

3

Materiais e Métodos

3.1

Equipamentos

Espectrofotômetro

Espectros de absorção ótica na faixa de 220–800 nm foram obtidos em temperatura ambiente (25°C) com um espectrofotômetro com detecção por arranjo de diodos HP – 8452A, com resolução de 2nm. O espectrofotômetro utilizado consiste de uma fonte luminosa, um monocromador, um porta-amostra, um detector de luz e um registrador para acumular os dados (Fig. 3.1).

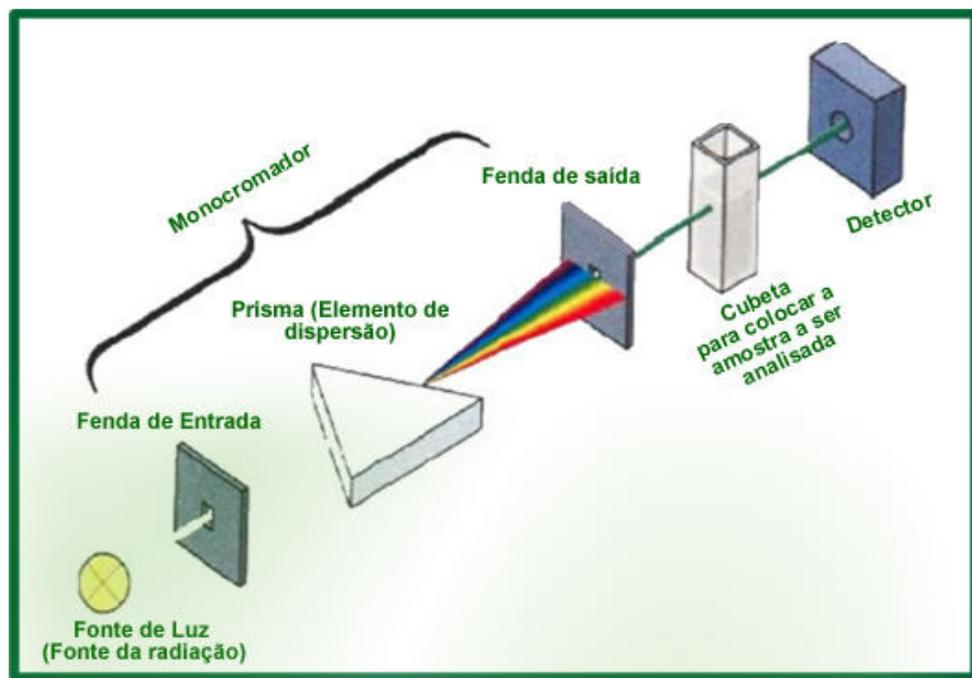


Figura 3.1 – Esquema de um típico espectrofotômetro. Figura retirada do site (<http://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/espectrofotometro/>)

Espectrofluorímetro estacionário

As medidas de fluorescência foram feitas no sistema de Fluorescência PTI QM-1 operando sempre com todas as fendas em 4 nm e potência da lâmpada em 50 W. A taxa de varredura utilizada foi de 1 nm/s. Todas as medidas foram realizadas com concentrações e comprimentos de onda de excitação em valores de absorvância menores que 0,1 para evitar os efeitos de filtro interno.

O espectrofluorímetro utilizado consiste basicamente em um feixe de luz de alta intensidade que tem comprimentos selecionados por um monocromador, permitindo a seleção da frequência dos fótons que irão compor o feixe de excitação. Então, o feixe atravessa uma cubeta transparente à luz de excitação. Para evitar a detecção do feixe incidente, a observação da fluorescência é realizada em noventa graus (90°) com o feixe de excitação. A luz emitida atravessa um monocromador, separando o feixe nos vários comprimentos de onda que compõem a luz emitida, para em seguida ter a sua intensidade registrada por um fotodetector (tubo fotomultiplicador). Programas de computador controlam o motor que faz a varredura dos comprimentos de onda de excitação ou de emissão. Para dado comprimento de onda de excitação, pode-se registrar a intensidade de emissão como uma função do comprimento de onda da luz emitida (espectros de emissão). É possível também registrar a intensidade de emissão em determinado comprimento de onda, em função do comprimento de onda de excitação (espectro de excitação).

