

7

Estudos espectroscópicos de derivado mentolado de ftalocianina (MentaZnPc) em diferentes meios

As ftalocianinas (Pc, da sigla em inglês) são fotossensibilizantes promissores para ser usados em Terapia Fotodinâmica (Garcia et al 2011; Nishiyama et al., 2009; Vior et al., 2011; Maree et al., 2002), mas devido a sua pouca solubilidade e tendência a agregação sua aplicação em tratamentos fotodinâmicos tem sido limitada. Nas últimas décadas, foram projetadas e sintetizadas novas moléculas com grupos hidrofílicos ligados ao centro da Pc, visando a melhoria das características do fotossensibilizante. De todas maneiras, as ftalocianinas solúveis têm apresentado alto grau de agregação (Spiller et al. 1998; Zhang et al., 2011; Ogunsiye et al., 2003; Maree et al., 2001; Seotsanyana-Mokhosi et al., 2001; Kasuga et al., 2002; Zorlu et al., 2010). Tem sido desenvolvido o uso de nanoportadores com dupla característica lipofílica-hidrofílica, que encapsulam as ftalocianinas (Garcia et al., 2011). Estes nanocarregadores são muito promissores como agentes de entrega de fármacos, contudo, poderiam induzir a agregação do fotossensibilizante e baixa eficiência na PDT (Nishiyama et al., 2009).

É conhecido na química das ftalocianinas que substituições periféricas volumosas podem ser usadas para evitar a agregação e para melhorar a solubilização em meio orgânico e aquoso (Vior et al., 2011; Zhang et al., 2010). Por exemplo, a ftalocianina lipofílica tetrakis-(1-adamantilsulfanil) ftalocianinato zinco(II) foi recentemente sintetizada e incorporada dentro de duas diferentes nanoemulsões, mostrando boa dispersão (Vior et al., 20011).

Por outro lado, foi publicado um estudo envolvendo o uso de derivados de mentol como aditivos na formulação para uso em tratamentos de PDT. Os grupos derivados de menta têm propriedades adequadas para funcionalizar as Pcs com o objetivo de reduzir sua agregação em soluções (Salvatella et al., 1998). Neste trabalho foi utilizada uma Pc contendo quatro grupos mentoxy como substituintes

nas posições β (MentaZnPc), sintetizada pelo grupo de Kleber Oliveira (UFSCar) (Fig. 7.1). Foi avaliado seu potencial de fotossensibilização em vários sistemas micelares.

A presença do grupo mentoxi na estrutura da ZnPc lhe atribui um componente solúvel em solventes orgânicos, principalmente os apróticos como hexano, acetato de etila, éter dietil, diclorometano, acetona, DMF, DMSO, mas o mesmo não acontece em água, metanol e etanol. Esta MentaZnPc foi incorporada dentro de micelas de diferentes surfactantes e sua dispersão foi avaliada. A atividade fotodinâmica foi estimada pela medição da eficiência quântica de oxigênio singleto usando DPBF como sonda de $^1\text{O}_2$. Foi avaliado também o fotobranqueamento dessa ftalocianina dentro de diferentes micelas.

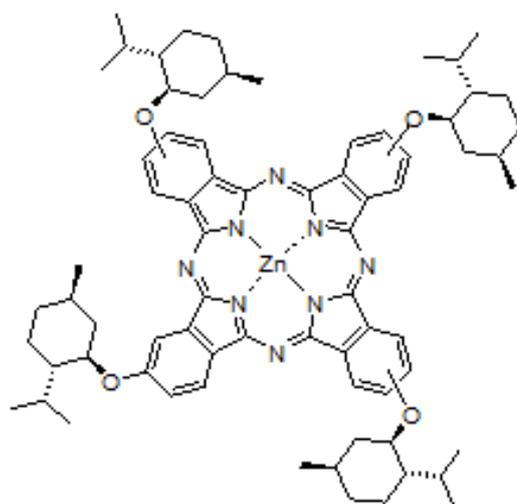


Figura 7.1. Estrutura da MentaZnPc

7.1

MentaZnPc em dimetilformamida (DMF) e acetato de etila (EtAc)

MentaZnPc apresentou uma rápida e eficiente solubilização em solventes apolares (clorofórmio, benzeno, e tolueno) e polares apróticos (THF, DMSO e DMF), onde se observou uma solução de cor azul esverdeada.

Foram tomados espectros de absorção de MentaZnPc em várias concentrações (Fig. 7.2). Em DMF, os picos característicos do espectro UV-Vis foram 284, 354, 616 e 684 nm. No caso de EtOAc, observa-se um pico extra em relação ao espectro em DMF (722 nm). Os picos característicos do espectro UV-

Vis foram 286, 350, 610, 680 e 722 nm. A Fig. 7.2 apresenta também o espectro da lâmpada usada nos estudos de fotossensibilização.

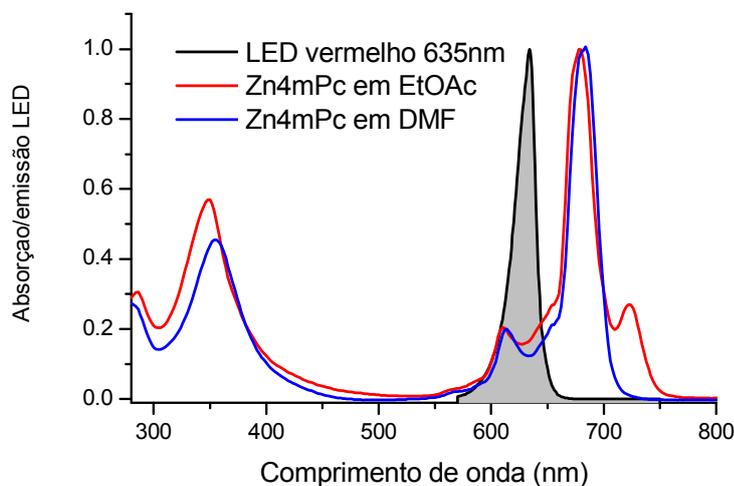


Figura 7.2. Espectros normalizados de absorção UV-Vis de MentaZnPc ($6,6 \mu\text{M}$) em DMF (azul) e em EtOAc (vermelho). Em preto, emissão da lâmpada vermelha, de LEDs.

Os espectros de absorção das soluções MentaZnPc em DMF e em EtOAc são típicos de espécies monoméricas. A banda de 684 nm, no caso do DMF, e 680 nm, no EtOAc, são bandas devido a monômeros. Em EtOAc (Fig. 7.2), o espectro apresenta uma banda extra em 722 nm, que será discutida abaixo. A banda de 722 nm foi observada claramente só na solução em EtOAc. Foram testados solventes apolares (clorofórmio, benzeno, e tolueno) e polares apróticos (THF, DMSO e DMF) onde foi observado um espectro típico de monômero, mas não se encontrou a presença desta banda.

Observou-se que a absorbância é proporcional à concentração (Lei de Beer-Lambert) nas soluções de MentaZnPc em DMF (Fig. 7.3). Foram encontrados os coeficiente absorção molar e comparados com os de ZnPc também em DMF (Tabela 7.1). Em EtOAc a proporção do pico em 722 nm varia com a concentração.

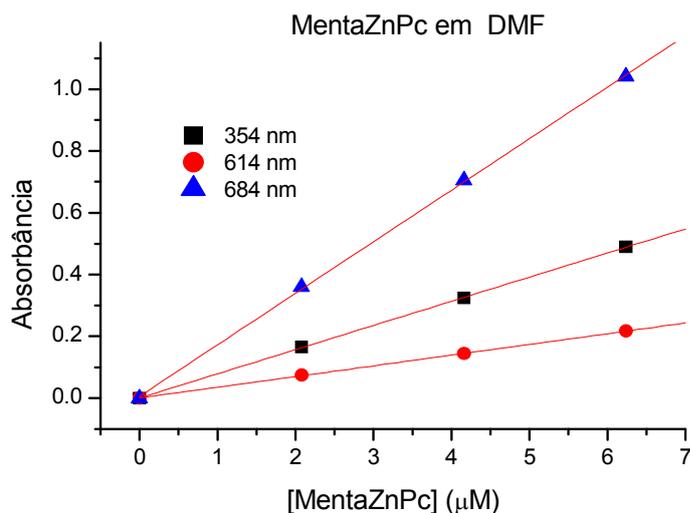


Figura 7.3. Gráficos da absorvância em função da concentração de MentaZnPc em DMF. Os coeficientes de absorção ($M^{-1} cm^{-1}$) foram calculados a partir dos coeficientes angulares das retas ajustadas.

Tabela 7.1. Coeficientes de absorção molar de MentaZnPc e ZnPc, para comparação, em DMF. * Zorlu Y. et al (2010). ^acalculado do espectro, usando o coeficiente em 670 nm*.

DMF	$\lambda / nm (\epsilon / M^{-1}cm^{-1})$	$\lambda / nm (\epsilon / M^{-1}cm^{-1})$	$\lambda / nm (\epsilon / M^{-1}cm^{-1})$
Menta ZnPc	354 (0.78×10^5)	614 (0.35×10^5)	684 (1.67×10^5)
ZnPc	340 (0.66×10^5) ^a	604 (0.39×10^5) ^a	670 (2.34×10^5) [*]

Nota-se que os coeficientes de absorção molar são semelhantes nos dois solventes, demonstrando características monoméricas das moléculas de MentaZnPc.

Existem vários trabalhos que relatam a presença de uma banda semelhante à banda de 722 nm obtida em EtOAc. Kasuga et al. (2002) observou uma banda similar, que denominaram banda X, em complexos de ZnPc. Esta banda foi observada na presença de solventes não polares, ou menos polares, tais como benzeno e clorofórmio, mas não em solventes polares como o DMF, acetona e DMSO. Maclean et al. (1996) observaram a banda X em porfirinas tetrafenílicas e associaram a desvios da planaridade. O aparecimento dessa banda X foi observado em Pc com oito grupos fenila nas posições periféricas dos anéis da ftalocianina, resultando na alta distorção do anel (Kobayashi et al., 2001).

