

ULISSES MOREIRA SILVEIRA ANDRADE

**MICROMANIPULAÇÃO DE PARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS
UTILIZANDO FEIXES DE BESSEL E ESTUDO DAS INTERAÇÕES DNA-LÍQUIDOS
IÔNICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Márcio Santos Rocha

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A553m
2022

Andrade, Ulisses Moreira Silveira, 1983-
Micromanipulação de partículas superparamagnéticas
utilizando feixes de Bessel e estudo das interações DNA-líquidos
iônicos / Ulisses Moreira Silveira Andrade. – Viçosa, MG, 2022.
1 tese eletrônica (85 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Márcio Santos Rocha.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Física, 2022.

Referências bibliográficas: f. 81-85.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.054>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Óptica física. 2. Feixes de laser. 3. Ondas
eletromagnéticas. 4. Dinâmica molecular. 5. Estrutura molecular.
6. Íons - Estrutura. 7. DNA. I. Rocha, Márcio Santos, 1978-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Física.
Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

CDD 22. ed. 535.2

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

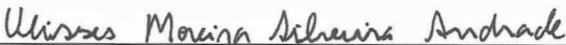
ULISSES MOREIRA SILVEIRA ANDRADE

**MICROMANIPULAÇÃO DE PARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS
UTILIZANDO FEIXES DE BESSEL E ESTUDO DAS INTERAÇÕES DNA-
LÍQUIDOS IÔNICOS**

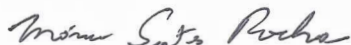
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 24 de junho de 2022.

Assentimento:



Ulisses Moreira Silveira Andrade
Autor



Márcio Santos Rocha
Orientador

Para Helena....

AGRADECIMENTOS

Ingressei no doutorado na Universidade Federal de Viçosa, em 2017 e agora, em 2022, finalizo esse projeto. Passei por muitas dificuldades, que são inerentes ao trabalho. Também fomos afetados por uma pandemia mundial que esteve presente nos dois últimos anos. Para complementar, me tornei Pai durante a pandemia, e com certeza, sem o apoio de muitas pessoas não seria possível finalizar este projeto. Aproveito esse espaço para agradecer à todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse defender o doutorado.

Primeiramente agradeço as meus pais, Dagmar e Messias, por todos ensinamentos e por tudo que fizeram e ainda fazem por mim. Não medindo esforços para que eu pudesse ter uma boa educação e dedico o doutorado à vocês. Agradeço às minhas irmãs, Adriana e Marina, pelo incentivo e torcida durante todos esses anos.

Agradeço à minha esposa Patrícia pelo companheirismo, paciência e amor durante este trajeto. Agradeço também pelo presente maravilhoso que me deu, nossa amada filha Helena. Aprendemos muito com o nascimento e crescimento da nossa filha.

Agradeço também ao meu sogro Ivo e à minha cunhada Simone, que nos deram um suporte essencial, principalmente durante a pandemia.

Agradeço ao meu orientador Márcio, por todos os ensinamentos durante o doutorado. É muito prazeroso e entusiasmante trabalhar com alguém que se dedica à ciência.

Agradeço aos meus colegas de laboratório: Leandro, Josi, José, Ethe, Paulo, Aloísio, Rayane e Tiago. Em particular, ao Aloísio, que colaborou com as medidas da pinça óptica holográfica e ao Paulo, que colaborou com as medidas de pinça óptica do trabalho com os líquidos iônicos. À Rayane e Tiago pelas excelentes discussões e conselhos sobre os projetos.

Agradeço aos amigos da salinha: Hamilton, Juliano, Bia, Kairon e Janaisa pelos momentos do café. Agradeço aos que já não estão mais presentes no departamento: Sylvestre, Oscar, Milton, Emerson e Marlon. Os momentos de convivência foram fundamentais para tornar o ambiente mais descontraído.

Agradeço à todos os professores que contribuíram para a minha formação durante as disciplinas.

Agradeço aos Professores Oscar e Ubirajara, ambos da UFMG, pelo empréstimo do modulador espacial de luz.

Agradeço ao Professor Luis Henrique e ao Alan Stampini, pela colaboração no trabalho sobre a interação DNA-Líquido iônico.

Agradeço ao CEFET-MG pela licença concedida para o doutorado.

Agradeço à todas agências de fomento: FAPEMIG, CNPq e CAPES.

RESUMO

ANDRADE, Ulisses Moreira Silveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Micromanipulação de partículas superparamagnéticas utilizando feixes de Bessel e Estudo das interações DNA-Líquidos Iônicos.** Orientador: Márcio Santos Rocha.

Este trabalho está dividido em duas partes. Na primeira, propomos uma pinça óptica que utiliza um feixe de Bessel e é capaz de capturar de forma estável microesferas superparamagnéticas. A constante de força é praticamente independente do raio do feixe de Bessel e da altura da microesfera (distância medida em relação à lamínula), indicando que as microesferas podem ser capturadas com alta precisão dentro de uma ampla faixa de valores desses parâmetros. Por outro lado, a constante de força exibe o aumento linear esperado com a potência do laser, apesar do coeficiente de absorção das esferas superparamagnéticas não ser desprezível. Um modelo de óptica geométrica que considera a aberração esférica e a absorção de luz pelas microesferas foi utilizado para prever a constante de força, apresentando excelente concordância com os dados experimentais. Os resultados aqui apresentados avançam no campo da manipulação de aprisionamento óptico de partículas magnéticas absorventes, e aplicações futuras envolvem, por exemplo, o projeto de novas pinças híbridas optomagnéticas. Na segunda parte, realizamos uma caracterização robusta das interações moleculares entre a molécula de DNA e dois líquidos iônicos à base de imidazólio (LIs): cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([bmim]Cl) e 1-octil-3- cloreto de metilimidazólio ([omim]Cl), usando abordagens de molécula única (pinças ópticas e magnéticas) e técnicas de múltiplas moléculas (calorimetria isotérmica de titulação e condutometria). As pinças ópticas e magnéticas permitiram obter as alterações nas propriedades mecânicas dos complexos de DNA formados com os dois LIs, bem como os parâmetros físico-químicos (de ligação) relevantes da interação. Apesar da fraca interação medida entre o DNA e os LIs, identificamos uma transição no regime de elasticidade do polímero dos complexos formados, o que resulta em uma compactação relevante do DNA para altas concentrações dos líquidos iônicos. Além disso, a calorimetria de titulação isotérmica e a condutometria complementaram os estudos de moléculas únicas, fornecendo uma caracterização termodinâmica completa das interações e permitindo a identificação das forças motrizes mais relevantes em várias faixas de concentração dos LIs. Com base nos resultados obtidos com todas as técnicas empregadas, propomos um modelo para os esquemas de ligação envolvendo DNA e [bmim]Cl e [omim]Cl.

Palavras-chave: Pinça óptica holográfica. Pinça magnética. moléculas únicas. DNA.

ABSTRACT

ANDRADE, Ulisses Moreira Silveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2022. **Micromanipulation of superparamagnetic particles using Bessel beams and Study of the DNA-Ionic Liquid interactions.** Adviser: Márcio Santos Rocha.

This work is divided into two parts. In the first we propose a Bessel beam optical tweezers setup capable to stably trap superparamagnetic beads. The trap stiffness measured is practically independent on the radius of the Bessel beam and on the bead height (distance from the coverlip of the sample chamber), indicating that the beads can be trapped with high accuracy within a wide range of such parameters. On the other hand, the trap stiffness exhibits the expected linear increase with the laser power, despite the nonnegligible absorption coefficient of the superparamagnetic beads. A geometrical optics model that considers spherical aberration and light absorption by the beads was used to predict the trap stiffness, presenting an excellent agreement with the experimental data. The results presented here advance in the field of optical trapping manipulation of absorbing magnetic particles, and future applications involve, for example, the design of new hybrid optomagnetic tweezers. In the second part, we performed a robust characterization of the molecular interactions between the DNA molecule and two imidazolium-based ionic liquids (ILs): 1-Butyl-3-methylimidazolium chloride ([bmim]Cl) and 1-Octyl-3-methylimidazolium chloride ([omim]Cl), using single molecule approaches (optical and magnetic tweezers) and bulk techniques (isothermal titration calorimetry and conductivity measurements). Optical and magnetic tweezers allowed us to obtain the changes on the mechanical properties of the DNA complexes formed with both ILs, as well as the relevant physicochemical (binding) parameters of the interaction. Despite the weak binding measured between DNA and the two ILs, we identify a transition on the regime of polymer elasticity of the complexes formed, which results in a relevant DNA compaction for high IL concentrations. In addition, isothermal titration calorimetry and conductivity complemented the single molecule investigation, giving a complete thermodynamic characterization of the interactions and allowing the identification of the most relevant driving forces at various different concentration ranges of the ILs. Based on the results obtained with all the employed techniques, we propose a model for the binding schemes involving DNA and both [bmim]Cl and [omim]Cl.

Keywords: Holographic optical tweezers. Magnetic tweezers. Single molecule. DNA.

LISTA DE FIGURAS

2.1	Efeitos dos feixes refletidos e refratados na microesfera	15
2.2	Efeito dos raios refratados na microesfera com seu centro localizado à direita e abaixo do ponto focal	16
2.3	Desenho esquemático da interação do laser com a microesfera com coeficiente de absorção não desprezível	17
2.4	Esboço de como é o funcionamento de um modulador espacial de luz	19
2.5	Ilustração da interação entre a microesfera e o campo magnético	20
2.6	Ilustração do deslocamento da microesfera em torno da sua posição de equilíbrio	21
2.7	Esboço simplificado de um calorímetro	22
2.8	Esboço simplificado de um condutímetro	23
2.9	Ilustração da absorção de luz pelo material	24
3.1	Estrutura da molécula de DNA	25
3.2	Formas da molécula de DNA	26
4.1	Classificação dos polímeros baseada no tipo de cadeia	27
4.2	Ilustração de um polímero de cadeia ideal mostrando algumas grandezas fundamentais	29
4.3	Cadeia ideal submetida à uma força \vec{f}	32
4.4	Cadeia ideal no espaço discreto e contínuo	35
5.1	Exemplos de cátions e ânions que compõe a estrutura química de uma molécula de líquido iônico	38
6.1	Montagem experimental utilizada nos experimentos de pinça óptica holográfica	40
6.2	Porta-amostra utilizado nos experimentos	41
6.3	Caracterização do feixe de Bessel	44
6.4	Gráfico da potência do laser no foco em função da potência do laser na entrada da objetiva para um feixe com Bessel	45
6.5	Gráfico da absorbância em função do comprimento de onda e da absorbância, para $\lambda = 1064$ nm, em função da concentração das microesferas	45
6.6	Forças ópticas transversais obtidas numericamente para os casos: com e sem absorção	47

6.7	Gráfico da posição em função da tempo da microesfera e seu respectivo histograma	47
6.8	Constante de força (k) em função do raio do feixe de Bessel (ρ_B)	48
6.9	Constante de força (k) em função da potência do laser no foco	49
6.10	Constante de força (k) em função da altura de pinçamento da microesfera superparamagnética	50
7.1	Configuração ideal da amostra de DNA para os experimentos de pinça óptica e pinça magnética.	53
7.2	Estrutura química dos LIs	54
7.3	Montagem experimental utilizada nos experimentos de pinça óptica.	54
7.4	Estiramento da molécula de DNA	55
7.5	Montagem experimental da pinça magnética	57
7.6	Calibração da altura da microesfera superparamagnética	57
7.7	Imagem do padrão de difração da microesfera superparamagnética	58
7.8	Perfil do contraste do padrão de difração da microesfera superparamagnética	58
7.9	Contraste do centro da microesfera	59
7.10	Painel frontal do LabView para o experimento de pinça magnética	60
7.11	Curvas típicas de força-extensão (FECs) obtidas para diferentes concentrações totais de [bmim]Cl	61
7.12	Curvas típicas de força-extensão (FECs) obtidas para diferentes concentrações totais de [omim]Cl	63
7.13	Comprimento de persistência em função da concentração total dos líquidos iônicos	64
7.14	Comprimento de contorno normalizado em função da concentração total dos líquidos iônicos	66
7.15	Raio de giro em função da concentração total dos líquidos iônicos	66
7.16	Extensão do DNA em função do tempo para o complexo DNA-[bmim]Cl	67
7.17	Extensão do DNA em função do tempo para o complexo DNA-[omim]Cl	68
7.18	Resultados da calorimetria isotérmica de titulação para o [bmim]Cl	69
7.19	Condutividade elétrica em função da concentração total de [bmim]Cl	70
7.20	Resultados da calorimetria isotérmica de titulação para o [omim]Cl	71
7.21	Condutividade elétrica em função da concentração total de [omim]Cl	72
7.22	Ilustração do mecanismo molecular de interação entre o [bmim]Cl e o DNA	74
7.23	Ilustração do mecanismo molecular de interação entre o [omim]Cl e o DNA	75

LISTA DE TABELAS

- 7.1 Parâmetros físico-químicos obtidos a partir dos dados de pinça óptica para as interações do DNA com os dois LIs utilizados: [bmim]Cl e [omim]Cl. 65

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2	Técnicas experimentais	14
2.1	Pinça óptica	14
2.1.1	Pinça óptica holográfica	18
2.2	Pinça magnética	19
2.3	Calorimetria isotérmica de titulação	21
2.4	Conductometria	22
2.5	Espectroscopia de absorção	24
3	DNA	25
4	Polímeros	27
4.1	Classificações	27
4.2	Definições gerais	28
4.3	Cadeias ideais flexíveis	30
4.3.1	Modelo da cadeia livremente articulada (CLA)	30
4.3.2	Modelo gaussiano	33
4.4	Cadeias ideais semi-flexíveis	34
4.4.1	Modelo Worm-like chain	34
5	Líquidos iônicos	37
6	Pinça óptica holográfica aplicada na manipulação de microesferas superparamagnéticas	39
6.1	Motivação	39
6.2	Procedimento experimental e metodologia	40
6.2.1	Montagem experimental	40
6.2.2	Caracterização do perfil de intensidade do feixe de Bessel	41
6.2.3	Medida da transmitância da objetiva	41
6.2.4	Medida do coeficiente de absorção das microesferas superparamagnéticas	42
6.2.5	Cálculo da constante de força da pinça óptica holográfica	42
6.3	Resultados e discussão	43
6.4	Conclusão	50
7	Interação DNA-líquido iônico	52
7.1	Motivação	52
7.2	Procedimento experimental e metodologia	52
7.2.1	Preparação da amostra de DNA	52
7.2.2	Pinça óptica	54
7.2.2.1	Montagem experimental	54

7.2.2.2	Determinação da curva de força por extensão	55
7.2.3	Pinça magnética	56
7.2.3.1	Montagem experimental	56
7.2.3.2	Determinação da extensão da molécula de DNA	57
7.2.3.3	Determinação da força magnética	59
7.2.4	Calorimetria isotérmica de titulação	60
7.2.5	Condutometria	61
7.3	Resultados	61
7.3.1	Pinça óptica	61
7.3.2	Pinça magnética	67
7.3.3	Calorimetria isotérmica de titulação e condutometria	68
7.4	Discussão	73
7.5	Conclusão	76
8	Conclusões finais e perspectivas	77
A	Artigos publicados e submetidos	79
A.1	Artigos relacionados à tese	79
A.1.1	Revista <i>Applied Optics</i>	79
A.1.2	Revista <i>International Journal of Biological Macromolecules</i>	79
A.2	Artigos relacionados a outros projetos	79
A.2.1	Revista <i>Optics Letters</i>	79
A.2.2	Revista <i>Journal of the Brazilian Chemical Society</i>	79
A.2.3	Revista <i>Physical Review E</i>	80
	Referências Bibliográficas	81

Capítulo 1

Introdução

O fenômeno de aprisionamento de partículas microscópicas utilizando um feixe de luz foi observado no ano de 1969 por Arthur Ashkin e colaboradores [1]. Em trabalhos posteriores, particularmente no ano de 1986, eles observaram que um feixe de luz fortemente focalizado era capaz de aprisionar partículas dielétricas micrométricas [2]. Desde então a técnica que ficou conhecida como pinça óptica tem sido utilizada em diversas áreas [3], tais como biologia, físico-química, física da matéria mole, etc. Com a técnica é possível manipular objetos da ordem de dezenas de nanômetros até centenas de micrômetros, aplicando forças da ordem de fentonewtons até centenas de piconewtons.

Estudos posteriores mostraram que é possível obter pinças ópticas múltiplas a partir de um único feixe, para isso é preciso modificar a frente de onda da luz [4]. Tal modificação pode ser realizada, por exemplo, através de hologramas gerados por computadores, conhecidos como CGH (Computer Generated Hologram). A técnica que utiliza esses hologramas é conhecida como pinça óptica holográfica, HOT (Holographic optical tweezers) [5]. Esses hologramas são projetados num visor de cristal líquido, conhecido como modulador espacial de luz, SLM (Spatial light modulator), que é um dispositivo composto por camadas de cristal líquido. A orientação das moléculas do cristal em cada camada, pode ser modificada quando um holograma é nele projetado. Uma luz refletida por um SLM tem a sua fase modificada, sendo possível: obter feixes múltiplos a partir de um único feixe, mudar o padrão do feixe, introduzir momento angular, dentre outras aplicações.

Trabalhos recentes têm aprofundado o estudo do pinçamento de novos materiais tais como partículas superparamagnéticas [6] e isolantes topológicos [7]. Novos efeitos têm sido observados, demonstrando ser uma área de enorme potencial para novos estudos e novas aplicações.

Outra técnica utilizada no estudo de moléculas únicas é conhecida como pinça magnética [8]. Assim como na pinça óptica, obtemos forças da ordem de femtonewtons até centenas de piconewtons. Além disso, podemos exercer torques sobre as moléculas de DNA, estudar dinâmica das interações da molécula de DNA com ligantes e realizar experimentos aplicando uma força constante. Uma das vantagens da pinça magnética em relação à pinça óptica é que sua implementação é mais barata, pois não é necessário um laser, que em geral, é um equipamento de custo elevado. Outra vantagem de se utilizar a pinça magnética, por exemplo, em experimentos com amostras biológicas, é que estamos livres do aquecimento do laser, o que exclui a possibilidade de degradação das amostras devido à radiação. O princípio de funcionamento da pinça magnética se baseia na interação magnética entre as microesferas paramagnéticas, utilizadas

nos experimentos, e um gradiente de campo magnético criado por um conjunto de ímãs.

Na primeira parte deste trabalho apresentaremos nossos resultados obtidos utilizando uma pinça óptica holográfica, que foi implementada por nós em nosso laboratório. Neste estudo, mostramos que é possível manipular microesferas superparamagnéticas utilizando um feixe de Bessel. Estudamos como a constante de força da pinça varia em função de três parâmetros: altura do pinçamento, potência do laser no foco e raio do feixe de Bessel.

Na segunda parte deste trabalho, aplicamos as técnicas de pinça óptica e magnética para caracterizar a interação da molécula de DNA com dois líquidos iônicos à base de imidazólio: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([bmim]Cl) e cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio ([omim]Cl). A técnica de pinça magnética também foi implementada por nós durante este trabalho. Realizamos também medidas com técnicas de análises de múltiplas moléculas (calorimetria isotérmica de titulação e de condutometria), a fim de complementar os resultados obtidos com as técnicas de moléculas únicas. Isso nos permitiu caracterizar a termodinâmica das interações, identificando as forças motrizes mais relevantes na interação.

Em resumo, no Capítulo 2, apresentamos todas as técnicas experimentais utilizadas nesta trabalho, onde discutimos resumidamente a teoria que fundamenta cada uma delas.

No Capítulo 3, discutimos a importância da molécula de DNA, apresentamos sua estrutura e as formas possíveis de se encontrar a molécula.

No Capítulo 4, tratamos dos modelos de polímeros utilizados na análise dos experimentos com a molécula de DNA. Mostramos a ideia básica de cada modelo, assim como as principais equações relacionadas a cada um deles.

No Capítulo 5, apresentamos alguns aspectos sobre a estrutura e as propriedades dos líquidos iônicos.

No Capítulo 6, discutimos toda a metodologia empregada e apresentamos os resultados obtidos utilizando a pinça óptica holográfica.

No Capítulo 7, apresentamos a metodologia empregada e os resultados do trabalho da interação do DNA com os líquidos iônicos.

Finalmente, no Capítulo 8, apresentaremos as conclusões finais e perspectivas do nosso trabalho.

Capítulo 2

Técnicas experimentais

Neste capítulo trataremos das técnicas experimentais utilizadas em nossos experimentos. As medidas relacionadas às técnicas de pinça óptica, pinça magnética e espectroscopia de absorção foram realizadas por nós, no Laboratório de Física Biológica (LFB), sediado no Departamento de Física da Universidade Federal de Viçosa (UFV). As medidas de calorimetria isotérmica de titulação e condutometria foram realizadas em parceria com o Grupo de Química Verde Coloidal e Macromolecular (QUIVECOM), do Departamento de Química da UFV.

2.1 Pinça óptica

Em 1873, o físico James Clerck Maxwell, em sua teoria sobre o eletromagnetismo, previu que uma onda luminosa intensa era capaz de exercer forças sobre objetos, tal força é denominada pressão de radiação e sua magnitude depende principalmente da potência da luz que incide sobre o objeto. Para se ter uma ideia, para ondas eletromagnéticas com potência na ordem de miliwatts, mW, a força observada é da ordem de dezenas de piconewtons, pN. Como a magnitude da força é muito pequena seus efeitos são difíceis de serem observados. Somente após a descoberta do laser, em 1960, criou-se a possibilidade de manipular objetos microscópios com a luz.

Em 1969, Ashkin e colaboradores [1] realizaram um experimento no qual mediram a velocidade de microesferas dielétricas, em um meio aquoso, sob a ação de um feixe de luz levemente focalizado. As velocidades medidas eram próximas das estimadas teoricamente. Nestes experimentos observaram também que as microesferas se deslocavam para a região do feixe que apresentava maior intensidade. Em experimentos posteriores Ashkin e colaboradores demonstraram que microesferas dielétricas poderiam ser aprisionadas em um único feixe de luz fortemente focalizado [2], tal fenômeno deu origem ao que conhecemos hoje como pinça óptica. Devido à esses estudos, Ashkin foi agraciado com metade do prêmio nobel de física de 2018. A outra metade foi dividida entre Gérard Mourou e Donna Strickland pela geração de pulsos laser ultra-curtos de alta intensidade. Desde então a técnica vem sendo aplicada em vários campos da física [3], biologia [9, 10], nanotecnologia [11], etc.

Em geral, a teoria de pinças ópticas é explicada em dois regimes distintos: o regime Rayleigh e o regime da óptica geométrica [12]. No primeiro, o raio das partículas (a) é muito menor que o comprimento de onda da luz (λ) e as partículas são consideradas como um dipolo indu-

zido num campo elétrico aproximadamente uniforme. No regime da óptica geométrica, o raio da partícula é muito maior que o comprimento da luz incidente ($\lambda \ll a$) e o pinçamento é explicado pela competição entre duas forças ópticas, a força de gradiente e a pressão de radiação. Trataremos aqui apenas do regime da óptica geométrica, onde o raio das microesferas (a) é muito maior que o comprimento de onda da luz incidente (λ).

Qualitativamente o pinçamento pode ser entendido analisando os raios A e B que incidem sobre uma microesfera, como pode ser visto na Figura 2.1(a). Devido à reflexão, os raios refletidos A' e B' exercem uma força $\vec{F}_{A'}$ e $\vec{F}_{B'}$ sobre a microesfera, respectivamente. Observe que a força resultante, \vec{F}_s , aponta na direção de propagação do feixe incidente, e é conhecida como pressão de radiação. A refração dos raios A e B dá origem às forças \vec{F}_A e \vec{F}_B , respectivamente. A força resultante, \vec{F}_g , conhecida como força de gradiente, aponta para a posição focal, isto é, região de maior intensidade. Os raios A e B possuem a mesma intensidade pois estão em posições simétricas em relação ao eixo óptico. Na Figura 2.1(b) é mostrado a direção da força de gradiente para o caso em que o centro da microesfera se encontra abaixo do foco do laser. As forças discutidas anteriormente têm origem no fato de que a luz, ao sofrer reflexão ou refração, tem seu momento linear alterado, e como o momento linear total do sistema luz-microesfera se conserva, surge uma força na microesfera.

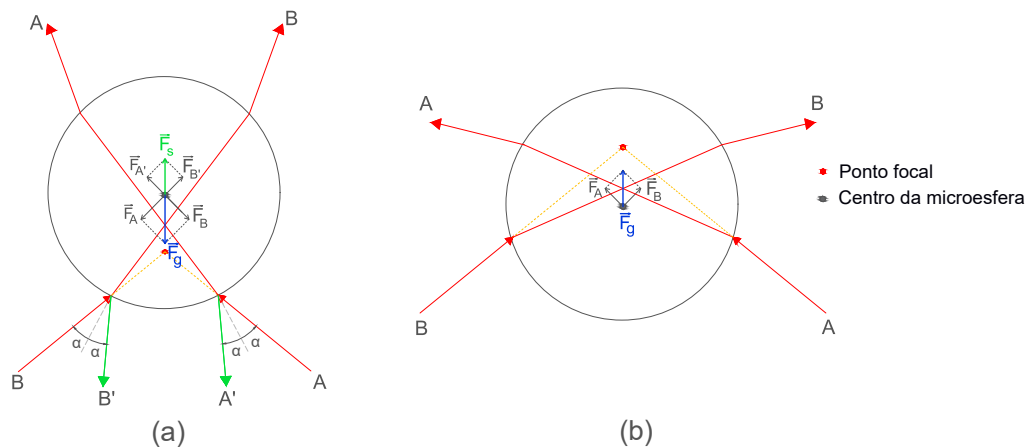


Figura 2.1: Figura ilustrativa mostrando o efeito da reflexão e refração dos feixes na microesfera. Em (a) o centro da microesfera se encontra acima do foco do feixe. A reflexão dos feixes A' e B', dá origem à força conhecida como pressão de radiação, \vec{F}_s , e a refração dos feixes A e B dá origem à força de gradiente \vec{F}_g . Em (b) o centro da microesfera se encontra abaixo do ponto focal, e é mostrada apenas a direção da força de gradiente, \vec{F}_g .

Já na Figura 2.2, o centro da microesfera se encontra deslocado do eixo óptico e os raios não possuem a mesma intensidade, pois assumimos que o laser possui perfil gaussiano. O módulo da força \vec{F}_A será maior do que o da força \vec{F}_B , então a força resultante deslocará a microesfera para a região do foco do feixe. Em resumo, o pinçamento óptico é alcançado devido à competição entre a força de gradiente, que tem origem na refração dos raios, e a pressão de radiação, oriunda da reflexão dos mesmos.

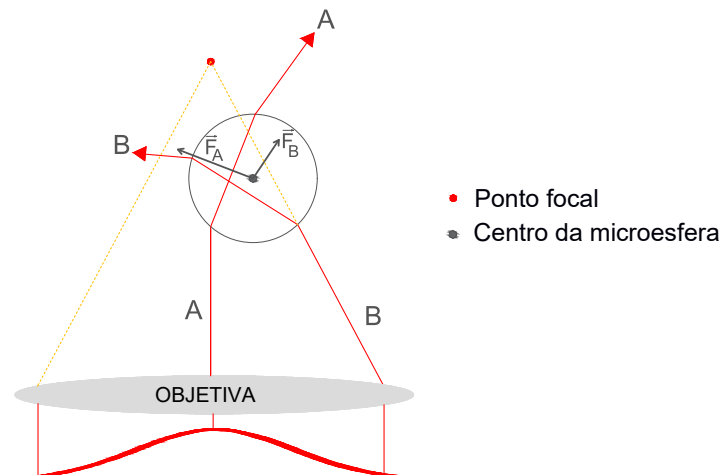


Figura 2.2: Figura ilustrativa mostrando o efeito dos feixes refratados na microesfera que está situada à direita e abaixo do ponto focal. Observe que, neste caso, o feixe possui perfil gaussiano.

Usamos o modelo de óptica geométrica para prever o comportamento da força óptica e, conseqüentemente, da constante de força, como função dos parâmetros de interesse, tais como: potência e perfil de intensidade do feixe, raio das microesferas, altura do pinçamento óptico e coeficiente de absorção das partículas. Esse tratamento está muito bem discutido na literatura e apresentaremos aqui os passos mais importantes para se chegar ao resultado final.

O cálculo é baseado no modelo original de Ashkin para o força radiativa em partículas esféricas [12], generalizado para incluir aberração esférica [13] e absorção de luz pelas partículas (considerado através do coeficiente de absorção das partículas, ε) [14]. Nesses trabalhos a força, no regime de óptica geométrica, foi calculada usando um laser com perfil gaussiano. Em parte deste trabalho utilizamos um feixe de Bessel e no Capítulo 6, apresentaremos o resultado da teoria adaptada para as características desse feixe.