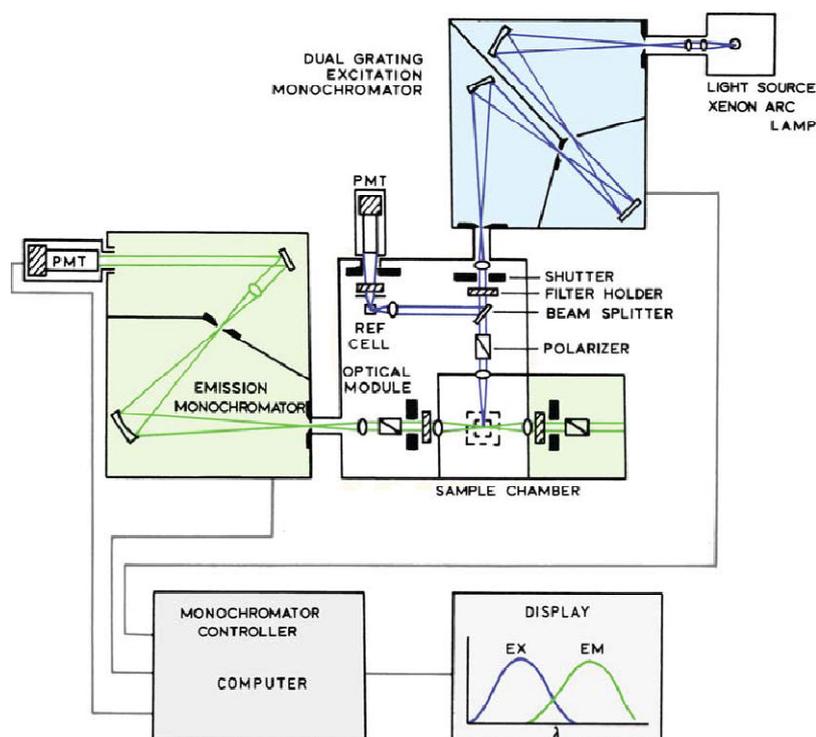


Figura 3.2. Esquema de um espectrofluorímetro estacionário. (Lakowicz;2006)

Sistema de fluorescência resolvida no tempo.

É necessário que o sistema de fluorescência resolvida no tempo seja capaz de medir tempos muito curtos da ordem de centenas de picossegundos até milissegundos. O equipamento de fluorescência resolvida no tempo utilizado nos experimentos é o TCSPC 5000 U Horiba – Jobin Ivon – IBH, o qual se baseia na técnica contagem de fóton único, descrita logo abaixo. O sistema de bombeamento utilizado foi um LED de estado sólido (NanoLED) com frequência de 1MHz e comprimento de onda de 330 nm, sendo que estes de uma duração média de 1 ns (todas as medidas de decaimento de fluorescência foram realizadas com o mesmo LED). Todo o sistema é controlado por um software comercial adquirido junto com o equipamento (DAS6 - Horiba Jobin Ivon).

A técnica de TSPC (Fig. 3.3), contagem de fótons, consiste em determinar o tempo decorrido a partir da excitação com um pulso luminoso (de largura extremamente curta e comprimento de onda bem definido), e o instante em que o primeiro fóton, advindo da relaxação das moléculas, chega ao detector. Ou seja, há um relógio que tem o seu disparo junto com a fonte de luz e cessa na detecção do primeiro fóton da amostra fluorescente. Para cada pulso, esses dados são acumulados num histograma (sendo o eixo y o número de fótons contados e x o

tempo decorrido até a observação do fóton advindo do fenômeno da fluorescência).