A formação de dímeros com arranjo cofacial deslocado produz um deslocamento para comprimentos de onda mais longos (Yoon et al., 1993; Kobuke et al., 1994). Tem-se observado a formação de agregados tipo J de derivados de Pc (Fitzgerald et al., 2002; Kameyama et al., 2005) onde se observa a formação de novos picos em comprimentos de onda longos. Yang et al. (2010) observaram a formação de agregados tipo J de ZnPc(α OPh), formados espontaneamente em CHCl₃. Esta formação apresentava um deslocamento ao vermelho de 50 nm em relação à banda do monômero.

MentaZnPc em EtOAc apresenta o pico de 722 nm do espectro de absorção deslocado de 42 nm ao vermelho, em relação ao monômero, sugerindo que a MentaZnPc em EtAc apresenta-se parcialmente dimerizada, num arranjo cofacial deslocado, onde o oxigênio do mentoxi de uma molécula de MentaZnPc formaria uma ponte com o íon Zn(II) da outra molécula semelhante.

Aumentando-se a concentração de MentaZnPc em EtOAc, observou-se que a relação entre a absorbância da banda de dímero A_d (722 nm) e a da banda de monômero A_m (680 nm), A_d/A_m, diminui com o aumento da concentração de MentaZnPc. Este fato, porém, não respalda a formação de dímeros, já que se esperaria que essa aumentasse com o incremento da concentração, a não ser que esses dímeros passassem a agregados de ordem superior, com bandas muito alargadas de baixa intensidade.

A banda denominada X, na região do vermelho, semelhante à banda de 722 nm, foi encontrada em vários estudos (Kuninobu et al., 2002; Ogunsipe et al., 2003) onde substituintes periféricos produzem uma distorção no anel central da metaloPc. Essa banda tem sido associada à distorção no anel da Pc, devido à perda da simetria da molécula provocada pela presença de um ligante axial do solvente ou dos substituintes periféricos. No entanto o DMF, que é capaz de se coordenar com o Zn²⁺ (Ribeiro, 2003; Zhang et al., 2010) não provoca aparecimento da banda X.

Eficiência quântica de fluorescência Φ_f

Foram obtidos os espectros de excitação e emissão de fluorescência (excitação em 610 nm) das soluções MentaZnPc em DMF e EtOAc (Fig. 7.4). No caso da solução em DMF (Fig. 7.4 a) são observadas duas bandas em 697 e

765 nm no espectro de emissão. O espectro de excitação é semelhante ao espectro de absorção, sugerindo a presença de uma só espécie fluorescente, ou seja, o monômero. O espectro de emissão em DMF é típico de um monômero de MPc (Zhang et al. 2010) e exibe uma simetria de espelho em relação a seu espectro de excitação.

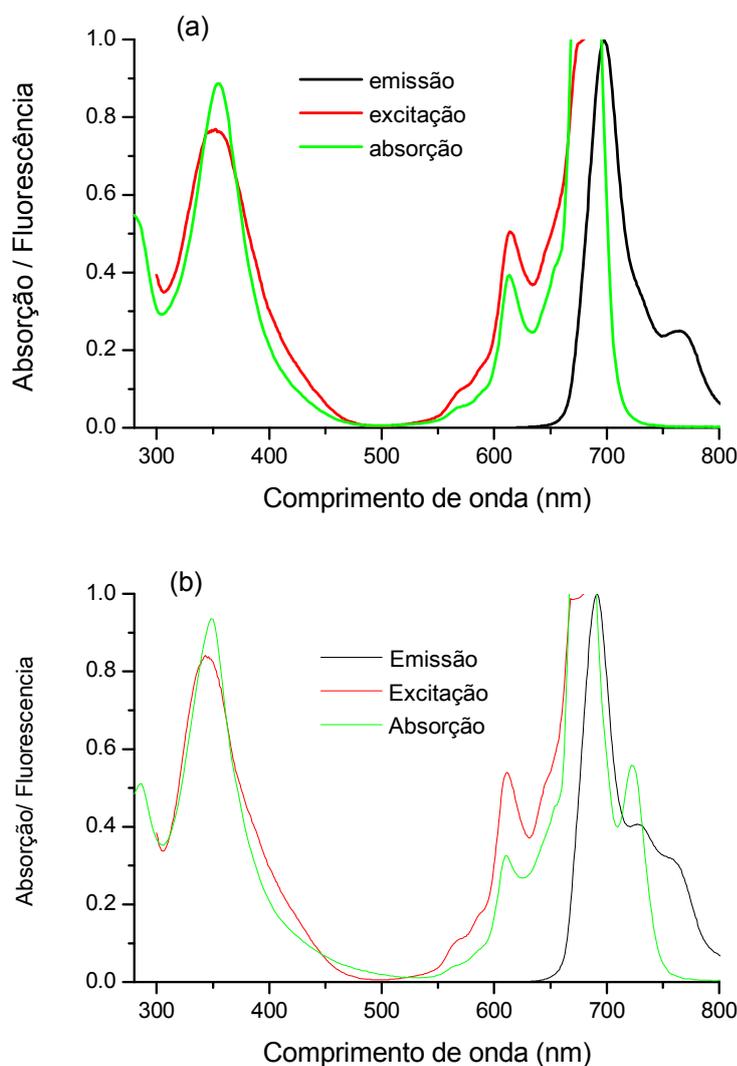


Figura 7.4. Espectros de emissão e excitação de fluorescência e de absorção das soluções de MentaZnPc (A) em DMF e (B) em EtOAc. Exc. 610nm, em. 684nm.

No espectro de emissão em EtOAc (Fig 7.4 b) são observadas três bandas em 691, 727 e 759 nm. Fixando-se a emissão em 684 nm, o espectro de excitação foi semelhante ao de absorção, já que nesse comprimento de onda predomina a emissão da espécie monomérica.

Foram obtidos também espectros de emissão, com excitação em 722, 680 e 690 nm para investigar a origem da banda de absorção 722 nm. Na Fig. 7.5 (a) observa-se que, com excitação em 722 nm, o espectro apresenta apenas um pico em 732 nm. Já o espectro com excitação em 680 nm apresenta picos em 690 e 732 nm e um ombro em 760 nm. Excitando-se em 690 nm nota-se um aumento do pico de 732 nm em relação aos outros. Esses resultados sugerem, então, que em EtOAc a MentaZnPc apresenta-se em duas formas fluorescentes: uma monomérica, igual à que aparece nos outros solventes e outra que poderia ser dimérica.

Foram obtidos também os espectros de excitação, com emissão em 700 e 732 nm (Fig. 7.5 b). A diferença entre eles corrobora a existência de duas espécies fluorescentes. Enquanto a emissão em 700 nm é devida preferencialmente ao espectro de monômeros, a emissão em 732 nm privilegia a espécie supostamente dimérica.

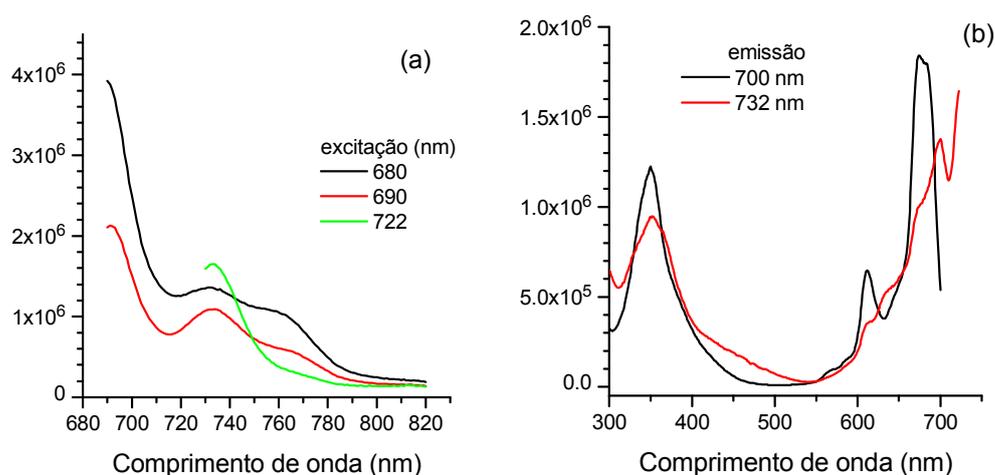


Figura 7.5. Espectros de emissão (a) e excitação (b) da fluorescência da solução MentaZnPc em EtOAc. MentaZnPc 3,0 μ M .

Foram calculadas as Φ_f de MentaZnPc em DMF e EtOAc 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 de EtOAc 1,37; a Φ_f do padrão (ZnPc em DMF) é de 0,18 (Maree et al. 2002). As relações entre as áreas debaixo das curvas de emissão foram 1,5 ($F_{\text{EtOAc}}/F_{\text{Padrão}}$) e 1,84 ($F_{\text{DMF}}/F_{\text{Padrão}}$) e as absorbâncias no comprimento de onda de excitação (610 nm) foram: 0,0381 (padrão), 0,0826 (EtOAc) e 0,0847 (DMF).

Na Tabela 7.2, podem ser observados os baixos valores da Φ_f de MentaZnPc em DMF e EtOAc, em relação à ZnPc em DMF. Isso quer dizer que os 4 grupos mentoxi localizados nos anéis laterais da ZnPc provocam uma redução da Φ_f . Esta diminuição é observada em Pcs com substituintes periféricos nos anéis laterais e é esperado também um efeito tanto na eficiência quântica quanto no tempo de vida do estado tripleto (Ogunsipe, Chen et al. 2004).

