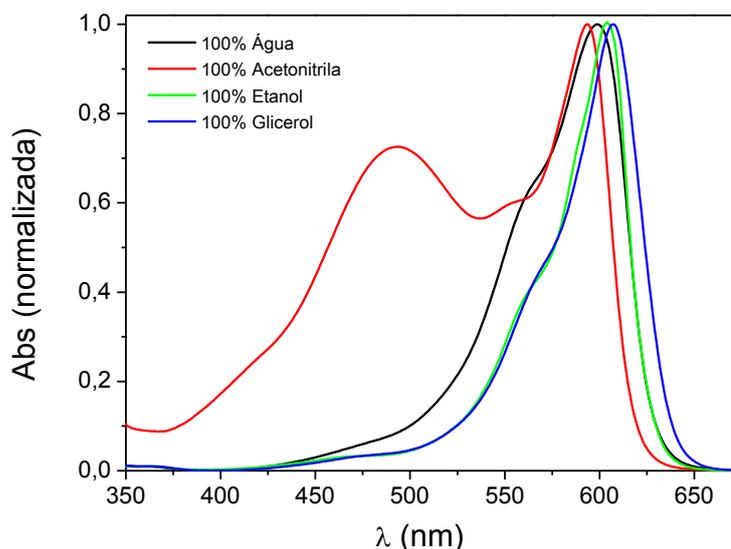


Figura 24 - Espectros de absorção de Th ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes meios.

O dímero da tionina pode ser observado em menores comprimentos de onda. A intensidade da banda do agregado foi mais acentuada em acetonitrila. Para avaliar melhor o processo de agregação da Th nos diferentes meios, construiu-se o gráfico da razão D/M, Figura 25. Verificou-se o favorecimento de processos agregacionais em acetonitrila, seguido pela água.

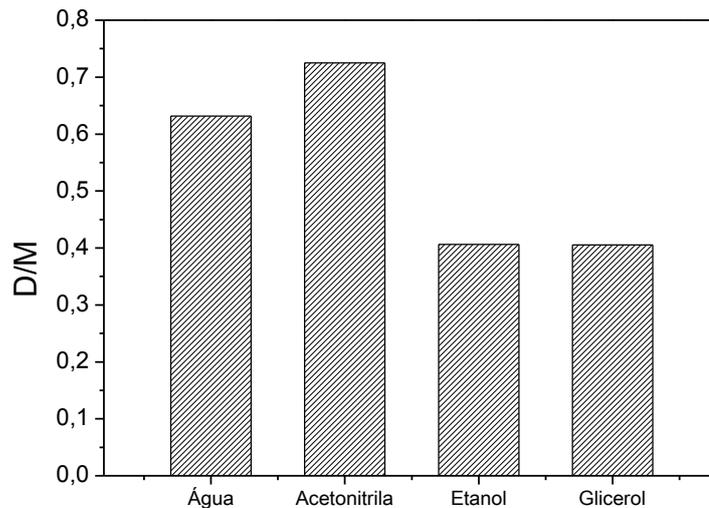


Figura 25 - Razão dímero/monômero (D/M) para a Th em diferentes meios.

Ao comparar o gráfico da razão D/M da Th com o gráfico da razão D/M do AM, observa-se que a agregação da Th é mais acentuada em acetonitrila, seguida pela agregação no meio aquoso. Esse fato está relacionado à estrutura da Th, cujo o grupo $-N(CH_3)_2$ das posições 3 e 7 do AM sofre reações de desmetilação para assim obter-se a tionina, $-NH_2$ nas posições 3 e 7. Como mostrado também para o AM, a Th apresenta baixa agregação em meio polar prótico. Neste meio, observa-se também que a viscosidade do solvente não interfere no fenômeno de agregação.

Os espectros de absorção da tionina foram obtidos em três diferentes concentrações, $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ao analisar as diferentes misturas água/solvente orgânico, mantendo fixa a proporção água/solvente orgânico e variando a concentração de Th, verificou-se um aumento na intensidade de absorção com o aumento da concentração de tionina. Além disso, observou-se que com o aumento da fração molar da água houve uma diminuição na intensidade de absorção da Th. Com o aumento da fração de água, a banda nas proximidades de 560 nm, referente aos dímeros, aparece com maior intensidade.

Os espectros de absorção da Th para as misturas binárias de água/acetonitrila são mostrados na Figura 26:

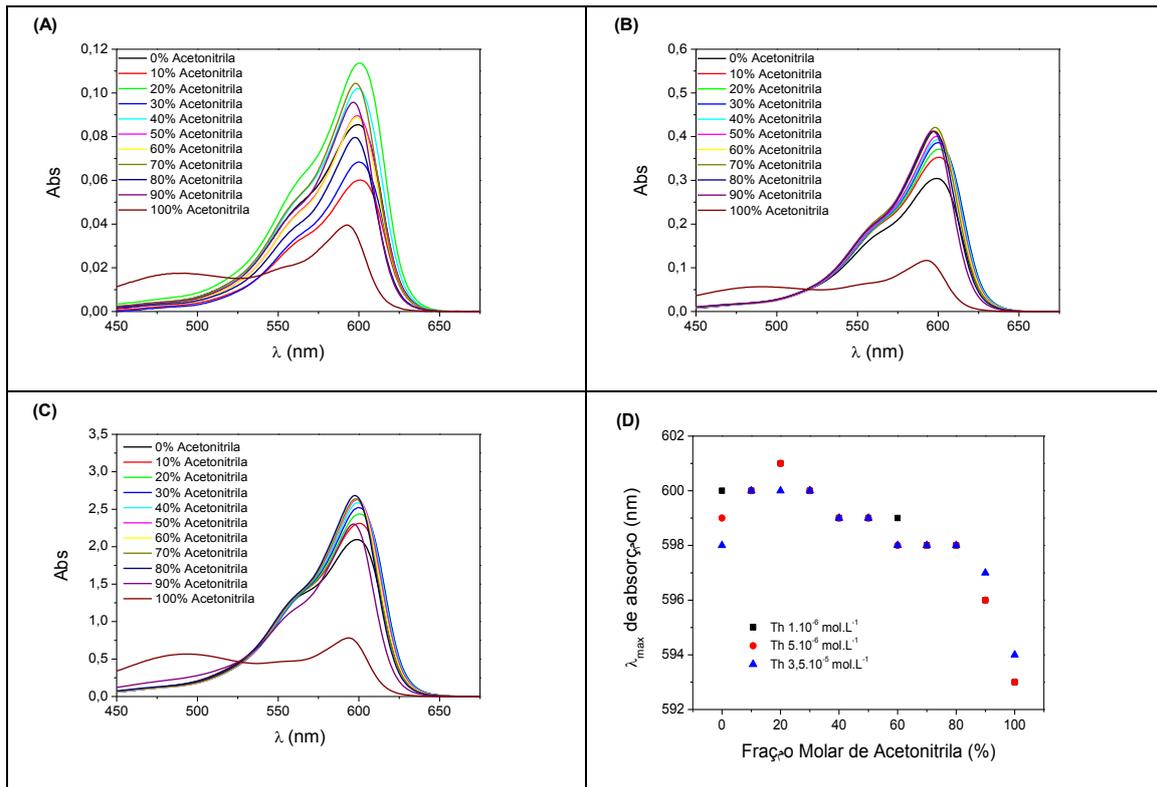


Figura 26 - Espectros de absorção de Th na mistura binária de água/acetonitrila. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de Th $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.

Para a Th nas três concentrações, observa-se que à medida que a fração molar de acetonitrila aumenta há um deslocamento hipsocrômico. Observa-se que em 100% de acetonitrila, a amostra apresenta intensidade de absorção inferior ao meio aquoso.

Os espectros de absorção da Th para as misturas binárias de água/dioxano são mostrados na Figura 27:

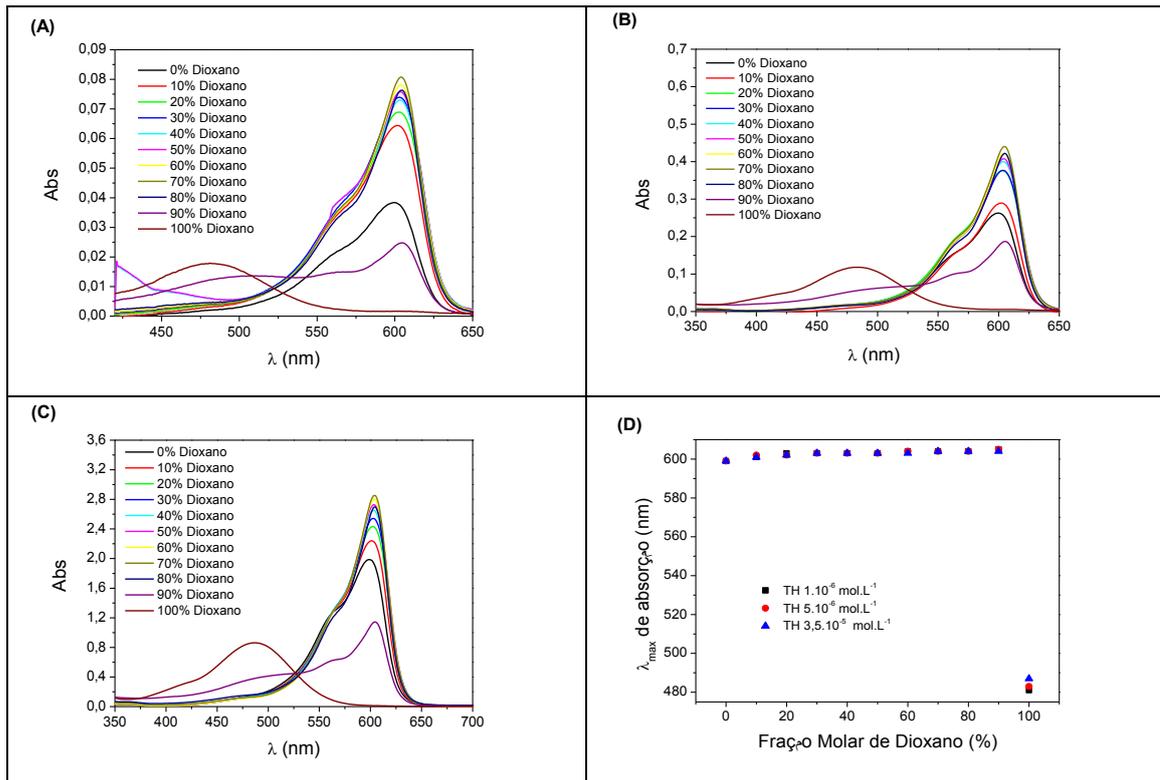


Figura 27 – Espectros de absorção de Th na mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros de Th $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.

Nas Figuras 27(A), 27(B) e 27(C), observa-se que à medida que aumenta a concentração de Th, aumenta a intensidade de absorção até a fração de 80% de dioxano nas misturas. Nos espectros de absorção da Th na mistura de água/dioxano, um solvente polar aprótico, observa-se que à medida que a fração molar de dioxano aumenta até 90% não há deslocamento significativo do máximo de absorção. A partir da fração molar de 90%, observa-se que há um deslocamento significativo do máximo de absorção para a região do azul.

Os espectros de absorção da Th para as misturas binárias de água/etanol são mostrados na Figura 28:

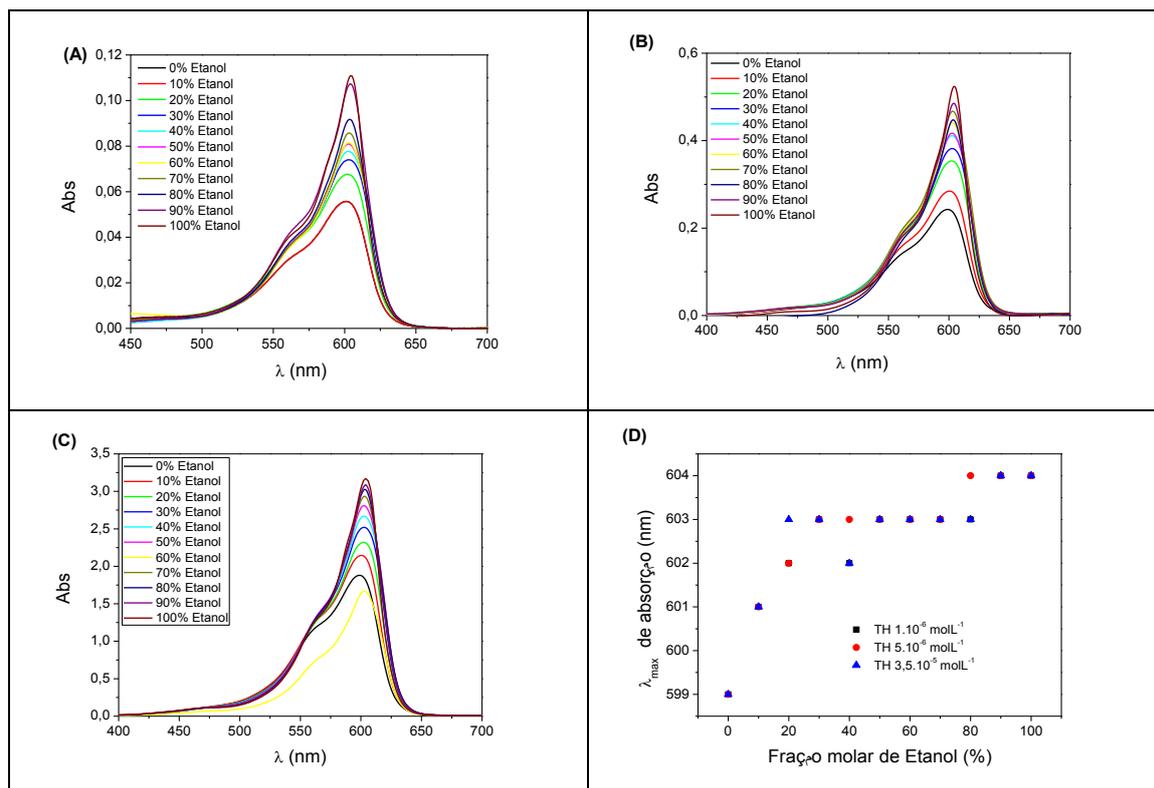


Figura 28 – Espectros de absorç~o de Th na mistura bin~ria de ~gua/etanol. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de Th $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gr~fico dos comprimentos de onda m~ximos de absorç~o da Th em misturas com diferentes composiç~es molares.

