

6

Propriedades fotossensibilizantes de ZnPc em micelas

O mecanismo de fotoxidação de moléculas na presença de fotossensibilizantes e oxigênio pode ocorrer via mecanismo Tipo I ou Tipo II, sendo que a maioria das reações ocorre via mecanismo Tipo II, produção de oxigênio singleto, conforme citado na introdução dessa tese. Ambos os mecanismos implicam em fotobranqueamento, isto é, em perda de absorção e/ou fluorescência, no caso de a molécula fotoxidada ser um cromóforo ou fluoróforo. Neste trabalho, foi estudado o fotobranqueamento da própria ftalocianina, de triptofano, e da sonda específica para oxigênio singleto, DPBF. Como será demonstrado mais adiante, foi observado que o mecanismo de ação da ZnPc é de Tipo II e que o 1O_2 gerado degrada tanto a própria ZnPc como as moléculas sondas utilizadas, Trp e DPBF.

O mecanismo Tipo II ocorre segundo as seguintes reações, sendo S a sonda:



A produção de 1O_2 por ZnPc irradiada com luz de LEDs vermelhos foi avaliada em nanoemulsões de DMF-surfactantes através de (a) fotobranqueamento da própria ZnPc, pelo decaimento da absorção; (b) fotoxidação de Trp solubilizado no meio aquoso, detectada pela perda de fluorescência; (c) sonda específica DPBF, com absorção em 417 nm, que sofre fotobranqueamento ao reagir com oxigênio singleto.

Foram utilizadas solução estoque de triptofano (Trp) 1 mM em tampão fosfato pH 7,4, 10 mM e solução estoque de 1,3-difenilisobenzofuran (DPBF) a 1mM em DMF. Foram feitas várias soluções estoques compostas de ZnPc a 0,5 mM em DMF e vários surfactantes: CTAB, 333 mM, HPS, 43 mM, SDS, 333

mM, Tween 80, 15 mM. Foi também utilizada uma solução de SDS 300 mM em água MilliQ para aumentar a concentração do SDS na solução final.

6.1

Atividade fotodinâmica avaliada por fotobranqueamento de ZnPc

A produção de oxigênio singleto por ZnPc em nanoemulsões pode ser avaliada pela taxa de fotoxidação da própria ZnPc, detectada pela diminuição da absorbância.

As nanoemulsões de ZnPc-DMF-surfactante foram irradiadas com luz de LEDs vermelhos na presença de oxigênio, para diferentes períodos de irradiação. Foram tomados espectros de absorção dessas amostras (Fig. 6.1). O espectro de absorção apresenta os picos típicos de ZnPc em 342 nm, 608 nm e 672 nm, que decaem com o tempo de irradiação. Nota-se que as taxas de fotobranqueamento dependem do surfactante utilizado. Como essas mesmas amostras foram utilizadas para avaliar a fotoxidação de Trp (próxima seção), o pico de Trp em 278 nm pode ser também observado.

Observou-se em experiências anteriores que a micela de ZnPc-DMF-surfactante em solução aquosa mantinha inicialmente o ZnPc monomérico, mas depois de um tempo o DMF, por sua miscibilidade em água, saía da nanoemulsão fazendo com que o compartimento hidrofóbico diminuísse, deixando mais próximos os monômeros de ZnPc e produzindo sua agregação. Observou-se que esta agregação dependia do surfactante. Para levar em conta o efeito da agregação no estudo das taxas de fotobranqueamento de ZnPc, foram obtidos espectros de absorção com amostras de ZnPc-DMF-surfactante tanto irradiadas como sem irradiar. A relação $A_{irrad} / A_{nãoirrad}$ permite eliminar a diminuição da absorbância devido à agregação, de tal maneira que esta relação mostra exclusivamente a diminuição provocada pelos efeitos da irradiação. A Fig. 6.2, mostra a relação $A_{irrad} / A_{nãoirrad}$, obtida no pico de ZnPc em 672 nm, em função do tempo para os sistemas ZnPc-DMF-surfactante, com os surfactantes CTAB, HPS, SDS e Tween 80. A partir desses resultados, apenas o fotobranqueamento de ZnPc devido à irradiação estará sendo avaliado.

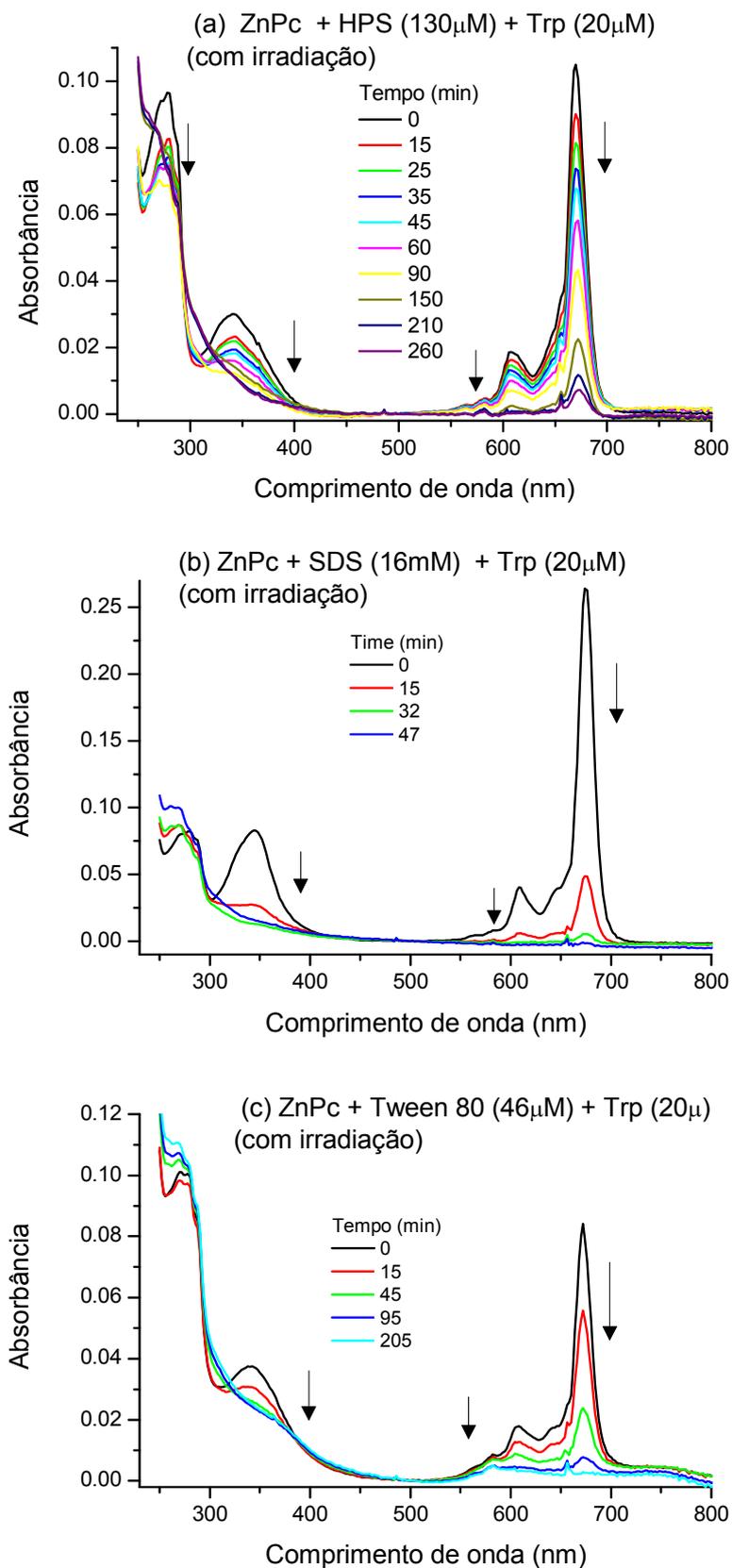


Figura 6.1. Espectros de absorção das soluções de ZnPc-DMF-surfactante com Trp em tampão fosfato pH 7,4 (10 mM). (a) 130 μ M HPS. (b) 16 mM SDS. (c) 46 μ M Tween 80. 1,5 μ M ZnPc e 20 μ M de Trp.