Avaliação fotodinâmica

O processo de fotodegradação está explicado na Seção 4.2. Resumidamente, foi utilizada como padrão ZnPc em DMF e foram avaliadas as soluções de MentaZnPc em DMF e EtOAc, utilizando DPBF como sonda de oxigênio singleto (ao redor de $15\mu\text{M}$) com $\varepsilon_{417\text{nm}}=2,3\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A fotoirradiação foi feita com uma lâmpada vermelha de 20 LEDs (pico em 635 nm) de $7,5 \text{ mW/cm}^2$ ($1,5 \text{ mW}/0,2 \text{ cm}^2$) de intensidade na posição da amostra. As amostras foram irradiadas em períodos subsequentes de 30 s ou 1 min, por tempos em torno de 15 minutos. Foram obtidos os espectros de absorção das soluções em função do tempo de irradiação (por exemplo, Fig 7.6 a e b). As medidas foram feitas em triplicata e os resultados de decaimento aparecem na Fig. 7.6 c.

Pode-se observar que, no caso da solução MentaZnPc em EtOAc, o decaimento do pico de 418 nm, próprio de DPBF, é muito mais abrupto do que na solução em DMF. Foram obtidas as taxas de fotoxidação de DPBF (k_p) (a partir dos dados da Fig. 7.5 c), mediante utilização de um ajuste exponencial dado pela equação ($A = A_f + A_0 \exp(-k_p t)$), sendo A_f a absorbância de ZnPc, que permanece constante no tempo, já que o fotobranqueamento de DPBF é muito mais rápido.

No caso da solução em EtOAc, observa-se que o pico em 722 nm diminui e o pico de monômeros (682 nm) aumenta logo após a adição de DPBF (Fig. 8.6 b, espectros preto e vermelho), o que indica interação preferencial com o DPBF, desfazendo a interação axial íon Zn^{2+} central, diminuindo a presença do dímero. Esta interação preferencial de DPBF com a MentaZnPc explica também a rápida fotoxidação do DPBF, devido à proximidade com o local de geração de $^1\text{O}_2$.

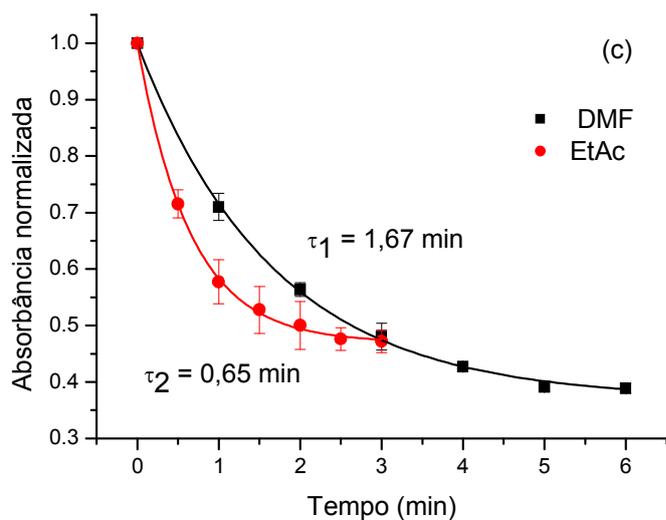
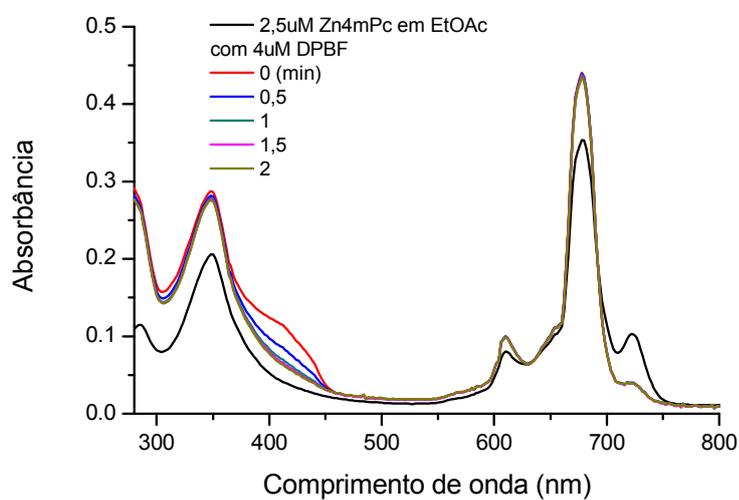
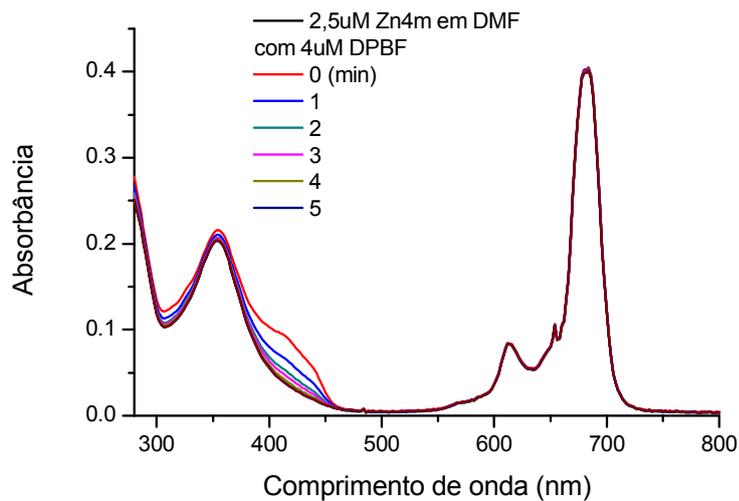


Figura 7.6. Fotoxidação de DPBF na presença de MentaZnPc nas soluções em (a) DMF.e em (b) EtOAc. 2,5 µM MentaZnPc. 4µM DPBF. (c) Decaimento da banda de 418 nm do DPBF em DMF e EtOAc (3 medições diferentes). As linhas contínuas são ajustes monoexponenciais.

Tabela 7.2. Taxa de fotoxidação k_f de DPBF, eficiência quântica de fluorescência Φ_f , eficiência quântica de oxigênio singleto Φ_Δ , eficiência quântica de fotobranqueamento tanto da ZnPc Φ_p ZnPc (referência da Tabela 1: 1 Maree et al. 2002)

	k_p (min^{-1})	Φ_f ($\pm 0,01$)	Φ_Δ	Φ_p MentaZnPc (10^{-5})
ZnPc DMF	0,85	0,18 ¹	0,56	0,92
MentaZnPc DMF	0,60	0,12	0,50	1,9
MentaZnPc EtOAc	1,54	0,14	1,23	2,9

Eficiência quântica de produção de oxigênio singleto Φ_Δ

A Φ_Δ é uma medida da capacidade do fotossensibilizante para gerar oxigênio singleto. A obtenção de Φ_Δ foi descrita na seção 4.2.3 e está dada pela Eq. 4.11, onde ZnPc em DMF foi tomado como padrão, $\Phi_\Delta^{std} = 0,56$ (Spiller et al., 1998), k_p e k_p^{std} aparecem na Tabela 7.2. I^{std} e I são as intensidades de radiação absorvida por ZnPc e por MentaZnPc, respectivamente, em $\lambda=635$ nm. Os valores das relações $I^{std}/I = 1,71$ e $1,70$ (Eq. 4.12), respectivamente para MentaZnPc em DMF e EtOAc, foram calculados a partir das absorbâncias em 635 nm (0,048 e 0,049, respectivamente) e do padrão (0,086).

Os valores encontrados de Φ_Δ encontram-se na Tabela 7.2. No caso da solução de MentaZnPc em DMF (0,70), tem-se Φ_Δ maior que a do padrão, ZnPc em DMF (0,56). Já no caso de MentaZnPc em EtOAc, o rendimento quântico calculado pelo método comparativo foi maior que 1. Isso foi, provavelmente, devido à interação preferencial entre a sonda DPBF e o anel de MentaZnPc, em EtOAc, indicando que, nesse caso, o método comparativo para obtenção de Φ_Δ , não foi adequado. Mas é claro que esta interação preferencial detectada em EtOAc aumenta o número de moléculas de oxigênio singleto que fotoxida o DPBF em um valor duas vezes maior do que em DMF. Isto pode ser observado nos valores das constantes de decaimento k_p (Tabela 7.2).

Eficiência quântica de fotobranqueamento de MentaZnPc (Φ_p)

A eficiência quântica de fotobranqueamento de MentaZnPc, Φ_p , permite medir a fotoestabilidade da molécula através da redução na intensidade da absorção do pico de MentaZnPc, sem que apareçam novos picos na fotoirradiação. O procedimento para a obtenção da Φ_p é descrito na Seção 4.2.3 mediante a equação 4.17, onde C_o e C_t em mol L⁻¹ representam as concentrações antes e depois da irradiação. Para o cálculo das concentrações, foram usados os seguintes coeficientes de absorção para a MentaZnPc: $\epsilon_{DMF}=7,4\times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ e $\epsilon_{EtOAc}=8,1\times 10^4$ M⁻¹cm⁻¹ no pico (684 e 680 nm, respectivamente). Os tempos de irradiação foram 180 s e 90 s e as absorbâncias no comprimento de onda de irradiação (635 nm) foram 0,106 e 0,105 para DMF e EtOAc, respectivamente. A área de irradiação foi $3,84\times 10^{-4}$ cm², a intensidade da lâmpada na posição da amostra foi de 75 W m⁻².

Na Tabela 7.2, observa-se que Φ_p de MentaZnPc, que contém anéis periféricos mentoxi, é maior que de ZnPc em DMF. Isto está de acordo com o encontrado por Maree et al. (2001), que observaram que moléculas de ftalocianina contendo bio substituintes nas posições periféricas são mais facilmente degradadas, comparadas com outros complexos de MPc. O cálculo de Φ_p também mostrou um maior fotobranqueamento em EtOAc do que em DMF.

7.2

MentaZnPc em diferentes soluções micelares

Foram utilizadas soluções micelares 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) e diluídas em 3 ml de PB pH 7,4 (concentração final dos surfactantes, 4 mg ml⁻¹ e de MentaZnPc 15 µM).

Foram obtidos espectros de absorção (Fig. 7.7) de MentaZnPc em soluções de diferentes micelas preparadas como descrito em “Materiais e Métodos”. Não foram observadas mudanças nos espectros em função do tempo.

