

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

MATEUS FILIPE PADILHA

**OBTENÇÃO DE MARCADORES FLUORESCENTES A PARTIR DE FONTES
ALTERNATIVAS**

SÃO GABRIEL

2017

MATEUS FILIPE PADILHA

**OBTENÇÃO DE MARCADORES FLUORESCENTES A PARTIR DE FONTES
ALTERNATIVAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de graduação em biotecnologia da Universidade Federal do Pampa como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Andrés Delgado Cañedo

SÃO GABRIEL

2017

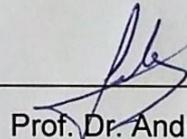
MATEUS FILIPE PADILHA

**OBTENÇÃO DE MARCADORES FLUORESCENTES A PARTIR DE FONTES
ALTERNATIVAS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao programa de graduação
em biotecnologia da Universidade Federal
do Pampa como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em
Biotecnologia.

Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em: 14/11/2017

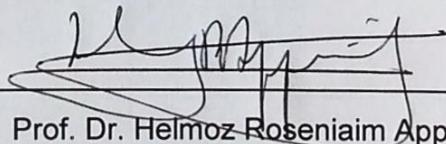
Banca examinadora:



Prof. Dr. Andrés Delgado Cañedo

Orientador

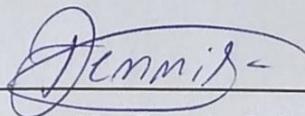
Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA



Prof. Dr. Helmoz Roseniaim Appelt

Banca

Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA



Me. Dennis Guilherme Costa Silva

Banca

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Dedico este trabalho de conclusão de curso à minha mãe, pelos melhores conselhos de vida, ao meu pai, por ser um exemplo de tranquilidade, e à minha avó, por ser a minha melhor amiga da terceira idade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus familiares mais próximos, que sempre me amaram e me guiaram para os melhores caminhos possíveis. Agradeço também aos meus amigos por serem o tempero da minha graduação, pois sem eles nada teria graça e sem alegria nem o conhecimento vale a pena. Também preciso mandar um abraço especial para a senhorita Midori, pois a sua companhia me trouxe ainda mais felicidade e me fez ser uma pessoa melhor. Além disso, gostaria de mandar um salve para o pessoal do laboratório por terem sido um grupo divertido e receptivo.

Decidi prosseguir na Unipampa não apenas por meus amigos, mas também por causa dos vários profissionais excelentes que nela trabalham. Por isso, primeiramente agradeço ao meu orientador Andrés, pois a sua dedicação com seu trabalho e encantamento com a ciência serão sempre uma inspiração para mim. Também devo a conclusão deste trabalho ao conhecimento dos químicos Helmoz, Susiane e Daiane, que sempre foram muito atenciosos comigo e me forneceram imensa ajuda experimental. Meu sincero respeito também a todos os bons professores que fizeram parte de minha formação desde a pré-escola.

RESUMO

Os corantes fluorescentes possuem uma ampla aplicação em análises biológicas, principalmente por serem capazes de marcar componentes celulares, permitindo a sua visualização. Canetas de uso comum podem possuir substâncias fluorescentes, mas também uma variedade de outros compostos, como lubrificantes, antioxidantes e surfactantes. A purificação permite que substâncias desconhecidas possam ser testadas em análises biológicas com menor influência de impurezas. Assim, novos marcadores fluorescentes podem ser encontrados a partir de fontes alternativas, como canetas, briófitas, algas e raízes vegetais. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo a purificação dos compostos fluorescentes presentes na caneta vermelha Pilot BP-1 INOX 1.0 (Brasil), de modo que possam ser utilizados em experimentos com amostras biológicas. Para isso, foi utilizada uma solução de 10% de tinta da caneta Pilot em etanol. A purificação foi realizada com cromatografia em coluna, com gradientes de polaridade com a fase móvel de hexano, acetato de etila e etanol. Com isso, foi possível visualizar a separação de dois principais compostos fluorescentes no interior da coluna. As frações provenientes da purificação foram analisadas por CCD, evaporadas e unificadas. Para se analisar o perfil cromatográfico dos compostos purificados, foi realizado um CLAE em solução isocrática de metanol e água (65:35) com fluxo de 1,1 ml/min a 35°C). A análise indicou que houve diferença entre as substâncias obtidas com a purificação e o extrato não purificado. As rodaminas B e 123 foram usadas como controle, porém não foi possível detectar essas substâncias nos extratos da caneta e nos compostos purificados. Além disso, foi realizada a determinação das características óticas desses compostos em espectrofluorímetro. As análises mostraram que houve diferença no comportamento ótico entre as substâncias purificadas e as rodaminas. Além disso, os picos de emissão e absorção dos compostos purificados foram próximos aos valores da rodamina 6G encontrados na literatura. As substâncias fluorescentes obtidas também mostraram ter carga positiva a partir de análise por eletroforese, o que pode apresentar potencial de interação com biomoléculas negativas, como células, proteínas e ácidos nucleicos.

Palavras-chave: Rodamina. Corante catiônico. Fluoróforo. Purificação Cromatográfica.

ABSTRACT

Fluorescent stains have a broad application in biological analysis, mainly by labelling cellular components, allowing their visualization. Some pen inks can have fluorescent substances and a variety of other compounds, such as lubricants, antioxidants and surfactants. Purification allows unknown substances to be tested at biological analysis with less influence of impurities. Thereby, new fluorescent markers can be found from alternative sources, like pens, bryophytes, seaweeds and vegetable roots. Likewise, this present work aims to purify fluorescent compounds present at the red pen Pilot BP-1 INOX 1.0 (Brazil), in order to apply it/them in experiments using biological samples. Hereby, it was used a solution of 10% of Pilot pen ink at ethanol. The purification was done with column chromatography, using polarity gradients of the mobile phase of hexane, ethyl acetate and ethanol. Thereby, it was possible to visualize the separation of two main fluorescent compounds inside the column. The purified fractions were analyzed by TLC, evaporated and joined with each other. To identify the chromatographic profile, the compounds were injected in CLAE, using as mobile phase an isocratic solution of methanol and water (65:35) with flow rate of 1,1 ml/min at 35°C. This experiment revealed that the purified compounds was different of the crude extract. The rhodamines B and 123 was used as controls, however the CLAE analysis did not detect them in the pen extract or in the purified substances. Furthermore, it was made the determination of optical characteristics of this compounds in a spectrofluorometer. The analysis showed that there were differences in the optical behavior between purified substances and the rhodamines used as control. The emission and absorption peaks of the purified fluorophores was close to the values of rhodamine 6G found in literature. The obtained fluorescent substances also showed positive charge by electrophoresis analysis, what can be potentially used for interaction with negatively charged biomolecules, like cells and nucleic acids.

Keywords: Rhodamine. Cationic Stain. Fluorophore. Chromatographic purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da rodamina 123.	16
Figura 2: Estrutura química da rodamina B.	17
Figura 3: Estrutura química da rodamina 6G.	17
Figura 4: Picos de Absorção das três rodaminas mais utilizadas. Rodamina B (RB): 543 nm. Rodamina 6G (R6G): 530 nm. Rodamina 123 (R123): 512 nm.	18
Figura 5: Picos de Emissão fluorescente das três rodaminas mais usadas. Rodamina B (RB): 565 nm. Rodamina 6G (R6G): 552 nm. Rodamina 123 (R123): 531 nm.	19
Figura 6: Imagem do TLC inicial do extrato bruto de tinta sob luz branca (A) e luz azul (B). Os círculos vermelhos marcam os principais compostos visualmente identificáveis.	25
Figura 7: Imagens da coluna cromatográfica em ordem cronológica. A: Início da purificação, com a amostra apenas empacotada. B: Início da saída das frações referentes aos corantes 2 e 3. C: Início da saída das frações referentes aos corantes 7, 8 e 9. D: Purificação encerrada.	26
Figura 8: Purificação por coluna cromatográfica. A: coluna cromatográfica sob a luz branca. B: coluna cromatográfica sob luz azul (488nm) observada através do filtro do transiluminador Safe Imager™ 2.0 Blue-Light (Invitrogen). Círculos em vermelho marcam os corantes fluorescentes deslocando-se através da coluna. Flecha em azul aponta a localização dos corantes que foram nomeados de 2, 3, 7, 8 e 9.	27
Figura 9: Corantes purificados por cromatografia em coluna e rodaminas em placa de 96 poços. As amostras foram excitadas com luz azul (488nm).	28
Figura 10: TLC realizado após a purificação. Os números indicam os compostos fluorescentes de interesse.	29
Figura 11: Espectrograma da absorção de rodamina 123, rodamina B, corantes 2, 3, 7, 8 e 9 diluídos em etanol.	30
Figura 12: Espectrograma de Excitação dos corantes purificados e da Rodamina B e 123. O detector foi fixado em 540 nm.	31
Figura 13: Espectrograma de Emissão dos corantes purificados e da Rodamina B e 123. Emissão de luz a 500 nm.	32
Figura 14: Espectrograma de excitação dos corantes purificados e da Rodamina B e 123. Emissão de luz a 540 nm.	33
Figura 15: Perfil Cromatográfico da amostra bruta em etanol da caneta Pilot. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.	34
Figura 16: Análise por CLAE do corante 2 purificado em coluna cromatográfica. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.	35
Figura 17: Análise por CLAE do corante 8 purificado em coluna cromatográfica. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente	

- a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.36
- Figura 18: Análise por CLAE da rodamina B. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.....37
- Figura 19: Análise por CLAE da rodamina B. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.....38
- Figura 20: Eletroforese em gel de agarose com os corantes 2,3,7,8,9 (representados por seus números correspondentes); Rodamina 123 (A); Rodamina B (B); Extrato bruto da caneta Pilot (C). A linha contínua vermelha determina os limites do gel de agarose para melhor visualização da imagem. Os sinais em cinza determinam a carga submetida pela eletroforese sobre as amostras. A flecha em azul aponta a localização dos poços nos quais foram introduzidos os corantes.39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Concentração de Rodaminas e Amostras (numeradas de 1-9) Injetadas no CLAE	23
Tabela 2 - Peso seco de todas as frações obtidas da purificação em coluna cromatográfica.....	28

LISTA DE SIGLAS

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

R123 – Rodamina 123

RB – Rodamina B

R6G – Rodamina 6G

pH – Potencial Hidrogeniônico

et al. – E outros

Apud – Citado por, conforme, segundo

mA – Miliampère

V – Volt

UA – Unidades Arbitrárias

OMLC – *Oregon Medical Laser Center*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE SIGLAS	VII
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Conceito e Aplicações da Fluorescência.....	15
1.2 Tintas de Canetas de Uso Comum.....	15
1.3 Rodaminas.....	16
1.4 Cromatografia.....	19
1.5 Direcionamento do Trabalho.....	20
2 OBJETIVOS	21
2.1 Objetivos Gerais.....	21
2.2 Objetivos Específicos.....	21
3 METODOLOGIA	22
3.1 Preparação da Amostra e TLC inicial.....	22
3.2 Cromatografia por Coluna.....	22
3.3 Preparação das Amostras Para CLAE e Leituras no Espectrofluorímetro.....	23
3.4 Condições Analíticas do CLAE.....	23
3.5 Determinação de Características Óticas em Espectrofluorímetro.....	24
3.6 Eletroforese.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 TLC Inicial.....	25
4.2 Purificação dos Compostos Fluorescentes por Coluna Cromatográfica.....	25
4.3 TLC após a coluna.....	28
4.4 Determinação de Características Óticas em Espectrofluorímetro.....	29
4.5 Cromatogramas obtidos a partir de CLAE.....	33
4.6 Eletroforese.....	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	40
6 REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e Aplicações da Fluorescência

Fluorescência é um fenômeno que envolve a emissão de fótons durante o processo de retorno de elétrons de um estado excitado para o estado fundamental. Para que isso ocorra, é necessário que haja absorção de energia pela molécula que comporta tais elétrons, o que pode acontecer através de ondas eletromagnéticas. Como a energia dos fótons que atingem a molécula é diferente que a dos fótons emitidos, a radiação emitida tem comprimento de onda maior que a da radiação recebida (Ito, 2004). Dessa forma, a fluorescência possui diversas aplicações, como em detecções e análises físico-químicas, na composição de lâmpadas, telas de plasma, detecção de falsificações (trabalhos artísticos, notas de bancos e documentos) e nos laboratórios de bioquímica, biologia molecular e celular, usando, por exemplo, microscopia de fluorescência (Valeur & Santos, 2011). Em relação a análises biológicas, a utilização de moléculas fluorescentes como sondas pode ser aplicada na visualização de membranas celulares, lipídeos, proteínas, DNA, RNA, antígenos, pH intracelular, viabilidade e ciclo celular, atividades enzimáticas, interações célula-célula e vírus-célula, endocitose e atividade citotóxica. Entretanto, a emissão de fluorescência por tais moléculas é influenciada por vários fatores como pressão, pH, viscosidade, ligações de hidrogênio, potencial elétrico, presença de *quencher*s, íons e polaridade (Valeur, 2001).