À medida que aumenta a polaridade do meio, a banda do mon~mero desloca-se para a regi~o do vermelho, indicando que o momento dipolar do estado excitado da mol~cula ~ maior que o do estado fundamental. No caso de um deslocamento para a regi~o do azul, com o aumento da polaridade do meio, o momento dipolar do estado excitado ~ menor que o do estado fundamental.

Os espectros de absorç~o da Th para as misturas bin~rias de ~gua/glicerol s~o mostrados na Figura 29:

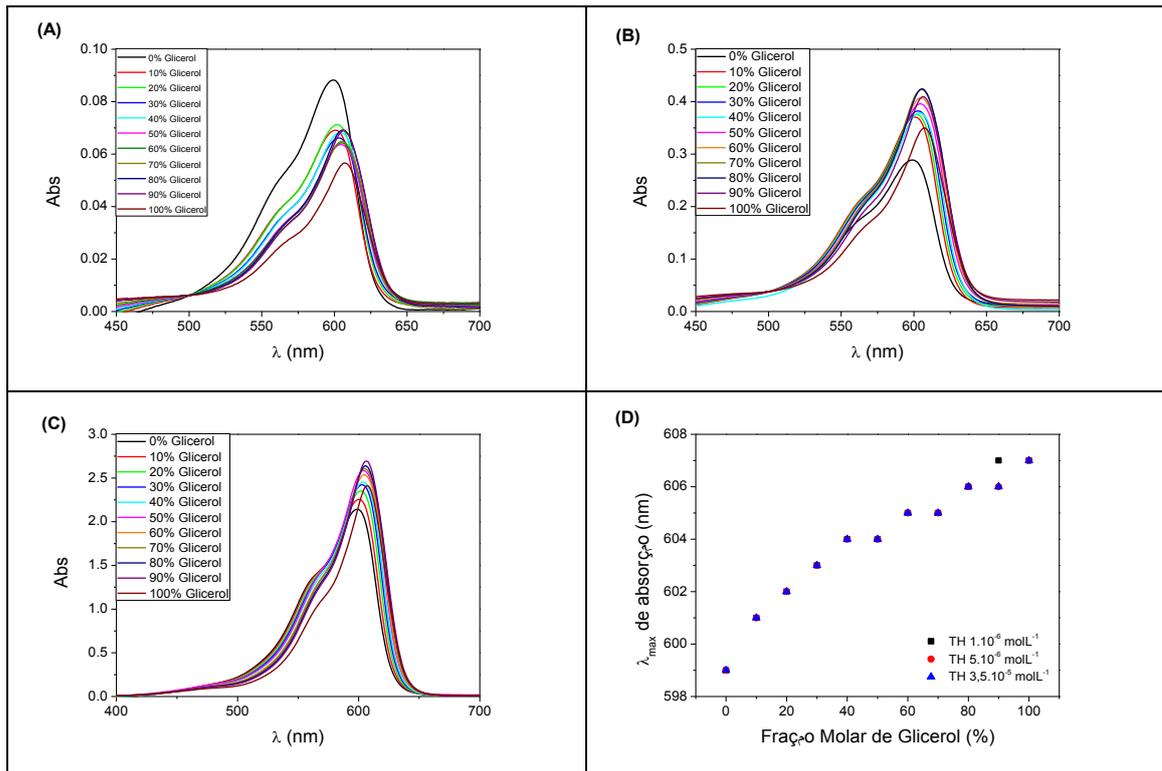


Figura 29 – Espectros de absorção de Th na mistura binária de água/glicerol. (A) Espectros de Th $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de Th $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de Th $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.

Nos espectros de absorção do Th nas misturas de água/glicerol, um solvente polar pr tico, observa-se que   medida que a fração molar de glicerol aumenta, o máximo de absorção desloca-se em aproximadamente 8 nm, levando a um deslocamento batocrômico. Com esse deslocamento positivo, pode-se dizer que o momento de dipolo do estado excitado da Th   maior do que o momento de dipolo para o estado fundamental, $\mu(S_1) > \mu(S_0)$ (Suppan, P.; 1990). Com o aumento da fração molar de glicerol, há um aumento da polaridade do meio indicando que o estado excitado da molécula   mais polar que o estado fundamental (Miranda, J. A. de, 2001).

4.1.4 - Azures

4.1.4.1 - Azure A

Os espectros de absorção do AA em solventes com diferentes polaridades são apresentados na Figura 24. Observa-se que a banda de absorção do corante sofre um deslocamento batocrômico de 622 nm para 636 nm à medida em que a polaridade do solvente diminui. Além disso, a banda característica dos agregados em menores comprimentos de onda não é claramente observada para o AA como é para outros corantes dissolvidos nos mesmos solventes. Cabe salientar que a assimetria das curvas, especialmente para o corante dissolvido em água, pode indicar a presença de processos agregacionais.

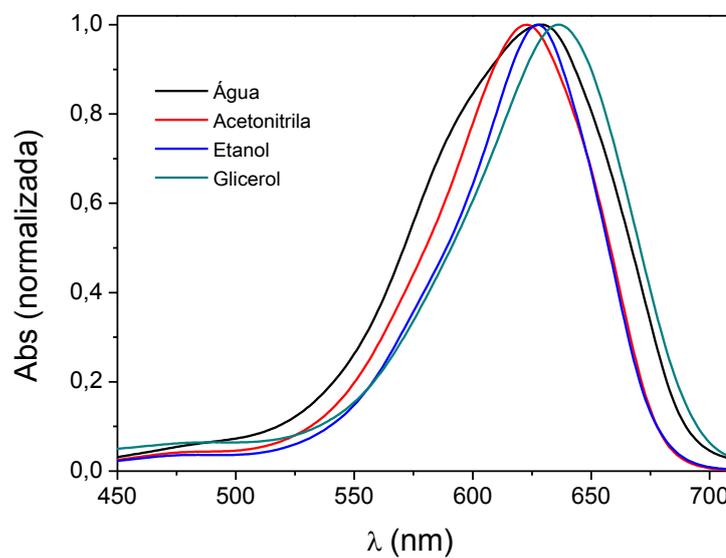


Figura 30 - Espectros de absorção do AA ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes meios.

Os espectros de absorção do Azure A foram obtidos em três diferentes concentrações, $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Ao analisar as diferentes misturas água/solvente orgânico, mantendo fixa a proporção água/solvente orgânico e variando a concentração do AA, verificou-se um aumento na intensidade de absorção com o aumento da concentração do Azure A. Além disso, observou-se que com o aumento da fração molar da água houve uma diminuição na intensidade de absorção do AA.

Os espectros de absorção do AA para as misturas binárias de água/acetonitrila são mostrados na Figura 31:

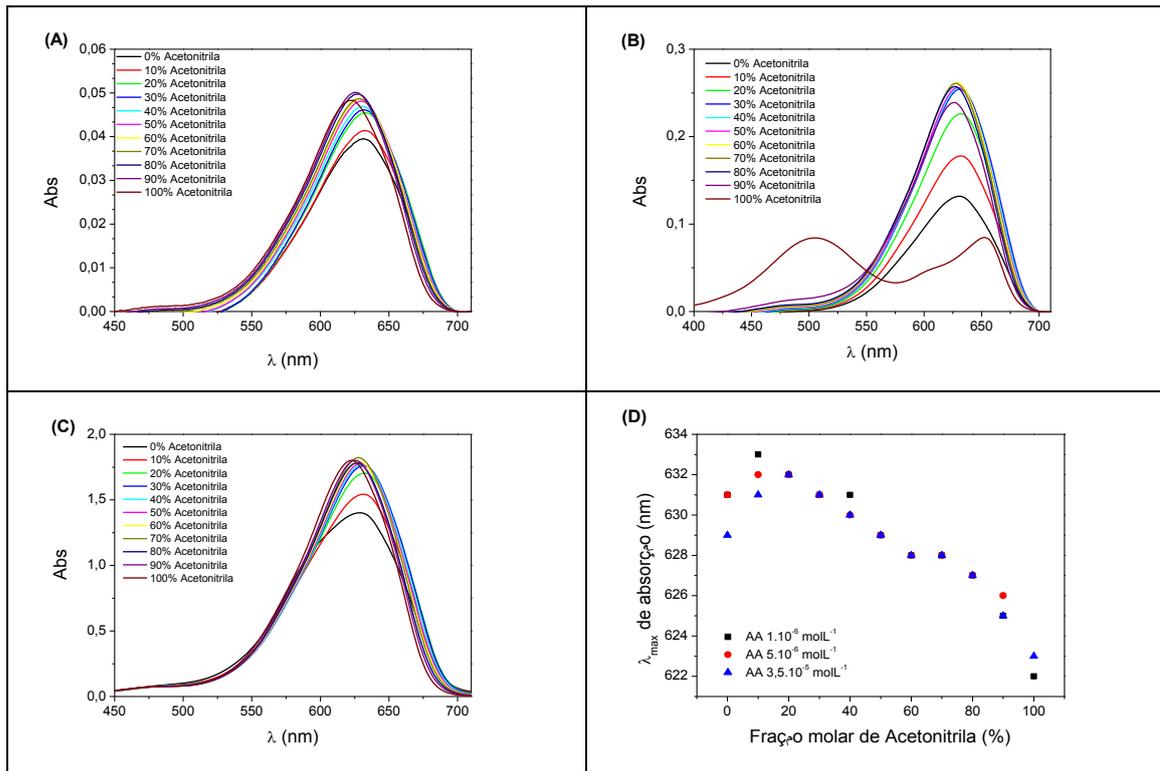


Figura 31 – Espectros de absorç~o do AA na mistura bin~ria de ~gua/acetoneitrila. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AA $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gr~fico dos comprimentos de onda m~ximos de absorç~o do AA em misturas com diferentes composiç~es molares.

Na Figura 31(D), o gr~fico com os comprimentos de onda m~ximos de AA nas misturas de ~gua/acetoneitrila mostra que de modo geral, com a diminuiç~o da polaridade do solvente, a banda de absorç~o sofre um deslocamento batocromico. Em uma an~lise mais detalhada, observa-se esse fen~meno ~ apresentado a partir da fraç~o molar de 10% de acetoneitrila. Entre a fraç~o molar de 0 e 10 % de acetoneitrila, observa-se um deslocamento hipsocromico. Este fen~meno, segundo Thompson et al. (2006), pode ser atribuido ~ uma regi~o onde h~ maior inclus~o de mol~culas org~nicas nas cavidades da ~gua.

Os espectros de absorç~o do AA para as misturas bin~rias de ~gua/dioxano s~o mostrados na Figura 32:

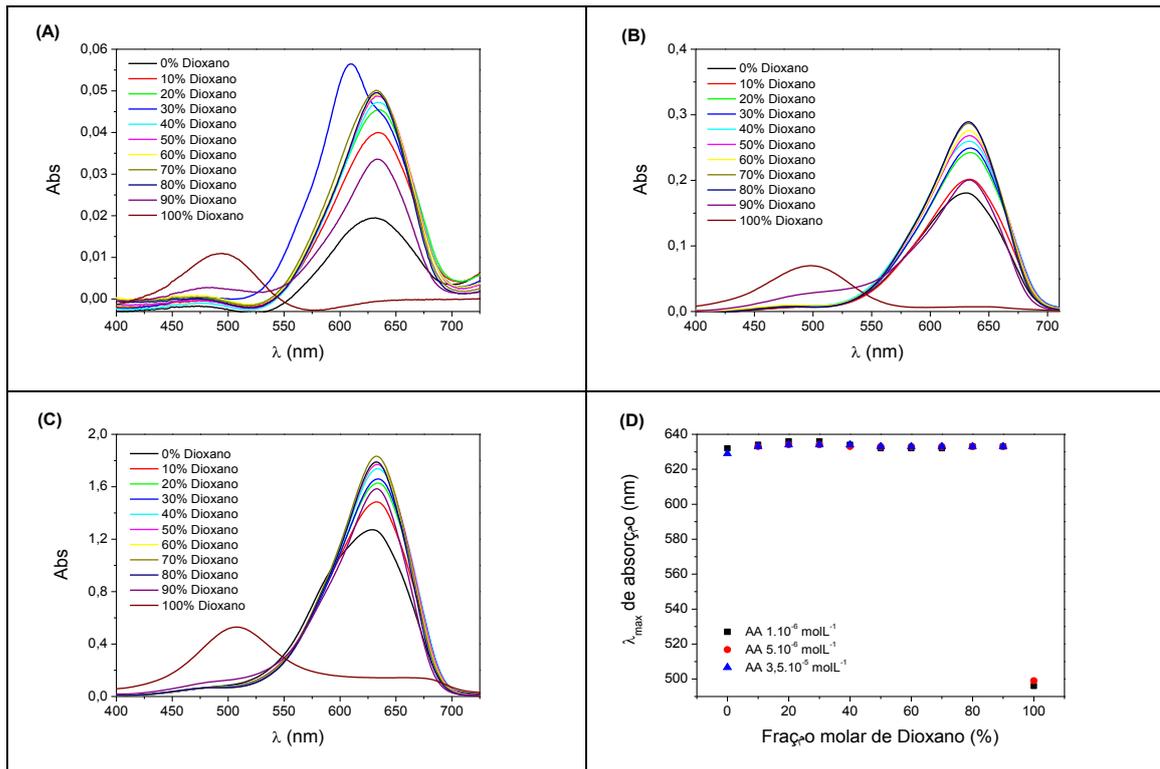


Figura 32 – Espectros de absorç̃o de AA nas mistura binária de água/dioxano. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros de $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorç̃o da Th em misturas com diferentes composiç̃ões molares.

