

4

Materiais e Métodos

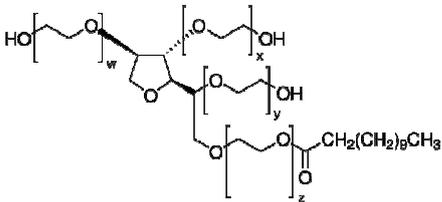
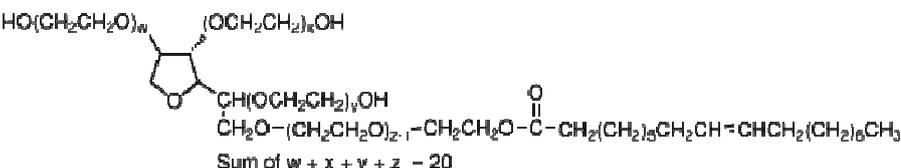
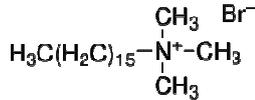
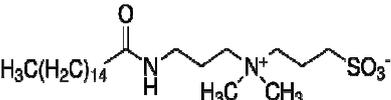
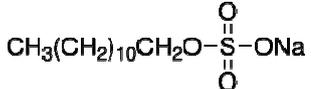
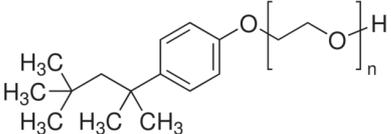
4.1

Materiais

Tabela 4.1

Materiais	Distribuidora	Peso molecular
Ftalocianinas		
ZnPc ($C_{32}H_{16}N_8Zn$)	Aldrich	577,91
MentaZnPc	Laboratório Prof. Kleber Oliveira, UFSCar- São Carlos	1195
Solventes		
N-N Dimetilformamida P.A. $HCON(CH_3)_2$ 99,8%	Aldrich	73,08
Dimetilfulsóxido P.A. $(CH_3)_2SO$ 99,9%	Aldrich	78,13

Tabela 4.2 Surfactantes

Surfactante	M.M. (g/mol)	CMC (mM)	Núm. Agreg.
Tween 20 [®] (Polisorbitol 20) 	1228	0,06	60
Tween 80 [®] (Polisorbitol 80)  Sum of w + x + y + z = 20	1310	0,011	60
CTAB Brometo de hexadecil trimetilâmionio 	364,45	1	170
HPS 3[N,N-Dimetil(3- palmitoilaminopropil) amônio]-propanosulfonato 	462,73	0,01-0,06	155
SDS Dodecil sulfato de sodio 	288,38	7-10	62
Triton X- 100 4 (1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil- polietilenoglicol 	625	0,2- 0,9	100-155

Pluronic [®] F-68	8400	0,04	60
Pluronic [®] F-127	12600	0,56	60
Brij [®] 30			
Polietilenoglicol dodecil eter	~362		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ n=4			
Brij [®] 35 Polioxietileno (23) lauril eter	~1198		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ n=23			
Brij [®] 97			
Polioxietileno 10 oleil eter	~709		
Brij [®] 98, Brij [®] 99, C ₁₈₋₁ E ₂₀			
Polioxietileno (20) oleil eter	~1150		
C ₁₂ E ₉	~425		
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$ n=9			

Os surfactantes Tween 20, Tween 80 e Triton X-100 foram doados pela Dra. Aurora Perez Gramatges.

4.2

Métodos

4.2.1 Preparação de ZnPc em nanoemulsões de surfactantes

Foram preparadas soluções estoque de ZnPc em DMF, (1,0 e 0,50 mM) e em DMSO (0,33 e 0,135 mM) . A solubilidade de ZnPc em DMSO é menor do que em DMF). Alíquotas dessas soluções foram diluídas no solvente indicado para obtenção dos espectros.

Para preparar micelas contendo ZnPc solubilizada em DMSO ou DMF, os surfactantes foram solubilizados em 100 μl dos estoques de ZnPc (SDS, 98 mg; CTAB, 18.4 mg; HPS, 8,2 mg; TritonX-100, 28 mg; Tween20, 9.8 mg; Tween80, 8.4 mg; PF-127, 84,4 mg e PF-68, 55,9 mg). Assim, garantiu-se que as moléculas de ZnPc não estavam agregadas durante a formação das micelas.