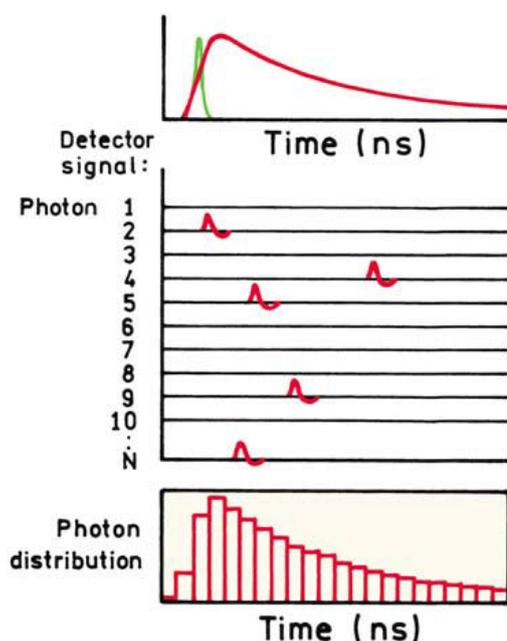


Figura 3.3. Esquema da técnica da contagem de fóton único. (Lakowicz, 2006).

O equipamento necessita também monitorar o perfil do pulso de luz, primeiramente porque esses pulsos não são curtos o suficiente para serem considerados deltas de Dirac, de maneira, que é necessário ter um tratamento matemático (realizar uma deconvolução) para obter corretamente os tempos de vida. Desse modo, tempos abaixo da largura a meia altura, que estariam dentro do erro experimental, ainda podem ser estimados.

Sistema de análise da fluorescência resolvida no tempo

Para determinar os tempos de vida, se utiliza a analogia com o decaimento radioativo que pode ser expresso por:

$$N(t) = A + \sum_i \alpha_i \exp \frac{-t}{\tau_i} \quad (2.19)$$

sendo A é uma constante associada ao ruído, τ_i são os tempos de vida das espécies presentes na amostra e α_i são os fatores pré-exponenciais. No intuito de ajustar as curvas de decaimento são utilizados dois “softwares” de análise, individual e global. Na análise individual, o programa DAS6 - Horiba Jobin Ivon nos permite realizar ajustes com até cinco exponenciais, ou seja, o somatório na equação (2.19) pode ir de 1 a 5. A parametrização é realizada através de uma avaliação

ponderada do χ^2 , o mesmo deve estar entre 0,8 e 1,2, e do comportamento coerente dos parâmetros segundo o modelo multi-exponencial. Na análise global o programa permite a realização de ajustes com até quatro exponenciais tendo τ_1 , τ_2 , τ_3 e τ_4 únicos para todas as curvas de decaimento. O ajuste é feito de modo iterativo entre as curvas de decaimento de tempo de vida., buscando tempos de vida que ajustem diversas curvas, podendo apresentar diferentes contribuições relativas as mesmas.

3.2

Materiais

Norfloxacina (NX), dodecil sulfato de sódio (SDS), brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foram obtidos da Sigma-Aldrich. A NX foi dissolvida em álcool etílico absoluto grau espectroscópico da VETEC numa concentração igual a 1 mmol.L⁻¹. Os surfactantes foram solubilizados em água Milli-Q em altas concentrações (soluções estoque), sendo respectivamente 1 mol.L⁻¹, 100 mmol.L⁻¹ e 30 mmol.L⁻¹. Todas as soluções de surfactantes foram utilizadas somente depois de 24 horas de preparo, a fim de garantir uma solução mais homogênea. A Tabela 3.1 apresenta algumas características dos surfactantes CTAB e SDS.