1.2 Tintas de Canetas de Uso Comum

As tintas das canetas de uso comum são compostos complexos que podem conter substâncias como surfactantes, lubrificantes, antioxidantes e diversos corantes, alguns fluorescentes como a rodamina (Chen, 2007). Essas tintas, quando encontradas em documentos, podem ser utilizadas na análise forense para identificar falsificações ao se comparar, por exemplo, a fórmula das canetas usadas (Crown; Brunelle; Cantu, 1976). Vários métodos analíticos já foram utilizados para comparar as tintas de canetas, como cromatografia em camada delgada (TLC) (Djozan et al, 2008), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Lyter, 1982), eletroforese

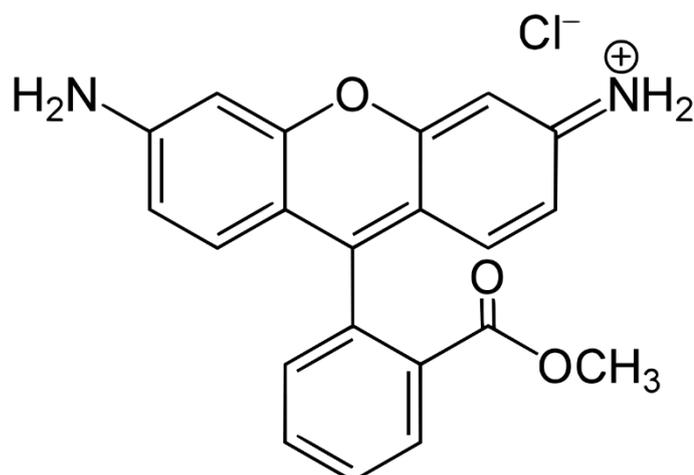
capilar (Slotnick; Smith, 1998), cromatografia gasosa (Aginsky, 1993) e espectrometria de massas (Sakayanagi et al, 1999).

1.3 Rodaminas

As rodaminas são moléculas orgânicas fluorescentes que pertencem à família dos xantenos (Beija; Afonso; Martinho, 2009) e possuem grupos reativos que podem se ligar covalentemente a biomoléculas, podendo ser utilizadas como sondas (Tsien; Ernst; Wagonner, 2006). Devido a sua alta fluorescência e fotoestabilidade, os derivados de rodamina possuem diversas aplicações, entre elas na mensuração de Ca^{2+} citosólico (Minta; Kao; Tsien, 1989), na detecção de íons de mercúrio em células vivas (Ko et al, 2006), e na análise da fluidez de membranas lipídicas (Bogen et al, 1998). Além dessas aplicações, as rodaminas também podem ser utilizadas para o desenvolvimento de novas moléculas, como alguns corantes da família Alexa que possuem maior fluorescência que as moléculas das quais são precursoras (Volushina et al, 1999).

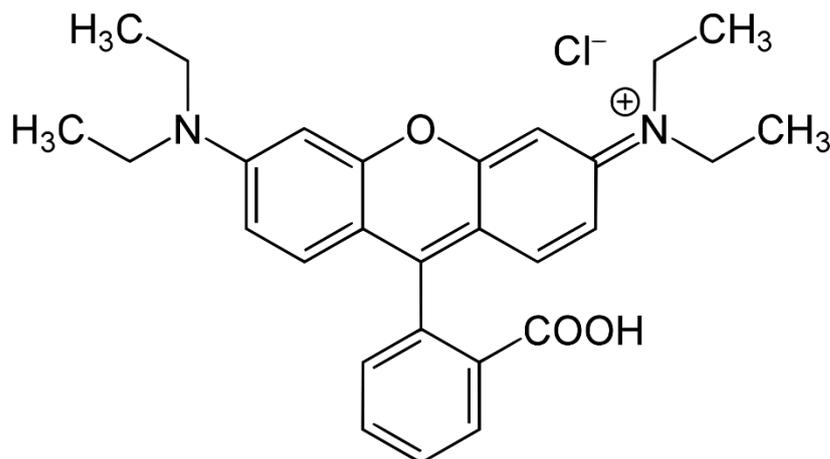
A rodamina 123 possui carga positiva e pode se ligar especificamente à mitocôndria (Johnson et al, 1981). A acumulação dessa molécula por células vivas acontece rapidamente, sendo que o acúmulo máximo pode acontecer em 5 a 10 minutos de contato independentemente da temperatura de incubação (0 - 37°C). Durante a divisão celular, as mitocôndrias marcadas com rodamina 123 são distribuídas para as células filhas, por isso esse corante pode ser usado como um marcador de proliferação e diferenciação celular (Darzynkiewicz, 1982).

Figura 1: Estrutura química da rodamina 123.



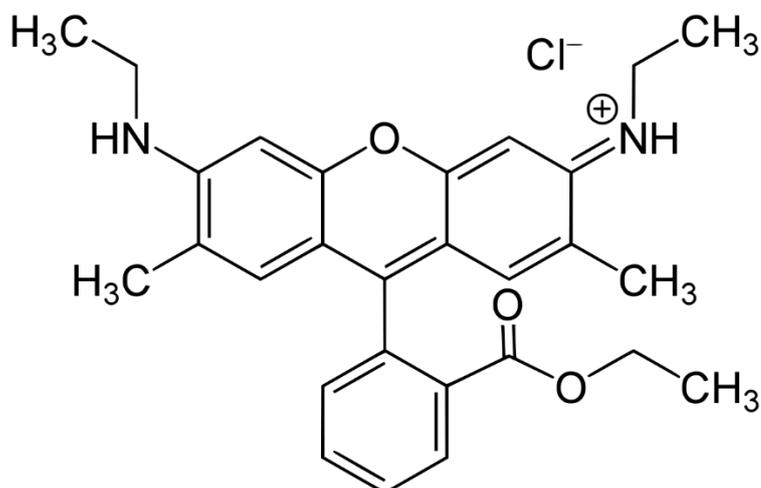
A rodamina B, quando utilizada juntamente com Auramina O, pode ser utilizada para diagnosticar a presença de micobactérias em portadores de AIDS (Bassiri et al, 1993). Além disso, a rodamina b pode ser utilizada na medição do pH endossomal por meio de técnicas de citometria de fluxo (Murphy; Powers; Cantor, 1984).

Figura 2: Estrutura química da rodamina B.



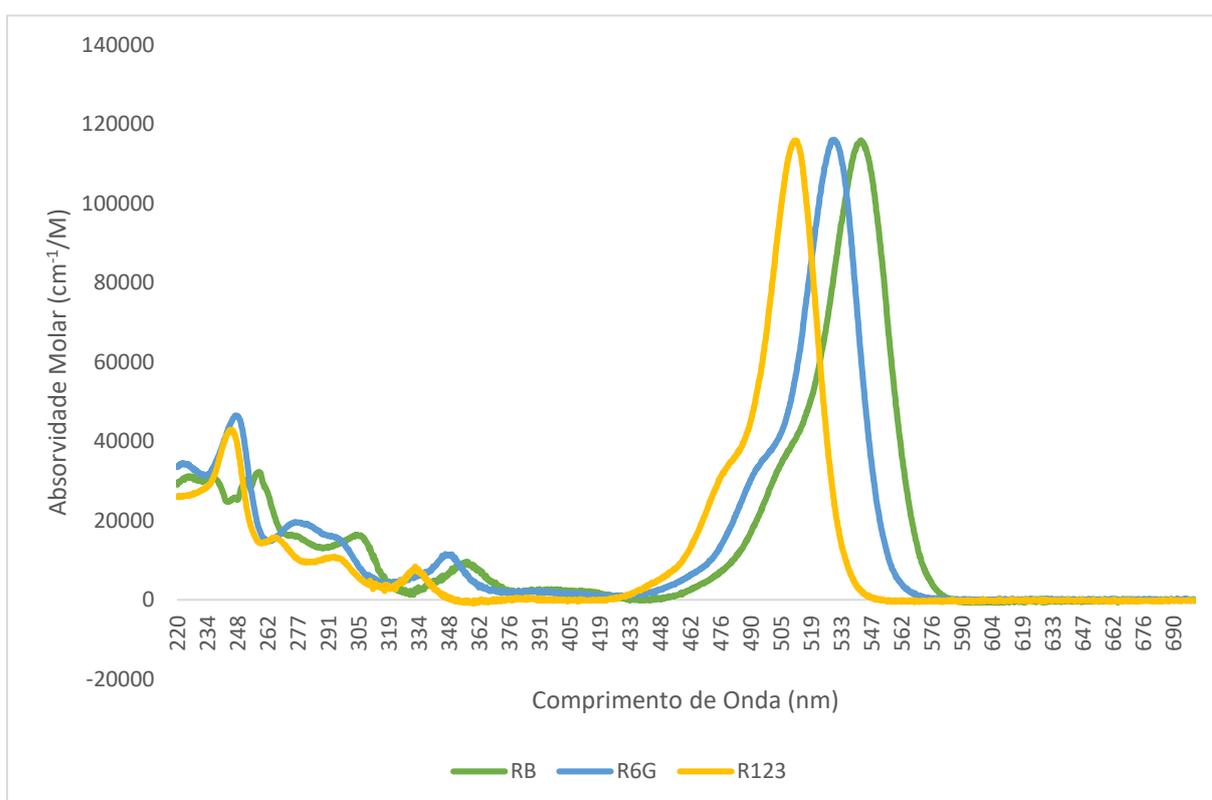
Segundo Johnsson e colaboradores, a rodamina 6G tem carga positiva em pH fisiológico e possui especificidade pela mitocôndria. Essa molécula e seus derivados podem ser utilizados em métodos de detecção de câncer de próstata (Dickman, 2008), para medir potencial de membrana celular (Mandalà, 1999; Aiuchi et al, 1982), em métodos de detecção de ácidos nucleicos (Seitz; Grossmann, 2007), para medir pH intracelular (Li et al, 2011), na detecção de atividade de proteases (Liu et al, 2007).

Figura 3: Estrutura química da rodamina 6G.



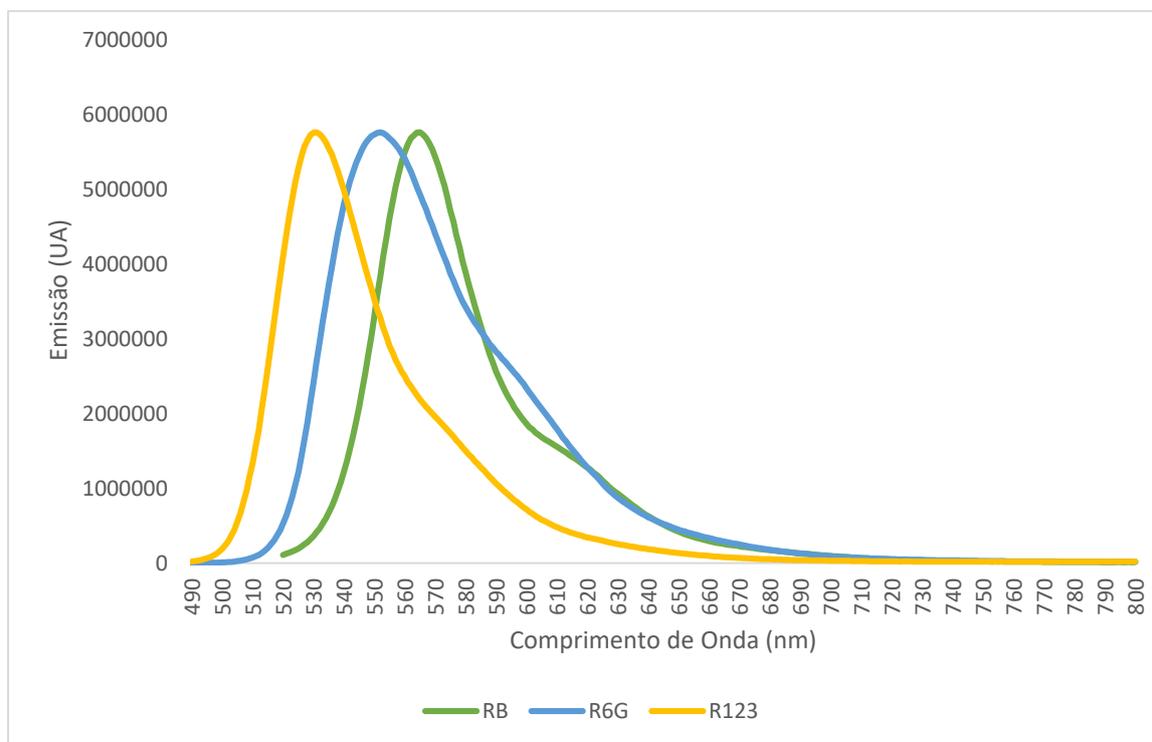
Cada uma das rodaminas acima citadas possui diferenças nos comprimentos de ondas para excitação e emissão de luz fluorescente como também nas respectivas absorbâncias, podendo ser diferenciadas facilmente a partir destas características. Nas figuras 1 e 2 são apresentados os comprimentos de onda de absorção e a emissão das rodaminas 6G, 123 e B presentes no banco de dados do programa PhotochemCAD, versão 2.1a (Du, 1998; Dixon, 2005).