Alíquotas dessas misturas ZnPc-surfactante-DMSO ou ZnPc-surfactante-DMF foram diluídas em solução aquosa para obtenção de micelas contendo ZnPc. As quantidades de surfactante foram calculadas de modo que as concentrações obtidas após diluição estariam sempre acima da CMC.

As concentrações dos estoques de ZnPc-surfactante em DMSO e em DMF foram as seguintes:

	[Surfactante] (mol L ⁻¹)	[ZnPc] (mmol L ⁻¹)	Surfactante (mol L ⁻¹)	ZnPc (mmol L ⁻¹)
	em DMSO		em DMF	
SDS	1.70	0.115	1.89	0.56
CTAB	0.250	0.115	0.250	0.50
HPS	0.088	0.115	0.088	0.50
Triton X100	0.225	0.115	0.450	0.50
Tween 20	0.080	0.230	0.080	1.0
Tween 80	0.064	0.230	0.064	1.0
PF-68	0.0186	0.077	0.067	0.50
PF-127	0.0223	0.077	0.045	0.70

Observou-se que SDS ficou uniformemente distribuído na solução de ZnPc-DMSO, mas não diluiu bem em ZnPc-DMF (solução não transparente). Ainda assim, ao se colocar a alíquota na solução aquosa, observou-se dissolução do SDS, ficando a solução homogênea.

Observou-se precipitação de CTAB nas soluções ZnPc-DMSO e ZnPc-DMF. A solução tinha que ser uniformizada mediante agitação imediatamente antes de diluir em meio aquoso; a solução continha agregados de surfactante que após cerca de 15 minutos iam desaparecendo, ou seja, a solução era deixada para estabilizar por 15 minutos após adição de cada alíquota.

O HPS ficou uniformemente distribuído nas soluções ZnPc-DMSO e ZnPc-DMF. O Triton X-100 ficou uniformemente distribuído apenas no momento da mistura, mas depois se observou uma separação de fase. Estas soluções foram homogeneizadas antes de diluídas em meio aquoso.

No caso de Tween20/80, bem como PF-68, os surfactantes distribuíram-se uniformemente nas duas soluções estoques dos Tween. Já para dissolver o PF-127 na solução estoque em DMSO, foi necessário adicionar mais DMSO e manter a temperatura acima de 25°C para conseguir desfazer o aspecto gelatinoso.

Para preparar micelas contendo ZnPc, as soluções de ZnPc-DMSO-surfactante ou ZnPc-DMF-surfactante foram diluídas em meio aquoso (tampão fosfato 10 mM pH 7.4 ou água milliQ) de modo que a concentração de ZnPc ficasse em torno de 0.5 a 2 µM. Foram obtidos os espectros de absorção e de fluorescência das soluções micelares preparadas dessa forma.

4.2.2 Preparação de MentaZnPc em micelas

Foram preparadas soluções 1 mM de MentaZnPc em solventes apolares (clorofórmio, benzeno, e tolueno) e polares apróticos (THF, DMSO e DMF), onde se observou uma rápida e eficiente solubilização obtendo-se uma solução de cor azul esverdeada.

As micelas dos surfactantes iônicos SDS, CTAB, HPS e não iônicos Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, PF-127 e os polioxietilenos C₁₂E₉, Brij 30, Brij35, Brij 97 e Brij 98 foram preparadas pela mistura de 12 mg de surfactantes e 45 µl de MentaZnPc (solução estoque de 1mM em DMF). A mistura foi dissolvida em 3 ml de PB pH 7,4 (10 mM). A concentração final dos surfactantes (4 mg ml⁻¹) foi acima da CMC e a concentração de MentaZnPc foi de 15 µM.