Tabela 3.1 Surfactantes

Surfactante	M.M. (g/mol)	CMC (mM)	Número de Agregação
CTAB			
Brometo de hexadecil trimetilamônio	364,45	1	170
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{Br}^- \\ \\ \text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_{15}-\text{N}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$			
SDS			
Dodecil sulfato de sódio	288,38	7-10	62
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\text{ONa}$			

Os complexos de cobre norfloxacinina foram diluídos em água Milli-Q a concentração de 2 mmol.L⁻¹. Os experimentos foram realizados com a temperatura ambiente controlada (24 °C).

Para o controle do pH foi utilizado tampão universal (borato, citrato, fosfato), sendo preparada a seguinte solução estoque: 13,7 ml de NaOH a 1 mol.L⁻¹, 140 µl ácido fosfórico 85%, 142 mg de ácido bórico, 280 mg de ácido cítrico e finalmente completando com água Milli-Q até um volume final de 40 ml. Nos experimentos optou-se por utilizar esse tampão com concentração de sódio igual a 22 mmol.L⁻¹ e, para tal, utilizou-se uma diluição de 1:15 em água Milli-Q, ajustando-se o pH com pequenas alíquotas de soluções concentradas de HCl.

Alíquotas da solução estoque de NX foram diluídas, diretamente na cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm, em 3 ml de tampão universal, obtendo-se concentração final de 8 µmol.L⁻¹. Esta foi a concentração de NX ou dos complexos de cobre NX utilizada em todos os experimentos. Os espectros foram levantados durante a titulação com os surfactantes listados acima.

Ademais, todos os resultados apresentados neste trabalho foram realizados pelo menos duas vezes, sendo que em sua maioria foram repetidos diversas vezes.

3.2.1 Complexos de cobre norfloxacinina

Os complexos [CuCl₂(H₂O)(NX)] (CuNX), [CuCl₂(py)(NX)] (CPN), [CuCl₂(bipy)(NX)] (CBN) e [CuCl₂(fen)(NX)] (CFN), onde NX representa o ligante norfloxacinina coordenado na forma zwitterionica e py, bipy e fen representam, respectivamente, os coligantes piridina, 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina (Figura 3.4) foram sintetizados pelo grupo da professora Letícia Teixeira do Departamento de Química da UFMG, conforme o método descrito abaixo.