Figura 4: Picos de Absorção das três rodaminas mais utilizadas. Rodamina B (RB): 543 nm. Rodamina 6G (R6G): 530 nm. Rodamina 123 (R123): 512 nm.



Fonte: OMLC, 2017

Figura 5: Picos de Emissão fluorescente das três rodaminas mais usadas. Rodamina B (RB): 565 nm. Rodamina 6G (R6G): 552 nm. Rodamina 123 (R123): 531 nm.



Fonte: OMLC, 2017

1.4 Cromatografia

O botânico russo M. S. Tswett publicou dois trabalhos em 1906 e um livro em 1910 descrevendo o seu trabalho com pigmentos de plantas que o levou a criar a cromatografia líquido sólido (Ettre; Sakodynskii, 1993a). Essa técnica permite a separação e a quantificação dos diferentes componentes de um extrato, proveniente por exemplo de uma amostra biológica. Para que isso ocorra, uma coluna (tubo) é preenchida por um sólido (fase estacionária). Na parte superior deste recipiente, é adicionada a amostra em solução seguida por um ou mais solventes puros (fase móvel) (Collins, 2009).

A cromatografia líquida é chamada de fase normal quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel. Quando o inverso ocorre, ou seja, a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, a técnica passa a ser caracterizada de fase reversa. A sílica e a alumina são os principais adsorventes utilizados na cromatografia por fase normal, mas fases estacionárias quimicamente ligadas com alta polaridade, como dióis, ciano ou amino, podem ser suportados em sílica para separar compostos

ionizáveis e neutros. Além disso, nesse tipo de cromatografia, os solventes orgânicos são frequentemente usados como fase móvel. A fase normal é normalmente menos eficiente e reprodutível que a fase reversa, no entanto é mais barata, comporta maior quantidade de amostra e é mais estável em pH extremo. (Snyder et al., 1979; 1993; 1997, apud Oliveira, 2005).

1.5 Direcionamento do Trabalho

Canetas marca textos podem ser utilizadas em análises biológicas como alternativa aos corantes disponíveis no mercado pelo fato de que podem conter vários compostos fluorescentes, serem de fácil acesso e por serem mais baratos que os corantes convencionais (Takase; Tadokoro; Takahashi, 2013). Nesse sentido, no presente trabalho descrevemos um método para purificar e analisar a pureza de substâncias fluorescentes da caneta esferográfica Pilot BP-1 INOX 1.0 (Brasil) de cor vermelha. A escolha de tal caneta se deu após testes em eletroforese, no qual foi possível visualizar que o seu extrato etanólico bruto apresentou carga positiva. Corantes carregados positivamente podem se ligar a material biológico com carga negativa, como ácidos nucleicos, proteínas e células. Por isso, o desenvolvimento de um método de purificação é essencial para diminuir as variáveis em testes com corantes provenientes de extratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais:

Purificar os corantes fluorescentes de interesse, para aplicação biotecnológica, a partir de caneta vermelha de uso comum.

2.2 Objetivos Específicos:

- Purificar as substâncias fluorescentes da caneta vermelha Pilot BP-1 INOX 1.0 (Brasil);
- Determinar as características óticas dos compostos purificados;
- Comparar os fluoróforos obtidos com a rodamina B e rodamina 123.

3 METODOLOGIA

3.1 Preparação da Amostra e TLC inicial

O conteúdo total de tinta de uma caneta esferográfica Pilot BP-1 INOX 1.0 (Brasil) de cor vermelha foi despejada em um tubo de reação de 2,0 ml. Esse material teve o seu conteúdo líquido evaporado em concentrador à vácuo Concentrator Plus (Eppendorf) durante 4 horas à 60° C, totalizando 113mg de peso seco. Um ml de etanol foi adicionado ao tubo que então foi agitado vigorosamente por cerca de um minuto.

A solução etanólica foi analisada inicialmente por TLC (Figura 6). Para isso, uma gota da tinta com etanol foi colocada sob fase estacionária e para a fase móvel foi usado 50% de acetato de etila e 50% de hexano. Posteriormente, a placa do TLC foi transferida para o transiluminador Safe Imager™ 2.0 Blue-Light (Invitrogen), onde a fluorescência pôde ser visualizada com a emissão de luz azul (488nm) proveniente do aparelho.

3.2 Cromatografia por Coluna

Para purificação dos compostos fluorescentes presentes na tinta da caneta utilizada, a solução etanólica foi usada para obter uma pastilha misturando com sílica até que a mistura ficasse homogênea e posteriormente usada para purificação dos compostos em coluna cromatográfica.

A coluna cromatográfica foi vedada na porção inferior com algodão e preenchida com 11 gramas de sílica gel. Posteriormente, foi realizado o empacotamento com 100 ml de hexano. O material da pastilha foi então colocado sobre a sílica já empacotada. Assim, foi iniciada a passagem das fases móveis: 20ml de hexano; 20ml de hexano/acetato de etila (50:50); 20ml de hexano/acetato de etila (25:75); 20 ml de acetato de etila; 20 ml de acetato de etila/etanol (75:25); 20 ml de acetato de etila/etanol (60:40); 20 ml de acetato de etila/etanol (50:50); 20 ml de acetato de etila/etanol (40:60); 60 ml de acetato de etila/etanol (25:75); 60 ml de

acetato de etila/etanol (10:90) e 150 ml de etanol, nesta ordem. As soluções provenientes da coluna foram coletadas em tubos de ensaio e unificadas de acordo com as análises por TLC com solução de fase móvel de 15 ml de etanol, 15 ml de acetato de etila e 0,5 ml de hexano. Os pontos fluorescentes foram localizados sob a emissão de luz à 488 nm a partir do transiluminador

3.3 Preparação das Amostras Para CLAE e Leituras no Espectrofluorímetro

As frações obtidas a partir da purificação por coluna cromatográfica foram mantidas em estufa (Medclave, modelo 4) à 60°C até que os conteúdos líquidos pudessem ser transferidos para tubos de reação de 2,0 ml. Posteriormente, o restante do líquido foi totalmente evaporado em concentrador à vácuo Concentrator Plus (Eppendorf) à 60°C. Então, foi realizada a pesagem das amostras e os corantes foram diluídos em etanol na concentração de 1g/L. Como controle usamos rodamina B e rodamina 123, também diluídas em etanol, com a concentração de 0,1g/L e 0,3g/L, respectivamente.

3.4 Condições Analíticas do CLAE

As frações obtidas por cromatografia em coluna (tabela 1) foram injetadas no cromatógrafo líquido LC-6AD (Shimadzu) com coluna C18. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna de 4,6x250 mm e tamanho de partícula de 5µm. A fase móvel usada foi isocrática e constituída por 65% metanol e 35% água com taxa de fluxo de 1,1 ml/min a 35°C. A medição da fluorescência foi realizada pelo detector RF 20A xs (Shimadzu) utilizando os comprimentos de onda de 550-580nm e 480-550 nm (excitação/emissão).

Tabela 1 Concentração de Rodaminas e Amostras (numeradas de 1-9) Injetadas no CLAE

	R123	RB	3; 7; 8; 9	1; 2; 4; 5; 6
Concentração (g/L)	0,3	0,1	0,05	1

3.5 Determinação de Características Óticas em Espectrofluorímetro

Os corantes purificados foram colocados em placa de 96 poços. Então, a placa foi introduzida no aparelho EnSpire™ 2300 Multilabel Reader (Perkin Elmer) para que fosse feito o escaneamento da absorbância, desde 300nm a 700nm, e dos comprimentos de onda de excitação e emissão. O comprimento de onda para excitação foi regulado fixando a leitura em 540 nm e escaneando os comprimentos de onda de excitação desde 300 nm até 520 nm. Já para a análise de emissão, o comprimento de onda de excitação foi fixado em 500 nm, escaneando a emissão desde 520 nm até 700 nm.

3.6 Eletroforese

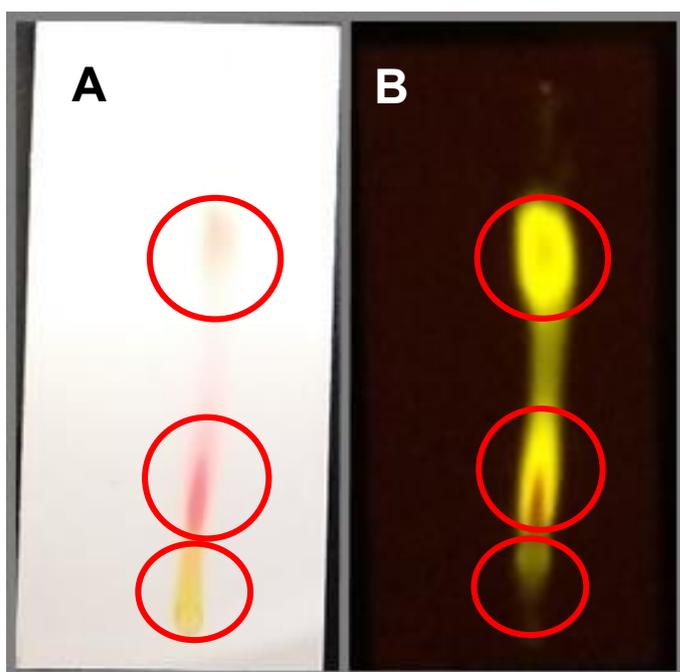
Os corantes purificados foram submetidos a uma eletroforese à 100 V e 150 mA durante 20 minutos em gel de agarose 1%. Dois µl das soluções etanólicas de rodamina 123 (0,3 g/L), dos corantes purificados (1g/L), do extrato bruto da caneta pilot e 4 µl de rodamina B (0,1 g/L) foram diluídos em 8 µl de glicerina 40%. As soluções então foram colocadas dentro dos poços do gel de agarose com o auxílio de uma pipeta. Os géis foram avaliados em transiluminador de luz azul Safe Imager™ 2.0 Blue-Light (Invitrogen) e fotografados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TLC Inicial

O TLC inicial da solução etanólica extraída da caneta vermelha Pilot BP-1 INOX 1.0 (Brasil), representado pela Figura 6, permitiu a observação de pelo menos três principais substâncias, sendo que a substância na posição superior se encontra mais afastada das demais. Ao mesmo tempo, foi possível observar que dois dos compostos emitiam fluorescência quando excitados com luz azul.

Figura 6: Imagem do TLC inicial do extrato bruto de tinta sob luz branca (A) e luz azul (B). Os círculos vermelhos marcam os principais compostos visualmente identificáveis.



4.2 Purificação dos Compostos Fluorescentes por Coluna Cromatográfica

A cromatografia líquida em coluna (Figura 7) separou a solução etanólica da tinta da caneta em dois compostos fluorescentes (Figura 8). O primeiro desses compostos começou a sair da coluna enquanto era adicionada a fase móvel de hexano/acetato de etila (25:75). O segundo composto começou a deixar a coluna durante a passagem da fase móvel correspondente a acetato de etila/etanol (25:75). Os compostos fluorescentes contidos na coluna só deixaram de ser avistados após a

passagem da fase móvel de 150 ml de etanol, quando se encerrou a purificação cromatográfica. Após o encerramento da adição da fase móvel, a porção onde havia sido colocada a amostra permaneceu com coloração (Figura 7 D), no entanto já não havia fluorescência detectável por meio do transiluminador.

A primeira porção de compostos fluorescentes (fração de compostos 2 e 3) começou a sair da coluna durante a adição de hexano/acetato de etila (25:75). Como os eluentes utilizados durante a purificação estavam em um gradiente de polaridade, é possível afirmar que as substâncias que saíram primeiro na coluna são menos polares que as que saíram depois, devido a interação entre essas moléculas com a fase móvel. Assim, é possível afirmar que os corantes 2 e 3 são mais apolares que 7, 8 e 9, que saíram durante a passagem de acetato de etila/etanol (40:60).

Figura 7: Imagens da coluna cromatográfica em ordem cronológica. A: Início da purificação, com a amostra apenas empacotada. B: Início da saída das frações referentes aos corantes 2 e 3. C: Início da saída das frações referentes aos corantes 7, 8 e 9. D: Purificação encerrada.