Observando os espectros das soluções de MentaZnPc em micelas iônicas (Fig. 7.7 a) nota-se a presença de duas bandas na região 3, em 690 e 708 nm, e uma banda em 636 nm aparece na região 2. Na presença de surfactantes não iônicos o pico do monômero de MentaZnPc na região 3 encontra-se em ao redor de 684 nm; A Fig. 7.7 b, mostra o espectro com diferentes frações de agregação (banda de 636 nm na região 2), e a Figura 7.7 c mostra o espectro característico do monômero, com um pico ao redor de 615 nm e um mínimo local a 636 nm na região 2.

Observa-se que a banda principal do monômero (banda 3 em 684 nm) do espectro de absorção da MentaZnPc em DMF dividiu-se em duas bandas na presença dos surfactantes iônicos SDS, CTAB e HPS (Fig. 7.8 a).

A Tabela 7.3 apresenta os comprimentos de onda e coeficientes de absorção molar das regiões 1, 2 e 3, obtidos a partir dos espectros da Figura 7.8. A tabela 7.3 também apresenta a razão entre o pico na região 3 e a absorbância a 636nm, A_{\max}/A_{636} . Esta razão é uma medição da quantidade relativa dos monômeros com respeito aos agregados. É importante observar que o espectro de absorção mostrado pela MentaZnPc na presença das micelas de Brij 97 e PF--127 mostram um incremento da fração de monômeros quando foram medidos três dias depois.

A Tabela 7.3 mostra que a MentaZnPc exibe um forte hipocromismo na presença de micelas em relação à solução em DMF. A razão A_{\max}/A_{636} pode ser vista como uma medida da fração de monômeros em relação aos agregados no complexo. Em micelas de Brji 30, 35 e 98 e PF-127, depois de alcançar o equilíbrio, as moléculas da ftalocianina encontra-se principalmente monomérica, enquanto que em todos os outros surfactantes testados a contribuição de agregados ao espectro de absorbância, é significativa. É importante mencionar que a relação A_{\max}/A_{636} também depende da concentração de surfactante.

A Fig. 7.8 mostra o espectro característico de agregados (azul), obtido por subtração de espectros de mistura (preto) e do espectro de monômeros (vermelho).

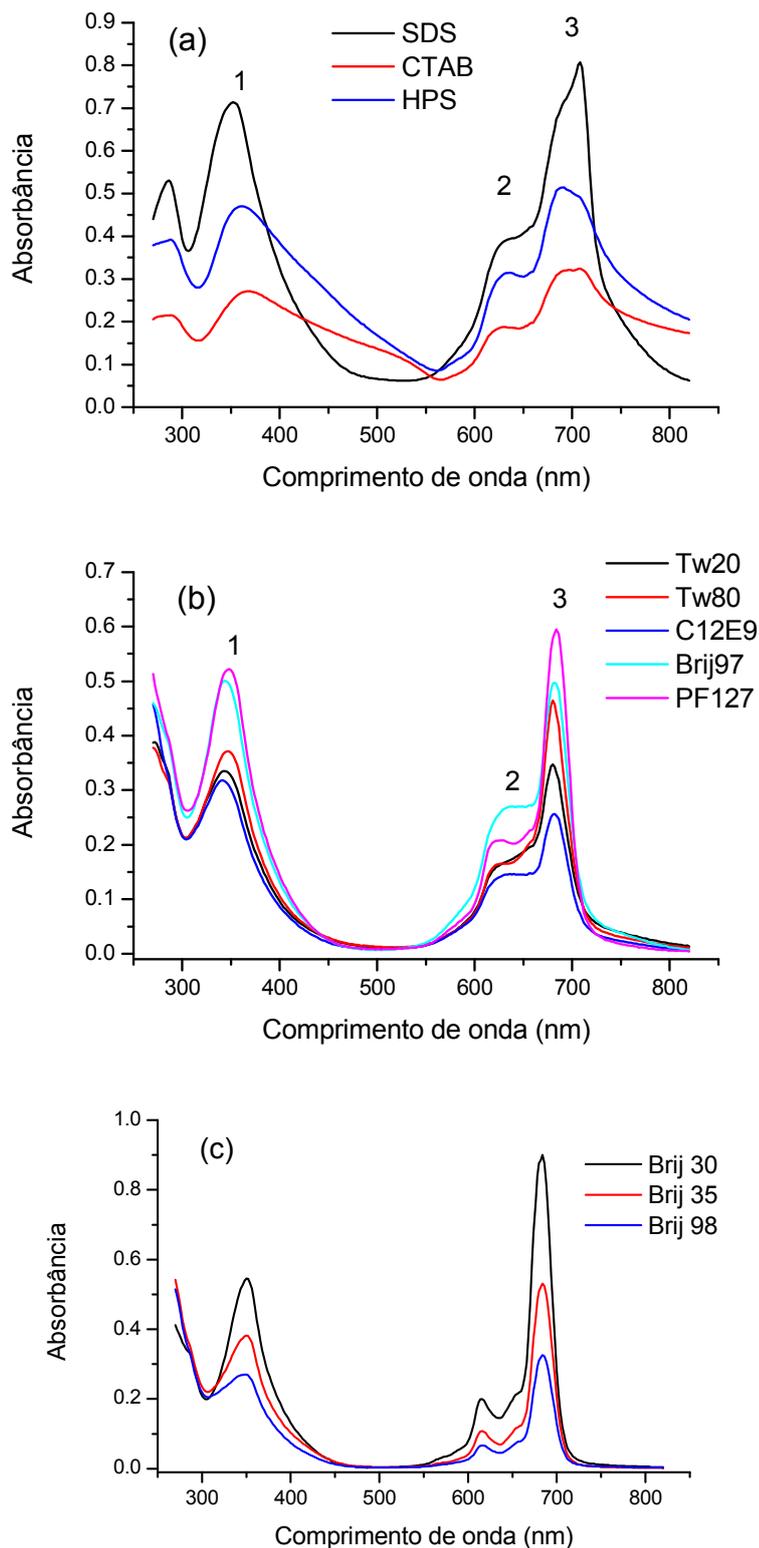


Figura 7.7. Espectros de absorção da MentaZnPc em diferentes micelas (a) surfactantes iônicos SDS, CTAB e HPS; (b) Tween 20, Tween 80, C12E9, Brij 97 e PF-127; (c) Brij 30, Brij 35 e Brij 98. [MentaZnPc] = 15 μM ; concentração dos surfactantes 4 mg ml^{-1} em solução PB pH 7,4 (10 mM). MentaZnPc foi adicionada a partir de solução estoque em DMF. Concentração final de DMF nas amostras 1.5% v:v

Tabela 7.3. Coeficiente de absorção molar da MentaZnPc em DMF e em diferentes micelas, obtidas dos dados da Figura 7.9. O valor A_{\max}/A_{636} é a taxa da região 3 e a absorbância em 636 nm. * medidos depois de três dias.

MentaZnPc	1	2	3	A_{\max}/A_{636}
	λ / nm ($\epsilon / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ / nm ($\epsilon / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	λ / nm ($\epsilon / 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	
DMF	354 (7.8)	614 (3.5)	684 (16.7)	8.2
SDS	352 (4.8)	636 (2.6)	708 (5.4)	2.1
CTAB	368 (1.8)	630 (1.2)	692 (2.1)	1.7
HPS	362 (3.1)	636 (2.1)	690 (3.4)	1.6
Tween 20	343 (2.2)	636 (1.1)	680 (2.3)	2.1
Tween 80	348 (2.5)	636 (1.1)	680 (3.1)	2.8
C12E9	341 (2.1)	636 (0.97)	681 (1.7)	1.8
Brij97	344 (3.3)	636 (1.8)	682 (3.3)	1.9-2.5*
PF-127	348 (3.5)	636 (1.4)	684 (4.0)	2.9-5.3*
Brij 30	350 (3.6)	615 (1.3)	684 (6.0)	6.2
Brij35	350 (3.5)	617 (0.72)	684 (3.5)	7.5
Brij 98	350 (1.8)	617 (0.44)	684 (2.2)	7.2

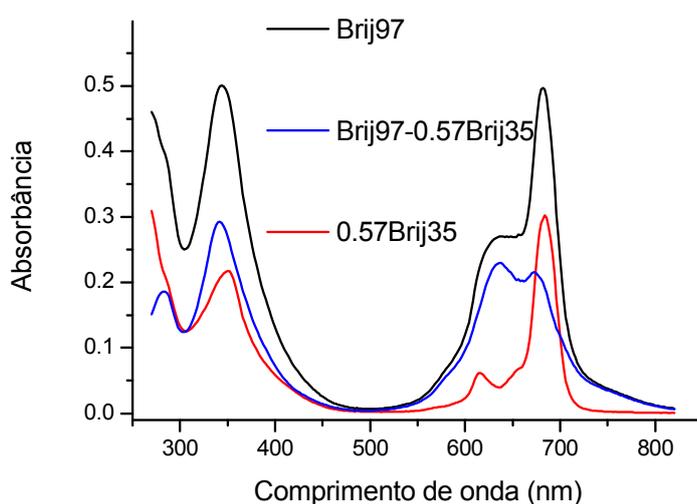


Figura 7.8. Espectro de absorção de MentaZnPc em Brij 97 (preto) com contribuição de monômeros e agregados. Subtração da contribuição de monômeros, obtida do espectro em Brij97 (vermelho). O resultado (azul) é o espectro de agregados, com picos em 340nm e 636nm. Aparece também um pico a 674nm

A Fig. 7.9 mostra o espectro de excitação e emissão de fluorescência da MentaZnPc em $C_{12}E_9$. Este mesmo espectro foi observado na presença dos outros surfactantes. Observa-se que, mesmo quando aparecem agregados, a fluorescência é devida apenas a monômeros. Os agregados não são fluorescentes e a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de monômeros.

