

Espalhamento Dinâmico de Luz

Daniela A. Nomura, Thais A. Enoki, Carla Goldman, M. Teresa Lamy

Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

1. Introdução Teórica

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering, DLS), também chamada de Espectroscopia de Correlação de Fótons (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), é amplamente utilizada para a avaliação das dimensões de partículas em suspensão, tanto na pesquisa como na indústria.

Quando uma partícula é iluminada por uma fonte de luz, como um LASER, ela irá espalhar luz em todas as direções. A técnica de DLS consiste na análise das **flutuações de intensidade da luz espalhada** em um determinado ângulo. Essa análise fornece informações sobre o **movimento da partícula**, movimento este que é a causa das flutuações da intensidade.

Para amostras monodispersas, e diluídas, isto é, com partículas não-interagentes, em movimento Browniano (aleatório), é possível extrair o **coeficiente de difusão translacional** da partícula, D_T . Caso as partículas possam ser assumidas esfericamente simétricas, e não permeáveis ao solvente (por exemplo, proteínas globulares, outros polímeros e vesículas lipídicas em suspensão), usa-se a **equação de Stokes-Einstein** para o cálculo do diâmetro efetivo (D_{ef}), ou hidrodinâmico, das partículas em equilíbrio térmico com o solvente:

$$D_{ef} = \frac{k_B T}{3\pi\eta D_T} \quad (1.1)$$

sendo k_B a constante de Boltzmann, T a temperatura e η a viscosidade do solvente. Para o diâmetro efetivo, conta-se o diâmetro da partícula associada a contra-íons e camadas de hidratação que difundem junto com a partícula.

Característica importante do movimento Browniano, que possibilita a estimativa do tamanho das partículas:

- *partículas pequenas apresentam movimento rápido*
- *partículas grandes apresentam movimento lento*

A Fig. 1.1 ilustra um padrão de flutuações da intensidade da luz espalhada, em um determinado ângulo, em um volume fixo, iluminado, onde entram e saem partículas.

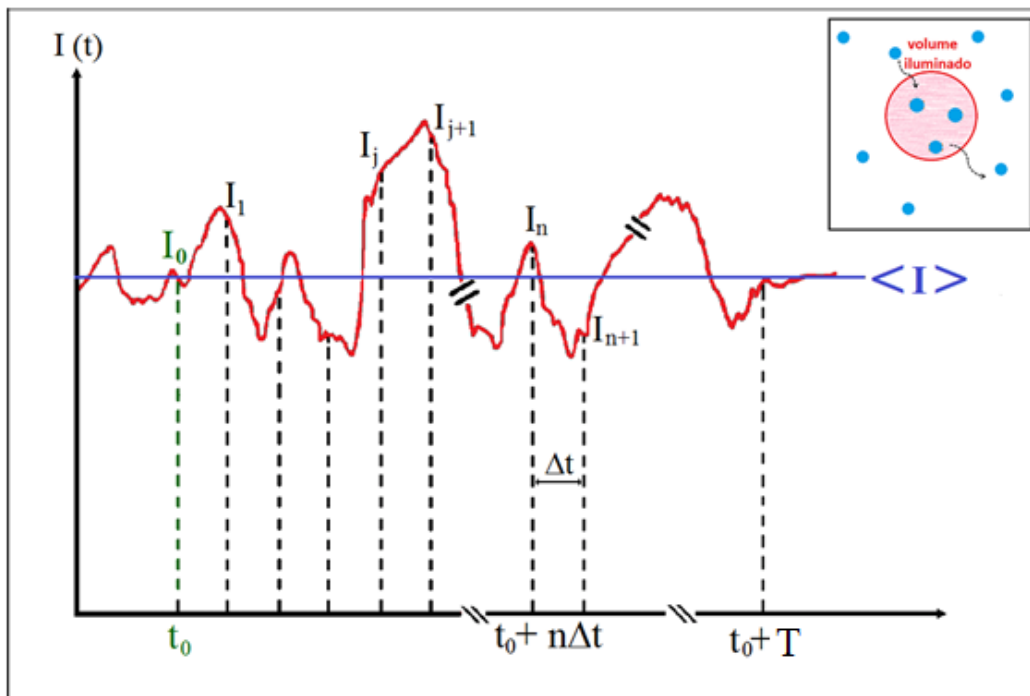


Figura 1.1: Flutuações da intensidade da luz espalhada devido à variação na densidade de partículas no volume de observação.

Faz parte do aparelho de DLS um **correlator**, que mede “o grau de semelhança entre dois sinais”. Tal medida é efetuada tomando-se valores para a intensidade $I(t)$ da luz espalhada em um instante de tempo t e a correspondente quantidade $I(t + \tau)$ em um instante posterior $t + \tau$, para todo t dentro do intervalo T em que o sinal é observado. O correlator calcula a função de correlação da intensidade de luz espalhada, $G^{(2)}(\tau)$, através da **média** do produto (*):

$$G^{(2)}(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle_t = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_j^N I_j I_{j+n} \quad (1.2)$$

(*) O sub-índice em $\langle \dots \rangle_t$, t no caso acima, indica a variável sob a qual a média está sendo calculada. Essa função é também chamada de função de autocorrelação, pois correlaciona as intensidades de luz espalhadas em instantes t e t + τ .