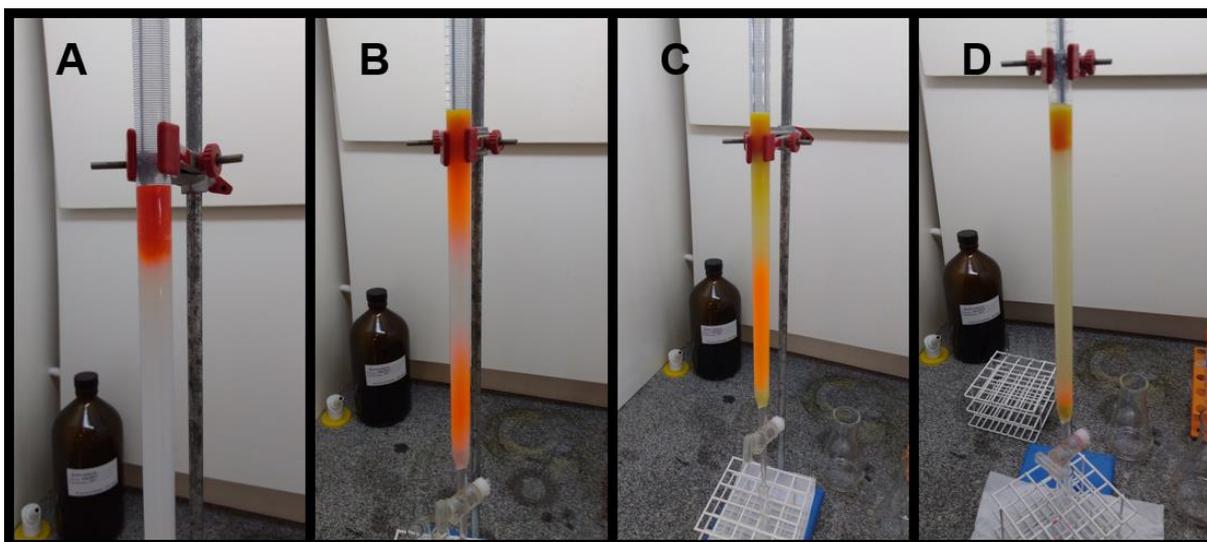
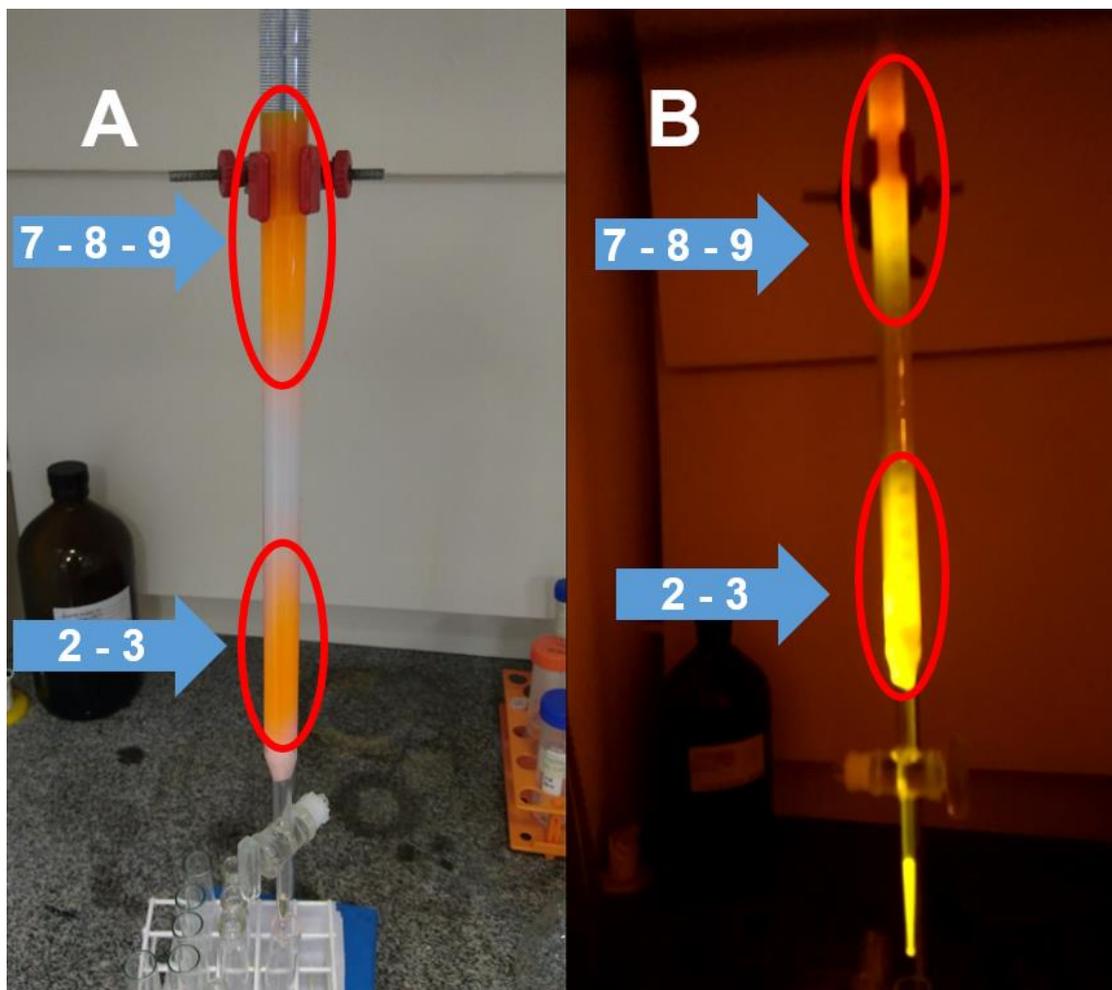


Figura 8: Purificação por coluna cromatográfica. A: coluna cromatográfica sob a luz branca. B: coluna cromatográfica sob luz azul (488nm) observada através do filtro do transiluminador Safe Imager™ 2.0 Blue-Light (Invitrogen). Círculos em vermelho marcam os corantes fluorescentes deslocando-se através da coluna. Flecha em azul aponta a localização dos corantes que foram nomeados de 2, 3, 7, 8 e 9.

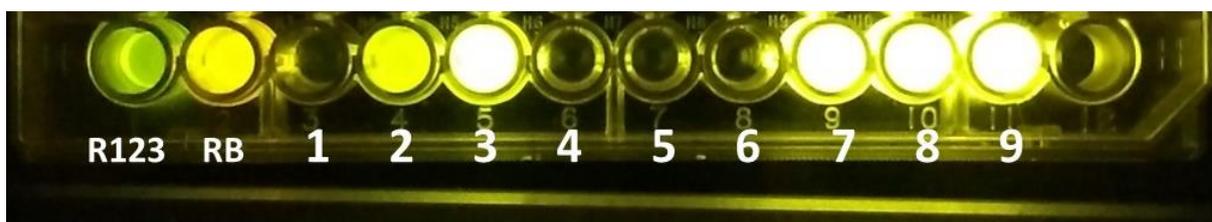


No total, foram obtidas 60 frações da purificação da caneta Pilot por coluna cromatográfica. Essas frações foram unidas no mesmo tubo de acordo com o padrão de pontos fluorescentes da análise por TLC. Assim, foram obtidas 9 frações, numeradas de 1 a 9 de acordo com a ordem de saída da coluna, sendo "1" a primeira a sair e "9" a última. O peso seco total de cada uma dessas amostras está descrito na tabela 1, enquanto a figura 9 representa a fluorescência de 100 μ l de cada amostra, na concentração de 0,1g/L, quando excitada com luz azul. O peso seco total obtido a partir de 113 mg de material bruto (tinta da caneta Pilot) foi de 12,5 mg.

Tabela 2 - Peso seco de todas as frações obtidas da purificação em coluna cromatográfica.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Peso	1170	760	4050	860	620	970	2259	750	1070
Seco (μg)									

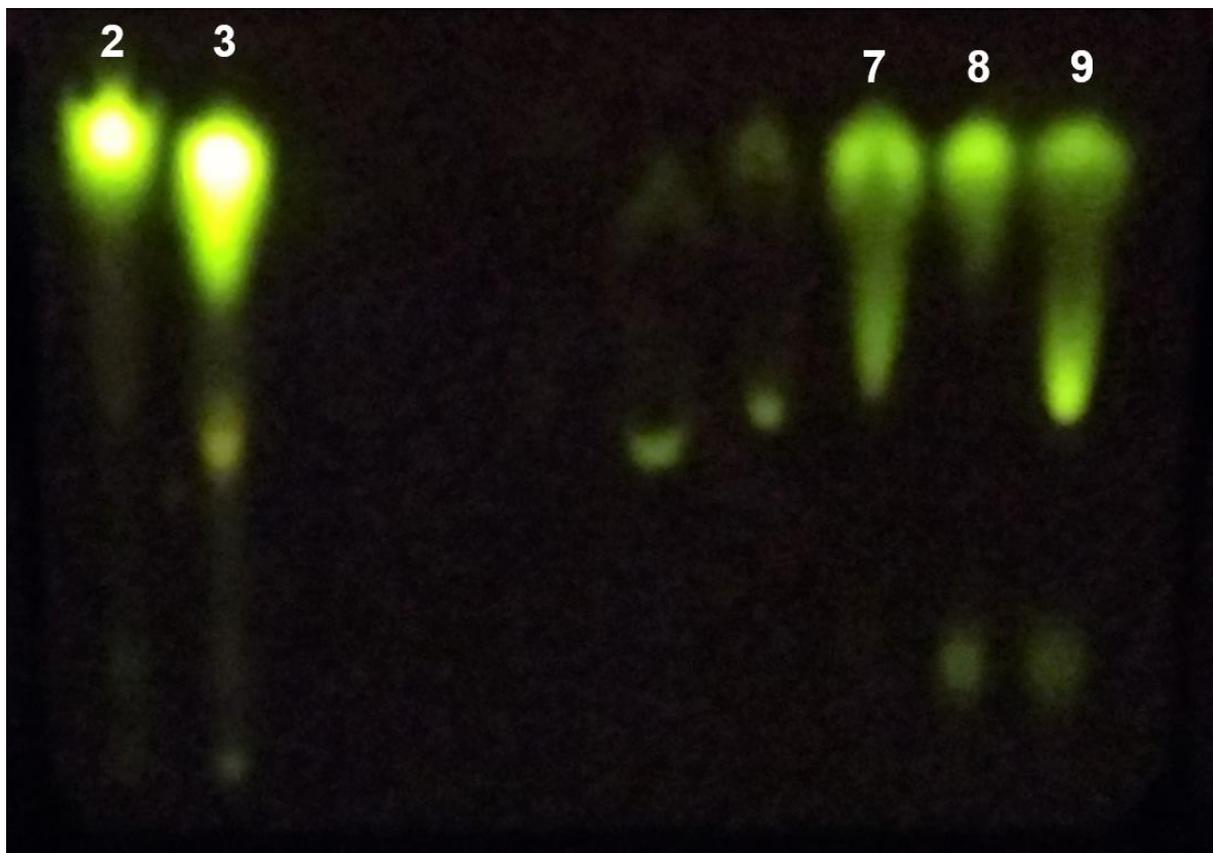
Figura 9: Corantes purificados por cromatografia em coluna e rodaminas em placa de 96 poços. As amostras foram excitadas com luz azul (488nm).



4.3 TLC após a coluna

No TLC realizado após a purificação por coluna cromatográfica e união das frações (Figura 10), é possível verificar um ponto fluorescente mais concentrado no composto 2 em relação ao composto 3. Quanto os 3 fluoróforos na extremidade direita da figura 10, é possível notar que o composto 8 apresenta uma mancha fluorescente mais concentrada em um ponto.

Figura 10: TLC realizado após a purificação. Os números indicam os compostos fluorescentes de interesse.