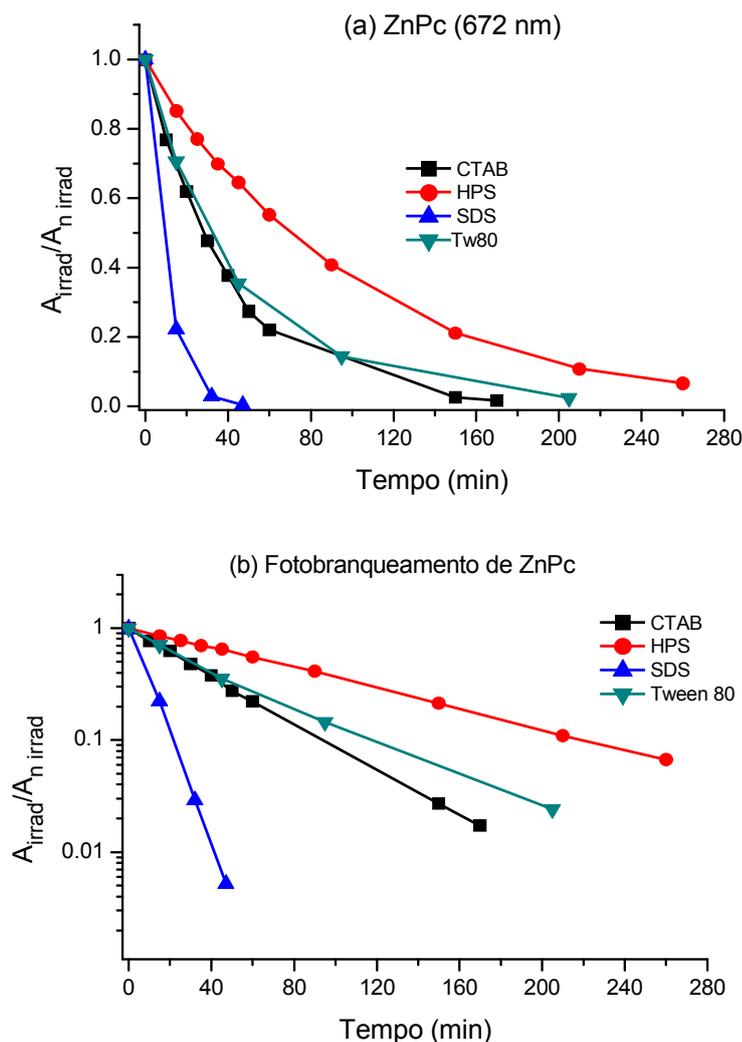


Figura 6.2. (a) Fotobranqueamento da ZnPc, observado no pico de 672nm, em função do tempo para soluções de ZnPc-DMF-surfactante em presença de Trp em tampão PB pH 7,4 (10mM). Surfactantes: CTAB, HPS, SDS, Tween 80. (b) Idem, em escala logarítmica.

O gráfico de $\log(A_{irrad}/A_{n\ irradi})$ no pico de 672nm pertencente à ZnPc em função do tempo apresentou comportamento linear, mostrando decaimento exponencial (Fig. 6.2 b). Esse comportamento foi ajustado com a função:

$$A = A_0 \exp(-kt)$$

onde k é a taxa de fotobranqueamento da ZnPc.

A Tabela 6.1 mostra as taxas de fotobranqueamento de ZnPc, encontradas a partir do ajuste monoexponencial. Observa-se que em SDS a intensidade dos picos de ZnPc decai cerca de dez vezes mais rapidamente que em HPS. As taxas de decaimento em Tween 80 e em CTAB foram intermediárias e semelhantes.

Tabela 6.1. Taxas de fotobranqueamento de ZnPc (k) e tempos característicos ($\tau = 1/k$) nos diferentes sistemas micelares, para amostras em ambiente aeróbico e taxas de irradiação com LED vermelho descritas no texto.

Surfactante	k (10^{-2} min^{-1})	k (10^{-4} s^{-1})	τ (min)
CTAB	$2,39 \pm 0,02$	4,0	42
HPS	$1,05 \pm 0,01$	1,8	95
SDS	$11,3 \pm 0,3$	18,8	9,0
Tween 80	$1,80 \pm 0,07$	3,0	56

O fotobranqueamento da ZnPc tem um comportamento exponencial no tempo e é provocado pelo oxigênio singleto gerado por ela mesma. De fato, Ogunsipe et al. (2003) encontraram que a fotodegradação oxidativa geralmente observada para as ftalocianinas é mediada pelo ataque do oxigênio singleto gerado pela própria ftalocianina irradiada. Portanto, as taxas de fotobranqueamento da Tabela 6.1 estariam associadas à produção de oxigênio singleto nos diferentes sistemas micelares. Para verificar este fato, foram comparados espectros de absorção de soluções ZnPc-DMF-surfactante em ambiente aeróbico e em amostra fechada submetida a fluxo de nitrogênio. Os resultados para amostras irradiadas em intervalos de 15 min por uma hora são apresentados na Fig. 6.3 e mostram que, quando o oxigênio é fluxado para fora da amostra, a diminuição do pico de ZnPc é muito menor do que em presença de oxigênio atmosférico.

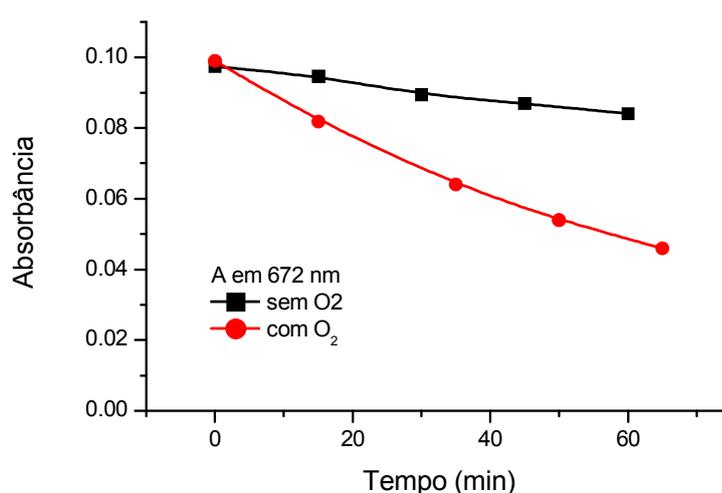


Figura 6.3. Absorbância em 672 nm, correspondente ao pico de ZnPc, em função do tempo de irradiação com LED vermelho. (■) em atmosfera de N₂; (●) em ambiente aeróbico.

A Tabela 6.1 indica que a taxa de fotobranqueamento de ZnPc em SDS foi 5 vezes maior que em CTAB; 6 vezes maior que em Tween 80 e 10 vezes maior que em HPS. Então, o surfactante zwitteriônico HPS mostrou a menor taxa de fotobranqueamento, seguido por Tween 80 e CTAB. Em SDS o fotobranqueamento foi o mais rápido.

Spikes et al. (1992) sugeriram que a diminuição do fotobranqueamento devido à presença de surfactante estaria relacionada com a incorporação do fotossensibilizante no sistema micelar, em regiões de baixa constante dielétrica onde o fotobranqueamento seria menor. Encontraram uma correlação entre o rendimento quântico de fotobranqueamento de porfirinas e a constante dielétrica do solvente. Em nosso caso, o fato de a água penetrar mais em micelas de SDS, aumentando a constante dielétrica do meio micelar, poderia estar de acordo com a alta taxa de fotobranqueamento nessas emulsões.

Em contraste, a nanoemulsão formada por ZnPc-DMF-HPS, sendo a micela mais estável dentre as utilizadas neste estudo, não permitiria a penetração de água no compartimento hidrofóbico, mantendo a constante dielétrica baixa e assim diminuindo o fotobranqueamento da ZnPc.

6.2

Atividade fotodinâmica avaliada por fotoxidação de Trp

Assim como Lambert et al. (1986); Ball et al. (1998) e Da Silva (2003), utilizaram a fotoxidação do triptofano para avaliar a eficiência fotodinâmica de alguns derivados porfirínicos. Aqui foi avaliada a capacidade das nanoemulsões de ZnPc-DMF-surfactante em tampão fosfato 7,4 de fotoxidar triptofano adicionado à solução. A produção de oxigênio singlete por ZnPc em nanoemulsões pode ser avaliada pela taxa de fotoxidação do Trp, obtida através da diminuição da sua fluorescência. É importante notar que o amino ácido Trp em pH neutro é zwitteriônico e suas moléculas localizam-se principalmente no meio aquoso. As moléculas de ZnPc, ao contrário, localizam-se no interior das micelas. Os dois tipos de moléculas sondam, portanto, o fotobranqueamento produzido por $^1\text{O}_2$ em diferentes regiões do meio não homogêneo.