Nas misturas binárias de água/dioxano do AA, com relaç̃o às misturas binárias de água/dioxano do AM, observa-se que a diminuiç̃o da presenç̃a de grupos metilas em um grupamento amino no corante não interfere na sua intensidade de absorç̃o. Quando analisada a intensidade de absorç̃o das misturas binárias de água/dioxano do corante AA em relaç̃o às misturas binárias de água/dioxano do corante Th, pode-se observar que o grau de metilaç̃o do grupamento amino interfere na intensidade de absorç̃o, uma vez que a tionina possui seus dois grupos amino desmetilados, fato este que a torna simétrica. Dessa forma, a Th apresenta uma maior intensidade de absorç̃o do que o AM e o Azure A.

Os espectros de absorç̃o do AA para as misturas binárias de água/etanol são mostrados na Figura 33:

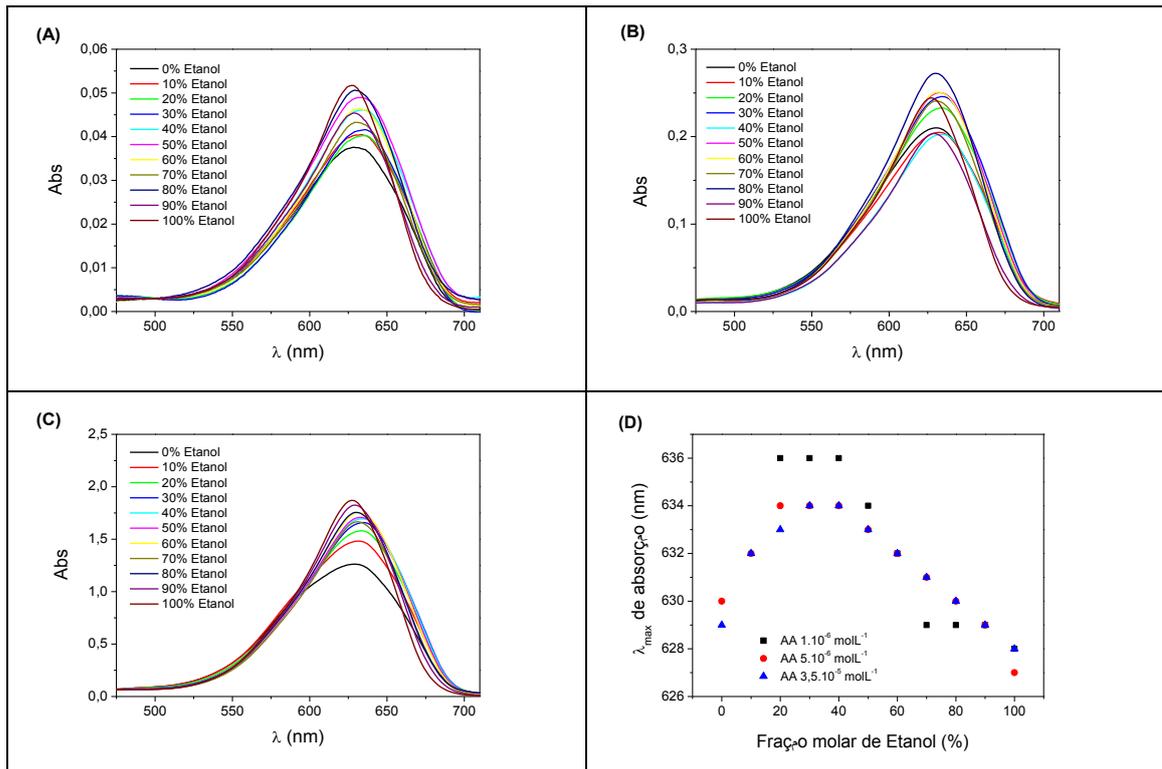


Figura 33 - Espectros de absorç~o de AA nas misturas bin~arias de ~gua/etanol. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AA $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gr~afico dos comprimentos de onda m~aximos de absorç~o da Th em misturas com diferentes composiç~oes molares.

As intensidades de absorç~o do AA na mistura bin~aria de ~gua/etanol, com rela~ao ~s misturas bin~arias de ~gua/etanol do AM, mostra a influ~encia da diminuiç~ao da presen~a de grupos metilas em um grupamento amino no corante. Essa influ~encia tamb~em ~ observada quando comparam-se as misturas bin~arias ~gua/etanol do AA com o corante Th, o qual possui grupamentos de amino com aus~encia de grupos metilas. A Th apresenta uma intensidade de absorç~o maior do que o AM e o AA.

Os espectros de absorç~o do AA para as misturas bin~arias de ~gua/glicerol s~o mostrados na Figura 34:

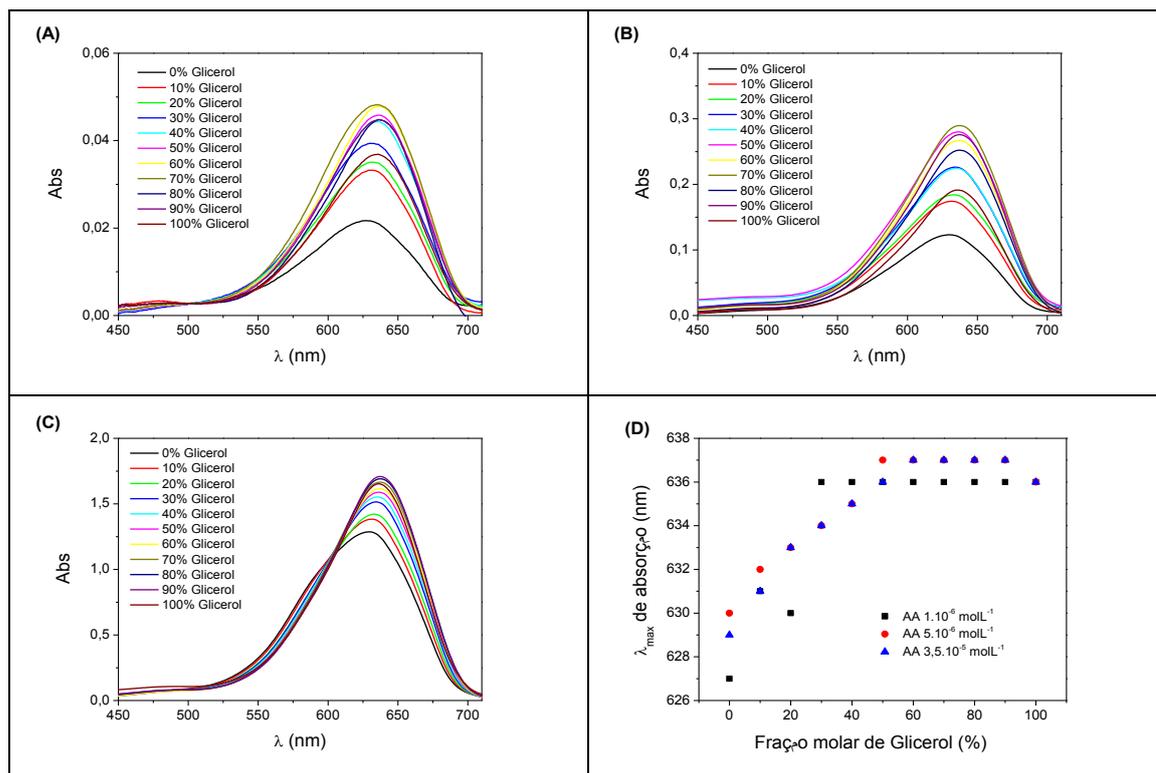


Figura 34 - Espectros de absorção de AA nas misturas binárias de água/glicerol. (A) Espectros de AA $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AA $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AA $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção da Th em misturas com diferentes composições molares.

Nos espectros de absorção do AA nas misturas de água/glicerol, ao analisar as Figuras 34(A), 34(B) e 34(C), observa-se a influência da concentração do corante no meio. À medida em que a concentração do corante aumenta, a intensidade de absorção também aumenta. Na figura 34(C), observa-se a presença do ponto isobéptico no comprimento de onda de aproximadamente 610 nm, indicando que o fenômeno da agregação acontece geralmente em uma etapa, num equilíbrio simples entre monômeros e dímeros.

Na Figura 34(D) observa-se que à medida em que a fração molar de glicerol aumenta, o comprimento de onda máximo de absorção desloca-se para o vermelho. Com esse deslocamento positivo, pode-se dizer que o momento de dipolo do estado excitado do AA é maior do que o momento de dipolo para o estado fundamental, $\mu(S_1) > \mu(S_0)$ (Suppan, P.; 1990). Com o aumento da fração molar de glicerol há um aumento da polaridade do meio indicando que o estado excitado da molécula é mais polar que o estado fundamental (Miranda, J. A. de, 2001).

4.1.4.2 – Azure B

Os espectros de absorção do AB em solventes com diferentes polaridades são apresentados na Figura 35. Observa-se que a banda de monômero sofre deslocamento batocrômico de 638 nm para 646 nm com a diminuição da polaridade do solvente, comportamento observado também para o AM.

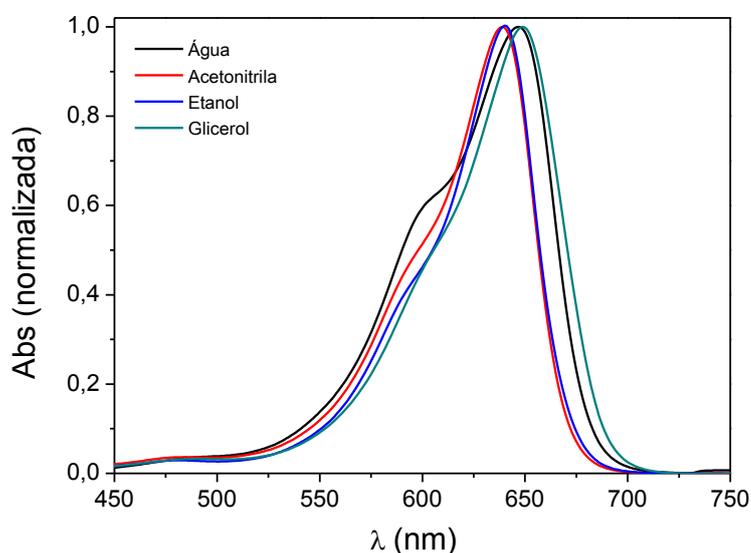


Figura 35 - Espectros de absorção de AB ($3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes solventes.

A presença do dímero pode ser observada em torno de 603 nm. A intensidade da banda do agregado foi mais acentuada em meio aquoso. Para avaliar melhor o processo de agregação do AM nos diferentes meios construiu-se o gráfico da razão D/M, Figura 36. Pode ser observado o favorecimento de processos agregacionais em meio aquoso, seguido pela acetonitrila.

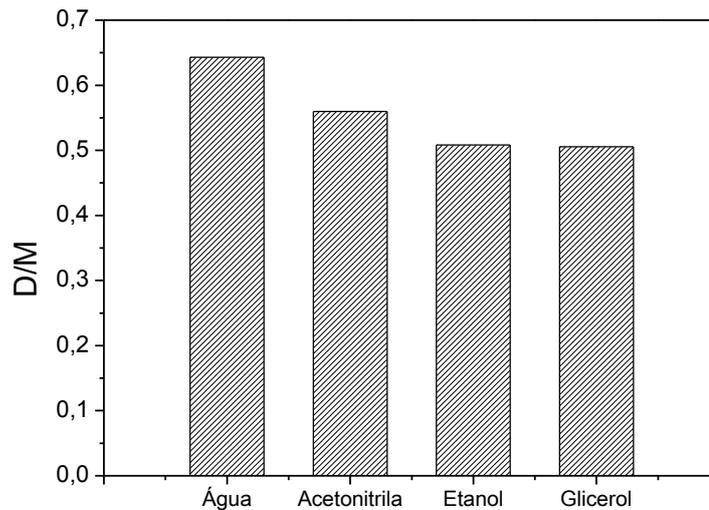


Figura 36 - Razão dímero/monômero (D/M) para o AB em diferentes meios.

Os espectros de absorção do Azure B foram obtidos nas três diferentes concentrações propostas para o trabalho. Analisando-se as diferentes misturas água/solvente orgânico, mantendo fixa a proporção água/solvente orgânico e variando a concentração de AB, verificou-se um aumento na intensidade de absorção com o aumento da concentração de AB. Além disso, observou-se que com o aumento da fração molar da água houve uma diminuição na intensidade de absorção do AB. Com o aumento da fração de água, a banda nas proximidades de 603 nm, referente aos dímeros aparece com maior intensidade.