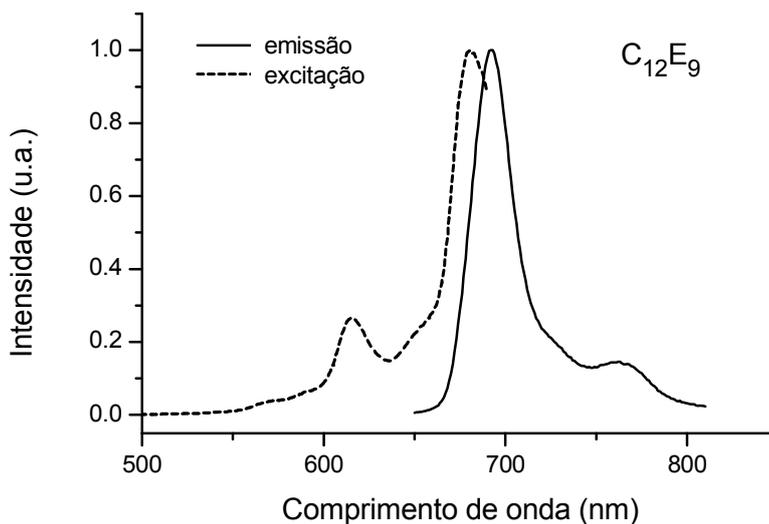


Figure 7.9. Espectros de emissão (sólido) e excitação (pontilhado) de MentaZnPc em micelas de $C_{12}E_9$. λ_{exc} = 610 nm e λ_{em} = 697 nm.

Nas soluções de MentaZnPc na presença dos surfactantes iônicos SDS, CTAB, HPS foi observado um deslocamento ao vermelho da banda 3 do espectro de absorção (Tabela 7.3) com relação ao espectro obtido de MentaZnPc em DMF. Na presença dos surfactantes não iônicos Tween 20, Tween 80, $C_{12}E_9$, Brij 97 foi observado um leve deslocamento ao azul da banda 3. Nos surfactantes Brij 30, Brij 35 e Brij 98, onde os espectros de absorção são próprios de monômero, não houve deslocamento da banda 3 em relação a DMF, mas o espectro de emissão de fluorescência teve um deslocamento ao azul (de 697 nm em DMF para 695 nm em Brij 30, Brij 35 e Brij 98). Nos espectros de emissão na presença dos outros surfactantes, teve-se também um deslocamento ao azul. Em geral, um deslocamento ao azul está relacionado à incorporação em meios menos polares.

O fato de o espectro de absorção das soluções de MentaZnPc em micelas não apresentar mudança em função do tempo indica que as moléculas de MentaZnPc, no interior da micela, se mantêm monoméricas, no caso dos surfactantes Brij 30, Brij 35 e Brij 98, ou parcialmente monoméricas, no caso dos

demais surfactantes (ver relação A_{\max}/A_{636}). Isto sugere que, ao contrário do que ocorre com ZnPc, as cadeias hidrofóbicas do surfactante são capazes de manter as moléculas de MentaZnPc desagregadas, mesmo após o solvente DMF se difundir para o meio aquoso.

7.3

Atividade Fotodinâmica

O processo de fotodegradação está explicado na Seção 4.2. Resumidamente, ZnPc em DMF foi utilizada como padrão e MentaZnPc foi avaliada nas soluções micelares dos surfactantes em tampão pH 7,4. DPBF (16 μM) foi usado como sonda de oxigênio singlete, com $\epsilon_{417\text{nm}} = 2,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A fotoirradiação foi feita com uma lâmpada de 24 LEDs (620-640 nm), sendo a intensidade na posição da amostra igual a $7,5 \text{ mW cm}^{-2}$.

Foram tomados espectros de absorção das soluções micelares de MentaZnPc (Fig. 7.10 a-k), onde é evidente a evolução temporal do espectro em DMF (Fig. 7.10 a) e nas diferentes micelas (Fig. 7.10 b-k). Pode-se observar que, durante a fotoirradiação, além do decaimento da banda de 418 nm pertencente a DPBF, as bandas de MentaZnPc também decaem, indicando fotodegradação da própria ftalocianina mesmo em presença de DPBF, o que não aconteceu nos solventes DMF e EtOAc. O decaimento da banda de DPBF (Fig. 7.11) foi ajustado a uma função monoexponencial $A = A_0 \exp(-t/\tau)$ (para o Brij 30 unicamente foram usados os quatro primeiros pontos) utilizada para obter a taxa de fotoxidação k_p , que depende do surfactante utilizado. A Tabela 7.4 apresenta a constante de tempo τ e a taxa de fotoxidação ($k_p=1/\tau$) de DPBF e a taxa de fotobranqueamento, k , para MentaZnPc.

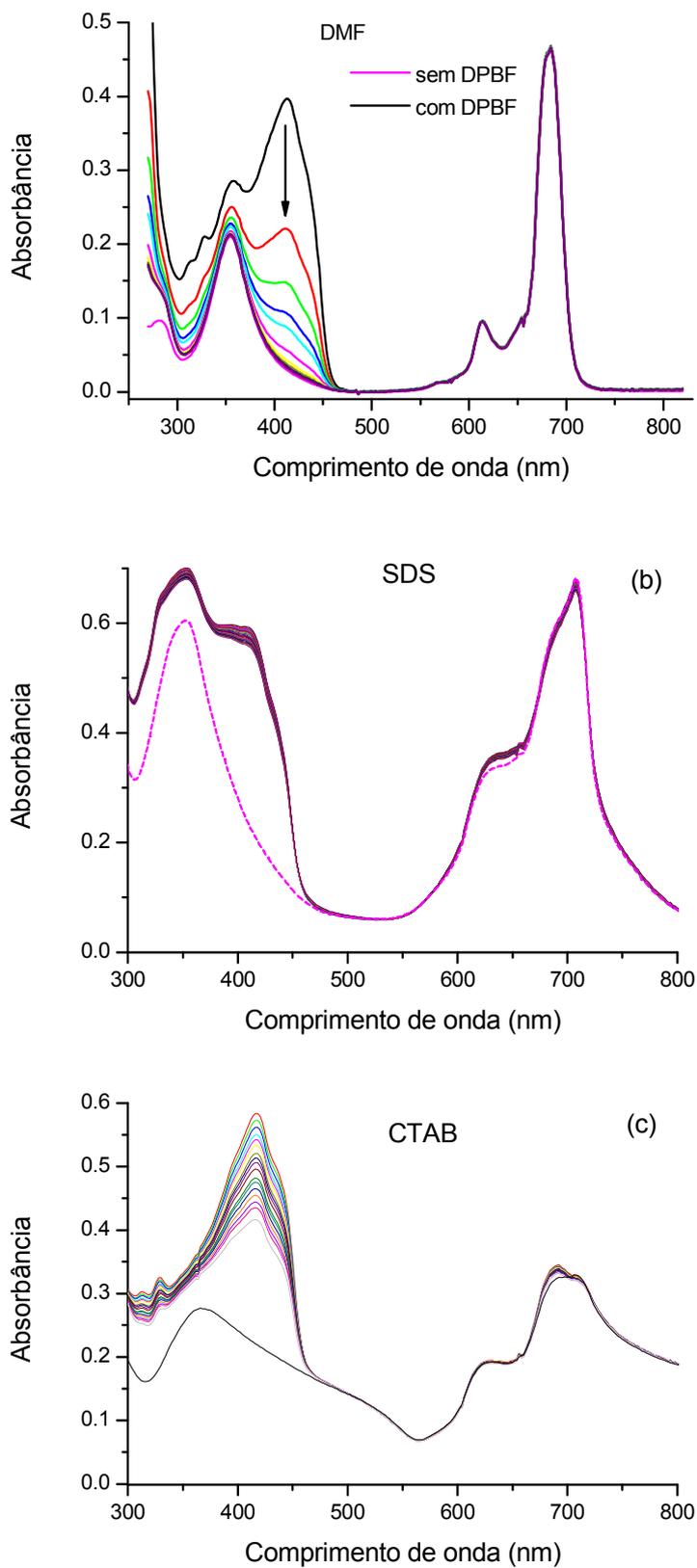


Figure 7.10 (a, b, c). Fotoxidação do DPBF pela irradiação com LEDs na presença de MentaZnPc em (a) DMF, (b) SDS e (c) CTAB. [DPBF] $\sim 20\mu\text{M}$.