A segunda igualdade (Eq. 1.2) expressa a maneira pela qual a média é calculada na prática, tomando-se medidas da intensidade em intervalos discretos de tempo. I_j é a medida da intensidade da luz no instante $t_j = j \cdot \Delta t$ e I_{j+n} a medida de intensidade no instante t_{j+n} , sendo $t_{j+n} - t_j = n\Delta t = \tau$. A quantidade Δt é um intervalo que define uma unidade usada para discretizar o tempo. O aparelho fixa uma “janela” de tempo τ e calcula o produto (Eq. 1.2) para cada j. No final toma a média dividindo por N, sendo que $(\Delta t) \cdot N$ coincide com o tempo total T em que o sinal é observado no limite para o qual $N \rightarrow \infty$, $\Delta t \rightarrow 0$. Os resultados são apresentados mostrando $G^{(2)}(\tau)$ como função de τ (exemplo na Fig. 1.2). Os valores mínimo e máximo para τ , respectivamente τ_{\min} e τ_{\max} , são escolhidos de forma adequada, e dependem de uma estimativa prévia do coeficiente de difusão das partículas a serem detectadas, e portanto, de seus tamanhos. Quanto menor τ_{\min} , maior será a sensibilidade da medida a partículas menores. Alguns aparelhos de DLS permitem que o operador escolha estes valores, em outros, estes valores são escolhidos automaticamente, a partir de uma primeira medida exploratória.

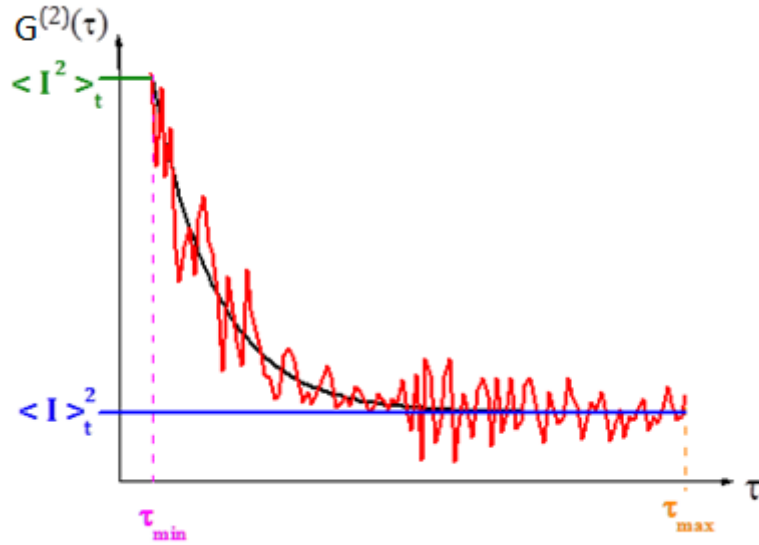


Figura 1.2: Representação do que se espera obter para $G^{(2)}(\tau)$.

A partir das medidas da função de autocorrelação da intensidade de luz espalhada, $G^{(2)}(\tau)$, para sistemas diluídos, é possível o cálculo da função de autocorrelação temporal do campo elétrico (\vec{E}), $g^{(1)}(\tau)$, através da relação de Siegert:

$$\frac{G^{(2)}(\tau)}{\langle I \rangle^2} = g^{(2)}(\tau) = 1 + \beta |g^{(1)}(\tau)|^2 \quad (1.3)$$

onde β refere-se a parâmetros experimentais e

$$g^{(1)}(\tau) = \frac{\langle \vec{E}(t) \cdot \vec{E}(t + \tau) \rangle_t}{\langle I \rangle} \quad (1.4)$$

onde $\langle I \rangle$ é a intensidade média da luz espalhada.

A média do produto indicada acima é tomada separadamente sobre tempos curtos e longos:

- Os tempos curtos caracterizam as oscilações (rápidas) da onda eletromagnética
- Os tempos longos caracterizam os processos **difusivos** do soluto na dispersão.

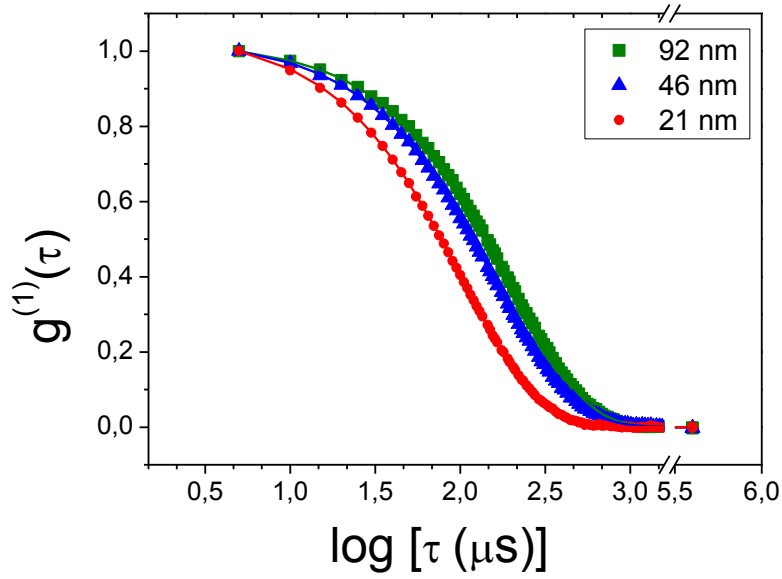


Figura 1.3: gráficos da função $g^{(1)}(\tau)$ para sistemas monodispersos de esferas de diâmetros 21, 46 e 92 nm (ver Exemplo 3.2).

