

7

Resultados e Discussão II: Fluorescência da Dibucaína, Norfloxacin e Levofloxacin

7.1

Espectros de fluorescência estacionária da Dib

Abaixo temos os espectros de fluorescência da dibucaína com excitação em 330 nm, medidos para a concentração de 10 μM em tampão universal ao longo da faixa de pH de 3.5 a 12.0.

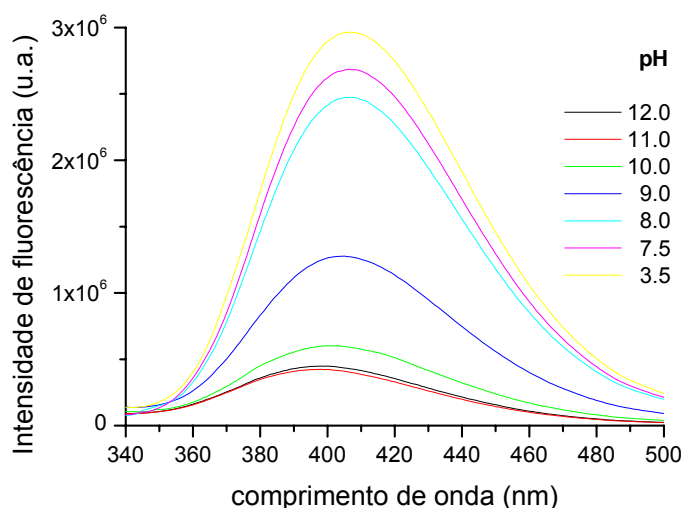


Figura 7.1 - Espectros de fluorescência da Dib (10 μM) com excitação em 330 nm na faixa de pH de 3.5 a 12.0.

Como podemos observar, na Fig. 7.1, em pH = 12.0, a Dib apresenta um pico de fluorescência em 398 nm. Para valores altos de pH temos a espécie neutra que apresenta baixa intensidade de fluorescência. À medida que o pH diminui a fluorescência aumenta muito, de modo que as espécies moncatiônicas e dicatiônicas apresentam um elevado rendimento quântico. Em pH = 3.5 temos o pico de fluorescência em 406 nm, ou seja, um $\Delta\lambda$ de 8 nm, evidenciando um deslocamento para o vermelho à medida que o pH diminui. A intensidade de fluorescência da dibucaína em 405 nm foi plotada na Fig. 7.2 em função do pH e a equação (6.14) foi utilizada para ajustar os dados experimentais.

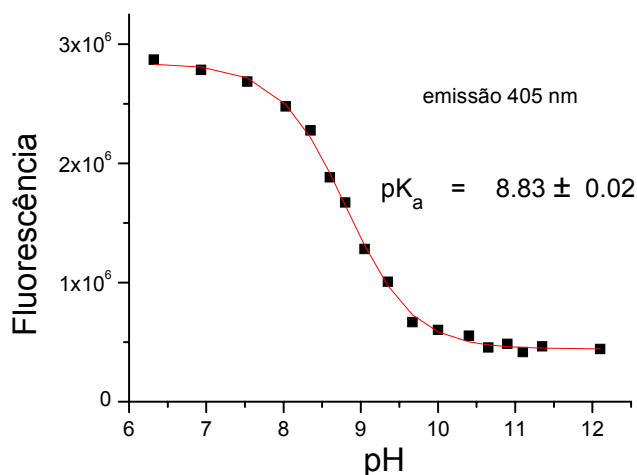


Figura 7.2 - Curva de transição entre as espécies neutra e monocationica da Dib (10 μ M) na faixa de pH de 6.3 a 12.1.

O valor do pK_a da faixa alcalina nos informa que no $pH = pK_a$ a Dib encontra-se 50% em sua forma monoprotonada (catiônica) e 50% em sua forma não ionizada (neutra). Neste sentido, para pH acima de 8.8 prevalece a espécie neutra e abaixo prevalecem as espécies ionizadas. A espécie neutra é decorrente da desprotonação da amina terciária. Na faixa alcalina há, portanto, uma transição entre as duas espécies que apresentam diferentes propriedades de fluorescência. As medidas realizadas não permitiram a determinação do pK_a da faixa ácida (ver Cap. 4.2). No entanto, na seção a seguir veremos como os pK_a podem ser obtidos a partir da fluorescência resolvida no tempo.

7.2

Fluorescência resolvida no tempo da dibucaína

Na figura abaixo temos exemplos das medidas de decaimento de fluorescência da dibucaína na concentração de 10 μ M em tampão universal ao longo da faixa alcalina de pH de 7.3 a 10.7 com excitação em 330 nm e emissão em 405 nm, com seus respectivos ajustes.

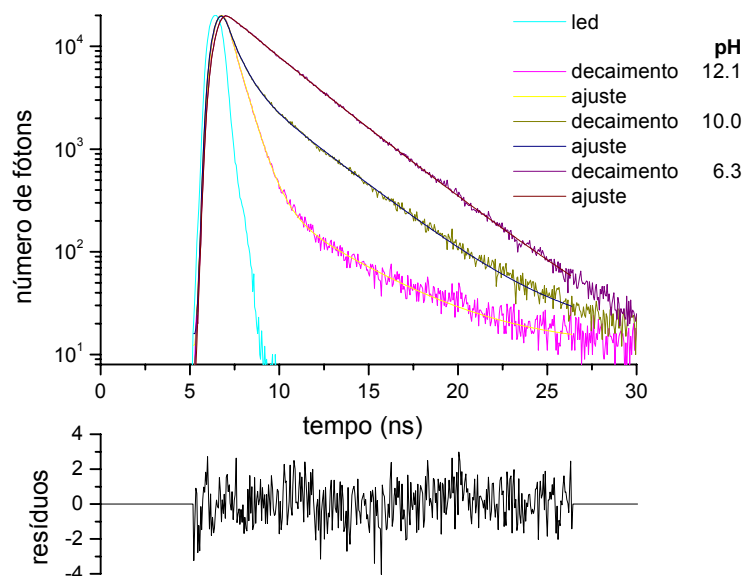


Figura 7.3 - Curvas de decaimento de fluorescência da Dib (10 μ M) em função do pH com excitação em 330nm e emissão em 405 nm. Ajustes realizados com três exponenciais.

Podemos observar na Fig. 7.3 que à medida que o *pH* diminui a componente com maior tempo de vida aumenta. A seguir ajustamos os resultados obtidos tanto com a análise individual (Tabela 7.1) quanto com a análise global (Tabela 7.2), considerando um modelo de três exponenciais. Na análise individual, em toda a faixa alcalina de pH de 7.3 a 12.1 fixou-se um tempo de vida τ_0 em um valor pequeno de 0.16 ns. Como associamos τ_0 ao espalhamento da luz na amostra, um maior fator pré-exponencial α_0 e uma maior amplitude relativa f_0 traduzem maior espalhamento, indicando agregação das moléculas. Na faixa de pH de 7.3 a 12.1 houve um aumento de 2% para 20% na agregação molecular.

Tabela 7.1 - Resultados da análise individual tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da dibucaína em função do pH na faixa alcalina, fixando-se τ_0 em 0.16 ns.

pH	α_0	f_0	τ_1	α_1	f_1	τ_2	α_2	f_2	χ^2
	(10^{-2})	(%)	(NS)	(10^{-2})	(%)	(NS)	(10^{-2})	(%)	
12.1	10.8	20.2	0.67	9.67	73.6	4.00	0.13	6.00	1.37
11.4	10.3	18.8	0.67	9.57	71.6	3.74	0.22	9.40	1.11
10.9	9.4	16.6	0.66	9.76	70.2	3.49	0.34	13.1	1.23
10.6	10.3	17.9	0.67	9.18	65.2	3.41	0.46	16.7	1.14
10.0	11.8	16.1	0.72	6.51	38.9	3.27	1.66	44.9	1.28
9.6	11.6	15.2	0.74	5.96	35.9	3.18	1.94	49.3	0.90
9.2	8.70	9.50	0.76	4.98	25.3	3.21	3.05	65.1	1.10
9.0	6.20	5.60	0.92	2.94	15.1	3.20	4.45	79.2	1.32
8.8	7.50	6.50	1.17	2.31	14.3	3.21	4.65	79.1	1.01
8.3	4.40	3.50	1.41	1.50	10.3	3.24	5.46	86.1	1.10
7.9	3.50	2.80	1.87	2.02	18.3	3.36	4.84	78.8	1.12
7.3	2.60	2.00	1.88	1.79	15.9	3.32	5.22	81.9	1.18

Uma hipótese possível é que este aumento é causado pela neutralização da interação coulombiana repulsiva e hidrofobicidade das moléculas. Como o número de moléculas neutras aumenta com o pH, foi possível utilizar os parâmetros α_0 e f_0 para ajustar uma curva de transição para a obtenção do respectivo pK_a . Para o tempo associado à espécie neutra, τ_1 , a partir da análise individual não foi possível definir um valor único. Sugerimos que a diminuição do tempo de vida associado a essa espécie deve-se à formação de agregados. Na faixa de pH de 7.3 a 12.1 há um aumento de 16% para 70% na amplitude relativa, f_1 , desta espécie. Nesse caso, a diminuição do tempo de vida de 1.88 ns para 0.67 ns poderia ser explicada pelo aumento de decaimento por processos não radiativos provocados pela agregação. Para o tempo associado à espécie catiônica, τ_2 , foi possível definir um valor em torno de 3.4 ns. Na faixa de pH de 7.3 a 12.1 há uma diminuição de 81.9% para 6% na amplitude relativa, f_2 , desta espécie.

Os fatores pré-exponenciais α_0 , α_1 e α_2 e as amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3 em função do pH aparecem na Fig. 7.4, respectivamente, os quais foram ajustados com o uso das equações (6.28) e (6.36).

O valores de pK_a encontrados, abaixo, usando as curvas de α_i em função do pH foram de 8.8, 9.6 e 9.5 (± 0.1) e usando os f_i foram 9.4, 9.8 e 9.8 (± 0.1), $i = 0, 1$ e 2 , respectivamente. Como podemos observar, apenas para α_0 o valor do pK_a manteve-se igual ao determinado pela fluorescência estacionária. Tanto para α_2 , quanto para α_3 , o valor do pK_a sofreu um deslocamento para valores mais altos.

Com o uso da amplitude relativa observou-se uma menor dispersão nos valores de pK_a . A média dos valores de pK_a fornecidos pelos ajustes dos dados de fluorescência resolvida no tempo foi 9.48. Note que este valor é um pouco maior do que o obtido através da fluorescência estacionária.

No intuito de melhor investigar a compatibilidade dos dados experimentais com o modelo teórico de duas espécies adotado, aplicamos a análise global para determinar valores únicos para os tempos de vida. Em toda a faixa alcalina de pH de 7.3 a 12.1 foi possível encontrar um conjunto de três tempos de vida τ_0 , τ_1 e τ_2 que ajustasse todas as curvas de decaimento (Tabela 7.2).

O valor do χ^2 foi um pouco superior a 1.2 na maioria das curvas individuais - não ultrapassando o máximo de 1.50. O valor do χ^2 global foi de 1.34 e o conjunto de tempos de vida encontrado foi compatível com os tempos da análise individual. Para τ_0 associamos o espalhamento da luz na amostra. Deste modo, o fator pré-exponencial α_0 , e a amplitude relativa f_0 estão associados à agregação das moléculas de dibucaína em solução. Na faixa de pH de 7.3 a 12.1 há um aumento de 8% para 23% nesta agregação. Associamos a espécie neutra a τ_1 . Na faixa de pH de 7.3 a 12.1 há um aumento de 0.4% para 70.7% na amplitude relativa, f_1 , desta espécie. Por fim, para τ_2 associamos a espécie moncatiônica. Na faixa de pH de 7.3 a 12.1 há uma diminuição de 94.1% para 6.2% na amplitude relativa, f_2 , desta espécie. Nota-se que os valores encontrados para τ_1 e τ_2 estão de acordo com (Mondal 2003, 2004).

