UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores
Cristal Violeta e Azul de Metileno em sistemas
microheterogêneos e em células cancerosas em cultura

Carla Santos de Oliveira
Tese de doutorado

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista
Orientador

São Paulo
2006

Carla Santos de Oliveira

**Propriedades fotoquímicas dos fotossensibilizadores
Cristal Violeta e Azul de Metileno em sistemas
microheterogêneos e em células cancerosas em cultura**

Tese de doutorado

Bioquímica

Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

Orientador

São Paulo

2006

*Aos meus pais Aurelino e Edivania,
pela preciosa lição de que sem dignidade de caráter
e sem luta por um ideal é impossível vencer.*

Agradecimentos

A Deus, pela vida e força que me deu.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista, pela orientação, amizade e apoio de valor inestimável.

À Prof. Dra. Alicia J. Kowaltowski, pela disponibilidade do laboratório para o trabalho inicial com células.

Ao Prof. Dr. Carlos Menck, pela doação das células e pelo aprendizado do manuseio com células.

Ao Prof. Dr. Guilherme Indig, pela oportunidade do estágio no seu laboratório nos Estados Unidos.

A todos os professores que cederam equipamentos para realização dos meus experimentos: Prof. Dr. Mario Jose Politi, Prof. Dr. Henrique Catalani, Prof. Dra. Iolanda Cuccovia, Prof. Dra. Alicia J. Kowaltowski.

A todos os meus amigos dos laboratórios que trabalhei no bloco 10 e bloco 12, aos amigos que fiz nos Estados Unidos durante o meu estágio internacional. Mencionar nomes seria problemático, pois certamente seria possível cometer alguma injustiça, assim agradeço a todos pela amizade, companheirismo e momentos alegres que vivemos juntos.

Aos técnicos de todos os laboratórios, pelo suporte técnico.

Aos meus pais Aurelino e Edivania, a homenagem da mais profunda gratidão pela lição de vida que, sabiamente, me prestaram e continuam a prestar.

À minha irmã Luciana e ao meu cunhado Leonardo, pela amizade e pelo afeto que nos une.

À FAPESP, pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS:	7
2. PREFÁCIO.....	8
3. RESUMO	9
4. ABSTRACT	11
5. INTRODUÇÃO	13
5.1. PROCESSOS FOTOFÍSICOS, FOTOQUÍMICOS E FOTOBIOLOGICOS INDUZIDOS	13
5.2. TERAPIA FOTODINÂMICA.....	22
5.3. CORANTES TRIARILMETANOS – FOTOSSENSIBILIZADOR CRISTAL VIOLETA	27
5.4. FOTOSSENSIBILIZADOR AZUL DE METILENO	32
5.5. PARES IÔNICOS.....	39
5.6. SISTEMAS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS.....	42
5.7. MICELAS REVERSAS	44
6. OBJETIVOS.....	47
7. PARTE EXPERIMENTAL.....	48
7.1. SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES.....	48
7.2. EQUIPAMENTOS E MÉTODOS.....	49
7.2.1. EXPERIMENTO COM SOLUÇÕES ISOTRÓPICAS (SOLVENTES)	49
7.2.2. PARÂMETRO $\lambda_{MÁX}$	50
7.2.3. PARÂMETRO λ_{OMBRO}	52
7.2.4. PARÂMETRO Δv	52
7.2.5. EXPERIMENTOS COM MICELAS REVERSAS DE AOT.....	52
7.2.6. DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	54
7.2.7. CÁLCULOS QUÂNTICOS QUÍMICOS	55
7.2.8. FOTÓLISE DE RELÂMPAGO A LASER	55
7.2.9. FOTÓLISES CLÁSSICAS	58
7.2.10. IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE FOTÓLISE	58
7.2.11. EQUIPAMENTO DE EMISSÃO NO INFRA-VERMELHO.....	59
7.2.12. PROCEDIMENTOS PARA A CULTURA CELULAR.....	61
7.2.13. SOFTWARES	73
8. RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
8.1. EFEITO DO SOLVENTE SOBRE AS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CV	74
8.2. ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT	81
8.2.1. LOCALIZAÇÃO DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	81
8.2.2. PARES IÔNICOS DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT	86

8.2.3. ESTUDOS DAS PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS DE CV	95
8.2.4. REAÇÕES FOTOQUÍMICAS DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT	118
9. CONCLUSÃO PARCIAL CV EM MICELAS REVERSAS	121
10. EFICIÊNCIA, DISTRIBUIÇÃO E MECANISMOS FOTOQUÍMICOS DE CV E MB EM CÉLULAS HELA.....	125
10.1 CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO FÍSICA DOS FOTOSSENSIBILIZADORES COM CÉLULAS.....	126
10.1.1. INCORPORAÇÃO DE CV E MB EM CÉLULAS.....	126
10.1.2. TOXICIDADE DE CV E MB EM CÉLULAS.....	132
10.1.2 MECANISMO DE MORTE CELULAR NA PRESENÇA DE MB E CV.....	139
10.3 GERAÇÃO DE ESPÉCIES EXCITADAS APÓS EXCITAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES CV E MB EM CÉLULAS.....	143
10.4 MECANISMO FOTOQUÍMICO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES CV E MB EM CÉLULAS.....	152
10.5 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE CV E MB EM CÉLULAS HELA.....	154
11 CONCLUSÕES FOTOSSENSIBILIZADORES CV E MB EM CÉLULAS.....	173
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	177

1. LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS:

PDT	terapia fotodinâmica
CV	cristal violeta
Leuco-CV	leuco cristal violeta
AOT	bis-2-etilhexil sulfocinato de sódio
W_0	razão entre a concentração de água e a concentração de anfílico
MB	azul de metileno
TAM	triarilmetano
ϕ_f	Rendimento quântico de fluorescência
$\Delta\nu$	distância entre o comprimento de onda no máximo de absorção e o comprimento de onda do ombro formado no espectro de absorbância
$\lambda_{\text{máx}}$	Comprimento de onda no máximo de absorção
λ_{ombro}	Comprimento de onda no ombro formado no espectro de absorbância
$^1\text{O}_2$	oxigênio singlete ($^1\Delta_g$)
SDS	dodecil sulfato de sódio
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) – 2,5- difenil-2H-tetrazólio
IP	iodeto de propídeo
RMN	Ressonância magnética nuclear
EPR	Ressonância eletrônica paramagnética
UV-VIS	Espectrofotometria no visível e ultra-violeta
D/M	Razão entre a concentração de dímero e a concentração de monômeros
MK	4,4' – bis (dimetilamino) benzofenona, cetona de Michler
R123	Rodamina 123
H33342	Hoescht 33342
Lys	Lysotracker
TLC	Cromatografia de camada fina

2. PREFÁCIO

Diversas metodologias baseadas em laser têm promovido avanços no diagnóstico e tratamento de doenças neoplásicas (Engels 1989 e 1990, Katzir 1993), entre elas a chamada terapia fotodinâmica (PDT) (Ochsner 1997, Henderson 1992). Em PDT, os tecidos tumorais são destruídos pela interação da luz proveniente do laser com fotossensibilizadores específicos adsorvidos em tumores. Após a excitação destas moléculas, processos fotofísicos e fotoquímicos são desencadeados e geram espécies reativas (oxigênio singleto, espécies tripletos, radicalares e outras), os quais são os responsáveis pela destruição tumoral (Ochsner 1997, Henderson 1992). O entendimento do efeito da ligação de sensibilizadores em biomoléculas e bioagregados devem proporcionar um aprimoramento no entendimento do processo fotodinâmico. Esta é a motivação principal deste trabalho de pesquisa.

3. RESUMO

As propriedades fotofísicas e fotoquímicas de cristal violeta (CV) foram investigadas em soluções isotrópicas e verificou-se que solventes com constante dielétrica pequena favorecem a formação do par iônico, já o aumento na viscosidade do meio restringe a movimentação rotacional dos anéis aromáticos, resultando em um aumento no tempo de vida de fluorescência e, portanto no rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) (Oliveira 2002).

Os experimentos com CV foram conduzidos em micelas reversas do tensoativo aniônico bis-2-etilhexil sulfocinato de sódio (AOT) em isooctano. A localização interfacial do CV nas micelas reversas de AOT em valores da razão molar entre água e surfactante (W_0) pequenos e grandes foram encontrados através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton e de carbono 13. Utilizando-se espectroscopia UV-Vis identificou-se que pares iônicos de contato estão presentes a valores pequenos de W_0 e com o aumento do W_0 pares iônicos separados por solventes são as espécies que predominam em solução.

A comparação da eficiência de fotodegradação de CV em micelas reversas de AOT em função do W_0 indicou que a fotoreatividade é maior em baixos valores de W_0 . Este efeito deve estar relacionado ao ambiente restrito no qual CV é localizado. A formação de intermediários reativos foi verificada através de Fotólise de Relâmpago a Laser e Emissão no infra-vermelho próximo, indicando a presença de espécies triplete, radical e oxigênio singlete com valor de rendimento quântico menor que 1%. Os produtos de fotólise foram identificados por técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Na presença de oxigênio, houve maior formação de cetona de Michler. Com baixa concentração de oxigênio, o produto observável foi leuco-CV. Destes estudos propomos o mecanismo de CV neste meio.

Após os estudos com micelas reversas, células cancerosas HeLa foram

empregadas para comparar fotoatividade do CV com o azul de metileno (MB). As proporções de CV e MB dentro das células são altas, incorporando 70% e 80% da concentração da solução de incubação, respectivamente. Com o aumento da concentração de MB, um favorecimento da formação de dímero foi identificada. Já CV não sofre agregação nas condições estudadas. Nenhum dos fotossensibilizadores estudados tem um efeito danoso sobre as células HeLa em concentrações abaixo de 10 μ M.

Após irradiação, MB causou uma diminuição de cerca de duas vezes maior na taxa de sobrevivência celular comparado com CV. A formação de formação de oxigênio singlete após incorporação dos fotossensibilizadores foi investigada. Há formação de oxigênio singlete em células incubadas com MB, já com CV a geração de oxigênio singlete é pouco significativa sugerindo um mecanismo radicalar. O processo de morte celular foi estudado por citometria de fluxo e verificou-se que MB induz apoptose depois da irradiação em células HeLa. A absorção de luz por ambos fotossensibilizadores é similar, o que indica que a diminuição na sobrevivência não se deve à diferença de absorção luminosa. As diferenças de sobrevivência observadas com células incubadas com CV e MB e irradiadas foram relacionadas às diferenças das propriedades fotoquímicas destes fotossensibilizadores.