4.2.3 Processo de fotodegradação

A montagem do experimento foi descrita em (Ogunsipe et al., 2003; Mare et al., 2001; Mare et al., 2002; Seotsanyana- Mokhosi et al., 2001). Brevemente, a fonte para fotossensibilização, composta de LEDs vermelhos, foi colocada a 10 cm da cubeta contendo a solução do fotossensibilizante em estudo, contendo também DPBF ou Trp, com uma lente plano-côncava foi interposta a 5cm da

fonte de LEDs (Fig. 4.1). A direção lâmpada-cubeta foi ajustada de modo a fazer um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz do espectrofotômetro. Foram avaliadas as nanoemulsões de ZnPc-DMF-surfactantes e as soluções de mentaZnPc em DMF e em micelas de vários surfactantes. Foram usados, como sondas de oxigênio singlete, Trp ($20 \mu\text{M}$) ou DPBF ($5 \mu\text{M}$ a $33 \mu\text{M}$), sendo $\epsilon_{417\text{nm}} = 2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para o DPBF (Ogunsipe et al., 2003). Foi utilizado como padrão ZnPc em DMF.

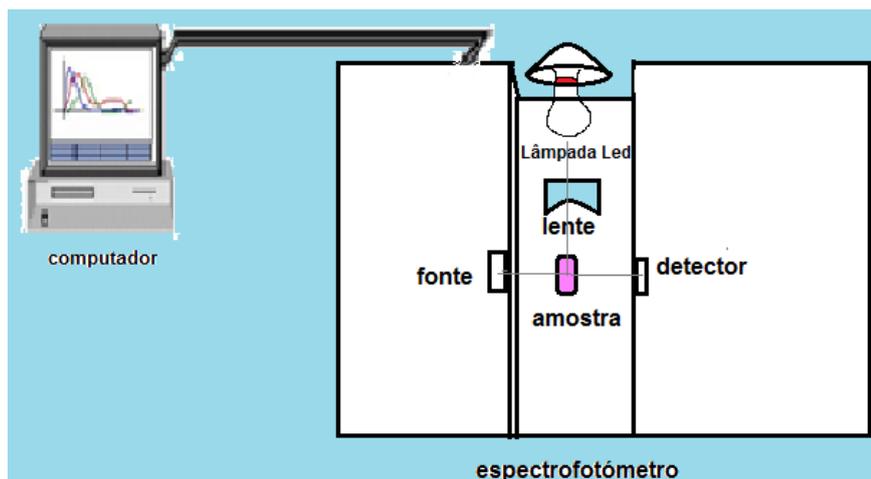


Figura 4.1. Montagem do experimento. Amostra, com DPBF ou Trp, fotoexcitada com a fonte de LEDs vermelhos. Absorvância detectada no espectrofotômetro UV-VIS.

A lâmpada para irradiação das amostras (Golden Plus) era formada de 20 LEDs vermelhos ($\sim 615\text{-}640 \text{ nm}$), cujo espectro é apresentado na Fig. 4.2 (vermelho), com pico em 635 nm . Nessa figura, observam-se também os espectros de absorção de ZnPc em DMF e em nanoemulsões ZnPc-DMF-HPS.

A potência da lâmpada, $1,5 \text{ mW}$, foi medida com um medidor de potência óptica Newport modelo 1830-C (com sensor colocado na posição das amostras) acoplado a um atenuador 4354 Newport modelo 818UV (faixa espectral de 200 a 1100 nm) a uma distância de 10 cm da fonte. A lente plano-côncava também foi usada entre a fonte e o medidor de potência. A intensidade da lâmpada na posição da amostra foi de $7,5 \text{ mW cm}^{-2}$.

As amostras foram irradiadas por períodos de cerca de 10 min durante mais de 3 horas , no caso de Trp, e por períodos de 1 min durante 10 a 15 min , no caso de DPBF. A cubeta de quartzo de 3 ml foi mantida a uma distância de 10 cm da fonte de luz. Os espectros de absorção e/ou fluorescência das amostras foram obtidos a cada período de irradiação.