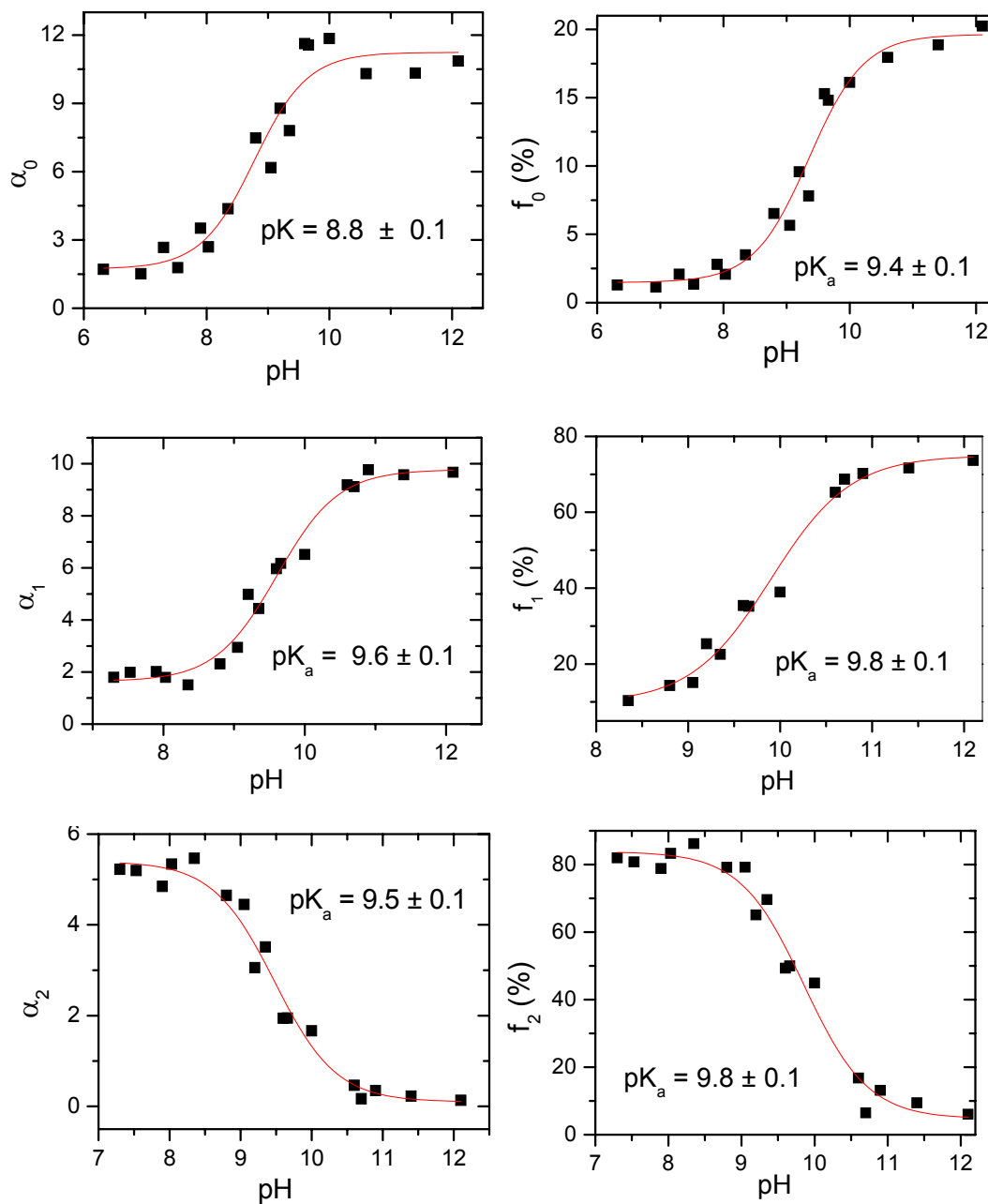


Figura 7.4 - Curvas de transição entre as espécies neutra e monocationica da Dib na concentração de $10\mu\text{M}$. Ajustes realizados com os fatores pré-exponenciais α_0 , α_1 e α_2 (à esquerda) e com as amplitudes relativas f_0 , f_1 e f_2 (à direita).

Tabela 7.2 - Resultados da análise global tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da dibucaína em função do pH na faixa alcalina.

τ_0 (ns)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
0.26	0.67	3.14	1.34

pH	α_0 (10^{-2})	f_0 (%)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
12.1	8.40	23.1	9.71	70.7	0.19	6.20	1.40
11.4	7.68	21.1	9.69	68.8	0.30	9.10	1.21
10.9	6.83	18.2	9.84	68.7	0.42	13.0	1.17
10.6	7.15	18.3	9.41	63.5	0.54	17.1	1.20
10.0	6.53	13.6	7.45	39.1	1.85	46.3	1.22
9.6	5.23	10.1	7.32	37.2	2.19	52.5	1.48
9.3	5.37	8.60	4.85	19.2	3.90	72.2	1.41
9.0	3.51	4.70	3.55	12.7	4.78	82.6	1.50
8.8	3.47	4.40	3.71	12.5	5.24	82.5	1.39
7.5	1.07	8.20	1.63	0.40	6.88	94.1	1.43

As amplitudes relativas f_0 , f_1 e f_2 em função do pH aparecem nas Figs. 7.5, 7.6 e 7.7, as quais foram ajustados com o uso da equação (6.36).

Os valores de pK_a encontrados para estes ajustes foram 9.76 ± 0.1 e 9.8 ± 0.1 . Com o intuito de diminuir o χ^2 realizamos também uma análise global quadri-dimensional. Os valores dos tempos de vida e das amplitudes relativas associadas aos tempos τ_0 , τ_1 e τ_2 não se alteraram, assim como o valor do pK_a obtido. O valor de τ_3 foi igual a 5.8 ns, com uma amplitude relativa inferior a 7%.

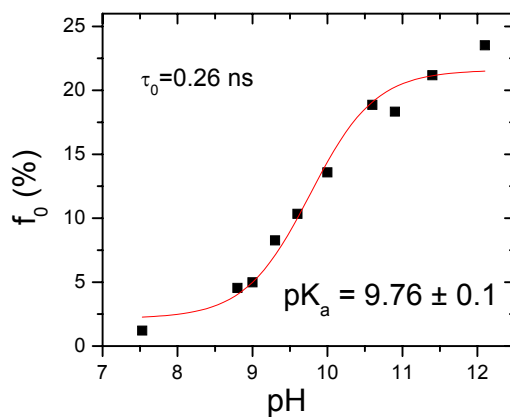


Figura 7.5 - Curva de transição entre as espécies neutra e moncatiônica da Dib ($10\mu\text{M}$) na faixa alcalina com o uso da amplitude relativa f_0 .

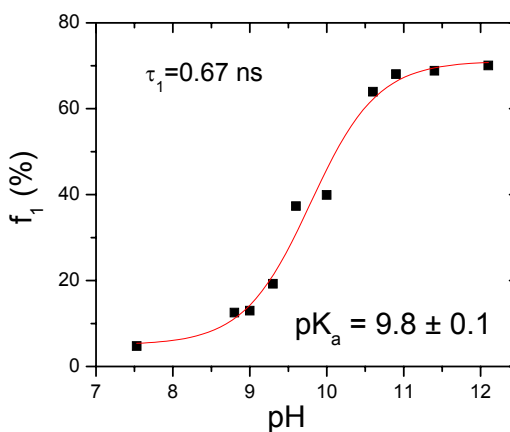


Figura 7.6 - Curva de transição entre as espécies neutra e moncatiônica da Dib ($10\mu\text{M}$) na faixa alcalina com o uso da amplitude relativa f_1 .

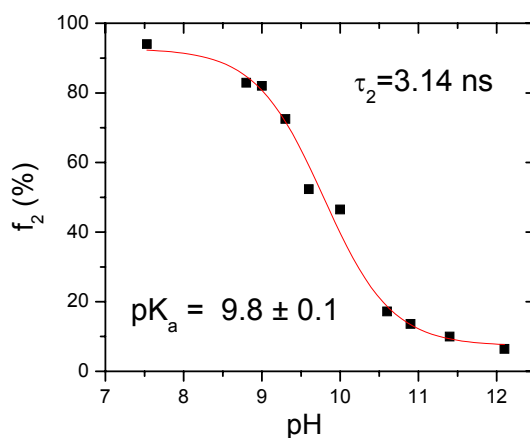


Figura 7.7 - Curva de transição entre as espécies neutra e moncatiônica da Dib ($10\mu\text{M}$) na faixa alcalina com o uso da amplitude relativa f_2 .

Por fim, nota-se que os valores de pK_a encontrados são um pouco maiores do que os obtidos através da fluorescência estacionária e muito próximos do valor

médio obtido através da análise individual. De fato, substituindo na Eq. 6.35 os valores dos rendimentos quânticos $Q_1 = 0.04$ e $Q_2 = 0.27$ com base em (Louro et al.), encontramos que $\Delta pK_a = 0.83$, que é próximo do deslocamento de pK encontrado quando utilizamos as amplitudes relativas como parâmetro (Fig. 7.7). Abaixo temos explicitamente o cálculo de ΔpK_a a partir da Eq. 6.35.

$$pK_a' - pK_a = \log \frac{Q_2}{Q_1} = \log \frac{0.27}{0.04} = 0.83 \quad (7.1)$$

O valor obtido para a constante de ionização da Dib está de acordo com os valores encontrados na literatura (Louro et. al., Vanderkooi, Malheiros et. al.).

7.3

Absorção ótica e fluorescência estacionária da NF e AuNF

Abaixo temos os espectros de absorção da NF e AuNF medidos para a concentração de $7 \mu\text{M}$ em tampão universal nos pHs de 11.3, 6.6 e 4.0.

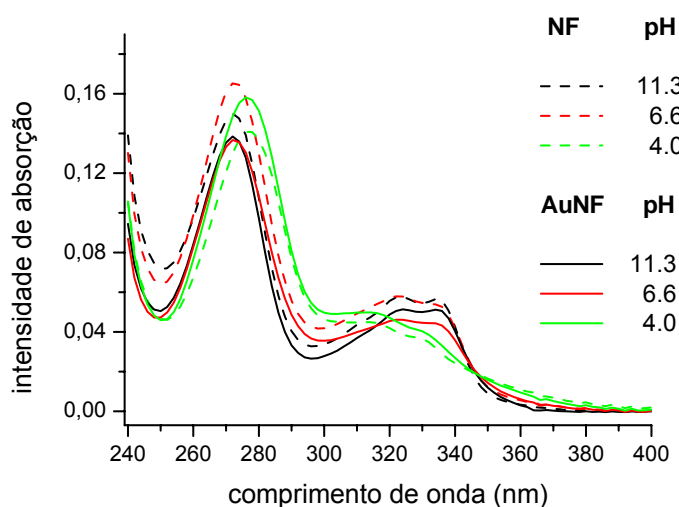


Figura 7.8 – Espectros de absorção da NF ($7 \mu\text{M}$) e do complexo AuNF nos valores de pH 11.3, 6.6 e 4.0.

Como podemos observar na Fig. 7.8, as diferenças entre os espectros de absorção da NF e AuNF são pequenas. A absorção do complexo AuNF mostrou-se um pouco menor que a absorção do antibiótico puro NF. A primeira banda de absorção apresenta um pico em 272 nm nos pHs 11.3 e 6.6 e um deslocamento para o vermelho, em 278 nm, no pH = 4.0.

Já a segunda banda de absorção apresentou dois picos, em 322 nm e 334 nm, nos pHs 11.3 e 6.6 e um deslocamento para o azul em 318 nm e 330 nm, respectivamente, em pH = 4.0. Nota-se que estes deslocamentos estão em torno de 4 nm. Alguns autores apontam que a absorção das fluoroquinolonas diminui significativamente na presença de íons metálicos (Turel and Bukovec, 1995). No entanto, nossos resultados não indicam uma diferença significativa entre as absorções da NF e seu complexo AuNF ao longo da faixa de pH de 4.0 a 11.3.

Abaixo temos os espectros de absorção da NF e AuNF medidos para a concentração de 6 μM em solvente orgânico DMSO.

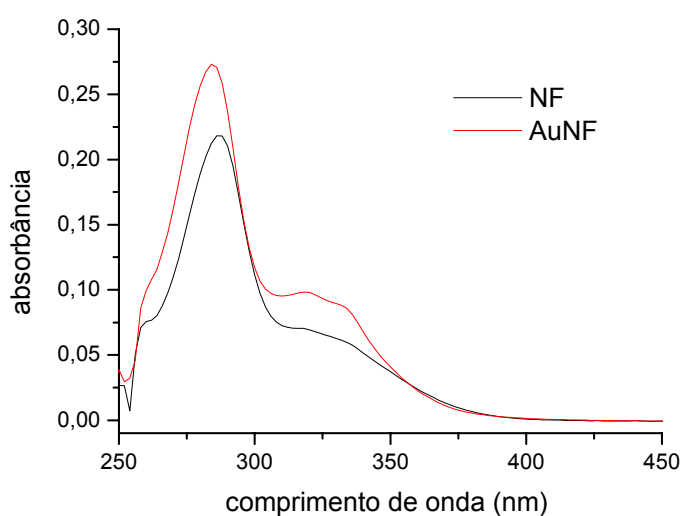


Figura 7.9 – Espectros de absorção da NF (6 μM) e AuNF em solução de DMSO.