A localização celular de CV e MB em células foram caracterizadas por microscopia de fluorescência. Verificou-se que ambos localizam-se em mitocôndrias. O aumento na concentração de CV não alterou o seu perfil de localização. Já para MB ao aumentar a concentração de MB, observa-se que o mesmo localiza-se além das mitocôndrias, em lisossomos. A comparação das propriedades fotoquímicas e de localização foram consideradas para explicar as diferenças de atividade fotodinâmica do CV e do MB em células HeLa.

4. ABSTRACT

The photophysical and photochemical properties of crystal violet (CV) were investigated in isotropic solutions and it was found that solvents with small dielectric constants favor the formation of the ion pair and that the increase in viscosity of the medium restricts the rotational movement of the aromatic rings, resulting in an increase in fluorescent lifetime and therefore in the fluorescence quantum yield (ϕ_f) (Oliveira 2002).

CV experiments were conducted in reverse micelles of the anionic tensoactive sodium bis-2-ethylhexyl-sulfosuccinate (AOT) in isooctane. The interfacial localization of CV in the AOT reverse micelles at low and high values of molar ratio between water and surfactant (W_0) was found through the proton and carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance techniques (NMR). Using UV-Vis spectroscopy, it was identified that contact ion pairs are present in low W_0 values and with the increase in the W_0 solvent separated ion pairs are the species that predominate in solution.

The comparison of the photobleaching efficiency of CV in AOT reverse micelles as a function of W_0 indicated that the photoreactivity is high with low W_0 values. This effect must be related to the restrict environment in which CV is located. The reactive intermediate formation was found through the Laser Flash Photolysis and Near Infra-Red Emission, indicating the presence of triplet, radical and singlet oxygen species with a yield quantum of less than 1%. The photolysis products were identified through the chromatographic and spectroscopic techniques. In the oxygen presence, there was high Michler ketone formation. With the low oxygen concentration, the observable product was leuco-CV. With these studies we hypothesized a mechanism of CV in these proposed media.

After the reverse micelles studies, the HeLa cancerous cells were used, in order to compare the CV and methylene blue (MB) photoactivity. The CV and MB proportion inside the cell was high, reaching 70% and 80% of concentration of the

incubation solution, respectively. With the increase of MB concentration, a favoring of dimmer formation was identified. CV does not suffer aggregation in the studied conditions. None of the studied photosensitizers has a damaging effect upon the HeLa cells in concentrations below 10 μ M.

After irradiation, MB caused a decrease about twice higher in the cellular survival rate compared to CV. The singlet oxygen formation after the photosensitizer incorporation was investigated. There is a singlet oxygen formation in the cells incubated with MB, though with the CV the singlet oxygen generation is significantly low suggesting the radicalar mechanism. The cellular death process was studied by Fluorescence Activated Cell Sorting and MB-induced apoptosis was found after MB irradiation in HeLa cells. The light absorption by both photosensitizers is similar, which means that the survival decrease is not because of the light absorption difference. The survival differences observed with the cells incubated with CV and MB and irradiated were related to the differences in the photosensitizer photochemical properties.

The cellular location of the CV and MB in cells were characterized by fluorescence microscopy. Both photosensitizers are located in mitochondrias. An increase in the CV concentration does not alter its local profile. However, with an increase in the MB concentration, MB was located not only in mitochondrias but also in lysosomes. The comparison of the photochemical and localization properties was considered in order to explain the differences in the photodynamic activity of CV and MB in HeLa cells.

5. INTRODUÇÃO

5.1 PROCESSOS FOTOFÍSICOS, FOTOQUÍMICOS E FOTOBIOLOGICOS INDUZIDOS

A interação da luz com a matéria é a base da vida neste planeta. A captura de energia solar e sua transformação em energia química, processo denominado fotossíntese, tornou possível a existência dos seres vivos. Além da obtenção de energia, outros processos envolvendo radiação eletromagnética são cruciais para os seres vivos, como por exemplo, fototropismo e fotoperiodismo nas plantas, visão nos animais. Da interação com a matéria, a luz pode sofrer alterações nas suas propriedades óticas de propagação (reflexão e refração) ou se envolver em transições eletrônicas favorecendo transformação da energia luminosa em outras formas de energia (absorção, emissão de luz, liberação de calor e reações fotoquímicas) (Bonnett 2000).

Para estudar organismos ou sistemas biológicos miméticos, têm sido empregadas diversas técnicas espectroscópicas, que utilizam de toda faixa espectral (das ondas de rádio aos raios-gama). De uma maneira simplificada, as técnicas espectroscópicas obtêm informação da matéria através da análise da luz transmitida ou espalhada. Entre as técnicas que utilizam radiação espalhada têm-se fluorescência, espalhamento inelástico, difração de raio-X, Raman e fosforescência. Já as que usam a radiação transmitida, têm-se absorção, ressonância magnética nuclear (RMN), ressonância eletrônica paramagnética (EPR) e dicroísmo circular.

A busca pela compreensão da interação luz com matéria levou a uma série de estudos em diferentes áreas do conhecimento. A fotofísica e a fotoquímica, se propõe a descrever os processos físicos e químicos induzidos pela absorção de luz, respectivamente, envolvendo estudos energéticos, estruturais e dinâmicos. Um

grande avanço na ciência tem sido obtido graças a técnicas que estudam a interação da luz com a matéria.

Moléculas excitadas podem perder sua energia através de maneiras físicas ou participar de reações químicas. Para quantificar cada um destes processos utilizam-se as medidas dos rendimentos quânticos (ϕ). ϕ é a razão entre o número de fótons envolvidos num específico processo pelo número de fótons absorvidos ou número de moléculas de produto formado por unidade de tempo pelo número de fótons absorvidos por unidade de tempo (Bonnett 2000, Rohatgi-Mukherjee 1986).