Para sistemas monodispersos, e diluídos, é possível mostrar que $g^{(1)}(\tau)$ decai exponencialmente com τ , com tempo de correlação τ_c , tal que:

$$\tau_c^{-1} = q^2 D_T \equiv \Gamma \quad (1.5)$$

de forma que, identificando Γ com a correspondente taxa de decaimento, a função $g^{(1)}(\tau)$ é expressa na forma:

$$g^{(1)}(\tau) \approx e^{-q^2 D_T \tau} = e^{-\Gamma \tau} \quad (1.6)$$

onde q é o módulo do vetor espalhamento $\vec{q} = \vec{K}_e - \vec{K}_i$

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (1.7)$$

para \vec{q} definido segundo a Fig. 1.4:

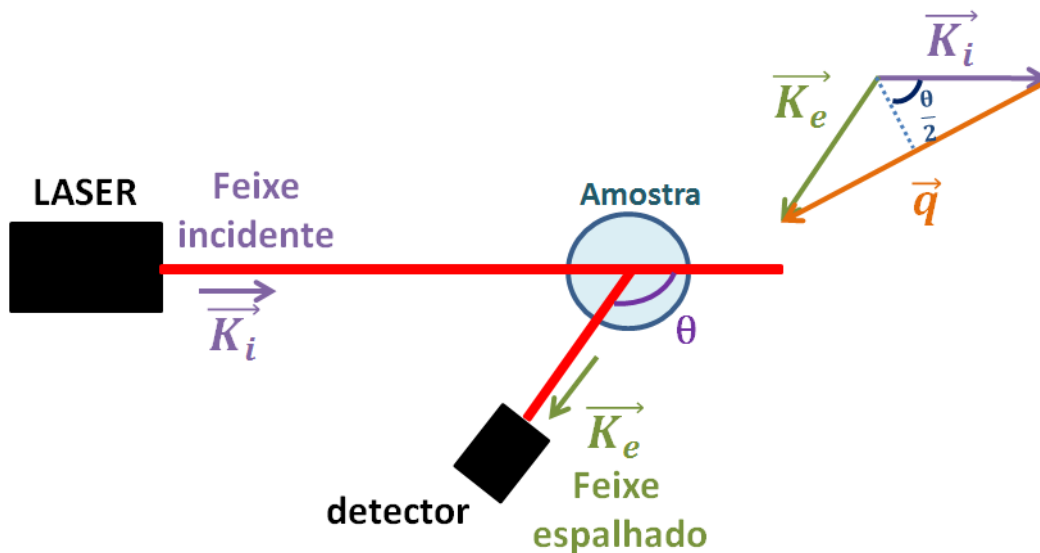


Figura 1.4: Esquema de um experimento de espalhamento de luz e definição do vetor \vec{q} . $|\vec{K}_i| = |\vec{K}_e|$

Assim, conhecendo-se o comprimento de onda da luz incidente, λ_0 , o ângulo de espalhamento, θ , e o índice de refração do meio, n_0 , determina-se q . Considerando-se ainda sistemas monodispersos e diluídos, pode-se estimar $g^{(1)}(\tau)$ a partir da relação de Siegert (Eq. 1.3), utilizando as medidas experimentais para $g^{(2)}(\tau)$. O coeficiente de difusão (D_T) das partículas em dispersão é então obtido através da Eq. 1.6, e o correspondente diâmetro hidrodinâmico (D_{ef}) com o uso da equação de Stokes-Einstein (Eq. 1.1), assumindo-se partículas esféricas.

Sistemas Polidispersos

Em geral os sistemas de interesse não são monodispersos, e a dispersão contém partículas de diferentes tamanhos ou, equivalentemente, diferentes coeficientes de difusão, correspondendo a diferentes taxas Γ . Em geral, supõe-se que as diversas taxas presentes na amostra são distribuídas segundo uma função $p(\Gamma)$ característica do sistema. O resultado mostrado na Eq. 1.6 pode ser generalizado, tomando-se a média:

$$\langle g^{(1)}(\tau) \rangle_{\Gamma} = \int_0^{\infty} g^{(1)}(\tau) p(\Gamma) d\Gamma = \int_0^{\infty} e^{-\Gamma\tau} p(\Gamma) d\Gamma \quad (1.8)$$

sendo $p(\Gamma)d\Gamma$ o número de partículas com valores de gama entre Γ e $\Gamma+d\Gamma$, indicado pela área sob a curva na figura abaixo. O problema aqui é que não conhecemos $p(\Gamma)$! **É isto que queremos achar!**

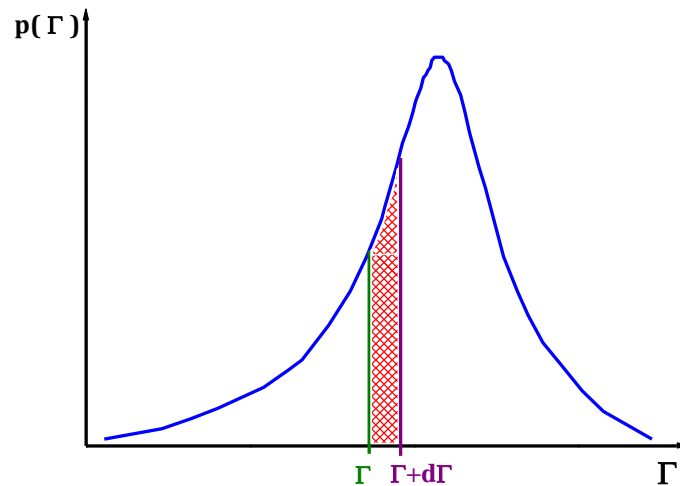


Figura 1.5: Representação de uma distribuição genérica $p(\Gamma)$.