Como podemos observar na Fig. 7.9, a AuNF apresentou uma absorção um pouco maior que a NF em DMSO. Nota-se que este resultado é o inverso das medidas realizadas em solução aquosa. A primeira banda de absorção da NF apresenta um pico em 286 nm e a segunda banda apresenta dois picos, 320 nm e 334 nm. Já a primeira banda de absorção da AuNF apresenta um pico em 284 nm e a segunda banda apresenta dois picos, 318 nm e 334 nm.

Na Fig. 7.10, abaixo, temos os espectros de emissão de fluorescência da NF, com excitação em 330 nm, medidos para a concentração de 7 μM em tampão universal ao longo da faixa de pH de 11.3 a 4.0.

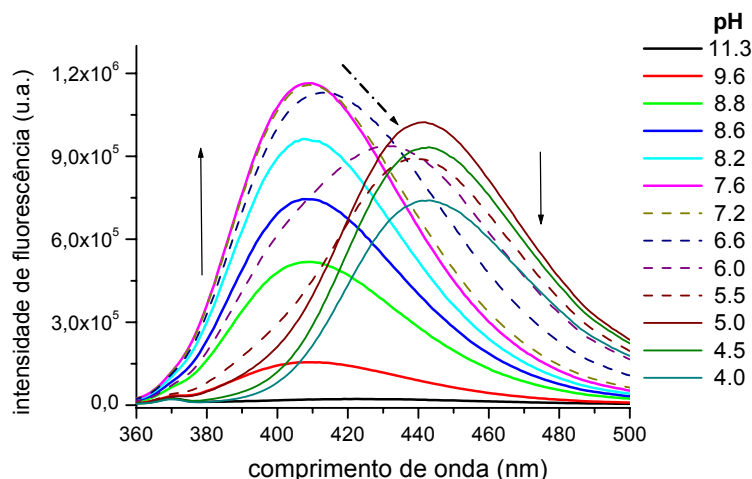


Figura 7.10 – Espectros de emissão de fluorescência da NF em função do pH. As setas indicam a evolução dos espectros no sentido decrescente de pH. Excitação em 330 nm.

Como podemos observar, em pH 11.3 a NF apresenta uma fluorescência quase nula, indicando que para valores altos de pH temos uma espécie não fluorescente. À medida que o pH diminui a fluorescência aumenta, tendo sua intensidade máxima em pH 7.6 com o pico em 409 nm. Na faixa de pH de 7.2 a 5.0 há uma transição entre duas espécies fluorescentes. Observa-se um deslocamento para o vermelho até 442 nm, com diminuição de intensidade seguida de leve aumento (de pH 5.5 para 5.0). Nessa faixa de pH os espectros puderam ser ajustados como soma dos espectros em pH 7.6 e 5.0, confirmando assim a transição entre duas espécies. Na faixa de pH de 5.0 a 4.0 há uma nova diminuição de intensidade sem deslocamento do pico, sugerindo uma outra transição.

A seguir, na Fig. 7.11, temos os espectros de emissão de fluorescência do complexo AuNF, também com excitação em 330 nm, em tampão universal nos mesmos valores de pH da NF.

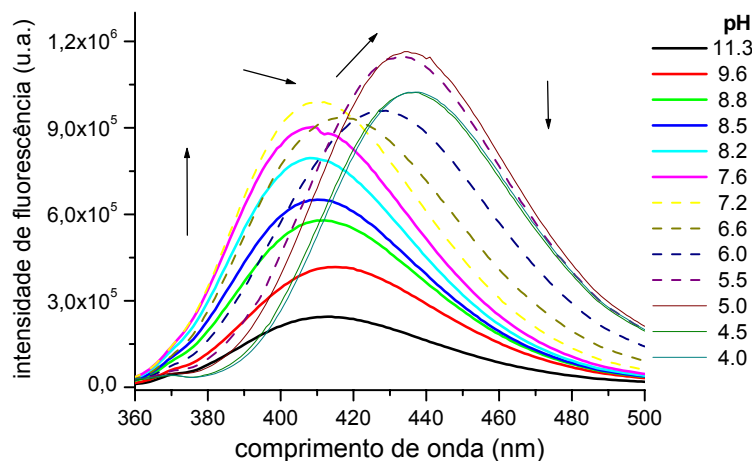


Figura 7.11 – Espectros de emissão de fluorescência da AuNF em função do pH. As setas indicam a evolução dos espectros no sentido de pH decrescente. Excitação em 330 nm.

Como podemos observar, diferentemente da NF, a AuNF possui uma fluorescência significativa em pH 11.3. À medida que o pH diminui a fluorescência com pico em cerca de 410 nm, também aumenta, tendo sua intensidade máxima em pH 7.2. Nota-se que a NF apresentou sua intensidade máxima em um valor de pH = 7.6. Na faixa de pH de 7.2 a 5.0, como observado na NF, há uma transição entre duas espécies fluorescentes. A diferença é que o pico de fluorescência da espécie que se vai formando com a diminuição do pH é mais intenso que em NF e desloca-se menos, para 435 nm, em vez de 442 nm. Na faixa de 5.0 a 4.0 há uma diminuição de intensidade.

Na Fig. 7.12, abaixo, temos os espectros de excitação de fluorescência (não corrigidos para a intensidade da lâmpada) da NF medidos para a concentração de 7 μM e emissão em 425 nm e também da AuNF, com emissão em 436 nm, ambos em tampão universal e pH em torno de 5.0. A NF possui bandas de excitação com picos em 281 nm e 333 nm, enquanto que a AuNF possui bandas mais largas, mas com picos em comprimentos de onda semelhantes, 283 nm e 331 nm.

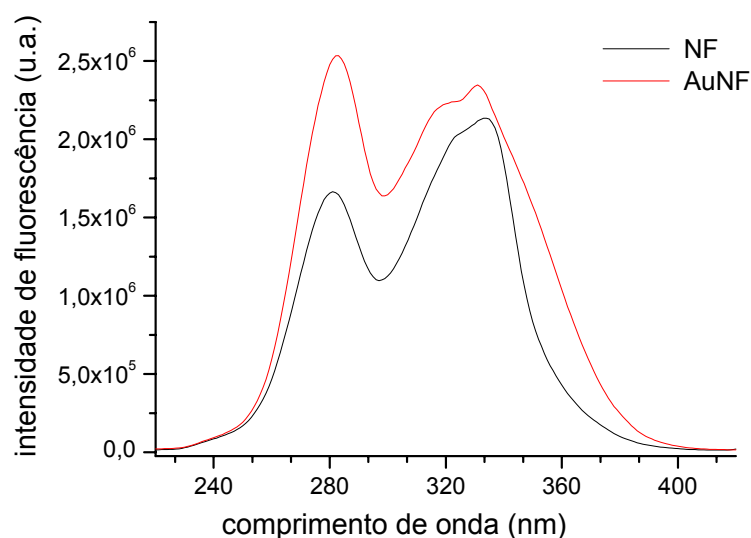


Figura 7.12 – Espectros de excitação de fluorescência da NF (7 μ M) e AuNF em pH \sim 5. Emissão em 425 nm, para NF e 436 nm para AuNF.

As Figs. 7.13 e 7.14, abaixo, apresentam uma comparação dos espectros de emissão de fluorescência da NF e da AuNF na faixa alcalina e na faixa ácida, respectivamente. Na faixa alcalina, em ambas as amostras houve um aumento da intensidade de fluorescência com a diferença de que a AuNF apresentou-se fluorescente em pH alto. Na faixa ácida, para a NF houve uma diminuição da intensidade de fluorescência com um deslocamento para o vermelho de 413 nm para 443 nm. Já para AuNF houve um aumento da intensidade na faixa de pH de 6.6 a 5.0 e uma diminuição de intensidade no pH = 4.0 com um deslocamento de 416 nm para 435 nm.

Os gráficos das intensidades de fluorescência da NF e da AuNF em 400 nm e 462 nm, pontos de maior variação de fluorescência, como função do pH aparecem na Fig. 7.15. Os pontos experimentais foram ajustados com o uso da equação (6.14).

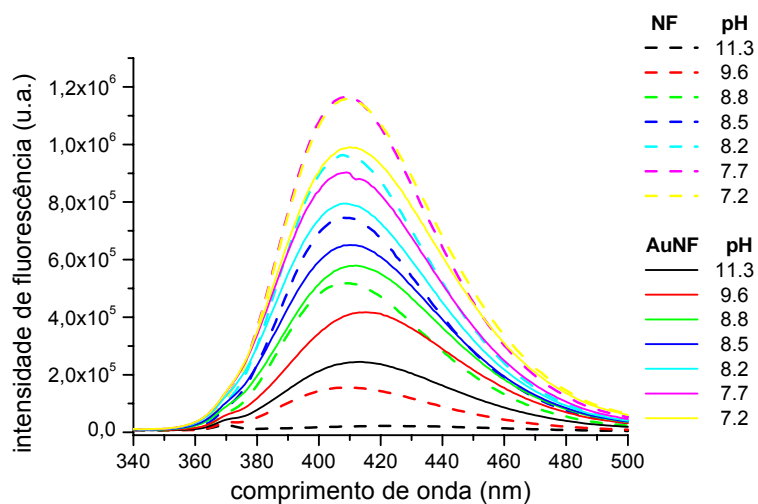


Figura 7.13 – Espectros de emissão de fluorescência da NF (7 μM) e AuNF na faixa alcalina de pH. Excitação em 330 nm.

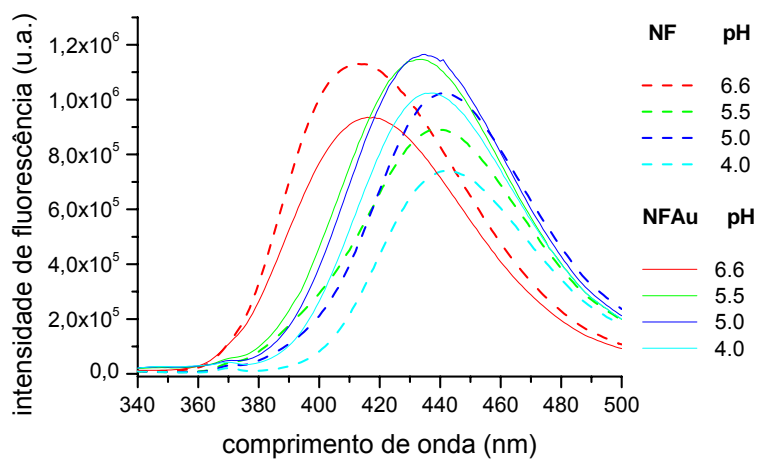


Figura 7.14 – Espectros de emissão de fluorescência da NF (7 μM) e AuNF na faixa ácida de pH. Excitação em 330 nm.

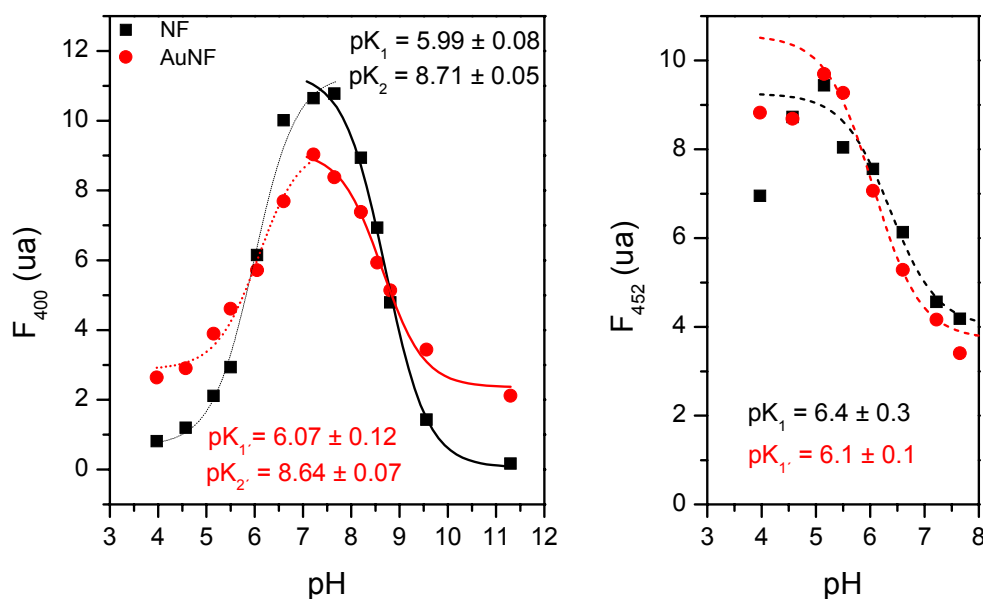


Figura 7.15 - Curvas de transição entre as espécies zwitteriônica - catiônica (pK_1) e zwitteriônica - aniônica (pK_2) da NF, quadrados preenchidos, e de seu complexo AuNF, círculos vermelhos, ao longo da faixa de pH de 4.0 a 11.3.