A incidência da luz do laser sobre um composto pode fornecer energia suficiente para desencadear processos fotoquímicos. A energia de um fóton interage com a molécula no seu estado fundamental de energia (S_0) causando a promoção de um elétron do orbital ligante para um anti-ligante desocupado de mais alta energia. um estado excitado inicial chamado singlete (S_1) (Figura 1). Neste estágio a molécula pode seguir caminhos diferentes quanto à utilização da energia (Birks 1995).

A Figura 1 apresenta uma forma simplificada do diagrama de Jablonski exemplificando nas setas os principais processos que uma molécula pode sofrer após absorção de fóton. A escala vertical representa energia potencial e a horizontal não tem significado particular. Cada estado eletrônico (S_0 , S_1 , S_2 , T_1 e T_2) têm níveis vibracionais e os níveis rotacionais (não foram mostrados na Figura 1). As linhas representam os processos radiativos, os quais ocorrem através de absorção ou emissão de luz e as linhas tracejadas, representam os processos não radiativos, nos quais ocorrem liberação de calor para o ambiente. Os números representam os diversos processos que podem ocorrer. Os processos 2 a 5 são de decaimento não-radiativos e os 6 a 10 são radiativos. O processo 1 é absorção de luz, na qual a molécula passa do estado fundamental (absorve energia) para o estado excitado. O processo 2 representa relaxação vibracional, um processo rápido (constante de

velocidade em média de 10^{12} sec^{-1}) onde a molécula relaxa do nível vibracional de maior energia para o de menor dentro de um mesmo estado eletrônico. O processo 3 é a conversão interna, trata-se de um processo não radiativo que converte estados eletrônicos de maior energia para o estado eletrônico de menor energia, mantendo a mesma multiplicidade (estados que tem o mesmo número de elétrons desemparelhados são ditos ter a mesma multiplicidade). Note que não há mudança de energia nestes processos. Decaimento não radiativo é o processo representado pela seta 4. É um processo que envolve transição não-radiativa do estado excitado retornando para o estado fundamental. É um processo lento, devido à diferença de energia entre esses estados. A seta representada pelo número 5 indica cruzamento entre sistemas que é a conversão do estado singlete para o tripleto (ou vice-versa) e requer uma mudança de spin do elétron, sendo um processo impedido pela restrição de spin.

Figura 1: Diagrama de Jablonski para os níveis de energia. Ver o texto para definição dos termos e da notação. S_0 , S_1 , S_2 são os estados singletes, T_1 e T_2 são os estados tripletes. Os números representam os processos: 1 - absorção, 2 - relaxação vibracional, 3 - conversão interna, 4 - transição não radiativa, 5 - cruzamento inter sistemas, 6 - fluorescência, 7 - fosforescência, 8 - absorção triplete-triplete, 9 - absorção singleto-singleto, 10 - absorção singleto-triplete.

A probabilidade de um cruzamento inter sistemas ocorrer depende da diferença de energia entre os estados singletes e tripletes, da simetria dos estados eletrônicos inicial e final e do spin. Se os estados eletrônicos inicial e final diferem em simetria,

então a transição é dita permitida por simetria (caso contrário, a transição é proibida por simetria). A mudança do spin do elétron durante uma transição eletrônica compõe os processos proibidos por spin (cruzamento inter-sistema, absorção singlete-triplete e fosforescência). Entretanto apesar do caráter proibitivo, esses processos podem ocorrer devido a não existência de singletes e tripletes puros. Através de processos conhecidos como acoplamento spin-órbita ocorre a influência de perturbações intramoleculares e intermoleculares, e algum caráter triplete é misturado no singlete e vice-versa. Essas perturbações são funções dos campos magnéticos criados pelas movimentações spin e órbita do elétron e pelo movimento órbita do núcleo, são, portanto, influenciados pela massa atômica. Assim quanto maior for a massa atômica (maior carga), maior será a mistura entre os estados singletes e tripletes e portanto a transição será facilitada (efeito do átomo pesado) (Cowan 1978).

O processo 6 representa fluorescência, que é o processo radiativo de desativação do estado excitado para o estado fundamental. Envolve estados de mesma multiplicidade, normalmente entre $S_1 \rightarrow S_0$, mas alguns compostos podem seguir $S_2 \rightarrow S_0$. Já o processo representado pela seta 7 trata-se da emissão de luz envolvendo estados de multiplicidade distintas, fosforescência. Para este processo ocorrer é necessário mudança do estado eletrônico e mudança do spin o que facilita isto. O processo 8 está relacionado com a absorção de fótons de uma molécula no estado triplete para estados tripletes de maior energia. O mesmo ocorre no processo 9, porém envolvendo estados singletes, ou seja, absorção de energia do estado excitado singlete para outros de maior energia. O processo 10 representa absorção singlete fundamental para triplete e assim como a fosforescência é um processo que requer mudança de spin e de estado eletrônico, portanto trata-se de um processo proibido. Através do avanço nas técnicas espectroscópicas é possível medir variações de absorção, emissão da amostra na faixa de femto, pico ou nanosegundos

tornando possível caracterizar todas as transições mostradas na Figura 1 (Lakowicz 1999, Birks 1995).

