



Gleice Conceição Mendonça Germano

**Estudo de interações do antibiótico norfloxacin e do seu
complexo de cobre-fenantrolina com sistemas de
distribuição controlada de medicamentos.**

Dissertação de Mestrado

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da PUC-Rio como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Física.

Orientadora: Prof. Sônia Renaux Wanderley Louro

Rio de Janeiro
Maio de 2018



Gleice Conceição Mendonça Germano

**Estudo de interações do antibiótico norfloxacin e do seu
complexo de cobre-fenantrolina com sistemas de
distribuição controlada de medicamentos**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Física do Departamento de Física do Centro Técnico Científico da PUC-Rio. Aprovada pela Comissão Examinadora abaixo assinada.

Profa. Sônia Renaux Wanderley Louro

Orientadora

Departamento de Física – PUC-Rio

Profa. Aurora Pérez Gramatges

Departamento de Química – PUC-Rio

Profa. Greice Kelly Bezerra da Costa

UFRRJ

Profa. Isabel Cristina dos Santos Carvalho

Departamento de Física – PUC-Rio

Prof. Márcio da Silveira Carvalho

Coordenador Setorial do Centro

Técnico Científico – PUC-Rio

Rio de Janeiro, 25 de maio de 2018.

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da universidade, do autor e do orientador.

Gleice Conceição Mendonça Germano

Graduou-se em Física na Universidade Federal Fluminense em Niterói – UFF- em 2015.

Ficha Catalográfica

Germano, Gleice Conceição Mendonça Germano

Estudo de interações do antibiótico norfloxacin e do seu complexo de cobre-fenantrolina com sistemas de distribuição controlada de medicamentos / Gleice Conceição Mendonça Germano; orientadora: Sônia Renaux Wanderley Louro. – 2018.

85 f.: il. color. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado)–Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Departamento de Física, 2018.

Inclui bibliografia

1. Física – Teses. 2. Biofísica 3. Espectroscopia 4. Fluorescência. 5. antibióticos. 6. distribuição de fármacos. I. Louro, Sônia R. W. II. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro. Departamento de Física. III. Título.

CDD: 530

Agradecimentos

Ao meu Deus, pelo dom da vida.

Aos meus Pais Luiz Carlos e Vanda Leila, e meu irmão Van Carlos por todo carinho e incentivo a minha vida acadêmica.

À minha orientadora Sônia Louro, por todas as discussões e toda ajuda para a conclusão desse trabalho.

Agradeço à professora Isabel e à Prof. Greice pela colaboração durante o período do meu trabalho, sem a qual esse trabalho não seria possível.

Agradeço a todos meus professores, pela minha formação.

Agradeço aos funcionários Julinho, Marcia, Juliana e Giza por toda ajuda.

Agradeço a todos meus amigos pelo carinho e apoio.

Por fim, agradeço a PUC-Rio, ao CNPq e a FAPERJ pelas instalações e apoio financeiro oferecidos durante o meu trabalho.

Resumo

Germano, Gleice Conceição Mendonça; Louro, Sônia Renaux Wanderley (Orientadora). **Estudo de interações do antibiótico norfloxacin e do seu complexo de cobre-fenantrolina com sistemas de distribuição controlada de medicamentos.** Rio de Janeiro, 2018. 85p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Os sistemas de administração controlada de medicamentos (*drug delivery*) permitem a introdução de uma substância terapêutica no organismo e melhoram sua eficácia e segurança, controlando a taxa, o tempo e o local de liberação, o que diminui os efeitos colaterais. Nesse trabalho nos dedicamos a estudar dois possíveis sistemas de administração de fármacos: lipossomos associados a surfactantes, já bastante utilizados em farmacologia, e nanobastões de ouro, cujas propriedades únicas têm sido avaliadas em aplicações biomédicas. Os lipossomos têm-se destacado devido a sua estabilidade e baixa toxicidade, os surfactantes são tensoativos muito usados tanto em farmacologia como para estabilizar soluções coloidais de nanopartículas. Já os nanobastões de ouro têm perspectivas promissoras para utilização em entrega de fármacos devido a suas propriedades óticas e biocompatibilidade. Estudamos, por meio de espectrofotometria de fluorescência e de absorção UV-visível, a associação entre esses sistemas e uma classe de fármacos denominada fluorquinolonas, que são antibióticos de amplo espectro bacteriano. A norfloxacin (NFX), pertencente à segunda geração de fluorquinolonas, foi escolhida para esse trabalho por ser naturalmente fluorescente, o que facilita a análise das interações sem a introdução de sondas extrínsecas ao sistema. Segundo a literatura, a associação da NFX com íons metálicos produz modificações nas propriedades desse fármaco, como solubilidade e biodisponibilidade. Essas mudanças têm sido avaliadas como uma possível solução ao problema de resistência bacteriana a antibióticos. Esse trabalho foi dividido em duas partes: na primeira, estudamos a formação dos complexos ternários de NFX com cobre-fenantrolina em presença de lipossomos associados a surfactantes que modificam a distribuição de carga elétrica superficial desses sistemas; na segunda parte estudamos a associação de NFX a nanobastões de ouro estabilizados por diferentes surfactantes.

Palavras-chave

Fluorescência; absorção UV-Visível; fluorquinolonas; distribuição de fármacos; lipídios; nanobastões de ouro.

Abstract

Germano, Gleice Conceição Mendonça; Louro, Sônia Renaux Wanderley (Advisor) **Study of interactions of the antibiotic norfloxacin and its copper-phenanthroline complex with drug delivery systems.** Rio de Janeiro, 2018. 85p. Dissertação de Mestrado - Departamento de Física, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro.

Drug delivery systems allow the introduction of a therapeutic substance into the body and improve its effectiveness and safety by controlling the rate, time and place of release, which reduces side effects. In this work, we study two possible drug delivery systems: liposomes associated with surfactants, which are already widely used in pharmacology, and gold nanorods, whose unique properties have been evaluated in biomedical applications. Liposomes have been remarkable because of their stability and low toxicity, and surfactants are widely used both in pharmacology and to stabilize colloidal solutions of nanoparticles. On the other hand, gold nanorods have promising perspectives for use in drug delivery due to their optical properties and biocompatibility. We study the association between these systems and a class of drugs called fluoroquinolones, which are broad-spectrum bacterial antibiotics, using fluorescence spectrophotometry and UV-visible absorption. Norfloxacin (NFX), a second generation fluoroquinolone, was chosen because it is naturally fluorescent, which facilitates the analysis of interactions without the introduction of extrinsic probes into the system. According to the literature, the association of NFX with metal ions produces changes in the properties of this drug, such as solubility and bioavailability. These changes have been evaluated as a possible solution to the problem of bacterial resistance to antibiotics. This work was divided in two parts: first, we studied the formation of the ternary complexes of NFX with copper-phenanthroline in the presence of liposomes associated to surfactants that modify the distribution of surface electric charge of the systems; in the second part, we studied the association of NFX to gold nanorods stabilized by different surfactants.

Keywords

Fluorescence; UV-Visible spectroscopy; fluoroquinolones; drug delivery; lipids; gold nanorods.

Sumário

1 .	Introdução	16
1.1.	Fluorquinolonas	16
1.1.1.	Propriedades químicas	17
1.1.2.	Propriedades Fotofísicas	19
1.2.	Sistemas de distribuição controlada de fármacos (<i>drug delivery</i>)	20
1.2.1.	Surfactantes	20
1.2.2.	Micelas	21
1.2.3.	Lipossomos	24
1.3.	Nanobastões de ouro	26
2 .	Introdução a Fluorescência	28
2.1.	Luminescência	28
2.1.1.	Absorção UV-Visível	29
2.1.2.	Lei de Beer-Lambert	30
2.1.3.	Diagrama de Jablonski	33
2.2.	Supressão de fluorescência	36
2.2.1.	Supressão dinâmica	37
2.2.2.	Supressão estática	38
2.3.	Anisotropia de Fluorescência	39
2.3.1.	Medidas de anisotropia de fluorescência	40
3 .	Metodologia	43
3.1.	Equipamentos	43
3.2.	Materiais	44
3.3.	Métodos	45
3.3.1.	Preparação de Lipossomos	45
3.3.2.	Experimentos com Pluronic F-127	46
3.3.3.	Experimentos com CTAB	47
3.3.4.	Experimentos com nanobastões de ouro	47
3.4.	Modelos	48

3.4.1. Determinação de constante de estabilidade de complexos metálicos a partir de titulações fluorimétricas	48
3.4.2. Titulação ácido-base	51
4 . Resultados e Discussões	53
4.1. Associação de norfloxacin e seus complexos de cobre com lipossomos	53
4.2. Norfloxacin e o complexo Cobre:Fen:NFX em Micelas de Pluronic F-127	56
4.2.1. Associação da Norfloxacin com Micelas de PF-127	56
4.2.2. Influência de PF-127 na associação de norfloxacin com o complexo cobre fenantrolina	58
4.3. Norfloxacin e o complexo Cobre:Fen:NFX em Micelas de CTAB	61
4.3.1. Associação da Norfloxacin com Micelas de CTAB	61
4.3.2. Influência do pH na associação da Norfloxacin com CTAB	63
4.3.3. Influência de CTAB na associação de Cu:Fen com norfloxacin	66
4.4. Associação de norfloxacin com nanobastões de ouro (AuNR)	68
5 . Considerações finais e perspectivas	80
6. Referências bibliográficas	83

Lista de figuras

Figura 1.1. Estrutura molecular (a) ácido nalidíxico, (b) norfloxacin.	17
Figura 1.2. Fórmula geral das fluorquinolonas modificada (Albini, et al., 2003)	18
Figura 1.3. Estados de protanação da norfloxacin. (Albini, et al., 2003)	18
Figura 1.4. Estrutura molecular de (a) dodecil sulfato de sódio (SDS) e (b) brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).	21
Figura 1.5. Estruturas de agregados de moléculas anfifílicas (Rangel-Yagui, et al., 2004)	22
Figura 1.6. (a) Estrutura química Pluronic F-127, $x \approx z \approx 100$, $y \approx 65$; (b) micelas de Pluronic. Moléculas de água em amarelo. Figura modificada de (Vilsinskia, 2014)	22
Figura 1.7. Formação de micela de Pluronic F-127 em água em função da temperatura e da concentração de copolímero. Modificado de (Lin, et al., 2002)	23
Figura 1.8. Grade dos copolímeros Pluronic (estados físicos Líquido=verde, Pasta=vermelho e Flocos=laranja) (Barry, et al., 2014)	24
Figura 1.9. Estrutura de lipossomos	25
Figura 1.10. Esquema de preparação de vesículas modificado (Avanti Polar Lipids)	25
Figura 1.11. Ilustração esquemática da interação de luz polarizada e nanoesferas de ouro (A) e nanobastões (B) para formar a oscilação da ressonância plasmônica de superfície coerente eletrônica (SPR).	26
Figura 2.1. Representação ilustrativa dos níveis de energia de formaldeído.	30
Figura 2.2. Esquema de Espectrofotômetro UV-Visível (Wikimedia Commons)	31
Figura 2.3. Diagrama de Jablonski (modificado de Lakowicz)	33
Figura 2.4. Diagrama esquemático do método de formato L para medida de anisotropia de fluorescência (Lakowicz).	41

Figura 3.1. Fotografia do espectrofotometro Perkin Elmer, Lambda 950.	43
Figura 3.2. Fotografia do Sistema de Fluorescência QM-1 da PTI - Photon Technology International.	43
Figura 3.3. Fotografia do sonicador. (Sonics)	44
Figura 3.4. Estruturas moleculares: a) norfloxacin; b) Cu:Fen; c) sugestão de estrutura do complexo ternário de NFX:Cu:Fen	44
Figura 3.5. Estruturas moleculares: a) L-cisteína, b) mercaptopropanosulfonato, c) glutatona.	45
Figura 3.6. Curvas de titulação de fluorescência para o complexo metal-ligante 1:1, de acordo a Eq. 3.14.	50
Figura 4.1. Espectros de fluorescência da norfloxacin com concentrações crescentes de Cu:Fen, em presença de SUVs com diferentes razões molares AE/eggPC (a) 0,20, (b) 0,40 e (c) 0,60.	54
Figura 4.2. (a) Gráficos de Stern-Volmer de supressão de fluorescência de NFX por Cu:Fen na presença de SUVs com diferentes concentrações de AE:eggPC. (b) Gráfico de $(F_0-F)/F_0$ em função da concentração de Cu:Fen, sendo F_0 e F as intensidades de fluorescência na ausência e em presença de determinada concentração de Cu:Fen, respectivamente.	55
Figura 4.3. Variação da intensidade de fluorescência de NFX (8 μ M) em presença do copolímero PF-127, com aumento temperatura.	57
Figura 4.4. Anisotropia de fluorescência da NFX em tampão fosfato, 23°C, e em presença de PF-127, 18 %, em temperatura abaixo (18°C) e acima (33°C) da transição de fase sol-gel.	58
Figura 4.5. Variação da intensidade da fluorescência de NFX com o aumento da concentração de Cu:Fen, na presença de micelas Pluronic F-127 (5% = 50 mg/ml \approx 4mM).	59
Figura 4.6. Variação da intensidade da fluorescência de NFX com o aumento da concentração de Cu:Fen, na ausência de micelas PF-127.	60
Figura 4.7. Gráfico de $(F_0-F)/F_0$ em função da concentração de Cu:Fen, na presença ■ e na ausência ● de PF-127. F_0 e F são as	

intensidades de fluorescência na ausência e em presença de determinada concentração de Cu:Fen, respectivamente.	60
Figura 4.8. Espectros de fluorescência da solução de NFX 8 μ M titulada com concentrações crescentes de CTAB (tampão fosfato de 10 mM, pH 7,4)	62
Figura 4.9. Variação da intensidade de fluorescência de NFX com a concentração de CTAB. F_0 e F são as intensidades dos picos de fluorescência na ausência e na presença de CTAB, respectivamente.	63
Figura 4.10. Espectros de absorção da norfloxacin em diferentes valores de pH. [CTAB]=25 mM.	64
Figura 4.11. Espectros de fluorescência de NFX em micelas de CTAB, com a variação do pH.	65
Figura 4.12. Variação da intensidade de fluorescência de NFX com o pH, em presença de micelas de CTAB. [CTAB]=25 mM. (medidas em tampão, (Luiz, 2009).)	65
Figura 4.13. Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração da Cu:Fen. (a) na presença e(b) na ausência de CTAB.	66
Figura 4.14. Variação de fluorescência de NFX, normalizada, em presença e ausência de CTAB, em função da concentração de Cu:Fen. F_0 e F são as intensidades dos picos de fluorescência na ausência e na presença de Cu:Fen, respectivamente.	67
Figura 4.15. Espectro de extinção dos nanobastões de ouro utilizados nesse trabalho.	68
Figura 4.16. Espectro de absorção de norfloxacin, pH 7.4.	69
Figura 4.17. Espectro de extinção de AuNRs estabilizados com CTAB: (1) sem NFX e (2 e 3) com NFX 20 μ M.	70
Figura 4.18. Espectros de absorção de NFX com AuNRs estabilizadas com CTAB.	71
Figura 4.19. Espectros de emissão de fluorescência de NFX em suspensão de AuNRs estabilizados com CTAB (3 mM) ao longo dos dias.	72
Figura 4.20. Anisotropia de fluorescência de NFX em suspensão de AuNRs recobertos com CTAB. [NFX]=20 μ M	72

Figura 4.21. Espectros de extinção dos nanobastões estabilizados por diferentes reagentes.	73
Figura 4.22. Espectros de absorção/extinção referentes aos AuNRs estabilizados com MPS, antes e após adição de NFX 20 μ M.	74
Figura 4.23. Espectros de absorção/extinção referentes aos nanobastões estabilizados com citrato antes e após adição de NFX, 20 μ M.	75
Figura 4.24. Espectros de absorção referentes ao nano bastões estabilizados com Plurnic F-127 0,2 mM, antes e após adição de NFX 20 μ M.	76
Figura 4.25. Espectros de absorção/extinção referentes ao nanobastões estabilizados com SDS, antes e após adição de NFX 20 μ M.	77
Figura 4.26. Espectros de emissão de fluorescência de norfloxacin em suspensão de AuNRs estabilizados com diferentes substâncias.	77
Figura 4.27. Espectro de emissão de fluorescência de norfloxacin 20 μ M em solução de AuNR em SDS 10mM.	79
Figura 4.28. Medidas de anisotropia de fluorescência da norfloxacin em presença e em ausência dos AuNRs.	79

Lista de Símbolos

AE	Ácido esteárico
AuNR	Nanobastões de ouro
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
Cu:Fen	Cobre fenantrolina
FQs	Fluorquinolonas
HOMO	Nível molecular mais alto (do inglês Highest occupied molecular orbital)
GSH	Glutathione
L-cys	L-cisteína
LUMO	Nível molecular mais baixo (do inglês, lowest unoccupied molecular orbital)
LUVs	Vesículas unilamelares grandes (do inglês, large unilamellar vesicles)
MPS	mercaptopropanosulfonato
MLV	Vesículas multilamelares (do inglês, multilamellar vesicles)
NFX	Norfloxacina
PB	Tampão fosfato (do inglês, phosphate buffer)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês, phosphate buffered saline)
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SUVs	Vesículas unilamelares pequenas (do inglês, small unilamellar vesicles)
P-F127	Pluronic F-127
RMN	Ressonância magnética nuclear

Eu te louvarei, de todo o meu coração; na presença dos deuses a ti cantarei louvores. Inclinar-me-ei para o teu santo templo, e louvarei o teu nome pela tua benignidade, e pela tua verdade; pois engrandeceste a tua palavra acima de todo o teu nome. No dia em que eu clamei, me escutaste; e alentaste com força a minha alma.

Salmos 138:1-3

“I find your lack of faith disturbing”

Darth Vader

1.

Introdução

A norfloxacin é um representante da família das fluorquinolonas, e uma das escolhas mais frequentes para tratamentos de infecção de trato urinário, por ser um antibiótico que apresentam um largo espectro antibacteriano (Sharma, et al., 2008).

Apesar disso a impossibilidade do uso de concentrações elevadas desse fármaco, o tempo de permanência do agente terapêutico na circulação sanguínea e, em especial, os efeitos colaterais inerentes às terapias podem dificultar a utilização da concentração necessária para o sucesso terapêutico. (Santos, et al., 2002)

Em consequência disso, a obtenção de transportadores eficientes para fármacos tem sido, há longo tempo, um anseio de médicos e farmacologistas. A busca por esse objetivo tem propiciado o desenvolvimento de novas tecnologias, essas novas formas farmacológicas têm sido revertidas em benefício ao paciente, seja garantindo a dose necessária e adequada do medicamento, seja diminuindo as reações adversas e as interações com outros fármacos.

Ademais disso, de acordo com a literatura, a interação da NFX com metais de transição produz modificações nas propriedades cinéticas e fotoquímicas desse fármaco. Tais transformações têm sido pesquisadas como uma solução à resistência bacteriana. (Uivarosi, 2013)

Nesse trabalho investigamos interação do antibiótico NFX e seu complexos metálicos com alguns sistemas para distribuição controlada de fármacos (*drug delivery*), tais como: lipossomos, surfactantes e nanobastões de ouro.

1.1.

Fluorquinolonas

Fluoroquinolonas pertencem a classe de agentes antibacterianos sintéticos de amplo espectro com atividade bactericida, com boa absorção oral e excelente biodisponibilidade. O primeiro membro pertencente à família das quinolonas foi o ácido nalidíxico (Fig 1.1), que foi descoberto em 1962 por Lescher (Leshner, et al., 1962).

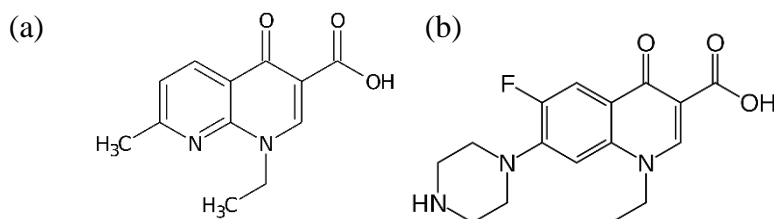


Figura 1.1. Estrutura molecular (a) ácido nalidíxico, (b) norfloxacina.

O uso clínico do ácido nalidíxico era limitado pelo curto espectro de atividade bacteriana. Desde a década 1960, as quinolonas têm sido modificadas gerando novos antibióticos, e melhorando o desempenho dos mesmos, ou seja, propiciando assim um aumento no espectro de atividade antibacteriana. (Andriole, 2000)

As quinolonas inibem rapidamente a síntese de DNA promovendo a clivagem do DNA bacteriano nos complexos DNA-enzima DNA girase e topoisomerase tipo IV, resultando em rápida morte bacteriana (Luiz, 2009).

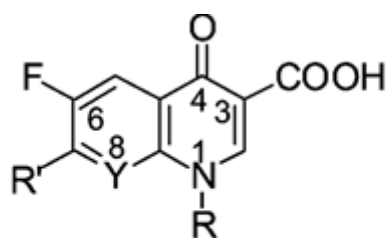
As quinolonas antigas têm melhor atividade contra a DNA-girase do que contra a topoisomerase IV em bactérias Gram negativas e melhor atividade contra a topoisomerase IV que a DNA girase nas Gram positivas, porém as quinolonas inibem ambas enzimas (Maxwell, 1992).

As fluorquinolonas começaram a ser usadas na clínica a partir dos anos 1980. Levando em consideração o seu espectro bacteriano e a suas propriedades farmacocinéticas, as fluorquinolonas podem ser divididas em quatro classes (Oliphant, et al., 2002).

A norfloxacin faz parte da 1ª classe da segunda geração das fluorquinolonas, sendo muito utilizada ultimamente para tratamentos de infecções no trato urinário.

1.1.1. Propriedades químicas

As Fluorquinolonas (FQs) apresentam uma função ácido carboxílico na posição 3, e o radical R' é substituído pelo anel piperazina que é uma função básica, ou seja, as FQs são moléculas zwitteriônicas. Essas duas funções são fracas e facilmente ionizáveis em meio aquoso.



FQs Fórmula Geral

Figura 1.2. Fórmula geral das fluorquinolonas modificada (Albini, et al., 2003)

O equilíbrio de protonação das FQs tem sido constantemente estudado por diferentes técnicas como espectrofotometria UV, RMN e potenciometria. (Ross, et al., 1992). Para as FQs que apresentam a estrutura genérica da Fig. 1-2, podemos identificar dois sítios de protonação. Em solução aquosa cada molécula de FQ apresenta-se em quatro estados de protonação diferentes (Fig. 1-3) (Albini, et al., 1999). Ou seja, podemos encontrar a norfloxacin na forma catiônica em pH mais baixo que o $pK_{a1} = 6,23$, na forma zwitteriônica por volta do $pH = 7,4$ ou na forma aniônica em pH mais alto que o $pK_{a2} = 8,6$.