Os valores de pK_a obtidos do grupo piperazina foram $pK_2^{NF} = 8.71 \pm 0.05$, para a NF, e $pK_2^{AuNF} = 8.64 \pm 0.07$, para AuNF. Esses pK_a s se referem à transição na faixa alcalina, da espécie zwitteriônica (em pH neutro) para a espécie aniônica (em pH alcalino). Nota-se que a presença do ouro não desloca significativamente o pK_a . Contudo, enquanto a NF não é fluorescente em pH alto (~11) o complexo de AuNF apresenta alguma fluorescência (ver Fig. 7.13). Neste sentido, temos que pK_2^{NF} refere-se à transição da espécie fluorescente NF à espécie não fluorescente NF^- . Já o pK_2^{AuNF} refere-se à transição de uma espécie de menor para uma de maior rendimento quântico.

Para o grupo carboxílico, os valores obtidos foram $pK_1^{NF} = 6.1 \pm 0.1$ e $pK_1^{AuNF} = 6.4 \pm 0.3$. Esses pK_a s se referem à transição na faixa alcalina, da espécie zwitteriônica (em pH neutro) para a espécie catiônica (em pH ácido). Nota-se que a presença do ouro também não desloca significativamente o pK_a da faixa ácida. Portanto, pK_1^{NF} refere-se à transição na faixa ácida de NF^+ e $AuNF^+$ para espécies com rendimentos quânticos maiores.

Na Fig. 7.16 temos os espectros de emissão de fluorescência da NF medidos com excitação em 330 nm para a concentração de 6 μM e também da AuNF, ambos em solvente orgânico DMSO.

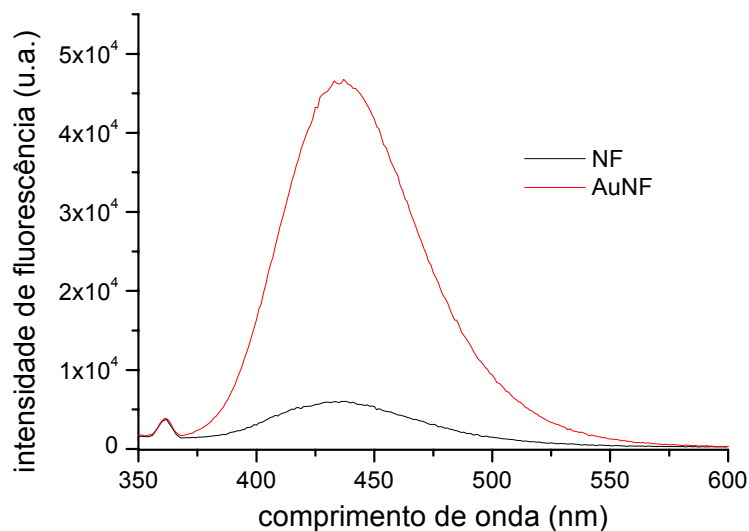


Figura 7.16 – Espectros de emissão de fluorescência da NF (6 μM) e AuNF em solução de DMSO. Excitação em 330 nm.

A NF apresentou baixa intensidade de fluorescência em DMSO com pico de em 438 nm. Já o complexo de AuNF apresentou uma maior largura de banda e uma maior fluorescência, com pico em 435 nm. Nota-se uma diferença significativa entre as intensidades da NF e AuNF em DMSO comparado às medidas realizadas em solução aquosa.

7.4

Fluorescência resolvida no tempo da NF

Foram realizadas medidas de fluorescência resolvida no tempo da NF na concentração de 7 μM em tampão universal na faixa de pH de 4.0 a 11.3. Na Fig. 7.17 temos uma curva de decaimento de fluorescência no pH 8.5, com seu respectivo ajuste. Excitação em 330nm e emissão em 409 nm.

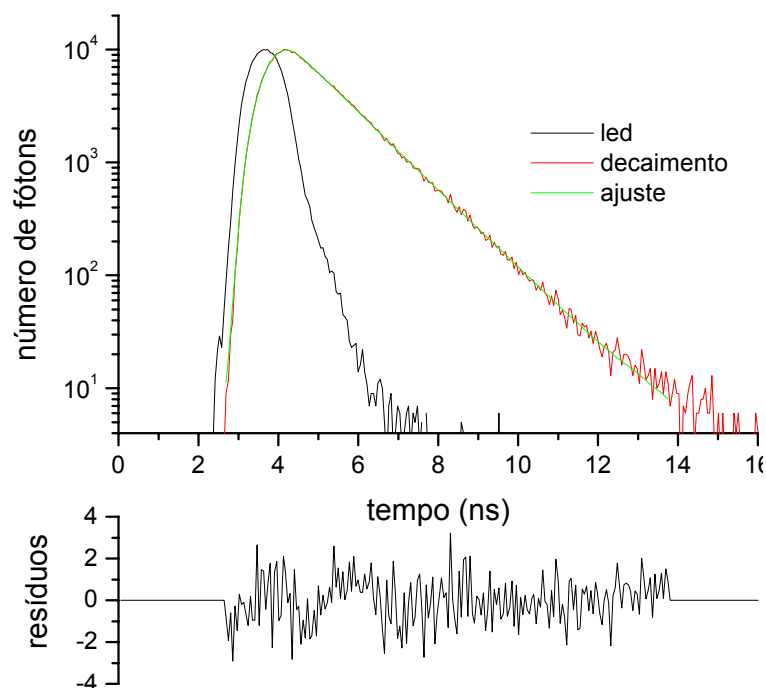


Figura 7.17 - Curva de decaimento de fluorescência da NF ($7\mu\text{M}$) no valor de pH 8.5. Ajustes realizados com duas exponenciais. Excitação em 330nm e emissão em 409 nm.

Como podemos observar na tabela 7.3, em toda a faixa de pH de 9.56 a 7.65 todas as curvas de decaimento de fluorescência foram ajustadas com o uso de dois tempos de vida. O valor do χ^2 global foi satisfatório. Nota-se que a amplitude relativa associada a τ_1 é inferior a 6%. Como a espécie aniônica da NF não é fluorescente em pH alto, associamos τ_2 à espécie zwitteriônica, o qual possui uma amplitude relativa acima de 94%.

Tabela 7.3 - Resultados da análise global bi-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da NF em função do pH na faixa alcalina.

τ_1 (ns)	τ_2 (ns)		χ^2		
0.60	1.24		1.20		

pH	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
9.56	1.05	5.40	8.86	94.6	1.43
8.81	0.56	0.20	9.51	99.8	1.43
8.54	0.53	2.70	9.10	97.3	1.01
8.20	0.20	1.00	9.25	99.0	1.04
7.65	0.08	0.40	9.38	99.6	1.09

A Fig. 7.18, abaixo, mostra duas curvas de decaimento de fluorescência características da NF (7 μ M) na faixa ácida e neutra (pHs 4.5 e 7.2), com seus respectivos ajustes. Excitação em 330nm e emissão em 448 nm. Como podemos observar na tabela 7.4, abaixo, em toda a faixa ácida de *pH* de 4.0 a 7.6 todas as curvas de decaimento de fluorescência foram ajustadas com o uso de dois tempos de vida. O valor do χ^2 global foi um pouco superior a 1.2. Associamos τ_1 à espécie com máximo de fluorescência em 409 nm. Nesta faixa de pH há uma diminuição de 99.7% para 28.4% na amplitude relativa, f_1 , desta espécie. Por fim, associamos τ_2 à espécie com máximo de fluorescência em 442 nm (ver Fig. 7.10). Nesta faixa de pH houve um aumento de 0.3% para 71.6% na amplitude relativa, f_2 , desta espécie. Nesta faixa de pH temos que a molécula de NF apresenta transição entre sua forma protonada (H_2Q^+) e zwitteriônica (HQ^\pm).

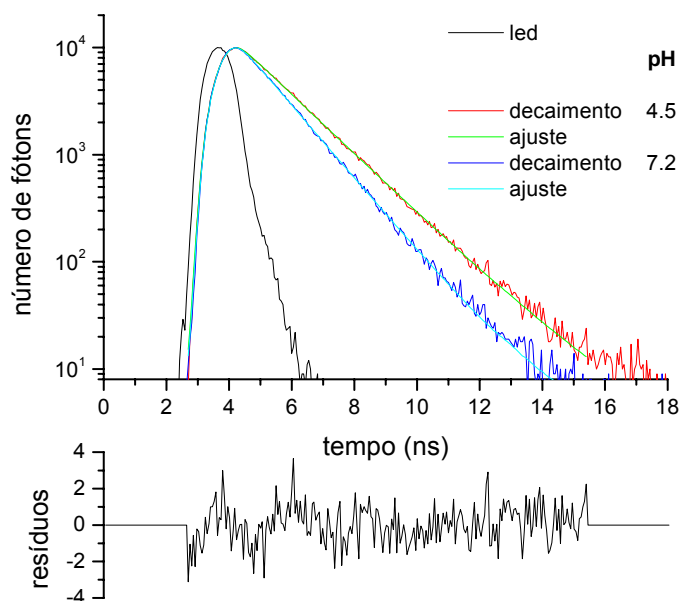


Figura 7.18 - Curvas de decaimento de fluorescência da NF ($7\mu\text{M}$) nos valores de pH 4.5 e 7.2. Ajustes realizados com duas exponenciais. Excitação em 330nm e emissão em 409 nm.

As amplitudes relativas f_1 e f_2 foram colocadas em gráfico abaixo, Fig. 7.19, como função do pH com o uso da equação (6.14).

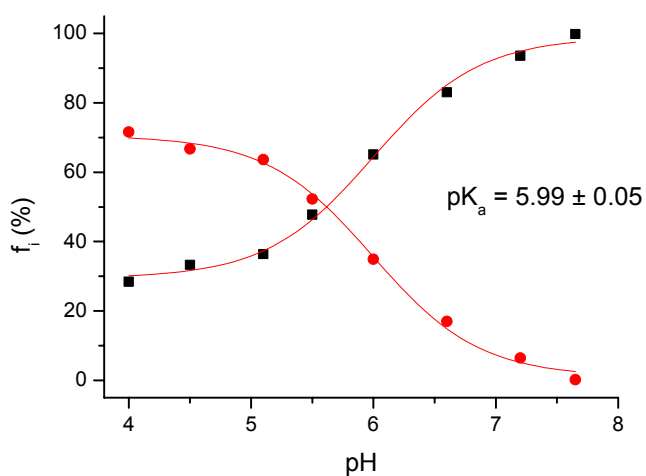


Figura 7.19 – Curvas de transição entre as espécies catiônica e zwitteriônica da NF ($7\mu\text{M}$). Os ajustes foram realizados com as amplitudes relativas f_1 e f_2 .

Tabela 7.4 – Resultados da análise global bi-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da NF em função do pH na faixa ácida.

τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
1.26	1.71	1.22

pH	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
7.6	9.36	99.7	0.18	0.30	1.44
7.2	8.93	93.5	0.45	6.50	1.28
6.6	8.08	82.9	1.22	17.1	1.15
6.0	6.53	65.0	2.58	35.0	1.01
5.5	4.95	47.7	3.99	52.3	1.22
5.1	3.92	36.3	5.05	63.7	1.31
4.5	3.61	33.2	5.33	66.8	1.18
4.0	3.09	28.4	5.74	71.6	1.13

O valor de pK_a encontrado para este ajuste foi de 5.99 ± 0.05 . Note que não houve diferença em relação ao pK_a encontrado na fluorescência estacionária. De fato, ao substituir os valores dos rendimentos quânticos na Eq. 4.27, encontra-se que a diferença entre os pK_a s é de apenas 0.01. A razão entre os rendimentos quânticos das espécies protonada (H_2Q^+) e zwitteriônica (HQ^+) foi determinada através da razão entre a integral dos espectros de fluorescência nos pHs 5.0 e 7.2 da Fig. 7.10. Abaixo temos explicitamente o cálculo de ΔpK_a .

$$pK_a' - pK_a = \log \frac{\phi_2 \tau_1}{\phi_1 \tau_2} = \log \frac{6.38}{6.62} = -0.01 \quad (7.2)$$

Nota-se que os valores obtidos para as constantes de ionização da NF tanto em meio ácido, $pK_1 = 5.99 \pm 0.05$, quanto em meio alcalino, $pK_2 = 8.7 \pm 0.06$, estão próximos dos valores encontrados a partir de outras técnicas experimentais, tais como $pK_1 = 6.36 \pm 0.12$ e $pK_2 = 8.6 \pm 0.08$ (DraKopoulos et. al.), $pK_1 = 5.93 \pm 0.05$ e $pK_2 = 8.33 \pm 0.11$ (Barbosa et. al.), $pK_1 = 5.9 \pm 0.05$ e $pK_2 = 8.22 \pm 0.07$ (Barron et. al.).