A Figura 2.3 ilustra um raio de luz interagindo com uma microesfera, com coeficiente de absorção ε . Observe que além da reflexão e refração que ocorre na interface meio-microesfera, o raio de luz sofre múltiplas reflexões no interior da microesfera e múltiplas refrações na interface microesfera-meio. Além disso, o raio sofre uma atenuação ao se propagar no interior da mesma.

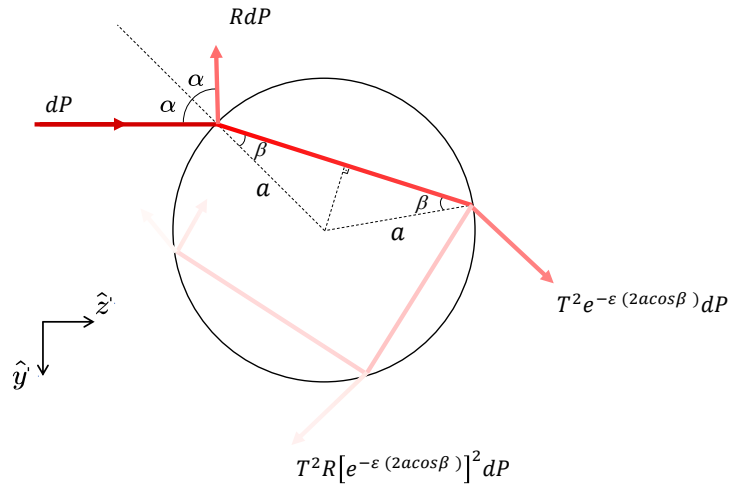


Figura 2.3: Desenho esquemático da interação do laser com a microesfera com coeficiente de absorção não desprezível. Consideramos as múltiplas reflexões e refrações do feixe e também a absorção do laser pela microesfera. Aqui α é o ângulo de incidência, β é o ângulo de refração, a é o raio da microesfera, ϵ é o coeficiente de absorção da microesfera, R é a refletividade e T é a transmissividade da interface microesfera-meio. Figura adaptada da referência [14].

O elemento diferencial da força exercida por um único raio é dada por [12]

$$d\vec{F} = \frac{n_m}{c} [(dF_{esp})\hat{z}' + (dF_g)\hat{y}'] dP, \quad (2.1)$$

onde n_m é o índice de refração do meio, c é a velocidade da luz no vácuo, y' , z' são os vetores unitários definidos na Figura 2.3 e dP corresponde ao elemento diferencial de potência do raio. dF_{esp} é o elemento diferencial de força associado à força de espalhamento ($dF_{esp} = Re(Q_t)$) e dF_g é o elemento diferencial de força devido à força de gradiente ($dF_g = Im(Q_t)$). O termo Q_t é dado por

$$Q_t = 1 + R \exp(2i\alpha) - T^2 \frac{\exp[2i(\alpha - \beta)]}{\exp(2a\epsilon \cos\beta) + R \exp(-2i\alpha)}, \quad (2.2)$$

onde R e T são o coeficiente de reflexão e transmissão na interface meio-microesfera, respectivamente, α e β são os ângulos de incidência e refração do raio na superfície da microesfera, respectivamente e a é o raio das microesferas. As expressões para R e T são calculadas tomando médias sobre as duas polarizações do laser, TE e TM, e são dados por

$$R(\alpha, \beta) = \frac{1}{2} \left[\frac{\text{sen}(\alpha - \beta)}{\text{sen}(\alpha + \beta)} \right]^2 + \frac{1}{2} \left[\frac{\text{tg}(\alpha - \beta)}{\text{tg}(\alpha + \beta)} \right]^2 \quad (2.3)$$

e

$$T(\alpha, \beta) = 1 - R(\alpha, \beta). \quad (2.4)$$

O elemento diferencial de potência (dP) deve ser escrito considerando o perfil de intensidade (I) do feixe incidente na objetiva. Utilizando coordenadas polares (ρ, φ) no plano da entrada da objetiva e considerando a condição seno de Abbe ($\rho = f \sin\theta$), onde f é a distância focal da objetiva e θ é ângulo do raio em relação ao eixo óptico, temos [13]

$$dP = I f^2 \text{sen}\theta \cos\theta d\theta d\varphi. \quad (2.5)$$

Para calcular a força resultante exercida sobre a microesfera pelo feixe focalizado, substituímos a Equação 2.5 na Equação 2.1 e somamos as contribuições individuais de cada raio

$$\vec{F} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_0} d\vec{F}, \quad (2.6)$$

onde θ_0 é o valor máximo de θ , ou seja, o ângulo que define o cone do feixe focalizado, que depende da abertura numérica da objetiva (NA). Essa integral é calculada considerando efeitos de aberração esférica [13].

Vale ressaltar que o modelo de óptica geométrica não tem parâmetros ajustáveis. Todos os parâmetros de entrada necessários para calcular as forças ópticas e, conseqüentemente, a constante de força, são medidos em laboratórios considerando a configuração de cada montagem experimental. Tais parâmetros são: perfil de intensidade do feixe, potência do laser na entrada da objetiva, altura do pinçamento da microesfera, transmitância da objetiva, índices de refração do meio e da microesfera e o coeficiente de absorção da microesfera. Todos os detalhes técnicos adicionais sobre esse modelo de óptica geométrica e os cálculos numéricos das forças ópticas podem ser encontrado em trabalhos anteriores [13, 14].

Por exemplo, considerando uma microesfera dielétrica ($\varepsilon = 0$) e um feixe com perfil gaussiano, o resultado final mostra que para pequenos deslocamentos da microesfera em relação ao eixo óptico, ela estará submetida à uma força restauradora, de módulo $F_x = k\Delta x$, onde x é posição transversal da microesfera em relação ao eixo óptico e k é a constante de força ou rigidez da armadilha óptica e pode ser calculada por

$$k_x = - \left(\frac{\partial F_x}{\partial x} \right)_{x_{eq}}, \quad (2.7)$$

onde x_{eq} é a posição de equilíbrio ao longo do eixo x .

Estudos posteriores mostraram que é possível criar pinças duplas [15] e tridimensionais [16], utilizando dois feixes de luz. A gama de aplicações da pinça óptica se tornou ainda maior com o uso de técnicas de modelagem de feixes de luz, utilizando elementos ópticos difrativos (DOEs - diffractive optical elements) [17].

Os DOEs (divisores de feixe, moduladores espaciais de luz (SLM), lentes, redes de difração, etc) são fabricados para terem padrões de microestrutura que alteram e controlam a fase (ou intensidade) da luz refletida ou transmitida. Ao alterar as microestruturas, é possível que um DOE produza qualquer perfil de intensidade ou formato do feixe para atender aos requisitos de aplicação. Por exemplo, tornou-se possível a criação de pinças múltiplas a partir de um único feixe, a conversão um feixe gaussiano em feixes de Bessel, Laguerre-Gauss, etc.

2.1.1 Pinça óptica holográfica

Um grande avanço no desenvolvimento das pinças ópticas holográficas foi utilizar hologramas gerados por computador (CGHs) que são endereçados a um display de cristal líquido [18–20]. O holograma pode ser implementado em uma função de transmissão, utilizando uma modulação de fase ou de amplitude. A modulação de fase é feita variando o índice de refração ou variando a espessura do meio onde é gravado o holograma, mantendo a transmissão de amplitude homogênea. A modulação de amplitude consiste em variar o coeficiente de transmissão ou reflexão do meio. Em ambos os casos, a modificação na fase ou amplitude, pode ser

feita através de uma função binária ou em escalas de cinza. Os dispositivos, conhecidos como moduladores espaciais de luz (SLMs) são composto por camadas de cristal líquido e a orientação das moléculas do cristal é modificada quando um holograma é nele projetado. Existem dois tipos de moduladores de luz: de reflexão e de transmissão. A principal diferença entre eles é que o feixe incidente de luz tem sua fase modificada ao ser refletido pelo SLM, no caso do de reflexão, e transmitida ao atravessar o dispositivo, no caso de transmissão. A Figura 2.4 mostra um esboço de como é o funcionamento de um modulador espacial de luz. A técnica que utiliza tais dispositivos ficou conhecida como pinça óptica holográfica, HOT [21, 22].

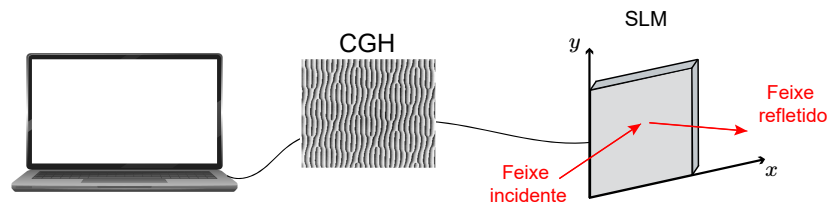


Figura 2.4: Esboço de como é o funcionamento de um modulador espacial de luz. Os hologramas são gerados computacionalmente e são projetados num modulador espacial de luz. A luz refletido pelo modulador tem a sua fase modificada.

A Figura 6.1 ilustra um exemplo da montagem experimental que utilizamos em nossos experimentos e na seção 6.2.1 discutiremos detalhadamente o funcionamento da pinça óptica holográfica.

Neste trabalho não estudamos os métodos de geração de hologramas, usamos funções predefinidas do software do modulador. Uma explicação detalhadas dos métodos de geração dos hologramas pode ser encontradas na referências [23, 24].

2.2 Pinça magnética

Os primeiros experimentos envolvendo manipulação de partículas magnéticas foram realizados em 1950, por Hughes e Crick [25]. Eles permitiam que células fagocitassem partículas magnéticas, que eram manipuladas com a aplicação de um campo magnético externo. Através da análise do movimento dessas partículas eles estudaram algumas propriedades elásticas do citoplasma celular. Posteriormente, em 1996, Strick, Bensimon e Croquette [26], estudaram as propriedades elásticas de uma molécula de DNA utilizando o mesmo princípio. Nesse estudo, a molécula de DNA possuía uma das suas extremidades presa à lamínula e a outra, presa à partícula magnética. Um campo magnético externo foi usado para girar e puxar as partículas causando uma torção e estiramento na molécula de DNA, respectivamente. Desde então diversas melhorias vem sendo desenvolvidas e hoje, a técnica é bastante utilizada no estudo e manipulação de moléculas únicas.

A técnica se baseia na interação de partículas magnéticas com um campo magnético externo. A Figura 2.5 mostra um esboço de três montagens experimentais. Um conjunto de ímãs permanentes posicionados sobre um porta-amostra gera um campo magnético numa região onde há microesferas paramagnéticas grudadas a uma das extremidades de uma molécula de DNA, que possui a outra extremidade presa a uma lamínula. O campo induz um momento magnético ($\vec{\mu}$) nas microesferas que sofrerão ação de uma força \vec{F} .

A energia de uma partícula paramagnética imersa em uma região que possui um campo magnético (\vec{B}) é dada por

$$U = -\frac{1}{2}\vec{\mu}(\vec{B}) \cdot \vec{B}, \quad (2.8)$$

onde $\vec{\mu}(\vec{B})$ é o momento de dipolo magnético. A força magnética que atua sobre a partícula será

$$\vec{F} = -\vec{\nabla}U = -\frac{1}{2}\vec{\nabla}(\vec{\mu}(\vec{B}) \cdot \vec{B}). \quad (2.9)$$

Observe que, se o campo magnético aplicado (\vec{B}) for relativamente fraco, o momento de dipolo magnético ($\vec{\mu}(\vec{B})$) é proporcional ao próprio campo. Dessa forma, a força será proporcional ao gradiente de B^2 , ou seja, aponta na direção de maior intensidade do campo magnético. A magnitude dessa força pode ser controlada através da mudança da posição relativa entre os ímãs e o porta-amostra.

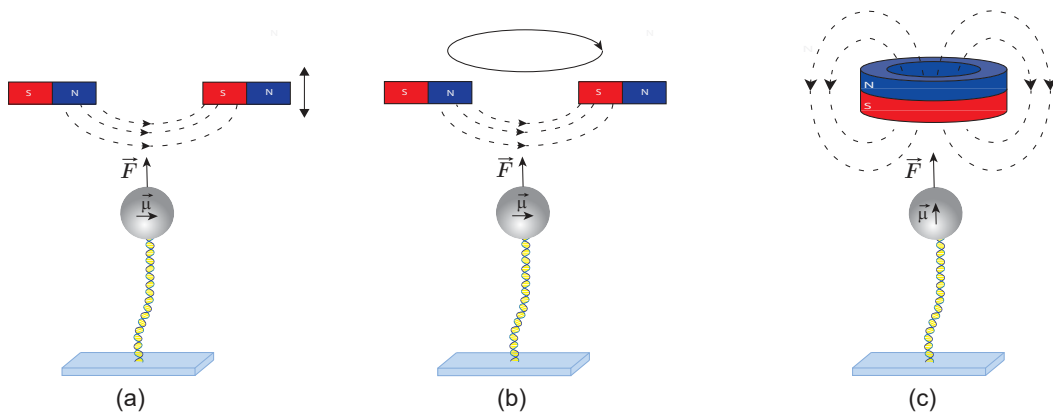


Figura 2.5: Ilustração da interação entre a microesfera e o campo magnético. Em (a) e (b) o momento de dipolo ($\vec{\mu}$) se orienta na direção horizontal e a força aponta na direção vertical. (c) O momento de dipolo ($\vec{\mu}$) se orienta na direção vertical e a força aponta na mesma direção. Observe que a força sempre aponta na direção do gradiente do campo magnético. Figura adaptada da referência [27].

Podemos considerar que a microesfera e, conseqüentemente, o DNA estão sujeitos à uma força constante pois a escala de comprimento do movimento da microesfera (normalmente micrômetros) é pequena quando comparada com a escala de comprimento das variações do campo magnético (\vec{B}), tipicamente de milímetros. Em nossos experimentos garantimos que a força atua na direção vertical, neste caso, ao longo do eixo z .

Devido ao movimento browniano, a microesfera sofre um deslocamento (δx) em torno da posição de equilíbrio e assim estará sujeita a uma força restauradora, $F_x = k_{pm}\delta x$, como ilustra a Figura 2.6.

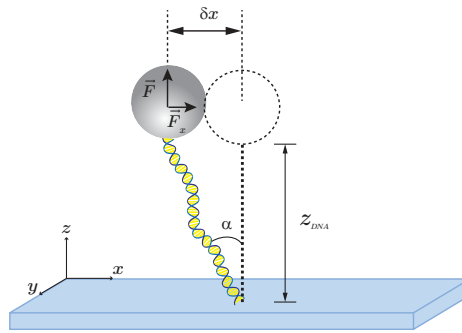


Figura 2.6: Ilustração do deslocamento da microesfera em torno da sua posição de equilíbrio.

A microesfera estará sujeita a um potencial harmônico, caracterizado por uma constante de força (k_{pm}) do mesmo modo que uma microesfera capturada em uma pinça óptica. De acordo com a Figura 2.6 podemos escrever

$$\operatorname{tg}\alpha = \frac{\delta x}{z_{DNA}} = \frac{F_x}{F} \quad (2.10)$$

e utilizando o teorema da equipartição da energia

$$\frac{1}{2}k_{pm}\langle\delta x^2\rangle = \frac{1}{2}k_B T,$$

obtemos

$$F = \frac{k_B T}{\langle\delta x^2\rangle} z_{DNA}, \quad (2.11)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, z_{DNA} é a extensão da molécula de DNA, $\langle\delta x^2\rangle$ é a variância das flutuações da microesfera transversais à direção do estiramento da molécula de DNA. Dessa forma, medindo a extensão do DNA e calculando a variância da posição da microesfera em ao longo do eixo x , encontramos a força aplicada.

Conforme mostra a Figura 2.5, existem várias configurações possíveis para uma pinça magnética. Se giramos o ímã, conforme a Figura 2.5(b), podemos aplicar um torque na molécula [26]. A montagem mostrada na Figura 2.5(c), também permite a aplicação de torque [28]. Existem inúmeras montagens experimentais possíveis para a pinça magnética, outros exemplos podem ser encontradas nas referências [27, 29].

2.3 Calorimetria isotérmica de titulação

Calorimetria isotérmica de titulação (ITC) é uma técnica termodinâmica usada para medir variação de energia que é absorvida ou liberada durante algum processo físico-químico. Ela permite detectar fluxos de energia da ordem de nJ. Do ponto de vista histórico, a calorimetria forneceu a primeira informação sobre a característica da transferência de energia nesses processos.

Um calorímetro de titulação isotérmica é composto por duas células idênticas (célula da amostra e célula de referência), uma seringa equipada com um agitador, um motor elétrico, que gira continuamente todo o sistema de injeção para garantir a homogeneidade da mistura, e um sistema de termopilhas, responsável por detectar fluxo de calor. A Figura 2.7 ilustra o esboço simplificado de um calorímetro.

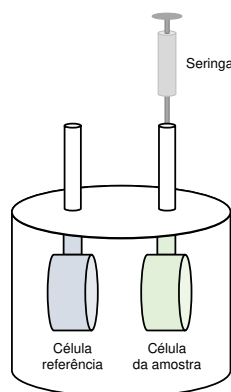


Figura 2.7: Esboço simplificado de um calorímetro.

Para entender uma medida típica de calorimetria isotérmica de titulação, vamos considerar um experimento no qual estamos interessados na reação entre um surfactante e um polímero. Colocamos nas células, referência e amostra, um certo volume de solução polimérica. Na célula de amostra são feitas adições consecutivas de surfactantes, todas controladas por software e com mesmo intervalo de tempo. Ao adicionar o surfactante ocorre um fluxo de energia, na forma de calor (q), diferente da célula de amostra em relação à de referência. Esse fluxo de energia é transformado em potência, um gráfico típico pode ser visto na Figura 7.18(a). Os valores da energia liberada ou absorvida são obtidos por integrações dos picos que ocorrem a partir da linha base. Com isso, obtemos um gráfico da variação de entalpia ($\Delta H = q$) em função da concentração do surfactante, como pode ser visto na Figura 7.18(b). A forma da curva de titulação oferece informações úteis sobre os tipos de interações que ocorrem entre o surfactante e o polímero.

2.4 Condutometria

A condutometria é um método de análise que se baseia na medida da condutividade elétrica de uma solução iônica. A condução da eletricidade através das soluções iônicas ocorre devido à migração de íons durante a aplicação de um campo elétrico externo. Espécies carregadas positivamente se movem em direção ao cátodo e as carregadas negativamente são atraídas pelo ânodo. A condutância da solução (G) está relacionada com a carga, a mobilidade e as concentrações de todos os íons presentes na solução iônica e depende de alguns fatores, tais como, temperatura da solução e dimensão dos eletrodos utilizados na medida.

Para entendermos o conceito de condutância recorreremos à lei de Ohm. Ela estabelece que a corrente elétrica (i), que flui através de um condutor, é diretamente proporcional à voltagem aplicada (V) e inversamente proporcional à resistência (R) do condutor, $i = V/R$.

A resistência de um material não depende unicamente de suas propriedades intrínsecas, mas também da quantidade e forma da amostra. Se o material possuir uma seção transversal

uniforme de área (A) e comprimento (l), a resistência é dada por

$$R = \rho \frac{l}{A}, \quad (2.12)$$

onde ρ é uma propriedade intrínseca do material, a resistividade. A condutância (G) é definida como sendo o inverso da resistência e a grandeza inversa da resistividade é a condutividade específica (κ) que é expressa em Siemens. m^{-1} , no Sistema Internacional.

A técnica de condutometria é utilizada em várias aplicações como, por exemplo, verificar a pureza de água destilada ou deionizada, determinar o teor em substâncias iônicas, determinar a concentração de eletrólitos de soluções simples, etc. Focaremos aqui no método de titulação condutimétrica que registra a condutividade em função das concentrações das espécies presentes na solução iônica e que permite verificar se ocorre ou não, a formação de agregados ou micelas. A Figura 2.8 ilustra um exemplo simples de um condutímetro, aparelho onde são realizadas as medidas de condutometria. Em geral, ele é composto por duas placas de platinas de área (A) separadas por uma distância (D) e um circuito de medida onde é registrado a resistência da solução.

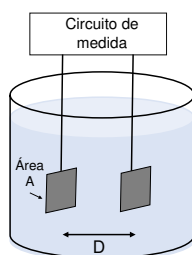


Figura 2.8: Esboço simplificado de um condutímetro.

Imaginemos o que ocorre no interior de uma solução iônica devido às forças eletrostáticas e agitação térmica. Alguns íons em solução podem apresentar em sua volta mais contra-íons do que se a distribuição fosse aleatória, esse fenômeno dá origem a dois efeitos: eletroforético e de relaxação. Ambos levam a uma diminuição na condutividade elétrica da solução.

O efeito eletroforético é o movimento de contra-íons de carga oposta que rodeiam os íons centrais. Esses contra-íons tendem a se movimentar em sentido oposto ao íon central, reduzindo assim o seu movimento. Já no efeito de relaxação, o movimento do íon central é desacelerado devido à presença de cargas com sinal oposto que se encontram no caminho da partícula em movimento. Dessa forma, a formação de agregados ou micelas influencia diretamente na medida da condutividade da solução. A concentração em que ocorre a formação dos agregados é conhecida como concentração crítica de agregação (CAC), e quando há a formação de micelas, temos a concentração crítica micelar (CMC). A Figura 7.19, ilustra o comportamento típico de um gráfico de condutividade em função da concentração, quando ocorre a formação de agregados ou micelas. O ponto onde ocorre a mudança na inclinação da reta nos fornece o valor da CAC ou CMC.

2.5 Espectroscopia de absorção

A espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis) é uma técnica amplamente utilizada que mede a quantidade de luz absorvida pelo material em função do comprimento de onda incidente. Quando a luz é absorvida por uma amostra, a energia do feixe incidente diminui. Então podemos definir uma grandeza que relaciona a intensidade da luz incidente (I_0) com a intensidade do feixe de luz que emerge do material (I). A Figura 2.9 ilustra essa situação.

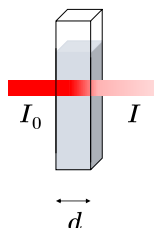


Figura 2.9: Ilustração da absorção de luz pelo material.

A absorbância é definida como

$$A = \log \frac{I_0}{I}, \quad (2.13)$$

que é uma medida da capacidade intrínseca dos materiais em absorver radiações para determinado comprimento de onda.

De acordo com a lei de Lambert-Beer, a absorbância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente (C), ao caminho óptico do meio absorvente (d) e ao coeficiente de absorção molar (ε),

$$A = \varepsilon d C. \quad (2.14)$$

Se, por exemplo, quisermos encontrar o coeficiente de absorção molar para um determinado comprimento de onda, precisamos realizar medidas da absorbância em função da concentração. Como o valor de d é conhecido, o coeficiente de absorção molar pode ser obtido através do coeficiente angular da reta ajustada aos pontos experimentais.

Capítulo 3

DNA

Em 1953, o biólogo James Watson e o físico Francis Crick anunciaram a descoberta da estrutura da molécula de DNA [30]. A proposta do modelo, conhecido como dupla hélice, lhes rendeu o prêmio Nobel de Medicina de 1962. Historicamente foi um passo muito importante na ciência pois o DNA desempenha um papel fundamental na reprodução carregando toda a informação genética do ser vivo. O nome dupla hélice vem do fato de que a molécula de DNA pode ser comparada a uma escada torcida.

A molécula de DNA é composta por quatro nucleotídeos diferentes, cada um deles é constituído por uma base nitrogenada (adenina, guanina, citosina ou timina), um açúcar pentose do tipo desoxirribose e um grupo fosfato. Os nucleotídeos se ligam entre si formando uma cadeia e duas cadeias se conectam através de ligações de hidrogênio, que ocorrem entre as bases nitrogenadas. A Figura 3.1(a) mostra a estrutura básica do nucleotídeo, a Figura 3.1(b) ilustra como é a ligação entre as bases nitrogenadas e a Figura 3.1(c) contém o desenho esquemático da dupla hélice de um DNA do tipo B.

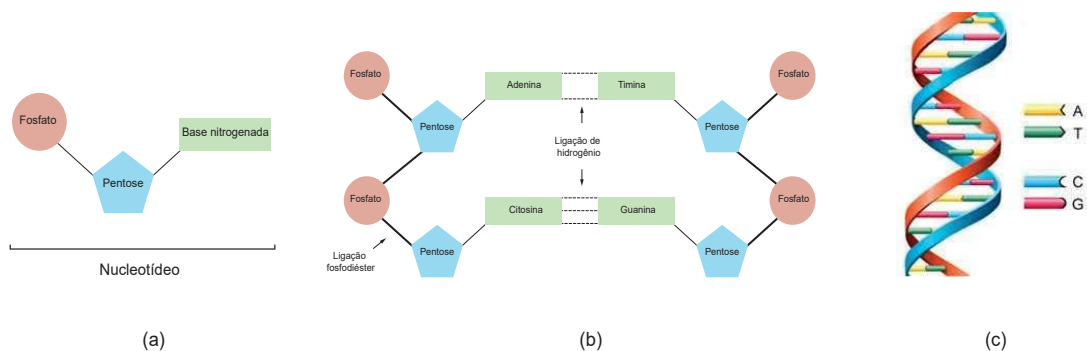


Figura 3.1: (a) Estrutura de um nucleotídeo do DNA, com um grupo fosfato, um açúcar do tipo pentose (desoxirribose) e uma base nitrogenada. (b) Estrutura da molécula de DNA, mostrando a ligação de hidrogênio entre as bases nitrogenadas e a ligação fosfodiéster que ocorre entre o grupo fosfato e dois açúcares de dois nucleotídeos. (c) Estrutura tridimensional do DNA. Figura adaptada de <http://ead.hemocentro.fmrp.usp.br/joomla/index.php/publicacoes/folhetins/469-dna-o-sentido-da-vida>.

Entender a estrutura do DNA é um tema central para a biotecnologia e a medicina em virtude do fato de que ele não apenas fornece os planos básicos para toda a vida, sendo também um regulador fundamental de como os organismos vivos funcionam. Compreender a estrutura e

a função do DNA ajudou a revolucionar a investigação de doenças, a avaliar a suscetibilidade genética de um indivíduo a doenças específicas, diagnosticar distúrbios genéticos e formular novos medicamentos. Também é fundamental para a identificação de patógenos.

O DNA em solução fisiológica pode se apresentar de três formas: A, B e Z. A diferença entre as formas está no passo e diâmetro da hélice e no sentido de giro da hélice. A forma mais comum é a B-DNA (Figura 3.2(a)) que é a utilizada em nossos experimentos, ela possui giro à direita e foi a descrita por Watson e Crick. O A-DNA (Figura 3.2(b)) também possui giro à direita, mas com uma estrutura helicoidal mais curta e compacta cujos pares de bases não são perpendiculares ao eixo da hélice como no B-DNA. Por outro lado o Z-DNA (Figura 3.2(c)) possui giro à esquerda e seu esqueleto tem a forma de um zigue-zague. Cada conformação possui um número de pares de base que compõe uma volta completa da dupla hélice. Na forma B-DNA são 10 pares de base, na A-DNA são 11 e na Z-DNA, 12 pares de base.

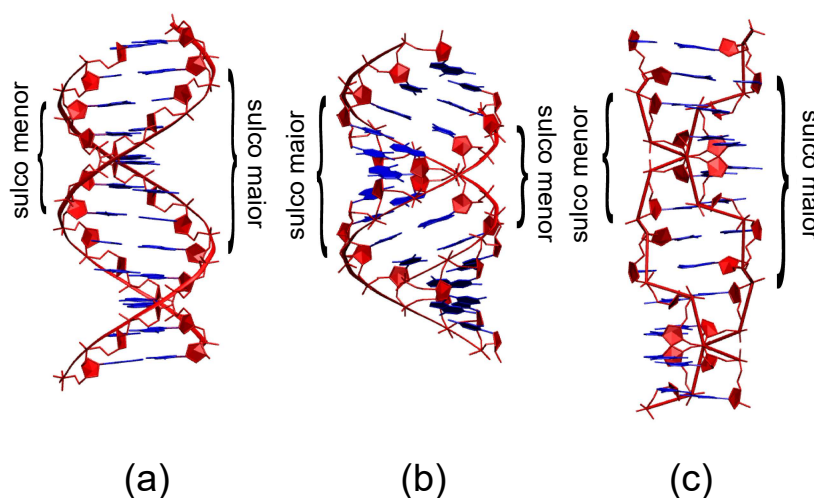


Figura 3.2: Formas da molécula de DNA: (a) B-DNA, (b) A-DNA e (c) Z-DNA. Figura adaptada de: <https://www.ks.uiuc.edu/Training/CaseStudies/pdfs/dna.pdf>

Neste trabalho trataremos dos aspectos mecânicos da molécula de DNA. A molécula de DNA quando é estirada, por exemplo, nos experimentos de pinça óptica, se comporta como um polímero e existem alguns modelos que explicam esse comportamento. Discutiremos no próximo capítulo modelos de polímeros que são usados para extrair propriedades mecânicas da molécula de DNA.