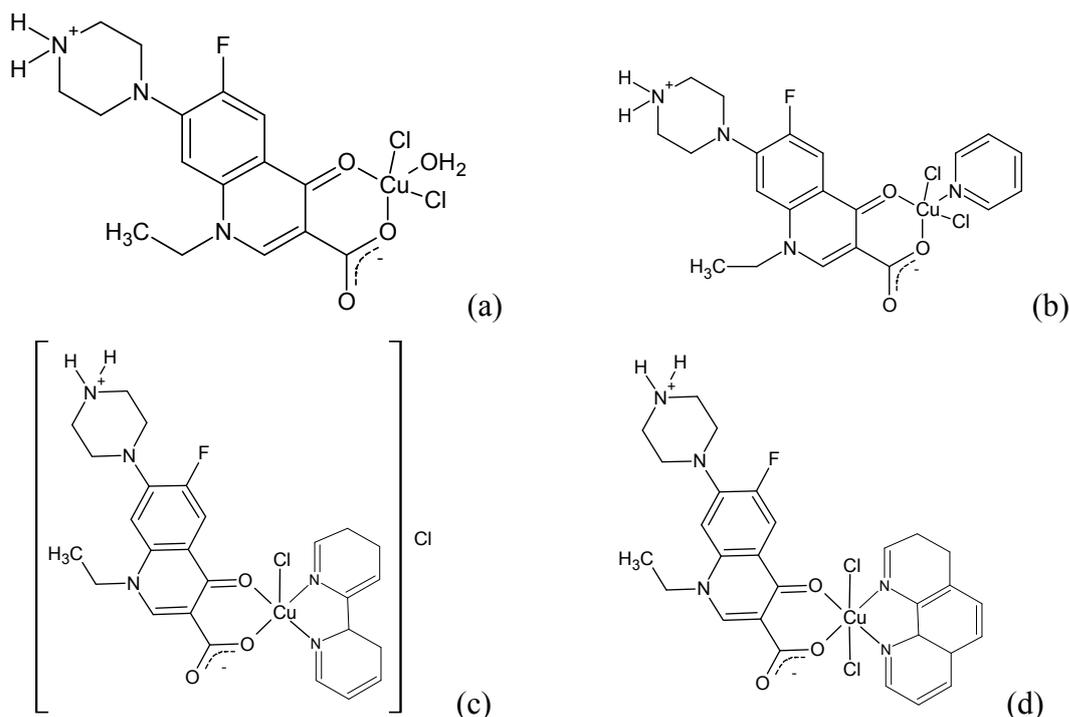


Figura 3.4. Estruturas propostas para os complexos de Cu(II) de norfloxacin: (a) $[\text{CuCl}_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NOR})]$, (b) $[\text{CuCl}_2(\text{py})(\text{NOR})]$, (c) $[\text{CuCl}(\text{bipy})(\text{NOR})]\text{Cl}$ e (d) $[\text{CuCl}_2(\text{fen})(\text{NOR})]$.

O complexo CFN foi preparado de acordo com um método semelhante ao descrito por Batista et al. (2011). NX (0,31 mmol) foi diluída em aproximadamente 40 ml de acetona. Em seguida, cobre(II) (1,10-fenantrolina) dicloro (0,31 mmol), previamente dissolvido em metanol, foi adicionado à solução. A mistura foi mantida em agitação por cerca de 24 horas. O volume de solvente foi reduzido usando-se um evaporador rotativo. O precipitado formado foi filtrado sob vácuo e lavado com álcool etílico e deixou-se o mesmo evaporar.

Os complexos CuNX, CPN e CBN foram obtidos por dissolução NX (0,31 mmol) em acetona (30 ml) com aquecimento e suave agitação. Deixou-se a solução alcançar a temperatura ambiente e foram adicionados (0,31 mmol) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ou $[\text{CuCl}_2(\text{piridina})_2]$ ou $[\text{CuCl}_2(\text{bipiridina})]$, todos previamente diluídos em acetona. A mistura foi deixada sob agitação a temperatura ambiente por 24 horas. Os precipitados foram filtrados e lavados com éter dietílico e secos em vácuo.

3.3

Modelos

3.3.1 Modelo de dois estados – Ligação a um único sítio

No presente caso, a equação de ligação a um único sítio (3.1), representa um modelo de dois estados (Bisswanger, 2002), no qual a norfloxacin ou está associada à micela ou livre em solução aquosa e, portanto, a equação deve ser modificada, pois segundo o modelo somente as micelas interagem, de maneira que devemos utilizar a concentração de micelas que é a concentração de surfactante menos a sua CMC:

$$\frac{1}{F - F_0} = \frac{1}{F_{\max} - F_0} \left(1 + \frac{1}{K_b ([S] - CMC)} \right) \quad (3.1)$$

F – Fluorescência num determinado comprimento de onda;

F₀ – Fluorescência na ausência do surfactante.

F_{max} – Fluorescência na incorporação completa da droga pelas micelas do detergente.

K_b – Constante de associação (binding) por surfactante na micela.

K_b = K_{mic}/N, cujo K_{mic} é a constante de associação à micela e N o número de agregação médio.

[S] é a concentração de surfactante.

3.3.2 Equação de Boltzmann – Modelo de cooperatividade.

O modelo sigmoidal de Boltzmann (Hait et al 2002, Ray et al, 2006. Reif, 1985) pressupõe um caráter de cooperatividade e é dado pela equação abaixo:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{(x - x_0)}{dx}}} + A_2 \quad (3.2)$$

A₁ e A₂ - Correspondem, respectivamente, as assíntotas superior e inferior

x – Concentração de surfactante.

x₀ – Ponto de inflexão da curva, tomado neste trabalho como a CMC.

dx –largura da sigmóide.