A fotoxidação de Trp, adicionado aos sistemas micelares para atuar como sonda de produção de $^1\text{O}_2$, localizado no meio aquoso, foi investigada através da

fluorescência de Trp, com pico de emissão em 350 nm. A eficiência da ZnPc, contida nas nanoemulsões ZnPc-DMF-surfactantes, em provocar fotoxidação de triptofano está relacionada com a difusão do oxigênio singlete para fora das micelas, já que o triptofano se localizará principalmente no meio aquoso.

Foram obtidos os espectros de fluorescência do Trp ($20\ \mu\text{M}$) nas soluções de ZnPc-DMF-surfactante (Fig. 6.4). Observa-se uma diminuição na intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação com LEDs vermelhos para todos os casos, mas a taxa de fotoxidação varia segundo o surfactante. Na ausência de ZnPc, não é observada qualquer diminuição de fluorescência devido à irradiação com LEDs.

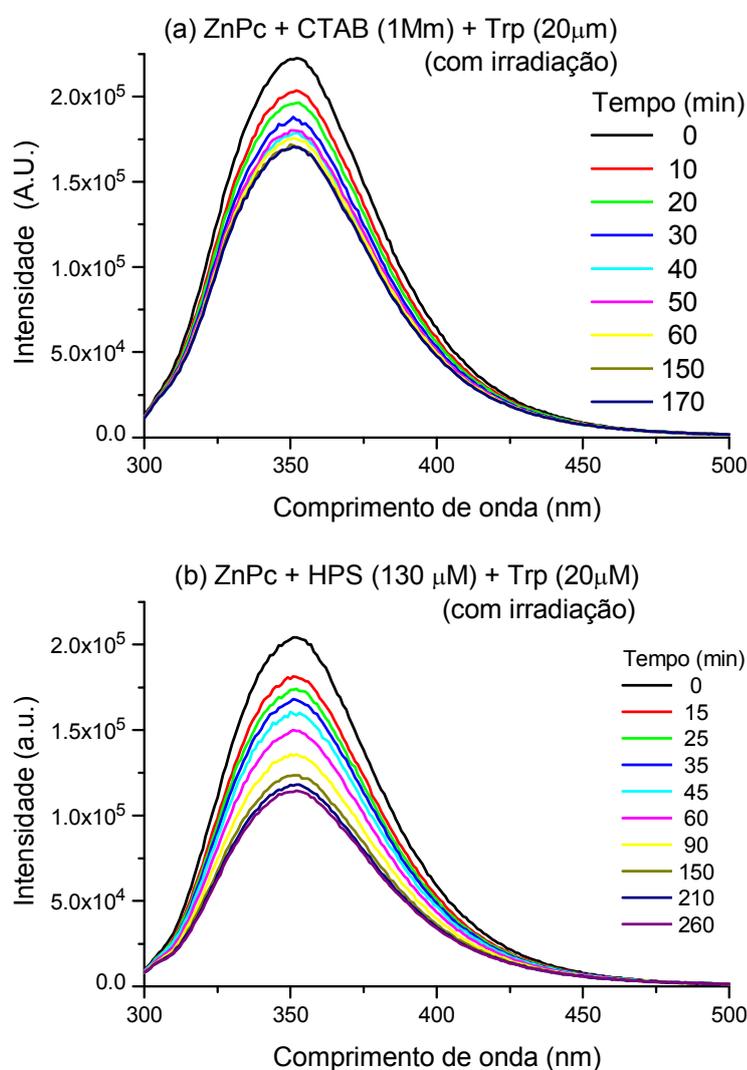


Figura 6.4 (a e b). Espectros de fluorescência do Trp ($20\ \mu\text{M}$) em soluções ZnPc-DMF-surfactante, em PB pH 7,4 (10 mM). Excitação, 278 nm. (a) 1 mM CTAB. (b) $130\ \mu\text{M}$ HPS. $1,5\ \mu\text{M}$ ZnPc.

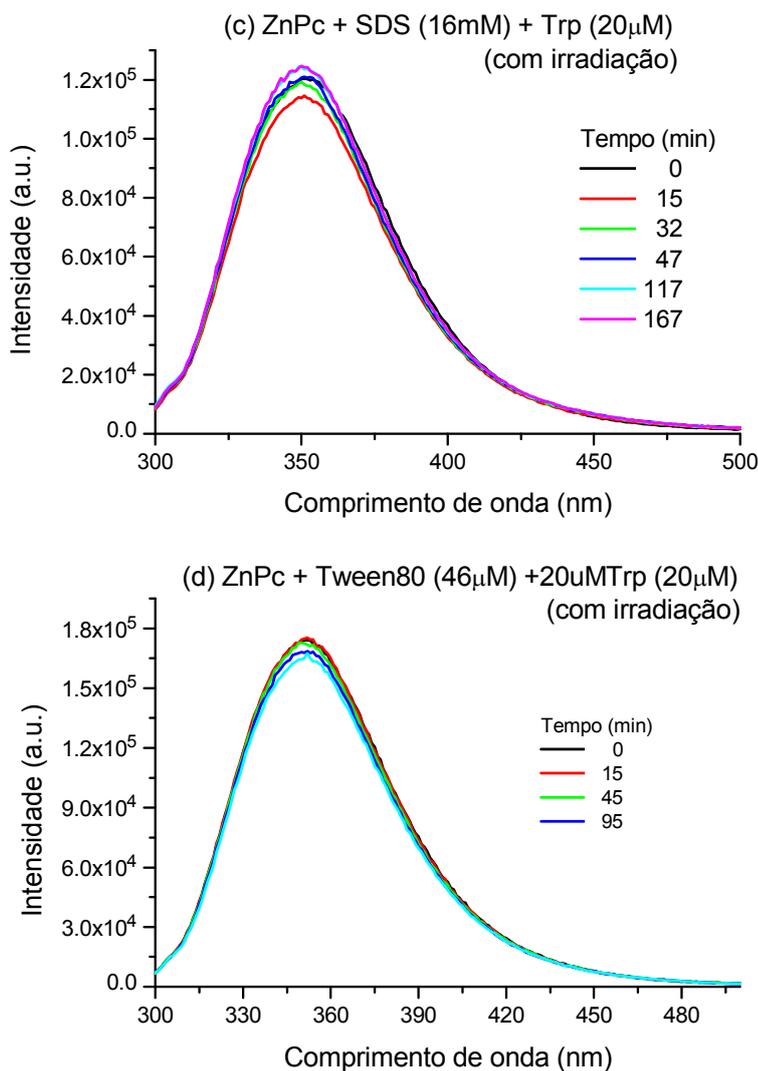


Figura 6.5 (c e d). Espectros de fluorescência do Trp (20 μ M) em soluções ZnPc-DMF-surfactante, em tampão fosfato pH 7,4 (10 mM). Excitação, 278 nm. (c) 16 mM SDS. (d) 46 μ M Tween 80. 1,5 μ M ZnPc

Para observar de uma maneira mais clara o decaimento da fluorescência de Trp, foi feito um gráfico da intensidade normalizada do pico em 350 nm em função do tempo (Fig. 6.5). No caso de HPS a fluorescência do Trp decai mais rapidamente e atinge um valor final menor do que nos casos dos outros surfactantes. No caso de CTAB, a taxa inicial de decaimento é a mesma que para HPS, mas o valor final da fluorescência é 80% do valor inicial, ou seja, o oxigênio singleto gerado na reação oxidou 20% do total de Trp que se encontrava na solução. Em micelas de SDS, a taxa de fotoxidação de ZnPc é tão grande (ver Fig. 6.2) que não sobra $^1\text{O}_2$ para se difundir para fora da micela e atacar o Trp.