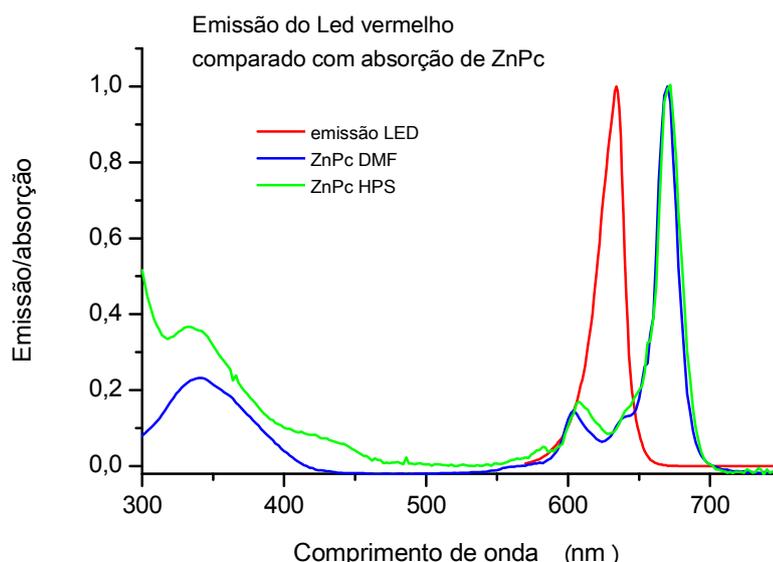


Figura 4.2. Espectro de emissão do LED vermelho obtido no espectrofluorímetro (em vermelho) fazendo-se incidir a luz do LED na cubeta contendo com centros espalhadores (solução de Ludox) e detectando-se a 90°. Também são mostrados os espectros de absorção de ZnPc em DMF e em nanoemulsão de HPS em tampão.

4.2.4 Taxas de fotoxidação

As **taxas de fotoxidação** (k_p) de Trp ou DPBF e a taxa de **fotobranqueamento da ZnPc** (k) foram encontradas na presença de oxigênio. Considerando que a última etapa das equações (4.1) é a mais lenta, a taxa de consumo da sonda é dada por (Da Silva A. R. 2003):

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1 [^1O_2][S] \quad (4.1)$$

Se a concentração de oxigênio singlete for constante durante a reação e definindo $k_p = k_1 [^1O_2]$, a equação (4.1) integrada vai fornecer:

$$[S] = [S]_0 \exp(-k_p t) \quad (4.2)$$

onde $[S]_0$ é a concentração inicial da sonda. Considerando-se uma relação linear entre a concentração da sonda e o parâmetro espectroscópico, I , associado a ela (fluorescência de Trp, absorvância de DPBF ou mesmo da própria ZnPc), temos a mesma função exponencial descrevendo a evolução temporal do parâmetro espectroscópico:

$$I = I_0 \exp(-k_p t) \quad (4.3)$$

Para Trp, I_0 é a fluorescência inicial em 350 nm, para excitação em 278 nm; I é a fluorescência no tempo t , k_p é a taxa de fotoxidação de Trp. Ajustando-se a Eq. 4.3 aos dados experimentais, pode-se determinar a taxa k_p .

Para DPBF, o parâmetro I é a absorção em ~ 417 nm (coeficiente de absorção molar $\epsilon_{\text{DMF}} = 2,30 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 411 nm; $\epsilon_{\text{DMF}} = 2,24 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ em 408 nm). No entanto, a própria ZnPc também contribui para a absorção nesse comprimento de onda. Nesse caso, observa-se um decaimento exponencial da forma:

$$A = A_f + A_0 \exp(-k_p t) \quad (4.4)$$

sendo A_f a contribuição de ZnPc, a qual permanece constante no tempo, já que o fotobranqueamento de DPBF é muito mais rápido.