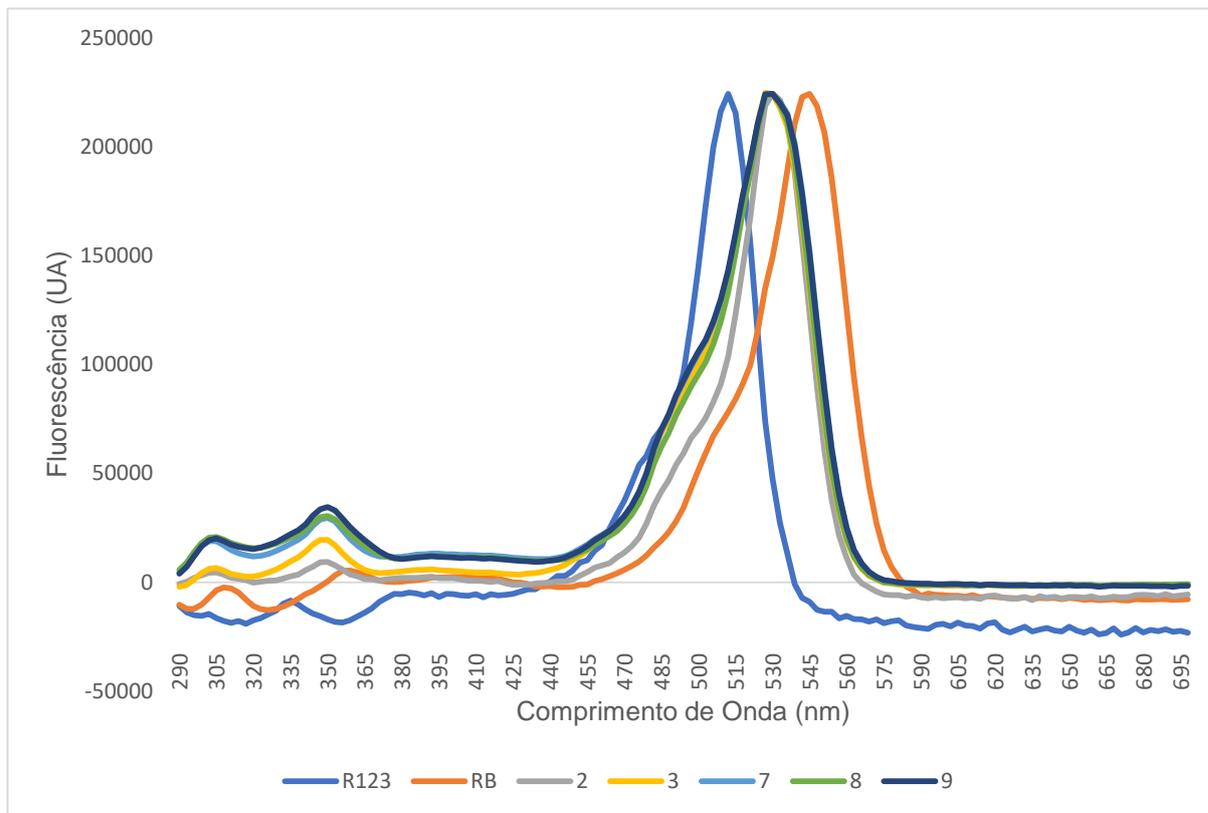


4.4 Determinação de Características Óticas em Espectrofluorímetro

Algumas rodaminas (123 e B) foram utilizadas como um padrão de comparação tanto na obtenção de cromatogramas por CLAE como nas análises por espectrofluorimetria. Isso se deu devido a frequente presença dessas moléculas em trabalhos de identificação de compostos em canetas para análise forense, sendo os principais derivados encontrados a rodamina B e a 6G (Chen, 2007; Siegel et al, 2005; Geiman et al, 2009).

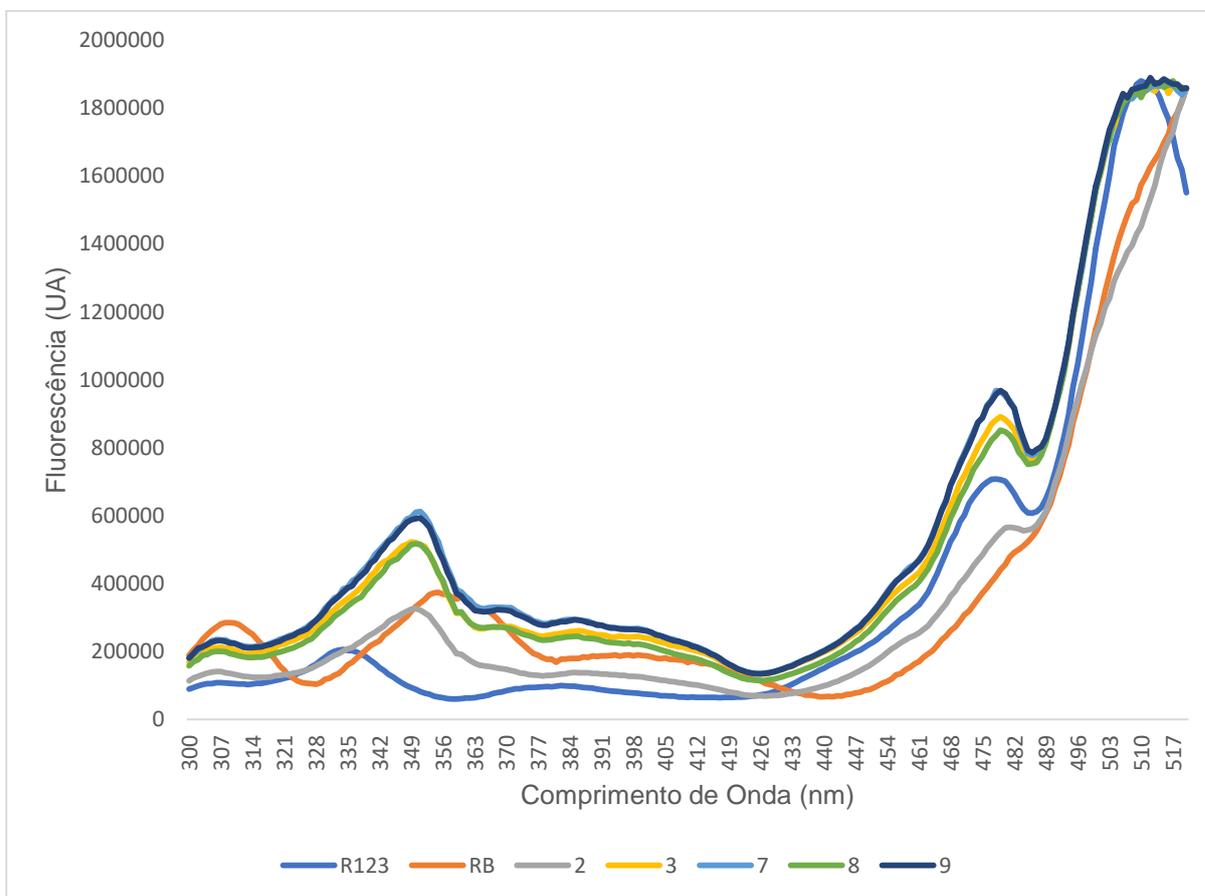
Todas as amostras purificadas tiveram o pico de absorção em 530 nm, com exceção do corante 2 que mais absorveu em 533 nm (figura 11). Ao contrário dos corantes, as rodamina B e 123 tiveram picos máximo de absorção em 543 nm e 512 nm, correspondendo com os valores presentes no banco de dados do programa PhotochemCAD, versão 2.1a (Du, 1998; Dixon, 2005). Entretanto, os espectrogramas dos corantes se assemelham aos das rodaminas (figura 4), especialmente ao da rodamina 6G, que possui pico de absorção em 530 nm.

Figura 11: Espectrograma da absorção de rodamina 123, rodamina B, corantes 2, 3, 7, 8 e 9 diluídos em etanol.



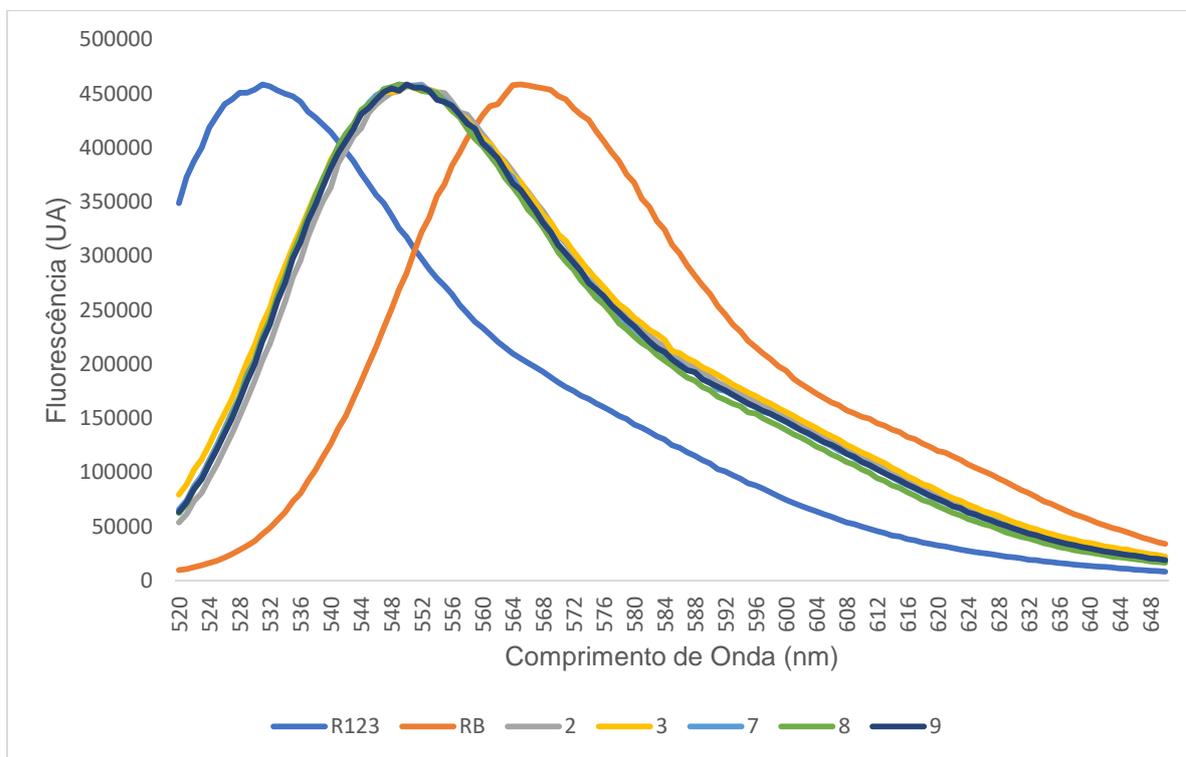
No espectrograma da figura 12, é possível notar que a maioria das substâncias apresenta 2 picos secundários, um em aproximadamente 350 nm e outro em 480 nm. A rodamina 123 em solução etanólica possui o pico máximo de emissão em 534 nm (Kubin; Fletcher, 1982) e na figura 12, é a única que apresenta um decaimento após 500 nm, pois o detector do espectrofluorímetro foi fixado em 540 nm. Para se determinar o espectro de emissão de algum fluoróforo, é necessário que o espectrofluorímetro excite a amostra com luz monocromática enquanto é feita a leitura pelo detector em um determinado comprimento de onda (Parker; Rees, 1960). Assim, a figura 12 mostra que nenhuma das substâncias testadas além da rodamina 123 apresenta pico de emissão em 540 nm.

Figura 12: Espectrograma de Excitação dos corantes purificados e da Rodamina B e 123. O detector foi fixado em 540 nm.



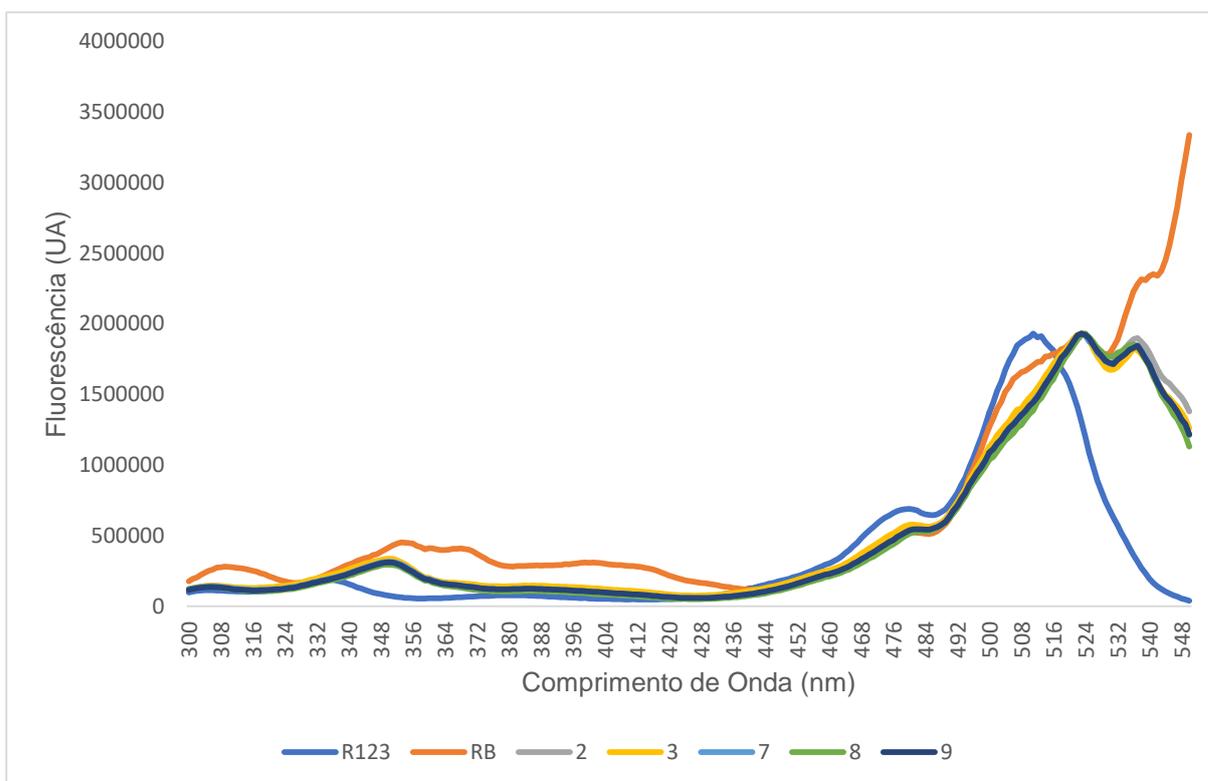
O espectrograma de emissão no comprimento de onda de 500 nm (figura 13) mostrou que os corantes purificados têm um comportamento fluorescente diferente das rodaminas testadas. Os fluoróforos purificados tiveram um pico máximo de emissão entre 549 nm e 552 nm enquanto que a rodamina 123 teve seu máximo em 531 nm e a rodamina B em 565 nm. De acordo com Sabnis (2010), a rodamina 6G possui pico máximo de emissão em 551 nm, enquanto Kubin e Fletcher (1982) afirmam que a emissão máxima da molécula é de 568 nm. Dessa forma, é possível que a rodamina 6G esteja entre os compostos fluorescentes presentes nos corantes purificados.