Vários métodos são usados para se estimar a forma da distribuição $p(\Gamma)$ em amostras polidispersas. Em princípio, conhecendo--se $p(\Gamma)$ é possível estimar-se a forma da distribuição de tamanhos das partículas na dispersão. Citamos alguns desses métodos a seguir.

A. Método da expansão em cumulantes (Koppel, 1972). Neste método, estima-se $p(\Gamma)$ através do ajuste dos dados experimentais nos primeiros cumulantes da distribuição. O primeiro cumulante κ_1 coincide com o **valor médio de gama** $\kappa_1 = \langle \Gamma \rangle = \int \Gamma p(\Gamma) d\Gamma$, e o segundo cumulante, κ_2 , coincide com a **variância da distribuição**, ou desvio quadrático médio, $\kappa_2 = \sigma^2 = \langle \Gamma^2 \rangle - \langle \Gamma \rangle^2$, que é associado ao “coeficiente de polidispersidade” da amostra. A essência do método consiste em perceber que a expressão resultante para o logaritmo de $\langle g^{(1)} \rangle_{\Gamma}$ pode ser escrita

em uma série de potências de τ , cujos coeficientes coincidem com os cumulantes da ordem correspondente:

$$\ln \langle g^{(1)} \rangle_{\Gamma} = - \langle \Gamma \rangle \tau + \frac{\kappa_2}{2!} \tau^2 - \frac{\kappa_3}{3!} \tau^3 + \frac{\kappa_4}{4!} \tau^4 - \dots \quad (1.9)$$

Assim, os diversos cumulantes κ_i $i=1,2,3,\dots$ (na prática, apenas os primeiros da série) são obtidos através do ajuste experimental de $\langle g^{(1)} \rangle_{\Gamma}$.

É importante ter em mente que o diâmetro hidrodinâmico (D_{ef}) calculado (Eq. 1.1) a partir do coeficiente de difusão obtido por $q^2 D_T = \langle \Gamma \rangle$, para esferas densas, coincide com o *z-average do diâmetro* (\bar{D}_z),

$$\bar{D}_z = \frac{\sum_i N_i M_i^2 D_i}{\sum_i N_i M_i^2} \quad (1.10)$$

sendo N_i , M_i , e D_i , respectivamente, o número, a massa e o diâmetro hidrodinâmico de uma partícula i presente na amostra. Lembramos que a massa é proporcional à terceira potência ao raio da esfera.

B. Método CONTIN. Em vista da expressão (1.8) para a média $\langle g^{(1)}(\tau) \rangle_{\Gamma}$ sobre a distribuição de tamanhos e a forma exponencial do decaimento da função $g^{(1)}(\tau)$ para qualquer valor de gama, pode-se estimar $p(\Gamma)$ através da transformada inversa de Laplace da função de autocorrelação $\langle g^{(1)}(\tau) \rangle_{\Gamma}$. Várias metodologias têm sido desenvolvidas para se estimar a transformada inversa numericamente, dado a complexidade do problema. Por exemplo, o programa Gendist (Jakes, 1995) tem sido muito utilizado (ver Enoki, 2011). Vários instrumentos de DLS vêm com um programa disponível para uso, porém, muitas vezes, sua aplicação é imprecisa.

C. Ajuste por multi-exponenciais. Também muito utilizado é o ajuste da função de autocorrelação, $g^{(1)}(\tau)$, por uma soma de exponenciais, assumindo a presença de partículas de dois, três ou quatro tamanhos

diferentes, bem definidos. A diferença com o método dos cumulantes é que para o caso do ajuste com um número limitado de exponenciais, assume-se que alguns poucos tamanhos sejam predominantes na amostra. Como mostraremos no Exemplo 3.2, este ajuste deve ser analisado com cuidado.