Capítulo 4

Polímeros

Neste capítulo abordaremos a física dos polímeros e discutiremos brevemente sobre três modelos: o da cadeia livremente articulada, o gaussiano e o Worm-like Chain. Apresentaremos as características principais de cada modelo, bem como as equações mais relevantes que os caracterizam.

4.1 Classificações

Nesta seção seguimos o desenvolvimento feito por Iwao Teraoka [31]. Polímeros são materiais que apresentam em sua estrutura molecular unidades relativamente simples que se repetem formando longas cadeias. Essas unidades que se repetem são conhecidas como monômeros e podem ser idênticos ou não. Se todos os monômeros são idênticos, os polímeros são chamados de homopolímeros. Se os polímeros apresentam dois ou mais tipos de monômeros eles são classificados como copolímeros. O número de monômeros (N) que compõe o polímero é chamado de grau de polimerização.

Os polímeros podem também ser classificados em função do tipo de cadeia que apresentam. Cadeias lineares são aquelas em que a cadeia polimérica é constituída apenas de uma cadeia principal, como mostrado na Figura 4.1(a). Nas cadeias ramificadas observamos bifurcações (ramos) a partir da cadeia principal do polímero, como pode ser visto na Figura 4.1(b). E nas cadeias reticuladas (ou ligações cruzadas) os monômeros formam ligações, e estas se cruzam num emaranhado, como ilustra a Figura 4.1(c).

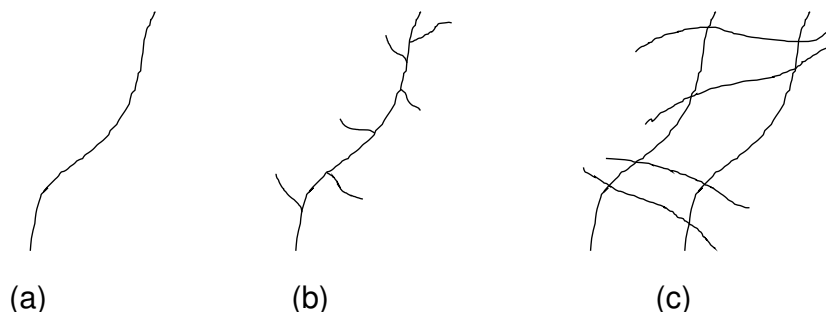


Figura 4.1: Exemplos dos tipos de cadeia de um polímero: (a) cadeia linear, (b) cadeia ramificada e (c) cadeia reticulada.

Polímeros em solução mudam sua forma constantemente devido às colisões com as moléculas do meio. Uma dada configuração espacial instantânea do polímero é chamada de conformação. A natureza do solvente e condições externas como pressão, temperatura, ambiente iônico, campo eletromagnético, etc., podem ter um efeito profundo sobre essas conformações. A representação espacial da conformação dos polímeros pode ser feita no espaço discreto ou contínuo. No espaço discreto os polímeros são representados em uma rede onde a posição dos monômeros é discretizada. Já no espaço contínuo, os monômeros podem ocupar qualquer posição no espaço. Por exemplo, o espaço discreto é amplamente utilizado em simulações computacionais, pois o tempo de simulação é bem inferior se comparado à representação no espaço contínuo.

Ainda na parte de representação espacial, a cadeia polimérica pode ser classificada como ideal e real. Nas cadeias ideais, dois ou mais monômeros podem ocupar o mesmo lugar no espaço. Já nas cadeias reais, os monômeros não podem ocupar o mesmo lugar no espaço, condição que é conhecida como exclusão de volume.

Observe que existem várias classificações e abordagens diferentes para tratar a modelagem de polímeros. A escolha de qual abordagem irá depender de vários fatores como, por exemplo, tempo computacional e proximidade da situação real. Modelos mais simples, como cadeias ideais no espaço discreto, demandam menos tempo computacional, mas podem mascarar propriedades importantes do sistema. Por outro lado, abordagens mais realistas como cadeias reais no espaço contínuo estão mais próximas da realidade, porém demandam muito tempo computacional.

4.2 Definições gerais

Começaremos resumindo algumas definições gerais que nos ajudarão a entender o desenvolvimento dos modelos de polímeros [31].

Comprimento de contorno L é a distância medida ao longo da cadeia polimérica, ou seja, é a distância de ponta a ponta quando o polímero se encontra numa conformação completamente retilínea. É expresso em unidades de comprimento.

Comprimento Kuhn (l_k) é uma medida de rigidez da cadeia. Pode ser descrito como sendo o segmento mais curto ao longo do polímero acima do qual flutuações térmicas começam a dobrar significativamente o polímero. De fato, em larga escala, um polímero pode ser descrito como uma sequência de N unidades estatisticamente independentes, cada unidade com comprimento l_k , que é mostrado na Figura 4.2.

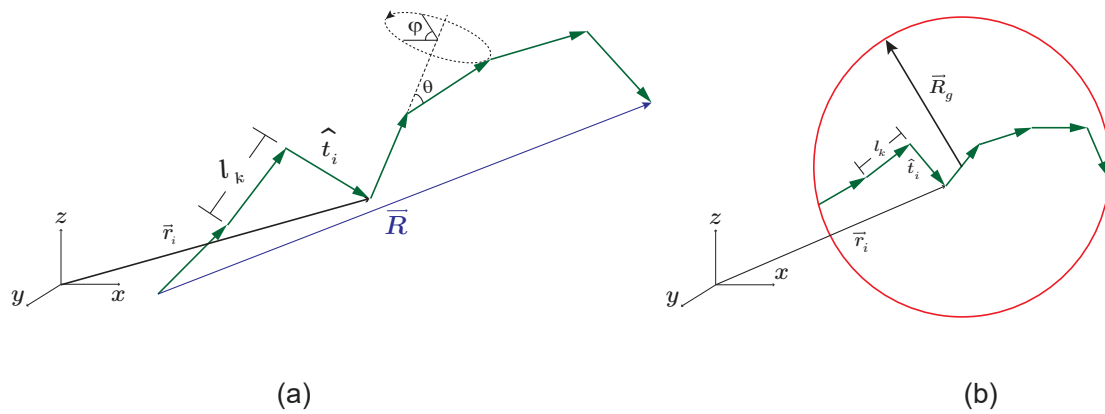


Figura 4.2: Ilustração de um polímero de cadeia ideal mostrando algumas grandezas fundamentais: em (a) o vetor (\vec{r}_i), o comprimento Khun (l_k), distância ponta a ponta (\vec{R}) e o vetor tangente (\hat{t}_i). E em (b), o raio de giro \vec{R}_g .

Comprimento de persistência (A) é uma propriedade mecânica que permite caracterizar a rigidez de um polímero. Quanto mais rígido for o polímero, maior será o seu comprimento de persistência e vice-versa. Pode ser interpretado como sendo uma medida do alcance de perturbações locais na conformação global da molécula, representando, de certa forma, uma espécie de comprimento de correlação da cadeia polimérica. Nos casos em que o valor de A for pequeno quando comparado ao valor do comprimento de contorno ($A \ll L$), uma pequena perturbação local causará um efeito de alcance limitado, afetando os monômeros consecutivos até uma certa distância A , ou seja, partes próximas da perturbação se movimentam umas em relação às outras. Já no limite em que o valor de A for muito grande quando comparado ao valor do comprimento de contorno ($A \gg L$), o efeito de qualquer perturbação local na posição de qualquer monômero será sentido por todos os outros, que tenderão a manter suas posições relativas inalteradas. Neste caso, teremos uma molécula rígida. Para cadeias suficientemente longas ($L \gg A$), os conceitos de comprimento de persistência e comprimento de Kuhn são equivalentes entre si.

Distância ponta a ponta quadrática média (R) é definida como sendo o valor quadrático médio da distância entre as extremidades de um polímero. Em solução, a cadeia polimérica assume várias conformações devido à flutuações térmicas aleatórias do meio, então $\langle \vec{R} \rangle = 0$, assim a grandeza $\langle \vec{R} \rangle$ não é útil para expressar o tamanho da cadeia. Dessa forma, é necessário realizar a média quadrática sobre esse valor que é definida como

$$\langle R^2 \rangle = \langle \vec{R} \cdot \vec{R} \rangle = \left\langle \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \cdot \sum_{j=1}^N \vec{r}_j \right\rangle, \quad (4.1)$$

onde \vec{r}_i corresponde à posição de cada monômero.

Raio de giro (R_g) é uma grandeza que nos fornece uma ideia do volume ocupado pelo polímero. Pode ser imaginado como sendo o raio da esfera cujo volume é o mesmo ocupado pelo polímero. É definido como

$$\langle R_g \rangle \equiv \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^L \langle (\vec{r}_i - \vec{r}_{cm})^2 \rangle}, \quad (4.2)$$

onde \vec{r}_i é o vetor posição em um ponto qualquer do polímero e \vec{r}_{cm} é o vetor posição que localiza o centro de massa do polímero. Podemos escrever o vetor posição do centro de massa como sendo a média de todos os vetores posição dos monômeros

$$\vec{r}_{cm} = \frac{1}{N} \sum_{j=1}^N \vec{r}_j. \quad (4.3)$$

Substituindo a Equação 4.3 na Equação 4.2, teremos [32]

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{N^2} \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle (\vec{r}_i - \vec{r}_j)^2 \rangle. \quad (4.4)$$

4.3 Cadeias ideais flexíveis

Nesta seção trabalharemos com cadeias ideais, nas quais não existe interação entre monômeros na cadeia polimérica. Estes modelos são uma idealização e são ponto de partida para vários modelos físicos de polímeros.

4.3.1 Modelo da cadeia livremente articulada (CLA)

O modelo da cadeia livremente articulada (CLA) (do inglês Freely Jointed Chain (FJC)) é um dos modelos mais básicos para descrever as propriedades de polímeros ideais em equilíbrio termodinâmico com o solvente. Utilizaremos o tratamento descrito na referência [32]. Supomos que o polímero é constituído de N segmentos Kuhn (de comprimento l_k) que são conectados por juntas flexíveis e podem apontar em qualquer direção (ângulo θ na Figura 4.2), independente dos outros segmentos, ou seja, não há correlação, e também podem girar em torno do ângulo ϕ , também definido na Figura 4.2. O comprimento de contorno para esse modelo é $L = Nl_k$.

Começaremos calculando a distância ponta a ponta quadrática média da cadeia livremente articulada

$$\begin{aligned} \langle R^2 \rangle &= \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle \\ &= \sum_{i=1}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_i \rangle + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle \\ &= \sum_{i=1}^N l_k^2 + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle \\ &= Nl_k^2 + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle \\ &= Nl_k^2 + 2 \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N l_k^2 \langle \cos\theta_{ij} \rangle, \end{aligned} \quad (4.5)$$

como o ângulo entre \vec{r}_i e \vec{r}_j pode assumir qualquer valor no intervalo $-\pi < \theta_{ij} \leq \pi$ com igual probabilidade, então $\langle \cos \theta_{ij} \rangle = 0$. Então para uma cadeia livremente articulada teremos

$$\langle R^2 \rangle = Nl_k^2. \quad (4.6)$$

Para o cálculo do raio de giro iremos fazer algumas considerações. Para cadeias lineares, o somatório da Equação 4.4 pode ser substituído por integrais que serão realizadas ao longo da cadeia do polímero

$$\sum_{i=1}^N \rightarrow \int_0^N du \quad (4.7)$$

e

$$\sum_{j=1}^N \rightarrow \int_u^N dv. \quad (4.8)$$

Substituindo as Equações 4.7 e 4.8 na Equação 4.4, teremos

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{1}{N^2} \int_0^N \int_u^N \langle (\vec{r}(u) - \vec{r}(v))^2 \rangle dudv, \quad (4.9)$$

onde $\vec{r}(u)$ é o vetor posição da coordenada u do polímero. A distância quadrática média entre duas coordenadas do polímero u e v pode ser calculada considerando cada cadeia com $v - u$ monômeros como sendo uma mini cadeia ideal. Conforme vimos, a distância ponta a ponta quadrática média é dada pela Equação 4.6

$$\langle (\vec{r}(u) - \vec{r}(v))^2 \rangle = (v - u)l_k^2. \quad (4.10)$$

O raio de giro quadrático médio é calculado utilizando uma simples mudança de variáveis $v' = v - u$ e $u' = N - u$, teremos

$$\begin{aligned} \langle R_g^2 \rangle &= \frac{1}{N^2} \int_0^N \int_u^N (v - u)l_k^2 dudv \\ &= \frac{l_k^2}{N^2} \int_0^N \int_0^{N-u} v' dv' du \\ &= \frac{l_k^2}{N^2} \int_0^N \frac{(N - u)^2}{2} du \\ &= \frac{l_k^2}{2N^2} \int_0^N (u')^2 du' \\ &= \frac{l_k^2}{2N^2} \frac{N^3}{3} = \frac{Nl_k^2}{6}. \end{aligned} \quad (4.11)$$

Neste modelo podemos relacionar o comprimento Kuhn com o comprimento de persistência através da expressão $l_k = 2A$. Dessa forma o raio de giro para o modelo da cadeia livremente articulada pode ser escrito como

$$\langle R_g^2 \rangle = \frac{LA}{3}. \quad (4.12)$$

Como não existe correlação entre as orientações dos monômeros, o modelo da cadeia livremente articulada pode ser visto como um passeio aleatório em três dimensões [32]. Assim, a função distribuição de probabilidade da distância ponta a ponta, ($R \equiv \sqrt{\langle \vec{R}^2 \rangle}$) obedece à uma distribuição gaussiana

$$P(R) = \left(\frac{3}{2\pi Nl_k^2} \right)^{\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{3R^2}{2Nl_k^2} \right). \quad (4.13)$$

Estenderemos nossa análise para verificar como é a resposta elástica de uma cadeia livremente articulada quando se aplica uma força \vec{f} . Consideraremos o regime elástico e que a força externa é aplicada nas duas extremidades da cadeia e está orientada ao longo do eixo z , conforme mostra a Figura 4.3.

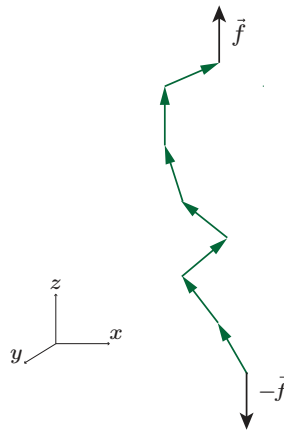


Figura 4.3: Cadeia ideal submetida à uma força \vec{f} .

A função de partição do modelo da cadeia livremente articulada é dada por [32]

$$\begin{aligned} Z_{CLA}(T, f, N) &= \int \exp\left(\frac{fl_k}{k_B T} \sum_{i=1}^N \cos\theta_i \right) \prod_{i=1}^N \sin\theta_i d\theta_i d\phi_i \\ &= \left[\frac{4\pi \sinh(fl_k/k_B T)}{fl_k/k_B T} \right]^N \end{aligned} \quad (4.14)$$

A energia livre de Gibbs, pode ser calculada diretamente da função partição, $G = -k_B T \ln Z$, então

$$G(T, f, N) = -Nk_B T \ln \left[\frac{4\pi \sinh(fl_k/k_B T)}{fl_k/k_B T} \right]. \quad (4.15)$$

A distância média ponta a ponta do polímero submetido a uma força \vec{f} é dada por

$$\begin{aligned}
\langle R \rangle &= -\frac{\partial G}{\partial f} \\
&= Nl_k \left[\cot gh \left(\frac{fl_k}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{fl_k} \right] \\
&= L \left[\cot gh \left(\frac{fl_k}{k_B T} \right) - \frac{k_B T}{fl_k} \right].
\end{aligned} \tag{4.16}$$

A expressão entre colchetes na Equação 4.16 é conhecida como função de Langevin, $\mathcal{L} = [\cot gh\beta - 1/\beta]$.

Observe que analiticamente não é possível isolar a força em função da distância média ponta a ponta $\langle R \rangle$. No seção 7.3 trabalharemos com esse modelo na análise dos nossos experimentos.

4.3.2 Modelo gaussiano

Assim como no modelo da cadeia livremente articulada, a cadeia também é composta por N monômeros e não há correlação entre a direção de segmentos consecutivos. A principal diferença é que o tamanho do segmento não é mais fixo. Podemos considerá-lo como uma variável aleatória gaussiana (c) [33]. A função de distribuição do comprimento do segmento é dada por

$$P(\vec{c}) = \left(\frac{3}{2\pi b^2} \right)^{\frac{3}{2}} \exp\left(-\frac{3|\vec{c}|^2}{2b^2} \right), \tag{4.17}$$

com $\langle c^2 \rangle = b^2$.

Como a orientação dos segmentos também não está correlacionada, as expressões para a distância ponta a ponta quadrática média e o raio de giro são idênticas às do modelo da cadeia livremente articulada, dado pelas Equação 4.6 e 4.11, respectivamente. Quando submetido à uma força, o modelo gaussiano é considerado como uma aproximação do modelo da cadeia livremente articulada para baixas forças. Isso equivale a dizer que $R \ll L$ ou que, $fl_k/k_B T \ll 1$, na Equação 4.16. Nesse limite podemos escrever

$$\langle R \rangle \approx \frac{fbL}{3k_B T}. \tag{4.18}$$

Substituindo a Equação 4.11 e considerando que $L = Nb$ e $l_k = b$, podemos reescrever a Equação 4.18 como

$$f = \frac{k_B T}{2\langle R_g^2 \rangle} \langle R \rangle. \tag{4.19}$$

Note que a força é diretamente proporcional à distância média ponta a ponta, ou seja, esse modelo se comporta como uma mola simples, com constante elástica dada por

$$k = \frac{k_B T}{2\langle R_g^2 \rangle}. \tag{4.20}$$

4.4 Cadeias ideais semi-flexíveis

Os modelos vistos nas seções 4.3.1 e 4.3.2 não levam em conta na sua concepção uma propriedade importante, a rigidez do polímero. Mesmo apresentando uma baixa rigidez, é necessário a realização de trabalho para dobrar o polímero. Trataremos nesta seção de um modelo que considera a energia de curvatura do polímero, conhecido como Worm-like Chain.

4.4.1 Modelo Worm-like chain

Uma maneira simples de contabilizar a rigidez de flexão é fornecida pelo modelo discreto de Kratky-Porod. Neste modelo um custo de energia está associado a dobrar o monômero, que possui tamanho l_k . A energia de flexão é dada por

$$E_{KP} = -\frac{\kappa_f}{l_k} \sum_{i=1}^{N-1} \hat{t}_i \cdot \hat{t}_{i+1} \quad (4.21)$$

onde κ_f é rigidez flexural do segmento e \hat{t}_i é definido como $\hat{t}_i = (\vec{r}_{i+1} - \vec{r}_i)/l_k$.

Diferentemente do modelo da cadeia livremente articulada, a correlação entre dois vetores tangentes (\vec{r}_i) não é zero, podemos calculá-la através de

$$\langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle = e^{|i-j| \ln \mathcal{L} \left(\frac{\kappa_f}{k_B T l_k} \right)}. \quad (4.22)$$

Definindo, o comprimento de persistência como

$$A \equiv -\frac{l_k}{\ln \mathcal{L} \left(\frac{\kappa_f}{k_B T l_k} \right)}, \quad (4.23)$$

a Equação 4.22 pode ser reescrita como

$$\langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle = e^{\frac{|i-j| l_k}{A}}. \quad (4.24)$$

O comprimento de persistência nos dá uma ideia da rigidez do polímero. Quanto maior o valor de A, mais rígido é o polímero (poucas dobras). Por outro lado, quanto menor for o valor de A, mais flexível é o polímero e mais dobras ele apresentará. Geometricamente, o comprimento de persistência pode ser entendido como sendo o comprimento de correlação do polímero, ou seja, é uma medida do alcance de perturbações locais na conformação do polímero.

A função de correlação permite calcular a distância ponta a ponta quadrática média do modelo Kratky-Porod. Considerando que $\langle R^2 \rangle = b \sum_{i=1}^N \vec{t}_i$, temos

$$\begin{aligned}
\langle R^2 \rangle &= l_k^2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N \langle \hat{t}_i \cdot \hat{t}_j \rangle = l_k^2 \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N e^{-\frac{|i-j|l_k}{A}} \\
&= N l_k^2 \frac{1 + \mathcal{L}\left(\frac{\kappa_f}{k_B T l_k}\right)}{1 - \mathcal{L}\left(\frac{\kappa_f}{k_B T l_k}\right)}. \tag{4.25}
\end{aligned}$$

Este resultado é bastante instrutivo. Mostra que, para $N \rightarrow \infty$, $\langle R^2 \rangle \propto N$, da mesma forma que para polímeros flexíveis. Fisicamente, isso se deve ao fato de que a memória induzida pela flexão decai exponencialmente, de modo que os vetores tangentes que estão longe o suficiente ao longo da cadeia comportam-se efetivamente como no modelo flexível. Este resultado não é uma característica específica do modelo Kratky-Porod, mas é válido para qualquer modelo de polímero com rigidez flexural. O que muda de caso para caso é a constante multiplicativa $\left[1 + \mathcal{L}\left(\frac{\kappa_f}{k_B T l_k}\right)\right] / \left[1 - \mathcal{L}\left(\frac{\kappa_f}{k_B T l_k}\right)\right]$.

O modelo de Worm-like chain (WLC) é visto como sendo o limite contínuo do modelo discreto de Kratky-Porod, obtido considerando os limites $b \rightarrow 0$ e $N \rightarrow \infty$, mantendo o comprimento de contorno ($L = N l_k$) constante. Introduzimos a coordenada de comprimento de arco s . Assim, mudamos para a notação $\vec{t}(s)$ para os vetores tangentes (\hat{t}_i), como pode ser visto na Figura 4.4, correspondendo ao valor $s = i l_k$.

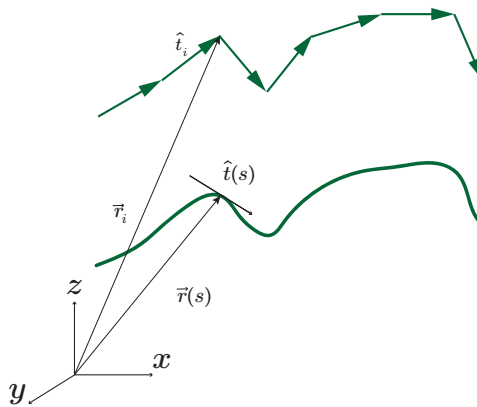


Figura 4.4: Cadeia ideal no espaço discreto e contínuo.

Com essas considerações, a Equação 4.21 pode ser reescrita como

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds. \tag{4.26}$$

O comprimento de persistência pode ser obtido tomando o limite $l_k \rightarrow 0$ na Equação 4.23 e utilizando $\mathcal{L}(\beta) \simeq 1 - 1/\beta$ para $\beta \rightarrow \infty$, encontramos

$$A = \frac{\kappa_f}{k_B T}. \tag{4.27}$$

A Equação 4.24 pode ser reescrita como

$$\langle \hat{t}(s_i) \cdot \hat{t}(s_j) \rangle = e^{\frac{|s_i - s_j|}{A}}. \quad (4.28)$$

A distância ponta a ponta quadrática média e o raio de giro serão dados pelas Equação 4.29 e 4.30, respectivamente [32]

$$\langle R^2 \rangle = 2Ll_k \left[1 - \frac{l_k}{L} \left(1 - e^{-\frac{L}{l_k}} \right) \right] \quad (4.29)$$

e

$$R_g = \sqrt{\frac{1}{3}AL - A^2 + 2\frac{A^3}{L} \left[1 - \frac{A}{L} \left(1 - e^{-\frac{L}{A}} \right) \right]}. \quad (4.30)$$

A equação 4.26 é usada para deduzir o comportamento da força em função da extensão do polímero à medida que ele é estirado. Essa análise pode ser realizada numericamente ou analiticamente usando aproximações apropriadas. Em 1995, Marko e Siggia [34] resolveram o modelo analiticamente, obtendo uma expressão aproximada para o comportamento da força, aplicada ao longo do eixo z , em função da extensão (z) do polímero. Esse modelo é bastante discutido na literatura, o desenvolvimento completo do modelo pode ser encontrado nas referências [34–36] e seu resultado final é

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (4.31)$$

Apesar da Equação 4.31 ser válida para estiramentos arbitrários, próximo e longe da conformação de equilíbrio, ainda é uma expressão aproximada. Perceba que a expressão diverge em $z = L$. Na prática, seu limite de validade vai até cerca de $z \sim 0,9L$, uma vez que acima disto a força se torna muito alta, fora portanto do regime entrópico. Este modelo reproduz muito bem os resultados experimentais obtidos quando se estira uma molécula de DNA no regime entrópico, por isso, é amplamente usado na análise de experimentos de moléculas únicas.

Capítulo 5

Líquidos iônicos

A busca por tecnologias mais limpas e sustentáveis nas atividades industriais tem recebido merecido destaque nas últimas décadas. O desenvolvimento dessas tecnologias e de processos alternativos, que reduzam a quantidade de resíduos no final do processo, tem sido exaustivamente estudados e essa nova abordagem tem recebido o nome de química verde, do inglês "*green chemistry*".

Dentre os inúmeros problemas relacionados à atividade química, podemos destacar o impacto causado por resíduos de solventes orgânicos convencionais, que são amplamente utilizados nos processos industriais, tais como, na aplicação de pintura, verniz, adesivos, na extração de azeites, etc. Os solventes normalmente evaporam de forma muito rápida, contribuindo significativamente para a poluição atmosférica.

Nas últimas décadas, muitos estudos tem sido realizados na busca de solventes alternativos (solventes verdes), para substituir os convencionais, a fim de reduzir o impacto ambiental. Como alternativa para o uso desses solventes convencionais, podemos destacar os líquidos iônicos.

Os líquidos iônicos, que foram descobertos em 1914 por Paul Warden [37], são essencialmente compostos de cátions e ânions. Como características principais, podemos citar: viscosidade muito baixa, baixa pressão de vapor, não inflamáveis e são excelentes solventes para vários compostos: orgânicos, inorgânicos, polímeros e biológicos, etc [38]. Por apresentarem baixa pressão de vapor, reduzem significativamente a emissão de resíduos, tornando-se compostos com alta capacidade para substituir solventes comuns e tóxicos. Essas propriedades podem ser facilmente modificadas variando a composição dos cátions e ânions [39], por isso, os líquidos iônicos são conhecidos como solventes desenháveis, do inglês "*designer solvents*". A Figura 5.1 mostra alguns exemplos de cátions e ânions que podem compor a estrutura química de um líquido iônico.

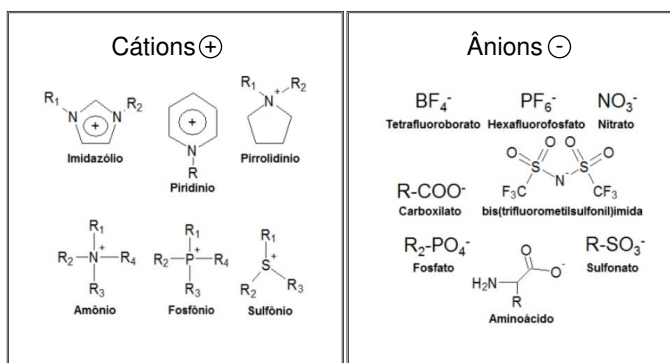


Figura 5.1: Exemplos de cátions e ânions que compõe a estrutura química de uma molécula de líquido iônico.

Devido à sua alta aplicabilidade na indústria [40, 41], sua aplicação nas ciências da vida também tem despertado grande interesse [42]. Muitos estudos mostram que os líquidos iônicos se ligam à estrutura do DNA. Por exemplo, Xie *et al.* [43] investigaram a interação eletrostática entre um líquido iônico hidrofílico 1-butil-3-metilimidazólio tetrafluoroborato ([bmim]BF₄) e DNA de timo de bezerro (ctDNA) usando um micrométodo eletroquímico de superfície. Vijayaraghavan *et al.* [44] mostraram uma estabilidade a longo prazo do DNA em vários solventes à base de colina, ou seja, a estrutura de dupla hélice é de fato mantida quando o DNA está em contato com o líquido iônico. Ding *et al.* [45] estudaram as características de ligação e o mecanismo molecular da interação entre um líquido iônico típico (LI), cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio com DNA.

A grande aplicabilidade dos líquidos iônicos e o fato de não haver na literatura estudos da interação dos líquidos iônicos com a molécula de DNA via experimentos de moléculas únicas, nos motivou a realizar esse trabalho.

Capítulo 6

Pinça óptica holográfica aplicada na manipulação de microesferas superparamagnéticas

6.1 Motivação

A técnica de pinça óptica já é amplamente utilizada no Laboratório de Física Biológica da UFV, principalmente no estudo da interação DNA-Ligantes. A partir de 2018, o grupo também tem se dedicado a estudar o pinçamento óptico de novos materiais [6, 7, 46]. Novos efeitos têm sido observados, demonstrando ser uma área de enorme potencial para novos estudos e novas aplicações.