7.5

Fluorescência resolvida no tempo da AuNF

Foram realizadas medidas de tempo de vida de fluorescência da AuNF em tampão universal na faixa alcalina de 11.3 a 7.6 com excitação em 330 nm e emissão em 409 nm. Na Fig. 7.20, a seguir, temos duas curvas de decaimento de fluorescência, nos pHs 8.2 e 9.5, com seus respectivos ajustes.

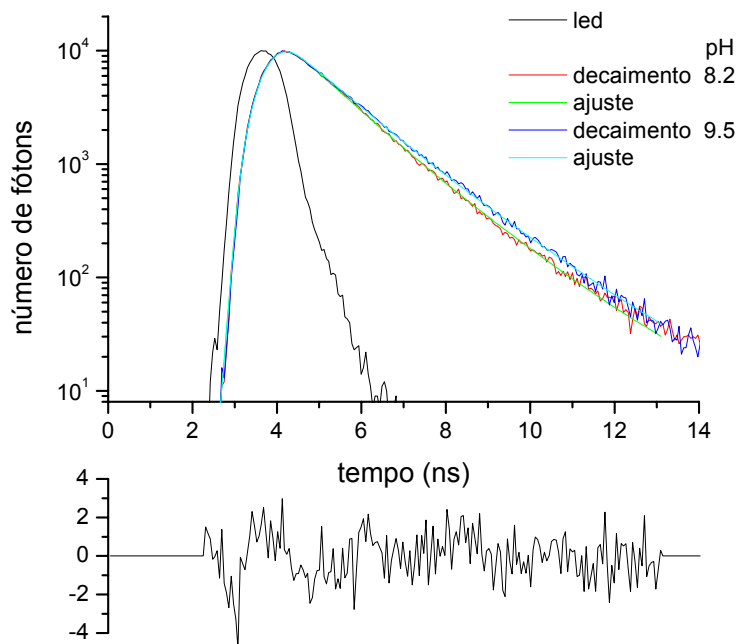


Figura 7.20 - Curvas de decaimento de fluorescência da AuNF nos valores de pH 8.2 e 9.5. Ajustes realizados com duas exponenciais. Excitação em 330nm e emissão em 409 nm.

Tabela 7.5 - Resultados da análise global bi-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da AuNF em função do pH na faixa alcalina.

τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	χ^2
1.15	1.91	1.35

pH	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
9.56	6.66	60.7	2.59	39.3	1.15
8.81	7.22	67.4	2.10	32.6	1.37
8.54	7.75	72.2	1.79	27.8	1.20
8.2	7.95	75.6	1.54	24.4	1.06
7.65	7.55	71.8	1.79	28.2	1.50

Em toda a faixa alcalina de pH de 11.3 a 7.65 foi possível encontrar um conjunto de dois tempos de vida τ_1 e τ_2 que ajustasse todas as curvas de decaimento (Tabela 7.5). O χ^2 global, no entanto, mostrou-se acima de 1.2. Ao contrário da NF, que apresentou apenas um tempo de vida ($\tau_1 = 1.24$ ns), a AuNF apresentou dois tempos de vida nessa faixa: $\tau_1 = 1.15$ ns e $\tau_2 = 1.91$ ns. Esses podem estar associados a dois sítios de coordenação diferentes ou a duas conformações diferentes para o mesmo sítio. Dado que o valor tanto dos χ^2 individuais, quanto do χ^2 global foi superior à 1.2, optou-se por realizar uma nova análise considerando um modelo tri-exponencial. Nesse caso, os valores de χ^2 foram satisfatórios e os resultados não diferiram significativamente dos da análise bi-exponencial, acrescentando apenas um tempo mais longo em torno de 6 ns, com amplitude relativa abaixo de 5%.

As amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3 foram ajustadas abaixo na Fig. 7.21 em função do pH com o uso da equação (6.14).

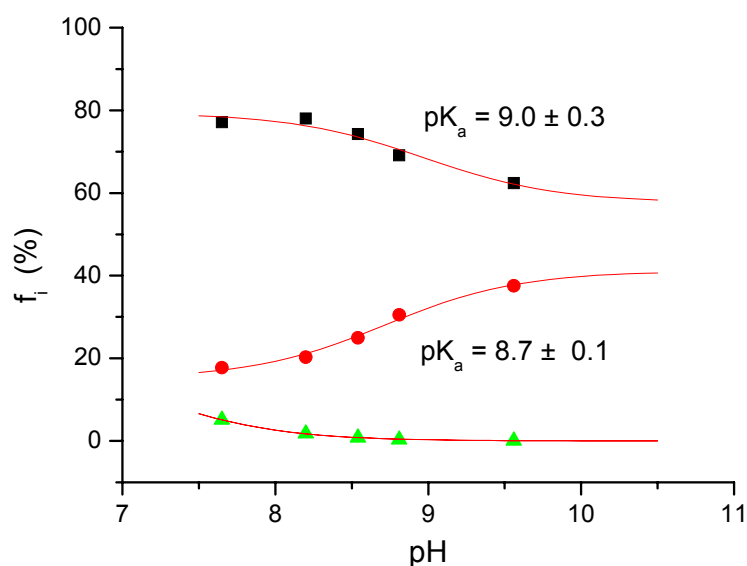


Figura 7.21 - Curvas de transição entre as espécies catiônica e zwitteriônica da AuNF. Os ajustes foram realizados com as amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3 .

Os valores de pK_a encontrados para este ajuste foi de 9.0 ± 0.3 , com o uso de f_1 , e 8.7 ± 0.1 com o uso de f_2 . Nota-se que os valores de pK_a obtidos estão muito próximos dos encontrados na fluorescência estacionária. Observa-se também que a contribuição f_3 , devido ao tempo τ_3 , é realmente pequena.

Medidas de tempo de vida de fluorescência da AuNF em tampão universal na faixa ácida foram realizadas (Tabela 7.6) com excitação em 330 nm e emissão

em 448 nm. As curvas de decaimento de fluorescência com seus respectivos ajustes para os pHs 4.0 e 7.2 encontram-se na Fig. 7.22. Em toda a faixa ácida de pH de 7.2 a 4.0 foi possível encontrar um conjunto de três tempos de vida τ_1 , τ_2 e τ_3 que ajustasse todas as curvas de decaimento. O valor do χ^2 mostrou-se satisfatório. Os tempos τ_1 e τ_2 são muito semelhantes aos da NF pura. No entanto, a amplitude relativa associada ao tempo de vida mais longo τ_3 cresce de 5.3% a 44.8% com o decréscimo do pH. A amplitude relativa, f_1 , varia de 80.6% a 21.5% quando o pH diminui, enquanto f_2 aumenta de 14.1% a 33.7%.

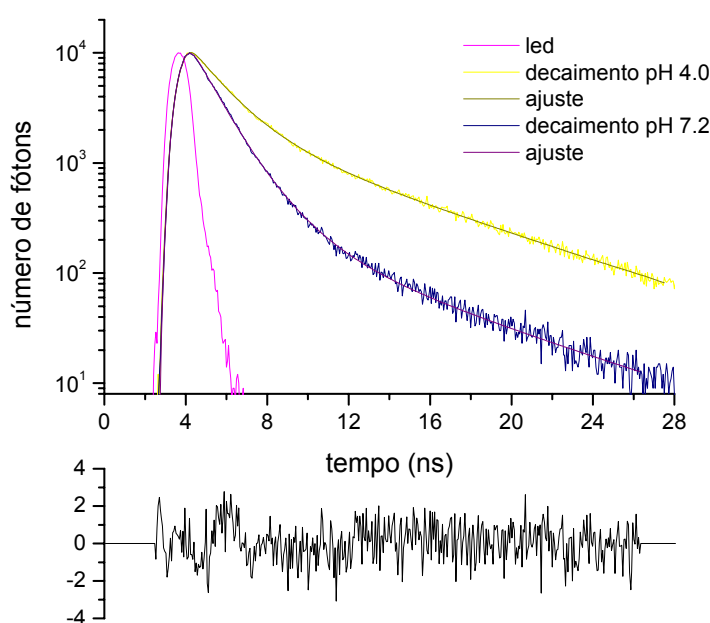


Figura 7.22 - Curvas de decaimento de fluorescência da AuNF nos valores de pH 4.0 e 7.2. Ajustes realizados com três exponenciais. Excitação em 330 nm e emissão em 448 nm.

A Fig. 7.23, abaixo, mostra o gráfico das amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3 em função do pH. Os resultados foram ajustados com o uso da Eq. 6.14. Os valores de pK_a s encontrados para este ajuste foram 6.50 ± 0.05 , 6.24 ± 0.06 e 6.65 ± 0.05 com o uso das amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3 . Nota-se que os valores de pK_a obtidos estão um pouco maior dos encontrados na fluorescência estacionária. Para a AuNF a contribuição de f_3 , devido ao tempo τ_3 , mostra-se significativa. Ao contrário da NF, que apresentou apenas dois tempos de vida ($\tau_1 = 1.26$ ns e $\tau_2 = 1.71$), a AuNF apresentou três tempos de vida nessa faixa: $\tau_1 = 1.20$ ns,

$\tau_2=1.90$ ns e $\tau_3=6.8$ ns. Esses podem estar associados a sítios de coordenação diferentes ou a conformações diferentes para o mesmo sítio.

Tabela 7.6 - Resultados da análise global tri-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da AuNF em função do pH na faixa ácida.

τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_3 (ns)	χ^2
1.20	1.90	6.80	1.09

pH	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	α_3 (10^{-2})	f_3 (%)	χ^2
7.6	8.23	80.6	0.91	14.1	0.10	5.3	1.14
7.2	8.00	74.6	1.01	15.0	0.20	10.4	1.00
6.6	6.91	55.0	1.59	20.1	0.55	24.9	1.14
6.0	5.64	40.0	2.27	25.3	0.90	34.7	1.17
5.5	4.40	28.1	3.03	30.8f	1.13	41.1	1.03
5.1	3.88	25.0	0.03	31.2	1.29	43.8	1.13
4.5	3.69	22.3	3.43	33.0	1.31	44.7	1.03
4.0	3.61	21.5	3.56	33.7	1.33	44.8	1.09

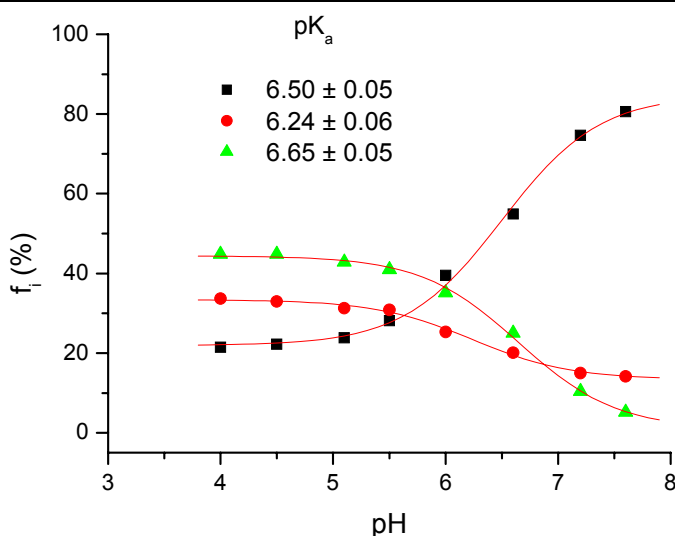


Figura 7.23 - Curvas de transição entre as espécies catiônica e zwitteriônica da AuNF. Os ajustes foram realizados com as amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3 .

O valor de pK_a da faixa alcalina encontrado na fluorescência resolvida no tempo para a AuNF foi 8.8 ± 0.2 . Para a faixa ácida o valor de pK_a obtido foi de 6.50 ± 0.05 . Nota-se que praticamente não houve diferença em relação aos pK_a s encontrados na fluorescência estacionária (8.7 ± 0.1 e 6.4 ± 0.1).

7.6

Fluorescência resolvida no tempo da NF e AuNF em DMSO

Foram realizadas medidas de tempo de vida de fluorescência da NF e AuNF em solvente orgânico DMSO com excitação em 330 nm e emissão em 409 nm. Na Fig. 7.24 temos duas curvas de decaimento de fluorescência com seus respectivos ajustes.