2. Aparelhos do Grupo de Biofísica do IFUSP

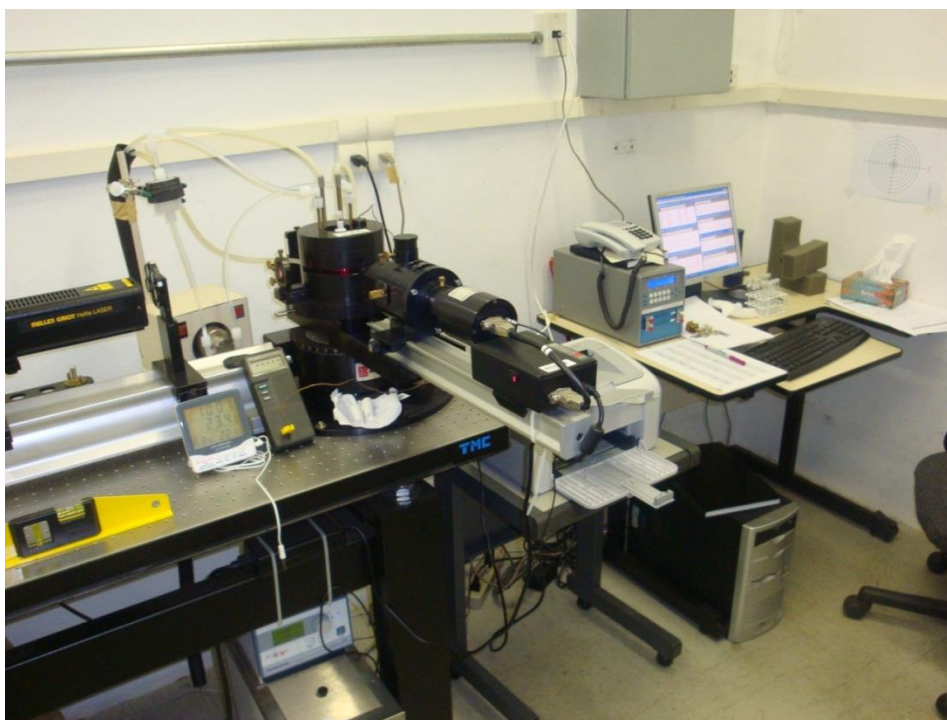


Figura 2.1. Este é um equipamento da *Brookhaven Instruments Corporation*, que permite tanto medidas de intensidade de luz espalhada (Espalhamento Estático de Luz, SLS), como de flutuações da intensidade da luz espalhada (Espalhamento Dinâmico de Luz, DSL), a vários ângulos de espalhamento.

Ele é composto por um LASER HeNe de potencia 35 mW e $\lambda_0 = 632,8$ nm, e um goniômetro *motor-drive* BI-200SM. Para o DLS, dispõe de um correlator digital BI-9000AT. O tubo de ensaio, contendo a amostra de interesse, é inserido em uma cuba de vidro que está preenchida com decalina (deca-hidro naftaleno), líquido cujo índice de refração é próximo ao do vidro, diminuindo reflexões na parede do tubo. Acoplados a essa cuba, estão um banho térmico (Poly Science) para o controle de

temperatura da amostra, e um filtro para a decalina. Este equipamento dispõe de alguns softwares para a aquisição e análise de dados, e para o controle de alinhamento do sistema óptico. Um filtro atenuador na saída do LASER permite o ajuste manual da intensidade de luz na amostra. Também é possível o ajuste manual de um *pin-hole* e um filtro para a luz espalhada, que incide no detector. Além disso, é o usuário que determina o tempo de duração das medidas, o primeiro e último tempo da função de autocorrelação $G^{(2)}(\tau)$ (τ_{\min} e τ_{\max} , na Fig. 1.2).

É necessário ligar o laser com algumas horas de antecedência (ao menos 4 horas), para que o sinal fique estável. Além da estabilidade do laser, é importante verificar seu alinhamento antes da realização de medidas. Este aparelho é bastante sensível, e deve permanecer em um local onde não haja variações na temperatura ambiente. O processo de montagem e alinhamento do aparelho é um trabalho bastante minucioso, e pode levar semanas para ser concluído.

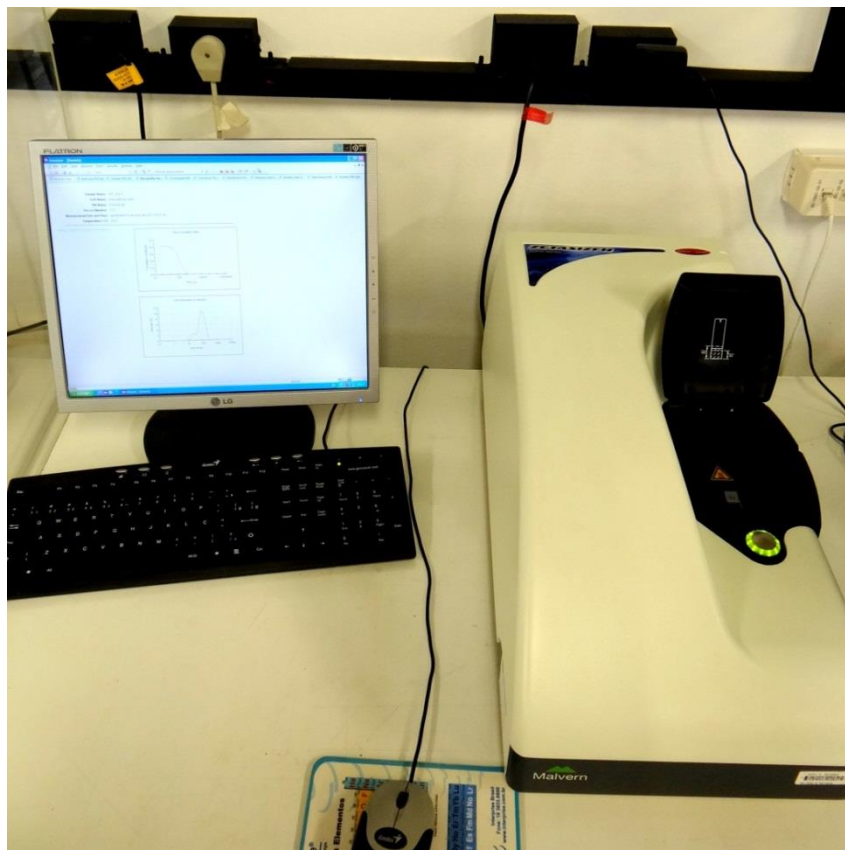


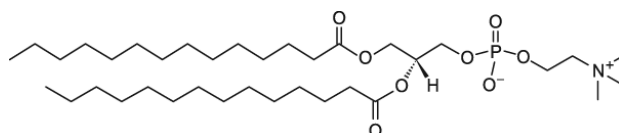
Figura 2.2. Este é o aparelho Zetasizer Nano ZS90, da *Malvern*. É um aparelho mais simples, compacto, tendo em seu interior o LASER HeNe