Fotossensibilizadores são moléculas que possuem a capacidade de absorver luz numa determinada região espectral e transferir esta energia para outras moléculas por transferência de energia ou do elétron. A interação com o substrato pode ser por transferência de elétron (redução ou oxidação) conforme reação A. Embora o tempo de vida do singlete seja geralmente pequeno para permitir reações que envolvem difusão, a transferência de elétrons é favorecida quando o sensibilizador é diretamente ligado ao substrato. (Baptista 1998). Esse mecanismo é denominado de mecanismo tipo I, são gerados radicais livres, os quais podem por sua vez reagir culminando na formação de produtos. A formação de radicais livres é favorecida na presença de redutores e oxidantes, especialmente se ambas as espécies redox encontrarem-se próximas, por exemplo, em pares iônicos (Heeb 2006, Guldi 2006).

Além disso, o estado triplete pode ainda transferir energia para uma outra molécula. Devido à presença do oxigênio molecular nos diferentes meios, ele é o principal supressor de tripletes. Desta transferência de energia resulta na formação de oxigênio singlete [$^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$)] (veja reação 2 esquema 1). A reação de formação de oxigênio singlete é permitida por spin, uma vez que o spin total é o mesmo antes e depois da reação (Bonnett 2000).

Esquema 1: mecanismos de reações fotoquímicas tipo I e tipo II, nas quais S é o estado fundamental do sensibilizador, ^1S é o estado singlete do sensibilizador, ^3S é o estado triplete do sensibilizador, RH é o substrato, $^3\text{O}_2$ é o estado fundamental triplete do oxigênio e $^1\text{O}_2$ é o estado excitado singlete do oxigênio.

Oxigênio molecular pode ainda reagir com os radicais gerados pelo mecanismo tipo I e gerar ânion superóxido, ou provocar fotoautooxidação da molécula em questão.

As reações fotoquímicas podem ser entendidas no nível molecular em sistemas de estudo homogêneos uma vez que se pode controlar parâmetros (por exemplo, concentrações e difusão). Já em fotobiologia, os sistemas são sempre complexos. Uma grande variedade de reações pode ocorrer competitivamente, tornando difícil a compreensão dos processos no nível molecular (Halliwell 2000). Portanto é importante caracterizar processos fotoquímicos em sistemas controlados para tentar compreender processos fotoquímicos em sistemas biológicos. O estudo do dano fotoinduzido em componentes celulares provocado por espécies excitadas tem interesse tanto patológico, por exemplo, no entendimento do câncer de pele induzido por exposição à luz solar, quanto terapêutico, no tratamento de tumores sólidos (Dougherty 1993, Henderson e Betts 1992, Indig 1997).

A geração de oxigênio singlete é fundamental em fotobiologia, uma vez que acredita-se que o oxigênio singlete seja um dos principais compostos tóxicos fotoinduzidos no ambiente celular (Weishaupt 1976, Henderson 1992). Assim sendo é fundamental entender em detalhe as propriedades do oxigênio singlete. O oxigênio no estado fundamental apresenta dois elétrons desemparelhados, cada um localizado num orbital π^* anti-ligante distinto. Trata-se de um bi-radical. Entretanto, se o oxigênio tenta oxidar uma molécula por aceitar um par de elétrons desta, ambos estes elétrons devem ser de spin antiparalelo para poder se ajustar aos espaços vazios nos orbitais π^* . Um par de elétrons num orbital molecular não obedeceria este critério uma vez que eles possuem spins opostos. Isso impõe uma restrição de transferência de elétron a qual tende a fazer com que o oxigênio aceite um elétron de cada vez. Essa restrição de spin explica o porquê do oxigênio reagir tão vagarosamente com muitas moléculas não radicalares. Os radicais livres possuem elétrons desemparelhados e portanto são acessíveis ao oxigênio molecular (Halliwell 2000, Rohatgi-Mukherjee 1986).

Após excitação eletrônica do oxigênio triplete fundamental, há formação dos oxigênios singletes $^1\Delta_g$ e $^1\Sigma_g^+$. A segunda espécie possui tempo de vida muito curto e decai para formar a espécie $^1\Delta_g$ (Turro 1985). O $^1\Delta_g$ não possui elétrons desemparelhados e a restrição de spin é removida neste caso, ou seja, a eficiência oxidante do oxigênio é fortemente aumentada.

Uma vez produzida, a molécula de oxigênio singlete pode sofrer decaimento não radioativo, oxidar biomoléculas vizinhas ou sofrer decaimento radioativo. O oxigênio singlete provoca danos em lipídeos, proteínas e DNA. Em membranas, o oxigênio singlete oxida principalmente fosfolipídeos e colesterol contendo insaturações formando hidroperóxidos, causando portanto uma desorganização na membrana e alteração de permeabilidade (Henderson e Dougherty 1992, Epe 1993). Em proteína, oxigênio singlete reage com resíduos de aminoácidos (principalmente cisteína, histidina, metionina, triptofano e tirosina), formando endoperóxidos, alterando a conformação e funcionalidade da proteína (Davies 2004). Já com DNA, oxigênio singlete reage principalmente com guanina, gerando 8-oxo-7,8-dihidroguanosina, o que pode comprometer a estrutura e funcionamento do DNA (Ravanat 2000, Martinez 2002, Frimer 2000).

Dano oxidativo devido ao oxigênio singlete foi detectado na membrana plasmática (Smith 1992, Deuticke 1989), na mitocôndria (Salet 1990, Salet 1991), no DNA (Ravanat 2004, Ravanat 2004, Martinez 2003), no retículo endoplasmático (Agarwal 1992) e no lisossomo (Kessel 1996, Berg 1997). Um trabalho recente na literatura mostrou que o oxigênio singlete pode difundir por distâncias longas no meio celular (Skovsen 2005).