Um dos objetivos desta tese é implementar uma pinça híbrida optomagnética, onde forças ópticas e magnéticas são aplicadas simultaneamente. As microesferas dielétricas, que são utilizadas nos experimentos tradicionais de pinça óptica, não possuem resposta magnética. Para conseguir aplicar forças ópticas e magnéticas simultaneamente é necessário que as microesferas tenham resposta magnética e, ao mesmo tempo, seja pinçada em algum tipo de feixe. Estudos anteriores mostraram que microesferas superparamagnéticas são pinçadas em um feixe anular [6], que foi obtido utilizando uma máscara de fase.

Neste trabalho mostraremos os resultados obtidos com a nova técnica implementada no laboratório, a pinça óptica holográfica. Conforme mencionado anteriormente, é uma técnica que permite gerar vários tipos de feixe utilizando um modulador espacial de luz, que permite modificar facilmente características do feixe gerado, o que não é possível com uma máscara de fase. Nos nossos experimentos verificamos que as microesferas paramagnéticas são pinçadas em diferentes feixes de Bessel. Estudamos como a constante de força da pinça varia com três parâmetros: altura do pinçamento, potência do laser e raio do feixe de Bessel.

6.2 Procedimento experimental e metodologia

6.2.1 Montagem experimental

A Figura 6.1 apresenta um esquema do sistema experimental implementado no laboratório. Utilizamos um laser infravermelho (CNI lasers China, modelo MIL – III) com potência máxima de 1,5 W e comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm. O feixe é polarizado linearmente e possui um diâmetro de aproximadamente 1,5 mm. Um telescópio composto por duas lentes L1 e L2, com distâncias focais de 25,4 mm e 75,0 mm, respectivamente, foi montado para expandir o diâmetro do feixe para aproveitarmos ao máximo a área do SLM (Spatial light modulator). Colocamos uma placa de meia onda após o primeiro telescópio pois precisamos controlar a polarização que chegará no SLM, pois ele só funciona para uma polarização específica do feixe incidente. O feixe chega ao SLM, modelo PLUTO - Holoeye Photonics AG, que está conectado a um computador e é controlado pelo software Holoeye Application Software 2.2. Com o software é possível endereçar diferentes hologramas ao SLM e assim efetuar modificações no feixe de luz refletido.

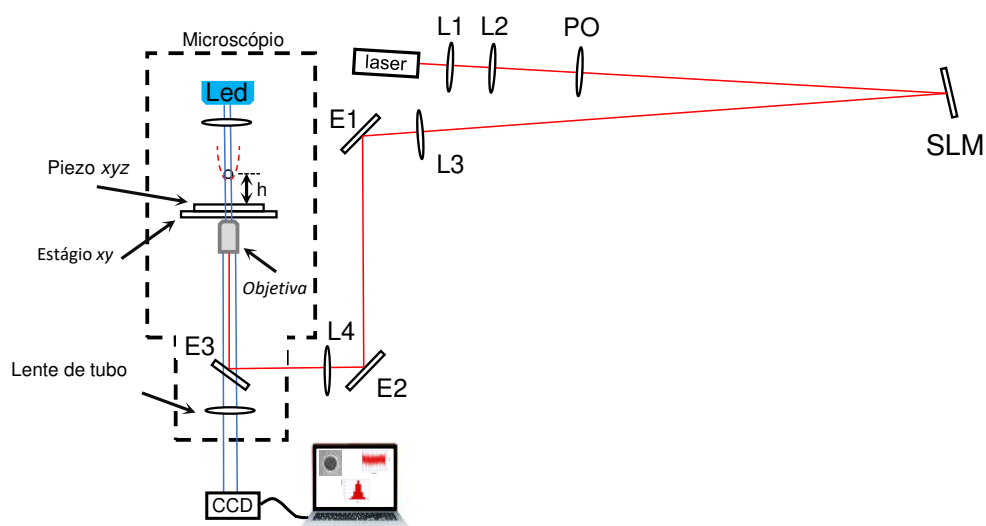


Figura 6.1: Montagem experimental utilizada nos experimentos de pinça óptica holográfica.

O feixe refletido diverge e a montagem de um segundo telescópio se fez necessária para que o diâmetro do feixe seja menor que a abertura da objetiva. Após passar pela lente L3, de distância focal de 1000,0 mm, o feixe é refletido pelos espelhos E1 e E2 e atravessa a lente L4, de distância focal de 200,0 mm, antes de entrar no microscópio invertido Nikon, modelo Eclipse Ti, representado pela linha pontilhada. Utilizamos uma objetiva Nikon, de óptica corrigida no infinito, de 100X, com abertura numérica de 1,4. Ela é responsável por focalizar o feixe infravermelho criando o poço de potencial que é a pinça óptica. Indicamos por h a distância do centro da microesfera pinçada em relação ao porta-amostra. Nosso porta-amostra é construído

colando um o-ring de borracha a uma lamínula de vidro, conforme mostra a Figura 6.2. Após a colocação da amostra colocamos uma outra lamínula na parte superior do o-ring para fechar o porta-amostra.

O porta-amostra é colocado sobre um deslocador piezoelétrico, modelo PI nano E-727, conectado a um computador, sendo possível controlar com precisão nanométrica os três eixos x , y e z . O deslocador é montado sobre um estágio de controle manual que nos possibilita mover a amostra nos eixos x e y . Como amostra, utilizamos microesferas superparamagnéticas, Dynabeads® M-280 Streptavidin, de $1,4 \mu\text{m}$ de raio. De acordo com as especificações, elas são compostas por uma matriz de poliestireno com material magnético, Fe_2O_3 e Fe_3O_4 , distribuídos uniformemente em seu volume, correspondendo a aproximadamente 12% do peso da microesfera. Elas são diluídas em uma solução de Phosphate Buffer Saline (PBS), com pH 7,4 e concentração de 150 mM de NaCl.

A amostra é iluminada com um led azul da Thorlabs. A luz passa pela amostra, pela objetiva, atravessa um espelho dicróico E3 e a imagem é conjugada pela lente de tubo. Para a observação da imagem das microesferas e gravação do experimento, acoplamos ao microscópio uma câmera CMOS, acA1920 - 155um - Basler ace, com 2,3 MP de resolução e taxa de captura máxima na ordem de 1000 *fps*, frames por segundo.

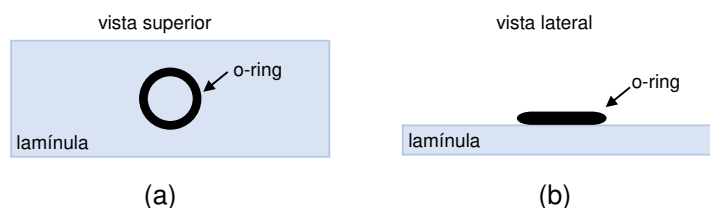


Figura 6.2: (a) Vista vertical do porta-amostra e em (b) vista lateral.

6.2.2 Caracterização do perfil de intensidade do feixe de Bessel

É importante sabermos como é o perfil do feixe antes da abertura da objetiva, pois ele será utilizado no cálculo teórico da força óptica. Substituímos a objetiva do microscópio por uma câmera CCD, modelo Jay CM 140 GE. Endereçamos um holograma, que gera um feixe de Bessel, para o SLM. Fotografamos o feixe e utilizamos o software ImageJ para obter o perfil de intensidade em função da posição radial do feixe.

6.2.3 Medida da transmitância da objetiva

A transmitância média da nossa objetiva para o feixe de Bessel foi determinada medindo a potência do laser antes e depois de passar pela objetiva, usando um método descrito anteriormente [6]. Basicamente, usamos um medidor de potência (ThorLabs Slide Power Sensor S170C) que é capaz de medir com precisão a potência de feixes altamente focalizados. Assim, ao posicionar tal dispositivo no plano focal da objetiva podemos medir a potência do laser que realmente atinge o foco, ou seja, a potência real que chega na microesfera presa na armadilha óptica. A transmitância será dada pela inclinação da reta do gráfico da potência do laser no foco em função da potência do laser antes da objetiva.

6.2.4 Medida do coeficiente de absorção das microesferas superparamagnéticas

Para determinar o coeficiente de absorção (ϵ) das microesferas superparamagnéticas utilizamos um espectrofotômetro UV-Vis (Horiba FluoroMax® Plus). Esse parâmetro é necessário para calcular a força que atua nas microesferas. Medimos a absorbância em função do comprimento de onda para várias concentrações. Escolhemos o valor da absorbância para $\lambda = 1064$ nm, que corresponde ao comprimento de onda do laser utilizado nos experimentos. Construímos gráfico da absorbância em função da concentração e utilizamos a lei de Beer-Lambert, Equação 2.14, para determinar o coeficiente de absorção.

6.2.5 Cálculo da constante de força da pinça óptica holográfica

A constante de força da pinça óptica foi medida analisando o movimento browniano da microesfera superparamagnética presa na armadilha. Gravamos um vídeo com uma câmera CMOS (Basler acA1920-155uc) com uma taxa de captura de 642 Hz. Este vídeo foi analisado no software ImageJ, para obtermos os valores da posição da microesfera em função do tempo.

No equilíbrio, a densidade de probabilidade da coordenada x da posição obedece à distribuição de Boltzmann

$$\rho(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi k_B T/k}} \exp\left(-\frac{kx^2}{2k_B T}\right), \quad (6.1)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta. Considerando a posição de equilíbrio na origem, podemos escrever a variância, $var(x)$, da coordenada x como

$$var(x) \equiv \langle x^2 \rangle - \langle x \rangle^2 = \langle x^2 \rangle. \quad (6.2)$$

De acordo com o teorema da equipartição da energia, podemos escrever

$$k = \frac{k_B T}{\langle x^2 \rangle}. \quad (6.3)$$

Para o cálculo da variância, devemos levar em consideração o tempo característico das flutuações, τ , dado por

$$\tau = \frac{\gamma}{k}, \quad (6.4)$$

onde γ é o coeficiente de atrito viscoso e k é a constante de força. O tempo τ define limites para o tempo de integração da câmera, W , e para o tempo de aquisição da medida, τ_{medida} .

O tempo de integração da câmera é definido como sendo o tempo mínimo para a aquisição de dois eventos sucessivos. Em geral, ele está relacionado com a eletrônica do sistema e pode ser calculado como o inverso da taxa de captura. Experimentalmente devemos certificar que $W < \tau < \tau_{medida}$. Devido ao tempo de integração, não é possível calcular a posição instantânea da partícula, $x(t)$. O que obtemos é a posição média, x_m , calculada num intervalo de tempo W , que é dada por

$$x_m(t) = \frac{1}{W} \int_t^{t+W} x(t') dt', \quad (6.5)$$

consequentemente $var(x_m) \leq var(x)$. Esse resultado sugere que caso não ocorra nenhuma correção na medida da posição, podemos estar superestimando o valor da força aplicada.

Ainda de acordo com a referência [47], a constante k pode ser calculada por

$$k = \frac{30k_B T}{2DW + 15var(x_m) + [225var(x_m)^2 + 240DWvar(x_m) - 11D^2W^2]^{\frac{1}{2}}}, \quad (6.6)$$

onde D é o coeficiente de difusão, dado por

$$D = \frac{k_B T}{6\pi a \eta \left(1 - \frac{9a}{16h}\right)^{-1}}, \quad (6.7)$$

onde a é raio da microesfera, h é altura do pinçamento. A viscosidade, η , é dada por

$$\eta = 10^{-3} \left[0,26 + 1,51e^{\frac{-273,15+T}{29}} \right], \quad (6.8)$$

na unidade de Pa.s. Assim, a constante de força é calculada diretamente a partir da variância da posição da microesfera.

6.3 Resultados e discussão

A Figura 6.3(a) mostra um feixe de Bessel obtido e a Figura 6.3(b) mostra o perfil de intensidade ao longo da linha amarela da Figura 6.3(a) para dois feixes diferentes. Observe que a diferença entre os feixes de Bessel está na distância do primeiro anel até o máximo central, que chamaremos de raio do feixe de Bessel (ρ_B). Ainda na Figura 6.3(b) são mostrados dois raios de Bessel diferentes, raios $\rho_1 = 0,16$ mm e $\rho_2 = 0,26$ mm, em preto e vermelho, respectivamente.

Note que nosso método de videomicroscopia permite obter imagens de alta qualidade do feixe de Bessel, possibilitando a determinação de seu perfil de intensidade com alta precisão. Tal procedimento é importante tanto para garantir que o holograma usado no SLM está retornando resultados confiáveis quanto para estudar o comportamento da constante de força em função do raio do feixe de Bessel.

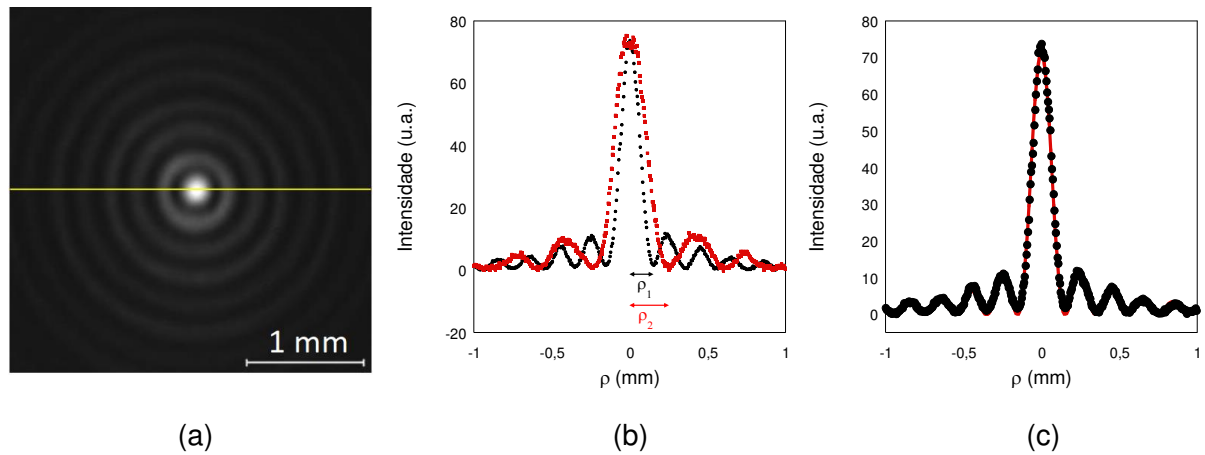


Figura 6.3: (a) Imagem típica do feixe na entrada da objetiva obtida por videomicroscopia. A linha amarela contínua ao longo do diâmetro foi usada para medir o perfil de intensidade. (b) Perfil de intensidade do feixe medido ao longo de seu diâmetro para dois raios de Bessel característicos $\rho_1 = 0,16$ mm e $\rho_2 = 0,26$ mm. (c) Ajuste da Equação 6.9 para o feixe com raio de Bessel 0,16 mm.

Para determinar os parâmetros do feixe, ajustamos os perfis de intensidade com a Equação 6.9. Dessa forma o valor de ρ_B pode ser determinado com precisão para cada feixe. A intensidade de pico I_0 também é determinada a partir deste ajuste, mas em unidades arbitrárias, o que não tem significado físico. O valor real de I_0 , em W/mm^2 , é obtido integrando a Equação 6.9 para o nosso feixe, que tem seu tamanho limitado pela diâmetro da entrada da objetiva (7 mm de diâmetro)

$$I = I_0 J_0^2 \left(\frac{2,4\rho}{\rho_B} \right) \quad (6.9)$$

Na Figura 6.3(c) mostramos um ajuste para o feixe de Bessel de raio $\rho_B = 0,16$ mm. Observe que a Equação 6.9 se ajusta muito bem ao perfil do feixe, permitindo a determinação do raio de Bessel com alta precisão.

Para o cálculo da força total, substituímos a Equação 6.9 na Equação 2.5 para obter o elemento de potência para o feixe de Bessel

$$dP = \frac{P_l J_0^2 \left(\frac{2,4\rho}{\rho_B} \right)}{2\pi \int_0^{\rho_{obj}} J_0^2 \left(\frac{2,4\rho}{\rho_B} \right) \rho d\rho} f^2 \sin\theta \cos\theta d\theta d\varphi. \quad (6.10)$$

onde ρ_{obj} é o raio da entrada da objetiva e P_l é a potência local que atinge a microesfera, que é a potência medida na entrada da objetiva multiplicada pela transmitância da objetiva.

A Figura 6.4(a) mostra o gráfico da potência do laser no foco em função da potência do laser na entrada da objetiva, para o feixe de Bessel $\rho_B = 0,16$ mm. A transmitância será dada pela inclinação da reta ajustada aos dados experimentais, neste caso a transmitância obtida foi de $(33,3 \pm 0,9)\%$.

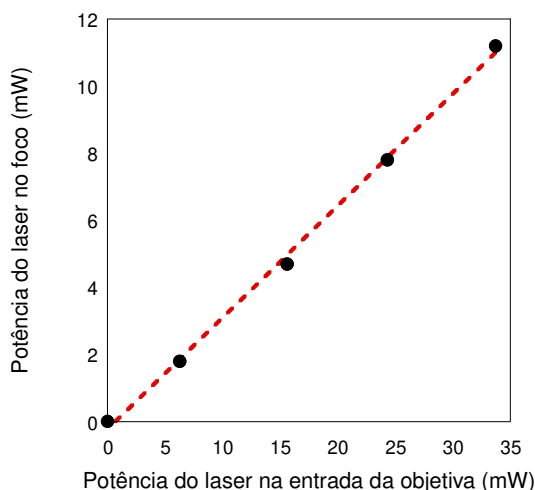


Figura 6.4: Potência do laser no foco em função da potência do laser na entrada da objetiva para um feixe de Bessel com raio de 0,16 mm. A linha vermelha tracejada é um ajuste linear, a transmitância da objetiva para esse feixe é a inclinação dessa curva.

Na Figura 6.5(a), mostramos a absorvância em função do comprimento de onda para uma solução das microesferas, igual a $C = 10^{-5}$ em porcentagem de massa. Já na Figura 2.9(b) mostramos a absorvância (para $\lambda = 1064$ nm) em função da concentração da solução das microesferas, de onde determinamos o coeficiente de absorção $\varepsilon = (0,6 \pm 0,2) \mu\text{m}^{-1}$ das microesferas superparamagnéticas. As barras de erro das medições de absorvância são menores que os símbolos usados para os dados experimentais.

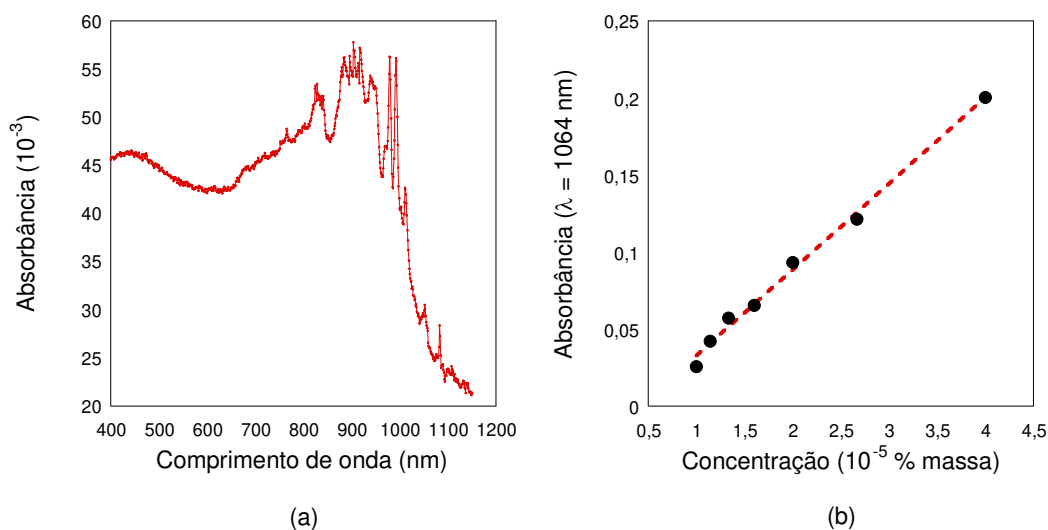


Figura 6.5: (a) Absorvância em função do comprimento de onda para uma solução contendo nossas esferas superparamagnéticas (concentração igual a 10^{-5} em porcentagem de massa). (b) Absorvância, para $\lambda = 1064$ nm, em função da concentração das microesferas. O coeficiente de absorção das microesferas superparamagnéticas medido foi $\varepsilon = (0,6 \pm 0,2) \mu\text{m}^{-1}$. As barras de erro das medições de absorvância são menores que o símbolo usado para plotar os dados.

Todos os parâmetros necessários para calcular a força total que atua nas microesferas foram medidos. Para o cálculo da força total, substituímos a Equação 6.10 na Equação 2.1. Substituí-

mos a expressão resultante na Equação 2.6 pra obter a equação da força total que atua sobre a microesfera

$$\vec{F} = \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_0} \frac{n_m}{c} [(dF_{esp})\hat{z}' + (dF_g)\hat{y}'] \frac{P_l J_0^2\left(\frac{2,4\rho}{\rho_B}\right)}{2\pi \int_0^{\rho_{obj}} J_0^2\left(\frac{2,4\rho}{\rho_B}\right) \rho d\rho} f^2 \sin\theta \cos\theta d\theta d\varphi. \quad (6.11)$$

Conforme mencionamos, neste trabalho estudamos como a constante de força da pinça óptica varia em função de três parâmetros: altura do pinçamento, potência do laser e raio do feixe de Bessel. A Equação 6.11 é resolvida numericamente fixando dois desses parâmetros. Por exemplo, para encontrar como a força varia com a altura do pinçamento, fixamos o valor da potência do laser e do raio do feixe de Bessel. O mesmo procedimento é feito nos nossos experimentos.

Na Figura 6.6(a) mostramos a força óptica transversal em função da distância da microesfera em relação ao centro do feixe para o nosso modelo, que considera a absorção, e para microesferas que não absorvem luz. Para este cálculo, utilizamos, $\varepsilon = (0,6 \pm 0,2) \mu\text{m}^{-1}$, $\rho_B = 0,16 \text{ mm}$, raio da microesfera superparamagnética $a = 1,4 \mu\text{m}$, altura do pinçamento $h = 10 \mu\text{m}$ e potência do laser no foco $P_l = 12 \text{ mW}$. A Figura 6.6(b) corresponde ao mesmo gráfico da 6.6(a), mostrando o valor da força para pequenos deslocamentos. Observe que neste caso, a força óptica varia linearmente com a distância da microesfera em relação ao centro do feixe. Os valores negativos para a força correspondem a um regime atrativo para regiões próximas ao centro do feixe, mostrando que o potencial óptico é harmônico nesse regime. A constante de força é obtida realizando um ajuste linear nessa região $x < 0,5 \mu\text{m}$. Para deslocamentos maiores da microesfera, outros pontos de equilíbrio (força nula), fora do eixo óptico podem ser encontrados devido à natureza periódica do feixe de Bessel, um resultado relatado anteriormente para microesferas dielétricas [48, 49].

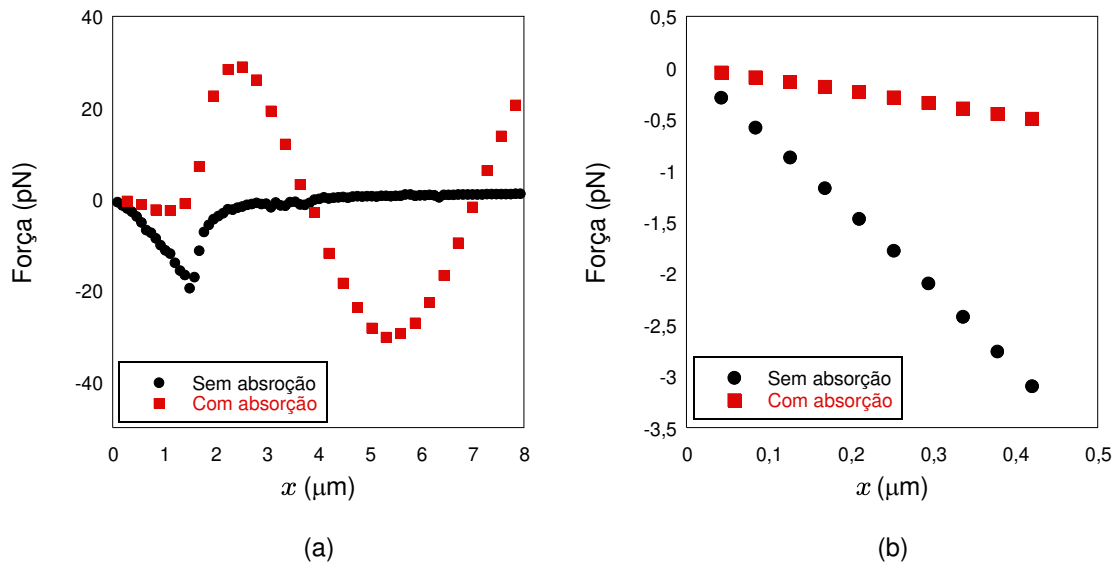


Figura 6.6: (a) Forças ópticas transversais (sem absorção (círculos pretos) e com absorção (quadrados vermelhos)) em função da distância da microesfera em relação ao centro do feixe, calculadas no regime de óptica geométrica para uma microesfera de raio $1,4 \mu\text{m}$, pinçada a uma altura de $10 \mu\text{m}$, para o raio do feixe de Bessel $\rho_B = 0,16 \text{ mm}$ e potência do feixe no foco igual a 12 mW . (b) Destaque do regime linear obtido para pequenos deslocamento do gráfico do painel (a).

Na Figura 6.7(a) mostramos o gráfico da posição da microesfera, em relação ao centro do feixe, em função do tempo e na Figura 6.7(b) o histograma da posição. Observe que o histograma é típico de uma partícula submetida à um potencial harmônico. A constante de força da pinça óptica é obtida a partir da variância da posição da partícula, Equação 6.6.

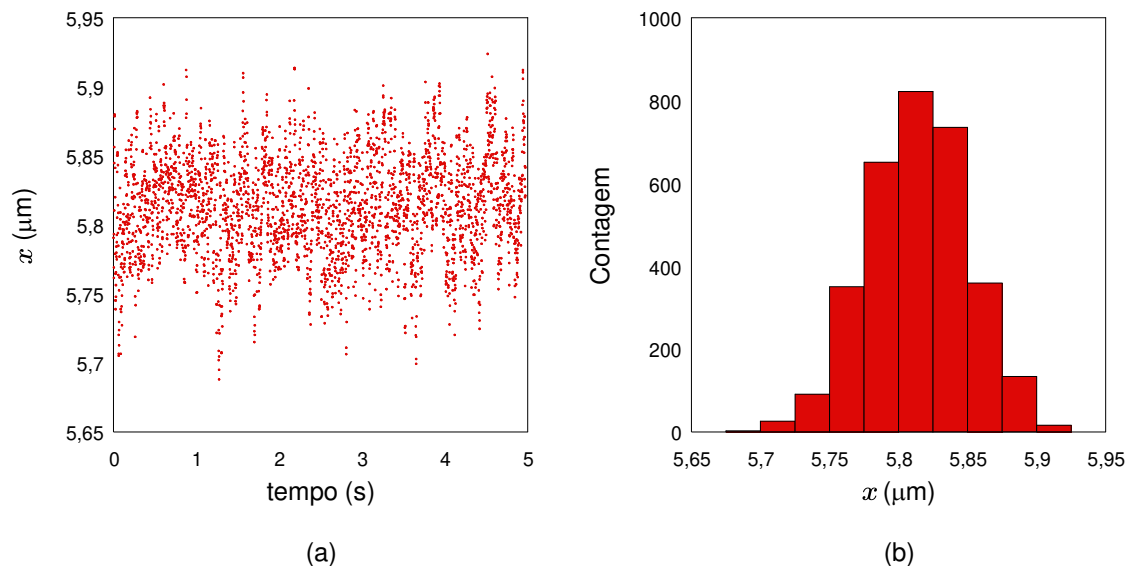


Figura 6.7: Dados experimentais obtidos de nossos experimentos: (a) coordenada x da partícula aprisionada em função do tempo e histograma correspondente dessa coordenada (b).

Na Figura 6.8 mostramos a constante de força medida k em função do raio do feixe de Bessel ρ_B (círculos pretos). As medidas foram realizadas usando uma potência do laser no foco P_f

= 40,8 mW e com a microesfera superparamagnética pinçada numa altura de $10 \mu\text{m}$. Os resultados numéricos obtidos do nosso modelo são mostrados para fins de comparação (quadrados vermelhos). Observe que o resultado numérico concorda muito bem com os resultados experimentais dentro da barra de erro, indicando que nosso modelo teórico é robusto. Vale lembrar que o modelo não possui parâmetros ajustáveis: todos os parâmetros necessários para calcular a força óptica foram medidos para a nossa montagem experimental e usados como parâmetros para o cálculo teórico.