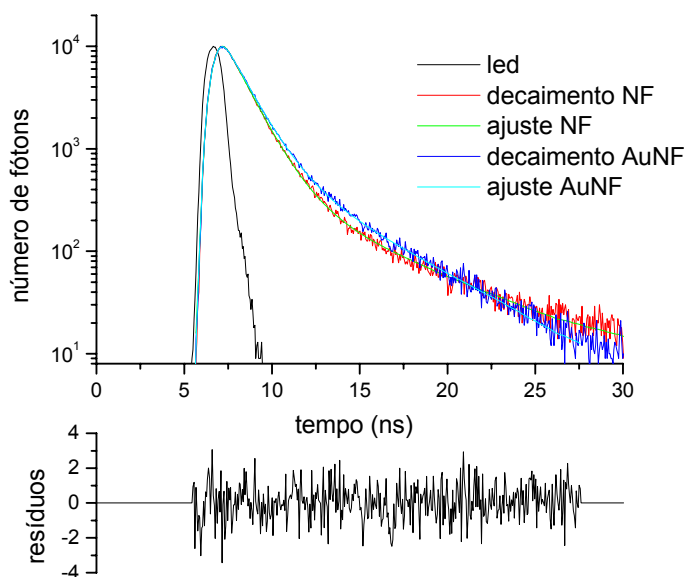


Figura 7.24 - Curvas de decaimento de fluorescência da NF (6 μ M) e AuNF em solução de DMSO. Ajustes realizados com duas exponenciais. Excitação em 330 nm e emissão em 409 nm.

Foi possível encontrar um conjunto de dois tempos de vida τ_1 e τ_2 que ajustasse as duas curvas de decaimento. O valor do χ^2 mostrou-se satisfatório. Nota-se que o tempo τ_1 da NF e AuNF são iguais. Já τ_2 é um pouco maior para a AuNF. As amplitudes relativas estão muito próximas, $f_1 = 87\%$ e 81% e $f_2 = 13\%$ e 19% para NF e AuNF, respectivamente.

Tabela 7.7 - Resultados da análise global bi-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da NF e AuNF em DMSO.

τ_1 (ns)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	τ_2 (ns)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
1.20	9.20	87.0	5.50	0.30	13.0	1.18

τ_1 (ns)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	τ_2 (ns)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
1.20	8.70	81.0	4.70	5.40	19.0	1.16

7.7

Absorção óptica e fluorescência estacionária da LEV e AuLEV

Abaixo temos os espectros de absorção da LEV medidos para a concentração de 8 μM em tampão universal na faixa de pH de 10.5 a 2.2.

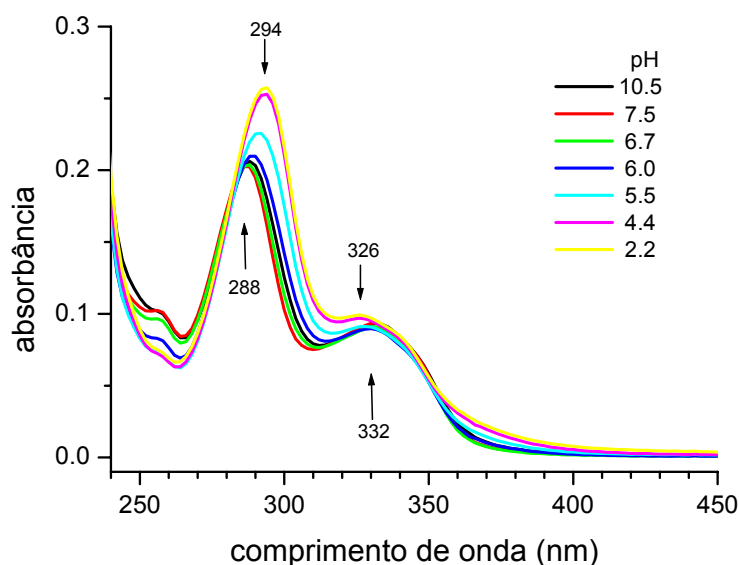


Figura 7.25 – Espectros de absorção da LEV (8 μM) na faixa de pH de 10.5 a 2.2.

Como podemos observar na Fig. 7.25, em 330 nm as diferenças entre as absorções da LEV em pH alcalino e pH ácido são muito pequenas, estando em torno de 5 a 10 %. Em toda a faixa alcalina o espectro não sofre modificação relevante, não mostrando a transição entre a espécie zwitteriônica e a aniônica, que ocorre em pH alcalino. O pico mais intenso, que na faixa alcalina localiza-se em 288 nm, sofre um deslocamento para o vermelho (294 nm, em pH < 4.4),

enquanto que o pico em 332 nm desloca-se levemente para o azul (326 nm em $\text{pH} < 4.5$). Essas variações espectrais estão relacionadas à protonação do grupo carboxílico, que ocorre na faixa ácida. Os espectros de absorção da AuLEV medidos nas mesmas condições foram similares aos da LEV. Abaixo temos os espectros de absorção da Lev e da AuLEV em tampão universal no valor de $\text{pH} = 7.4$ em diferentes concentrações.

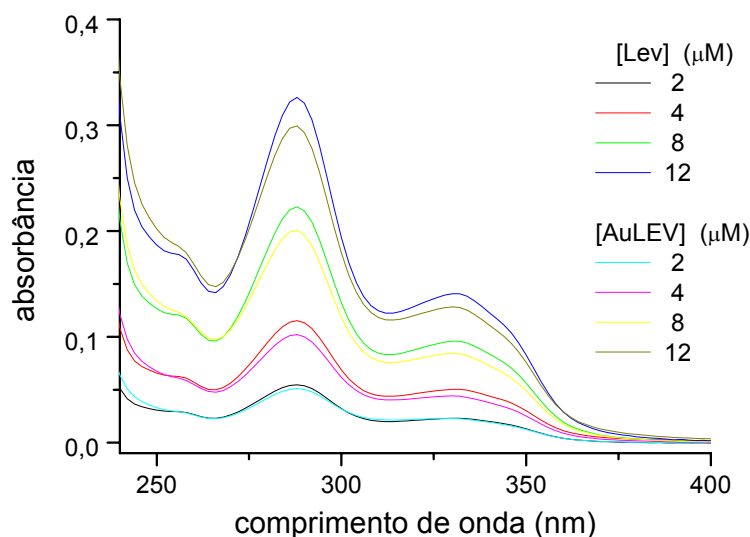


Figura 7.26 - Espectros de absorção da LEV e da AuLEV em diferentes concentrações.

Na Figs. 7.27 e 7.28, abaixo, temos os espectros de emissão de fluorescência da LEV medidos para a concentração de $8 \mu\text{M}$ em tampão universal ao longo das faixas alcalina de pH de 10.5 a 7.1 e ácida de 7.1 a 2.2 com excitação em 330 nm.

Como podemos observar, em $\text{pH} = 10.5$ a LEV apresenta um pico de fluorescência em 467 nm. Para valores altos de pH temos a espécie aniônica que apresenta baixa intensidade de fluorescência. À medida que o pH diminui a fluorescência aumenta muito, tendo sua intensidade máxima em $\text{pH} = 7.1$ (espécie zwitteriônica) com o pico em 448 nm. Na faixa alcalina há, portanto, uma transição entre as duas espécies que apresentam diferentes propriedades de fluorescência.

Na faixa de pH de 7.1 a 4.4 (Fig. 7.27) há outra transição. A LEV passa da espécie zwitteriônica com pico de fluorescência em 448 nm, para catiônica (protonada no grupo carboxílico e no amino da piperazina), com pico em 498 nm

de menor intensidade. Abaixo de pH 3.8 inicia-se uma nova diminuição de intensidade sem deslocamento do pico, sugerindo nova transição.

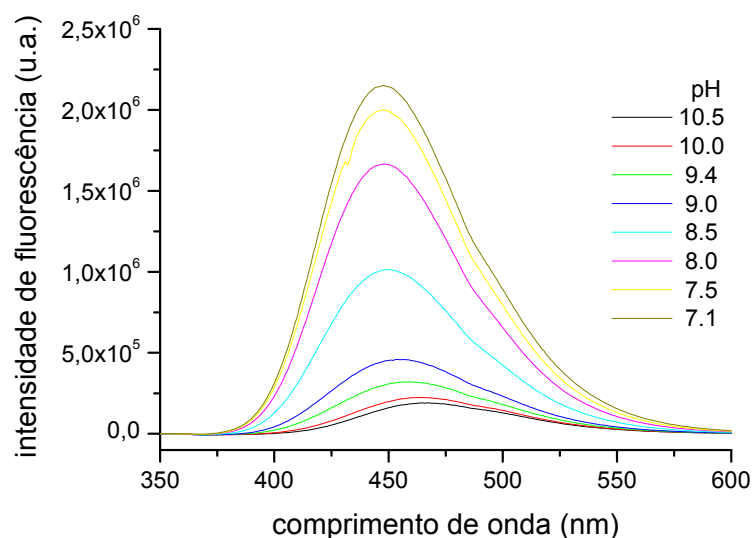


Figura 7.27 – Espectros de emissão de fluorescência da LEV (8 μ M) com excitação em 330 nm na faixa alcalina de pH.

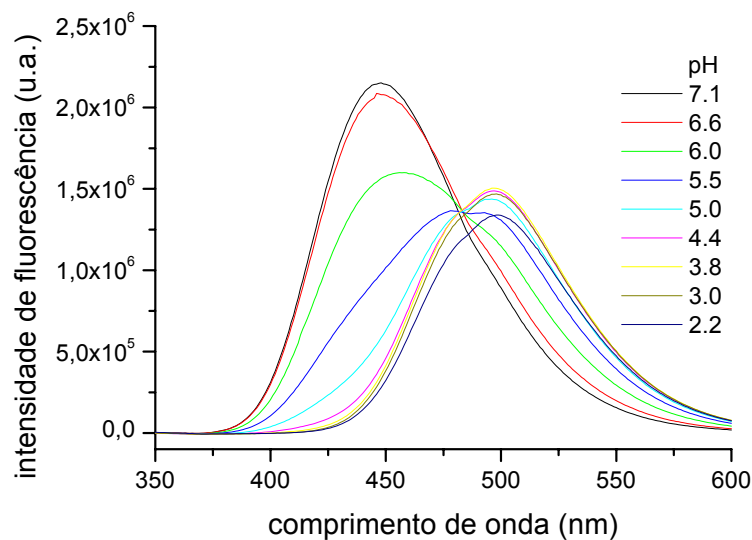


Figura 7.28 – Espectros de emissão de fluorescência da LEV (8 μ M) com excitação em 330 nm na faixa ácida de pH.

Nas Figs. 7.29 e 7.30, abaixo, temos os espectros de emissão de fluorescência da AuLEV medidos para a concentração de 8 μ M em tampão universal ao longo das faixas alcalina de pH de 10.5 a 7.1 e ácida de 7.1 a 2.2 com excitação em 330 nm. Como podemos observar, o comportamento é muito similar ao da LEV. Em pH = 10.5 a AuLEV também apresenta um pico de fluorescência

em 467 nm e, à medida que o pH diminui, a fluorescência aumenta, apresentando intensidade máxima em pH = 7.2 e deslocamento para o azul um pouco menor que o da LEV, para 452 nm.

Como na LEV, na faixa de pH de 7.1 a 4.5 (Fig. 7.28) há a transição entre as duas espécies fluorescentes. O pico em 452 nm da espécie zwitteriônica, em pH = 7.2, desloca-se um pouco menos para o vermelho, para 496 nm, da espécie catiônica, em pH = 4.5, com diminuição de intensidade fluorescência. Na faixa de pH de 4.5 a 2.0 há uma nova diminuição de intensidade com um pequeno deslocamento para o vermelho até 500 nm, indicando início da outra transição.

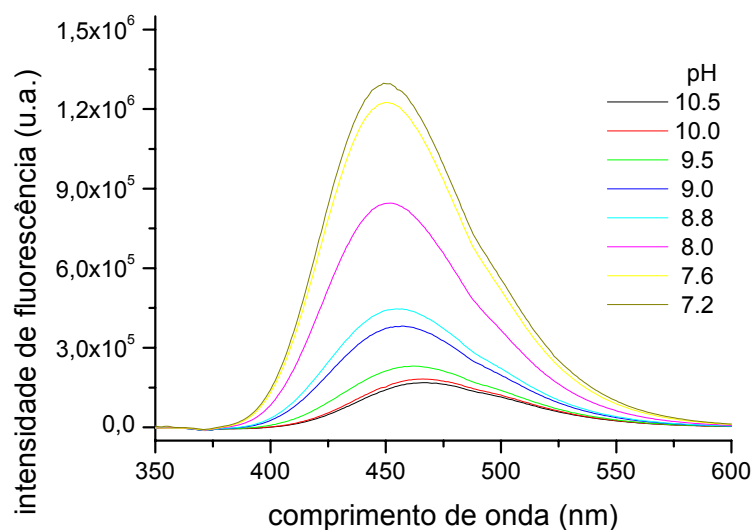


Figura 7.29 – Espectros de emissão de fluorescência da AuLEV na faixa alcalina de pH.