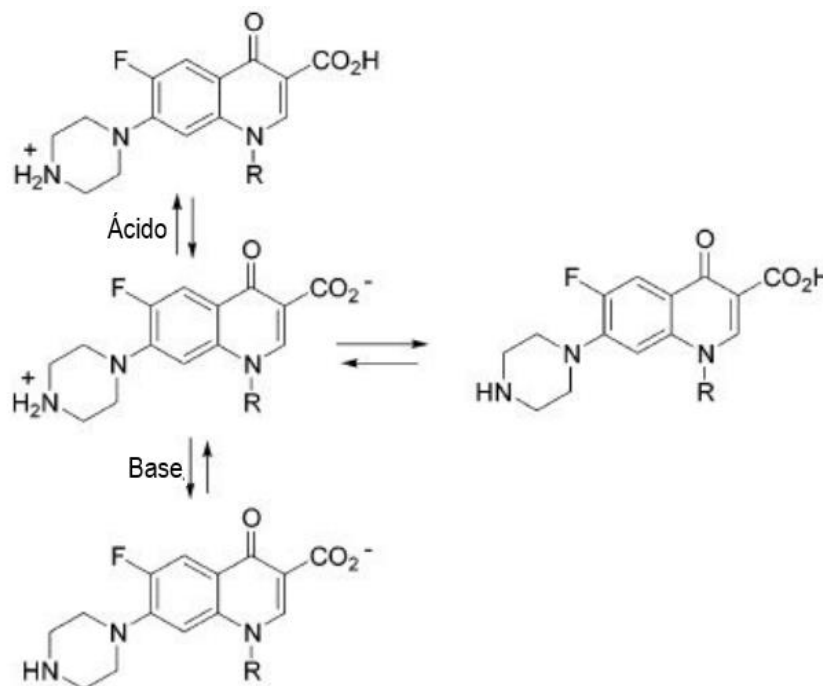


Figura 1.3. Estados de protanação da norfloxacin. (Albini, et al., 2003)

Estudos apontam que os estados de cargas das moléculas alteram de forma significativa a atividade das FQs, ou seja, em pH neutro elas se apresentam predominantemente zwitteriônicas, em pH menor que 6 apresentam-se de forma

predominantemente catiônica e em pH maior que 8,5 de forma predominantemente aniônica. Abaixo veremos como isso afeta as propriedades fotofísicas dessas moléculas (Barbosa, et al., 1999).

A micro especiação tem sido correlacionada com a biodisponibilidade das moléculas de FQs, a ligação proteica e a atividade antibacteriana (Novak, et al., 1990). A micro especiação é importante também na síntese de complexos metálicos, pois as moléculas agem como ligante na forma desprotonada em meio básico, e na forma zwitteriônica em meio neutro. Em meio fortemente ácido, as FQs formam complexos na sua forma catiônica (Uivarosi, 2013).

1.1.2. Propriedades Fotofísicas

Estudos usando a espectrometria UV indicam que FQs em solução aquosa e pH neutro, isto é, predominantemente zwitteriônicas, apresentam um espectro de absorção característico, com um pico de máxima intensidade num comprimento de onda entre 260-300nm, com um coeficiente de absorção molar $\epsilon=2,0 - 2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, e uma banda dupla no comprimento de onda em torno 320-340nm com um coeficiente de absorção molar em torno de 10^4 (Albini, et al., 2003).

Como dito anteriormente, alterações no equilíbrio ácido-base provoca mudança no espectro de absorção. Por exemplo, um deslocamento para um pH mais ácido induz alterações no espectro de absorção da norfloxacin, que pode ser observado por um aumento da intensidade na principal banda de absorção, além de um deslocamento do espectro como um todo para o vermelho. O mesmo não ocorre para um deslocamento para um pH mais alto (Rangel-Yagui, et al., 2004).

Ademais, a emissão da fluorescência também é dependente do meio, ou seja, do pH e da força iônica. O deslocamento do equilíbrio ácido-base pode alterar o rendimento quântico bem como o comprimento de onda do pico de emissão de fluorescência (Albini, et al., 2003).

Ao observar a variação do espectro de fluorescência em função do pH, nota-se que a intensidade do pico (~435 nm) diminui três vezes ao passar de pH 3,4 a 1,2. Ao passar de pH 3,4 para o pH fisiológico 7,4, o pico de fluorescência deslocase para o azul, para cerca de 407 nm, e a intensidade de fluorescência diminui levemente. Ao contrário quando ocorre um aumento de pH da solução, a partir de

7,6, temos uma extinção da fluorescência, o que indica que quando o grupo amino está desprotonado a FQs é pouco fluorescente.

Além disso, quando o pH da solução varia no entorno de pH 5,0 até 7,4 temos que o espectro pode ser obtido por uma combinação linear entre as formas zwitteriônica e catiônica (Luiz, 2009).

1.2.

Sistemas de distribuição controlada de fármacos (*drug delivery*)

Os sistemas de entrega de fármacos têm sido muito estudados pela medicina moderna, uma vez que permitem, por exemplo, o controle da absorção de fármacos nas regiões de interesse, da taxa de liberação e minimização da degradação, assim como a diminuição da toxicidade dos fármacos. Exemplos desses sistemas são os surfactantes e lipossomos. Ademais, têm sido estudados nanopartículas e nanobastões de ouro.

1.2.1.

Surfactantes

Surfactantes são compostos que têm propriedade de reduzir a tensão superficial entre dois líquidos ou duas fases distintas. Devido a essa propriedade, esses compostos podem agir como detergentes, emulsificadores e tensoativos. O nome surfactante vem da junção dos termos *surface active agents* (Tadros, 2014).

Os surfactantes possuem peso molecular da ordem de 10^2 , e apresentam um comportamento anfifílico, ou seja, possuem uma cadeia que contém uma parte hidrofóbica (apolar), pouco solúvel em água, e uma parte hidrofílica (polar), ou seja solúvel em água.

Existem várias formas diferentes de surfactantes que podem ser classificados de acordo com o grupo da cabeça polar, isto é, surfactantes que possuem uma cabeça polar carregada negativamente são referidos como aniônicos. Um exemplo importante é dodecil sulfato de sódio (SDS) como vemos Fig. 1.4 (Goodwin, 2004).

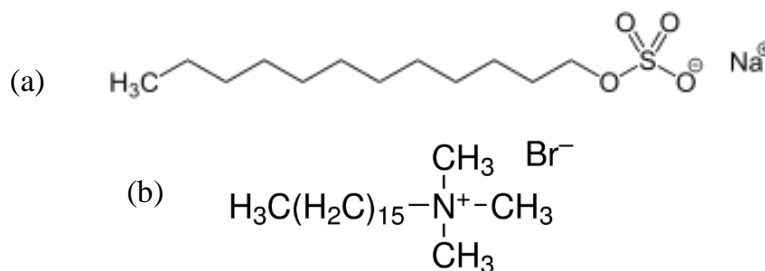


Figura 1.4. Estrutura molecular de (a) dodecil sulfato de sódio (SDS) e (b) brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB).

Os surfactantes catiônicos são aqueles que possuem a cabeça polar com um grupo carregado positivamente. Uma molécula importante é o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) como vemos na Fig. 1.4 (b).

Os surfactantes não carregados são geralmente referidos como não iônicos, como por exemplo os poloxâmeros (como o Pluronic F-127). Os zwitteriônicos contêm um grupo carregado negativamente e outro carregado positivamente e nesse caso a molécula se apresenta com carga elétrica nula, apesar de apresentar um momento de dipolo diferente de zero. A ionização do mesmo é profundamente dependente das propriedades do meio como por exemplo do pH e da temperatura.

1.2.2. Micelas

Devido a sua natureza anfifílica, as moléculas de surfactantes apresentam uma propriedade de se auto associar em estruturas, gerando assim agregados, que são chamados de micelas. Dependendo da estrutura dos surfactantes diferentes formatos de micelas podem ser formadas, incluindo esférica, cilíndrica e hexagonal (Boal, 2012).

A concentração micelar crítica (CMC) é um importante parâmetro para a caracterização dessas estruturas, e pode depender da natureza química do surfactante e do solvente, assim como do tamanho da cadeia hidrofóbica.

A CMC é definida como a concentração a partir da qual os surfactantes se organizam espontaneamente formando as micelas. Abaixo da CMC os surfactantes tendem a se organizar na interface reduzindo assim a tensão superficial. Já acima da CMC a maior parte das moléculas de surfactantes estão em meio micelar (Aires, 2012).

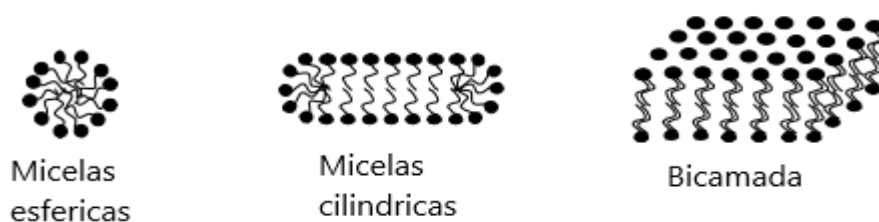


Figura 1.5. Estruturas de agregados de moléculas anfifílicas (Rangel-Yagui, et al., 2004)

A concentração micelar crítica tem sido alvo de muitos estudos, principalmente a influência da temperatura, pH e a força iônica. Como podemos observar da literatura temos que a concentração micelar crítica é uma função da entropia e da livre energia, e uma vez que essas variáveis dependem do pH, temperatura e a força iônica da solução, podemos verificar que a CMC também depende das características da solução aquosa. (Noudeh, et al., 2012; Rahman, et al., 1983)

1.2.2.1. Pluronic F-127

PluronicTM é um surfactante formado por uma estrutura polimérica tribloco do tipo polioxietileno-polioxipropileno-polioxietileno. Os copolímeros são naturalmente não iônicos onde a cadeia de polioxietileno (PEO) é hidrofílica e a cadeia de polioxipropileno (PPO) é hidrofóbica (Fig. 1.6 a)

Acima da concentração da micelar crítica, começa-se a formar um número considerável de micelas com a estrutura apresentada abaixo (Fig. 1.6 b).

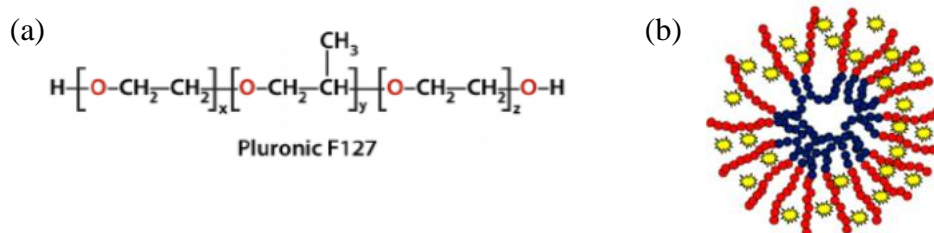


Figura 1.6. (a) Estrutura química Pluronic F-127, $x \approx z \approx 100$, $y \approx 65$; (b) micelas de Pluronic. Moléculas de água em amarelo. Figura modificada de (Vilsinskia, 2014)

O bloco central (grupo PPO) forma o núcleo da micela polimérica que é capaz de acomodar moléculas que têm pouca afinidade com o meio aquoso. Os blocos laterais (grupos PEO) formam a casca externa da micela que tem afinidade relativa

para a água e serve como uma região intermediária entre o meio aquoso e o núcleo hidrofóbico (Fig. 1.6 b).

Estudos anteriores apontam que a concentração micelar crítica depende da temperatura (Fig. 1.7). Acima de uma concentração de 20% o Pluronic F-127 se apresenta em uma fase gel em temperatura ambiente (Lin, et al., 2002).

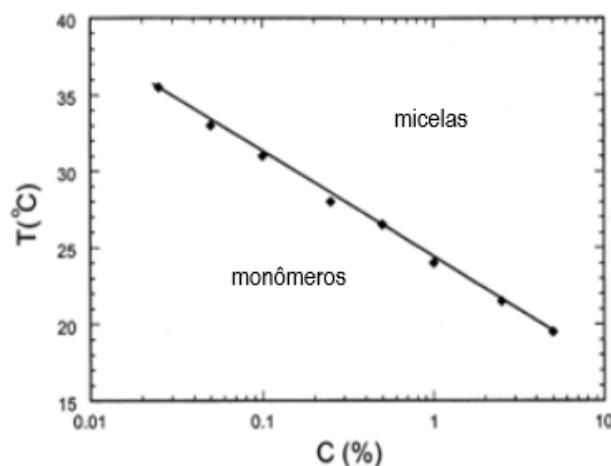


Figura 1.7. Formação de micela de Pluronic F-127 em água em função da temperatura e da concentração de copolímero. Modificado de (Lin, et al., 2002)

Além disso, os surfactantes poliméricos são mais estáveis, tendo uma CMC relativamente baixa, cerca de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ a 25°C para Pluronic F-127 (de acordo com Sigma-Aldrich) ou $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ (de acordo com a Fig. 1.8). Portanto, eles são mais resistentes aos efeitos de diluição que ocorrem durante a administração do medicamento. Sua biocompatibilidade e tamanho da ordem de 10^3 a prevenir o reconhecimento das micelas por proteínas e macrófagos, permitindo um maior tempo de circulação (Van Nostrum, 2004).

Usando a grade da Fig. 1.8, podemos calcular aproximadamente o peso molecular de cada Pluronic, os primeiros dois dígitos se o surfactante tiver 3 dígitos, ou o primeiro dígito se o surfactante tiver dois dígitos, estão relacionados ao peso molecular da cadeia hidrofóbica. O último dígito do surfactante representa 1/10 do percentual de óxido de etileno na cadeia total. Lembrando que P, L, F significam pasta, líquido ou flocos, respectivamente. A toxicidade desse material vem sendo estudada por mais de 20 anos. De acordo com a literatura, temos que a toxicidade vai diminuindo conforme a proporção de óxido de etileno aumenta em relação ao resto da cadeia (Schmolka, 1972).

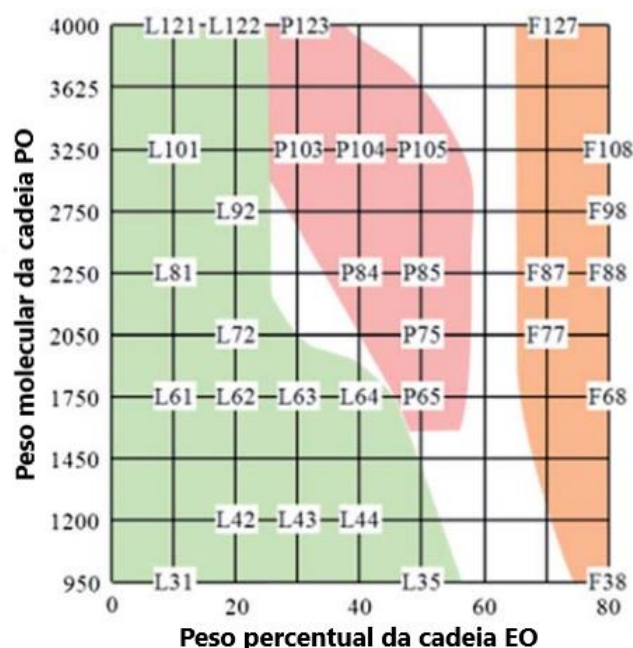


Figura 1.8. Grade dos copolímeros Pluronic (estados físicos Líquido=verde, Pasta=vermelho e Flocos=laranja) (Barry, et al., 2014)

1.2.3. Lipossomos

Lipossomos são pequenas vesículas esféricas artificiais, estáveis em solução aquosa, constituídas basicamente por fosfolipídios e glicerofosfolipídios que tendem a formar uma ou várias bicamadas concêntricas de lipídios (Fig. 1.9). Devido a seu tamanho, sua característica anfifílica e à sua biocompatibilidade, os lipossomos são sistemas promissores de liberação controlada de fármacos (Akbarzadeh, et al., 2013).

Os lipossomos podem apresentar diferentes propriedades, dependendo da sua composição, tamanho, carga superficial e método de preparação, e por isso são sistemas muito versáteis, pois podem ter propriedades ajustadas a uma determinada aplicação farmacológica.

As preparações dos lipossomos podem ocorrer de diversos processos: agitação, sonicação, extrusão, liofilização, congelamento entre outros (Fig. 1.10). Os diâmetros dessas vesículas podem variar de 20 nm a alguns μm , dependendo do modo com que é preparado. O início da preparação é comum a todos esses métodos de preparação. No início obtemos as vesículas multilamellares, MLV, que são constituídas de várias bicamadas, e a partir destas se utiliza o método de extrusão

para obtermos as vesículas unilamelares grandes, LUV, com diâmetro em torno de 100 nm. Se ao invés utilizamos o método de sonicação, obtemos as vesículas unilamelares pequenas SUV com diâmetro entre 45 a 80 nm.

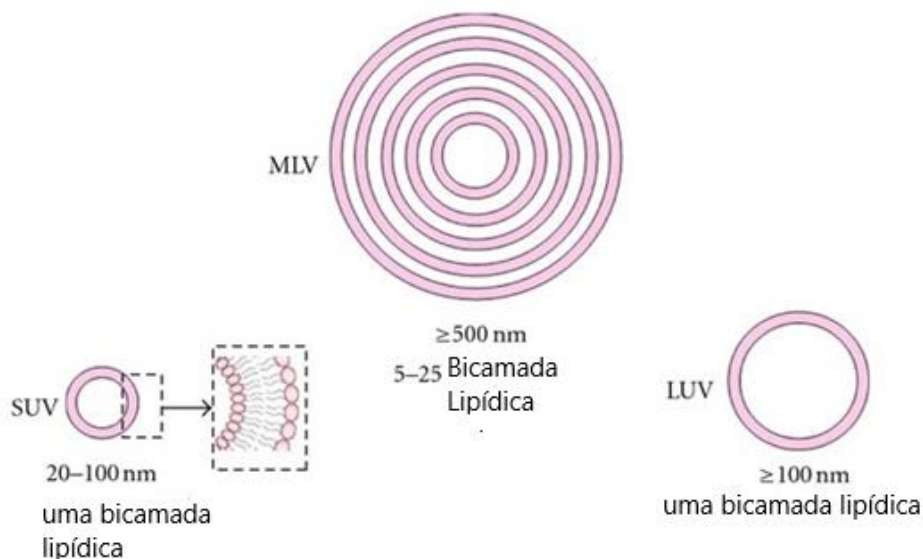


Figura 1.9. Estrutura de lipossomos

Para este trabalho usamos basicamente as SUV, que preparamos de acordo com o método de preparação fornecido por Avanti Polar Lipids, que será detalhado no capítulo de preparação e métodos (Avanti Polar Lipids).

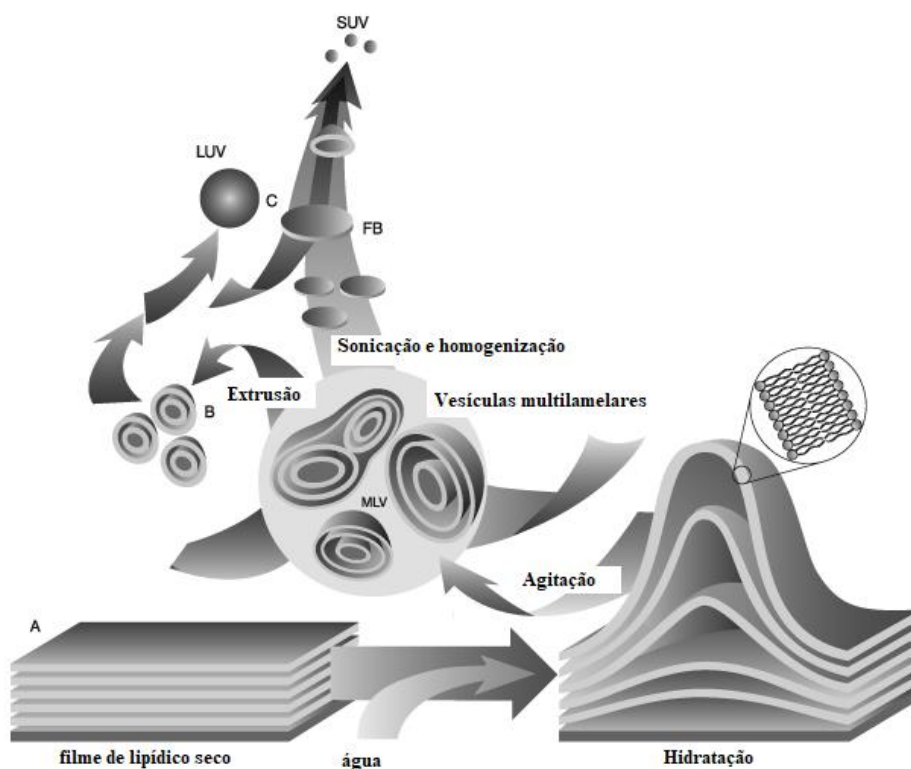


Figura 1.10. Esquema de preparação de vesículas modificado (Avanti Polar Lipids)

1.3. Nanobastões de ouro

Nanobastões de ouro tem aplicações promissoras no campo biológico e isso se deve a suas propriedades químicas, elétricas, óticas e foto térmicas. Além disso, a possibilidade de ajustar o tamanho e a forma dos nanobastões, incentivam muito o estudo dessa estrutura (Alkilany, et al., 2012).

Uma das propriedades que devemos destacar é a sua interação única com a luz incidente, que esta relacionada a sua coloração. Na presença de campo eletromagnético oscilante da luz, os elétrons da banda de condução de uma nanopartícula metálica sofrem uma oscilação coletiva coerente em ressonância com determinadas frequência da luz, chamada de ressonância de plasmon.

No caso dos nanobastões, os elétrons oscilar em duas direções diferentes dependendo da luz incidente. A excitação plasmônica no menor eixo induz uma absorção na região do visível, também observada nas nanopartículas de ouro, relacionada à banda transversal (Fig. 1.11) (Huang, et al., 2009).

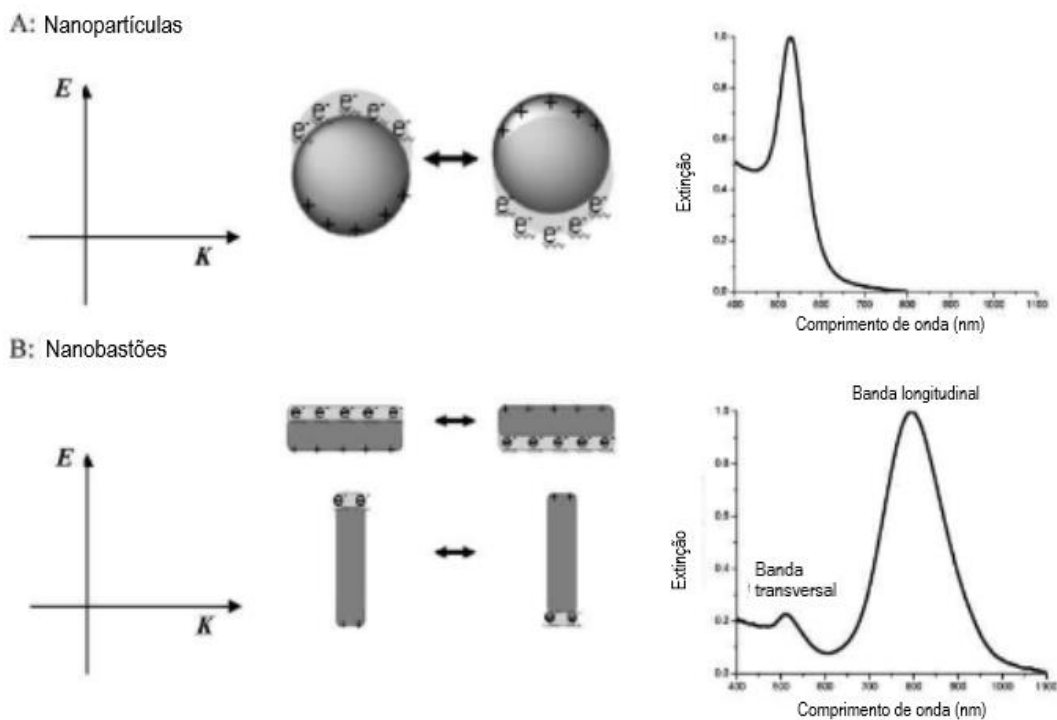


Figura 1.11. Ilustração esquemática da interação de luz polarizada e nanoesferas de ouro (A) e nanobastões (B) para formar a oscilação da ressonância plasmônica de superfície coerente eletrônica (SPR).