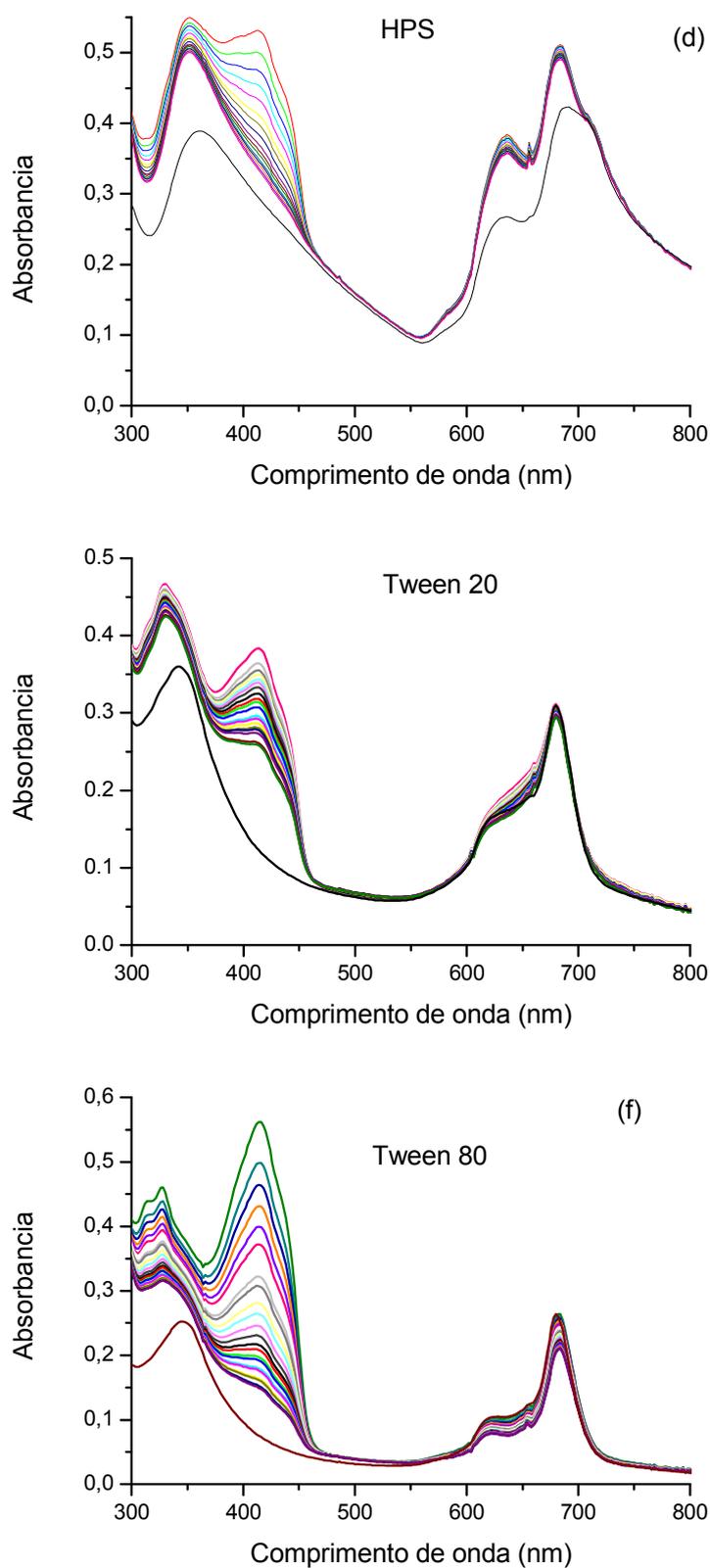


Figure 7.11 (d, e, f). Fotooxidação do DPBF pela irradiação com LEDs na presença de MentaZnPc em (d) HPS, (e) Tween 20, e (f) Tween 80. [DPBF] $\sim 20\mu\text{M}$.

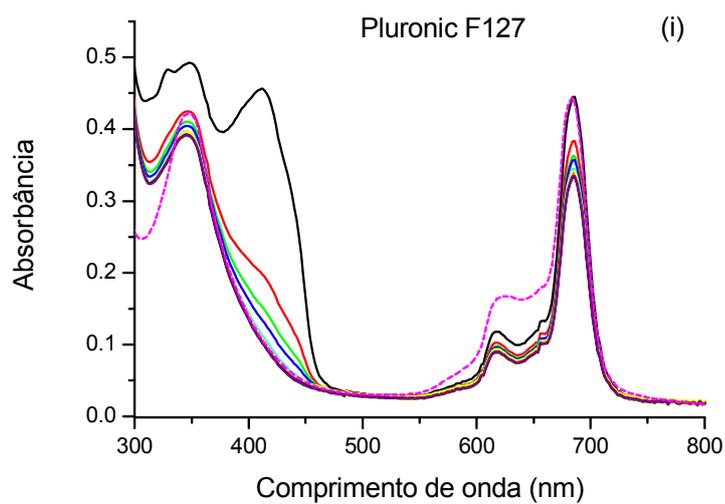
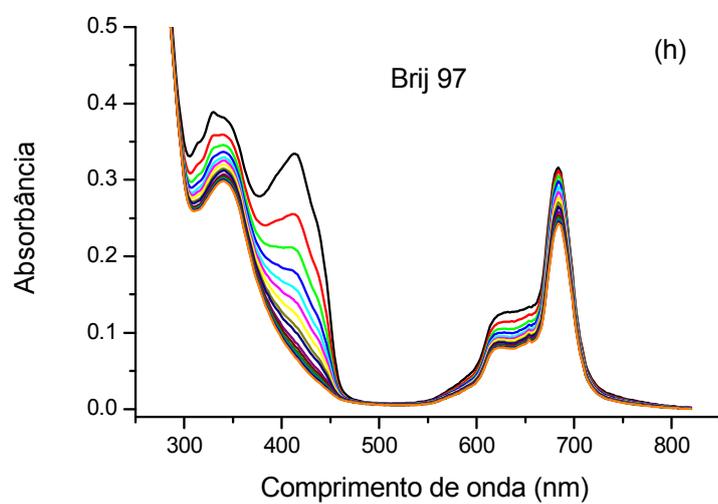
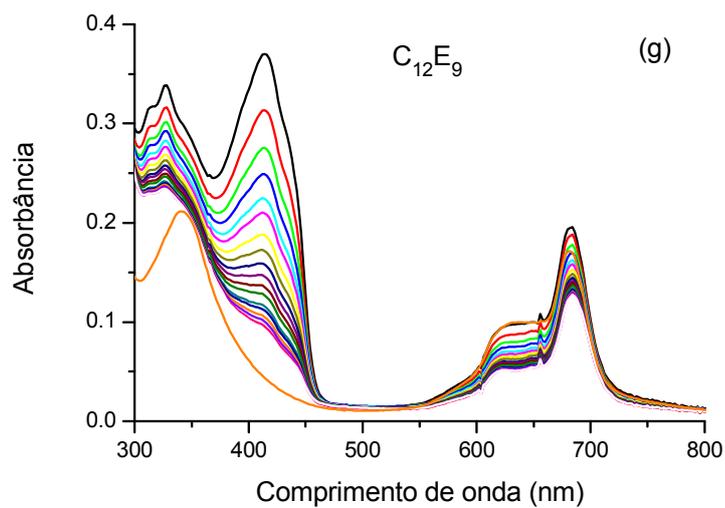


Figure 7.12 (g, h, i). Fotoxidação do DPBF pela irradiação com LEDs na presença de MentaZnPc em (g) $C_{12}E_9$, (h) Brij 97, (i) Pluronic F-127. [DPBF] $\sim 20\mu\text{M}$.

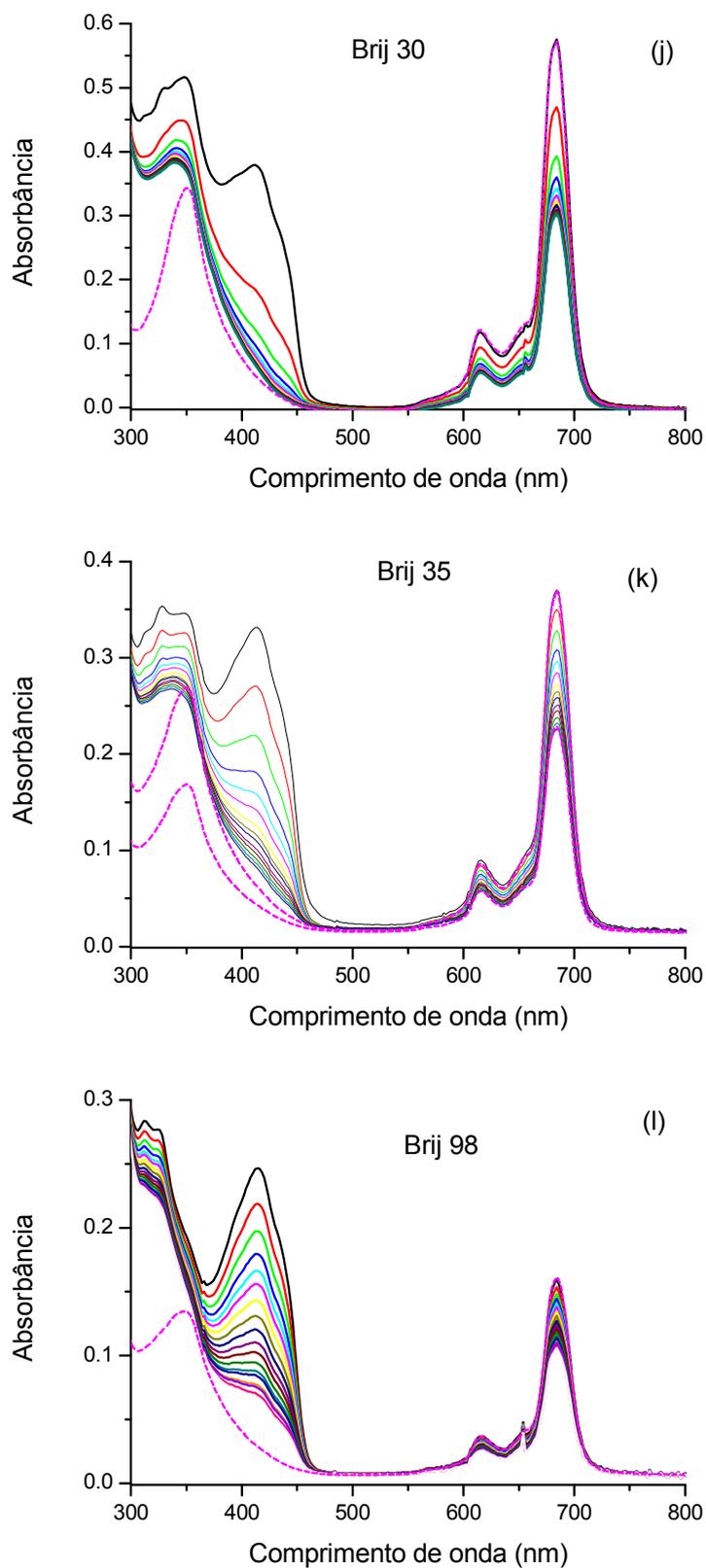


Figure 7.13 (j, k, l). Fotoxidação do DPBF pela irradiação com LEDs na presença de MentaZnPc em (j) Brij 30, (k) Brij 35 e (l) Brij 98. [DPBF] $\sim 20\mu\text{M}$.