Os espectros de absorção do AB para as misturas binárias de água/acetonitrila são mostrados na Figura 37:

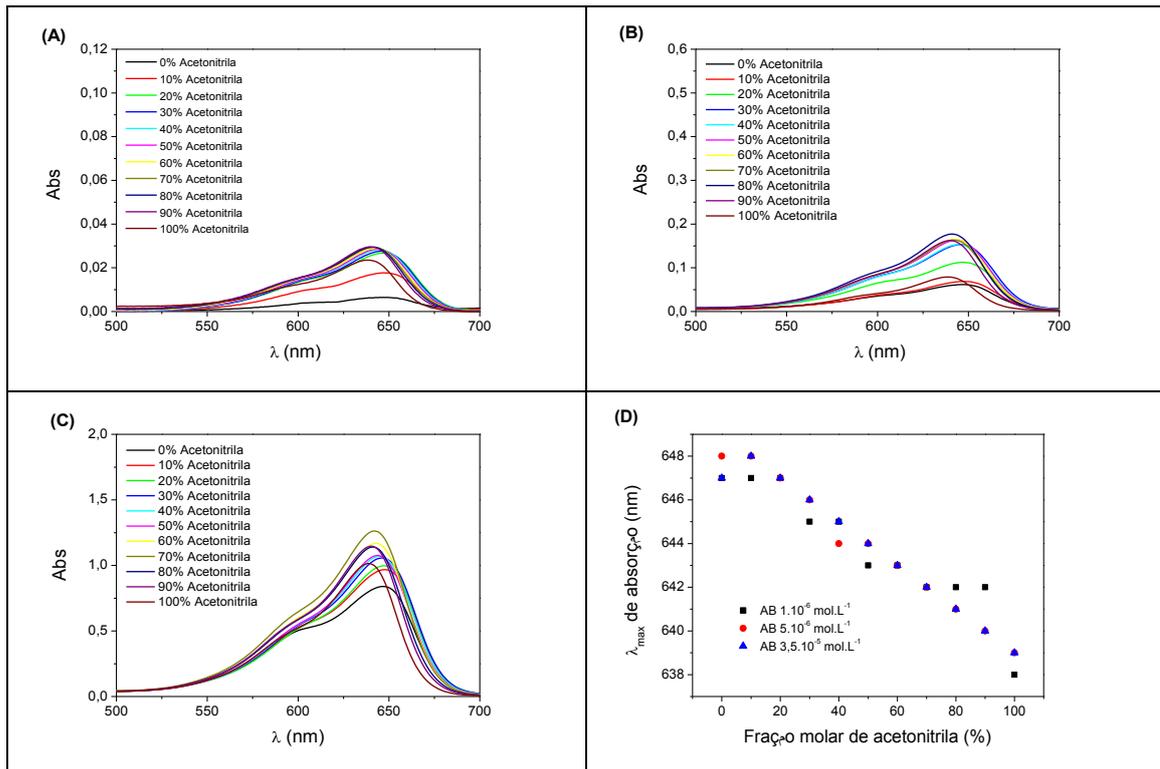


Figura 37 - Espectros de absorç-õ de AB nas misturas binárias de água/acetonitrila. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorç-õ do AB em misturas com diferentes composiç-ões molares.

Nos espectros de absorç-õ do AB nas misturas de água/acetonitrila, ao analisar as Figuras 37(A), 37(B) e 37(C), observa-se a influênciã da concentraç-õ do corante no meio. À medida que a concentraç-õ do corante aumenta, a intensidade de absorç-õ também aumenta. Ao comparar com o azul de metileno, percebe-se que a absorç-õ do AB é menor em relaç-õ ao corante AM. Esta menor absorç-õ esta relacionada com o grau de metilaç-õ dos grupamentos amino. Outra observaç-õ é a presençã de uma banda adicional nas proximidades de 600 nm, indicando a presençã de agregados. Esta banda foi mais pronunciada em meio aquoso para a maior concentraç-õ do corante AB.

Os espectros de absorç-õ do AB para as misturas água/dioxano s-õ mostrados na Figura 38:

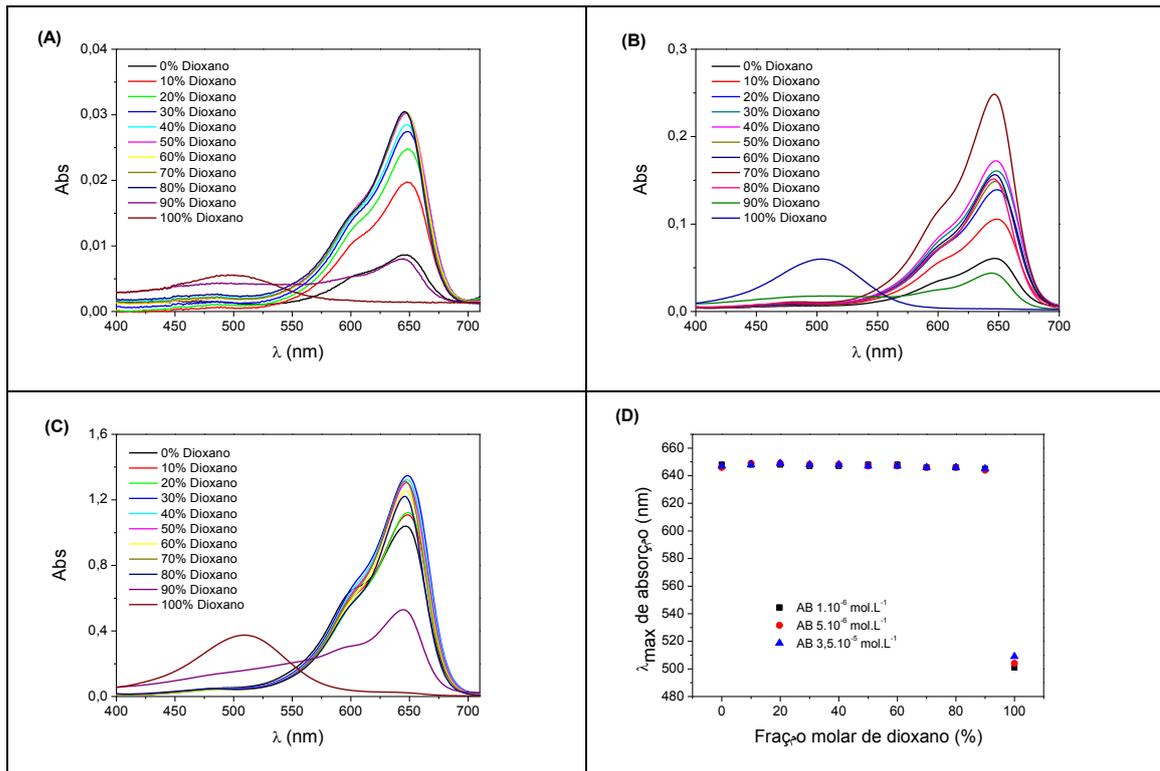


Figura 38 – Espectro de absorção de AB nas misturas binárias de água/dioxano. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AB em misturas com diferentes composições molares.

Nos espectros de absorção do AB nas misturas de água/dioxano, Figuras 38(A), 38(B) e 38(C), observa-se a influência da concentração do corante no meio. À medida que a concentração do corante aumenta, a intensidade de absorção das misturas binárias também aumenta. Comparando-se estes espectros com aqueles obtidos para o corante AM, a maior absorção observada para o AB pode ser atribuída a ausência dos grupos metilas dos grupamentos amino do AB. A banda do dímero em aproximadamente 603 nm é mais pronunciada em meio aquoso e para a maior concentração do corante AB.

Os espectros de absorção do AB para as misturas binárias de água/etanol são mostrados na Figura 39:

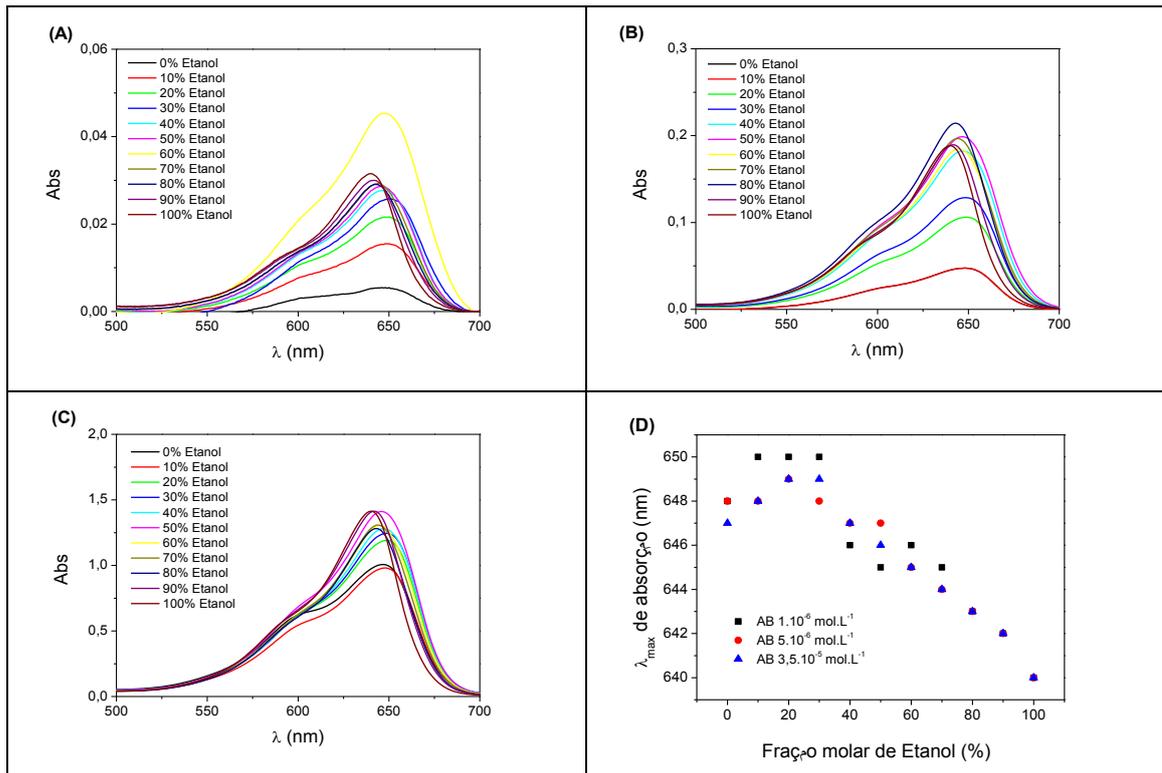


Figura 39 - Espectros de absorção de AB nas misturas binárias de água/etanol. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AB em misturas com diferentes composições molares.

Nos espectros de absorção do corante AB para as misturas de água/etanol, ao analisar as Figuras 39(A), 39(B) e 39(C), observa-se a influência da concentração do corante no meio. À medida que a concentração do corante aumenta, a intensidade de absorção também aumenta. Ao comparar com o azul de metileno, percebe-se que a absorção do AB é menor em relação ao corante AM. Esta menor absorção está relacionada com a presença de grupos metilas nos grupamentos amino. Outra observação é a presença de uma banda adicional nas proximidades de 600 nm, indicando a presença de agregados. Esta banda foi mais pronunciada em meio aquoso para a maior concentração do corante AB. Ao comparar as Figuras 16(D) e 39(D) observa-se que a presença dos grupos metilas no corante não interfere no perfil do comprimento máximo de absorção.

Os espectros de absorção do AB para as misturas binárias de água/glicerol são mostrados na Figura 40:

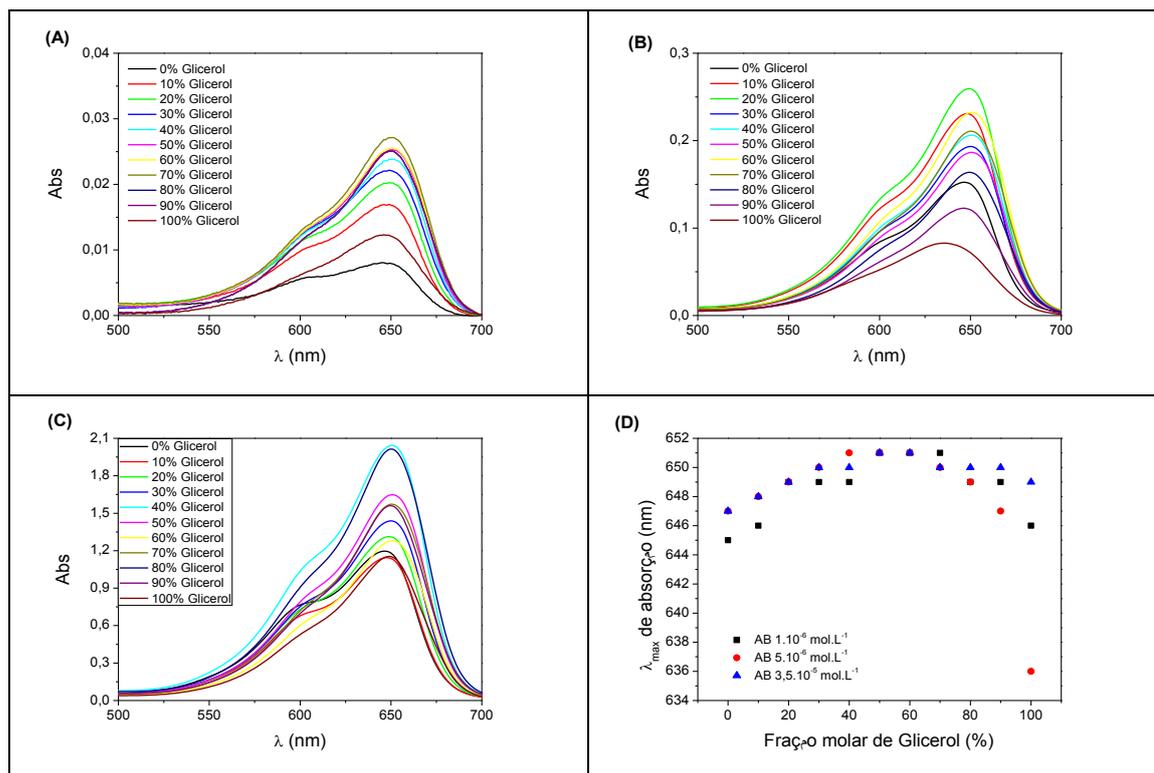


Figura 40 – Espectros de absorção de AB nas misturas binárias de água/Glicerol. (A) Espectros de AB $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (B) Espectros de AB $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; (C) Espectros de AB $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; (D) Gráfico dos comprimentos de onda máximos de absorção do AB em misturas com diferentes composições molares.

Ao analisar as Figuras 40(A), 40(B) e 40(C), os espectros de absorção do corante AB nas misturas de água/glicerol mostram a influência da concentração do corante no meio. À medida em que a concentração do corante aumenta, a intensidade de absorção também aumenta.