No caso do Tween 80 o comportamento é peculiar já que a intensidade da fluorescência do Trp decai só 5% nos 200 minutos de irradiação, ou seja, só 5% da quantidade de Trp foi fotooxidado, mas se observa que o fotobranqueamento da ZnPc é semelhante ao encontrado com o CTAB. Pode-se concluir que, provavelmente devido ao tamanho da cabeça polar de Tween 80, comparado com as dos demais surfactantes, o oxigênio singlete gerado pela fotoexcitação da ZnPc não consegue difundir-se até a região aquosa, fora da micela, onde se localiza o Trp, mantendo a intensidade da fluorescência de Trp quase inalterada.

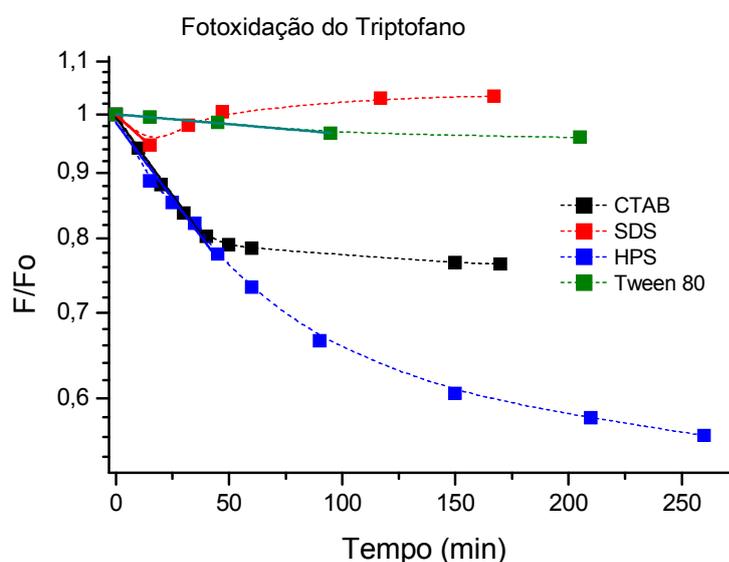


Figura 6.6. Relação F/F_0 do pico de fluorescência em 350 nm, pertencente ao Triptofano ($20 \mu\text{M}$) (escala logarítmica), em função do tempo de irradiação com LEDs vermelhos, para soluções de ZnPc-DMF-surfactante em tampão fosfato pH 7,4 (10 mM), com os surfactantes CTAB, HPS, SDS e Tween 80. Os valores de k_p (min^{-1}) correspondem às taxas iniciais de fotoxidação de Trp.

No gráfico logarítmico da Fig. 6.5, observa-se linearidade na fase inicial do decaimento da fluorescência no pico em 350 nm (primeira hora de irradiação), com exceção de SDS onde a ZnPc é rapidamente degradada. Devido à degradação da própria ZnPc por $^1\text{O}_2$ produzido, a taxa de geração de $^1\text{O}_2$ vai diminuindo, diminuindo também a taxa de fotoxidação de Trp. Foram encontradas as taxas de fotoxidação de Trp, k_p , usando a fase inicial (Tabela 6.2). As taxas de fotoxidação de Trp nas soluções contendo HPS e CTAB foram da mesma ordem de grandeza; com SDS, a eficiência de degradação de Trp foi muito pequena porque o mecanismo de ataque da própria ZnPc por $^1\text{O}_2$ predomina; já com Tween 80, a

taxa de fotodegradação de Trp foi uma ordem de grandeza menor do que com HPS e CTAB.

É interessante notar que, enquanto o HPS foi o surfactante que melhor protegeu a ZnPc de fotobranqueamento, também permitiu a saída do oxigênio singlete gerado no compartimento hidrofóbico para fotooxidar o Trp com maior eficiência.

Tabela 6.2. Taxas iniciais de fotooxidação do Trp por irradiação com LED vermelho na presença de ZnPc-DMF-surfactante.

Surfactante	k_p (10^{-3} min^{-1})
Em DMF	$0,43 \pm 0,045$
CTAB	$5,6 \pm 0,3$
HPS	$5,4 \pm 0,5$
SDS	3,7
Tween 80	$0,35 \pm 0,01$

Concluimos, da Fig. 6.5 e Tabela 6.2, que a taxa de fotooxidação de Trp provocada por ZnPc foi maior em nanoemulsões de DMF-CTAB e DMF-HPS, dentre as 4 nanoemulsões testadas. Foi observada que a taxa de fotooxidação do Trp depende da taxa do fotobranqueamento de ZnPc, já que, se houver pouca quantidade de ZnPc para fotoexcitar e produzir oxigênio singlete, vai haver menor quantidade de Trp fotooxidado.

Pelo fato de ser zwitteriônico, o Trp vai localizar-se no meio aquoso, e a sua taxa de fotooxidação k_p vai depender do surfactante utilizado para solubilizar a ZnPc, como observado na Tabela 6.2 e discutido acima. O tempo de vida de $^1\text{O}_2$ é de cerca de $3,5 \mu\text{s}$ e a difusão até o meio aquoso, que influi na eficiência de fotobranqueamento do Trp, depende do ambiente micelar.

Desta maneira se faz importante a utilização de outra molécula fotooxidável que possa penetrar na nanoemulsão e que fique mais próxima do oxigênio singlete gerado pela irradiação de ZnPc.

6.3

Atividade fotodinâmica avaliada com DPBF

Não somente a fotoxidação de aminoácidos é utilizada como parâmetro para avaliar a eficiência fotodinâmica de um fotossensibilizante, mas também fotoxidações de purinas, lipídios, carboidratos, proteínas e o composto 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) (Da Silva A. R. 2003; Zhang X. et al. 2010; Idowu M. et al. 2007). Neste trabalho o DPBF foi utilizado para este fim. Assim serão comparadas as eficiências quânticas de produção de oxigênio singlete por irradiação de ZnPc nos diferentes meios micelares, pelo método relativo, usando como padrão ZnPc em DMF (Eq. 4.11).

O espectro de absorção de DPBF em tampão fosfato pH 7,4 contendo micelas de surfactante CTAB (2 mM) apresenta um pico em 416 nm. Espectros obtidos após irradiação da solução com LEDs vermelhos, sem a presença de oxigênio, não apresentaram modificações consideráveis em 20 minutos de irradiação. Já em soluções de ZnPc-DMF-surfactante na presença de oxigênio (Fig. 6.6) DPBF sofre fotoxidação, detectada pela diminuição do pico em 416 nm. Por outro lado, o espectro de absorção de ZnPc com picos em 342 nm, 608 nm e 672 nm, que também poderia diminuir durante a irradiação por ataque de $^1\text{O}_2$ à própria ZnPc, diminuiu bem pouco durante o período de destruição do DPBF. De fato, no caso dos quatro surfactantes, observa-se uma diminuição bem mais acentuada do pico em 416 nm (DPBF) do que em 672 nm (ZnPc). Observa-se também que a taxa de fotoxidação depende do surfactante. Durante os estudos de produção de oxigênio singlete não foi observada formação de novas bandas ZnPc.