Excitação da superfície plasmônica ao longo do eixo mais longo resulta numa absorção na região de comprimentos de ondas entre comprimento de onda amarelo e o infravermelho próximo, referente a banda longitudinal que pode sofrer um deslocamento do visível para o infravermelho conforme a razão de aspecto aumenta (comprimento/largura). Isso confere aos nanobastões uma anisotropia inerente (Huang, et al., 2009)

A habilidade de modificar a superfície dos nanobastões e a conjugação com as moléculas dos fármacos e ainda a biocompatibilidade conferem aos nanobastões de ouro a possibilidade de serem estudados como sistemas de liberação controlada de fármacos, *drug delivery* (Stone, et al., 2011)

1.4. Objetivos

Mostrar o estudo da interação entre a norfloxacin e alguns sistemas de liberação controlada de fármacos, *drug delivery*, como os lipossomos, surfactantes, e nanobastões de ouro, com o intuito de melhorar a entrega do fármaco diminuindo assim efeitos perniciosos inerentes à terapia.

Tem-se visto muitos estudos sobre a formação de complexos metálicos de cobre e a norfloxacin, com o intuito de eliminar a resistência bacteriana. Nesse trabalho mostra-se também a interação desses complexos com os sistemas de entrega de fármaco.

2. Introdução a Fluorescência

2.1. Luminescência

O fenômeno de emissão fótons com frequência ultravioleta, visível ou infravermelho por uma espécie num estado eletrônico excitado é chamado de luminescência.

Em 1888 o físico Eilhardt Wiedemann usou pela primeira vez o termo luminescência para descrever os fenômenos de emissão de luz pela matéria que não estão associados ao aumento de temperatura, em oposição aos fenômenos incandescentes. Assim, fenômenos luminescentes originam “luz fria” enquanto fenômenos incandescentes originam “luz quente”.

Existem vários tipos de fenômenos luminescentes, e esses podem ser classificados de acordo com o método de excitação, na Tabela 1 (Valeur, 2001)

Tabela 2.1. Vários tipos de fenômenos luminescentes

Fenômenos luminescentes	Modo de excitação
Fotoluminescência (fluorescência, fosforescência, fluorescência atrasada)	absorção da luz (fótons)
Radioluminescência	radiação ionizante (raios X, α , β , γ)
Catodoluminescência	raios catódicos (feixes de elétrons)
Eletroluminescência	campo elétrico
Quimiluminescência	processos químicos (oxidação)
Bioluminescência	processos bioquímicos
Triboluminescência	forças eletrostáticas
Sonoluminescência	ultrassom

Nesse trabalho nos concentramos nos fenômenos referentes a fotoluminescência, mais precisamente fluorescência UV-Visível. Como podemos ver na tabela acima todos fenômenos fotoluminescentes são iniciados por absorção de fótons visível ou ultravioleta.

2.1.1.

Absorção UV-Visível

A absorção de radiação visível/ultravioleta é associada à excitação de elétrons de átomos e moléculas de um nível fundamental para um nível excitado de energia. Considerando que os estados são quantizados, somente os fótons com precisamente a energia capaz causar transições entre dois níveis serão absorvidos.

Tipos de transições eletrônicas em moléculas poliatômicas

Nas moléculas, elétrons ocupam orbitais moleculares. A interpenetração entre dois orbitais atômicos, resultando num orbital molecular pode se dar através de uma ligação do tipo σ (formada por dois orbitais atômicos s, por um s e um p, ou por dois orbitais p), ou de uma ligação do tipo π (formada por dois orbitais atômicos p sobrepondo-se lateralmente), como por exemplo no caso do etileno $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ onde temos uma ligação do tipo σ e uma ligação do tipo π . Considerando a absorção de um fóton com energia apropriada pode promover um elétron de um orbital π para um orbital não ligante denominado por π^* , essa transição é chamada de $\pi \rightarrow \pi^*$. A transição de um elétron de um orbital σ requer energia muito mais alta (absorção da ordem de UV distante).

Uma molécula pode apresentar também elétrons em orbitais não ligantes, chamados orbitais n, localizados em átomos como oxigênio e nitrogênio. A excitação de um elétron não ligante para um orbital não ocupado é possível e a transição associada é denominada de $n \rightarrow \pi^*$. A energia dessas transições eletrônicas segue geralmente a seguinte ordem.

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow \pi^* < \sigma \rightarrow \sigma^*$$

Para ilustrar vemos na Figura 2.1 os níveis de energias das possíveis transições do formaldeído. (Valeur, 2001)

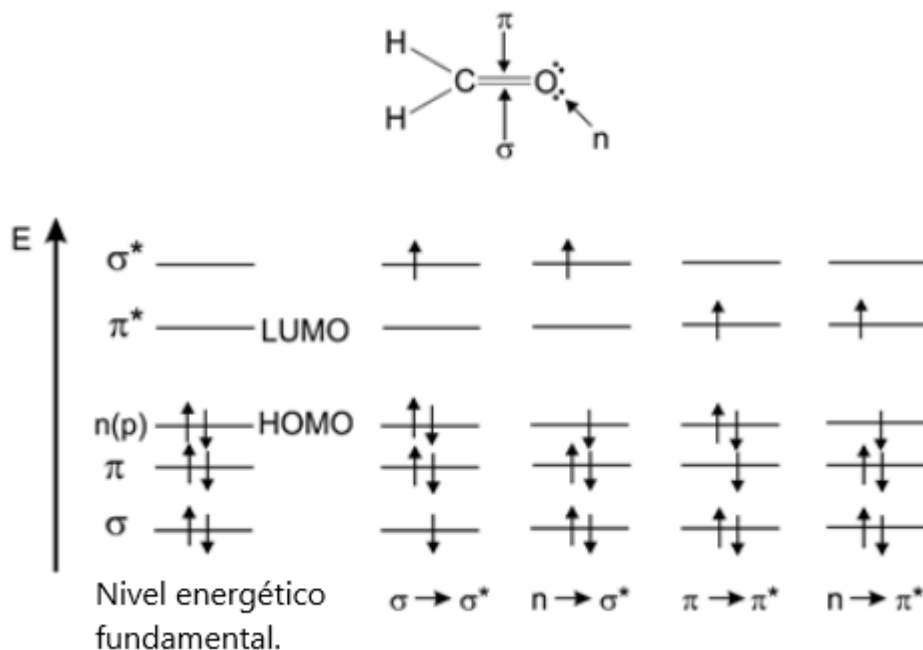


Figura 2.1. Representação ilustrativa dos níveis de energia de formaldeído.

Tanto na absorção quanto na espectroscopia de fluorescência, dois tipos importantes de orbitais são considerados: o nível molecular ocupado de maior energia (HOMO) e o nível molecular desocupado de menor energia (LUMO). Ambos se referem ao estado fundamental da molécula. Por exemplo, no formaldeído o HOMO é o orbital molecular n e o LUMO é o orbital π^* (Fig. 2.1).

Em geral, complexos de metais de transição são altamente coloridos (cromóforos), devido ao desdobramento dos orbitais d no campo ligante, pois assim alguns dos orbitais d ganham energia e outros perdem energia e as energias de transição entre esses orbitais se localizam na região visível do espectro eletromagnético. O número de desdobramentos depende do íon central.

É possível prever quais comprimentos de onda podem ser absorvidos por uma determinada substância. Quando a luz branca passa ou é refletida por uma substância, fótons com alguns comprimentos de onda característicos são absorvidos, e a luz restante assume a cor complementar ao(s) comprimento(s) de onda absorvido(s).

2.1.2. Lei de Beer-Lambert

A absorção de luz ultravioleta ou visível pode ser medida utilizando-se um espectrofotômetro UV-Visível. Esta técnica pode ser utilizada para obter tanto,

informações qualitativas quanto quantitativas. A fonte de luz fornece luz visível bem como radiação ultravioleta próxima, cobrindo então o espectro na faixa de 200-800 nm.

O esquema de um espectrofotômetro é mostrado na Fig. 2.2. A saída da fonte é focada sobre uma rede de difração, que divide a luz de entrada em suas cores componentes de diferentes comprimentos de onda. Para as amostras líquidas, primeiro medimos uma solução de referência à qual damos o nome de branco. A intensidade que passa pelo líquido de referência chamamos de I_0 e a intensidade que passa pela amostra de I . Então, como I é menor que I_0 , define-se a absorbância (A) pela expressão dada por:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2.1)$$

O detector de luz converte a entrada em corrente. Quanto maior a intensidade transmitida, maior a corrente medida.

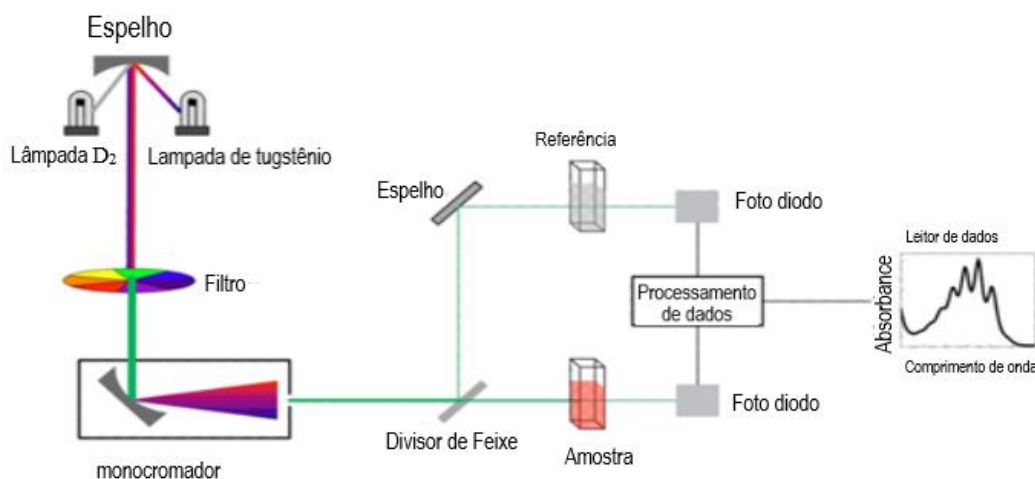


Figura 2.2. Esquema de Espectrofotômetro UV-Visível (Wikimedia Commons)

Vamos agora ver uma forma derivação simples da Lei de Beer-Lambert, bem como discutir os limites dessa Lei. Cada molécula tem associada uma seção de choque σ , que depende do comprimento de onda. Considerando que uma fina camada da cubeta dl contém dN moléculas, o dN é dado por:

$$dN = N_a c S d\ell \quad (2.2)$$

onde S é a seção de choque do feixe incidente, c é a concentração da solução e N_a é o número de Avogadro. A seção de choque de absorção total é dada pela soma das seções de choques moleculares. A probabilidade do fóton ser absorvido pelo orbital

molecular é $\sigma \frac{dN}{S}$, que é igual a $-\frac{dI}{I}$, fração da intensidade absorvida pela fina camada de cubeta, $d\ell$.

$$-\frac{dI}{I} = \frac{\sigma dN}{S} = \sigma N_a c d\ell \quad (2.3)$$

Integrando os dois lados, temos:

$$\ln \frac{I_0}{I} = N_a \sigma c \ell \quad \text{ou} \quad \log \frac{I_0}{I} = \frac{1}{2.303} N_a \sigma c \ell \quad (2.4)$$

Sabendo que ℓ é o caminho ótico da cubeta e que a seção de choque molecular pode ser calculada a partir de ε medido experimentalmente,

$$\sigma = \frac{2.303 \varepsilon}{N_a} \quad (2.5)$$

De acordo com Beer-Lambert, a absorbância é proporcional à concentração da substância na solução e como resultado disto a espectroscopia UV-visível pode ser usada para medir a concentração de uma amostra.

Substituindo a expressão 2.5 em 2.4 temos que a Lei de Beer-Lambert pode ser expressa na forma da equação seguinte:

$$A = \varepsilon \ell c \quad (2.6)$$

onde A é absorbância, ℓ é o caminho óptico, c a concentração da solução e ε uma constante característica de cada substância e que depende do comprimento de onda.

Uma vez que a absorbância para soluções diluídas é diretamente proporcional à concentração, esta técnica tem muitas aplicações, como estudar a cinética das reações dos compostos. A taxa de mudança na concentração pode resultar no aumento ou diminuição da absorção de luz pela amostra (Borissevitch, et al., 2016).

Para obter exata conformidade com a Lei de Beer-Lambert algumas condições devem ser satisfeitas. Como por exemplo: os feixes de luz devem ser monocromáticos, as amostras devem ser soluções moleculares ou iônicas, pois soluções coloidais causam espalhamento da luz, além disso as soluções devem ser suficientemente diluídas, para evitar alterações na estrutura molecular dentro da faixa de concentração em estudo (Lewis, 1985).

2.1.3. Diagrama de Jablonski

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão são comumente representados no diagrama de Jablonski, em que tal representação gráfica é um modo simples e conveniente de se visualizar esses processos tais como: conversão interna, fluorescência, fosforescência, cruzamento intersistema (Lakowicz, 1999).

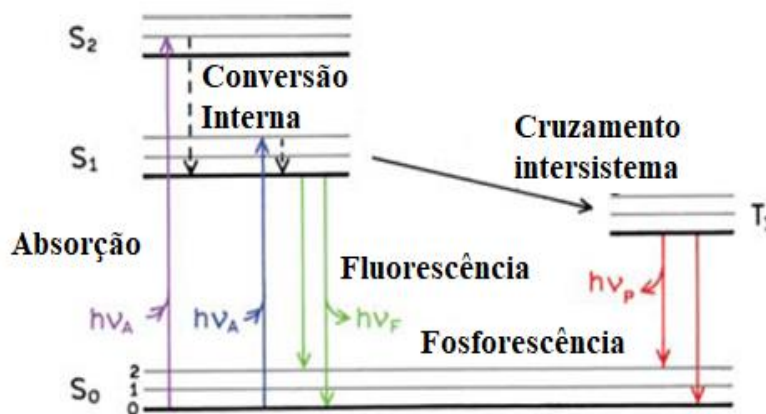


Figura 2.3. Diagrama de Jablonski (modificado de Lakowicz)

Um típico diagrama de Jablonski é mostrado na Fig. 2.3, onde os estados eletrônicos singletes fundamental, primeiro e segundo estados excitados são representados por S₀, S₁, S₂, respectivamente. Já os estados representados por T₁ e T₂ são os estados eletrônicos tripletes.

Um parâmetro importante de se observar é o tempo característico de cada processo, como podemos notar no quadro abaixo (Tabela 2.2). O tempo de absorção é muito rápido comparado ao de todos os outros processos, logo, segundo o princípio de Frank-Condon, não existe deslocamento do núcleo durante esse processo.

Em temperatura ambiente, a maioria das moléculas está no nível fundamental vibracional de S₀, então o primeiro processo que ocorre é de absorção, que é representado como uma seta vertical. Esse processo leva a molécula até o nível S₁ ou S₂ e, a partir de então, ocorrem os processos de desexcitação citados abaixo.

Tabela 2.2. Tempo característico de diversos processos

	Tempo característico	
Absorção	10^{-15} s	
Relaxação vibracional	10^{-12} a 10^{-10} s	
Tempo de vida do estado excitado S_1	10^{-10} a 10^{-7} s	Fluorescência
Cruzamento intersistemas	10^{-10} a 10^{-8} s	
Conversão interna	10^{-11} a 10^{-9} s	
Tempo de vida do estado excitado T_1	10^{-6} a 1 s	Fosforescência

- Conversão interna

A conversão interna é uma transição não radiativa entre dois níveis eletrônicos vibracionais de mesma multiplicidade de spin. Esse processo é seguido por um relaxamento eletrônico vibracional em direção ao nível vibracional de mais baixa energia. Durante as colisões, a molécula excitada pode chocar-se com as moléculas vizinhas do solvente e o excesso de energia vibracional pode ser transferido para o solvente.

- Cruzamento Intersistema

O cruzamento intersistema é um processo de desexcitação onde a molécula decai do estado vibracional S_1 , S_2 cruzando para o estado vibracional de um tripleto T_1 e T_2 , ou seja, cruzamento intersistema é transição não radiativa entre dois níveis isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de multiplicidades diferentes. O cruzamento intersistema pode ser rápido o suficiente (10^{-7} - 10^{-9} s) para competir com outras vias de desexcitação de S_1 (fluorescência e conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$).

- Fosforescência

O fenômeno que ocorre à temperatura ambiente dentro da solução é predominantemente a fosforescência, sendo de fato proibido esse processo de desexcitação não radiativa a partir do estado tripleto T_1 (mas pode ser observado por causa do acoplamento spin-orbita) e, portanto, tem constante de taxa radiativa muito baixa. Durante esse lento processo, numerosas colisões ocorrem com a molécula do solvente, favorecendo o cruzamento intersistema e o relaxamento vibracional para o nível fundamental S_0 .

Mesmo em baixas temperaturas ou em materiais rígidos esse fenômeno pode ser observado. Nessas condições o tempo de vida do estado tripleto é maior, a ponto de se poder ser observado em escalas de segundos ou até mesmo em minutos ou mais.

O espectro de fosforescência pode ser observado com comprimentos maiores que o espectro de fluorescência pois a menor energia do estado tripleto é menor que a energia do estado singleto. (Albani, 1968)

- Fluorescência

A transição de energia pela emissão de fótons a partir do estado S_1 para o estado S_0 é chamado de fluorescência. Vale destacar que apenas em poucas exceções a emissão ocorre de nível diferente de S_1 (caso do azulene onde a emissão ocorre a partir de S_2 e de S_1 simultaneamente). A emissão fluorescente ocorre geralmente a partir S_1 , ou seja, a forma do espectro de emissão, em geral, não depende do comprimento de onda de excitação.

A transição $0 \rightarrow 0$ é a mesma para absorção e para fluorescência, porém o espectro de fluorescência apresenta comprimentos de onda maiores (mais baixa energia) que os comprimentos de onda de absorção. Isso ocorre devido à perda de energia por relaxação vibracional. No entanto, em alguns casos o espectro de absorção tem alguma superposição com o espectro de fluorescência, ou seja, uma fração de luz é emitida em comprimentos de onda mais curtos do que a luz absorvida. Isso é possível pois à temperatura ambiente algumas moléculas encontram-se em estados vibracionais de maior energia.

Em geral, a distribuição dos níveis de energia vibracional de S_0 e S_1 são similares. Isso se reflete no fato de que o espectro de fluorescência se assemelhar à forma espelhada da primeira banda do espectro de absorção (chamada regra do espelho). O gap entre o máximo da primeira banda de absorção (expresso em número de onda) e o máximo de fluorescência é chamado de deslocamento Stokes (Wardle, 2009).

2.2. Supressão de fluorescência

A fluorescência de um composto pode ser caracterizada pelos seguintes parâmetros: intensidade, rendimento quântico, tempo de vida.

A intensidade da fluorescência referente a um dado comprimento de onda é igual ao número de fótons multiplicado pela energia de cada fóton.

$$I = n E \quad (2.3)$$

O rendimento quântico da fluorescência é a razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos, ou seja, o rendimento quântico dá a probabilidade de uma molécula no estado excitado S_1 decair por emissão de fótons.

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} = k_r \cdot \tau \quad (2.4)$$

onde o tempo de decaimento da fluorescência, τ , é definido por:

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (2.5)$$

No geral o rendimento quântico e a intensidade da fluorescência de um composto são proporcionais entre si, já o tempo de vida da fluorescência é dado pelo tempo em que o fluoróforo se mantém no estado excitado.

A supressão da fluorescência se refere a qualquer processo que diminui a intensidade da fluorescência e, por assim dizer, diminui o rendimento quântico da amostra. Geralmente ocorre quando moléculas externas são adicionadas à solução do fluoróforo. O supressor irá diminuir a fluorescência basicamente por dois processos: ao entrar em colisão com o fluoróforo, ou quando o mesmo forma um complexo não fluorescente com o fluoróforo. No primeiro caso estamos falando de uma supressão dinâmica, já no segundo caso a supressão se dá de forma estática.

Antes de entrar nas discussões matemáticas desses dois modelos, vamos fazer algumas considerações sobre o que acontece com tempo de vida nos dois processos citados acima. Usaremos então um exemplo: considere 100 moléculas de fluoróforo presentes em uma solução aquosa. Em uma supressão estática, algumas moléculas vão se ligar ao supressor e deixar de ser fluorescentes. Logo o número de moléculas

fluorescentes agora é menor que 100, mas o tempo de decaimento continua o mesmo. Assim o tempo de vida continua o mesmo.

Já a supressão dinâmica ocorre quando um supressor colide com uma molécula de fluoróforo e depois as moléculas são novamente separadas, ou seja, as 100 moléculas de fluoróforo continuam fluorescentes, porém, como nesse processo algumas moléculas perdem energia durante a colisão e voltam ao estado fundamental sem emissão de fóton, o tempo de vida diminui (Hof, et al., 2005).

2.2.1. Supressão dinâmica

Para derivar a equação que descreve essa supressão, primeiro temos que considerar a intensidade da fluorescência na ausência e na presença de supressor. Considere $[F^*]$ a concentração de moléculas do fluoróforo no estado excitado S_1 depois da absorção de um pulso δ de luz.

A variação temporal da concentração do fluoróforo no estado excitado vai depender da constante de decaimento radiativo k_r^s , não radiativo k_{nr}^s , e mais um termo que deve ser proporcional à concentração de supressor.

$$\frac{d[F^*]}{dt} = (k_r^s + k_{nr}^s)[F^*] + k_q[Q][F^*] \quad (2.6)$$

Da Eq. (2.5), chamando τ_0 o tempo de vida na ausência de supressor, tem-se.

$$\frac{d[F^*]}{dt} = \left\{ \frac{1}{\tau_0} + k_q[Q] \right\} [F^*] \quad (2.7)$$

Resolvendo essa equação diferencial temos.

$$[F^*](t) = [F^*](0) e^{(1/\tau_0 + k_q[Q])t} \quad (2.8)$$

Como a intensidade de fluorescência é proporcional a $[F^*]$, esta é dada por:

$$k_r[F^*] = i(t) = i(0) e^{(1/\tau_0 + k_q[Q])t} \quad (2.9)$$

Temos então que o tempo de vida do fluoróforo no estado excitado é dado por.