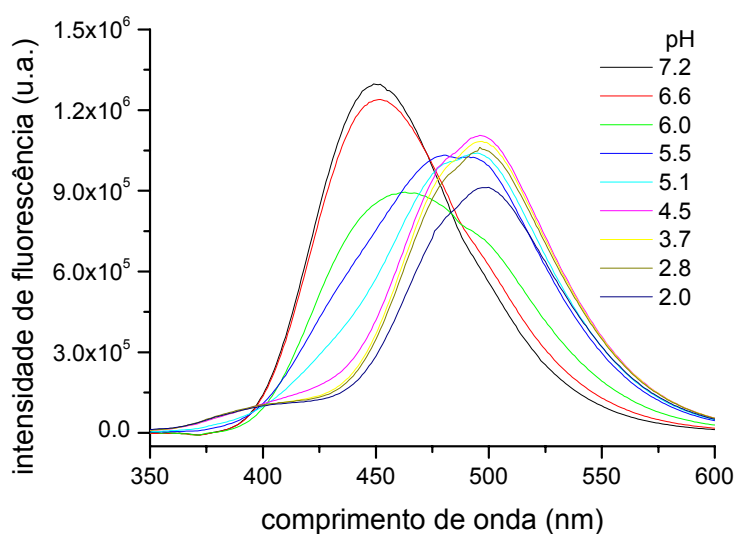


Figura 7.30 – Espectros de emissão de fluorescência da AuLEV na faixa ácida de pH.

As intensidades de fluorescência da LEV e da AuLEV em 448 nm e 498 nm foram colocadas em gráficos como função do pH na Fig. 7.31, onde os pontos experimentais foram ajustados com o uso da equação (6.14).

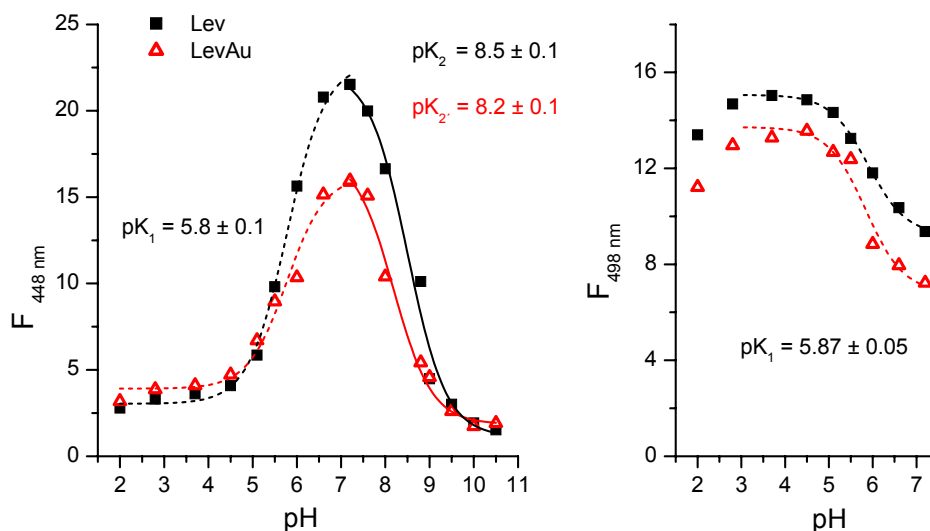


Figura 7.31 - Curvas de transição entre as espécies zwitteriônica - catiônica (pK_1) e zwitteriônica - aniônica (pK_2) da LEV, quadrados preenchidos, e da AuLEV, triângulos vazios, ao longo da faixa de pH de 2.0 a 10.5, com o uso da intensidade de fluorescência em 448 e 498 nm.

Os valores de pK_a obtidos para o grupo piperazina da LEV e da AuLEV foram 8.5 ± 0.1 e 8.2 ± 0.1 , respectivamente. Esse pK_a se refere à transição na faixa alcalina, da espécie zwitteriônica, LEV, (em pH neutro) para a espécie aniônica, LEV^- (em pH alcalino). A presença do ouro provoca uma pequena alteração no valor do pK_a e existe uma diferença evidente de rendimento quântico entre a Lev e a AuLev. Neste sentido, temos que pK_2^{LEV} e pK_2^{AuLEV} referem-se à transição entre duas espécies. Já para o grupo carboxílico, o valor de pK_a obtido foi igual para a Lev e AuLEV, ou seja, $pK_1^{Lev} = pK_1^{LevAu} = 5.8 \pm 0.1$ - referente à transição na faixa ácida das espécies Lev^+ e $AuLev^+$ para espécies com rendimentos quânticos maiores.

7.8

Fluorescência resolvida no tempo da LEV

Foram realizadas medidas de tempo de vida de fluorescência da LEV em tampão universal na faixa de pH de 2.0 a 10.5 com excitação em 330 nm e emissão em 448 nm. Na Fig. 7.32 temos duas curvas de decaimento de fluorescência, nos pHs 10.5 e 7.9, com seus respectivos ajustes.

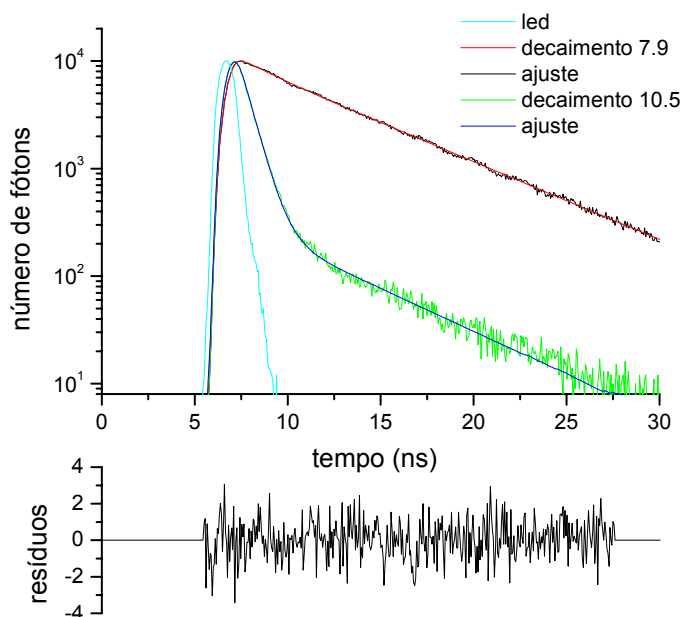


Figura 7.32 - Curvas de decaimento de fluorescência da LEV (8μM) nos valores de pH 10.5 e 7.9. Ajuste realizado com duas exponenciais. Excitação em 330 nm e emissão em 448 nm.

Em toda a faixa alcalina de *pH* de 10.5 a 7.9 as curvas de decaimento de fluorescência foram ajustadas com duas exponenciais a partir da análise individual. O valor do χ^2 mostrou-se alto, no valor de 1.6, devido ao ruído oscilatório que entra no detector através do cabo (ver resíduos, na Fig. 7.32). Os tempos de vida encontrados para as espécies fluorescentes foram $\tau_1 = 0.6$ ns (aniônica) e $\tau_2 = 5.4$ ns (zwiteriônica). A amplitude relativa, f_1 , varia de 88.6% a 5.3% quando o pH diminui, enquanto f_2 aumenta de 11.6% a 94.7%.

Tabela 7.8 - Resultados da análise global bi-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da LEV na faixa alcalina de pH.

pH	τ_1 (ns)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	τ_2 (ns)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
10.5	0.6	13.1	88.6	5.4	0.2	11.6	1.6
10.0	0.6	12.4	75.7	5.6	0.4	24.2	1.6
9.4	0.6	11.0	50.4	5.8	1.1	49.5	1.6
9.0	0.6	9.6	34.5	5.8	1.9	65.5	1.6
8.5	0.7	5.3	12.8	5.9	4.0	87.2	1.6
7.9	0.8	2.2	5.29	5.9	5.2	94.7	1.7

A Fig. 7.33, abaixo, apresenta a variação das amplitudes relativas f_1 e f_2 em função do pH. Os pontos experimentais foram ajustados com o uso da equação (6.14).

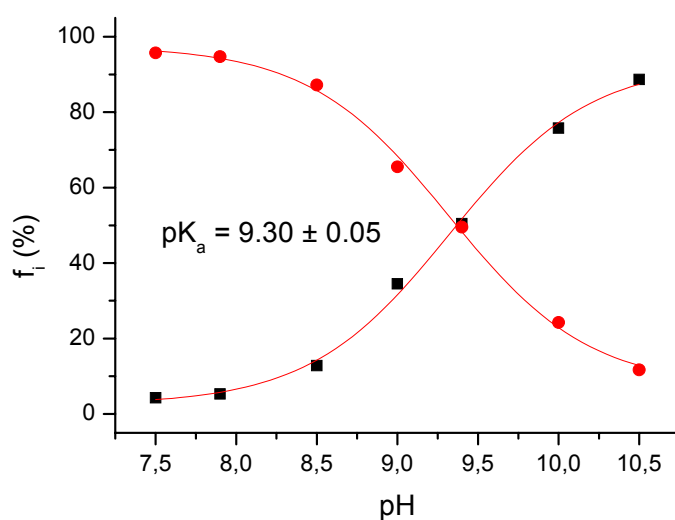


Figura 7.33 - Curvas de transição entre as espécies aniônica e zwitteriônica da LEV. Os ajustes foram realizados com as amplitudes relativas f_1 e f_2 .

Na Fig. 7.34, abaixo, temos duas curvas de decaimento de fluorescência da LEV, com excitação em 330 nm e emissão em 498 nm. nos pHs 7.5 e 4.5, com seus respectivos ajustes.

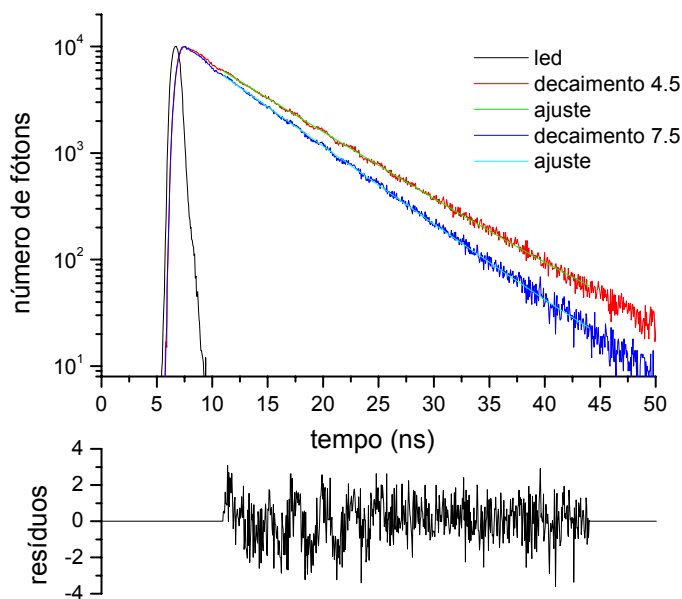


Figura 7.34 - Curvas de decaimento de fluorescência da LEV ($8\mu\text{M}$) nos valores de $\text{pH} = 4.5$ e 7.5 . Ajustes realizados com uma exponencial. Excitação em 330 nm e emissão em 498 nm .

Não foi possível encontrar valores coerentes para os tempos de vida de fluorescência e as amplitudes relativas na análise com duas exponenciais. Deste modo, em toda a faixa de pH de 7.5 a 2.9 as curvas de decaimento de fluorescência foram ajustadas com uma exponencial, omitindo-se a região de tempos da ordem da largura do pulso do LED. O valor do χ^2 mostrou-se alto, no valor de 1.5 , devido ao ruído oscilatório que entra no detector através do cabo (ver resíduos, na Fig. 7.33). Nesse caso, o tempo de vida variou, aumentando à medida que o pH diminui, apresentando valores na faixa de 5.8 a 7.2 ns .

Tabela 7.9 - Resultados da análise global mono-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da LEV na faixa ácida de pH. Omitiu-se a região de tempos curtos.

pH	τ_1 (ns)	χ^2
7.5	5.8	1.4
7.1	5.9	1.4
6.6	6.0	1.5
6.0	6.2	1.5
5.5	6.5	1.5
4.5	6.8	1.5
4.4	7.2	1.6
3.8	7.2	1.5
2.9	7.0	1.6

Na fig. 7.35, abaixo, temos o tempo de vida obtido a partir do ajuste monoexponencial em função do pH na faixa ácida com o uso da equação (6.14).