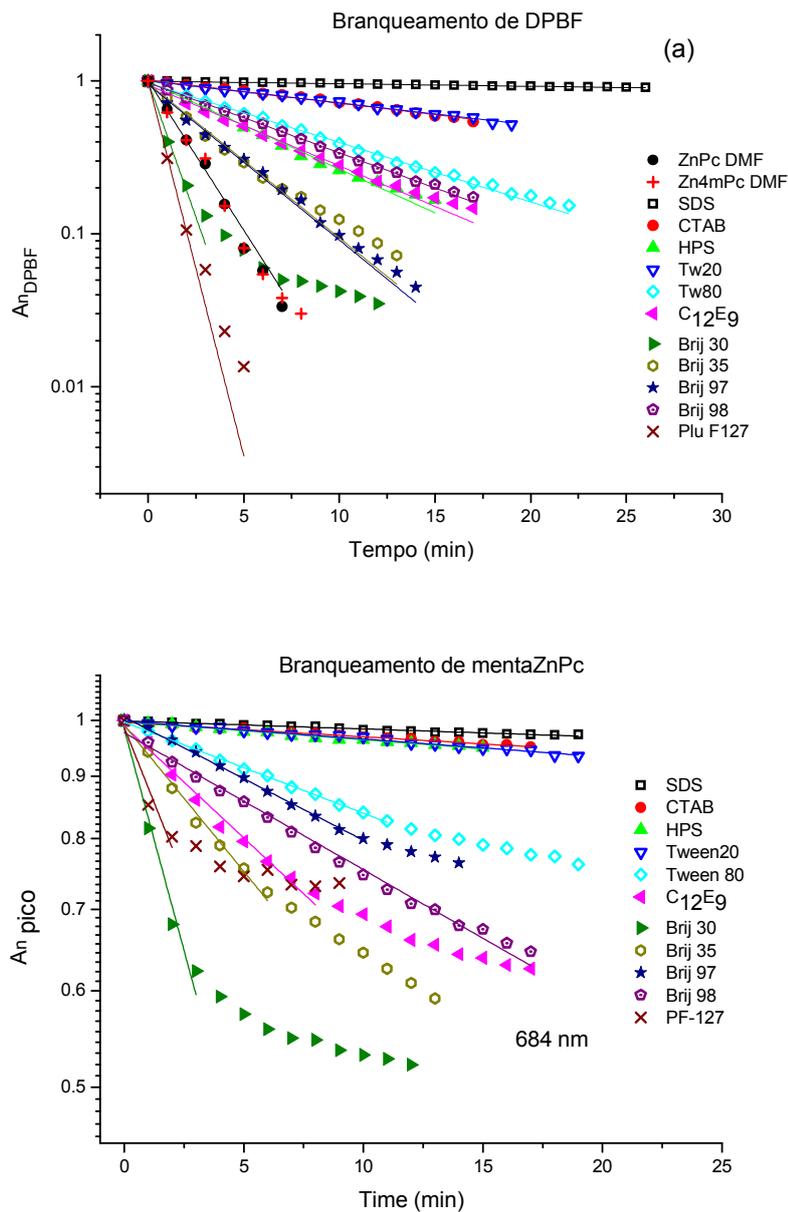


Figure 7.14. Absorbância normalizada das soluções de MentaZnPc contendo DPBF, em DMF e em diferentes soluções micelares (ver legenda), em função do tempo de irradiação. (a) Absorbância no pico de DPBF (418 nm) (b) Absorbância no pico de MentaZnPc (708 nm para SDS, 690 nm para CTAB e 684 nm para os restantes). O intervalo de tempo entre os espectros foi de 1 min.

Eficiência quântica de oxigênio singlete Φ_{Δ}

A eficiência de formação de oxigênio singlete é, provavelmente, o indicador mais importante para um fotossensibilizante a ser aplicado em PDT (Zhang et al. 2010).

Na Tabela 7.4 encontram-se os valores de Φ_{Δ} para MentaZnPc em diferentes micelas. A obtenção de Φ_{Δ} foi descrita na seção 4.2 e está dada pela Equação 4.11, utilizando como padrão ZnPc em DMF, $\Phi_{\Delta}^{std} = 0,56$ (Spiller et al., 1998). Os valores para a intensidade de radiação absorvida para ZnPc em DMF e MentaZnPc em surfactante foram calculados a partir das absorbâncias em 636 nm.

No caso de MentaZnPc em DMF, Φ_{Δ} (0,51) foi similar ao valor do padrão utilizado (0,56). A Φ_{Δ} na presença de micelas iônicas foi muito baixa, especialmente no surfactante iônico SDS, onde aparentemente não se observa a produção de 1O_2 . Entre os surfactantes não iônicos, em Tween 20 observa-se o menor valor de Φ_{Δ} . Entre os polioxietilenos, o Brij 30 tem o maior valor de Φ_{Δ} , mas é importante mencionar que seu ponto de nuvem (temperatura na qual a mistura começa a se separar em duas fases tornando-se nublado) é muito baixo (2 a 7°C), e que a amostra ficou turva. A melhor Φ_{Δ} obtida entre todas as soluções contendo micelas foi encontrada no copolímero tribloco Pluronic F-127, com $\Phi_{\Delta} \sim 1$. Este resultado é interessante porque PF-127 tem sido amplamente usado em diversas formulações farmacêuticas (Escobar-Chávez et al., 2006). O outro copolímero tribloco PF--68, contudo, não permitiu a solubilização da MentaZnPc produzindo um valor insignificante de Φ_{Δ} .

Eficiência quântica de fotobranqueamento de MentaZnPc

As moléculas de Pc usualmente fotodegradam oxidativamente via ataque causado por 1O_2 gerado pelas próprias moléculas. O fotobranqueamento da MentaZnPc foi identificado pelo decréscimo da intensidade do espectro de absorção sem a formação de novos picos.

Os espectros da Fig. 7.10 mostram que, além da fotoxidação de DPBF, a própria MentaZnPc também é degradada pelo oxigênio singleto gerado. A Fig. 7.11 (b) mostra os decaimentos da absorbância em 708 nm para SDS, 690 nm para CTAB e 684 nm para os surfactantes restantes.

O procedimento para a obtenção da Φ_p MentaZnPc, é descrito na Seção 4.2 mediante a Equação 4.18, sendo o volume da amostra irradiada $V = 3 \times 10^{-3}$ L, a área irradiada ($A = 3 \times 10^{-4}$ m²), o comprimento de onda de irradiação ($\lambda = 635$ nm) e a intensidade da lâmpada na posição da amostra, $I_{635nm} = 75$ W m⁻².

Pode-se observar que o $^1\text{O}_2$ não ataca as moléculas de ZnPc ou MentaZnPc em solução de DMF, pelo menos, na escala de tempo coberto por nossas experiências (observar a absorbância entre 559 e 750nm Fig. 7.10 a). No entanto, observa-se o decaimento das bandas de absorção tanto dos monômeros como também dos agregados de MentaZnPc (636nm) na presença das micelas (Fig. 7.10 b-l). A Figura 7.11 mostra a curva de decaimento do pico de absorção. Observa-se que o fotobranqueamento da MentaZnPc é bem menor que o de DPBF. A eficiência quântica de fotobranqueamento foi calculada a partir da Equação 4.18, com $t = \tau$ (Tabela 7.4). Observa-se que o fotobranqueamento de MentaZnPc é cerca de duas ordens de grandeza menor do que de DPBF.

Tabela 7.4. Constante de tempo τ , taxa de fotoxidação de DPBF k_p , absorbância no comprimento de onda de irradiação (A_{636}) e eficiência quântica de oxigênio singleto Φ_Δ e de fotobranqueamento Φ_p .

	solvente/ surfactant e	τ_{DPBF} (min)	$k_p (10^{-3} \text{s}^{-1})$	A_{636}	Φ_Δ	τ_{Pc} (min)	Φ_p
ZnPc	DMF	2.2	7.5	0.054	0.56*		-
	DMF	2.2	7.5	0.059	0.51		-
	SDS	257	0.065	0.301	0.001	662	1.9×10^{-5}
	CTAB	27.7	0.58	0.123	0.020	370	6.9×10^{-5}
	HPS	7.6	2.2	0.295	0.039	292	4.4×10^{-5}
MentaZnPc	Tween 20	30.2	0.55	0.147	0.017	298	7.3×10^{-5}
	Tween 80	11.2	1.5	0.067	0.091	58.1	7.5×10^{-4}
	C12E9	8.2	2.0	0.084	0.10	23.7	1.5×10^{-3}
	Brij 30	1.2	14	0.077	0.73	6.0	6.4×10^{-3}
	Brij 35	4.3	3.9	0.048	0.32	18.1	3.3×10^{-3}
	Brij 97	4.3	3.9	0.12	0.14	43.0	6.0×10^{-4}
	Brij 98	9.5	1.8	0.019	0.36	38.6	3.8×10^{-3}
	PF-127	0.9	19	0.07	1.1 [†]	8.8	4.8×10^{-3}

* Spiller et al., 1998

[†] Valor superior a 1 baseado na eficiência de ZnPc em DMF*.

Eficiência quântica de fluorescência Φ_f

Foram obtidos os espectros de excitação e emissão de fluorescência das soluções MentaZnPc-surfactante (Fig. 8.12). No caso de MentaZnPc em micelas de Brij 30 e Brij 98 (Fig. 8.12, a e c, respectivamente), o espectro de emissão é igual ao obtido em DMF, que é típico de um monômero de MPc (Zhang et al. 2010) e exibe simetria de espelho em relação ao espectro de excitação. O espectro de excitação é semelhante ao de absorção, indicando que apenas o monômero absorve nessa região.

Já a MentaZnPc em micelas de Brij 97 (Fig. 8.12, b), observa-se que o espectro de absorção apresenta contribuição de espécies agregadas, mas o espectro de excitação é igual ao de absorção da espécie monomérica, indicando que só os monômeros fluorescem. Os espectros de excitação e emissão mostram uma simetria tipo espelho.