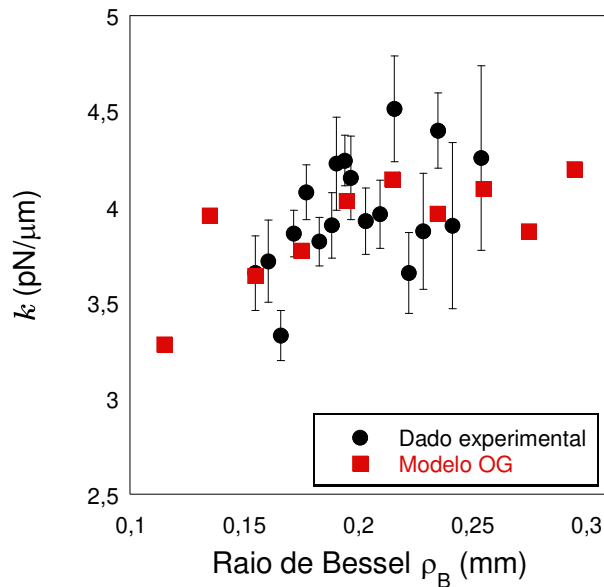


Figura 6.8: (a) Constante de força k em função do raio do feixe de Bessel ρ_B . Tais resultados foram obtidos usando uma potência do laser no foco igual a 40,8 mW e para a microesfera superparamagnética presa numa altura de $10 \mu\text{m}$. Os círculos pretos correspondem aos dados experimentais e os quadrados vermelhos, referem-se ao resultados numéricos.

Observe que o valor de k permanece praticamente constante no intervalo de $0,1 \text{ mm} \leq \rho_B \leq 0,3 \text{ mm}$ dentro das barras de erro experimentais. Nesta faixa de raio do feixe de Bessel o aprisionamento é muito estável e a microesfera superparamagnética permanece constantemente presa na armadilha óptica. Fora desta faixa, no entanto, é mais difícil mantê-la presa no potencial óptico de nossa configuração experimental, ou seja, o aprisionamento torna-se mais instável. Tal resultado indica que o valor da constante de força é independente do raio do feixe de Bessel usando essa configuração experimental.

Na Figura 6.9 mostramos a constante de força medida k em função da potência do laser no foco (círculos pretos). Tais medidas foram realizadas usando um raio do feixe de Bessel $\rho_B = 0,16 \text{ mm}$ e a microesfera superparamagnética pinçada numa altura de $10 \mu\text{m}$. Os resultados numéricos obtidos com o nosso modelo também são mostrados para fins de comparação (quadrados vermelhos). Observe que novamente o acordo entre os dados experimentais e o modelo teórico é excelente.

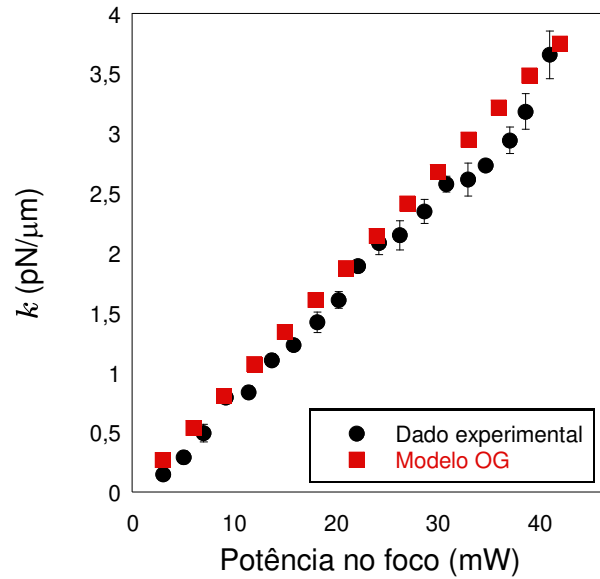


Figura 6.9: Constante de força k em função da potência do laser no foco. Os resultados foram obtidos para a microesfera superparamagnética pinçada numa altura de $10 \mu\text{m}$ e considerando o raio do feixe de Bessel, $\rho_B = 0,16 \text{ mm}$. Os círculos pretos correspondem aos dados experimentais e os quadrados vermelhos, referem-se ao resultados numéricos.

Observe que k aumenta linearmente em função da potência do laser, um resultado equivalente ao encontrado para pinças ópticas de feixe gaussiano comuns usando esferas dielétricas. Portanto, apesar de o coeficiente de absorção das microesferas superparamagnéticas não ser desprezível, a configuração proposta é muito eficiente para capturar nossas esferas superparamagnéticas de $1,4 \mu\text{m}$ de raio, com a dependência linear esperada entre a constante de força e a potência do laser, pelo menos na faixa de potências do laser estudadas aqui.

Finalmente, na Figura 6.10 mostramos como a constante de força medida k varia em função da altura do pinçamento da microesfera superparamagnética (círculos pretos). Tais medidas foram realizadas usando um raio do feixe de Bessel $\rho_B = 0,19 \text{ mm}$ e potência do laser no foco $P_l = 40,8 \text{ mW}$. Os resultados numéricos são mostrados (quadrados vermelhos), e uma boa concordância entre o modelo teórico e os dados experimentais foi obtida novamente.

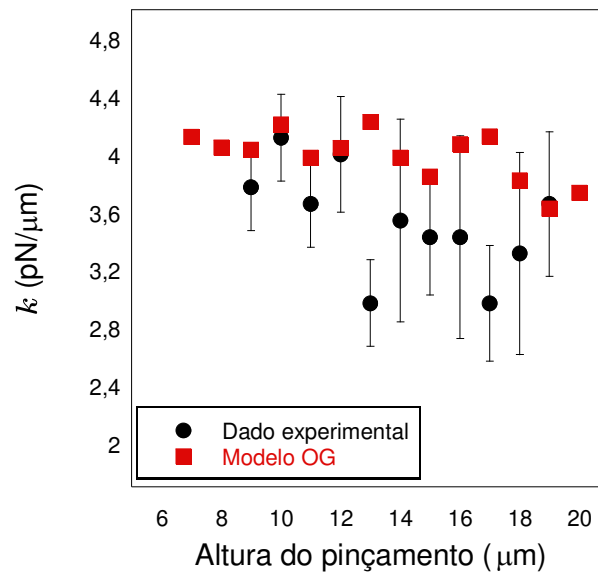


Figura 6.10: Constante de força k em função da altura de pinçamento da microesfera superparamagnética. Tais resultados foram obtidos usando uma potência do laser no foco igual a 40,8 mW no foco e raio do feixe de Bessel, $\rho_B = 0,19$ mm. Os círculos pretos correspondem aos dados experimentais e os quadrados vermelhos, referem-se ao resultados numéricos.

Observe que k permanece praticamente constante (dentro da barra de erro experimental). Tal resultado sugere que nossa configuração apresenta uma armadilha óptica que é praticamente independente da altura do pinçamento da microesfera superparamagnética (assim como para o raio do feixe de Bessel, discutido anteriormente). Esse resultado também indica que a aberração esférica é minimizada nesta configuração proposta. Tal aberração geralmente degrada o foco do laser e diminui a eficiência de aprisionamento em pinças ópticas que utilizam o laser com perfil gaussiano [6, 13], acarretando num decréscimo considerável de k em função da altura de pinçamento. No presente caso, nossa configuração minimiza a aberração esférica, permitindo medições mais precisas dentro de uma faixa consideravelmente ampla de alturas de pinçamento.

Em resumo, em nossa configuração, a constante de força é praticamente independente do raio do feixe de Bessel e da altura do pinçamento para uma ampla gama de valores desses parâmetros. Por outro lado, a constante de força varia linearmente em função da potência do laser no foco, como ocorre em pinças que utilizam um feixe gaussiano [50]. Os resultados do nosso modelo de óptica geométrica concordam muito bem com os resultados experimentais em todos os casos, mesmo para uma microesfera cujo tamanho não é muito maior que o comprimento de onda do laser, a condição necessária para uma abordagem óptica geométrica precisa. Espera-se ainda uma melhor concordância entre nosso modelo e experimentos realizados com microesferas maiores, que infelizmente não estavam disponíveis para o presente estudo. Os resultados apresentados aqui foram publicados na revista *Applied Optics* em abril de 2021 com o título "*Bessel beam optical tweezers for manipulating superparamagnetic beads*" [51].

6.4 Conclusão

Neste trabalho propomos uma montagem de pinça óptica que utiliza um feixe de Bessel, que é capaz de capturar de forma estável esferas superparamagnéticas de raio de $1,4 \mu\text{m}$ para

uma ampla gama de parâmetros. A constante de força permanece praticamente constante em função do raio do feixe de Bessel e da altura do pinçamento da microesfera, indicando que elas podem ser capturadas com alta precisão em uma ampla faixa desses parâmetros. Por outro lado, a constante de força apresenta a dependência linear esperada com a potência do laser no foco apesar do coeficiente de absorção das microesferas superparamagnéticas não ser desprezível. Um modelo de óptica geométrica que considera a aberração esférica e a absorção de luz pelas esferas foi usado para prever o valor da constante de força, e a concordância com os dados experimentais foi excelente. Os resultados apresentados são importantes no campo da manipulação óptica de partículas absorventes, em particular de partículas superparamagnéticas, dando novas contribuições sobre como capturar de forma estável tais partículas. Uma aplicação direta desses resultados seria na implementação de uma pinça híbrida optomagnética em nosso laboratório.

Capítulo 7

Interação DNA-líquido iônico

7.1 Motivação

Conforme dito no Capítulo 6, um dos nossos objetivos é implementar a pinça híbrida optomagnética. Para isso é necessário dominar a técnica de pinça magnética, que até então não existia em nosso laboratório. Implementamos nossa própria montagem no laboratório e isso nos motivou a aplicá-la no estudo das interações DNA-ligantes. A técnica de pinça óptica já está bem estabelecida, resolvemos então aplicar as duas técnicas na caracterização da interação entre o DNA e dois líquidos iônicos à base de imidazólio, que são substâncias que apresentam propriedades muito interessantes [38] e vem sendo utilizado em várias áreas do conhecimento [40,41]. Além disso, até onde sabemos, não há na literatura estudo dessa interação envolvendo técnicas de moléculas únicas. Para complementar, realizamos medidas de calorimetria isotérmica de titulação e condutometria. Com todas essas técnicas foi possível entender o mecanismo de interação entre o DNA e os líquidos iônicos, resultados que serão apresentados a seguir.

7.2 Procedimento experimental e metodologia

7.2.1 Preparação da amostra de DNA

O porta-amostra utilizado nos experimentos com DNA é o mesmo utilizado nos experimentos da pinça óptica holográfica, exceto que aqui não utilizamos uma segunda lamínula para tampar o o-ring. Utilizamos o DNA do bacteriófago λ , um vírus que infecta a bactéria *Escherichia Coli*. Sua escolha se deu porque possui tamanho adequado para nossos experimentos, tendo 48.500 pares de base e seu comprimento de contorno (L) vale aproximadamente 16,5 μm . O DNA utilizado em nossos experimentos (New England Biolabs) é marcado com biotina, então é necessário fazer um tratamento na lamínula para garantir que uma das extremidade do DNA fique presa à lamínula.

Seguimos o protocolo desenvolvido por Amitani *et al* [52]. Inicialmente colocamos no interior do o-ring 20 μL de uma solução de BSA-biotinilada (BSA-biot) na concentração de 1,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$, que permanece durante 20 minutos sob uma luz ultravioleta, que tem a função de evitar a proliferação de bactérias. A proteína BSA (proteína albumina de soro bovino, do inglês Bovine Serum Albumin) tem a função de recobrir o fundo da lamínula de vidro. Uma de

suas extremidades se liga ao vidro e a outra que está ligada à vitamina biotina ficará exposta à solução. Passado o tempo de espera, lavamos o o-ring com o tampão A. Retira-se todo o excesso e agora, colocamos uma solução de 20 μL da proteína estreptavidina (STP) em solução tampão (PBS), na concentração de 0,1 mg/mL. Novamente a solução é exposta à luz ultravioleta durante 20 minutos. Para finalizar, lavamos lamínula com PBS e esperamos novamente 20 minutos. Finalmente, a lamínula está pronta para receber a solução de DNA e das microesferas.

Em nossos experimentos de pinça óptica, utilizamos microesferas de poliestireno com 3 μm de diâmetro (Bangs Laboratories, Inc.) recobertas com estreptavidina. Preparamos uma solução de DNA e microesferas, colocamos na nossa lamínula preparada e levamos ao microscópio por cerca de uma hora. A configuração ideal da nossa amostra consiste em umas das extremidades do DNA esteja presa à lamínula e a outra, presa à uma microesfera. A Figura 7.1 ilustra essa situação. O processo detalhado da preparação da amostra pode ser encontrado nas referências [36, 53].

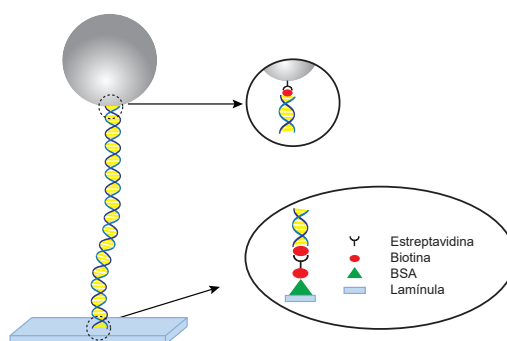


Figura 7.1: Configuração ideal da amostra de DNA para os experimentos de pinça óptica e pinça magnética.

A preparação da amostra de DNA para os experimentos de pinça magnética é idêntica ao da pinça óptica, só substituímos as microesferas de poliestireno por microesferas superparamagnéticas de 2,8 μm de diâmetro (Dynabeads® M-280) também recobertas por estreptavidina. Essas microesferas são as mesmas que foram utilizadas nos experimentos da pinça óptica holográfica.

Neste trabalho estudamos o mecanismo de interação entre a molécula de DNA e os dois líquidos iônicos: [bmim]Cl e [omim]Cl. Ambos foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St Louis, EUA) e usados sem purificação adicional. A solução estoque desses líquidos iônicos foi preparada num tampão PBS de pH 7,4 e concentração de 1 mM de NaCl. A diferença entre os dois líquidos está na quantidade de carbono que compõe a cadeia alquílica, no caso do [bmim]Cl temos quatro átomos de carbono, e no [omim]Cl, temos 8 átomos de carbono. A Figura 7.2 mostra a estrutura química dos dois líquidos iônicos.

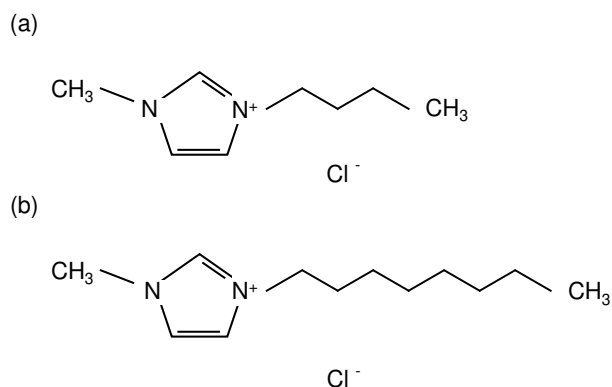


Figura 7.2: Estrutura química do (a) [bmim]Cl e (b) [omim]Cl, respectivamente.

7.2.2 Pinça óptica

7.2.2.1 Montagem experimental

A Figura 7.3 mostra a montagem experimental utilizada em nossos experimentos. Ela é muito semelhante à utilizada nos experimentos de pinça óptica holográfica. Neste caso não há o modulador espacial de luz, o polarizador e o segundo telescópio. Para a observação da imagem das microesferas e gravação do experimento, acoplamos ao microscópio uma câmera CCD, modelo JAI-BM-500GE, com taxa máxima de captura na ordem de 15 *fps*, frames por segundo. O restante do sistema permanece idêntico ao mostrado na seção 6.2.1.

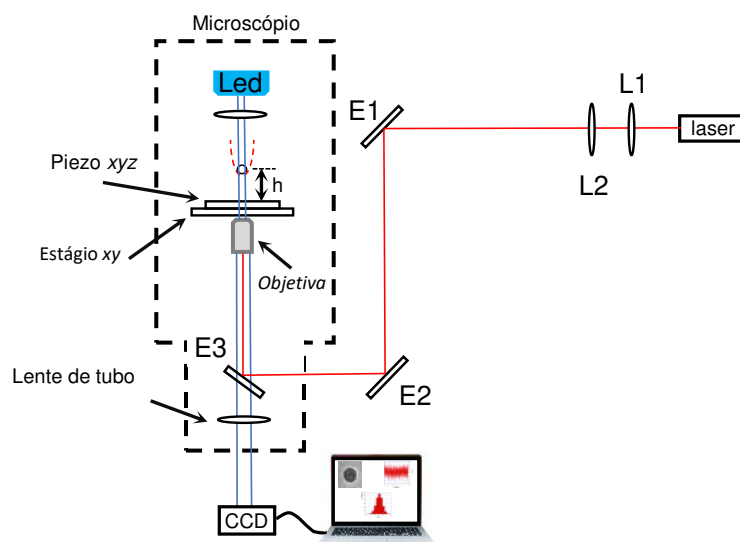


Figura 7.3: Montagem experimental utilizada nos experimentos de pinça óptica.

7.2.2.2 Determinação da curva de força por extensão

Após encontrarmos a configuração ideal da amostra, estiramos a molécula de DNA movendo o deslocador piezoelétrico com velocidade constante, conforme ilustra a Figura 7.4. O estiramento deve ser realizado a baixas velocidades para garantir que a microesfera passe por estados de equilíbrio, ou seja, que a força da pinça óptica ($\vec{F}_{pinça}$) seja igual, em módulo, à força exercida pelo DNA (\vec{F}_{DNA}) em qualquer instante.

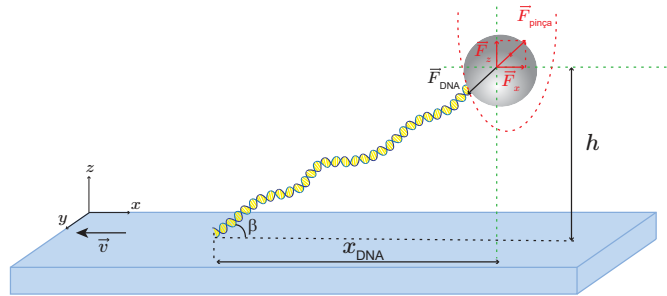


Figura 7.4: Figura ilustrativa de como é realizado o estiramento do DNA.

Observe que nosso estiramento é realizado ao longo do eixo x e a equação 4.31 refere-se a um estiramento ao longo do eixo z , assim, é necessário fazermos uma mudança de variáveis no modelo. Considerando

$$F_x = F \cos \beta = F \left(\frac{x_{DNA}}{z} \right)$$

e

$$z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2},$$

onde h corresponde à altura do pinçamento e x_{DNA} é a projeção da extensão da molécula de DNA ao longo do eixo x . Assim, podemos reescrever a Equação 4.31 como

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}{L} \right)^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2 + h^2}}. \quad (7.1)$$

Utilizaremos esta equação para ajustar os dados experimentais e determinar os valores do comprimento de contorno e persistência para cada estiramento realizado. Utilizaremos os outros dois modelos citados no Capítulo 4, o modelo da cadeia livremente articulada Equação 4.16, e o modelo gaussiano, Equação 4.19.

Para cada estiramento é gravado um vídeo que depois é analisado no software ImageJ. Na análise extraímos a posição do centro da microesfera em função do tempo. Utilizando esses dados e a Equação 7.1 construímos a curva de força por extensão (FEC). O DNA puro se com-

porta como um biopolímero semi-flexível, assim, ajustamos o modelo WLC à essa curva, de onde extraímos os valores do comprimento de contorno e persistência. A molécula é estirada cinco vezes e depois calculamos a média e o erro padrão para o comprimento de contorno e persistência. Encontrando uma molécula com os parâmetros aceitáveis, inserimos, no porta-amostra, a solução do ligante a ser estudado e esperamos um tempo para que ocorra a possível interação. Novamente estiramos o DNA cinco vezes e calculamos os mesmos parâmetros. O modelo utilizado no ajuste varia de acordo com a concentração do ligante. Na seção 7.3.1 detalharemos qual modelo foi utilizado em cada concentração e explicaremos o porquê da escolha. Esse procedimento é repetido até que a última concentração desejada do ligante seja atingida. Após todo esse processo é construído um gráfico do comprimento de contorno e persistência em função da concentração.

7.2.3 Pinça magnética

7.2.3.1 Montagem experimental

Conforme foi dito anteriormente, esta é uma técnica nova que foi implementada no nosso laboratório como parte deste trabalho. Toda a montagem foi pensada dentro das possibilidades dos equipamentos disponíveis. A Figura 7.5 mostra a montagem utilizada em nossos experimentos.

Utilizamos um microscópio invertido Nikon Ti-S. Sobre o estágio xy , montamos um deslocador tridimensional (três estágios lineares de Newport (UMR 5.25)) que controla a posição do ímãs em relação ao porta-amostra. Como ímãs utilizamos cubos magnéticos de neodímio ($\text{Nd}_2\text{Fe}_{14}\text{B}$), com arestas medindo 5 mm. A amostra é iluminada com um Led azul da Thorlabs e para a observação da imagem das microesferas e captura do experimento, utilizamos a mesma câmera dos experimentos de pinça óptica holográfica. Observe que aqui não é necessário utilizar um laser, essa é uma das vantagens da pinça magnética em relação à pinça óptica, pois o laser é um equipamento de custo elevado.

Com a pinça magnética também é possível determinar a curva de força por extensão do DNA. Aqui utilizaremos outra função da técnica, que também é uma vantagem em relação à pinça óptica. Conforme discutido, com a pinça magnética é possível aplicar uma força constante durante todo o experimento. Iremos observar como esta força influencia na interação entre o DNA e os líquidos iônicos. Além disso, podemos estudar a dinâmica da interação, ou seja, ter uma ideia do tempo necessário para se atingir o equilíbrio químico entre o DNA e os líquidos iônicos.

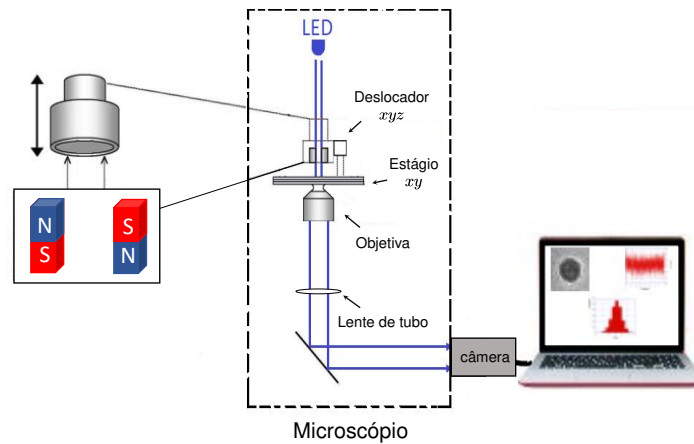


Figura 7.5: Montagem experimental utilizada nos experimentos de pinça magnética.

7.2.3.2 Determinação da extensão da molécula de DNA

De acordo com a Equação 2.11, precisamos determinar a extensão da molécula de DNA para calcular a força aplicada. A Figura 7.6(a) ilustra a situação real do experimento. O centro da microesfera está a uma altura z , medida em relação à superfície superior da lamínula. Para determinar a extensão do DNA, z_{DNA} , precisamos determinar o valor de z e subtrair o valor do raio da microesfera.

A Figura 7.6(b), mostra uma microesfera presa à lamínula, que será nossa referência para determinar a altura. A situação mostrada na Figura 7.6(b) é análoga à Figura 7.6(a), com a objetiva afastada em relação à lamínula.

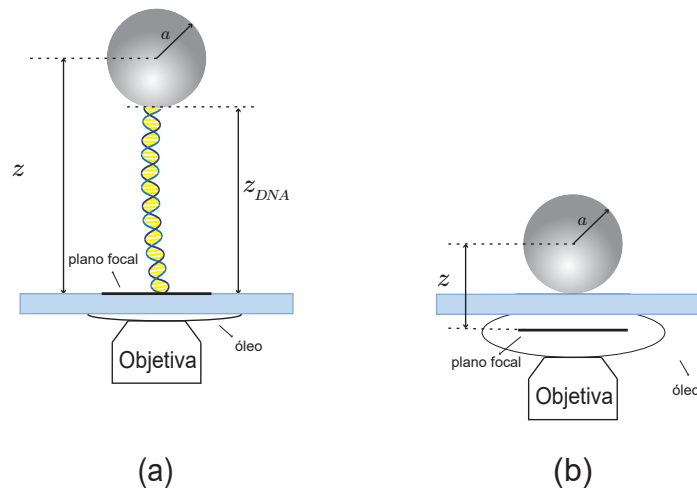


Figura 7.6: (a) Situação real do experimento e (b) situação análoga que utilizamos para determinar a altura da microesfera em relação à lamínula.

Para determinarmos a altura, focalizamos a superfície superior da lamínula e fotografamos a imagem do padrão de difração da microesfera, em seguida, afastamos em $1 \mu\text{m}$ o foco e fotografamos novamente. Esse processo é repetido até alcançarmos $20 \mu\text{m}$. Esse será nosso padrão de calibração. A Figura 7.7, mostra duas imagens do padrão de difração de uma microesfera paramagnética para diferentes alturas.

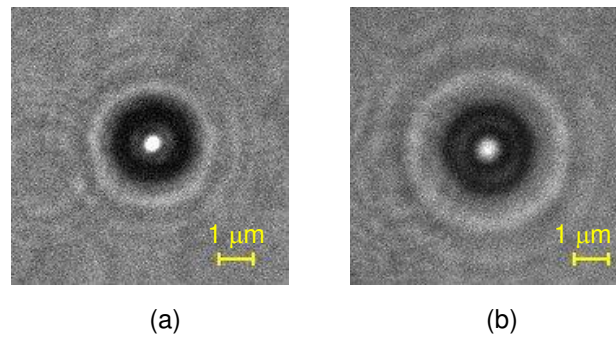


Figura 7.7: Imagem do padrão de difração da microesfera paramagnética para duas alturas diferentes: (a) $5,2 \mu\text{m}$ e (b) $11,9 \mu\text{m}$. As alturas foram medidas em relação à lamínula.

Ao final desse procedimento, obtemos o padrão de difração da microesfera para várias alturas diferentes. Croquette e Gosse [54] propuseram um método no qual se compara o perfil de intensidade, ao longo de uma linha que passa pelo centro da microesfera, com o padrão de calibração. A Figura 7.8(a) mostra a linha selecionada para análise do contraste e a Figura 7.8(b), mostra o contraste do centro da microesfera para três alturas diferentes: $6,4 \mu\text{m}$, $7,4 \mu\text{m}$ e $8,4 \mu\text{m}$. Observe que a diferença entre os três gráficos é muito sutil, o que pode levar a erros significativos na determinação da altura. Além do mais, a altura da microesfera varia devido ao movimento browniano e é necessário analisar uma quantidade muito grande de dados, que nesse tipo de análise, demandaria um tempo enorme.

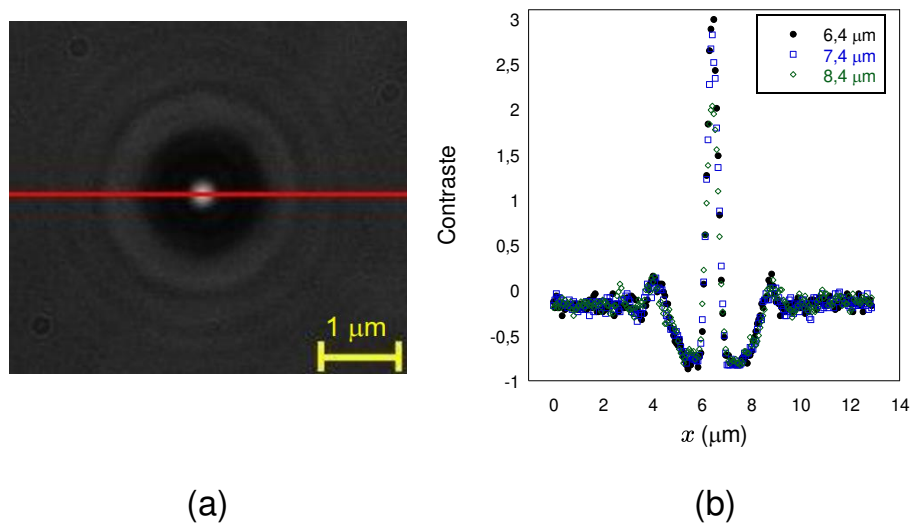


Figura 7.8: (a) Imagem ilustrando a linha selecionada para análise do perfil de intensidade e (b) perfil de intensidade para três alturas diferentes.

Propomos um novo método de análise para determinar a altura da microesfera baseado no contraste máximo do centro da microesfera. O contraste é definido como

$$C(x) = \frac{I(x) - I_0}{I_0}, \quad (7.2)$$

onde $I(x)$ é a intensidade e I_0 refere-se ao background da imagem, ou seja, a intensidade média

da imagem.