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_0} + k_q[Q] \quad (2.10)$$

Multiplicando essa equação por τ_0 , temos:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2.11)$$

Os rendimentos quânticos, na ausência (Eq. 2.4) e na presença do supressor, respectivamente, são dados por:

$$\Phi_F^0 = \frac{k_r}{(k_r + k_{nr})} = k_r \tau_0 \quad \text{e} \quad \Phi_F = \frac{k_r}{(k_r^s + k_{nr}^s + k_q[Q])} = k_r \tau \quad (2.12)$$

A razão entre eles é:

$$\frac{\Phi_F^0}{\Phi_F} = \frac{k_r + k_{nr} + k_q[Q]}{k_r + k_{nr}} = 1 + \frac{k_q}{k_r + k_{nr}}[Q] = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2.13)$$

Como dito anteriormente o rendimento quântico é proporcional à intensidade da fluorescência, então:

$$\frac{I_0}{I_1} = 1 + K_{sv}[Q] \quad (2.14)$$

2.2.2. Supressão estática

Na seção anterior vimos o caso em que a supressão dinâmica, causada pela colisão entre fluoróforo e supressor. A supressão também pode ser causada pela formação de complexo não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor.

Temos que a formação do complexo pode ser descrita pela constante de associação, K_b , dada pela seguinte expressão:

$$K_b = \frac{[FQ]}{[F].[Q]} \quad (2.15)$$

Temos que a concentração de fluoróforo livre pode ser escrita como:

$$[F] = [F_0] - [F.Q] \quad (2.16)$$

onde $[F_0]$ é a concentração total do fluoróforo e $[FQ]$ é a concentração do complexo do fluoróforo ligado ao supressor. Substituindo a equação (2.16) na expressão (2.15) temos que:

$$K_b = \frac{[F_0]}{[F] \cdot [Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (2.17)$$

Multiplicando a expressão acima por $[Q]$ obtemos a expressão abaixo:

$$\frac{[F_0]}{[F]} = 1 + K_b [Q] \quad (2.18)$$

Assim como na supressão dinâmica, o gráfico de Stern-Volmer para a supressão estática também é linear. Porém, no caso de supressão estática a constante de Stern-Volmer é a própria constante de associação. (Albani, 1968)

2.3. Anisotropia de Fluorescência

A anisotropia de fluorescência é uma poderosa ferramenta para estudos em bioquímica além de ser usada em muitos testes médicos. Isso ocorre porque essa é uma técnica bastante versátil, sendo possível medir desde o tamanho e o formato de proteínas até obter informações sobre interações entre proteínas e destas com fluoróforos. A anisotropia da emissão fluorescente é medida a partir da excitação da amostra por uma luz polarizada e a detecção do estado de polarização da luz emitida subsequentemente. A extensão dessa polarização pode ser descrita através da anisotropia, ou seja, amostras que exibem anisotropia diferente de zero emitem luz polarizada. A anisotropia, r , e a polarização, P , são dadas pelas expressões abaixo.

$$r = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + 2I_{\perp}} \quad \text{e} \quad P = \frac{I_{||} - I_{\perp}}{I_{||} + I_{\perp}} \quad (2.19)$$

Onde $I_{||}$ e I_{\perp} são, respectivamente, a intensidade da luz emitida polarizada na direção paralela e perpendicular à luz de excitação. (Ito, et al., 2016)

Percebe-se que a definição de anisotropia é mais adequada que a da polarização pois é independente da intensidade total da luz por ser normalizada. A medida da anisotropia é baseada no princípio da foto seletividade na excitação da

amostra pela luz polarizada, ou seja, quando expostos a luz polarizada, os fluoróforos que têm momentos de dipolo de transição orientados ao longo do campo elétrico da luz incidente são preferencialmente excitados. Logo as moléculas no estado excitado não são aleatoriamente orientadas.

A anisotropia revela a média do deslocamento angular do fluoróforo entre a absorção e a emissão subsequente de um fóton. Esse deslocamento angular está relacionado ao tempo de vida do estado excitado, o que significa que mudanças na viscosidade de arrasto da solução implicam em mudanças na anisotropia de fluorescência. Pequenos fluoróforos em solução com baixa viscosidade exibem taxa de difusão rotacional tão rápida quanto a emissão do fóton e assim a anisotropia fica em torno de zero.

O fato da anisotropia depender do movimento rotacional é o que gera as principais aplicações nas pesquisas em bioquímica e biofísica, porque a escala de tempo de difusão rotacional é comparável ao tempo de decaimento de muitos fluoróforos. Fatores que alteram o tempo de correlação rotacional afetam a anisotropia.

Como exemplos de aplicações da medida de anisotropia de fluorescência temos o uso dessa técnica para quantificar a desnaturação de proteínas, a associação de proteínas com outras macromoléculas, a dinâmica interna de proteínas. Ademais, a anisotropia de fluoróforos ligados a membranas tem sido bastante usada para estimar a viscosidade interna das membranas além de ser uma ferramenta para estimar a temperatura da transição de fase das membranas (Lakowicz, 1999).

2.3.1. Medidas de anisotropia de fluorescência

Um dos arranjos mais comuns na medida de anisotropia de fluorescência é o formato em L que está ilustrado na Fig. 2.4.

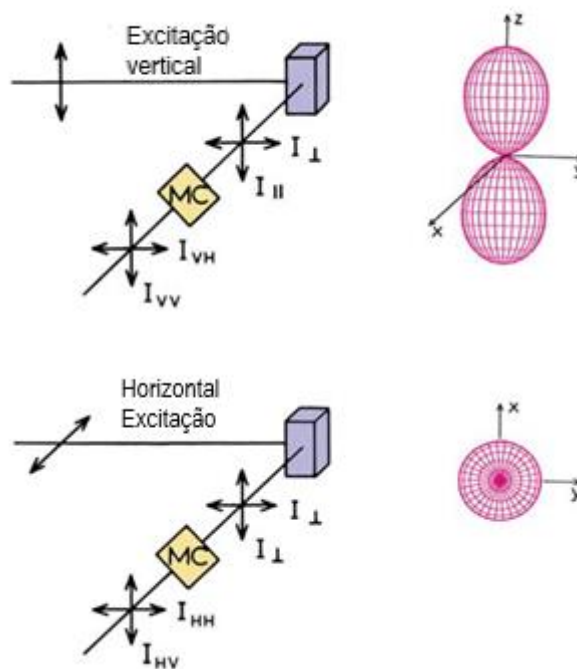


Figura 2.4. Diagrama esquemático do método de formato L para medida de anisotropia de fluorescência (Lakowicz).

Como podemos ver na equação (2.19), tanto a polarização quanto a anisotropia são funções das quantidades $I_{||}$ e I_{\perp} . No entanto, durante a medida obtemos, na verdade, as seguintes quantidades I_{VV} , I_{VH} , I_{HV} e I_{HH} . Vamos descrever a seguir como podemos obter a medida da anisotropia experimentalmente.

Considera-se uma amostra sendo excitada por uma luz polarizada verticalmente, que pode emitir uma luz também polarizada tanto verticalmente (I_{VV}) quanto horizontalmente (I_{VH}). Estas são dadas pelas seguintes relações.

$$I_{VV} = k S_V I_{||} \quad (2.20)$$

$$I_{VH} = k S_H I_{\perp} \quad (2.21)$$

Sendo k um fator de proporcionalidade que leva em consideração o rendimento quântico, S_V e S_H que são fatores que descrevem a sensibilidade do sistema de detecção para polarizadores vertical e horizontal. Dividindo a primeira relação pela segunda temos que:

$$\frac{I_{VV}}{I_{VH}} = \frac{S_V}{S_H} \cdot \frac{I_{||}}{I_{\perp}} = G \cdot \frac{I_{||}}{I_{\perp}} \quad .. \quad (2.22)$$

A partir da relação acima temos que o fator G é dado por:

$$G = \frac{S_V}{S_H} \quad (2.23)$$

A razão entre a emissão paralela e a emissão a perpendicular depende do fator G , que pode ser obtido realizando o mesmo experimento, mas agora com a luz polarizada horizontalmente. Quando a excitação é horizontal, como vemos na Fig. 2.4, a intensidade detectada será polarizada perpendicularmente à excitação, tanto para o polarizador orientado na vertical I_{HV} , quanto para o polarizador orientado na horizontal I_{HH} (Ito, et al., 2016).

$$I_{HV} = k S_V I_{\perp} \quad (2.24)$$

$$I_{HH} = k S_H I_{\perp} \quad (2.25)$$

Fazendo a razão entre essas duas relações e usando a equação (2.23), temos que:

$$G = \frac{S_V}{S_H} = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (2.26)$$

Substituindo G na equação (2.22):

$$\frac{I_{||}}{I_{\perp}} = \frac{I_{VV}}{I_{VH}} \frac{I_{HH}}{I_{HV}} = \frac{I_{VV}}{I_{VH}} \cdot \frac{1}{G} \quad (2.27)$$

E assim a anisotropia definida pela equação 2.19 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$r = \frac{\left(\frac{I_{||}}{I_{\perp}} \right) - 1}{\left(\frac{I_{||}}{I_{\perp}} \right) + 1} = \frac{I_{VV} - G I_{VH}}{I_{VV} + 2G I_{VH}} \quad (2.28)$$

3. Metodologia

3.1. Equipamentos

Nos experimentos descritos nesse trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- Espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 950 (Fig. 3.1) operando majoritariamente com passo de 1 nm e com uma varredura de 220 até 900 nm.



Figura 3.1. Fotografia do espectrofotometro Perkin Elmer, Lambda 950.

- Sistema de fluorescência PTI QM-1 (Fig.3.2) equipado com controlador de temperatura operando majoritariamente com fendas de 4 nm e potência de luz de 40 W, utilizando uma taxa de varredura de 1 nm/s.



Figura 3.2. Fotografia do Sistema de Fluorescência QM-1 da PTI - Photon Technology International.

- Sonicador Sonics Vibra-Cell VCX 130, potência 130 W (com ajuste) (Fig. 3.1), para preparação de vesículas unilamelares pequenas (SUV) operando majoritariamente (5 minutos ligados e 10 minutos desligado).



Figura 3.3. Fotografia do sonicador. (Sonics)

3.2. Materiais

Os antibióticos norfloxacin e ciprofloxacina, o complexo cobre-fenantrolina (Cu:Fen, Sigma 99%, 312,76 g/mol), a lecitina de ovo ($L\alpha$ -lecithin 99%, 758 g/mol) e o ácido esteárico (99%, 284,5g/mol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os surfactantes Pluronic F-127 (99%, 12600 g/mol), CTAB (99%, 364,45 g/mol) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes etanol e clorofórmio PA ou grau espectroscópico foram adquiridos de Vetec. Em todas as preparações foi utilizada água ultrapura (Milli Q). Na Fig. 3-4 encontram-se as estruturas moleculares de norfloxacin, cobre-fenantrolina e uma sugestão de associação entre a norfloxacin e a Cu:Fen.

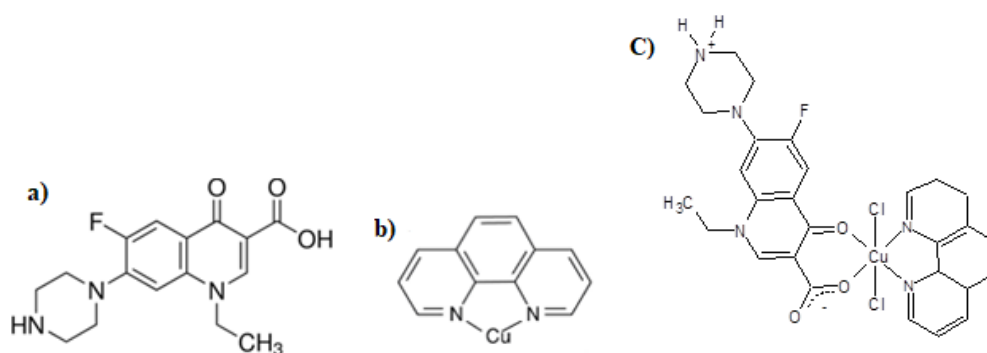


Figura 3.4. Estruturas moleculares: a) norfloxacin; b) Cu:Fen; c) sugestão de estrutura do complexo ternário de NFX:Cu:Fen

Os reagentes cisteína (L-cys), mercaptopropanosulfonato (MPS), glutathiona (GSH) foram também adquiridos da Sigma-Aldrich. Na Fig. 3-5 encontram-se as estruturas moleculares de cada um desses reagentes.

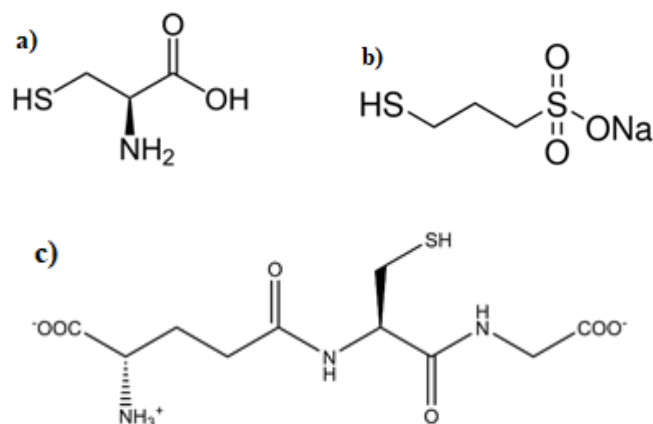


Figura 3.5. Estruturas moleculares: a) L-cisteína, b) mercaptopropanosulfonato, c) glutathiona.

Preparamos soluções estoques de norfloxacin em água, concentração de 1,0 mM. Para que solubilizasse em água nessa concentração, precisamos adicionar HCl na mesma concentração, para que predominasse sua forma catiônica. Também preparamos uma solução estoque de cobre fenantrolina em concentração 5 mM usando um tampão fosfato (PB) 10 mM, pH 7,4.

3.3. Métodos

3.3.1. Preparação de Lipossomos

Preparamos inicialmente 7,2 ml de solução estoque de lecitina de ovo (L α -lecithin Sigma 99%, 758 g/mol), concentração 10 mM, em clorofórmio, CHCl₃. Preparamos 1 ml de solução estoque de ácido esteárico (SA, 284 g/mol), em concentração 30 mM em etanol espectral.

Para a preparação das SUVs (vesículas unilamelares pequenas), em eppendorfs, adicionamos alíquotas de 1 ml da solução estoque de lecitina de ovo, evaporamos o clorofórmio da lecitina utilizando fluxo de nitrogênio ultrapuro, deixamos em vácuo durante 2 horas, após isso acrescentamos 1 ml de tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. Por fim adicionamos uma alíquota de 10 μ l da solução

estoque 1 mM de norfloxacin. E então agitamos a mistura em vortex. Em seguida levamos cada um dos eppendorfs para sonicação com sonda de 2 mm de diâmetro durante 5 minutos, em ciclos de 5 s/10 s (ligado/desligado), com amplitude de pulso de 75%. Avaliamos a obtenção das SUVs pela transparência da amostra (diminuição do espalhamento). A partir daí adicionamos a suspensão de SUVs a cubeta e titulamos com Cu:Fen usando a solução estoque 5 mM preparada anteriormente.

Preparamos também uma solução de controle, sem vesículas. Em uma cubeta de 1 ml com tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, adicionamos uma alíquota de 10 µl de norfloxacin e assim titulamos com as mesmas quantidades da solução estoque de Cu:Fen.

3.3.2. Experimentos com Pluronic F-127

O estudo da interação do surfactante não iônico Pluronic F-127 com a norfloxacin e seu complexo com cobre:fenantrolina foi dividido em duas partes. Na primeira queremos verificar se a interação da norfloxacin com Pluronic F-127 é capaz de detectar a transição de fase sol-gel que o polímero, em altas concentrações, sofre com o aumento de temperatura (hidrogel termosensível). Para isso, preparamos uma solução a 18% de PF-127 (540 mg/3ml em tampão PB 20mM, pH 7,4) e então adicionamos uma alíquota de 27 µl da solução estoque 1 mM de NFX.

A partir daí medimos a intensidade da fluorescência conforme aumentávamos a temperatura da solução. Medimos também a anisotropia da fluorescência de NFX em PF-127, na temperatura de 17°C, fase sol, e em uma temperatura de 33°C, após a transição de fase do PF-127.

Na segunda parte, estudamos a influência de micelas de PF-127 na formação de complexos ternários de Cu:Fen com NFX. Preparamos uma solução 5 mM de PF-127, que à temperatura ambiente (24°C) está acima da concentração micelar crítica, em tampão fosfato 20mM, pH 7,4. Adicionamos NFX a uma concentração fixa de 8 µM. Medimos a intensidade da fluorescência de NFX conforme titulamos essa solução com Cu:Fen e comparamos a supressão da fluorescência com a de uma solução controle de NFX a 8µM no mesmo tampão.

3.3.3. Experimentos com CTAB

O estudo referente à interação com micelas de CTAB será apresentado em duas partes: a primeira foi dedicada a estudar a interação entre as micelas e a norfloxacin; após isso, estudamos a formação do complexo ternário de Cu:Fen:NFX na presença de micelas de CTAB.

Preparamos uma solução estoque de CTAB com uma concentração molar de 300 mM em água miliQ, além disso utilizamos também a solução estoque de norfloxacin a 1mM.

Com o intuito de entender a associação entre a norfloxacin e o CTAB medimos a variação da intensidade da fluorescência de uma solução de 8 μ M de NFX em tampão 20 mM com pH 7,4 conforme íamos titulando essa solução com alíquotas da solução estoque de CTAB.

Investigamos também a influência do pH nesse processo. Para isso produzimos uma solução com 8 μ M de NFX e 30 mM de CTAB em tampão universal e medimos a variação da fluorescência ao variarmos o pH, começando em pH 11,2 e diminuindo até 4.2 ao adicionar pequenas alíquotas de HCl.

Para investigar a formação do complexo ternário de cobre em pH 7,4 e em presença de micelas de CTAB, titulamos uma solução 8 μ M de NFX e 30 mM de CTAB em tampão PB 20mM, pH 7,4 com a solução estoque de Cu:Fen 5 mM, e medimos a variação da fluorescência, comparando com a de solução controle em ausência de CTAB.

3.3.4. Experimentos com nanobastões de ouro

Os nanobastões foram sintetizados pela Profa. Greice Kelly Bezerra da Costa, UFRRJ, usando o método de semente, crescendo em solução de CTAB. Nosso objetivo nessa etapa é testar a associação do antibiótico norfloxacin (NFX) com nanobastões estabilizados com diferentes camadas de recobrimento, sejam surfactantes, polímeros ou outros reagentes.

Inicialmente a solução coloidal de nanobastões foi lavada, usando o seguinte procedimento: primeiro centrifugamos, 6000 rpm, 60 min, os nanobastões,

removemos o sobrenadante e ressuspendemos usando água deionizada para reduzir a concentração de CTAB, realizamos três esse ciclo por três vezes e assim obtivemos uma concentração de CTAB um pouco abaixo da CMC. Após isso, a amostra foi diluída para uma absorbância $A_{680} \sim 0,7$ em tampão fosfato pH 7,4, 1 mM.

Com intuito de modificar a superfície dos nanobastões e estudar sua estabilidade, submetemos suspensões a diferentes reagentes:

- Reagentes contendo sulfidrilas: cisteína, mercaptopropanosulfonato (MPS), glutathione
- Surfactantes: dodecil sulfato de sódio (SDS), Pluronic F-127, CTAB.
- Citrato.

Para isso, produzimos uma solução de nanobastões em tampão PB, 1 mM, pH 7,4, e separamos em frascos distintos, aos quais adicionamos os respectivos reagentes para obter uma concentração final em torno de 10 mM. Após isso, as amostras foram deixadas reagindo por três dias, sob refrigeração, e ao final o espectro de absorção de cada amostra era registrado.

Em seguida, acrescentamos alíquotas da solução estoque de norfloxacin, e fizemos o acompanhamento dos espectros de absorção e de fluorescência.

Para o surfactante CTAB, utilizamos duas concentrações: uma abaixo da CMC, com nanobastões obtidos após a lavagem, e em concentração de 3 mM, superior à CMC. Acompanhamos a absorbância dos nanobastões durante os primeiros quatro dias.

Em seguida, adicionamos alíquotas de NFX a cada uma das suspensões de nanobastões e acompanhamos a absorbância e fluorescência das suspensões. Realizamos também medidas de anisotropia de fluorescência.

3.4. Modelos

3.4.1. Determinação de constante de estabilidade de complexos metálicos a partir de titulações fluorimétricas

Em uma experiência de titulação, a concentração do ligante ($L=NFX$) é mantida constante e o metal M , na realidade sal metálico (Cu:Fen), é gradualmente adicionado. O espectro de fluorescência é registrado como função da concentração

de M . As mudanças nestes espectros após a formação do complexo misto nos permitem determinar a constante de estabilidade. (Valeur, 2002)



$$K_s = \frac{[ML]}{[M][L]} \quad (3.2)$$

Seja Y_0 a intensidade de fluorescência do ligante livre. Em experimentos de fluorescência, a absorbância no comprimento de onda de excitação deve ser menor do que $\sim 0,1$ para evitar correções de efeito filtro. Então, em determinado comprimento de onda, Y_0 é proporcional à concentração c_L :

$$Y_0 = a c_L \quad (3.3)$$

Na presença de um excesso de metal de modo que o ligante esteja completamente ligado ao metal, Y atinge o valor limite Y_{lim} :

$$Y_{lim} = b c_L \quad (3.4)$$

onde, em experimentos de fluorescência, a e b são proporcionais tanto ao coeficiente de absorção molar na excitação quanto ao rendimento quântico do ligante L e do complexo ML , respectivamente. Deve-se ter em mente que, se M é um supressor de fluorescência, $b=0$ e $Y_{lim} = 0$.

Após a adição de uma determinada quantidade de metal a uma concentração c_M , a intensidade de fluorescência torna-se:

$$Y = a[L] + b[ML] \quad (3.5)$$

Usando a conservação de massa temos que a equação de equilíbrio do ligante e do metal é dado por:

$$c_L = [L] + [ML] \quad (3.6)$$

$$c_M = [M] + [ML] \quad (3.7)$$

Usando as equações 3.2 a 3.7, acima, além da aproximação dada por Benesi-Hildebrand podemos facilmente derivar a equação abaixo: (Jr, et al., 1968)

$$\frac{Y_0 - Y}{Y - Y_{lim}} = K_s [M] \quad (3.8)$$

Se a concentração do metal $[M]$ for aproximadamente igual à concentração total adicionada c_M , e se Y_{lim} não for conhecido, porque experimentalmente não daria para atingir uma concentração suficientemente alta do metal, é mais conveniente utilizar a equação:

$$Y - Y_0 = (Y_{\text{lim}} - Y_0) \frac{[M]}{(1/K_s) + [M]} \quad (3.9)$$

ou na forma de duplo recíproco, para linearizar:

$$\frac{1}{Y - Y_0} = \frac{1}{(Y_{\text{lim}} - Y_0)} + \frac{1}{(Y_{\text{lim}} - Y_0) K_s [M]} \quad (3.10)$$

Ajustando a equação 3.9 ao gráfico de $(Y - Y_0)$ versus $c_M \approx [M]$, encontra-se K_s e Y_{lim} . Alternativamente, pode-se usar o gráfico de duplo recíproco $(Y - Y_0)^{-1}$ versus $[M]^{-1}$ para obter K_s e Y_{lim} através dos coeficientes linear e angular do gráfico (gráfico de Benesi-Hildebrand).