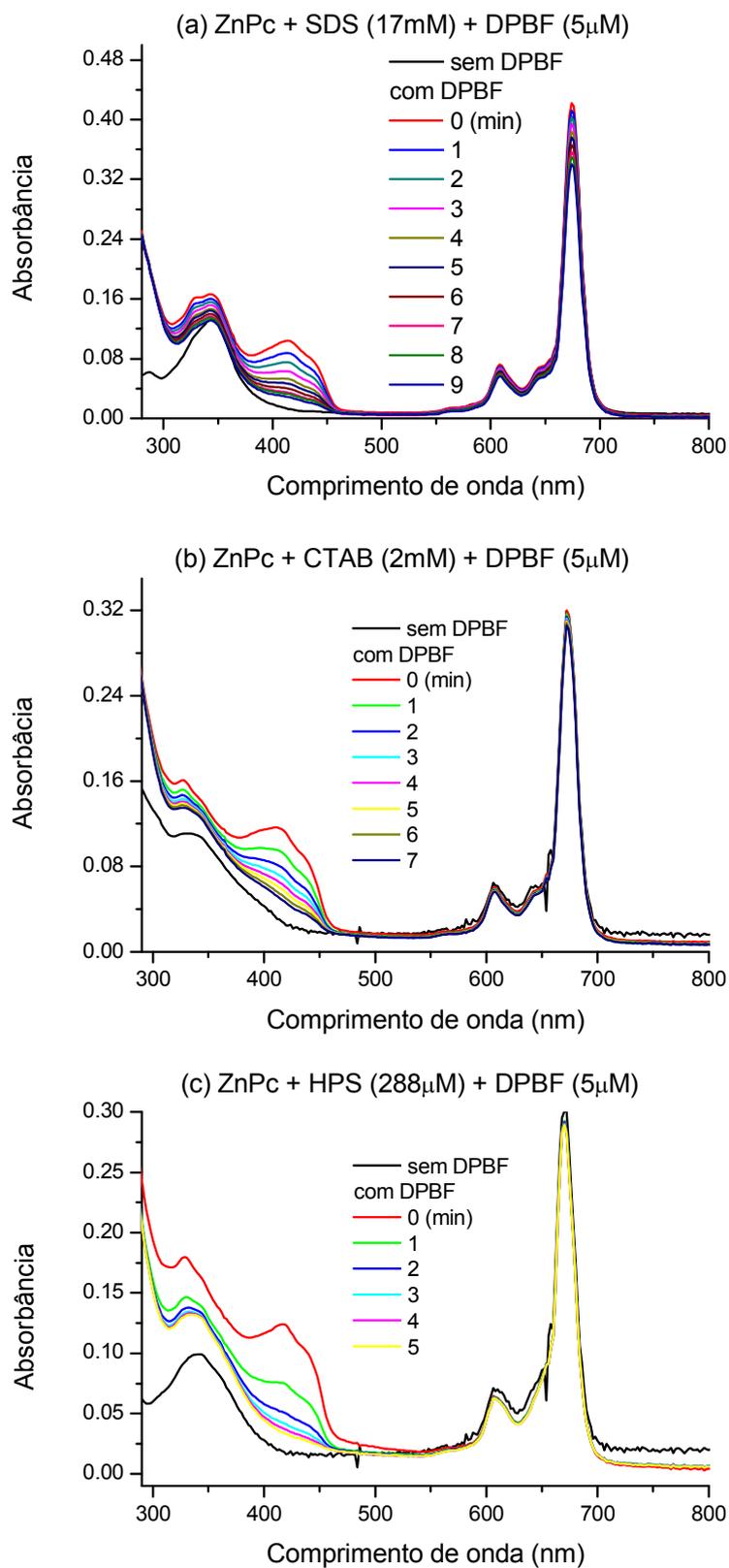


Figura 6.7 (a, b, c). Espectros de absorção da solução ZnPc-DMF-surfactante na presença de DPBF. (a) 17mM SDS; (b) 2 mM CTAB; (c) 288 μ M HPS. 3 μ M ZnPc, 5 μ M DPBF.

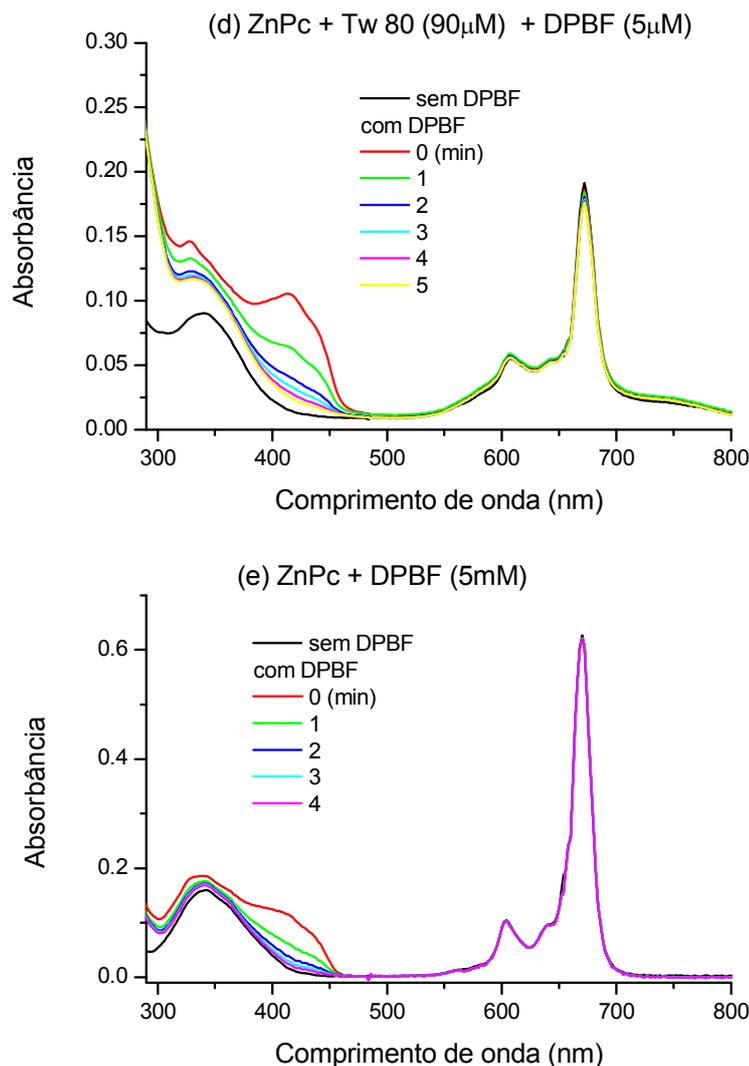


Figura 6.8 (d, e). Espectros de absorção da solução ZnPc-DMF-surfactante na presença de DPBF. (d) 90 μM Tween 80; (e) sem surfactante. 3 μM ZnPc, 5 μM DPBF.

Fazendo experimentos com várias concentrações de DPBF (de 7,5 μM a 33 μM), mantendo-se fixa a concentração de ZnPc, encontrou-se também que a taxa de fotoxidação de DPBF foi independente de sua concentração.

Na Figura 6.7 estão apresentados os decaimentos do pico de 416 nm (DPBF), para o estudo da taxa de produção de $^1\text{O}_2$, e do pico de 672 nm (ZnPc), para obter sua taxa de fotobranqueamento. Em relação à taxa de fotoxidação do DPBF, obteve-se um ajuste monoexponencial [$\ln(A/A_0) = -k_p t$] com um erro consideravelmente mais baixo do que no caso da fotoxidação do Trp. As taxas obtidas dos ajustes aparecem na Tabela 6.3, junto com as taxas das Tabelas 6.1 e 6.2, para comparação.

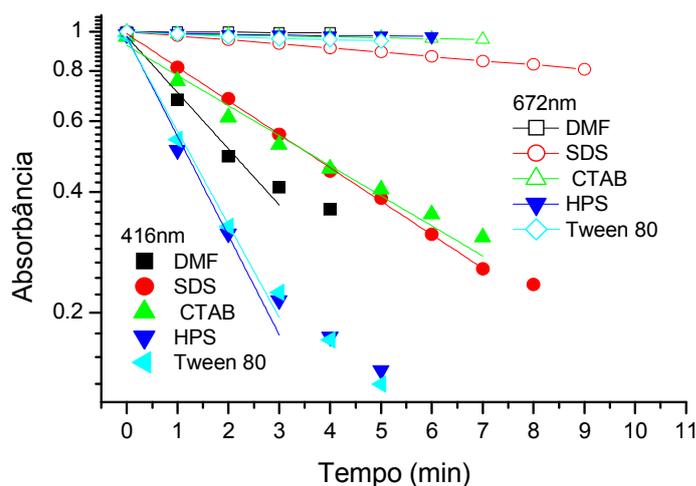


Figura 6.9. Fotoxidação de DPBF e de ZnPc. 3 μM ZnPc e as mesmas concentrações de surfactante que na Fig. 6.6.

Tabela 6.3. Taxas de fotoxidação do DPBF (k_p) por irradiação com LED vermelho na presença de ZnPc-DMF-surfactante e as taxas de fotoxidação de Trp (k_p) e da própria ZnPc (k), repetidas das Tabelas 6.1 e 6.2, para comparação. 1,5 μM ZnPc; concentrações de surfactante: 1mM CTAB, 230 μM HPS, 16 mM SDS e 45,8 μM Tw 80.