4.2.5 Eficiência quântica

Eficiência quântica de produção de oxigênio singleto Φ_{Δ} é definida como o número de moléculas de $^1\text{O}_2$ geradas dividido pelo número de fótons absorvidos pelas moléculas do fotossensibilizante. Existem varios metodos para a detecção de $^1\text{O}_2$, mas podem ser reunidos em duas clases(Ribeiro J. 2003):

Métodos direitos. Envolvem as medidas resolvidas no tempo. Podemos citar a detecção de fosforescência do $^1\text{O}_2$ a 1270 nm, ainda que a fosforescência do $^1\text{O}_2$ seja muito baixa na maioria dos solventes, se emprega detectores de alta sensibilidade, algumas vezes resfriados a 77K para sua detecção. A geração de $^1\text{O}_2$ pode ser indiretamente detectada pelo decaimento do estado tripleto do β -caroteno

Métodos indireitos ou relativos. Baseiam-se em medidas de consumo de um substrato oxidável realizadas em estado estacionário; isto permite avaliar a produção de $^1\text{O}_2$. Um dos substratos oxidáveis utilizados é o 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF). Quando o DPBF (D) está presente numa solução contendo $^1\text{O}_2$, observa-se a sua degradação, com a formação de produtos oxidados (DO_2) (Eq. 4.5).



O DPBF tem um pico de absorção em 417 nm. O desenvolvimento da reação com $^1\text{O}_2$ pode ser monitorado pela medida do decrescimento da absorbância em 417 nm, resultado do consumo dessa espécie pelo $^1\text{O}_2$ gerado em

solução pelo fotossensibilizante (ZnPc), desde que a excitação do fotossensibilizante ocorra em região espectral que não induza a degradação direta do DPBF. É recomendável que o acompanhamento dessas reações não se estenda até o consumo de todo o DPBF ou qualquer outro substrato oxidável, de modo que se possa evitar interferência nos resultados, causadas por reações secundárias.

Existe outra forma de detecção de 1O_2 que não envolve o consumo de substratos específicos, mas a degradação de compostos como os aminoácidos triptofano, histidina e metionina, por exemplo.

Wilkinson et al. (1995) utilizam a função estequiométrica da equação 4.5 e afirma que quando um estado fotoestacionário do oxigênio singlete é produzido, sua taxa de produção se iguala à taxa de decaimento. Obtém-se então:

$$[^1O_2] = \Phi_{\Delta} \frac{I_a}{k_d} \quad (4.6)$$

onde k_d é a taxa de desativação do solvente, I_a é a intensidade de luz absorvida pelo fotossensibilizador e Φ_{Δ} é a eficiência quântica de oxigênio singlete.

No caso de monitoramento do consumo de um substrato D por oxigênio singlete, e sob condições de estacionárias, tem-se:

$$\begin{aligned} -\frac{d[D]}{dt} &= \frac{d[O_2]}{dt} = \frac{d[P]}{dt} = k_r [^1O_2][D] \\ -\frac{d[D]}{dt} &= \frac{k_r I_a \phi_{\Delta}}{k_d} [D] \end{aligned} \quad (4.7)$$

onde k_r é a constante de taxa de consumo do D. Integrando a equação temos:

$$\ln \frac{[D]_0}{[D]} = \frac{(I_a \Phi_{\Delta}) k_r}{k_d} t + C \quad (4.8)$$

onde o coeficiente angular da reta do gráfico de $\ln \frac{[D]_0}{[D]}$ vs t é $\frac{(I_a \Phi_{\Delta}) k_r}{k_d}$.

Seguindo os passos de Kraljic et al. (1978) podemos efetuar uma reação em paralelo sob condições similares e empregar um fotossensibilizante cujo Φ_{Δ} é conhecido e, por comparação das inclinações, estimar esse parâmetro para dito fotossensibilizantes (amostra padrão). Como as reações monitoradas referem-se ao consumo do mesmo substrato oxidável, as duas taxas estimadas devem ser equivalentes:

$$(I_a \Phi_{\Delta})^{std} \frac{k_r}{k_d} = (I_a \Phi_{\Delta}) \frac{k_r}{k_d} \quad (4.9)$$

onde std se refere a parâmetros relativos ao fotossensibilizante tomado como padrão. Desta maneira:

$$\Phi_{\Delta} = \frac{(I_a \Phi_{\Delta})^{std}}{I_a} \quad (4.10)$$

Esse resultado concorda com Kraljic et al. (1978). Schmidt et al. (1994) consideram a reação direta entre o $^1\text{O}_2$ e um substrato oxidável para determinar a Φ_{Δ} de um fotossensibilizante, obtendo:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{std} \frac{k_r I_a^{std}}{k_r^{std} I_a} \quad (4.11)$$

onde k_r e k_r^{std} representam a taxa de consumo do substrato oxidável pela amostra e o padrão respectivamente.