Há principalmente dois tipos de morte celular, por necrose ou apoptose. A necrose é um modo de morte associado com a perda do controle homeostático, inchamento e rompimento da membrana celular. Necrose é uma morte não desenvolvida pela célula, ela ocorre pela desregulação das atividades celulares. Necrose é morfológicamente caracterizada pela extensa vacuolação do citoplasma, inchaço mitocondrial, dilatação do retículo endoplasmático e ruptura da membrana

plasmática. As células lisam sem a formação de vesículas. Consequentemente, o conteúdo celular é liberado no ambiente extracelular, danificando células vizinhas, provocando resposta inflamatória. Observa-se necrose em isquemia, hipoxia, trauma, doença de Alzheimer, etc. Embora os mecanismos que envolvem a necrose ainda não são totalmente esclarecidos, evidências experimentais mostram que a necrose é mediada pelo aumento do cálcio intracelular e é independente de caspases. A degradação do DNA no caso da necrose é normalmente não específica. Além disso, a diminuição de energia caracteriza o início da necrose (Leist 2001, Mattson 2003, Taylor 2002, Xiong 2004).

A apoptose é uma forma programada de morte celular. Esta pode ser estimulado por hormônios, fatores de crescimento e exposição a agentes tóxicos (Williams 1993). Há contração da célula, quebra do DNA nuclear, evitando seu extravazamento e finalmente fagocitose dos restos celulares, sem ocorrer lesão às estruturas vizinhas. O aumento na matriz de cálcio induz a abertura do poro transição de permeabilidade da mitocôndria, que proporciona a despolarização e inchamento da matriz, acarretando a liberação de proteínas intermembranas, como citocromo c e outros fatores indutores de apoptose (Bernardi 1994, Lam 2001, Scorrano 1999). Citocromo c, por sua vez, ativa caspases que culminam com a apoptose (Lam 2001). Este tipo de morte celular é caracterizado morfológicamente pela condensação da cromatina nuclear, compactação de organelas citoplasmáticas, contração celular e mudanças na superfície celular. Posteriormente, as células apoptóticas são fagocitadas. A apoptose é freqüentemente acompanhada pela fragmentação do DNA em fragmentos oligonucleossomais com comprimentos que são múltiplos de 180-200bp (Ormerod 1996, Arends 1991).

O fator determinante que define o tipo de morte celular é o nível de ATP na célula. A célula sofre necrose na presença de baixos níveis de ATP no ambiente celular. Já a apoptose é um processo que requer energia para sua execução. A produção de ATP é mantida pela fosforilação oxidativa e pela glicólise. Com o decorrer da apoptose, a mitocôndria perde sua função de produção de ATP, dessa

forma a via glicolítica é a principal responsável pela geração de ATP durante a apoptose. Apoptose e necrose não são fenômenos necessariamente independentes, eles podem estar entrelaçados, por exemplo, se no curso de uma via apoptótica faltar ATP, a célula morrerá por necrose (Lemasters 2005, Kirveliene 2003, Eguchi 1997, Majno 1995).

5.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (PDT) é uma modalidade de tratamento de câncer pouco invasiva e com menos efeitos colaterais comparada com a quimio e radioterapia (Fischer 1995, Stewart 1998, Foote 1968). Em PDT utiliza-se um fotossensibilizador, usualmente administrado sistematicamente ou topicamente, e que se localiza preferencialmente nos tumores sólidos. O tecido canceroso é então irradiado com luz de laser. Reações fotoquímicas resultam na formação de espécies altamente reativas (ROS e NOS) que causam destruição ou modificação do tecido alvo (Foote 1968, Peng 1996). Para o efeito fototóxico ocorrer requer-se o envolvimento do fotossensibilizador, luz proveniente de laser e oxigênio molecular dissolvido, veja esquema 2.

A PDT, inicialmente, era utilizada apenas em tumores em estágio avançado. O tratamento era considerado como paliativo e possuía um sucesso bastante limitado (Kessel 1998). Os resultados obtidos com o uso da PDT no tratamento de lesões superficiais ou em fase inicial evitaram, em muitos casos, a necessidade de cirurgias adicionais (Kessel 1998). A PDT é promissora no tratamento de lesões carcinomatosas (He 1994) de cabeça e pescoço (Kessel 1998). Esta já foi utilizada no tratamento de carcinomas epidermóides de nasofaringe, palato e úvula, faringe e trigono retromolar. Atualmente as aplicações para PDT têm sido ampliadas para áreas além de tumores. PDT foi usada com sucesso no tratamento de diversas

doenças virais e microbianas (Demidova 2004, Wainwright 2003). O uso da PDT para tratamento da degeneração macular relacionada com a idade apresentou benefícios consideráveis aos pacientes portadores da doença. Esta condição é causada pela proliferação de neovascularização na retina, o que pode acarretar com a cegueira. Atualmente não há tratamento eficaz que consiga combater a progressão da doença. Dados iniciais com o uso de PDT mostraram-se promissores. Na área ginecológica, PDT tem sido utilizada para tratamento de menorragia (períodos menstruais prolongados ou com excessiva perda de sangue). Os resultados foram eficazes e evitaram a necessidade de cirurgias. PDT tem sido empregada na dermatologia para tratamento de acne e de doença de Bowen. Em cosmetologia, PDT tem sido utilizada para rejuvenescimento da pele devido ao estímulo da produção de colágeno (Brown 1999, Garcia-Zuazaga 2005, Peng 2003).