Surfactante	k_p (10^{-3} min^{-1})	k (10^{-3} min^{-1})	k_p (min^{-1})	k (10^{-3} min^{-1})
	Trp	ZnPc (Trp)	DPBF	ZnPc (DPBF)
CTAB	$5,6 \pm 0,3$	$23,9 \pm 0,2$	$0,11 \pm 0,01$	$6,9 \pm 0,2$
HPS	$5,4 \pm 0,5$	$10,5 \pm 0,1$	$0,26 \pm 0,01$	$1,2 \pm 0,7$
SDS	3,7	113 ± 3	$0,12 \pm 0,01$	$31,9 \pm 0,4$
Tween 80	$0,35 \pm 0,01$	$18,0 \pm 0,7$	$0,28 \pm 0,02$	$20,5 \pm 1,6$

Na Tabela 6.3, observa-se que as taxas de fotoxidação de DPBF são bem maiores do que as de Trp. Isso está de acordo com a natureza hidrofóbica de DPBF, já que a produção de $^1\text{O}_2$ se dá na parte hidrofóbica das micelas, onde o fotossensibilizante está localizado. Observa-se também que as taxas de fotoxidação de DPBF são bem maiores do que as de ZnPc, indicando que DPBF é preferencialmente fotoxidado por $^1\text{O}_2$. Isto também concorda com a menor taxa de fotoxidação de ZnPc encontrada na presença de DPBF, em relação às taxas medidas na presença de Trp, à exceção de micelas de Tween 80 onde foram observados valores semelhantes.

Pode-se observar (Tabela 6.3) que as taxas k_p de DPBF são semelhantes no caso de HPS e Tween80 ($0,26 \text{ seg}^{-1}$ e $0,28 \text{ seg}^{-1}$, respectivamente). Essas taxas também são semelhantes no caso de CTAB e SDS ($0,10 \text{ seg}^{-1}$ e $0,12 \text{ seg}^{-1}$, respectivamente), porém cerca de duas vezes menores que as de HPS e Tween80. No caso do fotobranqueamento de ZnPc evidencia-se que a estabilidade no tempo da nanoemulsão de ZnPc-DMF-surfactante é importante para análise do fotobranqueamento de ZnPc. Como SDS e Tween 80 formam nanoemulsões menos estáveis que HPS e CTAB, como foi estudado no Capítulo 5.2, Figura 5.7, é possível que o aparente fotobranqueamento de ZnPc esteja relacionado com agregação devido à saída de DMF das nanoemulsões. Ainda que este fato já tenha sido descontado nos espectros obtidos com DPBF, observa-se que as moléculas de ZnPc em estado monomérico são mais resistentes ao fotobranqueamento que as moléculas agregadas.

O decaimento dos picos de DPBF (416 nm) e de ZnPc (672 nm), na Figura 6.7, evidencia que as melhores condições para fotoxidar DPBF, com menos fotobranqueamento de ZnPc, são encontradas em nanoemulsões ZnPc-DMF-HPS. Em Tween 80, ZnPc também tem uma alta eficiência para fotodegradar o DPBF, mas mostra menor capacidade de evitar fotobranqueamento de ZnPc. As nanoemulsões com CTAB mostram pouco fotobranqueamento de ZnPc, mas menor taxa de fotoxidação de DPBF. O SDS apresentou as piores condições, entre os quatro surfactantes, pois mostrou menor capacidade tanto de fotodegradar o DPBF, quanto de evitar fotobranqueamento de ZnPc.

Tabela 6.4. Valores utilizados para o cálculo das Φ_f , Φ_Δ , $\Phi_p \text{ ZnPc}$, $\Phi_p \text{ Trp}$, $\Phi_p \text{ DPBF}$

	Φ_f			Φ_Δ				$\Phi_p \text{ ZnPc}$		$\Phi_p \text{ Trp}$		$\Phi_p \text{ DPBF}$	
	$F_{\text{surf}} / F_{\text{std}}$	A_{610}	$A_{\text{std}} / A_{\text{surf}}$	A_{635}	I_{635}	$I_{\text{std}} / I_{\text{surf}}$	$k_p / 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$k_p \text{ ZnPc} / 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$I_{635 \text{ ZnPc}}$	$k_p \text{ Trp} / 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	$I_{635 \text{ Trp}}$	$k_p \text{ DPBF} / 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$I_{635 \text{ DPBF}}$
DMF	1	0,038	1	0,1	0,21	1	13,8	0,19	0,21	0,72	0,06	13,8	0,21
SDS	0,78	0,034	1,12	0,057	0,12	1,75	3,08	3,16	0,12	6,17	0,058	3,17	0,12
CTAB	0,23	0,014	2,71	0,038	0,084	2,5	3,33	1,00	0,08	9,33	0,039	3,33	0,084
HPS	0,22	0,014	2,71	0,042	0,091	2,31	9,08	0,79	0,09	9,00	0,032	9,00	0,091
Tween 80	0,38	0,032	1,19	0,054	0,12	1,75	10,8	1,07	0,12	0,58	0,035	10,8	0,12

6.4

Eficiência quântica de fluorescência Φ_f

A relação entre fótons emitidos e fótons absorvidos resultam no rendimento quântico de fluorescência Φ_f , onde valores próximos da unidade indicam que os fluoróforos são mais eficientes como sonda fluorescente, para usar no diagnóstico e também para usar como agente fotossensibilizante para PDT (Idowu et al., 2007).

Nas nanoemulsões de HPS, CTAB, SDS e Tween80 em PB pH 7,4 foram obtidos os valores das Φ_f a partir dos espectros tomados logo após a elaboração das nanoemulsão, antes da irradiação. Foi utilizando o procedimento da seção 4.2.3, juntamente com a equação 4.14. O índice de refração do DMF é 1,43 e o da água 1,33; a Φ_f do padrão (ZnPc em DMF) é de 0,18 (Maree et al. 2002). Os dados utilizados para o cálculo de Φ_f encontram-se na Tabela 6.4.

Na Tabela 6.5 pode-se observar que em nanoemulsão com SDS o Φ_f (0,14) é maior em relação a CTAB e HPS (0,10 e 0,09, respectivamente) e a diferença é maior com relação a Tween 80 (0,07).

Em relação à bibliografia (Tabela 6.5, valores com índices), pode-se notar que os resultados encontrados neste trabalho apresentam rendimentos quânticos maiores, associados às nanoemulsões ZnPc-DMF-surfactantes. Podemos notar que, em todos os experimentos, os autores utilizam soluções ZnPc-surfactante em que possivelmente as moléculas de ZnPc encontram-se mais aglomeradas, como no caso de nossas micelas, no dia seguinte à preparação das nanoemulsões.

O baixo valor de Φ_f da nanoemulsão formada por CTAB pode ser devido ao efeito de átomo pesado do bromo presente na solução; este efeito tende a favorecer a transição entre estados de multiplicidade diferente (Turro, 1991), o que provoca cruzamento intersistemas ao estado tripleto, evitando desta maneira que a maioria da população de moléculas que se encontram no estado eletrônico excitado S1 sejam desativadas por fluorescência e saltem ao estado eletrônico excitado tripleto T1.

Tabela 6.5. Eficiência quântica de fluorescência Φ_f , eficiência quântica de produção de oxigênio singleto Φ_Δ , eficiência quântica de fotobranqueamento tanto da ZnPc, DPBF e Trp, Φ_p ZnPc, Φ_p DPBF, Φ_p Trp, respectivamente (referências da Tabela 5: ¹Owens J. W. et al 1998; ²Ogunsipi et al 2003; ³Ribeiro J. 2003; ⁴Sibata et al, 2004. Todos os valores citados foram encontrados em soluções micelares de ZnPc-surfactante em meio aquoso)

ZnPc	Φ_f	Φ_Δ	Φ_p ZnPc (10^{-5})	Φ_p DPBF (10^{-3})	Φ_p Trp (10^{-5})
DMF	0,18 ¹	0,56 ²	1,90 0,022 ²	6,62	0,45
CTAB	0,10 0,002 ³	0,35 0,008 ³	12,09	4,00	9,03
HPS	0,09	0,95	8,91	9,95	10,61
SDS	0,14 0,092 ³ 0,15 ⁴	0,23 0,07 ³	26,27	2,65	4,00
Tween 80	0,07	0,79	9,3	9,08	0,63

As nanoemulsões que contêm ZnPc em HPS, Tween80 e CTAB mostram valores de Φ_f baixos em relação a SDS. Isto pode ser explicado mediante o espectro de fluorescência (Fig. 6.8), onde se observa que a espécie fluorescente presente nas diferentes nanoemulsões se encontra em estado monomérico e sofre diminuição, dependendo da estabilidade no tempo das nanoemulsões dos diferentes surfactantes. A relação $F_{SDS}/F_{Tween80}$ é de ao redor de 2 e as relações F_{SDS}/F_{CTAB} e F_{SDS}/F_{HPS} , ao redor de 3.