Este último resultado é utilizado em vários trabalhos (Ogunsipe et al., 2003; Maree et al., 2001; Maree et al., 2002; Seotsanyana- Mokhosi et al., 2001). A relação entre I^{std} e I pode ser obtida através da medida da transmitância de ambas soluções no comprimento de onda de excitação. Como $T = I_T/I_0$ onde I_T é a intensidade de radiação transmitida, I_0 é a intensidade de radiação incidente da amostra, assim I , a intensidade de radiação absorvida pela amostra, pode ser descrita como $1-T = I/I_0$, obtendo-se a equação (4.12), sendo A a absorbância.

$$\frac{I^{std}}{I} = \frac{(1-T)^{std}}{1-T} \frac{1-10^{-A^{std}}}{1-10^{-A}} \quad (4.12)$$

Neste trabalho, foi usado o resultado de Schmidt juntamente com a equação 4.12, para encontrar Φ_{Δ} . O ZnPc em DMF foi utilizado como referência (padrão) e o DPBF como sonda de oxigênio singleto. Para evitar a reação em cadeia induzida pelo DPBF na presença de oxigênio singleto (Spiller et al., 1998), a concentração de DPBF foi sempre menor que 3×10^{-5} M. Estas condições resultam na observação de cinética de primeira ordem. A Φ_{Δ} foi calculada em triplicata em diferentes concentrações de ZnPc e surfactante.

A degradação de DPBF foi monitorada em 418 nm. Durante os estudos de oxigênio singleto não foi observada uma mudança significativa na absorbância de

ZnPc-DMF-surfactantes, evidenciando que ZnPc nessas condições não reage com oxigênio singlete na mesma escala de tempo que DPBF.

A **eficiência quântica de fluorescência**, Φ_f , é definida como a relação entre o número de moléculas que fluorescem (n_F) e o número de moléculas que foram excitadas (N_{exc}) (Eq. 4.13). O número de moléculas excitadas é equivalente ao número de fótons absorvidos.

$$\Phi_f = \frac{n_F}{N_{exc}} \quad (4.13)$$

Nas medidas de Φ_f é necessário que exista uma correção prévia do espectro de emissão do material ou o uso de um padrão que apresente propriedades semelhantes às da espécie desconhecida (o espectro de emissão da amostra e do padrão devem estar na mesma faixa). Eaton et al. (1988) consideraram algumas interferências que podem estar presentes no meio em estudo: efeito de filtro interno (reabsorção), efeitos de comprimentos de onda (grandes diferenças entre o comprimento de onda de absorção e de excitação), índices de refração, efeitos de polarização, efeitos da temperatura, efeitos de impurezas, estabilidade fotoquímica, espalhamento Raman.

Existem dois métodos utilizados para medidas experimentais de Φ_f , que são:

Método primário. Inclui o uso de superfícies ou soluções espalhadoras para calibrar absolutamente o sistema detector/excitação.

Método secundário ou comparativo. Consiste no uso de espécies cuja Φ_f é conhecido. É o método mais utilizado devido à sua simplicidade.

A Φ_f , determinada pelo método comparativo (Maree S. et al., 2002; Spiller W. et al., 1998), é dada pela equação (4.14):

$$\Phi_f = \Phi_f^{std} \frac{A^{std}}{A} \frac{F}{F^{std}} \frac{n^2}{(n^{std})^2} \quad (4.14)$$

onde F e F^{std} são as áreas debaixo das curvas de emissão; A e A^{std} são as absorvâncias da solução nos respectivos comprimentos de onda de excitação, n e n^{std} são os índices de refração do solvente usado da solução contendo a Pc e o padrão respectivamente. A absorvância das espécies é mantida em torno de 0,1 no comprimento de onda de excitação para evitar o problema de efeito filtro (reabsorção). O padrão é, geralmente, escolhido de acordo com a região onde a espécie emite (Ribeiro 2003).