A Figura 7.9(a) mostra o gráfico do contraste do centro da microesfera em função da altura. A Figura 7.9(b), mostra o ajuste de um polinômio de grau 3 (linha sólida vermelha) ao dados do contraste (círculos pretos), para $z < 5 \mu\text{m}$ e a Figura 7.9(c), mostra o ajuste para $z > 5 \mu\text{m}$, utilizando uma exponencial decrescente. Com esses ajustes é possível obter uma relação entre o contraste e a altura da microesfera. Assim, calculando o contraste da microesfera durante o experimento e comparando com a calibração, obtemos a altura da microesfera e conseqüentemente a extensão do DNA. A vantagem desta metodologia é que conseguimos analisar todo o vídeo do experimento, que em geral, possui 20.000 frames, e além disso, podemos obter uma incerteza associada na determinação da extensão do DNA. Vale a pena ressaltar que a calibração foi feita com as mesmas microesferas que foram utilizadas na experimento.

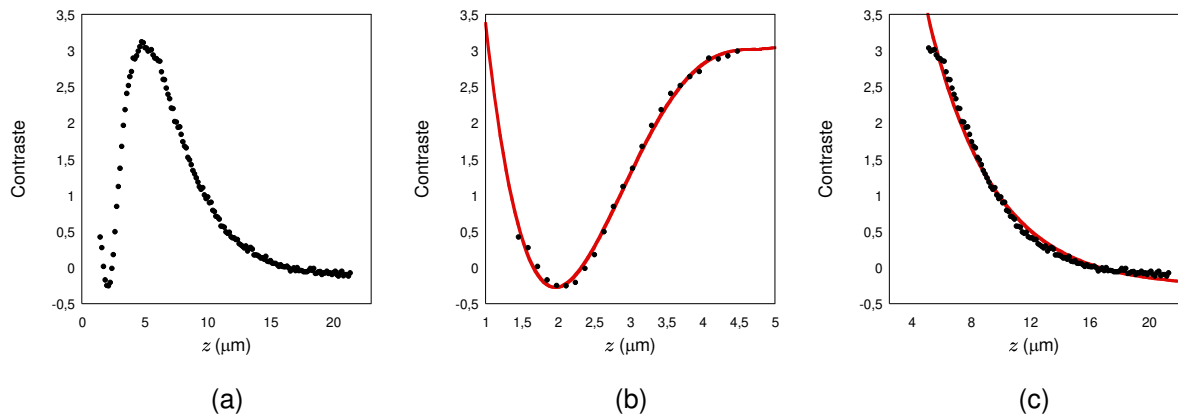


Figura 7.9: (a) Contraste do centro da microesfera em função da altura em relação à lamínula. (b) Ajuste do contraste (linha vermelha), para $z < 5 \mu\text{m}$, utilizando-se um polinômio do quinto grau. (c) Ajuste do contraste (linha vermelha), para $z > 5 \mu\text{m}$, utilizando uma exponencial decrescente.

7.2.3.3 Determinação da força magnética

Para o cálculo da força aplicada ao DNA, utilizaremos a metodologia da seção 6.2.5. Calculando a constante de força com a equação 6.6, encontramos a força aplicada através da equação

$$F = k_{pm} z_{DNA}. \quad (7.3)$$

Essa força pode assumir qualquer direção no espaço, pois é proporcional ao gradiente do campo magnético (Equação 2.9). Em nossos experimentos garantimos que ela aponta na direção z , conforme ilustra a Figura 2.5(a), devido a um alinhamento prévio entre os ímãs e a microesfera. Com os ímãs totalmente afastados da amostra garantimos que não há interação magnética entre eles e a microesfera. Escolhemos uma microesfera que esteja presa a um DNA e medimos, durante alguns minutos, sua posição média. Aproximamos ao máximo o ímã do porta-amostra, conseqüentemente a força magnética começa a atuar na microesfera estirando o DNA. Observamos novamente a posição em função do tempo da microesfera. Para que o alinhamento esteja perfeito, garantindo que a força está sendo aplicada ao longo do eixo z , as posições observadas antes e depois da aproximação dos ímãs devem ser iguais. Caso isso não aconteça, mudamos a posição dos ímãs através do deslocador mostrado na Figura 7.5 e repetimos todo o processo até que as posições coincidam.

Implementamos a automação da análise do nosso sistema utilizando o software LabVIEW, de modo que todas as medidas são monitoradas em tempo real. A Figura 7.10 mostra o painel frontal que monitora todas as medidas.

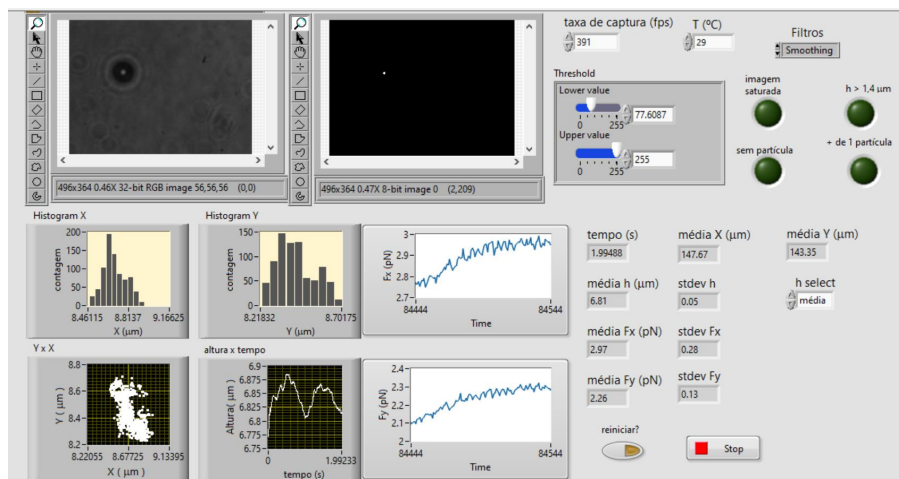


Figura 7.10: Painel frontal do LabView para o experimento de pinça magnética, que monitora as medidas em tempo real.

Após o devido alinhamento, monitoramos por alguns minutos o valor da extensão do DNA para verificar se não há erro sistemático na análise do experimento. Espera-se que a extensão permaneça constante durante esse período. Caso isso ocorra, trocamos a concentração da solução e observamos novamente o valor da extensão do DNA em função do tempo. Um gráfico típico pode ser visto nas Figuras 7.16 e 7.17.

7.2.4 Calorimetria isotérmica de titulação

As análises de calorimetria isotérmica de titulação foram realizadas a 298,15 K em um calorímetro, modelo CSC 4200 (TA Instruments, New Castle, EUA), controlado pelo software ITCRun. As soluções de [bmim]Cl, [omim]Cl e λ -DNA nas concentrações $3,75 \times 10^{-1}$ M, $2,5 \times 10^{-1}$ M, $1,00 \times 10^{-2}$ mM, respectivamente, foram preparadas no mesmo tampão PBS usado nos experimentos de pinça óptica e magnética. As soluções foram desgaseificadas, a célula de amostra foi carregada com 1,8 ml da solução de DNA, a célula de referência foi carregada com 1,8 ml da solução tampão (PBS) e a seringa de injeção foi carregada com [bmim]Cl ou [omim]Cl. As amostras foram agitadas constantemente a 180 rpm. Após atingir o equilíbrio térmico, alíquotas de 10 μ L das soluções de [bmim]Cl ou [omim]Cl foram tituladas 48 vezes com uma microseringa (marca Hamilton) em intervalos de 500 e 250 segundos, respectivamente. Os dados foram preparados para análise subtraindo o calor de diluição (medido durante a titulação da solução de [bmim]Cl ou [omim]Cl no solvente da solução) do calor liberado ou absorvido durante a titulação do [bmim]Cl ou [omim]Cl na solução de DNA (a titulação do tampão na solução de DNA produziu efeitos térmicos desprezíveis).

7.2.5 Condutometria

As medidas de condutometria foram realizadas com um medidor de condutividade digital DM-32 (Digimed, Brasil) com método de titulação. O equipamento foi inicialmente calibrado por solução padrão de KCl com concentração de $1,00 \times 10^{-2}$ M. Após isso, 3 mL do tampão PBS foram transferidos para uma célula de vidro contendo um agitador magnético, que foi colocado em banho-maria com temperatura ($298,15 \pm 0,10$ K). As soluções de [bmim]Cl e [omim]Cl nas concentrações 200 mM e 17,5 mM foram preparadas em tampão PBS e volumes de 25 μ L e 100 μ L foram titulados trinta vezes na célula por uma micropipeta, respectivamente. A célula foi agitada após cada titulação e mantida em repouso para atingir o equilíbrio térmico antes da medição. Cada valor de condutividade foi medido pelo menos três vezes, e a incerteza foi estimada em 1%.

7.3 Resultados

7.3.1 Pinça óptica

As Figuras 7.11(a) e 7.11(b) mostram algumas curvas de força por extensão (FECs) típicas medidas para o complexo DNA-[bmim]Cl, obtidas para diferentes concentrações de [bmim]Cl ($0 \leq [[\text{bmim}]\text{Cl}] \leq 250$ mM). Observe que à medida que a concentração de [bmim]Cl aumenta, há uma diminuição monotônica na extensão medida dos complexos DNA-[bmim]Cl.

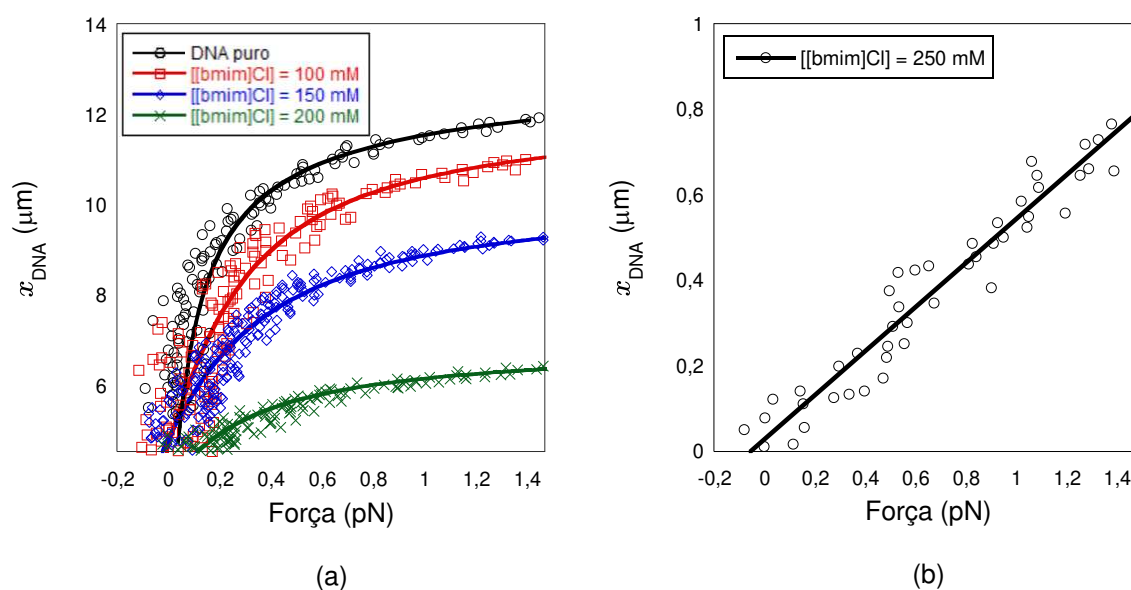


Figura 7.11: Curvas típicas de força-extensão (FECs) obtidas para diferentes concentrações totais de [bmim]Cl. Os símbolos referem-se aos dados experimentais e as linhas sólidas correspondem aos ajustes. (a) para o DNA puro usamos o modelo WLC para ajustar os dados experimentais, enquanto que para [[bmim]Cl] = 100 mM, 150 mM e 200 mM usamos o modelo da cadeia livremente articulada. (b) ajuste dos dados experimentais correspondentes a [[bmim]Cl] = 250 mM utilizando o modelo gaussiano.

Para concentrações baixas de [bmim]Cl (< 100 mM), os dados experimentais indicam que os complexos DNA-[bmim]Cl ainda se comportam como polímeros semi-flexíveis, uma vez

que o ajuste realizado, usando o modelo WLC, retorna valores confiáveis para os comprimentos de persistência e de contorno (círculos pretos na Figura 7.11(a)). O ajuste com o modelo WLC corresponde às linhas sólidas mostradas na Figura 7.11(a) para o DNA puro. Para o concentração de $[[\text{bmim}]\text{Cl}] = 50 \text{ mM}$, também foi utilizado o modelo WLC, gráfico não mostrado no Figura 7.11(a).

Por outro lado, no intervalo $100 \text{ mM} \leq [[\text{bmim}]\text{Cl}] \leq 200 \text{ mM}$, observamos que os valores obtidos para o comprimento de contorno, usando o modelo WLC, foram muito diferentes do valor estimado a partir da extensão máxima medida para os complexos DNA- $[\text{bmim}]\text{Cl}$, o que indica fortemente que a elasticidade entrópica de tais complexos está se desviando do comportamento esperado de cadeias semi-flexíveis [55], quadrados vermelhos, losangos azuis e cruces verdes na Figura 7.11(a). A forma dessas curvas sugere, no entanto, que se pode usar o modelo da cadeia livremente articulada para analisar essas concentrações. Os ajustes com esse modelo, que é válido para cadeias flexíveis, são mostrados na Figura 7.11(a) como linhas sólidas nas curvas correspondentes às concentrações $[[\text{bmim}]\text{Cl}] = 100 \text{ mM}$, 150 mM e 200 mM . O resultado obtido para o comprimento de contorno, utilizando esse modelo, está dentro do valor estimado a partir da extensão máxima dos complexos. Portanto, tal análise indica que os complexos DNA- $[\text{bmim}]\text{Cl}$ estão sofrendo um transição do regime semi-flexível para o flexível à medida que a concentração de $[\text{bmim}]\text{Cl}$ aumenta em solução [55].

Finalmente, para a concentração $[[\text{bmim}]\text{Cl}] = 250 \text{ mM}$, as FECs se tornam linhas retas e são ajustadas usando o modelo gaussiano, que é válido para polímeros flexíveis, confirmando assim a transição no regime de elasticidade. Os dados e o ajuste correspondente para esta concentração de $[\text{bmim}]\text{Cl}$ são mostrados na Figura 7.11(b), círculos pretos e linha sólida, respectivamente.

A Figura 7.12 mostra algumas FECs obtidas para os complexos DNA- $[\text{omim}]\text{Cl}$, medidas para diferentes concentrações ($0 < [[\text{omim}]\text{Cl}] \leq 3,0 \text{ mM}$, que é a faixa de concentração relevante na qual o interação ocorre neste caso). Para o DNA puro, realizamos o ajuste utilizando o modelo WLC. No intervalo, $1,0 \text{ mM} \leq [[\text{omim}]\text{Cl}] \leq 3,0 \text{ mM}$, utilizamos o modelo da cadeia livremente articulada, pelo mesmo motivo citado no caso do complexos DNA- $[\text{bmim}]\text{Cl}$. Novamente, todos os ajustes são mostrados na Figura 7.12 como linhas sólidas. Neste caso, o modelo gaussiano não foi utilizado, pois não obtivemos uma FEC linear para qualquer concentração de $[\text{omim}]\text{Cl}$.

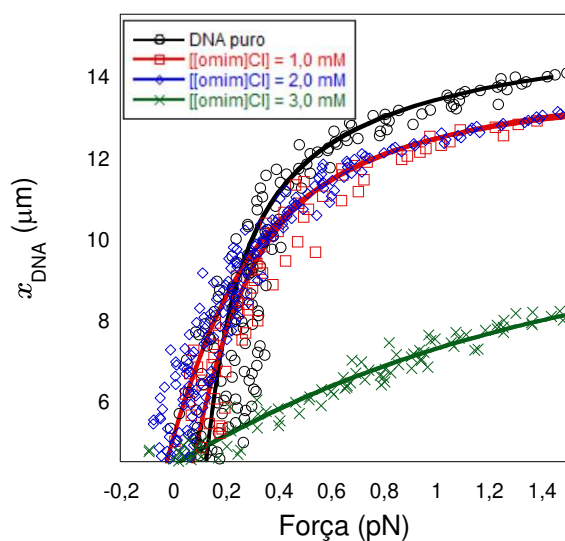


Figura 7.12: Curvas típicas de força-estiramento (FECs) obtidas para diferentes concentrações totais de [omim]Cl. Os símbolos referem-se aos dados experimentais e as linhas sólidas correspondem aos ajustes. Para DNA puro utilizamos ajustamos o modelo WLC e para as demais concentrações utilizamos o modelo da cadeia livremente articulada.

Na Figura 7.13(a), mostramos o comportamento do comprimento de persistência (A) dos complexos DNA-[bmim]Cl em função da concentração total de [bmim]Cl (círculos pretos), obtidos a partir dos ajustes discutidos anteriormente. No modelo WLC, o comprimento de persistência e o comprimento de contorno são obtidos diretamente do ajuste da FEC [34, 56]. Para o modelo da cadeia livremente articulada, o comprimento de persistência foi calculado como sendo duas vezes o segmento de Kuhn, um parâmetro obtido diretamente do ajuste da FEC, assim como o comprimento de contorno [32].

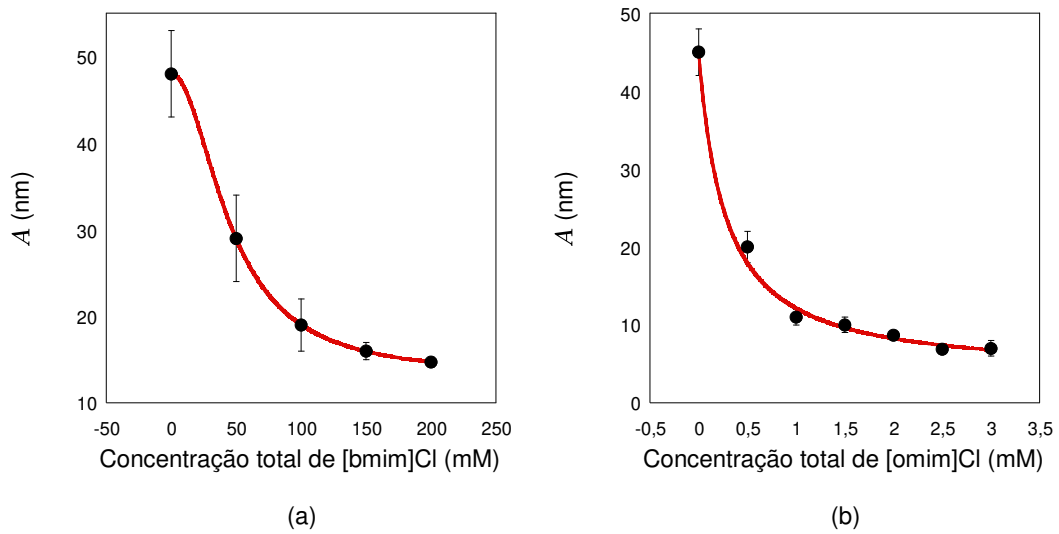


Figura 7.13: (a) e (b): comprimento de persistência A em função da concentração total de [bmim]Cl e [omim]Cl na amostra, respectivamente. Os círculos pretos referem-se aos dados experimentais e as linhas sólidas vermelhas referem-se aos ajustes usando o modelo estatístico quenched-disorder com a isoterma de ligação de Hill (substituindo a Equação 7.5 na Equação 7.4). Os resultados obtidos para os parâmetros de ligação dos ajustes são mostrados na 7.1.

Observe que o comprimento de persistência exibe um decaimento monotônico, ou seja, os complexos DNA-[bmim]Cl tornam-se mais flexíveis à medida que mais [bmim]Cl interage com a dupla hélice. A partir desta curva é possível obter parâmetros relacionados a físico-química da interação que ocorre entre DNA e [bmim]Cl. Para realizar tal tarefa, usamos um modelo estatístico quenched-disorder, desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo, que basicamente modela como o comprimento de persistência varia conforme o ligante interage com o DNA, e é dado por

$$\frac{1}{A} = \frac{1 - r/r_{max}}{A_0} + \frac{r/r_{max}}{A_1}, \quad (7.4)$$

onde r é a fração de pares de base ocupadas no DNA para uma dada concentração, r_{max} é o valor saturado de r , A_0 é o comprimento de persistência do DNA na ausência do líquido iônico e A_1 é o comprimento de persistência do DNA saturado com o líquido iônico. Note que a Equação 7.4 não explicita a dependência de r com a concentração do líquido iônico. Podemos relacioná-los utilizando uma isoterma de ligação, que relaciona a fração de pares de base ligadas com a concentração livre de líquido iônico em solução. Escolhemos a isoterma de ligação de Hill, que é uma das mais simples e leva em consideração o efeito de cooperatividade [56, 57]. Ela é descrita por

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{(KC_f)^n}{1 + (KC_f)^n}, \quad (7.5)$$

onde K é a constante de equilíbrio de associação, n é o expoente de Hill, um parâmetro que está relacionado com o grau de cooperatividade da reação. Se $n < 1$, dizemos que a interação

apresenta uma cooperatividade negativa, ou seja, uma molécula de líquido iônico que se liga ao DNA diminui a afinidade do mesmo pelas moléculas do líquido iônico que se ligarão posteriormente. Se $n = 1$, a interação é não-cooperativa, isto é, a afinidade de ligação é independente do número prévio de moléculas ligadas ao DNA. E finalmente, se $n > 1$ a interação apresenta uma cooperatividade positiva, uma molécula de líquido iônico que se liga ao DNA, aumenta a afinidade do mesmo pelas moléculas do líquido iônico subsequentes.

Na Figura 7.13(a), mostramos o ajuste (linha sólida vermelha) da Equação 7.4 aos nossos dados experimentais de [bmim]Cl, utilizando o procedimento descrito na referência [56]. Os resultados obtidos para os parâmetros foram $K = (11 \pm 1) \text{ M}^{-1}$, $n = (2,0 \pm 0,2)$ e $A_1 = (13 \pm 3) \text{ nm}$. O resultado obtido para a constante de equilíbrio de associação K indica que existe uma afinidade fraca (embora não desprezível) entre DNA e [bmim]Cl, sugerindo que forças motrizes fracas governam a interação. Por outro lado, o valor de ($n > 1$) indica que a interação entre DNA e [bmim]Cl é positivamente cooperativa, e assim a ligação de moléculas de [bmim]Cl facilita a ligação subsequente de outras moléculas de [bmim]Cl [56,58]. Por fim, o valor de A_1 confirma o decaimento do comprimento de persistência verificado nos dados experimentais.

Para uma comparação direta, na Figura 7.13(b) mostramos o comportamento equivalente do comprimento de persistência em função da concentração total de [omim]Cl. Observe que o comprimento de persistência exibe novamente um decaimento monotônico. A linha sólida vermelha refere-se ao ajuste com a Equação 7.4 como no caso anterior. Os resultados obtidos para os parâmetros de ligação foram $K = (480 \pm 50) \text{ M}^{-1}$, $n = (1,0 \pm 0,1)$ e $A_1 = (4 \pm 1) \text{ nm}$. O resultado obtido para a constante de ligação de equilíbrio K é cerca de uma ordem de grandeza maior do que o resultado obtido para [bmim]Cl, mostrando que a interação do [omim]Cl com o DNA é mais forte. Por outro lado, o resultado obtido para o expoente de Hill ($n \sim 1$) mostra que neste caso a interação é não cooperativa, com moléculas de [omim]Cl ligando-se individualmente ao longo da dupla hélice e não interferindo na ligação das moléculas subsequentes de [omim]Cl [56,58]. Finalmente, o resultado obtido para A_1 confirma novamente o forte decaimento do comprimento de persistência induzido pelos líquidos iônicos estudados.

Para fins de comparação, na Tabela 7.1 apresentamos esquematicamente os parâmetros de ligação obtidos para a interação do DNA com os dois líquidos iônicos estudados.

Parâmetros de ligação obtidos a partir dos dados de pinça óptica para as interações do DNA com os dois líquidos iônicos utilizados: [bmim]Cl e [omim]Cl.

Na Figura 7.14(a) mostramos o comportamento do comprimento de contorno normalizado (L/L_0 , onde L_0 é o comprimento do contorno do DNA puro) do complexo DNA-[bmim]Cl em função da concentração total de [bmim]Cl. Observe que o comprimento de contorno normalizado apresenta um decaimento monotônico, indicando que o [bmim]Cl tende a compactar a molécula de DNA após a interação. A Figura 7.14(b), por outro lado, mostra o comportamento do comprimento de contorno normalizado dos complexos DNA-[omim]Cl em função da concentração total de [omim]Cl na amostra. O comportamento qualitativo é o mesmo, um

Tabela 7.1: Parâmetros físico-químicos obtidos a partir dos dados de pinça óptica para as interações do DNA com os dois LIs utilizados: [bmim]Cl e [omim]Cl.

Líquido iônico	K (M^{-1})	n	A_1 (nm)
[bmim]Cl	11 ± 1	$2,0 \pm 0,2$	13 ± 3
[omim]Cl	480 ± 50	$1,0 \pm 0,1$	4 ± 1

decaimento monotônico, embora mais forte no último caso.

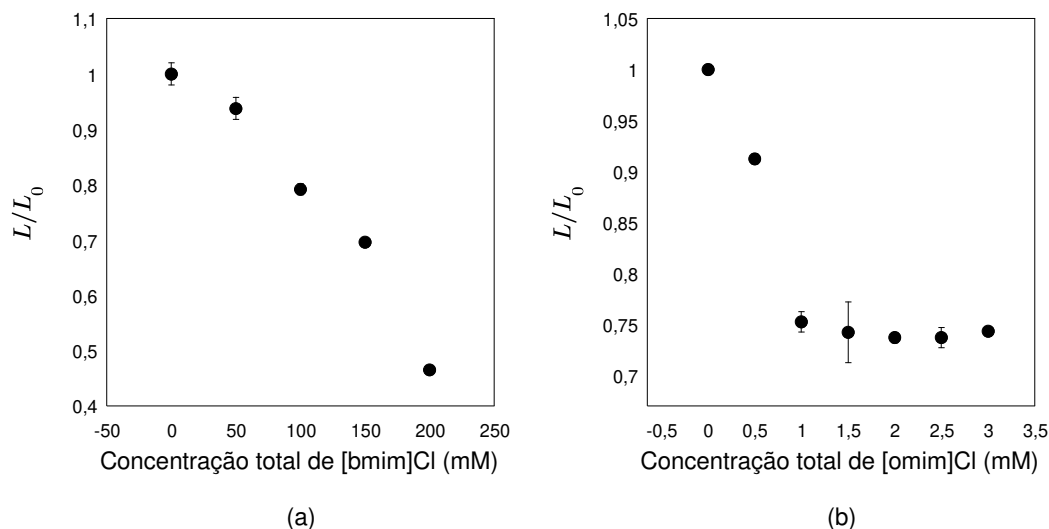


Figura 7.14: Comprimento de contorno normalizado em função da concentração total de (a) [bmim]Cl e (b) [omim]Cl.

A partir dos valores do comprimento de persistência e de contorno, obtidos através dos ajustes dos modelos WLC e da cadeia livremente articulada, calculamos o raio de giro dos complexos de DNA formados com os líquidos iônicos, que são apresentados nas Figuras. 7.15(a) e (b) para [bmim]Cl e [omim]Cl, respectivamente. Para $[[\text{bmim}]\text{Cl}] = 250 \text{ mM}$, o raio de giro foi obtido diretamente do ajuste do modelo gaussiano mostrado na Figura 7.11(b). Observe na Figura 7.15(a) que o raio de giro diminui monotonicamente até a concentração de $[[\text{bmim}]\text{Cl}] = 250 \text{ mM}$. Para concentrações mais altas de [bmim]Cl, a microesfera cola na lamínula, impossibilitando o estiramento da molécula de DNA. Na Figura 7.15(b) podemos ver que R_g também diminui monotonicamente para os complexos DNA-[omim]Cl, como no caso anterior. Tais resultados confirmam que os dois líquidos iônicos estudados promovem uma compactação na molécula de DNA.

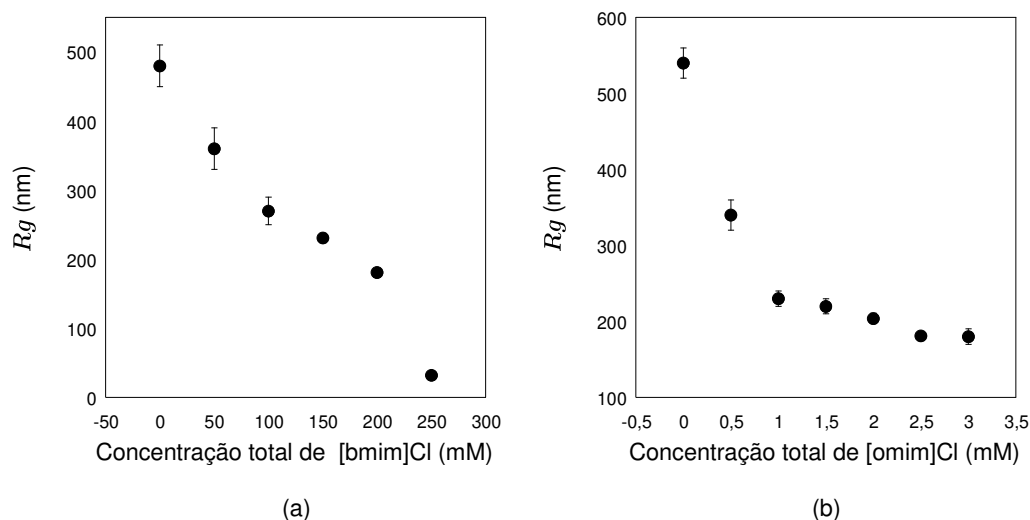


Figura 7.15: Raio de giro em função da concentração total de (a) [bmim]Cl e (b) [omim]Cl.