Figura 13: Espectrograma de Emissão dos corantes purificados e da Rodamina B e 123. Emissão de luz a 500 nm.



A figura 14 mostra o cromatograma de emissão utilizando o comprimento de onda de 540 nm. Nessa figura é possível observar que todos os fluoróforos purificados a partir da caneta apresentam um comportamento óptico semelhante, com pico máximo em 523 nm, enquanto a rodamina 123 teve pico máximo em 511 nm. A emissão da rodamina B, ao contrário dos demais fluoróforos testados, continuou a subir após 540 nm.

Figura 14: Espectrograma de excitação dos corantes purificados e da Rodamina B e 123. Emissão de luz a 540 nm.



4.5 Cromatogramas obtidos a partir de CLAE

Acompanhando os dados da literatura de que as rodaminas fossem as moléculas responsáveis pela fluorescência presente na caneta Pilot e nas frações dela purificadas, resolvemos nos basear em um protocolo de identificação de rodamina B por CLAE descrita por Qi e colaboradores (2014). Os corantes 2 (figura 16) e 8 (figura 17) foram os que aparentavam estar mais purificados. Analisando nossas amostras por CLAE (figura 15), foi possível notar um pico maior em 22,5 minutos. Nenhum corante apresentou pico nesse tempo de retenção.

O corante 2 (figura 16) apresenta maior concentração de fluorescência no tempo de retenção entre 12,5 e 20 minutos. No cromatograma do extrato bruto, há um pequeno pico em 17,5 minutos que pode ser uma substância purificada presente no corante 2. O corante 8 foi o que apresentou a melhor purificação, possuindo um pico maior próximo a 5 minutos. Um pico próximo a 5 minutos pode ser visto também no extrato bruto da caneta pilot (figura 15).

A rodamina B (figura 18) apresentou um pico máximo de fluorescência em 25 minutos, enquanto a rodamina 123 teve o seu pico em 20 minutos. O pico máximo do extrato bruto da caneta Pilot está entre os picos da rodamina, o que indica que essas moléculas não estão presentes na tinta da caneta analisada. Os corantes purificados por coluna cromatográfica também não apresentaram picos em tempo de retenção semelhante ao das rodaminas testadas.

Figura 15: Perfil Cromatográfico da amostra bruta em etanol da caneta Pilot. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.

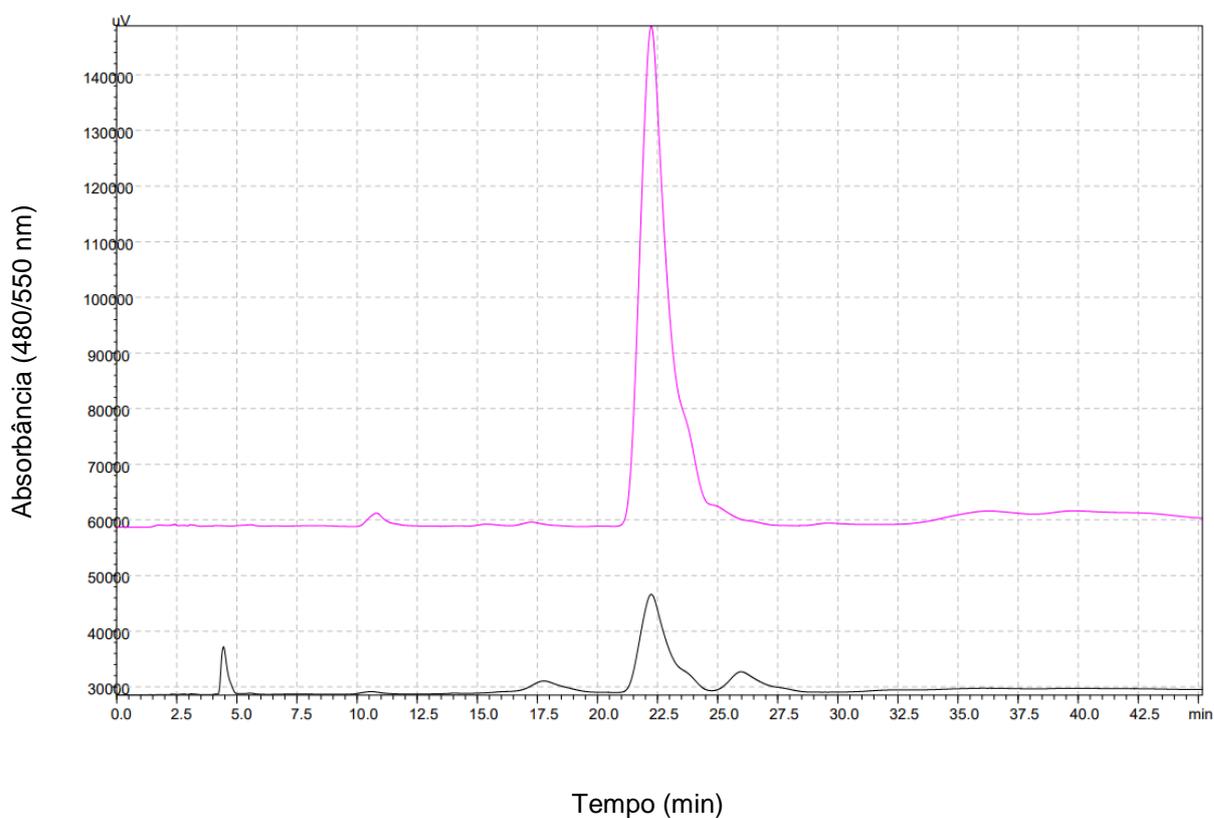


Figura 16: Análise por CLAE do corante 2 purificado em coluna cromatográfica. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.

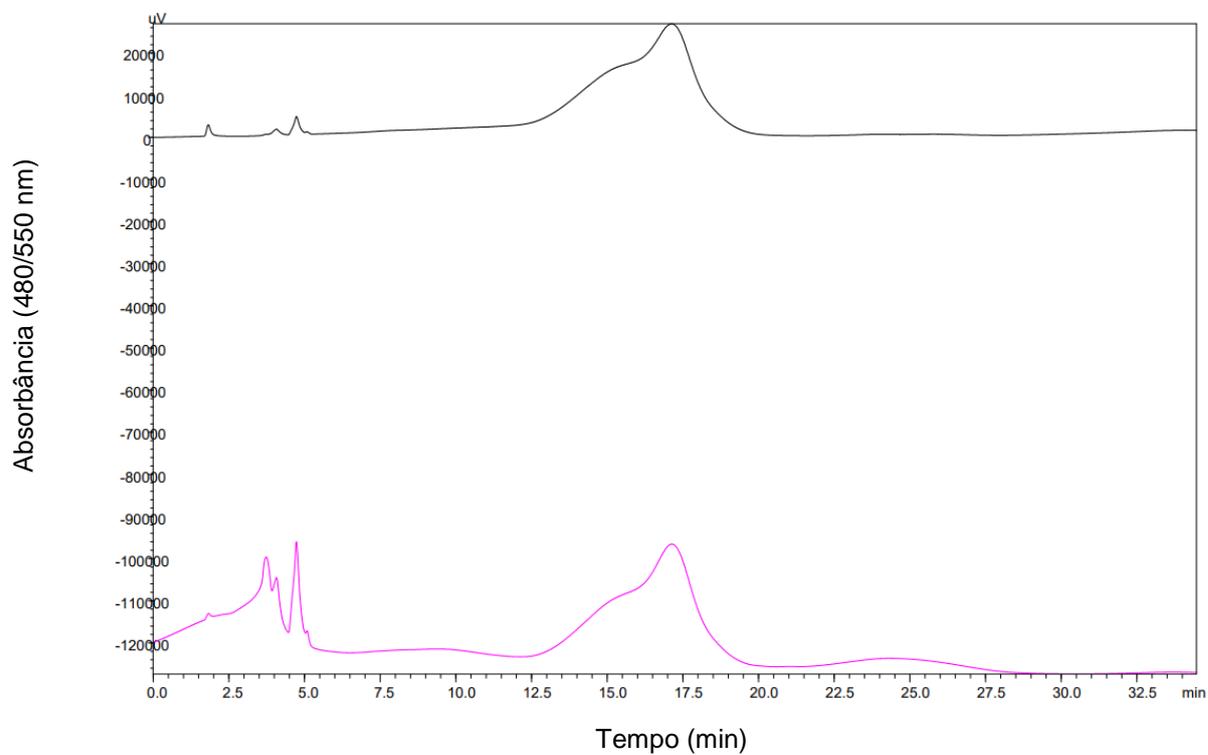


Figura 17: Análise por CLAE do corante 8 purificado em coluna cromatográfica. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5 μ m. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.

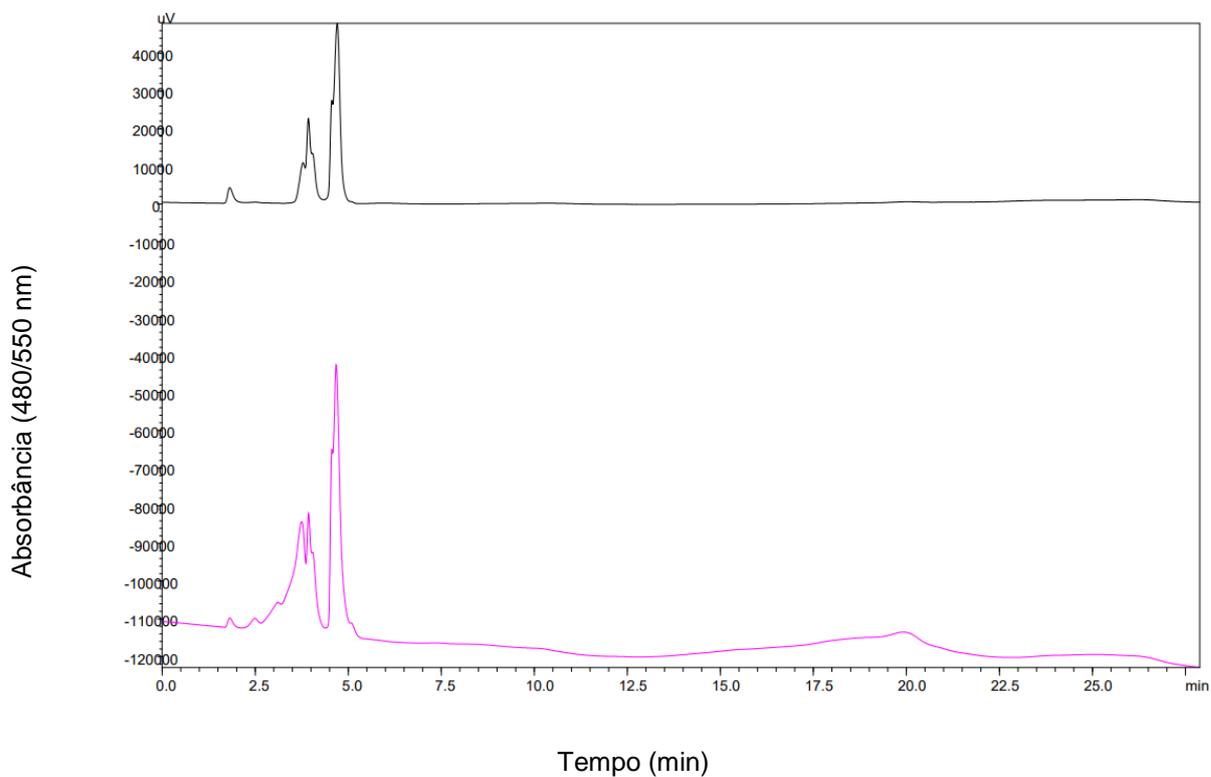


Figura 18: Análise por CLAE da rodamina B. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5 μ m. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.