No entanto, o procedimento usado acima (Eq. 3.9 ou 3.10) só é válido no caso de $c_M \approx [M]$. Em geral essa aproximação não é válida no caso de constantes de associação muito grandes. É surpreendente o número de trabalhos em que os autores não se dão conta de que a aproximação não é válida. Isto é quando $K_s c_L \gg 1$ (ver o gráfico da Fig. 3-6).

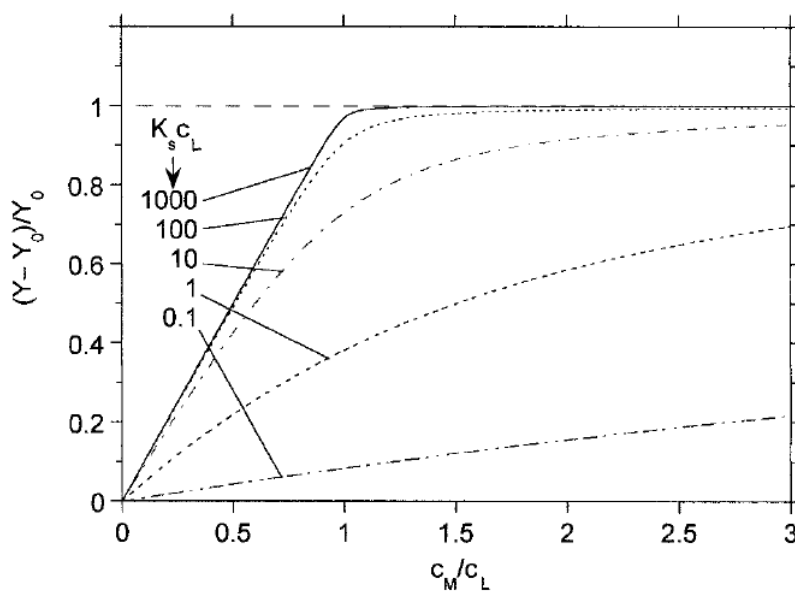


Figura 3.6. Curvas de titulação de fluorescência para o complexo metal-ligante 1:1, de acordo a Eq. 3.14.

Vamos, em seguida, obter a equação de $(Y - Y_0)$ em função de c_M , para o caso de $c_M \neq [M]$. Usando 3.6 e 3.7 em 3.2, temos:

$$K_s = \frac{[ML]}{(c_L - [ML]) \cdot (c_M - [ML])} \quad (3.11)$$

$$[ML]^2 - (c_L + c_M + \frac{1}{K_s})[ML] + c_M c_L = 0 \quad (3.12)$$

Resolvendo a equação de segundo grau (3.12) para $[ML]$, chegamos à seguinte expressão:

$$[ML] = \frac{1}{2} \cdot \left[\left(c_L + c_M + \frac{1}{K_s} \right) - \sqrt{\left(c_L + c_M + \frac{1}{K_s} \right)^2 - 4c_L c_M} \right] \quad (3.13)$$

Em função da intensidade de fluorescência a Eq. 3.11 fica:

$$\frac{[ML]}{c_L} = \frac{Y - Y_0}{Y_{lim} - Y_0} = \frac{1}{2} \left[\left(1 + \frac{c_M}{c_L} + \frac{1}{c_L K_s} \right) - \sqrt{\left(1 + \frac{c_M}{c_L} + \frac{1}{c_L K_s} \right)^2 - 4 \frac{c_M}{c_L}} \right] \quad (3.14)$$

A constante de associação (ou estabilidade, ou ligação) K_s pode ser obtida através de um ajuste por mínimos quadrados da equação 3.14 ao gráfico de $Y - Y_0$ versus c_M . Y_{lim} pode ser deixado como parâmetro a ajustar.

3.4.2. Titulação ácido-base

Como dito anteriormente as propriedades fotoluminescentes das fluorquinolonas são dependentes das propriedades do meio, especialmente o pH. Por isso é de extrema importância entender a influência do pH na interação dos surfactantes com as fluorquinolonas.

Nessa seção discutiremos o modelo amplamente usado para estudar experiências de titulação de pH (Aires, 2012). Para isso vamos considerar uma concentração do fluoróforo baixa para se manter a relação linear entre essa grandeza e a intensidade de fluorescência.

A intensidade de fluorescência, Y , em cada comprimento de onda é dada por uma combinação linear das intensidades devidas às duas espécies do fluoróforo, uma na forma ácida, A , e a outra na forma básica, B .

$$Y = a[A] + b[B] \quad (3.13)$$

onde a e b são proporcionais ao coeficiente de absorção molar e ao rendimento quântico de A e B , respectivamente. Quando o fluoróforo está completamente na forma ácida ou básica, a intensidade de fluorescência é dada, respectivamente, por:

$$\begin{aligned} Y_A &= ac_0 \\ Y_B &= bc_0 \end{aligned} \quad (3.14)$$

onde

$$c_0 = [A] + [B] \quad (3.15)$$

Substituindo em (3.13), a e b tirados de (3.14) e c_0 de (3.15), temos:

$$\frac{[B]}{[A]} = \frac{Y_A - Y}{Y - Y_B} \quad (3.16)$$

Logo usando a conhecida equação de Henderson-Hasselbalch:

$$pH = pK_a + \log \frac{[B]}{[A]} \quad (3.17)$$

Temos que, em função das intensidades de fluorescência,

$$pH = pK_a + \log \left(\frac{Y_A - Y}{Y - Y_B} \right) \quad (3.18)$$

ou

$$Y = \frac{Y_A 10^{pK_a} + Y_B 10^{pH}}{10^{pK_a} + 10^{pH}} \quad (3.19)$$

O valor do pK_a pode então ser obtido através de ajuste com a Eq. (3.19), por mínimos quadrados, dos dados de Y em função do pH .

4. Resultados e Discussões

4.1. Associação de norfloxacinina e seus complexos de cobre com lipossomos

Os espectros de fluorescência da norfloxacinina titulada com cobre fenantrolina (Cu:Fen) em presença das vesículas unilamerares pequenas (SUVs) preparadas com diferentes concentrações de ácido esteárico (AE), estão apresentadas na Fig. 4.1.

Para realizar essas medidas foram utilizadas SUVs preparadas com diferentes proporções molares de AE, com a intenção de variar a carga superficial das vesículas e assim entender a influência da carga na formação do complexo ternário NFX:Cu:Fen. Queremos também comparar com os resultados obtidos em presença de micelas do surfactante aniônico SDS.

Os espectros se encontram na ordem de 20% ,40% e 60% de AE com relação a eggPC. Ao observar as medidas abaixo (Fig. 4.1) podemos notar que houve um deslocamento do pico de fluorescência da NFX de aproximadamente 407 nm para aproximadamente 417 nm. É importante lembrar que o pico em 407 nm ocorre em tampão PB pH 7,4, onde a NFX se apresenta predominantemente zwitteriônica. Tanto em pH mais ácido, quanto em micelas de SDS, a NFX apresenta um pico deslocado para o vermelho (Luiz, 2009).

Sabendo que na vizinhança das vesículas aniônicas o pH local se encontra mais baixo do que na região longe das micelas, podemos explicar o deslocamento para o vermelho observado em presença das SUVs, lembrando que as moléculas de NFX próximas de vesículas aniônicas apresentariam o sítio amino protonado, ou seja no estado catiônico. Isso é uma indicação de que há uma associação entre moléculas de NFX e as vesículas.

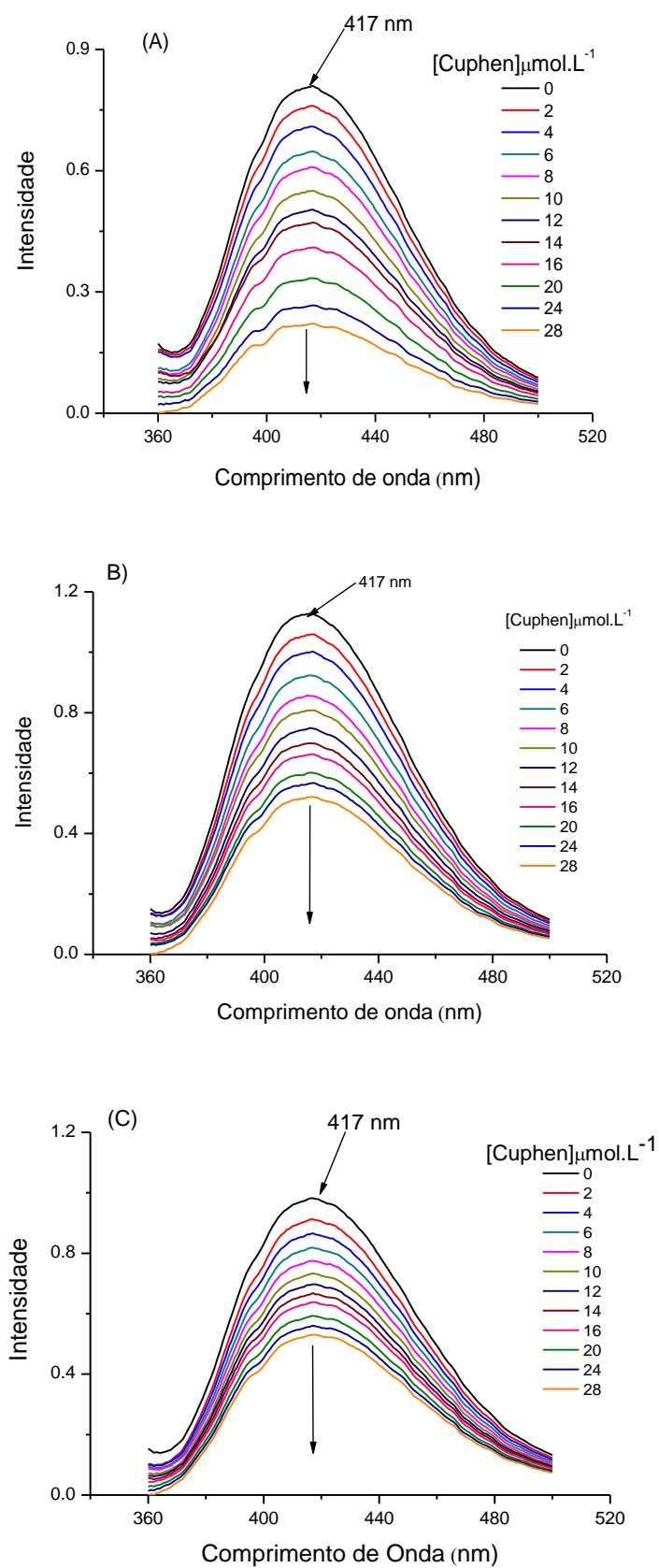


Figura 4.1. Espectros de fluorescência da norfloxacin com concentrações crescentes de Cu:Fen, em presença de SUVs com diferentes razões molares AE/eggPC (a) 0,20, (b) 0,40 e (c) 0,60.

Podemos notar ainda que a supressão de fluorescência causada pelos íons de cobre Cu (II) do complexo Cu:Fen é tanto mais eficiente quanto menor a proporção de AE na formação das vesículas, ao contrário do que foi observado para experiências com micelas de SDS. (Vignoli, 2013)

Na Fig. 4.2 vemos (a) o gráfico da Stern-Volmer para supressão de fluorescência, $(F_0/F - 1)$ vs $[Cu:Fen]$, e (b) o gráfico de $(F_0-F)/F_0$ vs $[Cu:Fen]$, de acordo com os espectros de fluorescência da Fig. 4.1. F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor.

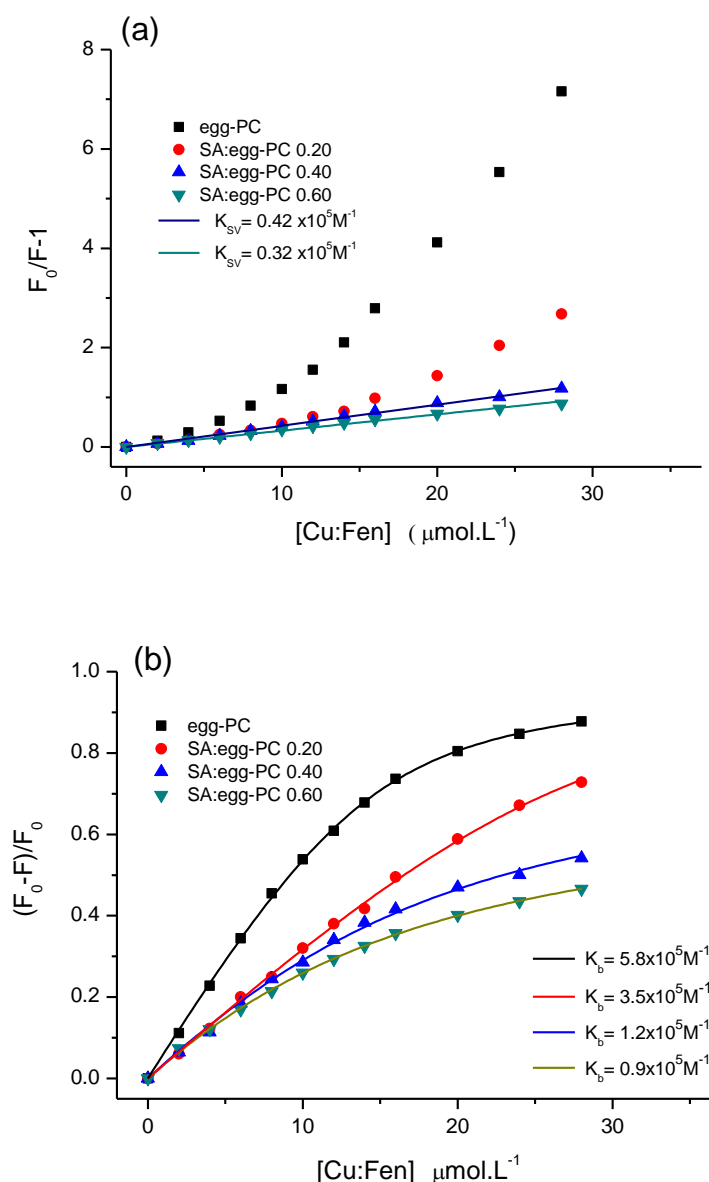


Figura 4.2. (a) Gráficos de Stern-Volmer de supressão de fluorescência de NFX por Cu:Fen na presença de SUVs com diferentes concentrações de AE:eggPC. (b) Gráfico de $(F_0-F)/F_0$ em função da concentração de Cu:Fen, sendo F_0 e F as intensidades de fluorescência na ausência e em presença de determinada concentração de Cu:Fen, respectivamente.

A partir dos dados experimentais da Fig. 4.2 (b) foi possível obter as constantes de ligação para a formação do complexo ternário Cu:Fen:NFX, usando a expressão (Eq. 3.14) apresentada na seção 3.4. As constantes de associação de Cu:Fen com NFX foram todas da ordem de 10^5 M^{-1} . Ao analisar os resultados obtidos, percebemos que a constante de associação K_b de Cu:Fen com NFX diminui à medida que a carga negativa das vesículas aumenta (representada pelo aumento da proporção de ácido esteárico): $5,8 > 3,5 > 1,2 > 0,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, para SUVs com relação molar AE/eggPC de 0, 0,2, 0,4 e 0,6, respectivamente. Esse resultado nos indicaria que a interação com as SUVs estaria protegendo as moléculas de NFX da formação do complexo ternário.

No entanto, é preciso destacar que esse resultado não se repetiu em outra série de experimentos, em que obtivemos constantes de associação não correlacionadas com a fração de AE nas vesículas. Visto que não houve reprodutibilidade, consideramos que não estávamos conseguindo controlar todas as variáveis e não insistimos nesse estudo.

4.2.

Norfloxacin e o complexo Cobre:Fen:NFX em Micelas de Pluronic F-127

4.2.1.

Associação da Norfloxacin com Micelas de PF-127

De acordo com a literatura (Gioffredi, et al., 2016; Boal, 2012) a viscosidade do Pluronic F-127 tende a aumentar com o aumento da temperatura, devido à transição de fase. Buscando ver a alteração da associação das micelas de PF-127 com a norfloxacin, provocada pela transição de fase, medimos a variação da intensidade da fluorescência com o aumento da temperatura. O gráfico abaixo (Fig. 4.3) apresenta a variação de fluorescência da NFX em função da temperatura, em presença de PF-127. Ao analisar esse gráfico, podemos perceber a transição de fase, à temperatura em torno dos 20°C , o que corresponde ao encontrado na literatura (Gioffredi, et al., 2016). Ou seja, a NFX associa-se a micelas de PF-127 e sua fluorescência é capaz de detectar a transição de fase desse copolímero.

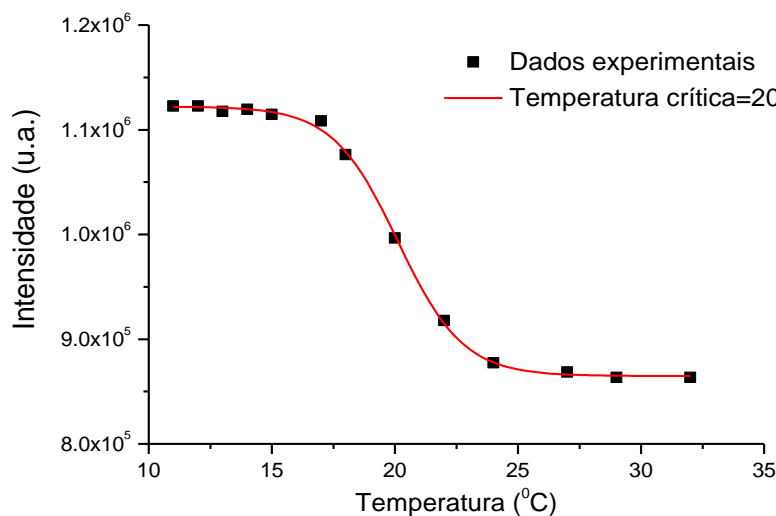


Figura 4.3. Variação da intensidade de fluorescência de NFX (8 μ M) em presença do copolímero PF-127, com aumento temperatura.

A anisotropia de fluorescência, r , dada pela expressão 2.19 é comumente usada para fornecer informações sobre tamanho e forma das moléculas, além de ser utilizada para investigar a interação entre moléculas. Utilizamos medidas de anisotropia para verificar se a transição de fase de PF-127, associada à variação de temperatura, tem influência no tempo de correlação rotacional das moléculas de NFX associadas às micelas de PF-127. Comparamos a anisotropia de fluorescência das moléculas de NFX em presença de PF-127, 18%, e em solução aquosa, que foi usada como referência. Em PF-127, medimos a anisotropia da NFX abaixo e acima da temperatura crítica de transição de fase do copolímero, ou seja, nas temperaturas de 18°C e 33°C, respectivamente. A Fig. 4.4 apresenta o gráfico da anisotropia (Eq. 2.19) calculada em diferentes comprimentos de onda.

Como podemos observar, a anisotropia de fluorescência da NFX em solução aquosa apresentou um valor muito pequeno, praticamente nulo, que pode ser justificado pelo fato de a NFX ser um fluoróforo muito pequeno, além de apresentar grandes velocidades de rotação devido à baixa viscosidade em solução aquosa. Desse modo, a NFX apresenta um tempo de correlação rotacional muito menor que o tempo de emissão de fluorescência e assim apresenta uma anisotropia nula (Lakowicz, 1999). Percebemos ainda que a anisotropia em presença de PF-127 aumentou um pouco, mas se manteve constante, em torno de 0,04, nas temperaturas abaixo e acima da transição de fase. Pode-se inferir que a associação de NFX com

micelas de PF-127 não muda consideravelmente o tempo de correlação rotacional das moléculas de NFX. Outrossim, temos ainda que a microviscosidade na região do gel onde se localiza a NFX não muda com a transição de fase, apesar de macroscopicamente a fluidez mudar drasticamente.

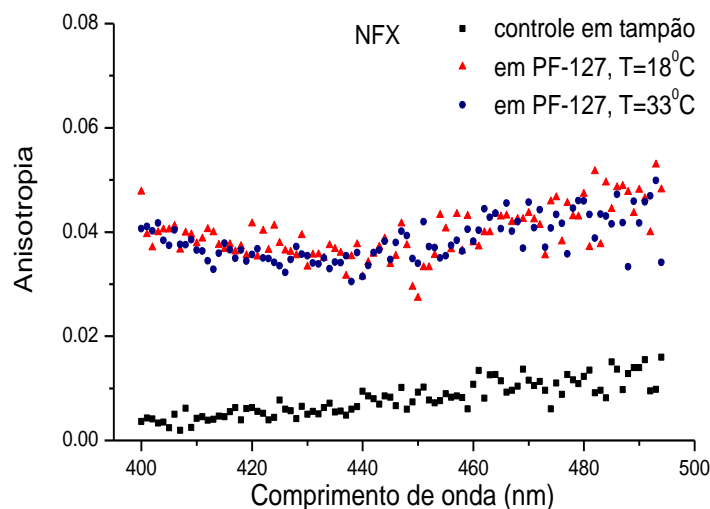


Figura 4.4. Anisotropia de fluorescência da NFX em tampão fosfato, 23°C, e em presença de PF-127, 18 %, em temperatura abaixo (18°C) e acima (33°C) da transição de fase sol-gel.

Como mostrado no gráfico acima, não existem mudanças significativas das medidas de anisotropia com o aumento de temperatura que provoca a transição sol-gel, isto é, apesar da enorme mudança na macroviscosidade da amostra, devido à transição de fase, a microviscosidade em torno do NFX não sofre alteração.

4.2.2.

Influência de PF-127 na associação de norfloxacin com o complexo cobre fenantrolina

Para determinar a influência de PF-127 na estabilidade do complexo de cobre, estudamos a associação de Cu:Fen com NFX na presença de PF-127. Analisamos a supressão de fluorescência da NFX conforme aumentamos a concentração de Cu:Fen, tanto em presença quanto na ausência de micelas de Pluronic. Aqui, as concentrações de PF-127 foram bem abaixo das necessárias para ocorrer a transição sol-gel, mas suficientemente altas para a formação de micelas.

Os espectros da Fig. 4.5 mostram a diminuição na intensidade de fluorescência (supressão) causada pela interação dos íons Cu (II) de Cu:Fen com a NFX.