7.3.2 Pinça magnética

Ao contrário do que foi feito nos experimentos de pinça óptica, na pinça magnética aplicamos uma força constante na molécula de DNA e verificamos como tal força influencia no comportamento da extensão do DNA quando os líquidos iônicos são introduzidos na amostra. A ideia é investigar a influência da força constante aplicada na compactação do DNA promovida pelos líquidos iônicos, bem como obter algumas informações sobre a cinética da compactação.

Na Figura 7.16(a), (b) e (c) mostramos alguns dados obtidos experimentalmente para os complexos DNA-[bmim]Cl e na 7.17(a) e (b) para os complexos DNA-[omim]Cl. Na Figura 7.16(a) são mostrados os dados correspondentes para uma força constante aplicada de $(0,17 \pm 0,03)$ pN em uma molécula de DNA pura (círculos pretos), para a qual a extensão permanece constante durante ~ 30 minutos, indicando a robustez da nossa metodologia. Após esse intervalo de tempo trocamos a solução introduzindo o líquido iônico na concentração $[[\text{bmim}]\text{Cl}] = 250$ mM. Observe que a extensão do DNA também permanece constante nesta situação por ~ 65 min (quadrados vermelhos), mostrando que o [bmim]Cl não promove compactação na molécula de DNA nessas condições experimentais. A Figura 7.16(b) mostra dados semelhantes obtidos com o mesmo procedimento e concentração total de [bmim]Cl, mas agora com uma força aplicada constante de $(0,032 \pm 0,004)$ pN. A conclusão é a mesma, novamente o líquido iônico não induziu nenhuma compactação na molécula de DNA. Finalmente, repetimos o procedimento com o DNA amarrado livre em solução, ou seja, sem força aplicada, como mostra a Figura 7.16(c). Após a introdução de [bmim]Cl na mesma concentração, a microesfera gruda à lamínula impedindo novas medidas. Esses resultados mostram que o [bmim]Cl compacta a molécula de DNA em solução basicamente apenas se o biopolímero estiver livre de forças aplicadas. Além disso, os experimentos de pinça magnética também mostram que essa compactação é rápida quando ocorre, e a forma compactada é alcançada alguns minutos após a introdução do líquido iônico na solução tampão ao redor do DNA.

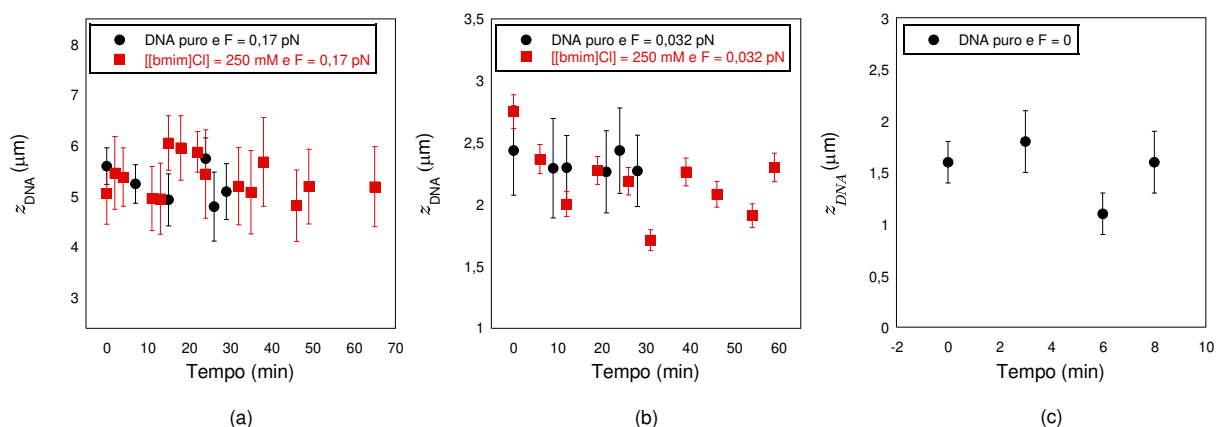


Figura 7.16: Extensão do DNA em função do tempo, nas três figuras, os círculos pretos referem-se ao DNA puro e os quadrados vermelhos referem-se ao complexo DNA-[bmim]Cl. Em (a) uma força de $(0,17 \pm 0,03)$ pN é aplicada ao complexo DNA-[bmim]Cl, em (b) a força aplicada vale $(0,032 \pm 0,004)$ pN e em (c) a força é nula.

Aplicamos o mesmo procedimento para estudar os complexos DNA-[omim]Cl. A Figura 7.17(a) mostra a situação para uma força aplicada de $(0,54 \pm 0,05)$ pN e uma concentração de [omim]Cl de 3,5 mM. Observe que a força aplicada dificultou o processo de compactação neste

caso. A Figura 7.17(b), por outro lado, mostra a situação para uma força aplicada igual a $(0,28 \pm 0,06)$ pN e a mesma concentração de [omim]Cl. Neste caso, quando introduzimos o [omim]Cl na solução, a extensão medida do complexo diminui consideravelmente, e aproximadamente após 7 minutos ele estava completamente compactado, com a microesfera grudada na lamínula. Tal resultado confirma que o processo de compactação é relativamente rápido como no caso anterior, mas agora pode ocorrer mesmo que uma força constante da ordem de $\sim 0,28$ pN seja aplicada ao complexo DNA-[omim]Cl.

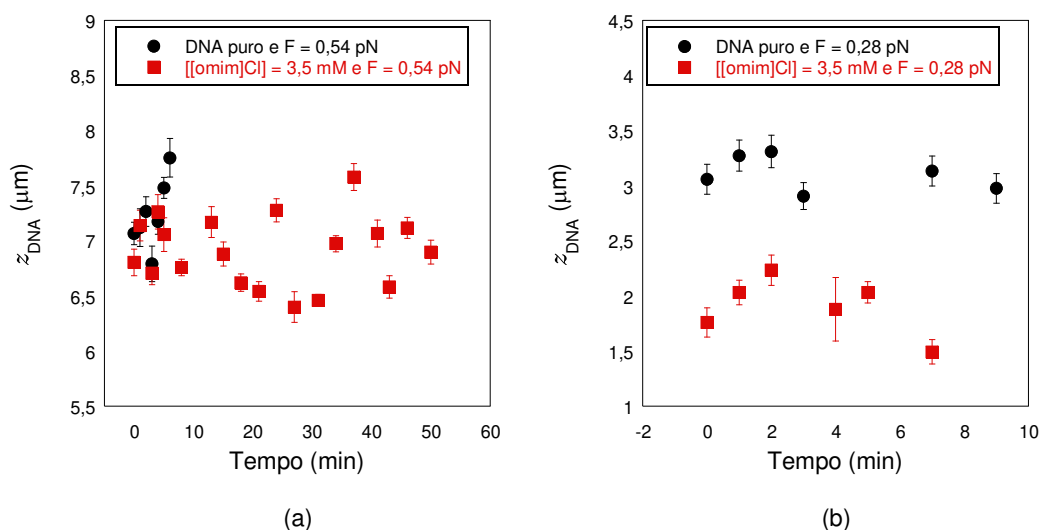


Figura 7.17: Extensão do DNA em função do tempo, nas duas figuras, os círculos pretos referem-se ao DNA puro e os quadrados vermelhos referem-se ao complexos DNA-[omim]Cl. (a) Uma força de $(0,54 \pm 0,05)$ pN é aplicada ao DNA e em (b) uma força de $(0,28 \pm 0,06)$ pN.

A compactação do DNA promovida pelo [bmim]Cl é mais fraca que a promovida pelo [omim]Cl, de acordo com os dados de pinça óptica apresentados na seção anterior. De fato, em nossos experimentos de pinça magnética verificamos que a compactação do DNA induzida por [bmim]Cl ocorre apenas quando a força aplicada é zero, ou seja, quando o complexo DNA-[bmim]Cl estão basicamente livres em solução. De fato, manter o complexo DNA-[bmim]Cl submetido a forças tão pequenas quanto $\sim 0,03$ pN dificulta a compactação promovida pelo [bmim]Cl. Note que tal resultado não está em contradição com os dados de pinça óptica, pois nele deixamos os complexos livres de forças ao alterar a concentração do líquido iônico na amostra, conforme mencionado anteriormente. Para os complexos DNA-[omim]Cl, por outro lado, a situação é diferente e podemos medir uma compactação significativa mesmo com forças de estiramento constantes aplicadas tão pequenas quanto $\sim 0,28$ pN.

7.3.3 Calorimetria isotérmica de titulação e condutometria

A calorimetria isotérmica de titulação (ITC) foi utilizada para investigar o comportamento termodinâmico associado às interações envolvidas na formação dos complexos DNA-[bmim]Cl e DNA-[omim]Cl, complementando assim a caracterização realizada com as técnicas de molécula única, pinça óptica e pinça magnética, permitindo uma comparação direta entre os experimentos de moléculas únicas e os experimentos de múltiplas moléculas.

A Figura 7.18(a), mostra o termograma para as titulações de $3,75 \times 10^{-1}$ M de [bmim]Cl numa solução de DNA, com concentração igual a $[DNA] = 1,00 \times 10^{-2}$ mM. A Figura 7.18(b), compara as medidas independentes das variações de entalpia observadas (ΔH_{obs}) obtidas a partir da titulação de [bmim]Cl na solução de DNA (dados da Figura 7.18(a)) e no tampão PBS (termograma não mostrado) a 298,15 K. Para ambas as titulações, os valores de ΔH_{obs} medidos estão no intervalo entre 2 a 20 mM de [bmim]Cl e ocorrem com uma mudança qualitativa em seu comportamento: inicialmente, adições sucessivas de [bmim]Cl promovem um aumento da entalpia, que atinge um valor máximo e depois diminui para as adições subsequentes de [bmim]Cl. A mudança de entalpia registrada nesse intervalo de concentração total de [bmim]Cl ($2 \leq [bmim]Cl \leq 20$ mM) é claramente da mesma magnitude para ambos os ensaios apresentados na Figura 7.18(b), mostrando assim que o comportamento é independente da presença de DNA. Portanto, também investigamos o fenômeno observado usando medidas de condutometria nesse mesmo intervalo de concentração total de [bmim]Cl, com titulações de [bmim]Cl na solução de PBS.

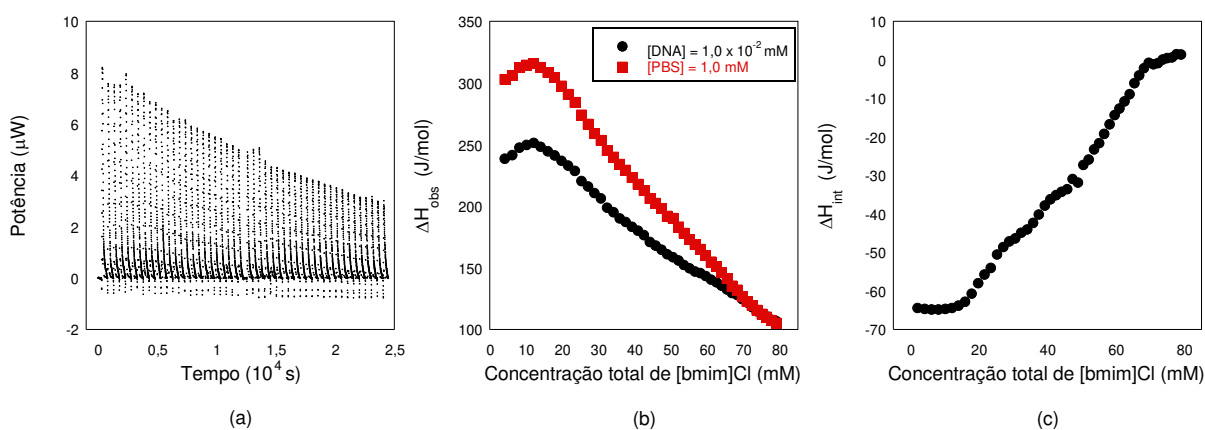


Figura 7.18: Titulação calorimétrica de [bmim]Cl em uma solução de DNA a 298,15 K. (a) termograma para as titulações de $3,75 \times 10^{-1}$ M de [bmim]Cl numa solução de DNA de $1,0 \times 10^{-2}$ mM. (b) ΔH_{obs} em função da concentração total de [bmim]Cl para a adição de $3,75 \times 10^{-1}$ M de [bmim]Cl no tampão PBS (círculos pretos) e na solução de DNA de $1,0 \times 10^{-2}$ mM (quadrados vermelhos). (c) entalpia de interação corrigida em função da concentração total de [bmim]Cl.

Círculos pretos referem-se aos dados experimentais e a linha vermelha refere-se a um ajuste com a integral de uma função sigmóide [59], de onde o valor da CAC foi obtido, $CAC = (8,0 \pm 0,4)$ mM

A Figura 7.19 mostra a variação da condutividade elétrica κ de uma solução de [bmim]Cl em função da concentração de [bmim]Cl a 298,15 K, os círculos pretos referem-se aos dados experimentais. A curva mostra que a condutividade elétrica de [bmim]Cl apresenta uma mudança significativa na inclinação no ponto marcado na figura. A linha vermelha refere-se a um ajuste com a integral de uma função sigmóide [59], de onde o valor da concentração crítica de agregação (CAC) [60] foi obtido, $CAC = (8,0 \pm 0,4)$ mM. Acima da CAC, [bmim]Cl pode formar agregados semelhantes a micelas devido à sua anfifilia inerente. Este valor obtido aqui para o CAC é diferente daquele obtido por Ding *et al.* [45] para o sistema [bmim]Cl/Tris-HCl (5 mM) nas mesmas condições de pH e temperatura, indicando que o tampão usado para o equilíbrio iônico teve um efeito significativo na agregação de [bmim]Cl.

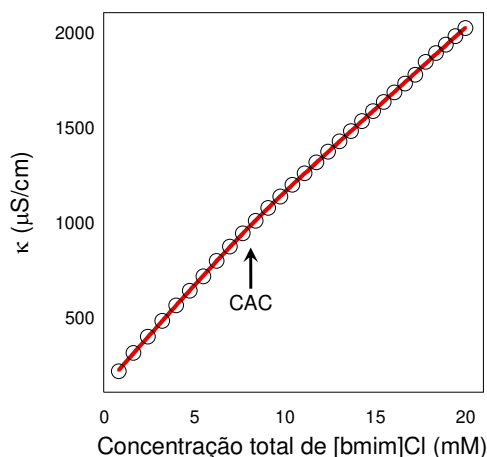


Figura 7.19: Dependência da condutividade elétrica κ com a concentração total de [bmim]Cl na solução tampão PBS. Círculos pretos referem-se aos dados experimentais e a linha vermelha refere-se a um ajuste com a integral de uma função sigmóide [59], de onde o valor da CAC foi obtido, $CAC = (8,0 \pm 0,4)$ mM.

Finalmente, na Figura 7.18(c) mostramos a variação de entalpia da interação correspondente, ΔH_{int} , em função da concentração total de [bmim]Cl, que foi calculada subtraindo as duas curvas mostradas na Figura 7.18(b) (curva DNA - curva PBS) [61].

A variação de entalpia ΔH_{int} medida em um experimento de calorimetria isotérmica de titulação representa uma soma de calor devido à vários fenômenos, como a formação/dissociação de agregados [bmim]Cl, a ligação de [bmim]Cl ao DNA, os efeitos de diluição e as mudanças na conformação de [bmim]Cl e/ou estruturas de DNA. Entre estes, os efeitos de diluição e a formação/dissociação de agregados [bmim]Cl foram subtraídos da titulação de controle do líquido iônico no tampão PBS (quadrados vermelhos na Figura 7.18(b)), como já mencionado.

Quando a concentração total de [bmim]Cl é inferior a 15 mM podemos ver (Figura 7.18(c)) que aumentando a concentração de [bmim]Cl, a variação de entalpia obtida é constante e negativa com um valor de (-64 ± 1) J/mol. Como esse comportamento é semelhante ao encontrado para interações eletrostáticas típicas [62–64], podemos concluir que essas interações predominam nessa faixa de concentração. Quando a concentração total de [bmim]Cl é superior a 15 mM, a variação de entalpia é continuamente reduzida com a adição de [bmim]Cl e, eventualmente, atinge um valor próximo de zero em uma concentração total de [bmim]Cl de ~ 70 mM, quando a saturação começa a ocorrer. Devido à sua estrutura, o [bmim]Cl também pode interagir com o DNA através de forças hidrofóbicas entre suas cadeias de hidrocarbonetos e as bases hidrofóbicas do DNA. Assim, os dados da Figura 7.18(c) sugerem fortemente que tais interações hidrofóbicas são a força motriz mais relevante para a ligação de [bmim]Cl ao DNA em concentrações de [bmim]Cl acima de ~ 15 mM. Embora [bmim]Cl tenha uma cadeia hidrofóbica curta, tal mecanismo se assemelha à ligação entre surfactantes e proteínas que também são exotérmicas [65].

A adição sucessiva de [bmim]Cl sugere que a ligação do [bmim]Cl ao DNA ocorre com saturação gradual e, ao final do processo, uma nova forma estruturada dos complexos DNA-[bmim]Cl é alcançada.

Repetimos o mesmo procedimento para investigar o comportamento termodinâmico associado à interação entre o [omim]Cl e DNA. A Figura 7.20(a), mostra o termograma para as titulações de $2,5 \times 10^{-2}$ M de [omim]Cl numa solução de DNA, com concentração igual a $[DNA] = 1,00 \times 10^{-2}$ mM. A Figura 7.20(b) mostra os gráficos de ΔH_{obs} para a titulação de [omim]Cl

na solução de DNA e na solução de PBS, ambas a 298,15 K. A curva de titulação de [omim]Cl na solução de DNA (círculos pretos) satura em altas concentrações de [omim]Cl, indicando um valor constante de ΔH_{obs} nesse intervalo de concentração. Além disso, a curva de diluição de [omim]Cl no tampão PBS (quadrados vermelhos) apresenta um comportamento quase semelhante, atingindo um decréscimo constante próximo à concentração de 1,35 mM, embora seja quantitativamente diferente. Essa mudança demonstra uma possível transição para um novo estado molecular. Assim, novamente usamos medidas de condutometria para verificar a possibilidade de novos eventos moleculares ocorrerem durante a titulação de [omim]Cl em solução tampão de PBS.

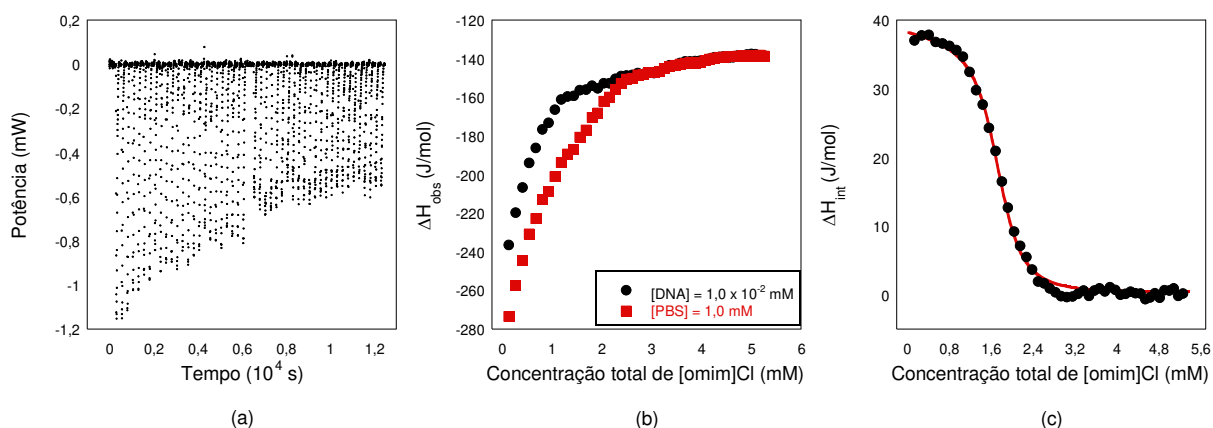


Figura 7.20: Titulação calorimétrica de [omim]Cl em uma solução de DNA a 298,15 K. (a) termograma para as titulações de $2,5 \times 10^{-2}$ M de [omim]Cl numa solução de DNA de $1,0 \times 10^{-2}$ mM. (b) ΔH_{obs} em função da concentração total de [omim]Cl para a adição de $2,5 \times 10^{-2}$ M de [omim]Cl no tampão PBS (círculos pretos) e na solução de DNA de $1,0 \times 10^{-2}$ mM (quadrados vermelhos). (c) entalpia de interação corrigida em função da concentração total de [omim]Cl (círculos pretos) e a linha sólida vermelha refere-se ao ajuste da Equação 7.6.

A Figura 7.21 mostra que a condutividade elétrica da solução de [omim]Cl aumenta linearmente à medida que a concentração de [omim]Cl aumenta. Assim, nesse intervalo de concentração não há evidências para a formação de agregados de [omim]Cl, e assim concluímos que esse líquido iônico interage na forma de monômero com o DNA em nossos experimentos. Tejwant *et al.* [66], mediu a concentração em que a formação de agregados [omim]Cl começa a ocorrer para um tampão fosfato (50 mM), encontrando um valor de CAC de 4,4 mM. Tal estudo corrobora com nossos achados aqui, embora as soluções tampões não sejam exatamente as mesmas. Portanto, interpretamos a variação da magnitude energética verificada na curva de titulação de [omim]Cl no tampão PBS da seguinte forma: inicialmente, os [omim]Cl apresentam um excesso relativo de moléculas de água ao redor do cátion imidazólio e posteriormente é levado a algumas mudanças estruturais como consequência dos ânions que ocupam a interface ao redor do cátion imidazólio.

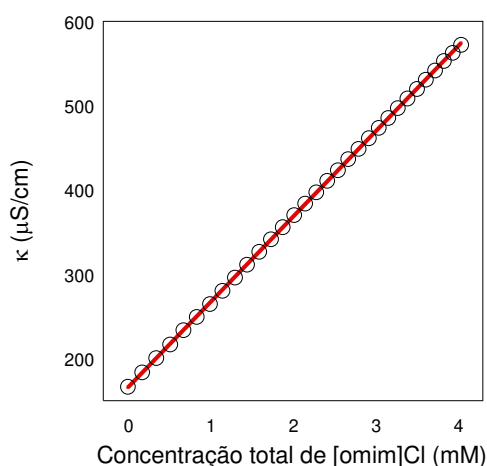


Figura 7.21: Dependência da condutividade elétrica, κ , da concentração total de [omim]Cl na solução tampão PBS. Círculos pretos referem-se aos dados experimentais e a linha vermelha corresponde a um ajuste linear, para o qual o coeficiente de correlação obtido foi de 0,99.

Finalmente, a Figura 7.20(c) mostra a variação de entalpia da interação em função da concentração de [omim]Cl, que foi calculada como no caso do [bmim]Cl. Quando a concentração de [omim]Cl é menor que 0,8 mM, pode-se observar que após a adição de [omim]Cl, a variação de entalpia é constante e positiva no valor de $\sim (37,1 \pm 0,8)$ J/mol. Distintamente da interação entre [bmim]Cl e DNA, os valores de entalpia positivos obtidos representam uma maior contribuição das interações hidrofóbicas, provenientes das cadeias de hidrocarbonetos de [omim]Cl e das bases hidrofóbicas do DNA. Observe que o comprimento das cadeias de carbono das moléculas de [omim]Cl é duas vezes o valor correspondente de [bmim]Cl (ver Figura 7.2).

Quando a concentração de [omim]Cl é superior a 0,8 mM, a variação de entalpia é continuamente reduzida com a adição de [omim]Cl, e eventualmente atinge um valor próximo de zero para concentrações totais de [omim]Cl acima de $\sim 2,8$ mM. Para concentrações superiores a essa, não há alteração na variação de entalpia com a titulação de [omim]Cl na solução de DNA, indicando a saturação dos sítios de ligação do DNA.

Quando as curvas da calorimetria isotérmica de titulação apresentam um perfil sigmoidal, como no caso da Figura 7.20(c), elas podem ser ajustadas por um modelo de sítios idênticos e independentes usando a equação

$$\Delta H_{int} = \frac{V_c \Delta H_{int}^0}{2K} (1 + K [omim]Cl)_T + NK [DNA]_T - \sqrt{(1 + K [omim]Cl)_T + NK [DNA]_T)^2 - 4NK^2 [DNA]_T [omim]Cl)_T}, \quad (7.6)$$

onde ΔH_{int}^0 corresponde ao calor total envolvido, V_c representa o volume efetivo dentro da célula de amostra calorimétrica, K é a constante de ligação de equilíbrio, $[DNA]_T$ e $[omim]Cl)_T$ são as concentrações totais das espécies de DNA e [omim]Cl no sistema, respectivamente, e N é a razão estequiométrica.

Ajustando os dados da Figura 7.20(c) à Equação 7.6 (linha sólida vermelha), foi possível determinar os valores de K , N , ΔH_{int}^0 , bem como calcular a variação de energia livre de Gibbs ΔG_{int}^0 e a variação de entropia $T\Delta S_{int}^0$ para a formação do complexo DNA-[omim]Cl [61].

Obtemos desta análise os resultados: $K = 3,01 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $N = 151,5$, $\Delta G_{int}^o = -25,6 \text{ J/mol}$, $\Delta H_{int}^o = 38,94 \text{ J/mol}$ e $T\Delta S_{int}^o = 25,6 \text{ J/mol}$.

7.4 Discussão

Nesta seção apresentamos uma discussão baseada nos resultados obtidos com as diversas técnicas já apresentadas e propomos um modelo para a interação envolvendo a formação dos complexos DNA-[bmim]Cl e DNA-[omim]Cl.

Os experimentos de pinça óptica nos permitiram monitorar os efeitos da ligação dos líquidos iônicos nas propriedades mecânicas da molécula de DNA, identificando uma mudança no regime de elasticidade do polímero semi-flexível para o flexível acarretando numa compactação do DNA. Além disso, tais experimentos sugeriram que a compactação dos complexos DNA-[bmim]Cl ocorre em torno de 250 mM (ver Figura 7.15(a)) sob nossas condições experimentais. De acordo com os dados da pinça magnética, tal compactação ocorre apenas quando nenhuma força externa aplicada atua sobre os complexos DNA-[bmim]Cl. Além disso, a análise realizada nos dados de pinça óptica para o comprimento de persistência dos complexos DNA-[bmim]Cl mostrou que a transição no regime de elasticidade do polímero é um processo positivamente cooperativo com um expoente de Hill, $n \sim 2$. Tal expoente também pode ser considerado como um limite inferior para o número de moléculas de ligante envolvidas em um evento de ligação, ou seja, uma estimativa aproximada do tamanho médio do agregado que se liga ao DNA [58]. Assim, neste caso há uma formação significativa de agregados de [bmim]Cl no sistema, de acordo com o que foi encontrado a partir da medida de condutometria, ver Figura 7.19.

Os dados da calorimetria isotérmica de titulação, por outro lado, forneceram alguns detalhes moleculares sobre a natureza das forças motrizes envolvidas na interação DNA-[bmim]Cl. Quando a concentração desse líquido iônico estiver abaixo da sua CAC (8,0 mM no caso), inicialmente moléculas individuais de [bmim]Cl irão se ligar ao DNA por atração eletrostática entre os grupos bmim⁺ e os grupos fosfato da dupla hélice, que são carregados negativamente. Quando a concentração total de [bmim]Cl atinge o CAC, os dímeros de [bmim]Cl ($n \sim 2$) serão o elemento preferencial de ligação ao longo da dupla hélice. De fato, na faixa de 8,0 mM \leq [[bmim]Cl] \leq 15 mM a atração eletrostática entre o DNA e o [bmim]Cl ainda predomina, embora [bmim]Cl tenha começado a formar agregados em solução, conforme sugerido pelo gráfico da Figura 7.19. No intervalo 15 mM \leq [[bmim]Cl] \leq 70 mM, o aumento da concentração total de [bmim]Cl dá origem a um efeito importante: como consequência da redução da repulsão eletrostática entre diferentes segmentos do DNA, devido à ligação do [bmim]Cl, as cadeias alquílicas das moléculas de [bmim]Cl ligadas passam a interagir por meio de interações hidrofóbicas, contribuindo para a compactação do DNA. Uma conclusão muito semelhante foi encontrada para a interação entre o DNA e o líquido iônico [C12mim]Br [67], bem como para a interação do DNA com o surfactante brometo de dodeciltrimetilamônio (DTAB) [68]. Assim, o aumento da entalpia com a adição de [bmim]Cl nesta faixa de concentração (15 mM \leq [[bmim]Cl] \leq 70 mM) está associado ao rearranjo estrutural dos complexos DNA-[bmim]Cl sobrepostos pela ligação de [bmim]Cl ao DNA. Este fenômeno induz flexões na molécula de DNA, com consequente diminuição da persistência aparente e dos comprimentos de contorno e, conseqüentemente, do raio de giro. Finalmente, para [[bmim]Cl] \geq 70 mM, a saturação dos sítios de ligação disponíveis começa a ocorrer e temos $\Delta H_{int} \sim 0$. Outras modificações serão

devidas principalmente a rearranjos na estrutura espacial 3D do complexo.