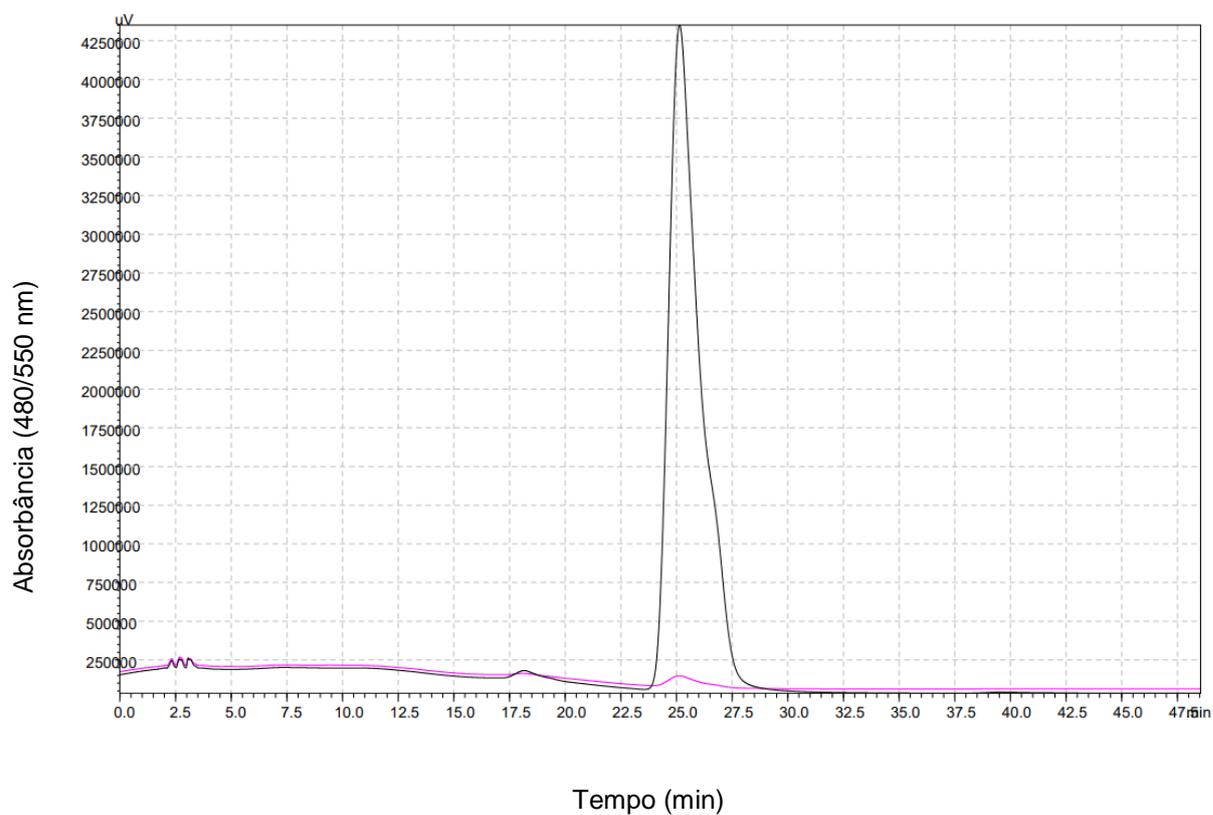
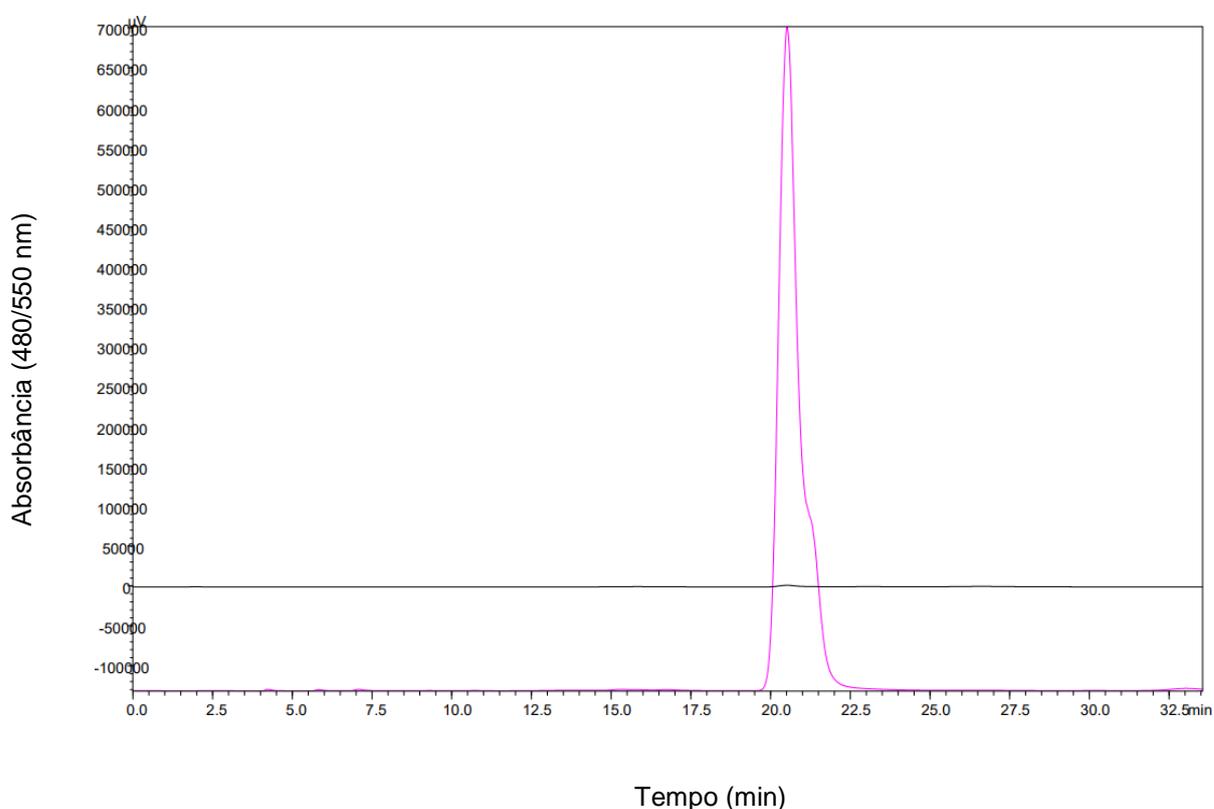


Figura 19: Análise por CLAE da rodamina B. Coluna hidrofóbica modelo Shimadzu C18 Shim-Pack Prep-ODS(H)KIT. Dimensões da coluna: 4,6x250 mm, tamanho de partícula: 5µm. A linha contínua rosa é referente a absorbância do espectro em 480 nm e a linha contínua preta é referente a absorbância do espectro em 550 nm.

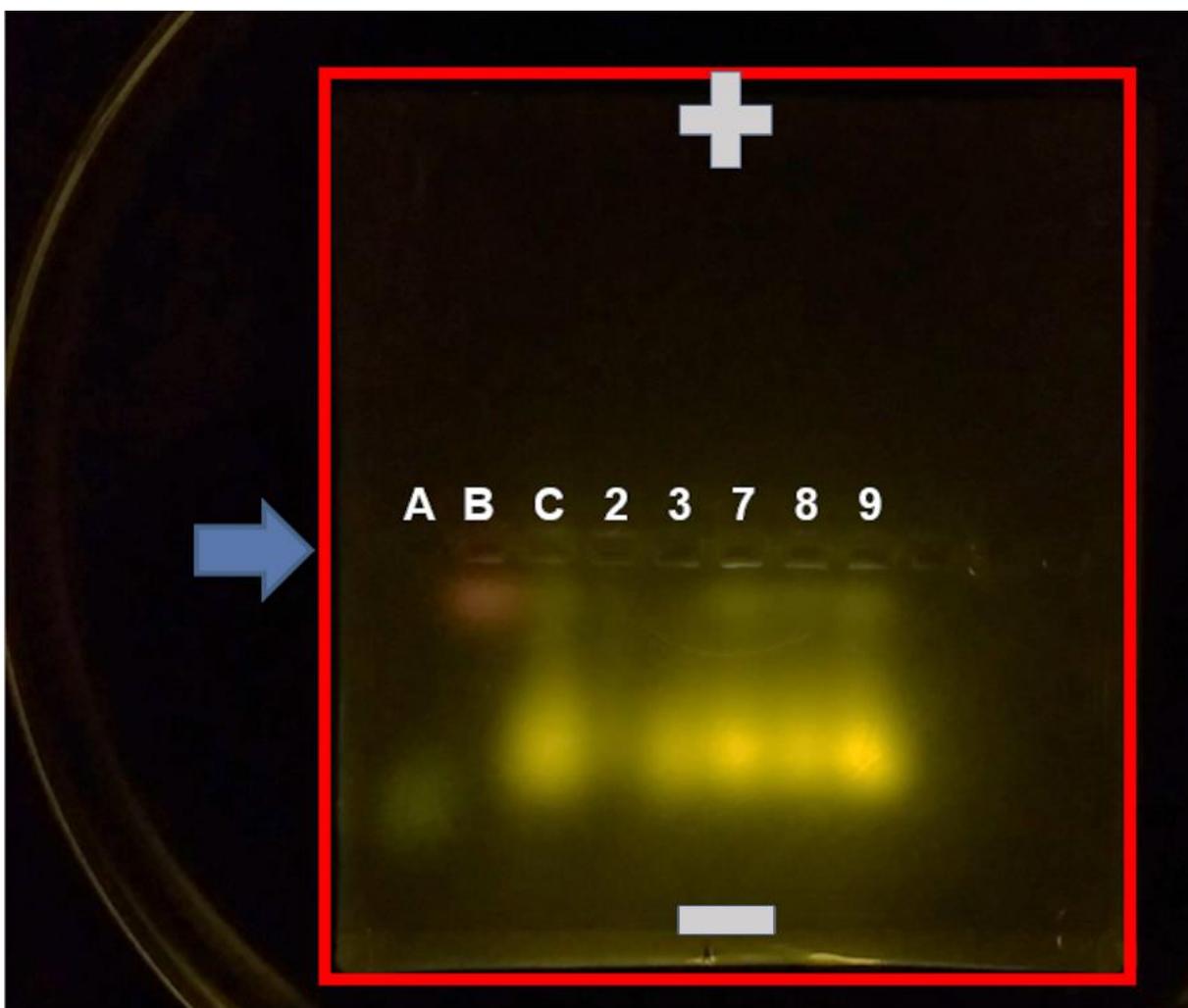


4.6 Eletroforese

A eletroforese em gel de agarose dos fluoróforos purificados mostrou que os mesmos possuem carga líquida positiva nas condições experimentais em que foram testados. Segundo Johnson e colaboradores (1981), a rodamina 123 possui carga positiva e a rodamina B é neutra em pH fisiológico. A rodamina B, apesar de sua neutralidade, migrou pelo gel por uma curta distância em direção ao pólo negativo. Na linha horizontal dessa molécula há a concentração de outras moléculas fluorescentes em todas as amostras provenientes da caneta, mas que apresentam fluorescência diferente, com exceção do corante 2 e 3. Como a técnica de eletroforese separa moléculas por carga e peso molecular (Brammer, 2001), é possível afirmar que há moléculas fluorescentes com tais características semelhantes à da rodamina B. A rodamina 123, no entanto, migrou mais que todas as substâncias, indicando que provavelmente essa molécula e outras de mesma carga e peso molecular não estão

presentes na amostra bruta e nos corantes purificados da caneta. Além disso, a amostra bruta possui um padrão de bandas de fluorescência parecido com os corantes 7,8 e 9, o que não significa que a purificação não ocorreu, pois segundo Chen (2007), as tintas de canetas de uso comum podem conter diversas substâncias. Por isso, a concentração de tais moléculas pode ter sido diminuída ou zerada durante a purificação em coluna cromatográfica.