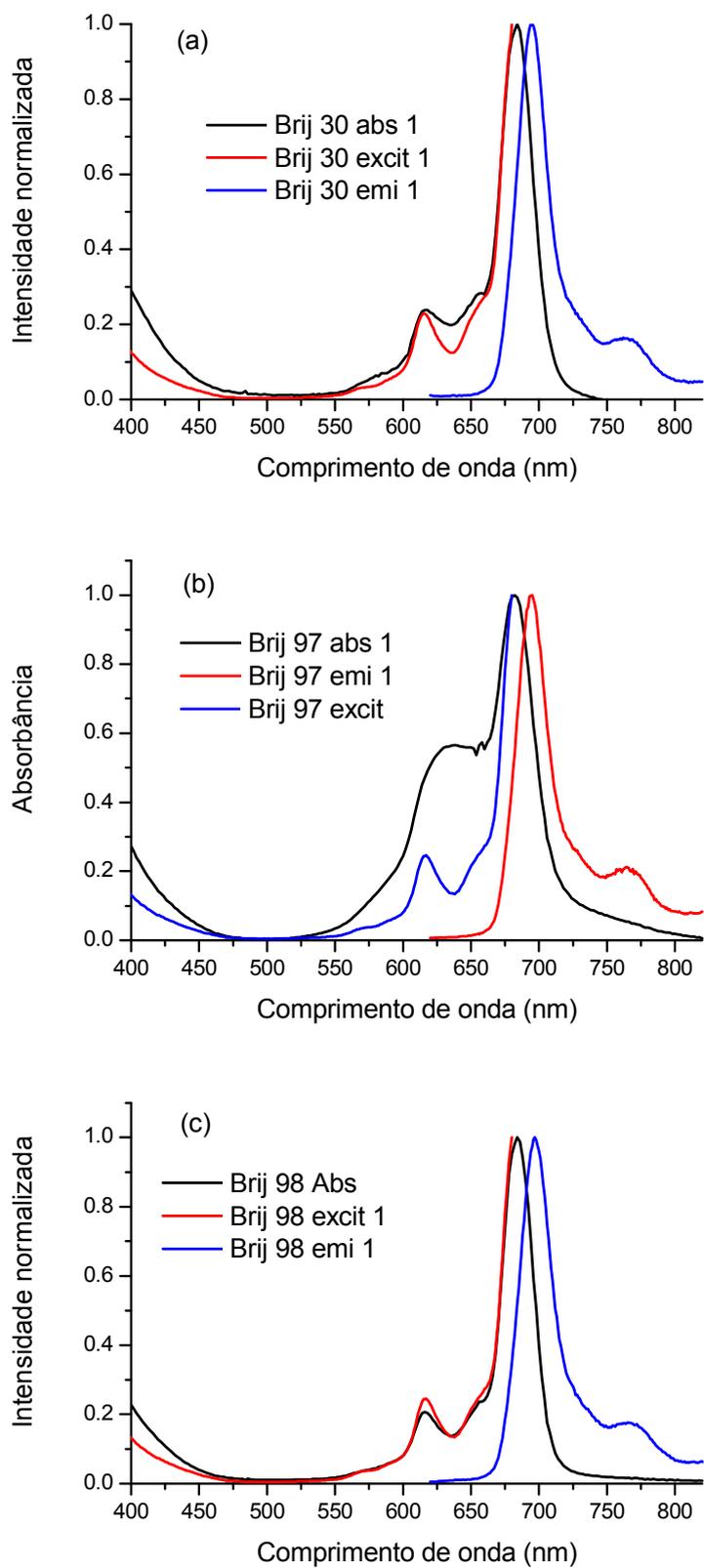


Figura 7.15. Espectros normalizados de absorção, excitação e emissão das soluções MentaZnPc-surfactante: (a) Brij 30. (b) Brij 97. (c) Brij 98. [MentaZnPc] 1,6 μ M.

Foram calculadas as Φ_f de MentaZnPc em micelas de Brij 30, Brij 97 e Brij 98 utilizando o procedimento da Seção 4.2.5, juntamente com a equação 4.14. O índice de refração n^{std} foi tomado como o de DMF, 1,43 e o n das soluções micelares foi tomado como o da água, 1,33. A Φ_f de ZnPc em DMF é de 0,18 (Maree et al. 2002). As relações F/F^{std} , entre as áreas debaixo das curvas de emissão, foram 1,68, 0,71 e 1,47 para MentaZnPc em Brij 30, Brij 97 e Brij 98, respectivamente. As absorbâncias no comprimento de onda de excitação (610 nm) foram 0,038, 0,046, 0,142 e 0,146, para ZnPc em DMF e em Brij 30, Brij97 e Brij98, respectivamente.

Foram encontrados os seguintes valores para Φ_f de MentaZnPc em Brij 30, Brij 98 e Brij 97: 0.22, 0.06 e 0.029, respectivamente. O valor mais alto em Brij 30 vem, em parte, da pequena absorção em 610 nm (fator 3) de MentaZnPc nessas micelas, já que em Brij 30 os agregados de MentaZnPc não absorvem nessa região, enquanto que em Brij 98 os agregados absorvem mas não são fluorescentes.

7.4 Conclusões

Em conclusão, este trabalho avaliou as propriedades ópticas e a atividade fotodinâmica de MentaZnPc, nova ftalocianina sintetizada pelo grupo de K. Oliveira (UFSCar), em alguns solventes e em diversas micelas de surfactantes iônicos (HPS, CTAB, SDS) e não-iônicos (Tween 80, Tween 20, Brij 30, Brji 35, Brij 97, Brij 98, Pluronic F-68 e Pluronic F-127). Como sonda de 1O_2 foi utilizado o DPBF.

MentaZnPc é solúvel em solventes apolares (clorofórmio, benzeno, e tolueno) e polares apróticos (THF, DMSO e DMF), onde foi observado um espectro de absorção UV-Visível típico de monômeros.

Em EtOAc aparece uma banda extra, em 722 nm, que pode estar associada à distorção do anel da MentaZnPc por formação de dímero ou agregado de ordem superior, num arranjo cofacial deslocado, onde Zn^{2+} de uma molécula estaria interagindo axialmente com um grupo mentil da outra molécula. O espectro de excitação prova que a MentaZnPc em EtOAc apresenta-se em duas formas fluorescentes: uma monomérica, igual à que aparece nos outros solventes e outra supostamente dimérica, já que agregados de ordem superior não são fluorescentes.

Os valores do rendimento quântico de fluorescência, Φ_f , de MentaZnPc em DMF e EtOAc são baixos em relação à ZnPc em DMF. Isso quer dizer que os 4 grupos mentoxi localizados nos anéis laterais da ZnPc provocam uma redução de Φ_f .

Na solução de MentaZnPc em EtOAc, observa-se que o pico do dímero em 722 nm diminui quando se adiciona DPBF e o pico de monômeros (682 nm) aumenta, o que indica interação preferencial com DPBF, desfazendo a provável interação axial do íon Zn^{2+} central. Esta interação preferencial de DPBF com a MentaZnPc explica também a rápida fotoxidação do DPBF, devido à proximidade com o local de geração de 1O_2 .

A eficiência de produção de oxigênio singleto, Φ_Δ , para MentaZnPc em DMF foi maior que a do padrão, ZnPc em DMF. Já no caso de MentaZnPc em EtOAc, foi maior que 1, o que indica que a eficiência do padrão estava superestimada ou que há uma interação preferencial entre a sonda DPBF e a molécula de MentaZnPc, em EtOAc, indicando que, nesse caso, o método comparativo para obtenção de Φ_Δ , não foi adequado. Conclui-se que a interação preferencial detectada em EtOAc aumenta em duas vezes o número de moléculas de DPBF oxidadas por oxigênio singleto, em relação a DMF.

A Φ_p de MentaZnPc, que contém anéis periféricos mentil, é maior que de ZnPc em DMF. O cálculo de Φ_p também mostrou um maior fotobranqueamento em EtOAc do que em DMF.

A agregação de MentaZnPc observada em micelas (Tween 20, Tween 80, $C_{12}E_9$, Brij 97 e PF-127) evidenciou a formação de um arranjo paralelo face-face de dois monômeros formando dímeros e agregados de ordem superior. Este tipo de arranjo é denominado agregados-H.

De acordo com os deslocamentos espectrais, tanto no espectro de absorvância como de fluorescência das soluções MentaZnPc-DMF-surfactante, e em acordo com vários autores, podemos concluir que a MentaZnPc foi incorporada na região hidrofóbica das respectivas micelas.

O valor A_{max}/A_{636} , relação entre as absorvâncias no pico da região 3 e em 636 nm, é uma medida da quantidade de monômeros com respeito a agregados. Depende da concentração de surfactante, mas principalmente da natureza do surfactante. Foi observado um leve aumento na fração de monômeros de MentaZnPc em micelas de Brij 97 e PF-127, quando espectros de absorção foram

medidos três dias depois. Isso mostra que, ao contrário de ZnPc, o derivado mentolado tem a tendência de desagregar-se com o tempo.

As eficiências Φ_{Δ} de MentaZnPc em micelas iônicas foram muito baixas, especialmente no surfactante iônico SDS, onde aparentemente não se observa a produção de $^1\text{O}_2$. Entre os surfactantes não-iônicos, em Tween 20 observou-se o menor valor de Φ_{Δ} . Entre os polioxietilenos, o Brij 30, tem o maior valor de Φ_{Δ} . A melhor Φ_{Δ} , entre todas os sistemas micelares estudados, foi encontrada com o copolímero tribloco PF-127 com $\Phi_{\Delta} \sim 1$.

O fotobranqueamento de MentaZnPc indica o menor valor na presença de micelas iônicas. No caso dos surfactantes Brij 30, 35 e 98 que mostravam um espectro típico de monômero, o fotobranqueamento foi maior. O Pluronic F-127, que indicava um alto valor de Φ_{Δ} , apresentou também um alto fotobranqueamento de MentaZnPc. De fato, se o oxigênio singlete é responsável tanto pela oxidação de DPBF como da própria ftalocianina, é razoável esperar que os dois fenômenos tenham comportamentos paralelos.