de potência 4 mW, $\lambda_0 = 633$ nm, o atenuador, o detector, o correlator, e o controle de temperatura. Neste aparelho só é possível realizar medidas com o detector a 90° do feixe incidente. Este equipamento dispõe de alguns softwares para a aquisição e análise de dados. Vários parâmetros, como intensidade do LASER, τ_{\min} e τ_{\max} , são automaticamente ajustados pelo software no início do experimento. Além disso, dependendo da amostra, várias medidas são feitas, e a média dos resultados obtidos é informada. É necessário ligar o LASER 30 minutos antes da realização de medidas.

3. Exemplos

3.1 Dispersões de vesículas lipídicas

Trabalharemos com vesículas do fosfolipídio neutro DMPC (dimiristoil fosfatidilcolina).



Na figura abaixo (Fig. 3.1), vemos a variação de calor específico de uma dispersão de DMPC com a temperatura. Este lipídio apresenta uma transição de fase gel-fluido, também chamada de transição principal (T_m), próximo à temperatura de 23°C . Este perfil de calor específico foi obtido com vesículas extrusadas de DMPC, preparadas conforme descrição abaixo.

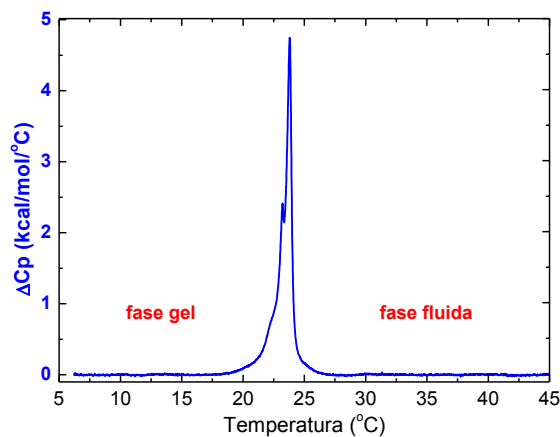


Figura 3.1: Perfil de variação de calor específico obtido com a técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) de dispersões de DMPC (1 mM), extrusadas por filtro de 100 nm (Enoki et al., 2012).

Neste exemplo, ilustramos como são feitas estimativas para os diâmetros efetivos das vesículas, nas fases gel e fluida da bicamada lipídica, utilizando a técnica de DLS, enfatizando a importância da obtenção de medidas a vários ângulos de espalhamento (θ), e várias concentrações lipídicas.

3.1.1. Preparação de amostras

Para a preparação de vesículas, os lipídios foram pesados na quantidade desejada, diluídos em clorofórmio, e submetidos a um fluxo de N_2 , para a formação de um filme na parede do tubo de ensaio. O filme foi então submetido à baixa pressão por 3 horas, para eliminação total do solvente orgânico. Em seguida, foi adicionado o tampão (10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7.4), e a suspensão foi fortemente agitada. Foram preparadas amostras com concentrações de DMPC entre 0,5 e 2,5 mM. A concentração lipídica foi obtida de maneira mais precisa através da dosagem de fosfato (Rouser et al., 1970).

Para a preparação de vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*, LUV), a dispersão foi extrusada, isto é, passada 31 vezes através de filtro de policarbonato, com poros de 100 nm, à temperatura de 30 °C (ver Enoki, 2010).

3.1.2. Resultados e análises

Resultados mostrados abaixo foram obtidos no aparelho da *Brookhaven* (Fig. 2.1). Foram feitas medidas a vários ângulos de espalhamento, e para várias concentrações de DMPC. Para cada amostra, em um determinado ângulo de espalhamento, a partir da função $g^{(2)}(\tau)$ foi gerada uma função $g^{(1)}(\tau)$, de acordo com a Eq. 1.3. Essa função pôde ser muito bem ajustada à Eq. 1.6, fornecendo o valor da taxa de decaimento Γ .

Para sabermos se estamos, de fato, medindo o coeficiente de difusão translacional das partículas, é importante verificarmos se a Eq. 1.5 é obedecida: $q^2 D_T \equiv \Gamma$, onde $q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$. Para isto foram feitos gráficos $\Gamma \times q^2$, variando-se θ . Na figura abaixo são apresentados gráficos de amostras, na fase gel e fluida do DMPC, onde vemos a nítida dependência linear de Γ com q^2 , com clara obediência à Eq. 1.5. Portanto, a inclinação da reta nestes gráficos fornece o coeficiente de difusão translacional das partículas (D_T).