As vantagens da PDT são comparativamente a outras metodologias de tratamento baixo índice de efeitos colaterais e alta seletividade, devido a luz do laser ser dirigida somente para os locais cancerosos, poupando outros órgãos que também acumulam os fotossensibilizadores. As desvantagens são: hiperfotossensibilidade da pele, corantes que absorvem pouco no vermelho, adsorção inespecífica no tumor. Todos esses tópicos têm sido motivos de intensa pesquisa para melhorar a metodologia. Atualmente os protocolos de PDT usam sensibilizadores mais eficientes e fontes de irradiação mais baratas diminuindo bastante o custo e aumentando a aplicação.

Esquema 2: esquema geral da terapia fotodinâmica

O mecanismo de morte celular provocada por PDT é dependente do fotossensibilizador (Luo 1996), da célula (Traul 1994) e das condições de tratamento empregadas. (Dellinger 1996) A maioria das drogas que estão sendo utilizadas em tratamentos de câncer por PDT ou que estão em testes clínicos em PDT são eficientes geradoras de oxigênio singlete e o mecanismo de ação destas moléculas depende da presença de oxigênio. Recentemente verificou-se que oxigênio singlete induz apoptose em células de HL-60. (Kochevar 2000) Porém, dependendo da interface que o fotossensibilizador estiver ligado, o mecanismo fotoquímico pode ser modificado (Baptista 1998, Borba 2000).

Em muitos casos o corte de suprimento de oxigênio ao tumor, decorrente do próprio tratamento de PDT (destruição da vasculatura tumoral), causa diminuição da sua eficiência. Desta forma, um dos objetivos de pesquisa atual em PDT é o desenvolvimento de sensibilizadores que destruam diretamente e especificamente organelas celulares (por exemplo, mitocôndria) de tumores na presença ou na ausência de oxigênio (mecanismos tipo I e II).

O estudo da localização celular de corantes despertou interesse recentemente (Lam 2001, Mellish 2002). A resposta fototóxica depende, entre outros fatores, da localização do corante (Kochevar 1994, Kessel 1995). O fotodano na região mitocondrial pode proporcionar a morte celular apoptótica (Kessel 1998).

Um exemplo é um derivado de benzoclorina carregado positivamente que localiza-se em ambos retículo endoplasmático e mitocôndria (Mak 2004). Esta droga causa dano no retículo endoplasmático, o qual é a principal organela que acumula Ca^{2+} . Após a indução do estresse oxidativo no retículo, há liberação de Ca^{2+} o que confere sensibilidade para a morte apoptótica mediada pela mitocôndria (Mak 2004).

A ausência de maneiras eficientes de se determinar a dose de luz e de concentração de corante são um dos principais fatores limitantes da evolução do tratamento de PDT. A dose da PDT deveria ser medida e calculada diretamente no momento do tratamento *in vivo*. Para tanto, dados como concentração do

fotossensibilizador no tecido, quantidade de luz que alcança o tecido, quantidade de luz que é absorvida pelo fotossensibilizador no local e concentração de oxigênio no tumor seriam necessários para garantir o máximo de eficiência da terapia. No entanto, a determinação desses dados *in vivo* é ainda inviável. Assim sendo, tem-se desenvolvido alternativas para determinar a dose. Como a determinação de dose baseada na interação de fotossensibilizador, cinética do oxigênio singlete e fotobleaching *in vitro* (Dysart 2005). Ou seja, um salto qualitativo e quantitativo nos mecanismos envolvidos em PDT são importantes para a evolução da técnica.

Os fotossensibilizadores devem ser moléculas que não causem dano celular quando no estado fundamental, mas que ao serem excitadas transferem energia e ou elétron e iniciam reações fotoquímicas que provocam a destruição de organelas, microestruturas e tecidos culminando com a morte celular. Também devem absorver fortemente nas regiões do vermelho e do infra-vermelho próximo, uma vez que a penetração de luz em tecidos vivos é substancialmente maior em comprimentos de onda acima de 600nm.

Photofrin, uma complexa mistura de porfirinas, foi o primeiro fotossensibilizador aprovado para PDT. Entretanto, a busca de melhores fotossensibilizadores, os quais são quimicamente puros, absorvem luz em comprimentos de onda na região do vermelho (facilita a penetração de luz no tecido) e que causam reduzida fotossensibilidade comparada com Photofrin, conduziu ao estudo de diversas classes de compostos incluindo ftalocianinas, clorinas, triarilmetanos (TAM) e fenotiazinas. (Brown 1999) Uma vantagem dos corantes TAM e fenotiazonas sobre o Photofrin é a formação de radicais na ausência de oxigênio (veja adiante) e de oxigênio singlete na presença de oxigênio triplete. Isto apresenta aspectos positivos para o tratamento de câncer em hipóxia. Um estudo comparativo da ação fotodinâmica de MB e hematoporfirina mostrou que para se obter o mesmo efeito fototóxico entre essas drogas é preciso uma concentração de hematoporfirina de 5 vezes maior que a necessária para MB (Waki 2005).

Um derivado de porfirina, o monometil éter hematoporfirina, induziu morte

celular tanto por apoptose quanto por necrose. Observou-se que oxigênio singlete e radical hidroxila foram fotogerados após excitação desta droga. Este derivado após excitação induziu a liberação do citocromo C e ativação da caspase 3 (Ding 2004). Já o fotossensibilizador benzopireno quando excitado provocou somente morte apoptótica em células de linfoma humano, como foi demonstrado através dos sinais apoptóticos (Ibuki 2002).