Na Figura 40(D), observa-se que à medida que a fração molar de glicerol aumenta, o comprimento de onda máximo desloca-se para o vermelho. Com este deslocamento positivo, pode-se dizer que o momento de dipolo do estado excitado do AB é maior do que o momento de dipolo para o fundamental, $\mu(S_1) > \mu(S_0)$ (Suppan, P.; 1990). Com o aumento da fração molar de glicerol, há um aumento da polaridade do meio indicando que o estado excitado da molécula é mais polar que o estado fundamental (Miranda, J. A. de, 2001).

4.2 - Tempo de Vida de Fluorescência

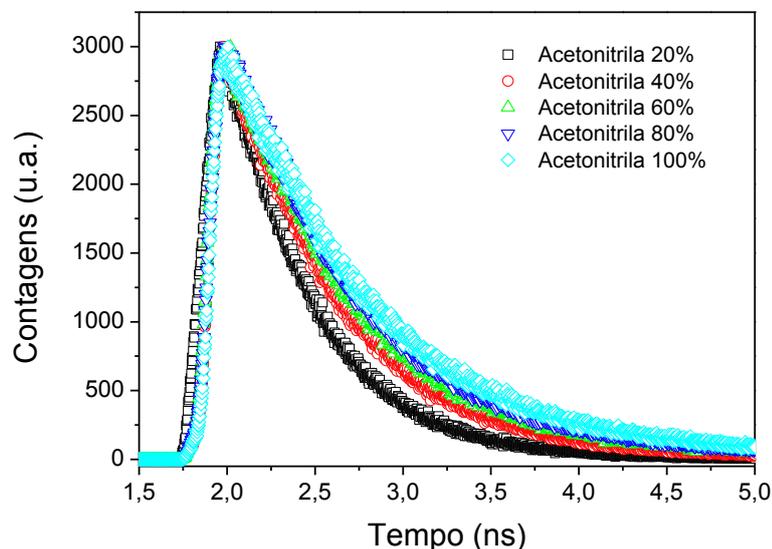


Figura 41 - Perfil de decaimento de fluorescência do DMAM ($1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em diferentes misturas de água/acetonitrila.

O tempo de vida das espécies fluorescentes dos corantes AM e DMAM em diferentes misturas binárias de água/solvente orgânico foram medidos e são mostrados nas Tabelas 2 e 3:

Os valores de tempo de vida de fluorescência mostraram-se menores nas misturas binárias com alto teor de água e estão em concordância com os resultados obtidos para o rendimento quântico de fluorescência, sendo estes menores como o aumento da fração molar de água nas misturas binárias. Os baixos valores de tempo de vida de fluorescência e do rendimento quântico de fluorescência com a diminuição do teor de solvente orgânico estão associados ao aumento da polaridade do solvente (Naika, et al. 2009).

Tabela 2 - Valores de tempo de vida de fluorescência (τ) em ps para o AM nas concentrações de $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ em misturas binárias de água/acetonitrila, água/etanol e água/glicerol.

(%)	Acetonitrila			Etanol			Glicerol		
	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
0	354,41	367,85	328,84	354,41	367,85	328,84	354,41	367,84	328,84
20	359,37	373,81	393,02	385,13	394,20	368,83	368,06	362,52	354,51
40	359,84	389,78	433,23	392,32	425,38	386,17	401,99	386,96	383,47
60	354,56	392,84	470,35	409,96	447,91	412,91	438,12	397,31	371,21
80	353,07	433,30	498,94	420,59	484,16	430,14	444,42	414,07	442,05
100	339,73	442,56	552,23	461,78	503,85	465,96	473,13	487,19	445,26

Tabela 3 - Valores de tempo de vida de fluorescência (τ) em ps para o DMAM nas concentrações de $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ em misturas binárias de água/acetonitrila e água/etanol.

(%)	Acetonitrila			Etanol	
	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
0	---	357,5650	366,6503	357,5650	366,6503
20	496,9638	543,2889	533,0408	431,0979	468,5881
40	653,3848	651,1031	646,5488	573,0896	571,3078
60	725,4924	711,7015	718,8475	630,5303	635,7075
80	781,8197	750,0668	774,4005	657,7122	667,1347
100	830,5381	814,2583	842,2963	717,0369	707,9384

Para avaliar o efeito da polaridade do meio sobre os tempos de vida de fluorescência nos solventes puros, construíram-se os gráficos em função da escala de polaridade E_T (30) (Reichardt, C.; 1994) e da constante dielétrica (ϵ), Figura 42. Com exceção do AM em acetonitrila, para menores concentrações, verificou-se uma diminuição do tempo de vida de fluorescência com o aumento da polaridade do solvente.

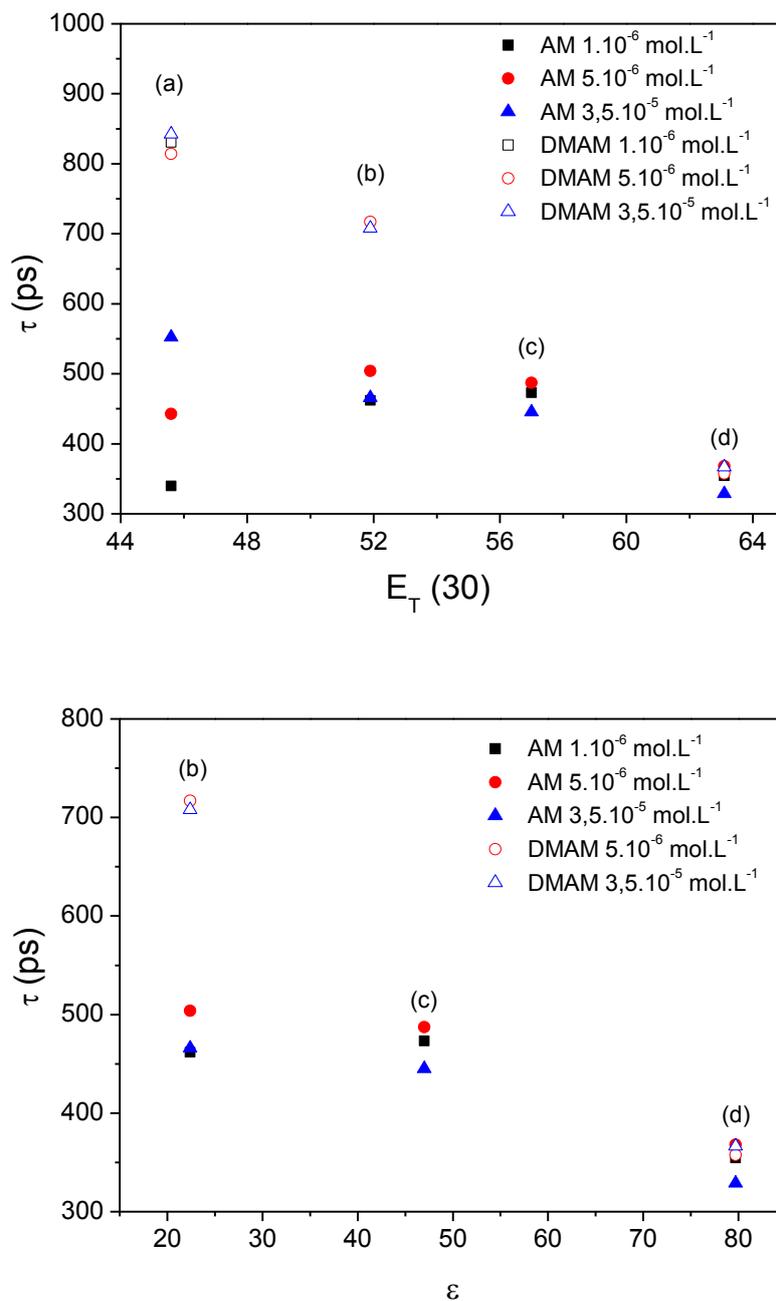


Figura 42 - Relação entre o tempo de vida de fluorescência do AM e do DMAM em diferentes concentrações com a escala de polaridade $E_T(30)$ e com a constante dielétrica (ϵ). Os solventes são: (a) acetonitrila, (b) etanol, (c) glicerol e (d) água.

Outro fator de fundamental importância para o tempo de vida de fluorescência é a viscosidade. Isto se deve ao fato de que o processo de desativação do estado excitado do fluoróforo torna-se mais lento em meios mais viscosos (Kubinyi, M. 2006).

A viscosidade do meio, juntamente com outros parâmetros, como a escala E_T (30), o momento de dipolo (μ), a constante dielétrica (ϵ) e o índice de refração (n), são apresentados na Tabela 4. Assim, os desvios do perfil observados para o AM em acetonitrila com relação à polaridade podem estar associados à viscosidade. O resultado deve-se a um balanço dos efeitos, uma vez que a acetonitrila apresenta tanto a menor polaridade, quanto a menor viscosidade, ambos os parâmetros que levam a um maior tempo de vida das espécies fluorescentes. Em menores concentrações do AM, o efeito da viscosidade prevalece, enquanto que em concentrações mais elevadas, $3,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, o movimento das espécies torna-se mais difícil e o efeito da polaridade do solvente prevalece.

Tabela 4 - Parâmetros físico-químicos dos solventes - escala E_T (30), momento de dipolo (μ), constante dielétrica (ϵ), viscosidade absoluta (η) e índice de refração (n).

Solvente	E_T (30) (kcalmol ⁻¹)*	μ (Debye)**	ϵ 20°C***	η 25°C***	n 25°C***
Acetonitrila	45,6	3,2	37,5	0,38	1,342
Água	63,1	1,87	79,7	0,89	1,332
Etanol	51,9	1,7	22,4	1,08	1,359
Glicerol	57,0	0,96	47,0	1499	1,47

* Dados adaptados de referência Reichardt, C.; (1994);

** Dados adaptados de referência Smallwood, I.M.; (1996);

*** Dados adaptados da referência Weast, R.C. Astle, M.J.; (1981).

Outro fator a ser levado em consideração é o efeito da substituição dos H por grupos $-\text{CH}_3$ nas posições 1 e 9 do sistema aromático. Esta substituição contribuiu para um aumento nos valores de tempo de vida de fluorescência do DMAM quando comparado com o AM.

4.3 - Tempo Rotacional

Os valores do tempo rotacional foram analisados de acordo com o modelo de Stokes, Einstein e Debye (SEB), o qual analisa o tamanho, a forma da molécula e a viscosidade do solvente. Os valores para o tempo rotacional do AM nas diversas misturas binárias de água/solvente orgânico é mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Valores de tempo rotacional (τ_r) em ps para o AM nas concentrações de $1,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹, $5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $3,5 \cdot 10^{-5}$ mol L⁻¹ em misturas binárias de água/acetonitrila, água/etanol e água/glicerol.

(%)	Acetonitrila			Etanol			Glicerol		
	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-6}$	$3,5 \cdot 10^{-5}$
0	126,927	113,947	105,556	126,927	113,947	105,556	121,409	113,947	105,556
20	119,003	176,158	98,985	174,559	165,280	166,490	196,531	139,790	136,139
40	110,458	179,693	99,837	203,668	212,015	180,981	275,517	249,326	241,972
60	108,618	180,466	97,990	294,577	281,907	200,767	399,116	289,842	198,604
80	119,688	125,426	83,391	301,654	242,850	224,017	607,669	315,614	613,176
100	141,952	125,019	79,725	281,506	217,625	205,980	681,207	978,306	591,636

O efeito da viscosidade sobre o tempo rotacional do AM nos solventes puro é mostrado na Figura 43. Observa-se claramente a influência da viscosidade sobre os mesmos. Para o meio mais viscoso, o glicerol, obteve-se o maior tempo rotacional. Os valores de tempo rotacional, nos solvente puros, foram encontrados na seguinte ordem: τ_r acetonitrila < τ_r etanol < τ_r glicerol. Este resultado está de acordo com a ordem de viscosidade dos meios: η acetonitrila < η etanol < η glicerol. Ao levar em consideração o tempo rotacional em água, os valores não seguiram esta tendência, provavelmente devido à presença de efeitos adicionais.

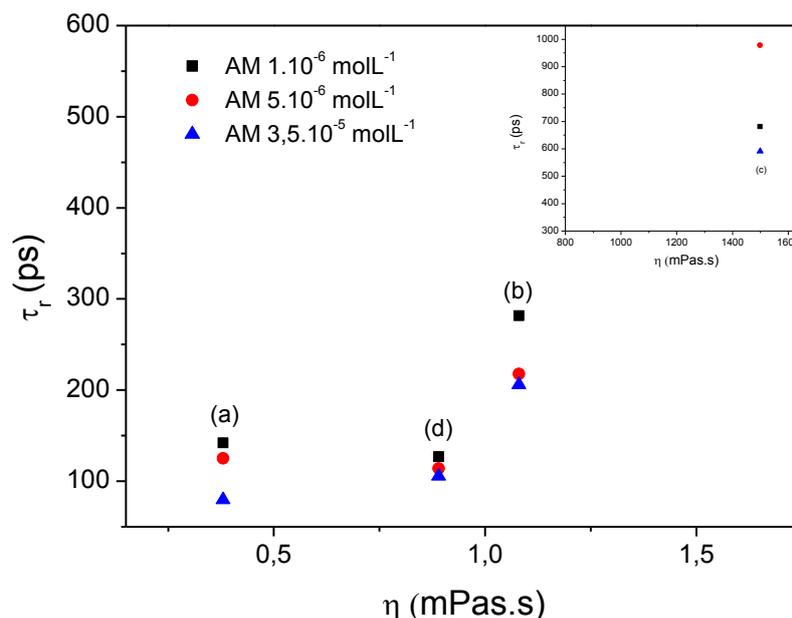


Figura 43 - Relação entre o tempo de vida de fluorescência do AM, em diferentes concentrações, com a viscosidade dos solventes: (a) acetoneitrila, (b) etanol e (d) água. Inseto - Relação entre o tempo de vida de fluorescência do AM, em diferentes concentrações, com a viscosidade do solvente glicerol (c).