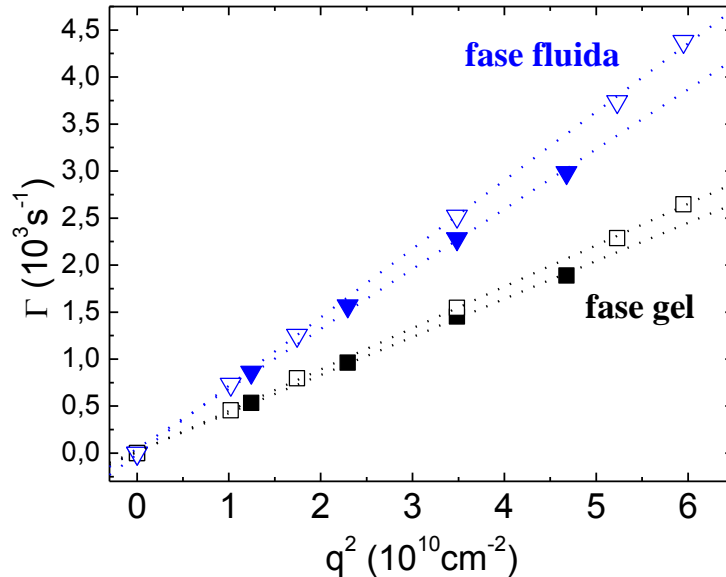


Figura 3.2: Variação da taxa de decaimento da função de autocorrelação $g^{(1)}(\tau)$ com o módulo do vetor espalhamento \vec{q} (ver Eq. 1.7). São apresentados resultados para o DMPC (1,36 mM) na fase gel (20 °C) e na

fase fluida (43 °C). Para cada temperatura, são apresentados resultados com duas amostras diferentes.

Como discutimos na Introdução Teórica, para o uso da equação de Stokes-Einstein (Eq. 1.1), é fundamental que as partículas sejam não interagentes. Assim, é importante que estejamos trabalhando com amostras suficientemente diluídas para que esta condição seja obedecida. Para verificarmos isso, fazemos medidas a várias concentrações de DMPC, e calculamos o valor do coeficiente de difusão translacional interpolando os dados para o limite $[DMPC] \rightarrow 0$, supondo um comportamento linear.

Os valores do coeficiente de difusão translacional obtidos no limite $[DMPC] \rightarrow 0$, foram usados na Eq. 1.1 para a obtenção dos diâmetros efetivos das vesículas de DMPC, nas fases gel e fluida da bicamada lipídica. Os valores assim obtidos estão na tabela abaixo.

Temperatura (°C)	D_{ef} (nm)
20 (fase gel)	107 ± 4
43 (fase fluida)	123 ± 5

3.1.3. Conclusões

Em princípio, o decaimento exponencial da função de autocorrelação $g^{(1)}(\tau)$ poderia estar associado a diferentes processos. O comportamento linear, $\Gamma \propto q^2$, assegura que estamos medindo um processo difusivo translacional.

A medida do coeficiente de difusão translacional pode ser influenciada por interações entre partículas. Portanto, é fundamental analisar a dependência do valor obtido com a concentração de partículas, e, se necessário, calcular o coeficiente para o limite da amostra infinitamente diluída.

Os diâmetros obtidos para as vesículas de DMPC estão de acordo com a extrusão através de filtro de poros de 100 nm. Como esperado, as vesículas apresentam um aumento de diâmetro na fase fluida, relativo à

fase gel, devido à expansão dos lipídios na bicamada na transição gel-fluido (ver, por ex., Nagle e Tristram-Nagel, 2000).

(Para mais informações, ver Enoki, 2010, e Enoki et al., 2012)

3.2 Sistemas poliméricos multidispersos

Neste exemplo, trabalharemos com suspensões de nanoesferas poliméricas de poliestireno, da *Duke Scientific Corporation*, com diâmetros (dados pelo fornecedor) $(21,0 \pm 1,5)$ nm, $(46,0 \pm 2,0)$ nm e $(92,0 \pm 3,7)$ nm.

Discutiremos aqui a importância da interpretação cuidadosa de dados obtidos por DLS para dispersões mistas.

3.2.1 Preparação de amostras

Como as esferas poliméricas são levemente carregadas, para que se observe movimento aleatório das partículas, e seja possível a obtenção do coeficiente de difusão translacional das mesmas, e, portanto, seu diâmetro efetivo (Eq. 1.1), é necessário o acréscimo de sal para a blindagem das interações eletrostáticas entre elas.

Preparou-se as amostras em solução salina de 10 mM de NaCl, com água Mili-Q filtrada por filtros *Acrodisc SyringeFilter 0.1 μ m Supor Membrane Low Protein Binding Non-Pyrogenic*, em tubos de ensaio de vidro, totalmente transparentes e sem danos. A filtragem é necessária para que se evite a presença de possíveis contaminações. As alíquotas da suspensão polimérica foram coletadas por seringas *Hamilton*, e os tubos vedados foram mantidos à temperatura ambiente. Antes da medida, apenas tombou-se o tubo de ensaio em um movimento suave, conforme indicado pelo fabricante, para evitar a formação de micro bolhas de ar. As amostras foram preparadas suficientemente diluídas para que não apresentassem interações relevantes entre as partículas.

3.2.2 Resultados e análises

Abaixo mostramos resultados obtidos no aparelho de DLS da *Malvern* (Fig. 2.2), com o uso de softwares lá disponíveis, para análise da

função de autocorrelação. Como dissemos na seção anterior, as medidas são obtidas com o detector a 90° do feixe incidente.

O próprio software realiza diversas medidas da mesma amostra, e, como resultado, informa os valores médios obtidos para o diâmetro das partículas na dispersão, e o índice de polidispersidade, obtidos com o uso da Expansão em Cumulantes até 2ª ordem (Eq. 1.9). Por outro lado, através do ajuste do decaimento da função de autocorrelação por uma soma de exponenciais (ver item 1), é também possível obter-se os diâmetros das partículas presentes na dispersão, e a proporção (em porcentagem) entre as várias populações.