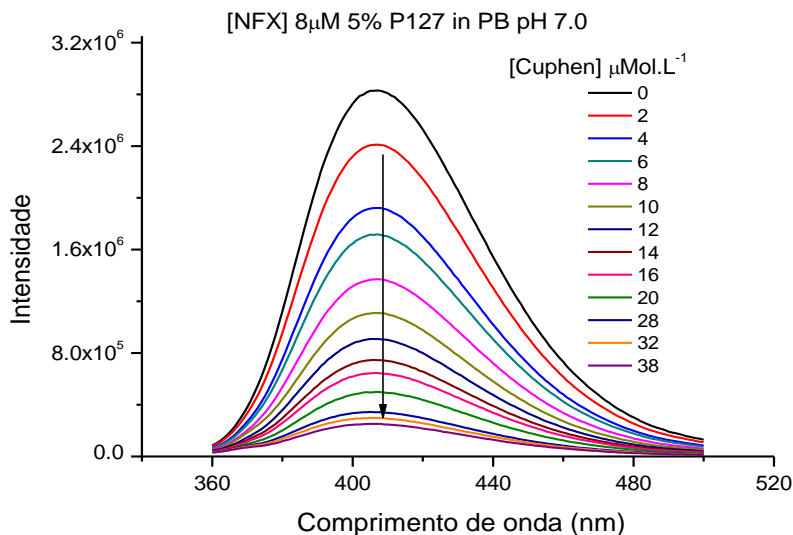


Figura 4.5. Variação da intensidade da fluorescência de NFX com o aumento da concentração de Cu-Fen, na presença de micelas Pluronic F-127 (5% = 50 mg/ml \approx 4mM).

Não é possível observar muita mudança na fluorescência de NFX, ao comparar o espectro em presença (Fig. 4.5) e na ausência (Fig. 4.6) das micelas de PF-127. Isso por que o PF-127 é um surfactante não iônico e, portanto, não há interações eletrostáticas entre as suas micelas e as moléculas de NFX. Esse comportamento, contrário ao observado na interação de NFX com micelas de SDS (Vignoli, 2013), reflete a grande influência das interações eletrostáticas na interação.

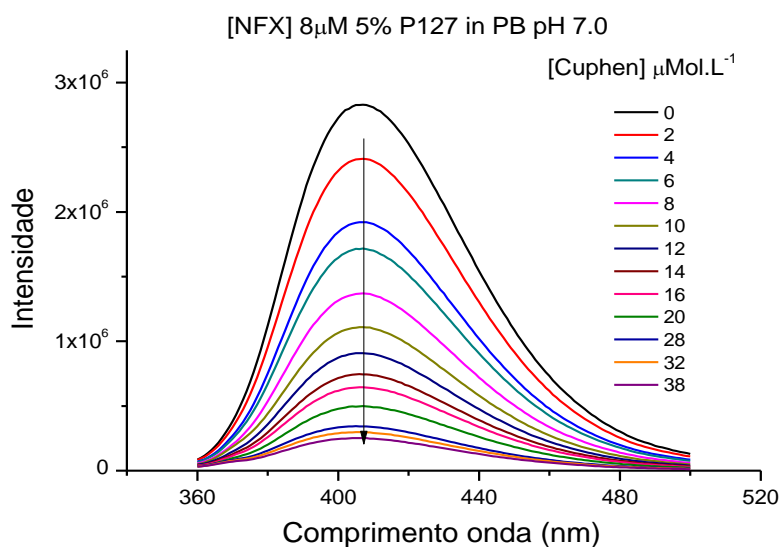


Figura 4.6. Variação da intensidade da fluorescência de NFX com o aumento da concentração de Cu:Fen, na ausência de micelas PF-127.

Para obter a constante de associação da norfloxacin com Cu:Fen em presença e na ausência de micelas de PF-127, usamos o modelo de um sítio de ligação (Eq. 3.14). Para isso, plotamos na Fig. 4.7 o gráfico de $(F_0 - F)/F_0$ em função da concentração de Cu:Fen, de acordo com os espectros das Figs. 4.5 e 4.6, sendo F_0 e F as intensidades de fluorescência em ausência e presença do supressor (Cu:Fen).

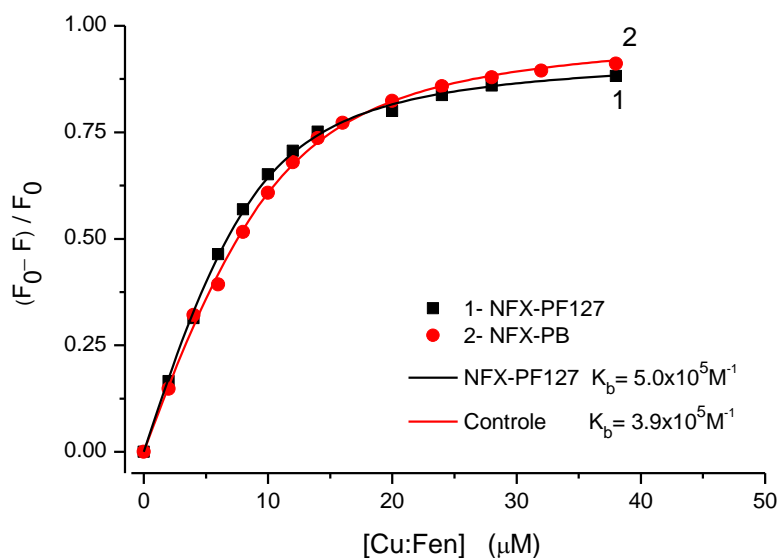


Figura 4.7. Gráfico de $(F_0 - F)/F_0$ em função da concentração de Cu:Fen, na presença ■ e na ausência ● de PF-127. F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e em presença de determinada concentração de Cu:Fen, respectivamente.

Usando o modelo descrito no Capítulo 2, seção 2.2.4, conseguimos determinar a constante de associação de Cu:Fen com NFX em presença de micelas de PF-127, que foi $K_b = (5,0 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, enquanto na ausência foi $K_b = (3,9 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, o que revela uma diferença pequena, indicando que a presença das micelas de PF-127 blinda pouco a associação de Cu:Fen com a norfloxacin. O que é corroborado com as medidas realizadas anteriormente.

Sabemos que a solubilidade da norfloxacin é profundamente depende das características da solução, como por exemplo pH, força iônica entre outras características. Sabemos também que em pH 7,4 a norfloxacin não exibe um comportamento hidrofóbico acentuado. Lembrando que nas micelas de Pluronic as interações mais proeminentes são as interações hidrofóbicas, podemos entender o motivo da baixa interação entre as micelas de PF-127 e a moléculas de NFX.

4.3.

Norfloxacin e o complexo Cobre:Fen:NFX em Micelas de CTAB

4.3.1.

Associação da Norfloxacin com Micelas de CTAB

Com intuito de estudar a interação da norfloxacin com micelas do surfactante catiônico CTAB, primeiro titulamos a solução aquosa de NFX $8 \mu\text{M}$ preparada em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4, com concentrações crescentes de CTAB. A Fig. 4.8 mostra as mudanças no espectro da fluorescência da NFX com o aumento da concentração de CTAB. Esse aumento provoca uma pequena diminuição na intensidade da fluorescência e quase nenhuma alteração na posição do pico ou na forma do espectro.

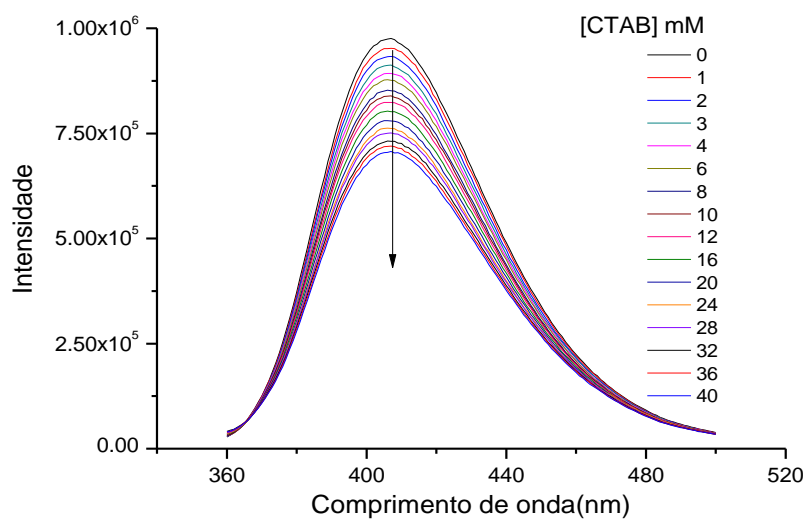


Figura 4.8. Espectros de fluorescência da solução de NFX 8 μM titulada com concentrações crescentes de CTAB (tampão fosfato de 10 mM, pH 7,4)

A redução da intensidade da fluorescência observada nos espectros da Fig. 4.8 pode ser explicada pelo fato que as moléculas de NFX, por se apresentar no estado zwitteriônico pode ser atraída para a superfície catiônica da micela de CTAB, que, por ter o pH local mais básico, promove a desprotonação do sítio carboxílico, tornando aniônica a molécula de NFX. Como no estado aniônico a NFX não é fluorescente, a fluorescência da solução diminui com o aumento da concentração de CTAB.

Com o objetivo de encontrar a constante de associação entre o CTAB e a NFX, plotamos a variação dos espectros acima, $(F_0 - F)/F$, em função da concentração de CTAB (Fig. 4.9). Analisamos o gráfico da Fig. 4.9 usando modelo de dois estados (Eq. 3.14).

A partir disso obtivemos uma constante de associação da norfloxacin com o CTAB, $K_b = (62 \pm 1) \text{ M}^{-1}$, que representa que as micelas de CTAB interagem muito pouco com a norfloxacin.

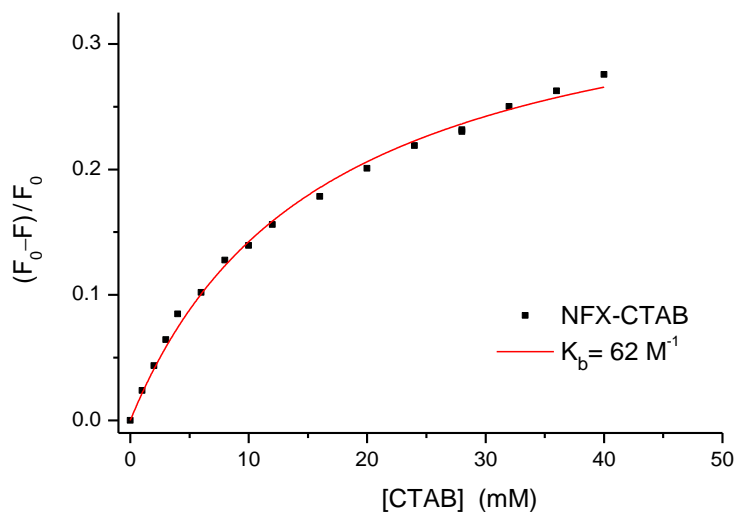


Figura 4.9. Variação da intensidade de fluorescência de NFX com a concentração de CTAB. F_0 e F são as intensidades dos picos de fluorescência na ausência e na presença de CTAB, respectivamente.

4.3.2.

Influência do pH na associação da Norfloxacin com CTAB

Como a norfloxacin é fortemente afetada por mudanças no equilíbrio ácido-base, porque apresenta vários sítios de protonação, o pH pode ter grande influência na sua interação com micelas de CTAB, catiônicas. Para estudar essa influência, fizemos medidas da absorção variando o pH da solução de NFX em presença de micelas de CTAB. Com base na constante de associação NFX-CTAB em pH 7,4, encontramos que para $[CTAB] = 16$ mM, 50% de moléculas de NFX encontram-se ligadas a micelas. Usamos $[CTAB] = 25$ mM para estudar a influência do pH na associação com NFX (60% ligada, em pH 7,4). Os espectros de absorção encontram-se na Fig. 4.10.

Acompanhamos as alterações que ocorrem no espectro de absorção (Fig. 4.10) e medimos a variação da intensidade da fluorescência (Fig. 4.11) conforme diminuimos o pH.

No espectro de absorção percebemos um deslocamento para o vermelho do pico de mais alta intensidade, em 260 nm, para valores em torno de 270 nm conforme o pH diminuía. Percebemos ainda uma perda de resolução na banda de absorção como um todo, referente ao comprimento de onda 300-350nm. Tais

resultados também foram observados por Luiz na ausência de vizinhança micelar. (Luiz, 2009)

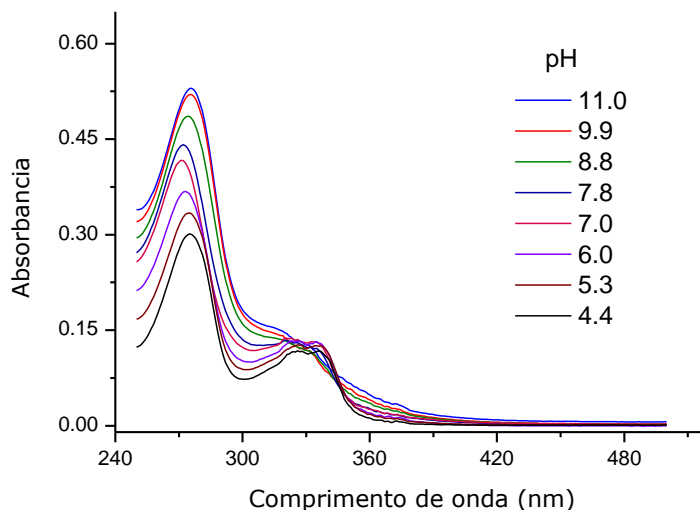


Figura 4.10. Espectros de absorção da norfloxacin em diferentes valores de pH. [CTAB]=25 mM.

A norfloxacin em pH alto se apresenta com o grupo amino e o grupo ácido desprotonados, ou seja, no estado aniônico. Nesse estado a norfloxacin não é fluorescente. À medida que o pH vai abaixando o grupo amina vai ficando protonado e ela começa a ficar fluorescente, apresentando um pico de emissão em torno de 407-410 nm (Fig. 4.11). À medida que o pH vai ficando ácido, o grupo ácido vai-se protonando (ficando neutro) e a norfloxacin se apresenta em estado catiônico. Com isso, o espectro de emissão de fluorescência começa a se deslocar para comprimentos de ondas maiores, deslocamento batocrômico (para o vermelho), com pico em torno de 437-440 nm.

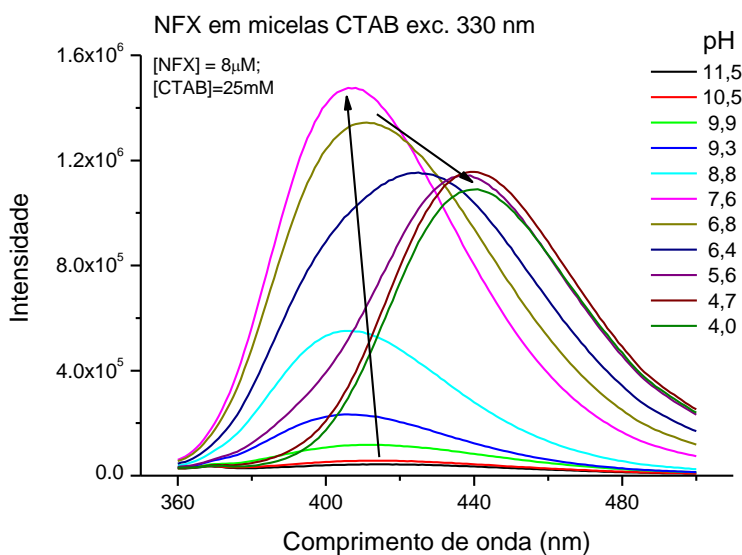


Figura 4.11. Espectros de fluorescência de NFX em micelas de CTAB, com a variação do pH.

A variação da intensidade de fluorescência no comprimento de onda 407 nm (protonação da amina) e 452 nm (protonação do ácido), conforme o pH ia diminuindo, está plotada na Fig. 4.12. Podemos notar que os pK_a da norfloxacin em presença CTAB tiveram uma pequena alteração quando comparados com os obtidos na ausência de CTAB, o que pode indicar que a variação do pH da solução afeta pouco a associação da molécula de norfloxacin com as micelas de CTAB.

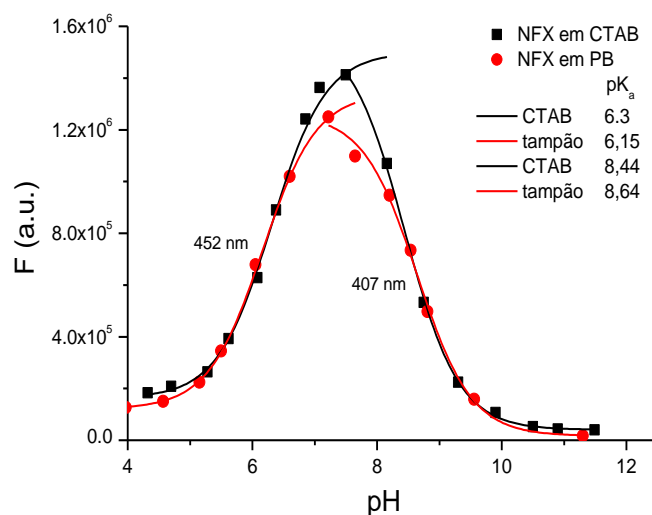


Figura 4.12. Variação da intensidade de fluorescência de NFX com o pH, em presença de micelas de CTAB. [CTAB]=25 mM. (medidas em tampão, (Luiz, 2009).)

4.3.3.

Influência de CTAB na associação de Cu:Fen com norfloxacin

Para determinar a influência do CTAB na estabilidade dos complexos de cobre, estudamos a associação de Cu:Fen com NFX na presença de CTAB. Analisamos as alterações no espectro de fluorescência conforme aumentamos a concentração de Cu:Fen tanto em presença quanto na ausência de micelas de CTAB (Fig. 4.13).

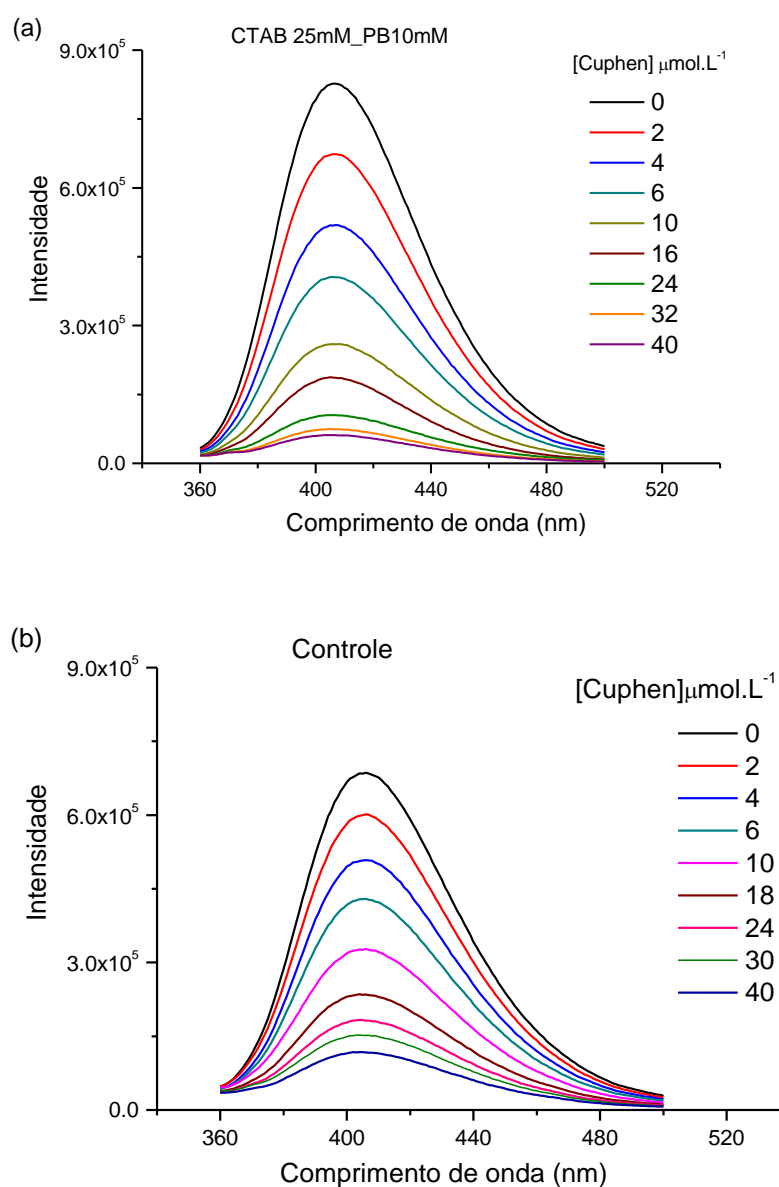


Figura 4.13. Variação da intensidade de fluorescência com o aumento da concentração da Cu:Fen. (a) na presença e (b) na ausência de CTAB.

Os espectros da Fig. 4.13 mostram a variação da intensidade de fluorescência da norfloxacin em tampão fosfato em pH 7.4, na presença (a) e na ausência (b) de CTAB, ao adicionamos alíquotas de Cu:Fen. Como o cobre é um supressor de fluorescência, através da diminuição da fluorescência da NFX, ligada ou não ligada a micelas de CTAB, podemos obter a influência do CTAB na formação do complexo ternário.

Para comparar a formação do complexo ternário, plotamos a variação da intensidade da fluorescência da norfloxacin em função da concentração de cobre fenantrolina, como podemos ver na Fig. 4.14.

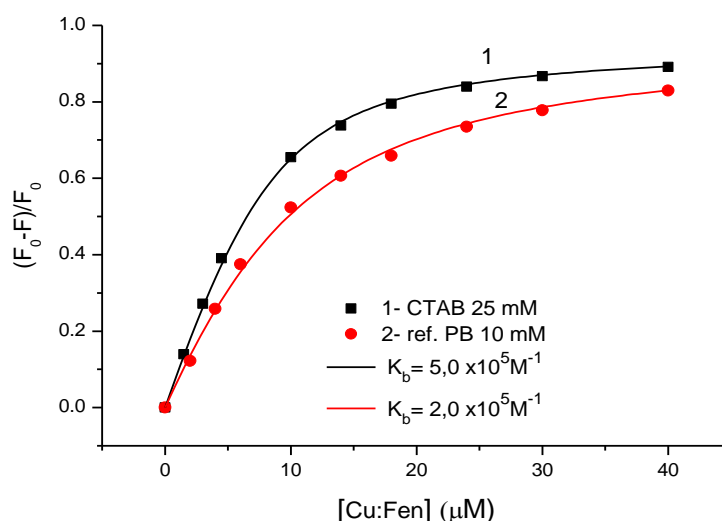


Figura 4.14. Variação de fluorescência de NFX, normalizada, em presença e ausência de CTAB, em função da concentração de Cu:Fen. F_0 e F são as intensidades dos picos de fluorescência na ausência e na presença de Cu:Fen, respectivamente.

Usando a variação de fluorescência no comprimento de onda 407 nm (Fig. 4.14) e considerando o modelo de dois estados para determinação da constante de associação, foi possível analisar quantitativamente a interação e obter a constante de associação entre Cu:Fen e NFX em micelas de CTAB. O valor encontrado para a constante de associação na presença de micelas foi duas vezes e meia maior ($K_b = 5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) do que o obtido para NFX em tampão fosfato ($K_b = 2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$).