A relação do tempo rotacional com as viscosidades das diferentes misturas água/solvente orgânico é apresentada na Figura 44. Para as misturas água/acetoneitrila, Figura 44(A), e água/etanol, Figura 44(B), a viscosidade apresentou um comportamento distinto, apresentando um aumento com a adição de solvente orgânico, atingindo valores de viscosidade maiores do que para os solventes puros, seguidos de uma queda. Os valores τ_r nas diferentes misturas binárias de água/acetoneitrila e água/etanol não apresentaram uma relação direta com a viscosidade. Para as misturas de água/glicerol, Figura 44(C), verificou-se o aumento do tempo rotacional com o aumento da viscosidade da solução. A maior dependência do tempo rotacional com a viscosidade para as misturas água/glicerol pode ser associada a grande diferença entre a viscosidade dos solventes puros ($\eta_{\text{água}} = 0,89 \text{ mPa s}$ e $\eta_{\text{glicerol}} = 1499 \text{ mPa s}$). Por outro lado, os desvios observados para as misturas água/acetoneitrila e água/etanol podem ser associados à presença de efeitos relevantes para o movimento das moléculas, como a formação de agregados, ligações de hidrogênio, formação de *clusters*, entre outros.

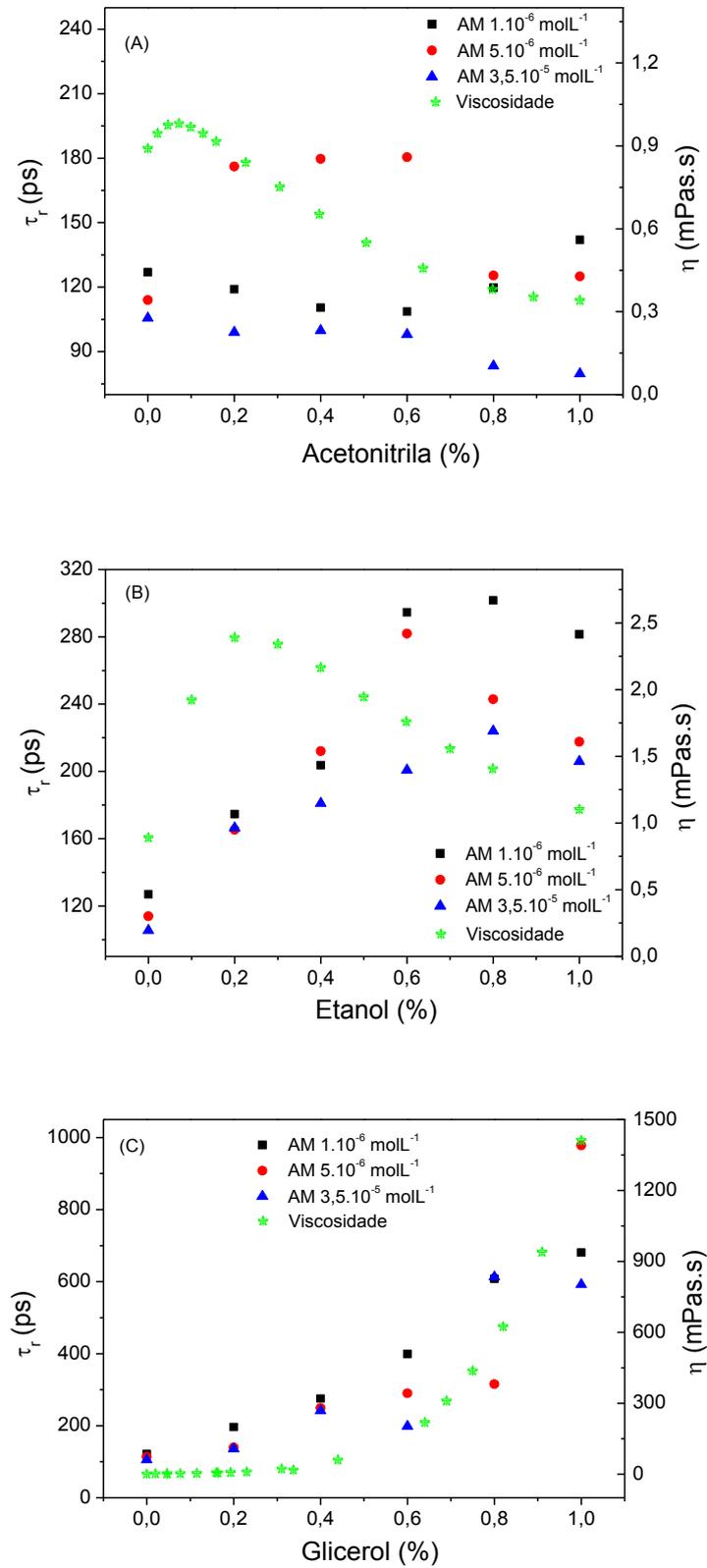


Figura 44 - Tempo de vida rotacional do AM em diferentes concentrações e viscosidades das misturas binárias: (A) água/acetonitrila; (B) água/etanol; (C) água/glicerol.

A formação de *clusters* em misturas de solventes influencia diretamente nas interações cromóforo/mistura de solvente (cromóforo/mistura binária). Para cada tipo de mistura têm-se *clusters* de diferentes conformações. Trabalhos na literatura relatam que os *clusters* de água/acetonitrila apresentam uma forma adicional, enquanto os *clusters* de água/etanol tem uma forma substitucional.

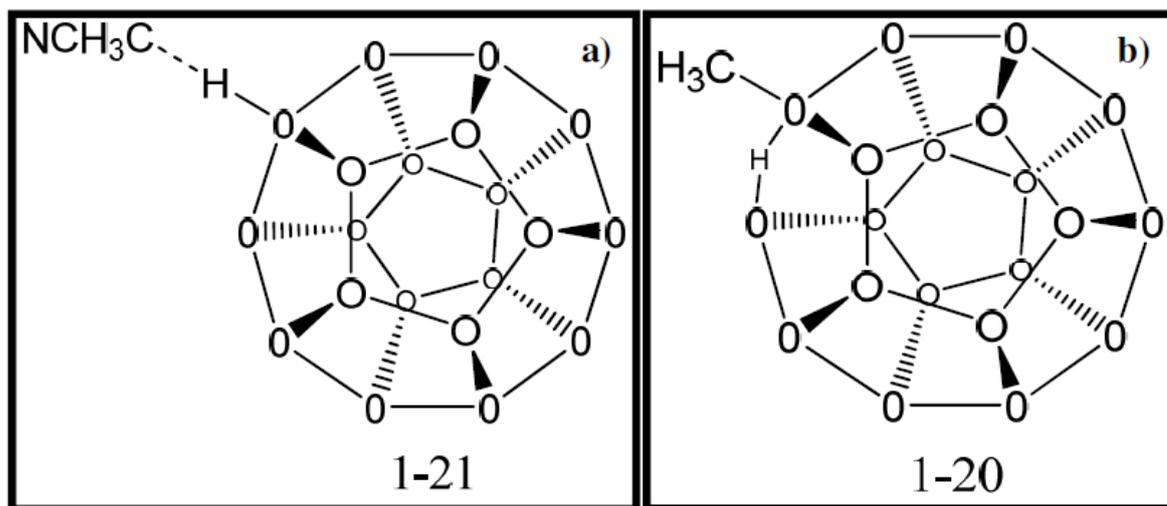


Figura 45 - Estruturas dos *clusters* observados nas misturas binárias: a) água/acetonitrila (1 molécula de acetonitrila para 21 moléculas de água), b) água/álcool (1 molécula de álcool para 20 moléculas de água).

O perfil distinto observado entre o tempo rotacional e a viscosidade nas misturas binárias de água/etanol pode ser dependente da forte interação entre os solventes (ligações de hidrogênio) (Petong et al. 2000). Apesar do etanol ser miscível em água em qualquer proporção de mistura, suas misturas mostram propriedades termodinâmicas irregulares ou mudanças nas propriedades físico-químicas de forma não linear (Kubota et al., 1987). As misturas binárias de água/etanol apresentam separação de fase em nível microscópico em grande parte da mistura, $0,033 < X_{Et} < 0,74$. Como resultado, estruturas micro-heterogêneas nessas misturas binárias a nível molecular passaram a ser aceitas. Isto explica o comportamento peculiar das propriedades termodinâmicas e físico-químicas da mistura (Wakisaka e Matsuura 2006). Como exemplo, verifica-se que a viscosidade em função das proporções água/etanol aumenta com a adição de etanol em $X_{Et} < 0,2$, como esperado devido a maior viscosidade do etanol. A partir de $X_{Et} \approx 0,2$,

ocorre uma diminuição da viscosidade. Cabe ressaltar que em torno de $X_{Et} \approx 0,2$, a viscosidade é quase o dobro da viscosidade do etanol puro, indicando uma anomalia da mistura. O aumento da viscosidade até $X_{Et} \approx 0,2$ é devido a formação dos *clusters* de álcool dentro da rede de ligações de hidrogênio de moléculas de água. Na faixa de $X_{Et} > 0,3$, os *clusters* de álcool começam a aumentar, diminuindo assim a viscosidade (Nagasawa et al., 2005).

A formação dos diferentes tipos de *clusters* em diferentes misturas de solventes altera o tipo de interações AM-mistura binária, modificando assim a cinética de desativação do estado excitado do corante. Esse fato justifica as alterações observadas na Figura 44 para os tempos de rotação em função da viscosidade. Estas variações podem ser explicadas em termos da “hidratação hidrofóbica”. Isso ocorre porque nas regiões de menores concentrações de etanol ($X_{Et} < 0,2$), a parte hidrofóbica da molécula de etanol está rodeada por *clusters* de água. A forte interação entre as ligações de hidrogênio dos *clusters* de água resultam em uma maior viscosidade e, conseqüentemente, um maior tempo rotacional. Já em concentrações mais elevadas de etanol, as moléculas de álcool já não estão mais contidas nas gaiolas de água e sim, disponíveis para interagir com o corante AM. Estas interações cromóforo/etanol são essenciais para definir o tempo rotacional. Desvios similares do modelo de Deybe-Stokes-Einstein do tempo rotacional em misturas água/etanol foram reportados na literatura para o violeta de cresila, sendo que o tempo rotacional teve um aumento na região rica em água $X_{Et} < 0,2$. A partir desta região, os valores de τ_r mantiveram-se praticamente constantes.

Assim como observado para as misturas água/etanol, o comportamento não linear dos valores de tempo rotacional em função da viscosidade nas misturas água/acetonitrila pode ser explicado pela formação de *clusters* de diferentes conformações, dependentes diretamente da proporção de água/acetonitrila. As misturas água/acetonitrila possuem uma característica micro-heterogênea, apresentando regiões estruturalmente diferentes, dependentes das propriedades físico-químicas de cada fração molar (Catalán et al., 2003). Com base em dados de volume de excesso, viscosidade, constante dielétrica e propriedades ácidas e básicas, foi deduzida a presença de três regiões estruturalmente diferentes nessa mistura, conforme a composição de cada componente (Catalán et al., 2003, Moreau e Douhéret, 1975). Foi verificado um aumento da viscosidade até a fração de

aproximadamente 0,05 de acetonitrila, havendo uma diminuição da viscosidade após este valor. A região de maior viscosidade se refere a uma maior inclusão de moléculas orgânicas nas cavidades da água, permitindo assim uma maior estabilização das unidades de *clusters* formados (Thompson et al 2006). Três regiões com comportamento distintos podem ser analisadas: $X_{ACN} \leq 0,3$; $0,3 \leq X_{ACN} \leq 0,7$ e $0,7 \leq X_{ACN} \leq 1,0$ (Wakisaka et al., 1998; Moreau e Douhéret, 1975; Yeou e Leong, 2007; Marcus e Migron, 1991). No segmento abundante em moléculas de água,   admitido que as moléculas de acetonitrila encaixam-se nas cavidades da estrutura formada pelas moléculas de  gua. Já no segmento intermediário, os *clusters* de água começam a ser desfeitos e há a forma o simultânea de *clusters* aquosos e orgânicos. Na região abundante em moléculas orgânicas, os clusters formados pela fraca intera o dipolo-dipolo do grupo $-C\equiv N$ da acetonitrila são gradualmente perturbados (desfeitos) pela adi o de moléculas de  gua (Yeou e Leong, 2007; Marcus e Migron, 1991).

A estrutura do glicerol em soluço   dependente da força das liga es de hidrogênio das moléculas vizinhas. Uma vez que cada molécula de glicerol tem efetivamente três sítios doadores e três sítios aceitadores, há uma alta probabilidade de que todas as moléculas estejam interligadas por uma série de liga es de hidrogênio. Sabe-se que o glicerol interage favoravelmente com a água fortalecendo a rede de liga es de hidrogênio desse volume. Em misturas com alta concentra o de água, o número médio de liga es de hidrogênio aumenta quando comparado com a água pura. Acima de $X_{Glic} = 0,22$, o número total de liga es de hidrogênio por molécula de água diminui e as intera es glicerol/glicerol dominam a solvata o (Antoniou e Alexandridis, 2010). Mesmo com diferentes intera es, foi observado que a grande diferença de viscosidade entre os solventes são responsáveis pelos resultados obtidos.

4.4 – Resultados do Surfactante

Para obter os valores de K_b dos corantes, o ajuste das curvas de ligação foi dividido em duas partes, sendo uma na região pré-micelar, representada pela queda da absorção (K_{b1}) e outra onde ocorre o processo normal de micelização (ou região micelar) (K_b) (Caetano e Tabak, 2000). As curvas do ajuste com a Equação 34 para ambas as fases estão representadas na Figura 46 para o DMAM.

Os espectros de absorção para o corante DMAM ($5,0 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) em soluções aquosas de 0 a 25 mM de SDS são mostrados na Figura 46(A), o comportamento do DMAM em concentrações acima de 25 mM de SDS é apresentado na Figura 46(B). Espectros de absorção foram adquiridos em intervalos de 10 mM de SDS. Para DMAM na ausência de SDS, observa-se o máximo de absorção em torno de 648 nm, com uma banda próxima a 598 nm. A banda em 598 resulta da agregação de DMAM em meio aquoso. Após a adição do SDS, a absorção do monômero de DMAM em 648 nm diminui significativamente até 25,0 mM de SDS e após essa concentração, a intensidade de absorção do monômero aumenta novamente. A absorção do agregado em 598 nm também sofre a diminuição da absorbância e depois aumenta novamente.