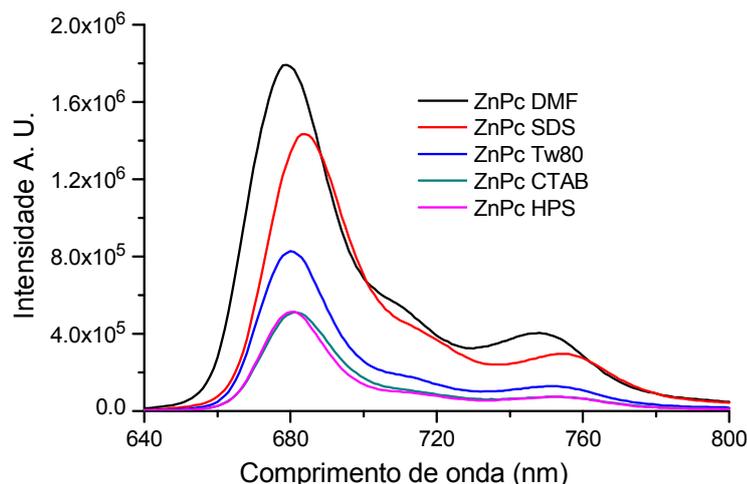


Figura 6.10. Espectro de Fluorescência das nanoemulsões ZnPc-surfactante-DMF em PB pH 7,4. [ZnPc]=1,5 μ M; [surfactantes] > 2 CMC. Espectros tomados no momento da elaboração das nanoemulsão, antes da irradiação.

Partindo da premissa de que $\Phi_f + \Phi_{ISC} + \Phi_{IC} = 1$, e que o Φ_{IC} (eficiência quântica de conversão interna) deve ser desprezível devido à rigidez da molécula de ZnPc (Ribeiro, 2003), dos baixos valores de Φ_f apresentados pela ZnPc nos diferentes meios micelares conclui-se que a via de desativação da molécula será preferencialmente por cruzamento intersistemas ISC, fosforescência e outros processos a partir do estado tripleto. Em acordo com os valores relativamente altos de Φ_{Δ} (obtido na próxima secção), observa-se que a via de desativação preferencial foi a partir do estado tripleto do fotossensibilizante, induzindo a criação do 1O_2 (mecanismo de desactivação tipo II).

De qualquer maneira, os valores de Φ_f são baixos o suficiente como para permitir que estas nanoemulsões sejam usadas em fotodiagnóstico e como fotossensibilizante. Estes dados podem ser diretamente relacionados à eficiência fotodinâmica do fotossensibilizante (Foote, 1991).

6.5

Eficiência quântica de oxigênio singlete Φ_{Δ}

A eficiência na formação de oxigênio singlete é provavelmente o mais importante indicador para um fotossensibilizante a ser aplicado em PDT (Zhang et al., 2010). A Φ_{Δ} foi determinada em solução PB pH 7,4 usando DPBF como um

quencher químico. A obtenção da Φ_{Δ} foi descrita na seção 4.2.3 e está dada pela

$$\text{Eq. 4.11} \quad \left(\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{std} \frac{k_p}{k_p^{std}} \frac{I^{std}}{I} \right), \text{ onde } \Phi_{\Delta}^{std} \text{ é a eficiência quântica de oxigênio}$$

singleto para o padrão, ZnPc em DMF, $\Phi_{\Delta}^{std} = 0,56$ (Spiller et al., 1998), k_p e k_p^{std} são as taxas de fotobranqueamento de DPBF, I^{std} e I são as intensidades de radiação absorvida no comprimento de onda de irradiação, $\lambda = 635$ nm na presença de ZnPc-DMF-surfactante e de ZnPc em DMF, respectivamente. Os valores utilizados para o cálculo de Φ_{Δ} encontram-se na Tabela 6.4. Foram obtidas a Φ_{Δ} para várias concentrações e a média colocada na Tabela 6.5.

Os valores de Φ_{Δ} são apresentados na Tabela 6.5 para as nanoemulsões de ZnPc-DMF-surfactante em PB pH 7,4 obtidas em relação à solução de ZnPc em DMF (0,56). Observa-se que os valores de Φ_{Δ} variam muito, sendo o menor encontrado para a nanoemulsão de SDS e o maior, de HPS. Pode-se sugerir-se que existe alta eficiência de transferência de energia desde o estado excitado tripleto T_1 ao oxigênio molecular: $T_1(\text{ZnPc}) + {}^3\text{O}_2 \rightarrow S_0(\text{ZnPc}) + {}^1\text{O}_2$. Pode-se observar uma correspondência inversa entre os valores de Φ_{Δ} e Φ_f , ou seja, que o surfactante com maior valor de Φ_f (SDS) tem menor valor de Φ_{Δ} , podendo-se argumentar que os surfactantes que permitiram ZnPc decair de S_1 até S_0 por meio de emissão de fluorescência, não permitiram popular suficientemente o estado excitado tripleto T_1 e, portanto, não puderam gerar oxigênio singleto, baixando desta maneira Φ_{Δ} . No caso de HPS e Tween80, pode-se observar alta eficiência de geração de oxigênio singleto, podendo sugerir que estes surfactantes permitem que a população de ZnPc salte ao estado excitado tripleto quase que por completo, tendo pouco decaimento por fluorescência.

Em relação à bibliografia (Tabela 6.5, valores com índices) pode-se ver que os resultados encontrados neste trabalho, onde foram utilizadas nanoemulsões ZnPc-DMF-surfactante, são bem maiores, devido à estabilidade da nanoemulsão que mantém monoméricas as moléculas de ZnPc, como tínhamos observado acima.

Eficiência quântica de fotobranqueamento da ZnPc Φ_p

O fotobranqueamento é identificado por um decrescimento no espectro, sem a formação de novos picos. As moléculas de ftalocianinas, em geral, fotodegradam-se oxidativamente via ataque de oxigênio singlete gerado por elas mesmas. Tem sido observada fotodegradação redutiva (Seotsanyana-Mokhosi et al., 2001).

O procedimento para a obtenção da Φ_p é descrito na Seção 4.2.3 mediante a equação 4.18

$$\left(\Phi_p = C_0 k_p \frac{V N_A h c}{(1 - 10^{-A_{635nm}}) A I_{635nm} \lambda} \right), \text{ onde } k_p \text{ é a taxa de fotooxidação da ZnPc}$$

(na banda de 670 nm), A_{635nm} é a absorbância do ZnPc-surfactante no comprimento de onda de radiação e I_{635nm} é a intensidade da lâmpada na posição da amostra (75 W m^{-2}), A é a área de irradiação ($3,84 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$), V o volume da solução irradiada ($3 \times 10^{-3} \text{ L}$), e o comprimento de onda de fotoexcitação é $\lambda = 635 \text{ nm}$. Os dados utilizados para o cálculo de Φ_p encontram-se na Tabela 6.4.

Os valores de Φ_p obtidos para as soluções ZnPc- DMF-surfactante em PB estão na Tabela 6.5; o maior fotobranqueamento é da solução contendo SDS ($26,3 \times 10^{-5}$), as demais soluções CTAB, HPS e Tween80 têm valores similares entre si. Estes valores indicam uma boa estabilidade das nanoemulsões de ZnPc-DMF-surfactante em relação à fotodegradação.

Os baixos valores encontrados de fotobranqueamento permitem avaliar o grau de agregação da ZnPc nas nanoemulsões. Várias publicações têm reportado que os baixos valores de Φ_p estão associados com baixa agregação de ZnPc (Aveline et al., 1998); este comportamento permite ter uma melhor atividade fotodinâmica devido a que a agregação reduz a atividade fotofísica das moléculas (Sibata et al., 2004). Podemos concluir que as soluções formadas por CTAB, HPS e Tween80 têm, de alguma maneira, melhor dispersão de ZnPc que no caso de SDS. Esses surfactantes formam nanoemulsões mais estáveis no tempo o que permite manter a ZnPc na sua forma monomérica por mais tempo.