Eficiência quântica de fotobranqueamento Φ_p . A determinação de Φ_p proporciona informação da máxima energia que pode ser adicionada ao sistema, para evitar a fotodegradação do corante, que reduz a ação fotodinâmica (Sibata et al. 2004). A equação de Φ_p é dada por Spiller et al. (1998) (Eq. 4.15), que relaciona o número de moléculas fotobranqueadas (ZnPc ou DPBF) e o número de fótons absorvidos.

$$\Phi_p = -\frac{(C_t - C_0)}{\frac{I_{abs}}{V_R} t} \quad (4.15)$$

onde C_0 e C_t em mol L⁻¹ são as concentrações antes e depois da irradiação no pico de interes, t é o tempo de irradiação é o V_R o volume da reação, I_{abs} é a energia absorvida por ZnPc por unidade de tempo, definida como:

$$I_{abs} = (1 - 10^{-A_{635nm}}) * S * I_{635nm}$$

onde S é a área da cubeta irradiada, A_{635nm} é a absorbância no comprimento de onda de irradiação e I_{635nm} é a intensidade da lâmpada na posição da amostra, em fótons m⁻²seg⁻¹ (em nosso caso $2,4 \times 10^{20}$ fótons m⁻²seg⁻¹, onde a energia do fóton em 635 nm foi de $3,12 \times 10^{-19}$ J), obtendo-se a equação 4.16:

$$\Phi_p = -\frac{(C_t - C_0) V_R N_A}{(1 - 10^{-A_{635nm}}) S I_{635nm} t} \quad (4.16)$$

onde N_A é o número de Avogadro. Sendo Φ_p uma fração que relaciona o número de moléculas fotodegradadas e o número de fótons absorvidos, podemos escrever o denominador de tal maneira que encontremos o número de fótons absorvidos pelo fotossensibilizante a partir da intensidade da luz I_{635nm} em Watt m⁻², obtendo a equação 4.17:

$$\Phi_p = -\frac{(C_t - C_0) V_R N_A h c}{(1 - 10^{-A_{635nm}}) S I_{635nm} t \lambda} \quad (4.17)$$

onde h é a constante de Planck, c a velocidade da luz e λ o comprimento de onda da fonte de excitação.

Finalmente, a equação 4.18 pode ser escrita da seguinte maneira:

$$\Phi_p = C_0 k_p \frac{V_R N_A h c}{(1 - 10^{-A_{635nm}}) S I_{635nm} \lambda} \quad (4.18)$$

onde k_p é a taxa de decaimento da concentração de molécula (min⁻¹), obtida a partir dos dados de absorção.

As equações 4.17 e 4.18 podem ser usada para o cálculo tanto da eficiência quântica de fotobranqueamento das ftalocianinas, $\Phi_p \text{ ZnPc}$, $\Phi_p \text{ mentaZnPc}$ quanto de DPBF ou Trp, $\Phi_p \text{ DPBF/Trp}$, onde as concentrações C_t e C_0 são calculadas pelas absorbâncias nos picos característico de ZnPc $\sim 672\text{nm}$, ou nos picos de Trp ou DPBF.

Spiller et al. (1998) encontraram Φ_Δ relacionando o inverso de $\Phi_p \text{ DPBF}$ com o inverso da [DPBF] mediante a equação:

$$\frac{1}{\Phi_{DPBF}} = \frac{1}{\Phi_\Delta} + \frac{1}{\Phi_\Delta} \frac{k_d}{k_a} \frac{1}{[DPBF]}, \quad (4.19)$$

onde k_d é a constante cinética de decaimento do oxigênio singleto no respectivo solvente e k_a é a constante cinética de reação do DPBF com oxigênio singleto. O valor $1/\Phi_\Delta$ é a interseção obtida do gráfico de $(1/\Phi_{DPBF}$ versus $1/[DPBF]$), o valor k_d/k_a , denominado valor β , é constante para o decaimento de DPBF num determinado solvente.