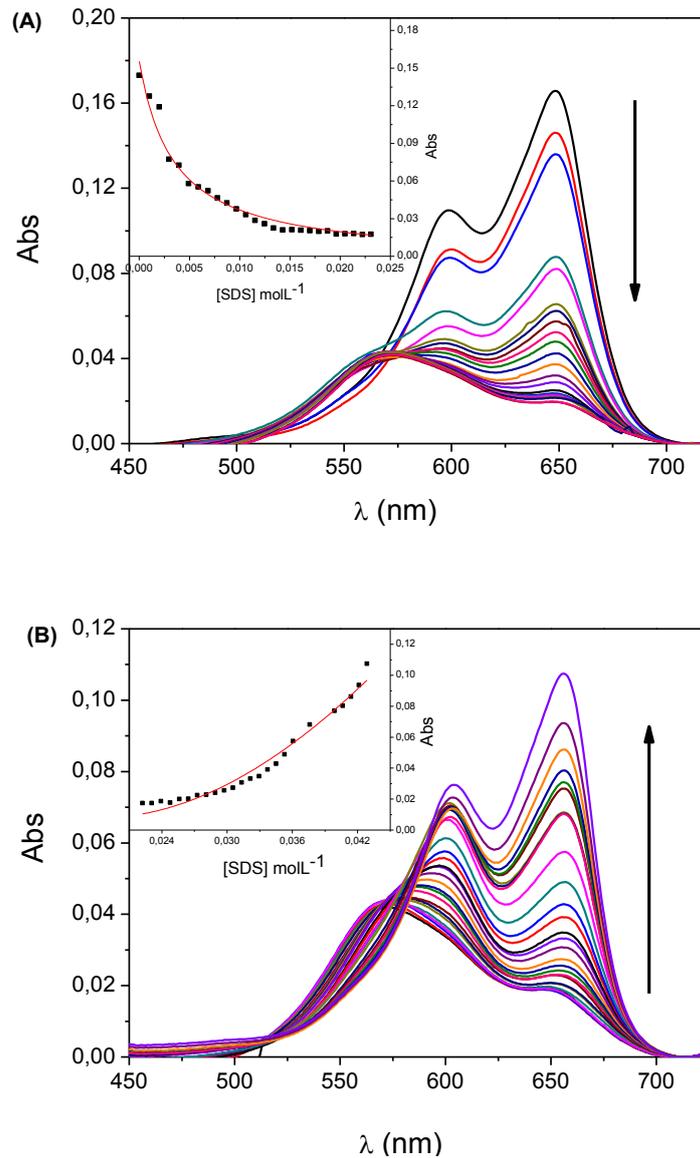


Figura 46 - Espectro de absorção do DMAM $5,0 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com a adição de SDS. (A) Região pré-micelar. Inseto – Intensidade de absorção em $\lambda_{\text{abs}} 656 \text{ nm}$ vs [SDS], cuja curva foi ajustada pela Equação 34 e (B) Pós-micelar. . Inseto – Intensidade de absorção em $\lambda_{\text{abs}} 656 \text{ nm}$ vs [SDS], cuja curva foi ajustada pela Equação 34.

Nota-se um ajuste satisfatório, mesmo para a região abaixo da concentração micelar crítica (CMC), Figura 46(A). Os parâmetros obtidos a partir do ajuste encontram-se nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6 - Constantes de ligação dos corantes em SDS calculadas pela Equação 34 na região pré-micelar de 25°C.

Pré-micelar			
FS	N	CMC (10^{-3} mol L $^{-1}$)	K_{b1} (L mol $^{-1}$)
Th 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 1,75.10^{-5}$)	8,33 ($\pm 0,093$)	84,08 ($\pm 1,009$)
Th 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 1,39.10^{-4}$)	9,57 ($\pm 0,219$)	63,77 ($\pm 1,80$)
DMAM 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 1,15 .10^{-4}$)	7,72 ($\pm 0,097$)	89,82 ($\pm 1,25$)
AA 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 1,81.10^{-5}$)	7,3 ($\pm 0,068$)	92,61 ($\pm 0,96$)
AA 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 3,15.10^{-5}$)	7,71 ($\pm 0,114$)	38,34 ($\pm 0,82$)
AB 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 3,78.10^{-5}$)	8,21 ($\pm 0,167$)	54,05 ($\pm 1,41$)
AB 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 8,58.10^{-6}$)	8,23 ($\pm 0,108$)	69,40 ($\pm 1,09$)
AM 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 1,67.10^{-5}$)	8,58 ($\pm 0,092$)	62,09 ($\pm 0,808$)
AM 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1 ($\pm 3,26.10^{-5}$)	8,48 ($\pm 0,173$)	66,10 ($\pm 1,632$)

*Não foi possível obter o ajuste da curva para o DMAM $1,0.10^{-6}$ mol L $^{-1}$. Não foi possível obter o ajuste das curvas para os FS na concentração $3,5.10^{-5}$ mol L $^{-1}$.

Tabela 7 - Constantes de ligação dos corantes em SDS calculadas pela Equação 34 na região pós-micelar a de 25°C.

Pós-micelar			
FS	N	CMC (10^{-3} mol L $^{-1}$)	K_b (L mol $^{-1}$)
Th 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	1,47 ($\pm 0,045$)	12,46 ($\pm 0,011$)	86,25 ($\pm 14,83$)
Th 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1,74 ($\pm 0,003$)	14,24 ($\pm 0,006$)	33,69 ($\pm 0,427$)
DMAM 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	1,51 ($\pm 0,017$)	7,58 ($\pm 0,681$)	369,89 ($\pm 24,55$)
DMAM 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1,97 ($\pm 0,005$)	18,19 ($\pm 0,005$)	76,56 ($\pm 1,63$)
AA 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	1,00 ($\pm 0,007$)	11,52 ($\pm 0,0007$)	93,44 ($\pm 3,13$)
AA 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1,30 ($\pm 0,007$)	16,02 ($\pm 0,011$)	126,25 ($\pm 3,64$)
AB 1.10^{-6} mol L $^{-1}$	0,90 ($\pm 0,007$)	8,80 ($\pm 0,202$)	59,18 ($\pm 1,77$)
AM 5.10^{-6} mol L $^{-1}$	1,00 ($\pm 0,003$)	8,16 ($\pm 0,291$)	34,16 ($\pm 0,40$)

*Não foi possível obter o ajuste para as curvas do AB $5,0.10^{-6}$ mol L $^{-1}$ e para AM $1,0.10^{-6}$ mol L $^{-1}$. Não foi possível obter o ajuste das curvas para os FS na concentração $3,5.10^{-5}$ mol L $^{-1}$.

O parâmetro N da Equação 34 está relacionado com o número de micelas/moléculas do corante (Caetano e Tabak, 1999). Para a região pré-micelar, o parâmetro N ficou próximo a 1, o que demonstra que cada molécula do corante está solubilizada em uma micela. Os valores de CMC obtidos no ajuste estão próximos ao valor obtido na literatura, $0,0082 \text{ mol L}^{-1}$ (Turro e Yekta, 1987). Em relação ao K_{b1} , os corantes em solução de maior concentração apresentam menores valores de K_{b1} , havendo assim uma menor interação do corante com o surfactante.

Para a região pós-micelar, o parâmetro N foi superior a 1 para a grande maioria dos corantes. Os valores de CMC obtidos no ajuste estão acima do valor obtido na literatura. Os valores de K_b são maiores do que os valores para a região pré-micelar, demonstrando que há uma maior interação entre o corante e o surfactante após atingir a CMC.

5 - Considerações Gerais

5 – Considerações Gerais

Através dos dados apresentados concernentes às propriedades das misturas binárias estudadas neste trabalho, percebe-se que a dependência dessas propriedades sobre a composição de cada solvente da mistura não é linear, sendo dependente dos tipos de interações existentes entre os solventes.

Explica-se o comportamento termodinâmico dessas misturas com base nas estruturas microscópicas de *clusters*. De fato, uma série de sistemas micro-heterogêneos ocorrem nas diferentes misturas de solventes avaliadas. Variações aparentemente sutis de concentração de um dos solventes empregados podem repercutir de maneira drástica na morfologia das interações formadas, ou seja, na disposição dos arranjos intermoleculares estabilizados no sistema solvente. A compreensão dessas nuances, as quais envolvem necessariamente o entendimento das interações ditas “fracas” de carácter intra-e intermoleculares, constitui um estudo físico-químico altamente relevante para uma gama de estudiosos, incluindo, químicos de materiais, bioquímicos, biofísicos, fotoquímicos, fotofísicos, entre outros.

Em compostos que possuem grupamentos amino como substituintes, podemos observar que há um aumento na intensidade de absorção à medida que aumenta os grupos metilas e isso se deve ao fato de o grupo metila ter um efeito hiperconjugação que aumenta a densidade eletrônica.

6 – Conclusões

6 – Conclusões

As propriedades espectroscópicas dos corantes fenotiazínicos mostraram-se dependentes da natureza e da composição da mistura binária de água/solvente orgânico (água/acetonitrila, água/dioxano, água/etanol e água/glicerol), devido aos mecanismos solvatocrômicos associados à interações do corante/mistura binária.

Pode-se avaliar que o fenômeno de agregação, no geral, foi mais pronunciado em meio aquoso, seguido da acetonitrila, do etanol e do glicerol.

A polaridade das misturas binárias tem uma influência significativa nos valores do tempo de vida de fluorescência dos corantes, isso pode ser observado uma vez que estes valores mostraram uma tendência para diminuir com o aumento da polaridade do solvente. A viscosidade do meio foi um fator relevante no tempo rotacional (τ_r), apresentando valores mais elevados em ambientes com maior viscosidade.

A constante de ligação mostrou-se superior na região acima da CMC e em menor concentração do corante, demonstrando que há uma maior interação entre o corante e o surfactante SDS após atingir a CMC.

7- Perspectivas Futuras

7 – Perspectivas Futuras

Concluir as medidas de anisotropia resolvida no tempo, tempo de vida de fluorescência, tempo de vida rotacional para o DMAM, AA, AB e Th.

Otimizar as concentrações de surfactantes para a análise do K_b para os corantes fenotiazínicos.

8 - Referências

8 – Referências

Allinger, N. L.; Cava, M. P.; Jongh, D.C. De; Johnson, C. R.; Lebel, N. A. *Química Orgânica*. 2.ed. LTC **1976**. 961.

Antoniou, E.; Alexandridis, P. Polymer conformation in mixed aqueous-polar organic solvents. *European Polymer Journal*, **2010**, 46, 324-335.

Caetano, W.; Tabak, M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with ionic micelles: electronic absorption spectroscopy studies. *Spectrochimica Acta Part A*. **1999**, 55 2513-2528.

Caetano, W.; Tabak, M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS): electronic absorption and fluorescence studies. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2000**, 225 69-81.

Castellan, G.; *Fundamentos de Físico-Química*; LTC, **1986**.

Catalán, J.; Díaz, C.; Blanco, F. G. Characterization of binary solvent mixtures: the water-acetonitrile mixture. *Organic & Biomolecular Chemistry*. **2003**, 1, 575-580.

Chen, C.; Zhai, W.; Lu, D.; Zhang, H.; Zheng, W. A facile method to prepare stable noncovalent functionalized grapheme solution with thionine. *Materials Research Bulletin*. **2011**, 46, 583-587.

Chen, J.; Cesario, T.; C.; Rentzepis, P.; M. Time resolved spectroscopic studies of methylene blue and phenothiazine derivatives used for bacteria inactivation. *Chemical Physics Letters*. **2010**, 498, 81-85.

Das, S.; Kamat, P.V. Can H-Aggregates Serve as Light-Harvesting Antennae? Triplet-Triplet Energy Transfer between Excited Aggregates and Monomer Thionine in Aerosol-OT Solutions. *Journal of Physical Chemistry B*. **1999**, 103, 209-215.

Ding, Y.; Chen, Z.; Xie, J.; Guo, R.; Comparative studies on adsorption behavior thionine on gold nanoparticles with different sizes. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2008**, 327, 243-250.

Elsherbiny, A. S.; Egelhaaf, H. J.; Oelkrug, D. Accessibility and shielding of silanol surface centers on porous silica beads; UV/vis absorption and fluorescence studies. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **2011**, 220, 39-46.

Gama, M. F. M.; Tardivo, J. P.; Paschoal, F. M.; Pinhal M. A. S.; Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. *Clinical and Experimental Dermatology*. **2012**, 37, 527–533.

Gilani, A.; G.; Ghorbanpour, T.; Salmanpour, M. Additive effect on the dimer formation of thiazine. *Journal of Molecular Liquids*. **2013**, 177, 273-282.

Gilani, A.; G.; Salmanpour, M.; Ghorbanpour, T. Solvatochromism, dichroism and excited state dipole moment of azure A and methylene blue. *Journal of Molecular Liquids*. **2013**, 179, 118-123.

Gilbert, A.; Baggott, J. In: *Essentials of Molecular Photochemistry*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, **1991**.

Giraud, G.; Schulze, H.; Bachmann, T. T.; Campbell, C. J.; Mount, A. R.; Ghazal, P.; Khondoker, M. R.; Ember, S. W. J.; Ciani, I.; Tlili, C.; Walton, A. J.; Terry, J. G.; Crain, J. Solution state hybridization detection using time-resolved fluorescence anisotropy of quantum dot-DNA bioconjugates. *Chemical Physics Letter*. **2010**, 484, 309-314.

Glusko, C. A.; Previtali, C. M.; Vera, D. M. A.; Chesta, C. A.; Montejano, H. A. An experimental and theoretical study on the photophysical properties of methylene green. *Dyes and Pigments*. **2011**, 90, 28-35.