Isso indica que a formação do complexo ternário é de fato facilitada pela presença de micelas de CTAB. No entanto, a diferença entre essas duas constantes não é tão proeminente, o que mostra que a NFX interage fracamente com as micelas de CTAB. Isso pode ser explicado pela fórmula estrutural desse surfactante, já que, ao contrário do SDS, a cabeça polar catiônica do CTAB é blindada pelos 3 radicais

metila, não deixando a carga positiva dessa cadeia tão acessível como no caso da cabeça polar aniônica do SDS.

4.4.

Associação de norfloxacin com nanobastões de ouro (AuNR)

Nesses experimentos foram utilizados nanobastões de ouro, cedidos pela Profa. Greice Bezerra da Costa, UFRRJ, produzidos por via química em presença de CTAB. Estes foram caracterizados usando medidas de absorção UV-Visível, tendo apresentado espectro com duas bandas plasmônicas características de nanobastões (Fig. 4.15). Percebemos uma em 516 nm, que aparece também em nanopartículas de ouro, e a outra, cuja posição depende fortemente da razão de aspecto dos nanobastões, apareceu em 680 nm nesse lote. Usamos AuNRs em concentrações tais que absorvância era $A_{680} \approx 1,0$. De acordo com a literatura podemos considerar o coeficiente de extinção é aproximadamente igual a $\epsilon = 3,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Orendorf, et al., 2006).

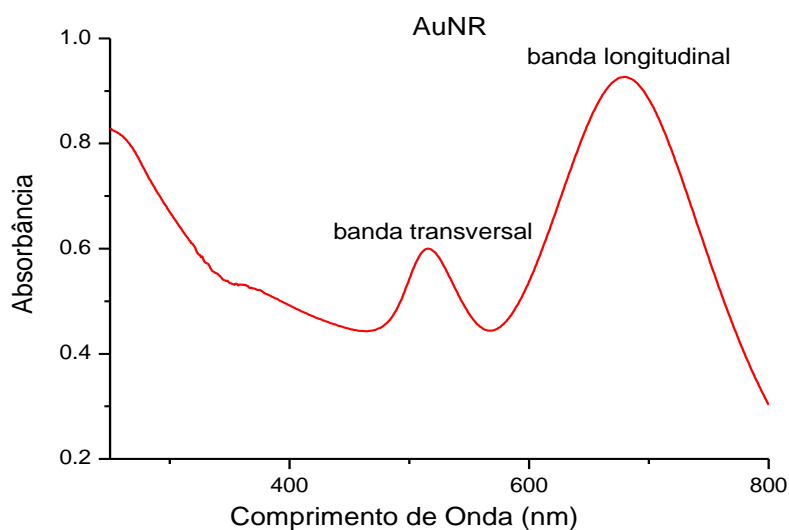


Figura 4.15. Espectro de extinção dos nanobastões de ouro utilizados nesse trabalho.

Obtivemos também o espectro de absorção da NFX em concentração de 20 μM em tampão PB 1 mM e pH 7,4, para funcionar como controle de todas as experiências subsequentes (Fig. 4.16). O espectro de absorção, nessas condições, apresenta uma banda com máxima absorção em 272 nm e outra com dois picos em 324 e 335 nm. É importante observar que na concentração de 20 μM $A_{272} \sim 0,6$ e

$A_{330} \sim 0,2$ e com esses valores o efeito filtro em fluorescência pode se tornar relevante.

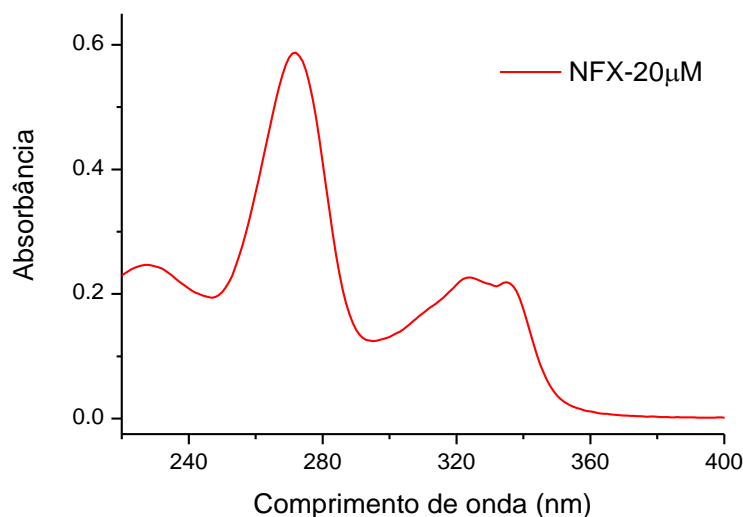


Figura 4.16. Espectro de absorção de norfloxacin, pH 7.4.

É importante lembrar que as moléculas de CTAB que recobrem os nanobastões apresentam carga positiva em solução. Assim, os AuNRs têm sua superfície protegida pelas cadeias hidrofóbicas do surfactante e são estabilizados pela interação repulsiva entre as cargas elétricas positivas superficiais dos nanobastões, mantendo-se em suspensão coloidal.

Para verificar se moléculas do antibiótico norfloxacin associam-se aos nanobastões, foi acrescentada uma alíquota de norfloxacin para deixar a solução com uma concentração de 20 μM , de NFX.

Logo em seguida medimos a absorbância da solução coloidal de AuNRs estabilizados com CTAB com a adição de NFX (Fig. 4.17), e percebemos um leve deslocamento batocrômico da banda plasmônica de 680 nm, além de uma redução do mesmo, sugerindo uma pequena aglomeração dos nanobastões. No dia seguinte medimos essa mesma amostra e percebemos um deslocamento maior e uma redução mais pronunciada (Fig. 4.17). Após mais algumas horas, foi observado que os nanobastões tinham precipitado completamente.

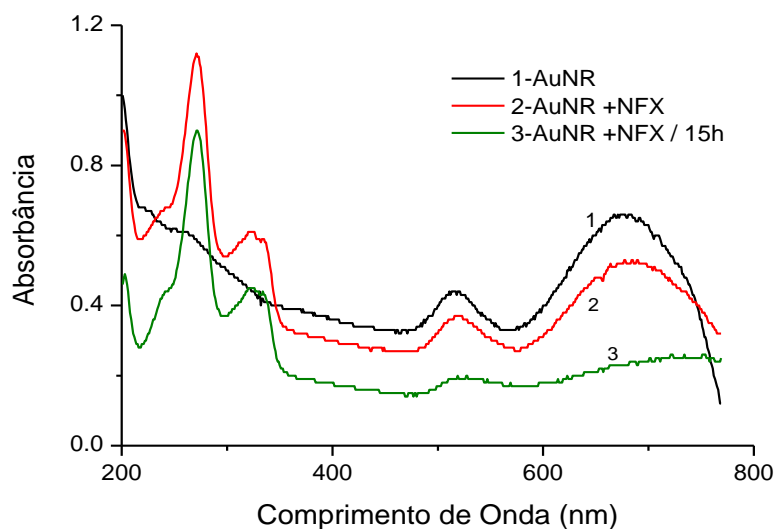


Figura 4.17. Espectro de extinção de AuNRs estabilizados com CTAB: (1) sem NFX e (2 e 3) com NFX 20 μ M.

Em seguida, foi utilizada nova solução de nanobastões aumentando-se a concentração de CTAB para 3 mM, que é superior à CMC desse surfactante, para verificar se nessa configuração a suspensão se apresenta mais estável em presença de NFX. Assim acompanhamos a absorvância dos nanobastões durante os primeiros quatro dias, depois adicionamos uma alíquota de NFX para deixar a solução com uma concentração final de 20 μ M de NFX e acompanhamos essa solução durante 8 dias, realizando medidas de absorvância e fluorescência além de medidas de anisotropia de fluorescência. No gráfico da Fig. 4.18 encontramos os espectros dos nanobastões tanto em presença de NFX quanto na ausência (detalhe inserido). Ao analisar esses espectros, percebemos que essa solução apresentou melhor resolução na banda plasmônica longitudinal, referente ao comprimento de onda 680 nm, na ausência de NFX, além de não ter apresentado mudanças significativas após a adição de NFX, mesmo ao longo de alguns dias.

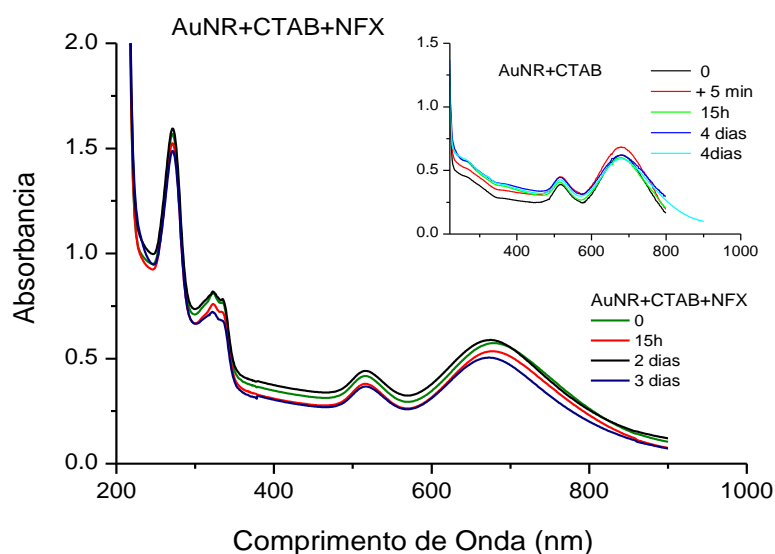


Figura 4.18. Espectros de absorção de NFX com AuNRs estabilizadas com CTAB.

Realizamos também medidas de fluorescência e de anisotropia dos nanobastões para caracterizar a estabilidade da solução e estudar a influência do CTAB na interação da NFX com a solução coloidal. Ao examinar o gráfico apresentado na Fig. 4.19, verificamos uma pequena flutuação do rendimento quântico de fluorescência da NFX. Além disso, não foram observados quaisquer deslocamentos significativos do pico, indicando que os nanobastões recobertos com CTAB influenciam muito pouco a fluorescência da norfloxacin. Os nanobastões se apresentaram estabilizados pelas moléculas de CTAB e a NFX não apresentou mudança significativa nos espectros de absorção e fluorescência. Isto está de acordo com os resultados obtidos nos experimentos de interação de NFX e micelas de CTAB, onde percebemos que a NFX não interage muito com as micelas de CTAB.

Ou seja, uma vez que os AuNRs estão estabilizados com CTAB em concentração acima da CMC, a adição de moléculas de NFX não afeta a estabilidades dos AuNRs.

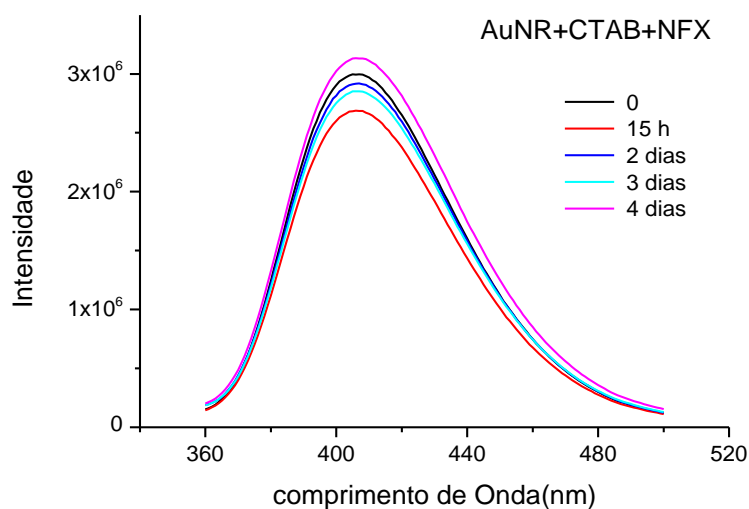


Figura 4.19. Espectros de emissão de fluorescência de NFX em suspensão de AuNRs estabilizados com CTAB (3 mM) ao longo dos dias.

Investigamos também as alterações na anisotropia da fluorescência para caracterizar se ocorrem interações entre NFX e os nanobastões recobertos com CTAB. No gráfico da Fig. 4.20, podemos verificar um leve aumento da anisotropia para $r \approx 0,04$, quando comparamos com os resultados obtidos para NFX em tampão ($r < 0,01$). A diferença é muito pequena, o que sugere baixa interação entre a NFX e os AuNRs, resultado condizente com os dos outros experimentos.

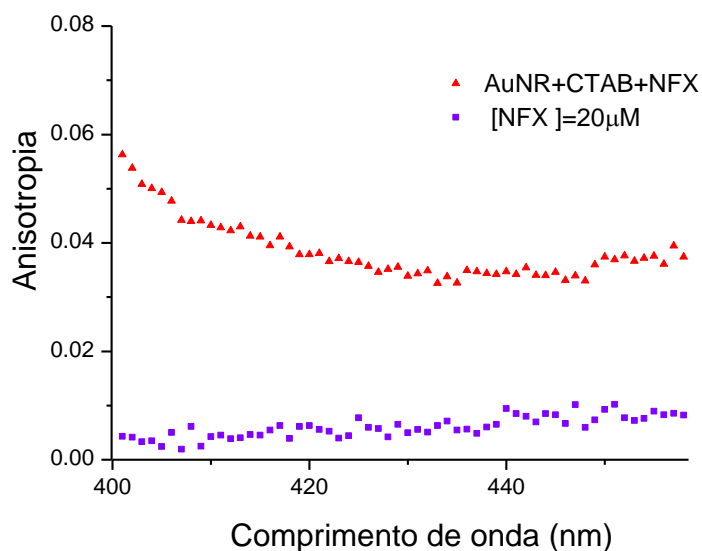


Figura 4.20. Anisotropia de fluorescência de NFX em suspensão de AuNRs recobertos com CTAB. $[NFX]=20\mu M$

Para verificar o efeito da troca de recobrimento dos AuNRs na interação com o antibiótico, buscamos inicialmente estudar a estabilidade dos nanobastões sob o efeito de diferentes substâncias que modificam a superfície dos AuNRs, tais como compostos contendo um grupo tiol e surfactantes. Os reagentes contendo tiol utilizados foram cisteína, mercaptopropanosulfonato (MPS) e glutathiona. Os surfactantes, além de CTAB, foram dodecil sulfato de sódio (SDS), aniônico, e Pluronic F-127, neutro. Além desses, tentamos estabilizar os nanobastões com citrato. Produzimos sete soluções padronizadas de nanobastões com os respectivos reagentes citados. Essas soluções foram deixadas para estabilizar por três dias e, ao final, tomamos o espectro de absorção de cada amostra, como podemos ver no gráfico da Fig. 4.21.

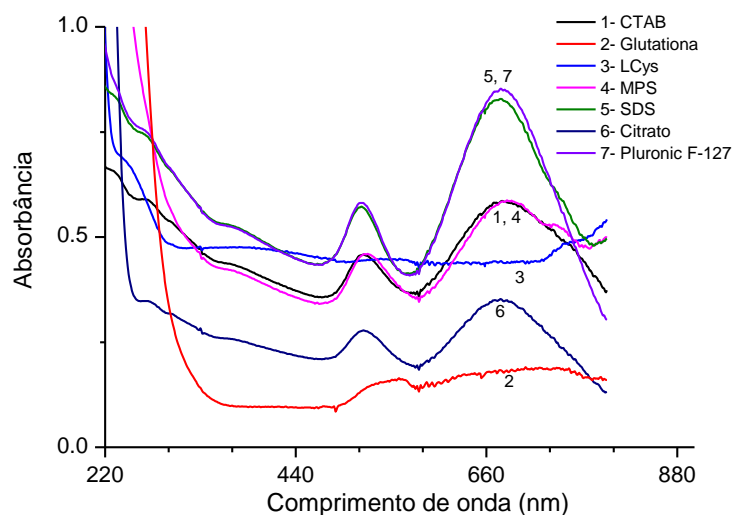


Figura 4.21. Espectros de extinção dos nanobastões estabilizados por diferentes reagentes.

Percebemos que as amostras em SDS, Pluronic F-127, citrato e MPS permaneceram transparentes e sem mudança de cor aparente, enquanto as com cisteína e com glutathiona (GSH) precipitaram completamente. Para medir a absorção/extinção UV-Vis-NIR, ressuspendemos a amostra com L-Cys no ultrassom e percebemos que esta apresentou uma coloração leitosa, o que sugere uma aglomeração das partículas, também observada no espectro da Fig. 4.21. Quando comparamos os espectros de extinção dos AuNRs submetidos aos diferentes reagentes, percebemos uma completa descaracterização nos espectros para L-Cys e glutathiona. Nos espectros referentes à estabilização com MPS e com

citrato (4 e 6) percebe-se pouca alteração, com menos espalhamento para o citrato. Contudo, os espectros das soluções estabilizadas com SDS e PF-127 apresentaram uma melhor resolução das bandas plasmônicas, ou seja, um aumento da intensidade e diminuição da largura.

A partir desses resultados, estudamos a estabilidade dos AuNRs com os diferentes recobrimentos em presença de norfloxacin. Para tal adicionamos uma alíquota de 10 μ l de uma solução estoque, a uma concentração de 2 mM, às amostras (1 ml) que tiveram maior estabilidade, ou seja, às amostras que foram estabilizadas com SDS, PF-127, MPS e citrato. Em sequência, medimos novamente os espectros de absorção/extinção de cada amostra, além de realizar um breve acompanhamento no tempo, como apresentaremos a seguir.

Vamos discutir os resultados obtidos para cada recobrimento separadamente, começando pelas amostras que não produziram muitos resultados ou seja MPS e citrato. Depois apresentaremos as amostras estabilizadas por Pluronic F-127 e SDS, que melhor estabilizaram os AuNRs. As amostras foram analisadas usando absorbância e fluorescência. O gráfico da Fig. 4.22 se refere aos espectros de absorção/extinção dos nanobastões estabilizados com MPS.

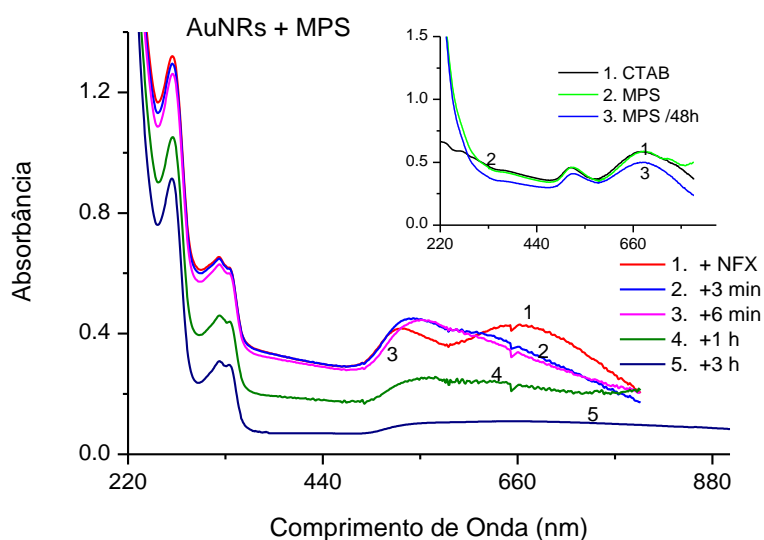


Figura 4.22. Espectros de absorção/extinção referentes aos AuNRs estabilizados com MPS, antes e após adição de NFX 20 μ M.

Ao analisar o espectro de AuNR sem NFX (detalhe Fig. 4.22) verifica-se que com adição de MPS ocorre uma leve diminuição na intensidade e um deslocamento

da banda plasmônica para 660 nm. Ao adicionarmos NFX à solução coloidal, percebemos que essas alterações se intensificaram. E assim, em pouco tempo, as bandas de ressonância plasmônica foram completamente alargadas, e tão logo a solução tinha precipitado completamente no fundo da cubeta.

Na Fig. 4.23 temos o espectro de nanobastões estabilizados por citrato.

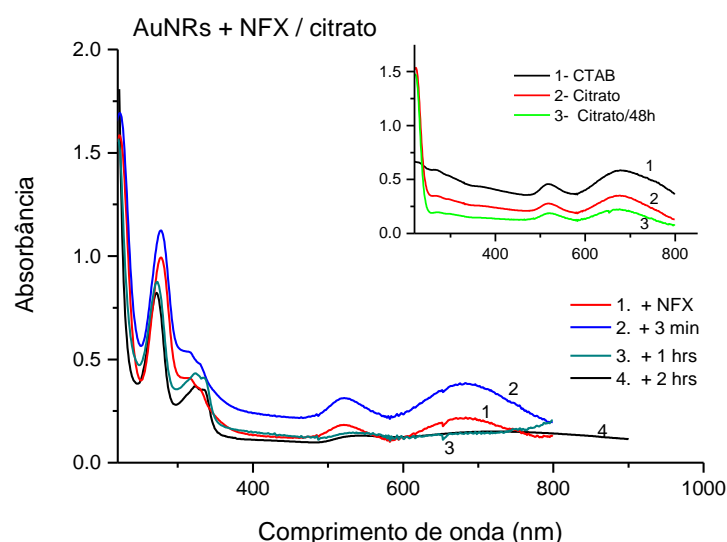


Figura 4.23. Espectros de absorção/extinção referentes aos nanobastões estabilizados com citrato antes e após adição de NFX, 20 μ M.

Ao observarmos os gráficos referentes aos AuNRs estabilizados com citrato, percebemos uma redução da intensidade das bandas plasmônicas. Após a adição da alíquota de NFX percebemos que o desaparecimento dessas bandas ocorre muito rapidamente, assim como o que ocorreu com as amostras estabilizadas com MPS.

Como dito anteriormente, os melhores resultados foram obtidos com as amostras de AuNRs estabilizados pelos surfactantes SDS e Pluronic F-127. Discutiremos com mais detalhe esses resultados a partir de agora.

As soluções coloidais estabilizadas com PF-127 (Fig. 4.24) tiveram uma melhor resolução das bandas plasmônicas e um aumento da intensidade, passando de uma absorbância 0,6 para 0,8, além de apresentarem um pequeno deslocamento para o azul (*blue shift*) de 680 nm para 675 nm. Apresentaram também uma estabilidade maior, evidenciada pelos espectros de absorção, mesmo depois de 15 h após a primeira medida.

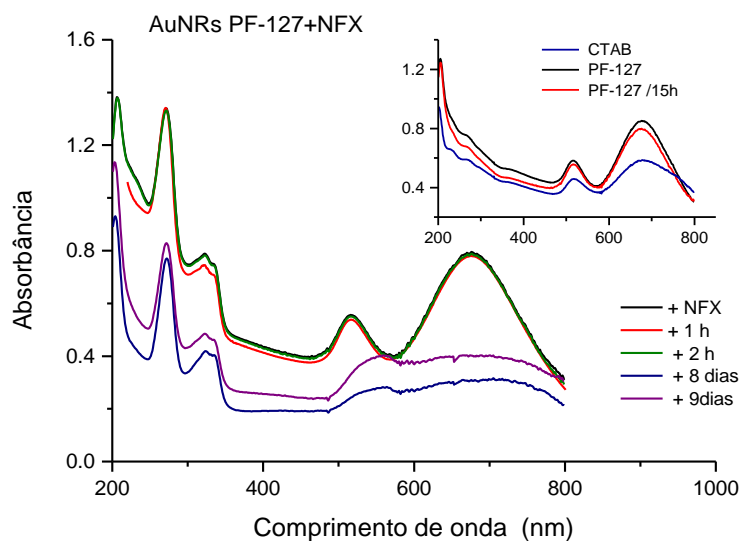


Figura 4.24. Espectros de absorção referentes ao nano bastões estabilizados com Pluronic F-127 0,2 mM, antes e após adição de NFX 20 μ M.