Na tabela abaixo, nas quatro colunas à direita, mostramos os resultados obtidos para amostras monodispersas, amostras mistas com nanoesferas de 21 e 92 nm, e mistas com nanoesferas de 21, 46 e 92 nm de diâmetro (para simplificar, escrevemos os diâmetros das nanoesferas somente com os dois primeiros algarismos). Estes resultados foram obtidos com a Expansão dos Cumulantes e o método de Multi-exponencias.

Também estão apresentados a proporção de esferas de cada tamanho nas dispersões usadas (coluna “Proporção”) e o *z-average* do diâmetro (\overline{D}_z), calculado através da Eq. 1.10 (colunas à esquerda).

Amostras (diâmetro, nm)	Calculados		Expansão em Cumulantes		Multi-exponencias	
	Proporção	\overline{D}_z (nm) (Eq. 1.10)	\overline{D}_z (nm)	Índice de polidispersidade	População 1 diâm.(nm) [%]	População 2 diâm.(nm) [%]
21			22,1 ± 0,1	0,12 ± 0,02	24,2 ± 0,2 [100]	-
92			90,9 ± 0,9	0,03 ± 0,02	95,5 ± 1,4 [100]	-
21:92	140:1	90,6	89,1 ± 0,4	0,02 ± 0,01	93,7 ± 1,4 [100]	-
	700:1	85,6	81,2 ± 0,5	0,15 ± 0,01	95,5 ± 0,8 [100]	-
	1400:1	80,3	74,7 ± 1,5	0,20 ± 0,02	94,6 ± 2,3 [92,9]	20,3 ± 2,0 [7,1]
	2100:1	75,7	69,9 ± 0,8	0,24 ± 0,01	94,8 ± 1,0 [93,3]	17,0 ± 0,5 [6,7]
21:46:92	140: 9: 1	84,7	82,3 ± 0,3	0,07 ± 0,01	89,3 ± 0,5 [100]	-
	2100:90:1	59,6	56,9 ± 0,4	0,15 ± 0,01	67,9 ± 1,0 [100]	-

É importante ressaltar que o dado medido por DLS é a intensidade de luz espalhada (flutuações da intensidade). As demais análises oferecidas pelo software (por número e por volume das partículas em solução) são feitas a partir da distribuição obtida pela intensidade, sendo esta a análise mais recomendada.

3.2.3. Conclusões

A partir da tabela acima, vemos que, para as amostras monodispersas, obtemos resultados próximos ao esperado para o tamanho das partículas em solução.

No caso das dispersões mistas, os valores dos diâmetros calculados (z-average, $\overline{D_z}$) pelo equipamento, com o uso da Expansão em Cumulantes até 2ª ordem, são semelhantes aos valores calculados teoricamente (Eq. 1.10), mas ligeiramente menores.

É importante notarmos a enorme influência das partículas grandes no cálculo de $\overline{D_z}$.

O índice de polidispersidade não é confiável como indicativo da polidispersidade da amostra, já que soluções monodispersas e multidispersas apresentaram índices similares.

Para amostras multidispersas, a análise por multi-exponenciais mostrou-se muito falha. Por exemplo, para as misturas de esferas de 21 nm e 92 nm, o software só começa a distinguir as duas populações na proporção de 1400 esferas de 21 nm para cada esfera de 92 nm. Além disso, a porcentagem fornecida de cada população é totalmente errada, e apenas mostra que a população de tamanho maior contribui muito mais para a intensidade de luz espalhada, mesmo estando em muito menor proporção na dispersão. Na presença de três populações, de 21, 46 e 92 nm, o software não foi capaz de distinguir as diferentes populações.

As medidas e análises obtidas para dispersões mistas mostram que devemos ter muito cuidado ao interpretar esses dados, uma vez que os métodos são muito mais sensíveis à presença de partículas

maiores! Podemos confiar nas medidas de $\overline{D_z}$. Porém, não podemos confiar no indicativo de presença ou não de mais de uma população, nas frações dessas populações, e no índice de polidispersidade.

(Para mais informações, ver Nomura et al., 2013)

Referências

- Berne, B. J., Pécora, R. (2000). Dynamics Light Scattering, Dover Pub., Inc.
- Enoki, T. A. (2010). Caracterização por espalhamento de luz de dispersões aquosas de agregados lipídicos aniônicos. Dissertação de Mestrado. Instituto de Física, USP.
- Enoki, T.A., Henriques, V.B., Lamy, M.T. (2012). Light scattering on the structural characterization of DMPG vesicles along the bilayer anomalous phase transition. Chem. Phys. Lipids 165, 826-837.
- Goldman, C. (2013). Notas de aula do curso “Introdução à técnica de espalhamento de luz dinâmico: teoria e experimento”. Instituto de Física, USP.
- Johnson, Jr., C.S., Gabriel, D. A. (1981). Laser Light Scattering, Dover Pub., Inc.
- Nagle, J.F., Tristram-Nagel, S. (2000). Structure of lipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta 1469, 159-195.
- Nomura, D.A., Enoki, T.A., Silveira, N.P., Lamy, M.T. (2013). Discussing the use of light scattering in the characterization of polydisperse colloidal systems. Trabalho apresentado na XLII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Biofísica, 2013, Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- Rouser, G., Fleischer, S., Yamamoto, A. (1970). Dimensional thin layer chromatographic separation of polar and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spot. Lipids 5, 494-496.