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose com os corantes 2,3,7,8,9 (representados por seus números correspondentes); Rodamina 123 (A); Rodamina B (B); Extrato bruto da caneta Pilot (C). A linha contínua vermelha determina os limites do gel de agarose para melhor visualização da imagem. Os sinais em cinza determinam a carga submetida pela eletroforese sobre as amostras. A flecha em azul aponta a localização dos poços nos quais foram introduzidos os corantes.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir deste trabalho, concluímos os seguintes pontos:

- Os cromatogramas de CLAE, as análises por TLC e a eletroforese indicaram que nenhuma molécula foi isolada durante a purificação em coluna cromatográfica. Não foi possível concluir o grau de pureza do corante a partir do perfil cromatográfico obtido por CLAE. Por isso, tanto a purificação por coluna quanto a análise por CLAE devem ser ajustadas para melhores resultados;
- Os corantes fluorescentes purificados por cromatografia possuem carga positiva a partir do teste em eletroforese. Esse resultado é favorável no sentido de que várias biomoléculas frequentemente utilizadas na biotecnologia apresentam carga negativa, como proteínas, ácidos nucleicos e células vivas. Portanto, os corantes purificados podem possuir atração eletrostática com essas biomoléculas e servir como um marcador, o que deve ser testado futuramente;
- As análises por CLAE indicaram que as rodaminas 123 e B não estão presentes na caneta Pilot, porém os picos gerados pelo fluorímetro podem ser um indicativo de que a rodamina 6G faça parte da composição dos corantes purificados. Esse dado pode ser utilizado em análises forenses para detectar falsificações de documentos que utilizem a caneta vermelha Pilot BP-1 INOX 1.0 (Brasil);
- Uma futura análise por CLAE deve ser feita usando a rodamina 6G como controle;
- O método descrito neste trabalho mostrou que é possível separar compostos fluorescentes de uma amostra apenas com uma coluna cromatográfica, um TLC e um transiluminador. Esse método pode ser adaptado para purificar e

prospectar compostos fluorescentes de extratos de materiais biológicos. Os vegetais, por exemplo, são conhecidos por possuírem diversos compostos secundários, alguns deles que somente são produzidos em condições ambientais específicas e que podem ainda não ser conhecidos. Assim, novas moléculas fluorescentes podem ser purificadas e analisadas para a aplicação na biotecnologia.

- Os fluoróforos purificados apresentaram comportamentos óticos muito semelhantes, se deslocaram de forma parecida no TLC e apresentaram o mesmo pico na análise por CLAE (entre 2,5 e 5 min). Entretanto, a purificação por coluna cromatográfica separou os compostos fluorescentes em duas faixas principais, que se moveram pela coluna de forma muito divergente. Por isso, essas substâncias podem ser iguais ou serem derivadas de uma mesma molécula, talvez com alguma alteração de radical.

6 REFERÊNCIAS

Aginsky, V. N. **Some New Ideas for Dating Ballpoint Inks - A Feasibility Study.** *Journal of Forensic Sciences*, vol. 38, n. 5, pp. 1134- 1150, Set. 1993.

Aiuchi, T., Daimatsu, T., Nakaya, K. & Nakamura, Y. **Fluorescence changes of rhodamine 6G associated with changes in membrane potential in synaptosomes.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 685, 289-296, (1982).

Bassiri, A., Chan, N. B., McLeod, A., Rossi, S. & Phillips, P. **Disseminated cutaneous infection due to *Mycobacterium tuberculosis* in a person with AIDS.** *CMAJ* 148, 577–578 (1993).

Beija, M., Afonso, C. A. M. & Martinho, J. M. G. **Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes.** *Chem. Soc. Rev.* 38, 2410–2433 (2009).

Bogen, S.-T., Karolin, J., Molotkovsky, J. G. & Johansson, L. B.-Å. **1,32-Dihydroxy-dotriacontane-bis(Rhodamine) 101 ester A lipid membrane spanning bichromophoric molecule as revealed by intramolecular donor–donor energy migration (DDEM).** *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 94, 2435–2440 (1998).

Brandtzaeg, P. **Rhodamine Conjugates: Specific and Nonspecific Binding Properties in Immunohistochemistry***. *Annals of the New York Academy of Sciences* 254, 35–53 (1975).

Chen, Hu-Sheng. **Identification of Rhodamine 6g and Rhodamine B dyes present in ballpoint pen inks using high-performance liquid chromatography and UV-Vis spectrometry.** *Forensic Science Journal*, v. 6 (1), p. 21-37, 2007.

Costa, A.F. **Farmacognosia**, 3ª ed., Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2000.

Crown, D. A.; Brunelle, R. L.; Cantu, A. A. **The Parameters of Ballpen Ink Examinations.** *Journal of Forensic Science*, v. 21, n. 4, 1976

Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Staiano-Coico, L., Kapuscinski, J. & Melamed, M. R. **Interactions of Rhodamine 123 with Living Cells Studied by Flow Cytometry.** *Cancer Res* 42, 799–806 (1982).

Dickman, D. **Methods of detecting prostate cancer**. PCT Int. Appl. WO2006054296, 2006; Chem. Abstr 145, 3346, 2008.

Dixon, J. M., M. Taniguchi and J. S. Lindsey. "PhotochemCAD 2. **A Refined Program with Accompanying Spectral Databases for Photochemical Calculations**. Photochem. Photobiol., 81, 212-213, 2005.

Djozan, D., Baheri, T., Karimian, G. & Shahidi, M. **Forensic discrimination of blue ballpoint pen inks based on thin layer chromatography and image analysis**. *Forensic Sci. Int.* 179, 199–205 (2008).

Du, H., R.-C. A. Fuh, J. Li, L. A. Corkan and J. S. Lindsey. **PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry**. Photochem. Photobiol. 68, 141-142, (1998).

Dunn, T., Hu, R., Isaacs, W., Luo, J. **Methods of detecting prostate cancer**. Patente: WO2009011911 A3, (2009).

Entwistle, A. & Noble, M. **The use of Lucifer yellow, bodipy, FITC, TRITC, RITC and Texas red for dual immunofluorescence visualized with a confocal scanning laser microscope**. *Journal of Microscopy* 168, 219–238 (1992).

a Ettore, L. S. & Sakodinskii, K. I. M. S. **Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899–1903)**. *Chromatographia* 35, 223–231 (1993).

b Ettore, L. S. & Sakodinskii, K. I. M. S. **Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903–1910)**. *Chromatographia* 35, 329–338 (1993).

Ito, J. A. **Técnicas Espectroscópicas em Biofísica**. Caderno de Física da UEFS, 03 (01) p 21-29 (2004).

Geiman, I., Leona, M. & Lombardi, J. R. **Application of Raman spectroscopy and surface-enhanced Raman scattering to the analysis of synthetic dyes found in ballpoint pen inks**. *J. Forensic Sci.* 54, 947–952 (2009).

Johnson, L. V., Walsh, M. L. & Chen, L. B. **Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123**. *PNAS* 77, 990–994 (1980).

Johnson, L. V., Walsh, M. L., Bockus, B. J. & Chen, L. B. **Monitoring of relative mitochondrial membrane potential in living cells by fluorescence microscopy.** *J. Cell Biol.* 88, 526–535 (1981).

Jones, R. W., Cody, R. B. & McClelland, J. F. **Differentiating writing inks using direct analysis in real time mass spectrometry.** *J. Forensic Sci.* 51, 915–918 (2006).

Karstens, T. & Kobs, K. **Rhodamine B and rhodamine 101 as reference substances for fluorescence quantum yield measurements.** *J. Phys. Chem.* 84, 1871–1872 (1980).

Ko, S.-K., Yang, Y.-K., Tae, J. & Shin, I. **In vivo monitoring of mercury ions using a rhodamine-based molecular probe.** *J. Am. Chem. Soc.* 128, 14150–14155 (2006).

Kolmakov, K. *et al.* **Red-emitting rhodamine dyes for fluorescence microscopy and nanoscopy.** *Chemistry* 16, 158–166 (2010).

Kubin, R. F. & Fletcher, A. N. **Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes.** *Journal of Luminescence* 27, 455–462 (1982).

Li, Z., Wu, S., Han, J. & Han, S. **Imaging of intracellular acidic compartments with a sensitive rhodamine based fluorogenic pH sensor.** *Analyst* 136, 3698–3706 (2011).

Liu, G. L. *et al.* **Peptide-nanoparticle hybrid SERS probes for optical detection of protease activity.** *J Nanosci Nanotechnol* 7, 2323–2330 (2007).

Lyter, A.H., III. **Examination of Ball Pen Ink by High Pressure Liquid Chromatography.** *Journal of Forensic Sciences*, vol. 27, n. 1, p. 154-160, jan. 1982.

Mandalà, M., Serck-Hanssen, G., Martino, G. & Helle, K. B. **The fluorescent cationic dye rhodamine 6G as a probe for membrane potential in bovine aortic endothelial cells.** *Anal. Biochem.* 274, 1–6 (1999).

Minier, C. & Moore, M. N. **Rhodamine B accumulation and MXR protein expression in mussel blood cells: effects of exposure to vincristine.** *Marine Ecology Progress Series* 142, 165–173 (1996).

Minta, A., Kao, J. P. & Tsien, R. Y. **Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores.** *J. Biol. Chem.* 264, 8171–8178 (1989).

Müller, A. *et al.* **Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater.** *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 659–666 (2010).

Murphy, R. F., Powers, S. & Cantor, C. R. **Endosome pH measured in single cells by dual fluorescence flow cytometry: rapid acidification of insulin to pH 6.** *J. Cell Biol.* 98, 1757–1762 (1984).

Oregon Medical Laser Center – OMLC. **Rhodamine 123.** Disponível em: <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/008.html>. Acesso em: 15 out 2017.

Oregon Medical Laser Center – OMLC. **Rhodamine 6G.** Disponível em: <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/083.html>. Acesso em: 15 out 2017.

Oregon Medical Laser Center – OMLC. **Rhodamine B.** Disponível em: <http://omlc.org/spectra/PhotochemCAD/html/009.html>. Acesso em: 15 out 2017.

Panchuk-Voloshina, N. *et al.* **Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates.** *J. Histochem. Cytochem.* 47, 1179–1188 (1999).

Penney, D. P., Powers, J. M., Frank, M., Willis, C. & Churukian, C. **Analysis and testing of biological stains--the Biological Stain Commission Procedures.** *Biotech Histochem* 77, 237–275 (2002).

Qi, P. *et al.* **Development of a rapid, simple and sensitive CLAE-FLD method for determination of rhodamine B in chili-containing products.** *Food Chem* 164, 98–103 (2014).

Rosenthal, I. **Photochemical stability of rhodamine 6G in solution.** *Optics Communications* 24, 164–166 (1978).

S. T. Bogen, J. Karolin, J. G. Molotkovsky and L. B. A. Johansson, J. **1,32-Dihydroxy-dotriacontane-bis(Rhodamine) 101 ester A lipid membrane spanning bichromophoric molecule as revealed by intramolecular donor–donor energy migration (DDEM).** Chemical Society, vol. 94, p. 2435–2440, 1998.

Sakayanagi, M.; Komuro J.; Konda, Y.; Watanabe, K.; Harigaya, Y. **Analysis of ballpoint pen inks by field desorption mass spectrometry.** *Journal of Forensic Science*, vol. 44, p. 1204–1214, 1999.

Seitz, O.; Grossmann, T. **Detection of target nucleic acids using template catalyzed transfer reactions.** *Eur. Pat. Appl. EP 1860197*, 2007

Siegel, J., Allison, J., Mohr, D. & Dunn, J. **The use of laser desorption/ionization mass spectrometry in the analysis of inks in questioned documents.** *Talanta* 67, 425–429 (2005).

Takase, Y., Tadokoro, R. & Takahashi, Y. **Low cost labeling with highlighter ink efficiently visualizes developing blood vessels in avian and mouse embryos.** *Develop. Growth Differ.* 55, 792–801 (2013).

Valeur, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications.** 2. ed. Wiley Online Library. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/book/10.1002/9783527650002>. Acesso em 15 jul 2017.

Valeur, B.; Santos, M. N. B. **A Brief History of Fluorescence and Phosphorescence before the Emergence of Quantum Theory.** *J. Chem. Educ.* 88, 731–738 (2011).

Veal, D. A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J. & Atfield, P. V. **Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells.** *J. Immunol. Methods* 243, 191–210 (2000).

Zehentbauer, F. M. *et al.* **Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: concentration and solvent effects.** *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 121, 147–151 (2014).

Zhang, J., Campbell, R. E., Ting, A. Y. & Tsien, R. Y. **Creating new fluorescent probes for cell biology.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 906–918 (2002).

Zlotnick, J. A. & Smith, F. P. **Separation of some black rollerball pen inks by capillary electrophoresis: preliminary data.** *Forensic Science International* p 92, 269–280 (1998).