Gurp, M. V.; Ginkel, G. V.; Levine, Y. K. Fluorescence anisotropy of chlorophyll *a* and chlorophyll *b* in castor oil. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1989**, 973, 405-413.

Havelcová, M.; Kubát, P.; Nemcová, I.; Photophysical properties of thiazine dyes in aqueous solution and in micelles. *Dyes and pigments*. **2000**, 44, 49-54.

Heger, D.; Jirkovský, J.; Klán, P. Aggregation of Methylene Blue in Frozen Aqueous Solutions Studied by Absorption Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry A*. **2005**, 109, 6702-6709.

Hichem, H.; Djamilia, A.; Hania, A. Optical, electrical and photoelectrochemical characterization of electropolymerized poly methylene blue on fluorine doped tin oxide conducting glass. *Electrochimica Acta*. **2013**, 106, 69-74.

Junqueira, H. C.; Severino, D.; Dias, L. G.; Gugliotti, M. S. Baptista, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*. **2002**, 4, 2320-2328.

Kasha, M.; Rawls, H.; R.; Bayoumi, M. The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure and Applied Chemistry*. **1959**, 11, 371-392.

Karns, G.; A.; Gallagher, W.; A.; Elliott, W.; B. Dimerization constants of water-soluble porphyrins in aqueous alkali. *Bioorganic Chemistry*. **1979**, 8, 69-81.

Khayyat, S.; A.; Akhtar, M.; S.; Umar, A. ZnO nanocapsules for photocatalytic degradation of thionine. *Materials Lettes*. **2012**, 81, 239-241.

Kikteva, T.; Star, D.; Zhao, Z.; Baisley, T. L.; Leach, G. W. Molecular orientation, aggregation, and order in rhodamine films at the fused silica/air interface. *Journal of Physical Chemistry: B*. **1999**, 103, 1124-1133.

Kubinyi, M.; Grofcsik, A.; Kárpáti, T.; Jones, W. J. Rotational reorientation dynamics of ionic dye solutes in polar solvents with the application of a general model for the solvation shell. *Chemical Physical*. **2006**, 322, 247-253.

Kubota, H.; Tanaka, Y.; Makita, T. Volumetric Behavior of Pure Alcohols and Their Water Mixtures Under High Pressure. *International Journal of Thermophysics*. **1987**, 8, 47-70.

Lakowicz, J. R. In: Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2^a ed., New York, **1999**.

Lakowicz, J.R.; Gryczynski, I.; Gryczynski, Z.; Dattelbaum, J.D.; Anisotropy-Based Sensing with Reference Fluorophores. *Analytical Biochemistry*. **1999**, 267, 397-405.

Lee, S.; Mills, A. Luminescence of Leuco-Thiazine Dyes. *Journal of Fluorescence*. **2003**, 13, 375-377.

Li, D.; Zhua, Q.; Yea, D.; Fang, Y.; Xu, J. A rapid method for the determination of molar ratio of fluorophore to protein by fluorescence anisotropy detection; *Analytica Chimica Acta*, **1999**, 389, 85-88

Machado, A.; E.; da H. Terapia Fotodinamica: Principios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Química Nova*. **2000**, 23, 237-243

Marcus, Y.; Migron, Y. Polarity, Hydrogen Bonding, and Structure of Mixtures of Water and Cyanomethane. *Journal of Physical Chemistry*. **1991**, 95, 400-406.

Melo, J. S. S. de.; Becker, R. S.; Maçanita A. L. Photophysical Behavior of Coumarins as a Function of Substitution and Solvent: Experimental Evidence for the Existence of a Lowest Lying $^1(n,\pi^*)$ State. *Journal of Physical Chemistry*, **1994**, 98, 6054-6058.

Micali, N.; Monsu'Scolaro, L.; Romeo, A.; Mallamace, F. Fractal aggregation in aqueous solutions of porphyrins. *Physica A*, **1998**, 249, 501-510.

Miranda, J. A. de, Caracterização Fotofísica de Derivados de Cumarinas, Brasil. 2001. 144f. Dissertação (Mestrado em Química)-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

del Monte, F.; Mackenzie, J.D.; Levy, D. Rhodamine fluorescent dimmers Adsorbed on the Porous Surface of Silica Gels. *Langmuir*. **2000**, 16, 7377-1382.

Moreau, C.; Douhéret, G. Thermodynamic Behavior of Water-Acetonitrile Mixtures Excess Volumes and Viscosities. *Thermochimica Acta*. **1975**, 13, 385-392.

Moreira, L. M.; Rodrigues, M. R.; Oliveira, H. P. M. de; Lima, A.; Soares, R. R. S.; Batistela, V. R.; Gerola, A. P.; Hioka, N.; Severino, D.; Baptista, M.S.; Machado, A. E. H.; Influência de Diferentes Sistemas de Solvente Água-Etanol Sobre as Propriedades Físico-Químicas e Espectroscópicas dos Compostos Macroclícos Feofitina e Clorofila α . *Química Nova*. **2010**, 33, 258-262.

Nagasawa, Y.; Nakagawa, Y.; Nagafuji, A.; Okada, T.; Miyasaka, H. The microscopic viscosity of water-alcohol binary solvents studied by ultrafast spectroscopy utilizing diffusive phenyl ring rotation of malachite green as a probe; *Journal of Molecular Structure*. **2005**, 735, 217-223.

Naika, L.; R.; Naika, A.; B.; Pal, H.; Steady-state and time-resolved emission studies of Thioflavin-T. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. **2009**, 204, 161-197.

Ohline, S. M.; Lee, S.; Willians, S.; Chang, C. Quantification of methylene blue aggregation on a fused silica surface and resolution of individual absorbance spectra. *Chemical Physics Letters*. **2001**, 346, 9-15.

Oliveira, H. P. M. de; Legendre, A. Júnior, A. M. Gehlen, M. H. Transferência de energia entre corantes catiônicos em sistemas homogêneos. *Química Nova*, **2003**, 26, 564-569.

Oliveros, E.; Pheulpin, P.; Braun, A. M. Comparative study of the sensitized photooxidation of N-methyl phenothiazine in homogeneous and microheterogeneous media. *Tetrahedron*, **1987**, 43, 1713-1723.

Patil, K.; Pawar, R.; Talap, P.; Self-aggregation of Methylene Blue in aqueous medium and aqueous solutions of Bu₄NBr and urea. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2000**, 2, 4313-4317.

Paul, P., Hossain, M., Kumar, G. S. Calorimetric and thermal analysis studies on the binding of phenothiazinium dye thionine with DNA polynucleotides. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, **2011**, 1036-1043.

Paul, P.; Kumar, G. S. Spectroscopic studies on the binding interaction of phenothiazinium dyes toluidine blue O, azure A and azure A to DNA. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **2013**, 107, 303-310.

Paul, P.; Kumar, G. S. Thionine Interaction to DNA: Comparative Spectroscopic Studies on Double Stranded Versus Single Stranded DNA. *Journal of Fluorescence*, **2012**, 22, 71-80.

Perussi, J. R. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos, *Química Nova*, **2007**, 30, 988-994.

Petong, P.; Pottel, R.; Kaatze, U. Water-Ethanol Mixtures at Different Compositions and Temperatures. A Dielectric Relaxation Study. *The Journal of Physical Chemistry A*. **2000**, 104, 7420-7428.

Pelizzetti, E.; Fisicaro, E.; Minero, C.; Sassi, A.; Hidaka, H.; Electron-Transfer Equilibria and Kinetics of N-Alkylphenothiazines in Micellar Systems. *The Journal of Physical Chemistry*. **1991**, 95, 766-770.

Piovesan, E.; Hidalgo, Á. A.; Marletta, A. Influência da espessura nas propriedades de absorção e emissão e na morfologia de filmes automontados de poli(*p*-fenileno vinileno). *Química Nova*, **2006**, 29, 916-921.

Prazeres, T. J. V.; Beija, M.; Fernandes, F. V.; Marcelino, P. G. A.; Farinha, J. P. S.; Martinho, J. M. G. Determination of the critical micelle concentration of surfactants and amphiphilic block copolymers using coumarin 153. *Inorganica Chimica Acta*. **2012**, 381, 181-187.

Quagliotto, P.; Barbero, N.; Barolo, C.; Costabello, K.; Marchese, L.; Coluccia, S.; Kalyanasundaram, K.; Viscardi, G. Characterization of monomeric and gemini cationic amphiphilic molecules by fluorescence intensity and anisotropy. *Dyes and Pigments*, **2009**, 82, 124-129.

Reichardt, C. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews*, **1994**, 94, 2319-2358.

Reija B.; Monterroso B.; Jiménez M.; Vicente M.; Rivas G.; Zorrilla S. Development of a homogeneous fluorescence anisotropy assay to monitor and measure FtsZ assembly in solution. *Analytical Biochemistry*, **2011**, 418, 89-96.

Ribeiro, J. Fotofísica e Determinação de Parâmetros Fotodinâmicos da Ftalocianina de Zinco em Meios Homogêneo e Microheterogêneo, Brasil. 2003. 119f. Dissertação (Mestrado em Química)-Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

Royer, C.A.; Approaches to Teaching Fluorescence Spectroscopy; *Biophysical Journal*. **1995**, 68:1191-1195.

Sartori, P. H. dos S.; Loreto, E. L. da S. Medidor de fluorescência caseiro. *Química Nova na Escola*, **2009**, 31, 150-154.

Sezgin, Z.; Biberoglu, K.; Chupakhin, V.; Makhaeva, G. F.; Tacal, O.; Determination of binding points of methylene blue and cationic phenoxazine dyes on human butyrylcholinesterase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **2013**, 532, 32-38.

Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R.; Fundamentos de Química Analítica. 8 ed. São Paulo:Cengage Learning, **2009**.

Smallwood, I.M.; Handbook of organic solvent properties. Copublished in the Americas by Halsted Press an imprint of John Wdey & Sons Inc. New York:Toronto, 1996. 306p.

Solomons, T. W. G.: Fryhle, C. B. *Química Orgânica*. Vol.1 9.ed. LTC, **2008**. 675

Solomons, T. W. G.: Fryhle, C. B. *Química Orgânica*. Vol.2 9.ed. LTC, **2008**. 496

Suppan, P.; Solvatochromic Shifts: The Influence of the Medium on the Energy of Electronic States. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*. **1990**, 50, 293-330.

Thompson, J. W.; Kaiser, T. J.; Jorgenson, J. W. Viscosity measurements of methanol-water and acetonitrile-water mixtures at pressures up to 3500 bar using a novel capillary time-of-flight viscometer. *Journal of Chromatography A*. **2006**, 1134, 201-209.

To, E. C. H.; Davies, J. V.; Ticker, M.; Westh, P.; Trandum, C.; Suh, K. S. H.; Koga, Y. Excess Chemical Potentials, Excess Partial Molar Enthalpies, Entropies, Volumes, and Isobaric Thermal Expansivities of Aqueous Glycerol at 25°C. *Journal of Solution Chemistry*. **1999**, 28, 10, 1137-1157.

Tuite, E. M.; Kelly, J. M.; Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biol.*, **1993**, 21, 103-124.

Turro, N. J.; Yekta, A.; Luminescent probes for detergent solutions. A simple procedure for mean aggregation number of micelles. *Journal of the American Chemical Society.* **1987**, 30, 5961-5962.

Valeur, B.; *Molecular Fluorescence: Principles and Applications.* Wiley-VCH Verlag GmbH, **2001**.

Viswanathan, K.; Natarajan, P. Photophysical properties of thionine and phenosafranine dyes covalently bound to macromolecules. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* **1996**, 95, 245-253.

Wagner, M.; Suarez, E. R.; Theodoro, T. R.; Machado Filho, C. D. A. S.; Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. *Clinical and Experimental Dermatology.* **2012**, 37, 527-533.

Wainwright, M.; Meegan, K.; Loughran, C. Phenothiazinium photosensitisers IX. Tetra- and pentacyclic derivatives as photoantimicrobial agents. *Dyes and Pigments.* **2011**, 91, 1-5.

Wainwright, M.; Phoenix, D. A.; Rice, L.; Burrow, S. M.; Waring, J. Increased cytotoxicity and phototoxicity in the methylene blue series via chromophore methylation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* **1997**, 40, 233-239.

Wakisaka, A.; Abdoul-Carime, H.; Yamamoto, Y.; Kiyozumi, Y. Non-ideality of binary mixtures Water.methanol and water.acetonitrile from the viewpoint of clustering structure. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions.* **1998**, 94, 369-374.

Wakisaka, A.; Matsuura, K. Microheterogeneity of ethanol-water binary mixtures observed at the cluster level. *Journal of Molecular Liquids*. **2006**, 129, 25-32.

Weast, R.C.; Astle, M.J. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 61.ed. 1980-1981.

Yazdani, O.; Irandoust, M.; Ghasemi, J.; B.; Hooshmand, Sh. Thermodynamic study of the dimerization equilibrium of methylene blue, methylene green and thiazole orange at various surfactant concentrations and different ionic strengths and mixed solvents by spectral titration and chemometric analysis. *Dyes and Pigments*. **2012**, 92, 1031-1041.

Yeou, Y. L.; Leong, Y.-K.; Partial molar volumes of (acetonitrile plus water) mixtures over the temperature range (273.15 to 318.15)K. *The Journal of Chemical Thermodynamics*. **2007**, 39, 1675-1680.

You, Y., Gao, S., Yang, Z., Cao, M., Cao, R. Facile synthesis of polyoxometalate-thionine composite via direct precipitation method and its photocatalytic activity for degradation of rhodamine B under visible light. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2012**, 365, 198-203.

Zhu, L.; Luo, L.; Wang, Z. DNA electrochemical biosensor based on thionine-graphene nanocomposite. *Biosensors and Bioelectronics*. **2012**, 35, 507-511.

Zoratti, M.; Szabò, I. The mitochondrial permeability transition. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1995**, 1241, 139-176.

<http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro>, acessado em dezembro de 2013.