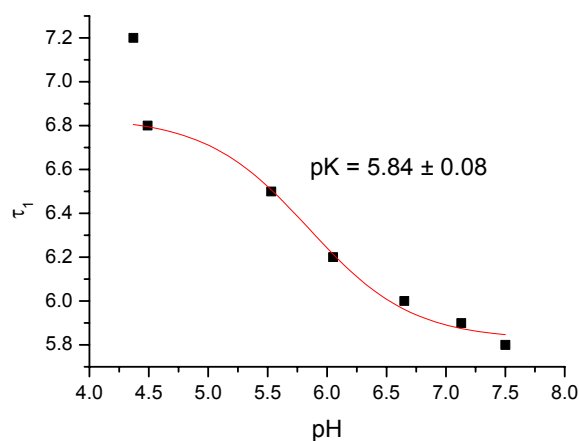


Figura 7.35 - Curva de transição entre as espécies catiônica e zwitteriônica da LEV. Os ajustes foram realizados com o uso do tempo de vida de fluorescência obtido a partir do ajuste monoexponencial.

7.9

Fluorescência resolvida no tempo da AuLEV

Foram realizadas medidas de tempo de vida de fluorescência da AuLEV em tampão universal na faixa de pH de 2.0 a 10.5 com excitação em 330 nm e emissão em 448 nm. Na Fig. 7.36 temos duas curvas de decaimento de fluorescência, nos pHs 10.5 e 8.2, com seus respectivos ajustes.

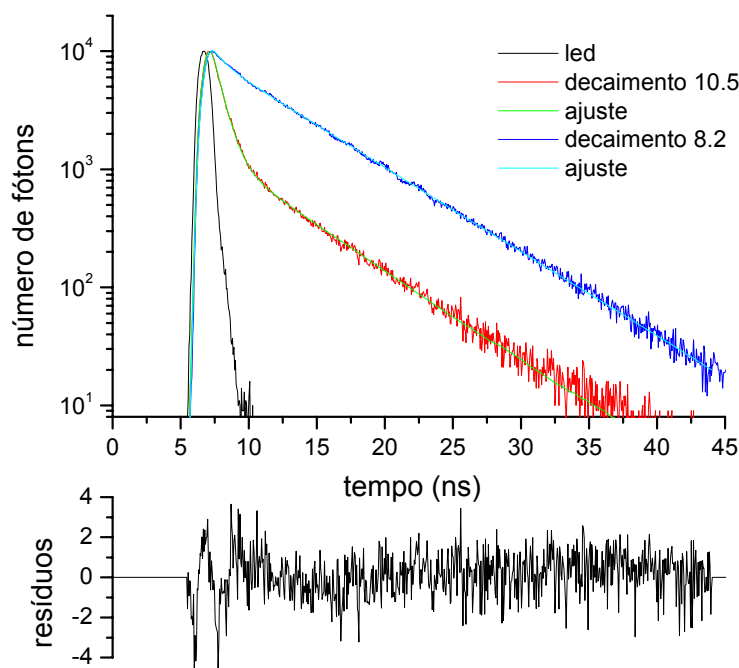


Figura 7.36 - Curvas de decaimento de fluorescência da AuLEV ($8\mu\text{M}$) nos valores de $\text{pH} = 10.5$ e 8.2 . Excitação em 330 nm e emissão em 448 nm .

Em toda a faixa alcalina de pH de 10.5 a 7.2 as curvas de decaimento de fluorescência foram ajustadas a partir da análise individual com o uso de duas exponenciais. O valor do χ^2 mostrou-se alto, no valor de 1.4 , devido ao ruído oscilatório que entra no detector através do cabo (ver resíduos, na Fig. 7.36). Os tempos de vida obtidos para as espécies fluorescentes foram $\tau_1 = 0.7\text{ ns}$ (zwiteriônica) e $\tau_2 = 5.7\text{ ns}$ (aniônica). A amplitude relativa, f_1 , varia de 63.2% a 7.0% quando o pH diminui, enquanto f_2 aumenta de 36.8% a 93.0% .

Tabela 7.10 - Resultados da análise individual bi-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da AuLEV na faixa alcalina de pH .

pH	τ_1 (ns)	α_1 (10^{-2})	f_1 (%)	τ_2 (ns)	α_2 (10^{-2})	f_2 (%)	χ^2
10.5	0.7	11.1	63.1	5.5	0.82	36.8	1.40
10.2	0.7	11.0	59.2	5.6	0.92	40.7	1.30
9.5	0.7	9.8	43.8	5.9	1.40	56.1	1.40
9.0	0.7	7.5	24.8	6.0	2.60	75.1	1.30
8.8	0.7	6.7	19.6	6.0	3.20	80.3	1.30
8.2	0.7	3.1	7.0	6.0	5.00	93.0	1.50
7.6	2.9	0.9	7.2	6.2	5.50	92.8	1.60
7.2	3.0	0.7	5.5	6.1	5.80	94.4	1.50

Na fig. 7.37 temos as amplitudes relativas f_1 e f_2 ajustadas como função do pH com o uso da equação (6.14).

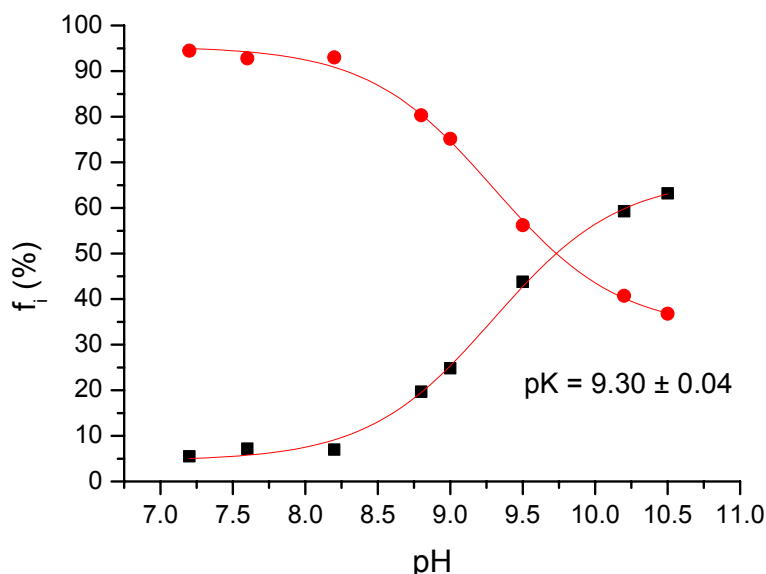


Figura 7.37 - Curvas de transição entre as espécies aniônica e zwitteriônica da AuLEV. Os ajustes foram realizados com as amplitudes relativas f_1 e f_2 .

Na Fig. 7.38 temos duas curvas de decaimento de fluorescência, com excitação em 330 nm e emissão em 498 nm, nos pHs 7.2 e 4.5, com seus respectivos ajustes.

Em toda a faixa ácida de pH de 7.5 a 2.9 as curvas de decaimento de fluorescência foram ajustadas com uma exponencial, omitindo-se a região de tempos da ordem da largura do pulso do LED. O valor do χ^2 mostrou-se alto, em torno do valor de 1.5, devido ao ruído oscilatório que entra no detector através do cabo (ver resíduos, na Fig. 7.38). Nesse caso, o tempo de vida variou, aumentando à medida que o pH diminuiu, apresentando valores na faixa de 6.1 a 6.4 ns. Nota-se que em relação à LEV houve uma menor variação no tempo de vida em função do pH.

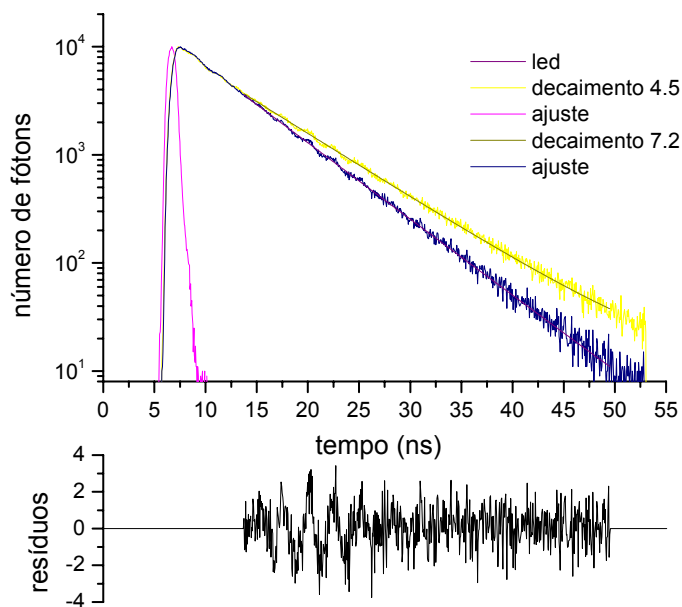


Figura 7.38 - Curvas de decaimento de fluorescência da AuLEV ($8\mu\text{M}$) valores de $\text{pH} = 4.5$ e 7.2 . Excitação em 330 nm e emissão em 498 nm .

Tabela 7.11 - Resultados da análise global mono-exponencial das curvas de decaimento de fluorescência da AuLEV na faixa ácida de pH . Omitiu-se a região de tempos curtos.

pH	\square (ns)	\square^{\square}
7.2	6.1	1.3
6.6	6.2	1.3
6.0	6.4	1.3
5.5	6.6	1.5
5.1	6.9	1.5
4.5	7.3	1.5
3.7	7.4	1.4
2.8	7.2	1.4
2.0	6.4	1.5

Na fig. 7.39, abaixo, temos o tempo de vida obtido a partir do ajuste monoexponencial em função do pH na faixa ácida com o uso da equação (6.14).

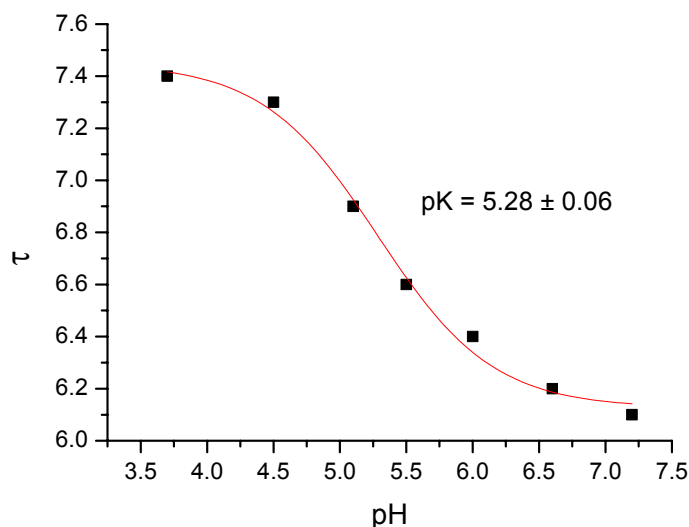


Figura 7.39 - Curva de transição entre as espécies catiônica e zwitteriônica da AuLEV. Os ajustes foram realizados com o uso do tempo de vida de fluorescência obtido a partir do ajuste monoexponencial.

Os valores de pK_a da faixa alcalina encontrados na fluorescência resolvida no tempo para LEV e seu complexo AuLEV foram iguais, ou seja, 9.30 ± 0.05 . Nota-se uma diferença em relação ao pK_a encontrado na fluorescência estacionária, onde $pK_2^{LEV} = 8.5 \pm 0.1$ e $pK_2^{AuLEV} = 8.2 \pm 0.1$. Substituindo a razão entre os rendimentos quânticos das espécies zwitteriônica (HQ^\pm) e aniônica (Q^-) da LEV e AuLEV na Eq. 4.27, encontra-se que os valores de ΔpK_a para a LEV e para AuLEV são iguais a 1.1 e 1.0, respectivamente. Essa razão entre os rendimentos quânticos das espécies foi determinada através das integrais dos espectros de fluorescência nos pH 10.5 e 7.1 das Figs. 7.27 e 7.29, na faixa de $440 \text{ nm} < \lambda < 456 \text{ nm}$.

Já para a faixa ácida, foi encontrado o mesmo valor de pK_a na fluorescência estacionária para a LEV e AuLEV: $pK_1^{LEV} = pK_1^{AuLEV} = 5.8 \pm 0.1$. Já os valores obtidos através da variação do tempo de vida de fluorescência foram diferentes: 5.8 ± 0.1 para a LEV e 5.3 ± 0.1 para a AuLEV. No entanto, essa diferença parece estar associada ao erro causado pela pequena variação no tempo de vida.