Assim como nas outras amostras, após o estudo da estabilidade dos nanobastões na presença de Pluronic F-127, adicionamos uma alíquota de NFX e acompanhamos as alterações que ocorrem na amostra com medidas de absorção e fluorescência. Os espectros de absorção/extinção continuaram a apresentar melhor resolução das bandas plasmônicas, porém após alguns dias a amostra precipitou completamente na cubeta.

Os AuNRs estabilizados em SDS sem NFX (Fig. 4.25, gráfico inserido) apresentaram um aumento da intensidade da banda plasmônica longitudinal, além de melhor resolução dessa banda, quando comparados com nanobastões estabilizados com CTAB. Percebemos também um *blue shift* para 670 nm, assim como os resultados obtidos com o Pluronic F-127. Após 15 h, não foram observadas mudanças significativas dos AuNRs e assim continuamos a análise, agora em presença de NFX.

Após isso, adicionamos uma alíquota de NFX e assim acompanhamos as alterações da amostra (Fig. 4.25). Essas mostraram uma excelente resolução nos picos referentes às bandas plasmônicas, mesmo depois da adição de norfloxacin, além de um *blue shift* da banda plasmônica longitudinal, de 680 para 665 nm. Mesmo depois de dez dias não houve alteração significativa nem na coloração da amostra nem nos espectros de absorção.

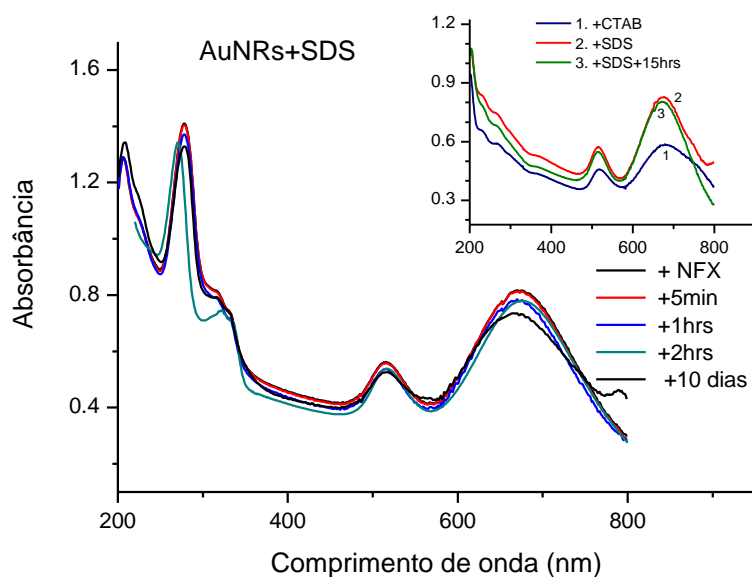


Figura 4.25. Espectros de absorção/extinção referentes ao nanobastões estabilizados com SDS, antes e após adição de NFX 20 μ M.

Para análise subsequente, também medimos a fluorescência após adição da NFX aos nanobastões estabilizados com as diferentes substâncias. Fizemos ainda um acompanhamento durante alguns dias da solução coloidal estabilizada com SDS, além de medir a anisotropia de fluorescência dessa amostra, para entender a interação entre os nanobastões e a norfloxacin. Os espectros de emissão de fluorescência estão apresentados na Fig. 4.26.

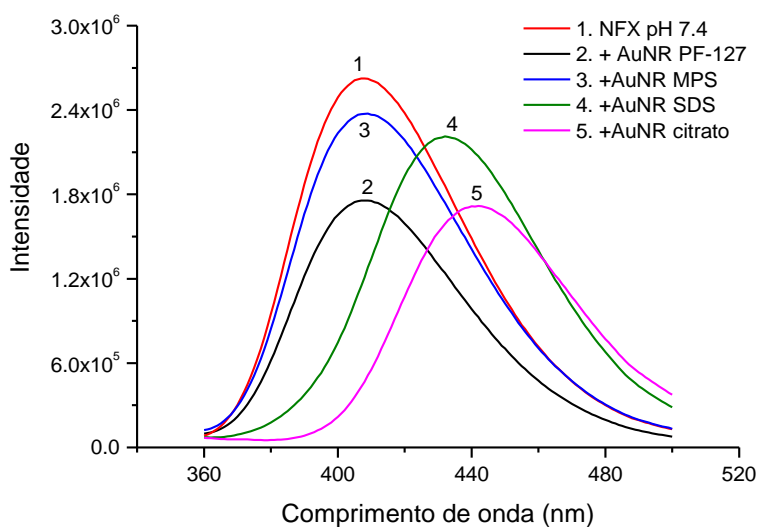


Figura 4.26. Espectros de emissão de fluorescência de norfloxacin em suspensão de AuNRs estabilizados com diferentes substâncias.

Nos espectros da Fig. 4.26, podemos perceber que, em nanobastões estabilizados com PF-127 e MPS, a NFX não apresentou mudanças significativas na posição do pico de fluorescência, em relação ao pico em solução aquosa pH 7.4. Apresentaram o pico característico em 407 nm (espectros 1, 2 e 3), que corresponde a NFX no estado zwitteriônico de protonação. Nas amostras estabilizadas com citrato, vemos que esse pico foi deslocado para o 440 nm, o que de acordo com a literatura (Albini, et al., 1999) corresponde ao estado catiônico de protonação da NFX. A partir disso medimos o pH dessa amostra e percebemos que estava bem próximo a 2, o que justifica deslocamento do pico característico. Ao ajustar o pH em 7.4, o pico voltou a 407 nm.

Nas amostras estabilizadas com SDS, percebemos que esse pico foi deslocado para 432 nm, o que de acordo com a literatura (Vignoli, 2013) revela uma associação das moléculas de NFX com as micelas de SDS.

Devido a ter obtido bons resultados de absorbância, resolvemos fazer um acompanhamento da fluorescência dos nanobastões estabilizados por SDS durante vários dias. Percebemos um deslocamento do pico de fluorescência para comprimentos de ondas menores. Ao observar o gráfico da Fig. 4.27, vemos que o primeiro espectro de fluorescência apresenta um pico de emissão em 432 nm, que indica que a NFX se apresenta em SDS, na forma catiônica, comportamento também apresentado em micelas de SDS (Vignoli, 2013). Após alguns dias podemos observar que a emissão passou para o comprimento de onda de 414 nm, como podemos ver no gráfico da Fig. 4.27 (detalhe) o que pode sugerir que existe uma associação da NFX com os nanobastões recobertos com SDS. Percebemos também que as moléculas de NFX em solução coloidal de AuNRs sofreram menos fotodegradação que em solução aquosa.

No gráfico da Fig. 4.28, vemos medidas de anisotropia de fluorescência da norfloxacin tanto em solução aquosa quanto em solução coloidal. A anisotropia de fluorescência da NFX em solução aquosa ficou em torno de zero, o que já havia sido verificado, já que a taxa de difusão rotacional em meio aquoso é bem mais rápida que a taxa de emissão do fluoróforo (Lakowicz, 1999). Já na medida em presença de AuNRs estabilizados com SDS a anisotropia, r , apresentou um valor em torno de 0,1, o que sugere uma interação entre a NFX e os nanobastões.

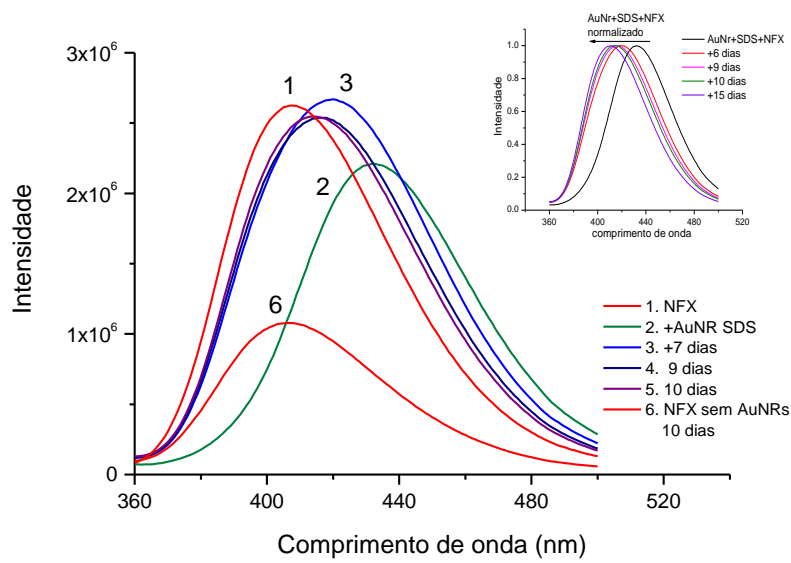


Figura 4.27. Espectro de emissão de fluorescência de norfloxacina 20 μ M em solução de AuNR em SDS 10mM.

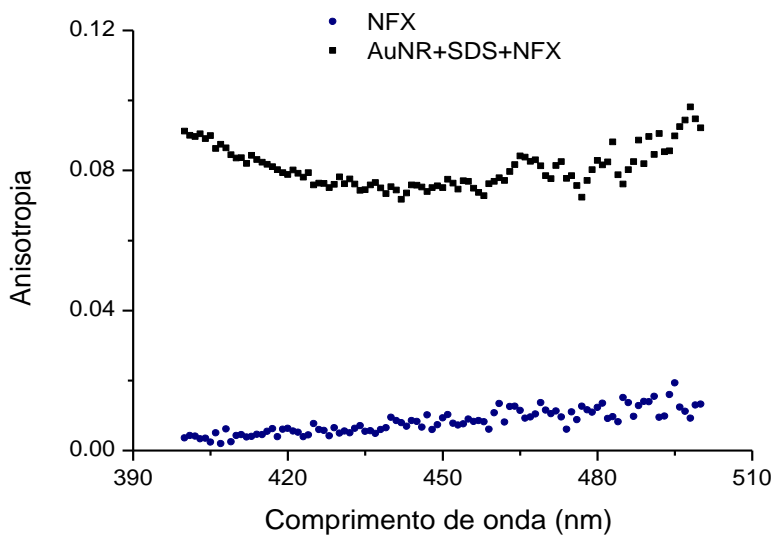


Figura 4.28. Medidas de anisotropia de fluorescência da norfloxacina em presença e em ausência dos AuNRs.

5. Considerações finais e perspectivas

Analizando as medidas de fluorescência referentes à formação do complexo ternário Cu(II):Fen:NFX na presença dos lipossomos de lecitina de ovo, devido ao deslocamento do pico da NFX podemos concluir que as moléculas de NFX interagem com as vesículas unilamelares, SUVs.

No entanto, conforme também foi observado, a constante de associação obtida para a formação do complexo ternário diminui conforme a concentração de ácido esteárico aumenta. Ou seja, o aumento da concentração de moléculas aniônicas nas vesículas dificulta a formação do complexo ternário Cu:Fen:NFX, o que é o contrário do observado na formação desse complexo em presença de micelas de SDS. Novos experimentos devem ser realizados para corroborar essa conclusão.

Os experimentos de norfloxacin, em presença de alta concentração de PF-127 (cerca de 20%), demonstraram que a fluorescência da NFX é capaz de detectar a transição de fase sol-gel desse surfactante termossensível. Nos experimentos com variação de temperatura, na faixa de 10 a 35°C, a intensidade de fluorescência apresentou o comportamento característico das curvas sigmoidais de transição de fase. Medidas de anisotropia de fluorescência mostraram que existe um pequeno aumento de anisotropia em presença de PF-127, tanto na fase sol quanto na fase gel. Porém esse resultado não foi tão expressivo, indicando que a mobilidade de NFX não varia muito na presença do polímero, o que está de acordo com resultados obtidos anteriormente, de que a interação eletrostática é extremamente importante para a associação da NFX às micelas.

Podemos perceber ainda que a inexistência de variação da anisotropia com o aumento da temperatura, indica que a transição de fase do polímero não produz mudanças na microviscosidade ao redor das moléculas de NFX, apesar da enorme mudança na macroviscosidade.

As análises de formação dos complexos ternários em presença do surfactante não iônico Pluronic F-127, em que foram realizados experimentos de supressão de

fluorescência, indicaram que as micelas de Pluronic F-127 têm pouca influência na formação dos complexos ternários de Cu:Fen:NFX.

Experimentos em que titulamos NFX com o surfactante catiônico CTAB permitiram obter a constante de associação, que demonstrou baixa interação entre NFX e micelas de CTAB. Isso refletiu-se também na titulação ácido-base de NFX em presença de micelas de CTAB. O ambiente micelar, apesar de catiônico, não alterou o equilíbrio iônico da NFX, ou seja, a presença de micelas não alterou o valor dos pK_a dos grupos amino e carboxílico da molécula de NFX.

As experiências realizadas para estudar a formação de complexo ternário NFX:Cu:Fen na presença de CTAB indicaram constante de associação 2,5 vezes maior na presença do que na ausência das micelas. Ou seja, micelas de CTAB de fato facilitam a formação de complexo, mas não substancialmente.

Por fim, realizamos experimentos com nanobastões de ouro, com o intuito de estudar sua estabilidade quando recobertos com diferentes reagentes e surfactantes, para avaliar sua possível utilização como carreadores de fármacos. Em seguida, estudamos a associação da norfloxacin com os nanobastões recobertos que apresentaram maior estabilidade.

Nessas experiências, percebemos que reagentes com grupos sulfidril, cisteína (L-cys), mercaptopropanosulfonato (MPS) e glutathione (GSH), nas concentrações usadas (mM), os nanobastões de ouro não ficaram estáveis, se aglomeraram e precipitaram em pouco tempo. Esse mesmo resultado foi observado para os nanobastões que reagiram com citrato.

Os resultados obtidos com nanobastões de ouro estabilizados por surfactantes, indicaram que o Pluronic F-127 estabiliza bem os nanobastões de ouro, provavelmente devido ao tamanho de suas três cadeias, uma hidrofóbica e duas hidrofílicas. Porém, esse comportamento não foi observado quando adicionamos NFX, isto é, após a adição os nanobastões estabilizados por PF-127 se aglomeraram e precipitam completamente.

O que percebemos nas experiências realizadas com surfactantes iônicos foi que o excesso de carga é extremamente importante para a estabilidade dos AuNR. Podemos concluir isso pois percebemos que as suspensões coloidais contendo nanobastões estabilizados por CTAB e por SDS tiveram os melhores resultados, mesmo na presença do antibiótico NFX.

Os resultados obtidos das experiências de fluorescência de NFX em amostras de AuNR@CTAB apontaram uma pequena flutuação na intensidade de fluorescência. Assim concluímos que as moléculas de NFX não interagem bem com AuNRs recobertos com CTAB, o que corrobora os resultados obtidos das experiências que realizamos com NFX e micelas de CTAB.

Através dos resultados obtidos em experiências de fluorescência de NFX em amostras de AuNR@SDS, percebemos que, no primeiro momento, as moléculas de NFX estavam majoritariamente interagindo apenas com as micelas de SDS, pois o pico de fluorescência apresentou-se em 432 nm, característico de NFX e micelas de SDS. Porém, após algum tempo percebemos um deslocamento desse pico para comprimentos de onda menores, o que sugere um aumento da interação de NFX com os AuNRs.

Esse resultado foi reiterado pela anisotropia de fluorescência, em que obtivemos valores em torno de $r = 0,1$ para NFX em presença de AuNR@SDS e aproximadamente zero para NFX em solução aquosa.

Para estudos futuros, pretendemos nos concentrar em experimentos com nanobastões de ouro, variando seu encapsulamento para dar a eles diferentes funcionalidades associadas a distribuição de fármacos. Desejamos ainda repetir alguns experimentos, em condições mais controladas, diminuindo o tempo entre cada medida e usando maior controle para garantir a precisão dos resultados obtidos nesse trabalho.

6. Referências bibliográficas

- Aires, Margarida Mello. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- Akbarzadeh, Abolfaz, Rogaie Rezaei Sadabady, e Soodabeh Davaran. **Liposome: classification, preparation, and application**. *Nanoscale Research Letters*, 2013: 1-9.
- Albani, Jihad René. **Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy**. Blackwell, 1968.
- Albini, A., e S. Monti. **“Photophysics and photochemistry of fluoroquinolones.”** 2003: 238-250.
- Albini, A., E. Fasani, e M. Rampi. **“Photochemistry of some fluoroquinolones: effect of pH and chloride ion.”** *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 9 de maio de 1999: 238.
- Alkilany, Alaaldin M., Lucas B. Thompson, Stefano P. Boulos, Patrick N. Sisco, e Catherine J. Murphy. **“Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery,tempered by the complexity of their biological interactions.”** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 11 de março de 2012: 190-199.
- Andriole, Vicent T. **The Quinolones**. United states of American: Academic Press, 2000.
- Avanti Polar Lipids. **Avanti Polar Lipids**. s.d. <https://avantilipids.com/tech-support/liposome-preparation/>.
- Barbosa, J., D. Barron, and E. Jimenez-Lozano. **"Electrophoretic behaviour of quinolones in capillary electrophoresis: Effect of pH and evaluation of ionization constants."** *Journal of Chromatography A*, 1999: 183-192.
- Barry, Anais Pitto, e Nicolas P.E. Barry. **“Pluronic Block -copolymers in medicine: From chemical and Biological versatility to rationalisation and clinical advances.”** *polymer Chemistry*, 2014: 3291.
- Boal, David. **Mechanics of the Cell**. Cambridge University Press, 2012.
- Borissevitch, Iouri E., Pablo José Gonçalves, e Fábio Antonio Scharberle. **Fundamentos da Espectroscopia de Absorção Óptica**. São Paulo: Livraria da Física, 2016.
- Farn , RJ. **“Chemistry and technology of surfactants.”** Em *What are Surfactants?*, por David R Karsa Joel Houston, 1-23. Blackwell Publishing Ltd, 2006.
- Gioffredi, Emilia, et al. **“Pluronic F-127 hydrogel characterization and biofabrication in cellularized constructs for tissue engineering applications.”** *ScienceDirect*, 2016: 125.

Goodwin, J. **“Colloids and interfaces with surfactants and polymers—an introduction.”** 2004.

Hof, M, R Hutterer, e V Fidler. ***Fluorescence Spectroscopy in Biology***. Springer, 2005.

Huang, By Xiaohua, Svetlana Neretina, e Mostafa A. El-Sayed. **“Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications.”** *Advanced materials*, 2009: 4880–4910.

Ito, Amando Siuiti, Marina Berardi, e Wallance Pazin Moreira . **Fluorescência e aplicações em Biofísica**. São Paulo: Livraria da Física, 2016.

Lakowicz, Joseph R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. New York: Plenum, 1999.

Leshner, George Y, Ernest J Froelich, Gruett D. Monte, John Hays. Bailey, e R. Pauline Brundage. **“1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents.”** *J. Med. Chem.*, 1962, 5 ed.

Lewis, Gerald F. **Analytical chemistry : an introduction**. Macmillian Publisher, 1985.

Lin, Yining, e Paschalis Alexandridis. **“Temperature-Dependent Adsorption of Pluronic F-127 Block Copolymers onto Carbon Black.”** *J. Phys. Chem. B* 106, nº 42 (2002): 10834-10844.

Luiz, Fabricio Casajeros . **“Estudos de fluorescência estacionária e resolvida no tempo de anestésicos locais e de antibióticos da classe das fluoroquinolonas.”** 2009, 455-465.

Maxwell, A. **“molecular basis of quinolone action.”** *J antimicrobial Chemother*, 1992: 409-414.

Noudeh, Gholamreza Dehghan, e Ehsan Mohajeri. **“Effect of Temperature on the Critical Micelle Concentration and Micellization Thermodynamic of Nonionic Surfactants: Polyoxyethylene Sorbitan Fatty Acid Esters.”** *E-Journal of Chemistry*, 2012.

Novak, Takacs, K Noszal, I Hermecz, G Kereszturi, B Podanyi, e G Szasz. **“Protonation equilibria of quinolone antibacterials.”** *J Pharm. Sci*, 1990: 1023-1028.

Oliphant, C. M., e G.M. Green. **“Quinolones: A comprehensive review.”** *Am. Fam. Phys.*, 2002: 455-464.

Orendorf, Christopher J, e Catherine J Murphy. **“Quantitation of Metal Content in the Silver-Assisted Growth of Gold Nanorods.”** *J. Phys. Chem. B*, 5 de Janeiro de 2006: 3990.

Rahman, A, e C. W. Brown. **“Effect of pH on the Critical Micelle Concentration of Sodium Dodecyl Sulphate.”** *Journal of Applied Polymer Science*, 1983.

Rangel-Yagui, C. O. , A Pessoa-Jr, e D Blankschtein. **“Two-phase aqueous micellar systems: an alternative method for protein purification.”** *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 2004: 531-544.

Ross, D, e C Riley. **“Physicochemical properties of the fluorquinolonas antimicrobial II. acid ionization constants and their relationship to structure.”** *Int. J. Pharmaceut*, 1992: 267-272.

Royal society of chemistry . **Ultraviolet - Visible Spectroscopy (UV)**. copyright, 2009.

Santos, Nuno, e Miguel Castanho. Santos NC. Castanho MARB. **Lipossomas: a bala magica acertou?”** *Quimica nova*, 2002.

Schmolka, I. R. **“Artificial Skin I. Preparation and Properties of Pluronic F-127 Gels for Treatment of Burns.”** *J. Biomed. Mater. Res.*, 1972.

Sharma, P. C., A. Saneja, e S. Jain. **“Nofloxacin : A Therapeutic Review.”** *Int. J. Chem. Sci.*, 2008.

Sonics. **Sonics.** sonics. s.d. <https://www.sonics.com/liquid-processing/products/vibra-cell-processors/vcx-130/> (acesso em março de 2018).

Stone, John, Stephen Jackson, e David Wright. **Biological applications of gold nanorods.** *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2011: 101-109.

Tadros, Tharwat F. **An Introduction to surfactants.** Berlin: De Gruyter, 2014.

Uivarosi, Valentina. **Metal complexes of quinolones antibiotic and their applications: an update.** *molecules*, 11 de september de 2013: 11153-11197.

Valeur, Bernard. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications.** New York: Wiley-VCH, 2001.

Van Nostrum, C. F. **Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy.** *Adv. Drug Delivery Rev* 56 (2004): 9-16.

Vignoli, Gabriel. **“Estuda do Interação dos antibioticos Norfloxacin e seus complexos de cobre com micelas de surfactantes ionicos por espectroscopia de absorção UV-visível e fluorescência.”** 2013.

Vilsinskia, B.H. **“Physico-chemical properties of meso-tetrakis(p-methoxyphenyl)porphyrin (TMPP) incorporated into Pluronic™ P-123 and F-127 polymeric micelles.”** *Quimica nova*, 2014: 1650-1656.

Wardle, Brian. **Principles and Applications of Photochemistry.** Reino Unido: John Wiley & Sons, 2009.