Assim, vale a pena notar que o comportamento da ligação de [bmim]Cl ao DNA pode ser modulado ajustando a razão molar do líquido iônico para o DNA. Infelizmente, os vários detalhes moleculares diferentes envolvidos em tal interação não nos permitiram determinar a constante de equilíbrio de associação e a estequiometria da reação de ligação.

Com base na discussão acima, o mecanismo molecular de interação entre o [bmim]Cl e o DNA é esquematicamente ilustrado na Figura 7.22.

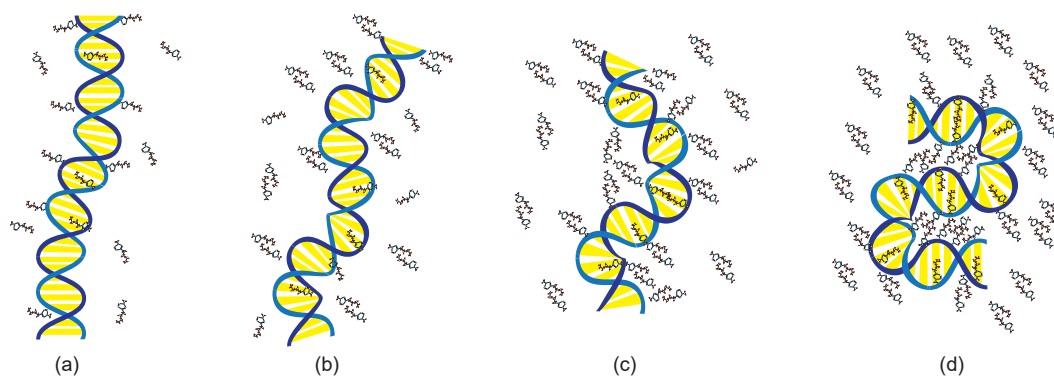


Figura 7.22: Ilustração esquemática da interação entre o [bmim]Cl e o DNA. (a) $0 \leq [[\text{bmim}]\text{Cl}] \leq 8,0$ mM, (b) $8,0 \text{ mM} \leq [[\text{bmim}]\text{Cl}] \leq 15,0$ mM, (c) $15,0 \leq [[\text{bmim}]\text{Cl}] \leq 70,0$ mM e (d) $[[\text{bmim}]\text{Cl}] \geq 70,0$ mM.

Similarmente ao caso do [bmim]Cl, observamos variações nas propriedades mecânicas do complexo DNA-[omim]Cl através dos experimentos de pinça óptica. Neste caso, no entanto, a transição do semiflexível para o flexível da elasticidade do polímero mostrou-se não cooperativa, indicando que os monômeros de [omim]Cl interagem com o DNA - resultado que também está de acordo com as medidas de condutometria mostrado na Figura 7.21.

Nos experimentos de pinça magnética observamos que a compactação do DNA pode ocorrer em uma concentração total de [omim]Cl de 3,5 mM mesmo se uma força constante da ordem de $\sim 0,28$ pN for aplicada para estirar o DNA. Este resultado provavelmente é consequência do fato de o [omim]Cl apresentar uma cadeia hidrofóbica mais longa, o que aumenta as interações hidrofóbicas relacionadas à compactação dos complexos DNA-[omim]Cl.

Voltando a atenção agora para os dados de calorimetria isotérmica de titulação do complexo DNA-[omim]Cl, podemos realizar uma análise semelhante à feita anteriormente para [bmim]Cl. Os valores positivos encontrados para as quantidades ΔH_{int}^o e $T\Delta S_{int}^o$ indicam a dominância de forças hidrofóbicas na interação entre o [omim]Cl e DNA. A contribuição do ganho de entropia dominou a formação de tais complexos devido à liberação de moléculas de água para o volume da solução que, antes da interação, solvatoou as partes hidrofóbicas do DNA e [omim]Cl. Observe que DNA e [omim]Cl interagem com uma pequena magnitude de ΔH_{int}^o . Para fins de comparação, [omim]Cl interage com a proteína BSA [69] e com ciclodextrinas [70] com valores de ΔH_{int}^o de $-10,4$ kJ/mol e $-4,3$ kJ/mol, respectivamente, que são cerca de duas a três ordens de grandeza superiores ao que encontramos no presente trabalho.

Quando a concentração total de [omim]Cl está abaixo de 1 mM, moléculas individuais de [omim]Cl ligam-se ao DNA por atração eletrostática entre os grupos omim⁺ e grupos fosfato negativos da dupla hélice, promovendo uma diminuição na repulsão eletrostática entre segmentos, aproximando diferentes partes do DNA resultando numa diminuição do comprimento de

persistência. Com esta aproximação, as cadeias hidrofóbicas das moléculas de [omim]Cl ligadas tendem a interagir via forças hidrofóbicas, contribuindo para a compactação dos complexos. Na faixa de $1 \text{ mM} \leq [\text{omim}]\text{Cl} \leq 2,5 \text{ mM}$, há predominância de interações hidrofóbicas, tanto entre as cadeias alquílicas dos [omim]Cl ligados, quanto das cadeias hidrofóbicas de [omim]Cl livres com as bases de DNA.

Observe que nos experimentos de pinça óptica, o valor encontrado para a saturação dos sítios de ligação do DNA é em torno de $\sim 2,5 \text{ mM}$, onde há uma saturação do raio de giro, ver Figura 7.15(b). Tal concentração de saturação está muito próxima do valor de saturação encontrado nas medidas de calorimetria isotérmica de titulação, ver Figura 7.20(c), para o qual $\Delta H_{int} \sim 0$.

Os resultados obtidos para a constante de equilíbrio de associação dos dados de pinça óptica e calorimetria isotérmica de titulação são muito diferentes, sendo este último cerca de duas ordens de grandeza superior. Tal diferença, no entanto, pode ser facilmente compreendida. Na análise dos experimentos de pinça óptica, os parâmetros de ligação são obtidos a partir da curva de comprimento de persistência em função da concentração do ligante. Observe que para [omim]Cl superior a $1,0 \text{ mM}$, o valor do comprimento de persistência é aproximadamente constante, de modo que a constante de associação de ligação medida reflete basicamente a interação no intervalo $0 \leq [[\text{omim}]\text{Cl}] \leq 1,0 \text{ mM}$, ou seja, a região de concentração onde a interação eletrostática é a principal força motriz, conforme concluído a partir dos dados da Figura 7.20(c). Por outro lado, o resultado da constante de ligação obtida das medidas de calorimetria isotérmica de titulação refere-se principalmente à região de concentração onde ΔH_{int} varia (1 a $2,5 \text{ mM}$), isto é, a faixa de concentração onde a interação hidrofóbica é a principal força motriz. Portanto, os dados de pinça óptica nos permitiram obter uma constante de ligação basicamente associada à força motriz eletrostática, enquanto nos dados da calorimetria isotérmica de titulação, o valor da constante está associada à força motriz hidrofóbica, que é consideravelmente mais forte neste sistema, conforme discutido anteriormente.

Finalmente, com base nesta discussão, o mecanismo molecular de interação entre o [omim]Cl e o DNA é ilustrado na Figura 7.23.

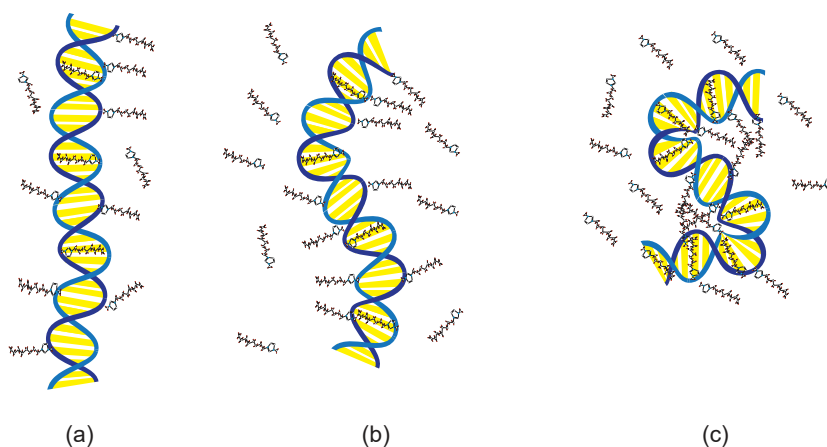


Figura 7.23: Ilustração esquemática da interação entre o [omim]Cl e o DNA. (a) $0 \leq [[\text{omim}]\text{Cl}] \leq 1,0 \text{ mM}$, (b) $1,0 \text{ mM} \leq [[\text{omim}]\text{Cl}] \leq 2,5 \text{ mM}$ e (c) $[[\text{omim}]\text{Cl}] \geq 2,5 \text{ mM}$.

Os dados aqui apresentados compõem o artigo "Imidazolium-based ionic liquids binding to DNA: mechanical effects and thermodynamics of the interactions", que foi publicado na revista *International Journal of Biological Macromolecules* em junho de 2022.

7.5 Conclusão

No presente trabalho apresentamos uma caracterização robusta das interações de DNA com dois importantes líquidos iônicos à base de imidazólio: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([bmim]Cl) e cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio ([omim]Cl), usando tanto abordagens de molécula única (pinça óptica e magnética) quanto abordagens de múltiplas moléculas (calorimetria isotérmica de titulação e medidas de condutometria).

Os dados de pinça óptica e pinça magnética permitiram obter as mudanças nas propriedades mecânicas dos complexos de DNA formados com ambos os líquidos iônicos, bem como obter os parâmetros físico-químicos (de ligação) relevantes da interação, como as constantes de equilíbrio de associação e o grau de cooperatividade da reação de ligação. Apesar da fraca ligação medida entre o DNA e os dois líquidos iônicos, as técnicas de molécula única permitiram identificar uma transição no regime de elasticidade do polímero para os complexos formados, o que resulta em uma compactação relevante do DNA em altas concentrações de líquidos iônicos.

As medições de calorimetria isotérmica de titulação e de condutometria, por outro lado, complementaram as medições anteriores dando uma caracterização termodinâmica completa das interações, o que nos permitiu identificar as forças motrizes mais relevantes em várias faixas de concentração dos líquidos iônicos.

Finalmente, com base nos resultados obtidos com todas essas técnicas, propusemos um modelo para o esquema de ligação nas diferentes faixas de concentração tanto para [bmim]Cl quanto para [omim]Cl. Dada a riqueza de detalhes sobre as medições e análises aqui realizadas, o presente trabalho pode, assim, orientar futuras pesquisas sobre as interações entre ácidos nucleicos e líquidos iônicos e, de forma geral, entre DNA e pequenos ligantes que se ligam por meio de interações eletrostáticas e hidrofóbicas.

Capítulo 8

Conclusões finais e perspectivas

Neste trabalho, aplicamos seis técnicas diferentes em duas frentes de estudo.

Na primeira parte, implementamos a montagem da pinça óptica holográfica em nosso laboratório. Utilizando um modulador espacial de luz, conseguimos transformar um feixe de luz com perfil gaussiano num feixe com perfil de Bessel. Conseguimos capturar microesferas paramagnéticas, que não são pinçadas no feixe gaussiano, e verificamos como a constante de força da pinça varia com a altura do pinçamento, potência do laser e com diferentes raios do feixe de Bessel. Utilizamos um modelo de óptica geométrica, que considera a aberração esférica e a absorção de luz pelas partículas, para realizar cálculos numéricos dos valores da força total. Este modelo não possui parâmetros ajustáveis, ou seja, foi necessário medir todos os parâmetros para realizar os cálculos. Comparamos nossos resultados experimentais com o modelo teórico e observamos uma excelente concordância.

Na segunda parte, estudamos a interação da molécula de DNA com dois líquidos iônicos à base de imidazólio: cloreto de 1-butil-3-metilimidazólio ([bmim]Cl) e cloreto de 1-octil-3-metilimidazólio ([omim]Cl), usando tanto abordagens de molécula única (pinça óptica e magnética) quanto abordagens de múltiplas moléculas (calorimetria isotérmica de titulação e medidas de condutometria). Vimos que os dois líquidos iônicos interagem com a molécula de DNA e promovem uma mudança de elasticidade dos complexos formados, passando de um regime semi-flexível para flexível. Tal mudança resulta numa compactação da molécula de DNA. Através das medidas de calorimetria isotérmica de titulação, verificamos que a interação hidrofóbica é a principal responsável por promover tal compactação. No caso do [bmim]Cl, vimos que a interação apresenta cooperatividade positiva. Por meio de medidas de condutometria observamos que a partir da concentração ($CAC = (8,0 \pm 0,4) \text{ mM}$) ocorre a formação de dímeros e esses passam a interagir com a molécula de DNA, resultado confirmado com os experimentos de pinça óptica. Por outro lado, nossas medidas mostraram que somente monômeros de [omim]Cl interagem com a molécula de DNA. As medidas de pinça magnética e pinça óptica permitiram concluir que a compactação do DNA promovida pelo [bmim]Cl é mais fraca que a promovida pelo [omim]Cl. Tal fato ocorre porque o comprimento das cadeias de carbono das moléculas de [omim]Cl é duas vezes o valor correspondente de [bmim]Cl.

A princípio esses dois trabalhos podem parecer não estar relacionados, mas eles serão fundamentais para implementar uma pinça híbrida optomagnética em nosso laboratório. Com a implementação da pinça óptica holográfica, agora é possível manipular com a luz microesferas superparamagnéticas, que são as mesmas utilizadas nos experimentos de pinça magnética.

Dessa forma, agora estamos aptos a acoplar os dois sistemas num mesmo microscópio possibilitando aplicar simultaneamente forças ópticas e magnéticas, isso seria uma perspectiva importante deste trabalho. Pretendemos também aprimorar a montagem da pinça magnética para realizar torções na molécula de DNA.

Apêndice A

Artigos publicados e submetidos

A.1 Artigos relacionados à tese

A.1.1 Revista *Applied Optics*

Bessel beam optical tweezers for manipulating superparamagnetic beads

Esse artigo refere-se à primeira parte deste trabalho e foi publicado em abril de 2021.

A.1.2 Revista *International Journal of Biological Macromolecules*

Imidazolium-based ionic liquids binding to DNA: mechanical effects and thermodynamics of the interactions

Esse artigo refere-se à segunda parte do trabalho e foi publicado em junho de 2022.

A.2 Artigos relacionados a outros projetos

A.2.1 Revista *Optics Letters*

Silicon microparticles as handles for optical tweezers experiments

Este artigo foi publicado em janeiro de 2020. Colaborei nas discussões e no cálculo da constante de força. Esse trabalho é fruto do projeto de doutorado do aluno Tiago Moura.

A.2.2 Revista *Journal of the Brazilian Chemical Society*

Allyl Dibenzoylmethane Derivative: Antimelanoma Activity and Study of Its Molecular Mechanism of Interaction with DNA

Esse artigo publicado em julho de 2021. Realizamos as medidas de pinça óptica para estudar o mecanismo de interação entre a molécula de DNA e 1,3-diphenyl-2-allyl-1,3-propanedione (DPAP), composto estudado para ser utilizado no tratamento de melanoma.

A.2.3 Revista *Physical Review E*

Dodecyltrimethylammonium bromide surfactant effects on DNA: Unraveling the competition between electrostatic and hydrophobic interactions

Esse artigo foi publicado em setembro de 2021 e foi fruto de uma colaboração com o ex-aluno Eduardo Ferreira. Nesse artigo consta a primeira medida com a nossa montagem da pinça magnética.

Referências Bibliográficas

- 1 ASHKIN, A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*, APS, v. 24, n. 4, p. 156, 1970.
- 2 ASHKIN, A. *et al.* Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics letters*, Optical Society of America, v. 11, n. 5, p. 288–290, 1986.
- 3 GRIER, D. G. A revolution in optical manipulation. *nature*, Nature Publishing Group, v. 424, n. 6950, p. 810–816, 2003.
- 4 DUFRESNE, E. R.; GRIER, D. G. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. *Review of scientific instruments*, American Institute of Physics, v. 69, n. 5, p. 1974–1977, 1998.
- 5 GRIER, D. G.; ROICHMAN, Y. Holographic optical trapping. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 45, n. 5, p. 880–887, 2006.
- 6 OLIVEIRA, L.; CAMPOS, W. H.; ROCHA, M. S. Optical trapping and manipulation of superparamagnetic beads using annular-shaped beams. *Methods and Protocols*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 1, n. 4, p. 44, 2018.
- 7 CAMPOS, W. H. *et al.* Topological insulator particles as optically induced oscillators: toward dynamical force measurements and optical rheology. *ACS Photonics*, ACS Publications, v. 5, n. 3, p. 741–745, 2018.
- 8 VILFAN, I. *et al.* Magnetic tweezers for single-molecule experiments. In: *Handbook of single-molecule biophysics*. [S.l.]: Springer, 2009. p. 371–395.
- 9 ASHKIN, A.; DZIEDZIC, J. M.; YAMANE, T. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams. *Nature*, Nature Publishing Group, v. 330, n. 6150, p. 769–771, 1987.
- 10 BAUMANN, C. G. *et al.* Stretching of single collapsed dna molecules. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 78, n. 4, p. 1965–1978, 2000.
- 11 MARAGÒ, O. M. *et al.* Optical trapping and manipulation of nanostructures. *Nature nanotechnology*, Nature Publishing Group, v. 8, n. 11, p. 807–819, 2013.
- 12 ASHKIN, A. Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 61, n. 2, p. 569–582, 1992.

- 13 ROCHA, M. Optical tweezers for undergraduates: theoretical analysis and experiments. *American Journal of Physics*, American Association of Physics Teachers, v. 77, n. 8, p. 704–712, 2009.
- 14 CAMPOS, W. H. *et al.* How light absorption modifies the radiative force on a microparticle in optical tweezers. *Applied Optics*, Optical Society of America, v. 57, n. 25, p. 7216–7224, 2018.
- 15 FÄLLMAN, E.; AXNER, O. Design for fully steerable dual-trap optical tweezers. *Applied Optics*, Optical Society of America, v. 36, n. 10, p. 2107–2113, 1997.
- 16 MISAWA, H. *et al.* Three-dimensional optical trapping and laser ablation of a single polymer latex particle in water. *Journal of applied physics*, American Institute of Physics, v. 70, n. 7, p. 3829–3836, 1991.
- 17 DUFRESNE, E. R.; GRIER, D. G. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. *Review of scientific instruments*, American Institute of Physics, v. 69, n. 5, p. 1974–1977, 1998.
- 18 REICHERTER, M. *et al.* Optical particle trapping with computer-generated holograms written on a liquid-crystal display. *Optics letters*, Optical Society of America, v. 24, n. 9, p. 608–610, 1999.
- 19 LIESENER, J. *et al.* Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms. *Optics Communications*, Elsevier, v. 185, n. 1-3, p. 77–82, 2000.
- 20 DUFRESNE, E. R. *et al.* Computer-generated holographic optical tweezer arrays. *Review of Scientific Instruments*, American Institute of Physics, v. 72, n. 3, p. 1810–1816, 2001.
- 21 CURTIS, J. E.; KOSS, B. A.; GRIER, D. G. Dynamic holographic optical tweezers. *Optics communications*, Elsevier, v. 207, n. 1-6, p. 169–175, 2002.
- 22 GRIER, D. G.; ROICHMAN, Y. Holographic optical trapping. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 45, n. 5, p. 880–887, 2006.
- 23 LEE, W.-H. Computer-generated holograms: Techniques and applications. *PROGRESS IN OPTICS*, v. 31, p. 119–119, 1993.
- 24 TRICOLES, G. Computer generated holograms: an historical review. *Applied optics*, Optical Society of America, v. 26, n. 20, p. 4351–4360, 1987.
- 25 CRICK, F.; HUGHES, A. The physical properties of cytoplasm. *Experimental Cell Research*, Citeseer, v. 1, n. 1, p. 37–80, 1950.
- 26 STRICK, T. R. *et al.* The elasticity of a single supercoiled dna molecule. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 271, n. 5257, p. 1835–1837, 1996.
- 27 SARKAR, R.; RYBENKOV, V. V. A guide to magnetic tweezers and their applications. *Frontiers in Physics*, Frontiers, v. 4, p. 48, 2016.

-
- 28 LIPFERT, J. *et al.* Freely orbiting magnetic tweezers to directly monitor changes in the twist of nucleic acids. *Nature communications*, Nature Publishing Group, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2011.
- 29 KILINC, D.; LEE, G. U. Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysics. *Integrative Biology*, Oxford University Press, v. 6, n. 1, p. 27–34, 2014.
- 30 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. *et al.* Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, v. 171, n. 4356, p. 737–738, 1953.
- 31 TERAOKA, I. *Polymer solutions: an introduction to physical properties*. John Wiley, 2002.
- 32 RUBINSTEIN, M.; COLBY, R. H. *et al.* *Polymer physics*. [S.l.]: Oxford university press New York, 2003. v. 23.
- 33 DOI, M.; EDWARDS, S. F.; EDWARDS, S. F. *The theory of polymer dynamics*. [S.l.]: oxford university press, 1988. v. 73.
- 34 MARKO, J. F.; SIGGIA, E. D. Stretching dna. *Macromolecules*, ACS Publications, v. 28, n. 26, p. 8759–8770, 1995.
- 35 ROCHA, M. S. *Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- 36 SILVA, E. F. da. *Análise de complexos DNA-ligantes com aplicações na construção de carreadores de fármacos*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Viçosa, 2018.
- 37 WALDEN, P. Über die molekulargrösse und elektrische leitfähigkeit einiger geschmolzener salze. *Bull Acad Imper Sci (St Petersburg)*, v. 8, p. 405–422, 1914.
- 38 PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. Applications of ionic liquids in the chemical industry. *Chemical Society Reviews*, Royal Society of Chemistry, v. 37, n. 1, p. 123–150, 2008.
- 39 PLECHKOVA, N. V.; SEDDON, K. R. *Ionic liquids: “designer” solvents for green chemistry*. [S.l.]: John Wiley & Sons: Hoboken, 2007. v. 105.
- 40 GREER, A. J.; JACQUEMIN, J.; HARDACRE, C. Industrial applications of ionic liquids. *Molecules*, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, v. 25, n. 21, p. 5207, 2020.
- 41 SINGH, S. K.; SAVOY, A. W. Ionic liquids synthesis and applications: An overview. *Journal of Molecular Liquids*, Elsevier, v. 297, p. 112038, 2020.
- 42 EGOROVA, K. S.; GORDEEV, E. G.; ANANIKOV, V. P. Biological activity of ionic liquids and their application in pharmaceuticals and medicine. *Chemical Reviews*, ACS Publications, v. 117, n. 10, p. 7132–7189, 2017.
- 43 XIE, Y.-N. *et al.* Interaction between room temperature ionic liquid [bmim] bf₄ and dna investigated by electrochemical micromethod. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 112, n. 32, p. 9864–9868, 2008.

-
- 44 VIJAYARAGHAVAN, R. *et al.* Long-term structural and chemical stability of dna in hydrated ionic liquids. *Angewandte Chemie International Edition*, Wiley Online Library, v. 49, n. 9, p. 1631–1633, 2010.
- 45 DING, Y. *et al.* Binding characteristics and molecular mechanism of interaction between ionic liquid and dna. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 114, n. 5, p. 2033–2043, 2010.
- 46 MOURA, T. *et al.* Silicon microparticles as handles for optical tweezers experiments. *Optics Letters*, Optical Society of America, v. 45, n. 5, p. 1055–1058, 2020.
- 47 WONG, W. P.; HALVORSEN, K. The effect of integration time on fluctuation measurements: calibrating an optical trap in the presence of motion blur. *Optics express*, Optical Society of America, v. 14, n. 25, p. 12517–12531, 2006.
- 48 SOKOLOVSKII, G. S. *et al.* Optical trapping with bessel beams generated from semiconductor lasers. In: OPTICAL SOCIETY OF AMERICA. *CLEO: Science and Innovations*. [S.l.], 2014. p. JTh2A–75.
- 49 MILNE, G. *et al.* Transverse particle dynamics in a bessel beam. *Optics express*, Optical Society of America, v. 15, n. 21, p. 13972–13987, 2007.
- 50 NETO, P. M.; NUSSENZVEIG, H. Theory of optical tweezers. *EPL (Europhysics Letters)*, IOP Publishing, v. 50, n. 5, p. 702, 2000.
- 51 ANDRADE, U.; GARCIA, A.; ROCHA, M. Bessel beam optical tweezers for manipulating superparamagnetic beads. *Applied Optics*, Optical Society of America, v. 60, n. 12, p. 3422–3429, 2021.
- 52 AMITANI, I. *et al.* Watching individual proteins acting on single molecules of dna. In: *Methods in enzymology*. [S.l.]: Elsevier, 2010. v. 472, p. 261–291.
- 53 ROCHA, M. S. Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação dna-fármacos. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.
- 54 GOSSE, C.; CROQUETTE, V. Magnetic tweezers: micromanipulation and force measurement at the molecular level. *Biophysical journal*, Elsevier, v. 82, n. 6, p. 3314–3329, 2002.
- 55 LIMA, C.; ALMEIDA, G.; ROCHA, M. A cooperative transition from the semi-flexible to the flexible regime of polymer elasticity: mitoxantrone-induced dna condensation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, Elsevier, v. 1862, n. 5, p. 1107–1114, 2018.
- 56 ROCHA, M. Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments. *Integrative Biology*, Oxford University Press, v. 7, n. 9, p. 967–986, 2015.
- 57 DAUNE, M. *Molecular Biophysics*. First. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- 58 SIMAN, L. *et al.* Quantitative assessment of the interplay between dna elasticity and cooperative binding of ligands. *Physical Review Letters*, APS, v. 109, n. 24, p. 248103, 2012.

-
- 59 CARPENA, P. *et al.* Problems associated with the treatment of conductivity- concentration data in surfactant solutions: simulations and experiments. *Langmuir*, ACS Publications, v. 18, n. 16, p. 6054–6058, 2002.
- 60 BOWERS, J. *et al.* Aggregation behavior of aqueous solutions of ionic liquids. *Langmuir*, ACS Publications, v. 20, n. 6, p. 2191–2198, 2004.
- 61 MARTINEZ, J. C. *et al.* *Isothermal titration calorimetry: thermodynamic analysis of the binding thermograms of molecular recognition events by using equilibrium models*. [S.l.]: chapter, 2013. v. 4.
- 62 RUNGSARDTHONG, U. *et al.* Effect of polymer ionization on the interaction with dna in nonviral gene delivery systems. *Biomacromolecules*, ACS Publications, v. 4, n. 3, p. 683–690, 2003.
- 63 JOSHI, H. *et al.* Isothermal titration calorimetry studies on the binding of amino acids to gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 108, n. 31, p. 11535–11540, 2004.
- 64 ZHU, P.; DING, Y.; GUO, R. Coil-globule structure transition and binding characteristics of dna molecules induced by isoquinoline-based photoactive ionic liquid surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Elsevier, v. 531, p. 150–163, 2017.
- 65 FERREIRA, G. M. D. *et al.* Lactoferrin denaturation induced by anionic surfactants: The role of the ferric ion in the protein stabilization. *International journal of biological macromolecules*, Elsevier, v. 117, p. 1039–1049, 2018.
- 66 SINGH, T. *et al.* Ionic liquids induced structural changes of bovine serum albumin in aqueous media: a detailed physicochemical and spectroscopic study. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 116, n. 39, p. 11924–11935, 2012.
- 67 HE, Y. *et al.* Interactions between ionic liquid surfactant [c12mim] br and dna in dilute brine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Elsevier, v. 101, p. 398–404, 2013.
- 68 SILVA, E. *et al.* Dodecyltrimethylammonium bromide surfactant effects on dna: Unraveling the competition between electrostatic and hydrophobic interactions. *Physical Review E*, APS, v. 102, n. 3, p. 032401, 2020.
- 69 BHARMORIA, P. *et al.* Biamphiphilic ionic liquid induced folding alterations in the structure of bovine serum albumin in aqueous medium. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 118, n. 1, p. 115–124, 2014.
- 70 ONDO, D. *et al.* Interaction of ionic liquids ions with natural cyclodextrins. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 115, n. 34, p. 10285–10297, 2011.