Ogunsipi et al. (2003) encontraram o valor de Φ_p (Tabela 6.5) menor que o encontrado neste trabalho para a solução ZnPc em DMF. Esta diferença provavelmente se deve a uma melhor dispersão da ZnPc na solução.

Eficiência quântica de fotobranqueamento da DPBF $\Phi_{p, DPBF}$

O procedimento para a obtenção da Φ_p é descrito na Seção 4.2.3 mediante a equação 4.18

$$\left(\Phi_p = C_0 k_p \frac{V N_A h c}{(1 - 10^{-E_{635nm}}) A I_{635nm} \lambda} \right), \text{ onde } k_p \text{ é a taxa de fotoxidação do}$$

DPBF (na banda de 418 nm). Os valores utilizados para o cálculo de Φ_p encontram-se na Tabela 6.4. Na Tabela 6.5 são apresentados os valores de $\Phi_{p, DPBF}$, onde o maior valor é o de HPS, seguido por Tween 80, CTAB e SDS.

Foram calculadas as eficiências quânticas de fotobranqueamento de Trp, $\Phi_{p, Trp}$ obtidos da mesma maneira que $\Phi_{p, DPBF}$ salvo que o k_p é a taxa de fotoxidação obtida a partir do pico de 350 nm do espectro de fluorescência do Trp (Eq. 4.17, dados da Tabela 6.4) das nanoemulsões ZnPc-DMF-surfactante na presença de Trp, colocadas na Tabela 6.5. Pode-se observar que as maiores eficiências no fotobranqueamento do Trp são em HPS e CTAB, seguidos por SDS e finalmente Tween 80. Pode-se sugerir que HPS e CTAB permitem que a molécula de Trp interaja melhor com o oxigênio singleto gerado dentro das nanoemulsões. O caso do Tween 80 é diferente. As micelas que mantêm a ZnPc monomérica não permitem que o Trp interaja com o 1O_2 , evitando desta maneira sua fotoxidação (observada no seu k_p , Tabela 6.3). Observa-se desta maneira que a localização do Trp com relação ao oxigênio singleto é de suma importância para se obter uma eficiente fotoxidação.

Relacionando os valores de $\Phi_{p, DPBF}$ com os de $\Phi_{p, Trp}$, podemos observar que a eficiência de fotobranqueamento das moléculas de DPBF é duas ordens de magnitude maior que no caso do Trp. Isto deve ser devido, principalmente, à diferença de localização das duas sondas.

6.6

Conclusões

Em conclusão, este trabalho avalia a atividade fotodinâmica obtida com ZnPc solubilizada em DMF e incorporada em micelas dos surfactantes HPS, CTAB, SDS e Tween80 formando nanoemulsões dispersas em tampão. Como

sondas de $^1\text{O}_2$ foram usadas o Trp e o DPBF que se localizam em diferentes regiões da nanoemulsão.

Observou-se que tanto as taxas de fotoxidação do Trp e DPBF quanto a taxa de fotobranqueamento de ZnPc nas nanoemulsões dependem do surfactante usado.

A relação $A_{\text{irrad}}/A_{\text{n irrad}}$ (relação entre a absorbância da amostra irradiada e a não irradiada na banda de 672 nm) permitiu eliminar o efeito da diminuição da absorbância devido à agregação provocada pela instabilidade no tempo das nanoemulsões de ZnPc-DMF-surfactante (estudada no Cap. 5), de tal maneira que esta relação mostra exclusivamente a diminuição provocada pelos efeitos da irradiação. As curvas $A_{\text{irrad}}/A_{\text{n irrad}}$ vs tempo, ajustadas com monoexponenciais do tipo $A = A_0 \exp(-kt)$, permitiram encontrar as taxas de fotobranqueamento da ZnPc.

As taxas de fotobranqueamento de ZnPc estão associadas à produção de oxigênio singleto nos diferentes sistemas micelares. Isto foi comprovado tomando os espectros de absorção das nanoemulsões em ambiente aeróbico e anaeróbico. Com esses resultados se avaliou o fotobranqueamento da ZnPc devido à irradiação.

O fato de a água penetrar mais em micelas de SDS, aumentando a constante dielétrica do meio micelar, poderia explicar a alta taxa de fotobranqueamento nessas emulsões. Já a nanoemulsão de HPS, sendo a mais estável desse estudo, não permitiria a penetração de água no compartimento hidrofóbico.

A eficiência de oxidação do triptofano, pelo $^1\text{O}_2$ produzido por ZnPc, está relacionada com a interação entre Trp, que sendo uma molécula zwitteriônica se localizará principalmente no meio aquoso, e a ZnPc contida nas nanoemulsões (região hidrofóbica). Devido ao tamanho da cabeça polar de Tween 80, comparado com as dos demais surfactantes, o oxigênio singleto gerado pela fotoexcitação de ZnPc não consegue se difundir até a região aquosa, fora da micela, onde se localiza o Trp, mantendo a intensidade da fluorescência de Trp quase inalterada e evitando desta maneira a fotoxidação do Trp.

Na fotoxidação do Trp, a taxa de geração de $^1\text{O}_2$ vai diminuindo, exceto em SDS, onde a ZnPc é rapidamente degradada pelo próprio $^1\text{O}_2$ produzido. É interessante notar que enquanto o HPS foi o surfactante que melhor protegeu a

ZnPc de fotobranqueamento, também permitiu a saída do oxigênio singleto gerado no compartimento hidrofóbico para fotooxidar o Trp com mais eficiência.

As taxas de fotooxidação de DPBF são bem maiores do que as de Trp. Isso está de acordo com a natureza hidrofóbica de DPBF, já que a produção de $^1\text{O}_2$ se dá na parte hidrofóbica das micelas, onde o fotossensibilizante está localizado. As taxas de fotooxidação de DPBF são bem maiores do que as de ZnPc, indicando ataque preferencial a DPBF por $^1\text{O}_2$.

O decaimento dos picos de DPBF (416 nm) e de ZnPc (672 nm) evidencia que as melhores condições para fotooxidar DPBF, com menos fotobranqueamento de ZnPc, são encontradas em nanoemulsões ZnPc-DMF-HPS. O Tween 80 também tem uma alta eficiência para fotodegradar o DPBF, mas mostra menor capacidade de evitar fotobranqueamento de ZnPc. As nanoemulsões com CTAB mostram pouco fotobranqueamento de ZnPc e menor taxa de fotooxidação de DPBF. O SDS apresentou as piores condições, entre os quatro surfactantes, pois mostrou menor capacidade tanto de fotodegradar DPBF, quanto de evitar fotobranqueamento de ZnPc.

Foram observados baixos valores da eficiência quântica de fluorescência o que permitiu que a desativação das moléculas de ZnPc seja por cruzamento intersistemas, priorizando a desativação via mecanismo tipo II (criação de $^1\text{O}_2$). Com este fato, foram observados altos valores da eficiência quântica de oxigênio singleto.

O HPS teve um baixo valor de eficiência quântica de fluorescência e alto valor de eficiência quântica de oxigênio singleto o que permite concluir que quase toda a população de moléculas realiza o cruzamento intersistemas até T_1 e, desta maneira, pode gerar oxigênio singleto que vai fotooxidar a sonda DPBF. O HPS é seguido pelos surfactantes Tween 80, CTAB e SDS. Em SDS se observou, por outro lado, alta eficiência quântica de fluorescência e baixa eficiência quântica de oxigênio singleto.

No caso de HPS, CTAB e Tween80, tem-se valores baixos e similares da eficiência quântica de fotobranqueamento de ZnPc durante a irradiação da solução.

Algumas das nanoemulsões de ZnPc-DMF-surfactante apresentam ótimas condições para serem usadas em PDT e procedimentos de fotodiagnóstico, devido aos maiores valores de eficiência quântica de fluorescência, de oxigênio singleto e

baixa eficiência quântica de fotobranqueamento em relação aos encontrados na literatura (Tabela 6.5). Estes resultados sugerem que os surfactantes HPS, Tween 80 e CTAB que formam as nanoemulsões podem ser sistemas promissores de transporte de ZnPc para serem usados em PDT.