Os corantes positivos, principalmente das classes das fenotiazinas e dos triarilmetanos (TAM) (Figura 2), apresentam características favoráveis para utilização. São relativamente lipofílicos e possuem carga positiva. Isso garante a permeação em membranas e também acúmulo em mitocôndrias devido ao potencial negativo da matriz mitocondrial (Hacham 1990, Baptista 1997, Baptista 1998, Foote 1968).

5.3 CORANTES TRIARILMETANOS – FOTOSSENSIBILIZADOR CRISTAL VIOLETA

O cristal violeta (CV) pertence à classe dos triarilmetanos (TAM) (Figura 2) que apresentam ampla aplicações comerciais, tecnológicas e médicas (Duxbury 1993, Ippen 1975, Naguib 1986, Ishikawa 1994, Jones 1986). Eles exibem propriedades antibacterianas (Albert 1981) e de desinfecção (Namiki 1986). Além desta aplicações, os corantes TAM têm interesse para a PDT.

A investigação da fotoquímica e da fotofísica dos corantes TAM foi intensa nos últimos anos (Duxbury 1993, Sundstrom 1982, Leaver 1972, Naguib 1986, Jones 1986, Bhasikuttan 2002, Lovell 1999, Li 1999). Dentre os TAM, CV é o corante que apresenta melhor partição hidrofílica e lipofílica (Indig 2000). CV apresenta coeficiente de partição baixo (2,4), porém é altamente acumulado na célula, outros TAM com coeficientes de partição altos e, portanto, mais hidrofóbicos

do que CV apresentaram baixo acúmulo intracelular. Já com um corante com um coeficiente de partição muito baixo como rodamina (0,24), a captura intracelular é dirigida por forças atrativas como o potencial mitocondrial. Apesar de ser atraído pelo potencial mitocondrial e acumular nesta organela, após a despolarização da mesma, observou a presença de CV nesta organela, o que indica que CV apresenta caráter hidrofóbico suficiente para garantir a sua permanência na mitocôndria mesmo sem o potencial. Pode-se inferir, portanto, que CV tem apropriado caráter hidrofílico e lipofílico entre os TAM para garantir uma eficiente permeação em membranas celulares.

Caracterizou-se que o rendimento quântico de fluorescência e o tempo de vida do estado excitado do CV dependem do solvente (Duxbury 1993). CV apresenta pouca fluorescência em solventes de baixa viscosidade devido ao rápido decaimento (em torno de pico segundos) não radiativo do estado excitado singlete para o estado fundamental (Vogel 1985, Sundstrom 1982). Estudos fotofísicos indicam que os rendimentos quânticos de fluorescência e de cruzamentos entre sistemas podem ser aumentados quando a rotação dos anéis benzênicos é impedida e a mobilidade molecular restringida (Vogel 1985). De fato, vários estudos mostram um ganho no rendimento quântico quando corantes TAM são incorporados em polímeros (Duxbury 1993, Jones 1991) ou em proteínas (Baptista e Indig 1998).

Figura 2: Estrutura molecular dos fotossensibilizadores MB e CV.

O mecanismo de fotodegradação tem sido também estudado, no entanto é ainda objeto de conjectura. Tanto reações de oxidação quanto de redução podem ser responsáveis pela fotodegradação do corante (Jones 1986, Leaver 1972). Dois

intermediários radicalares principais têm sido descritos $CV^\bullet$ e $CV^{2+\bullet}$. Diversos agentes redutores podem facilitar a formação de $CV^\bullet$. Estudos de ressonância eletrônica paramagnética mostraram que CV sofre redução de um elétron formando o radical livre $CV^\bullet$, na presença do agente redutor é nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) (Docampo 1983). Além disso $CV^\bullet$ reduz C_{60} gerando $C_{60}^\bullet$ (Kitagawa 1999). A geração de $CV^\bullet$ ocorre só na ausência de oxigênio molecular (Compton 1988, Reszka 1986). O radical semireduzido de CV também foi observado em polímeros através da técnica ressonância eletrônica paramagnética (Leaver 1972).

A ejeção de elétron de CV conduz a formação do radical dication $CV^{2+\bullet}$. Bhasikuttan *et al* investigaram a fotoionização de CV em soluções aquosas e mostraram que o processo ocorre via absorção bifotônica e que os transientes envolvidos tratam-se dos $CV^\bullet$ e $CV^{2+\bullet}$ (Bhasikuttan 1995). Jones *et al* detectaram a formação de $CV^\bullet$ e $CV^{2+\bullet}$ pela técnica de flash photolysis quando CV é ligado ao polimetacrilato (Jones 1991). Observou-se que o radical $CV^\bullet$ absorve em 410nm e o $CV^{2+\bullet}$ em 630nm (Jones 1991). Além dessas espécies obteve-se elétron solvatado o qual absorve em 720nm (Bhasikuttan 1995). A formação do radical $CV^{2+\bullet}$ está associada com a reação de N-demetilação da molécula de CV causando a formação de fucsina básica (Li 1999). Observou-se que a reação de N-demetilação foi fortemente inibida pela glutathione reduzida gerando a formação de radical glutathionil e CV no estado fundamental (Gadelha 1992).

Além disso, outros mecanismos fotoquímicos têm sido sugeridos para CV em meios orgânicos. Reações de heterólise, homólise a partir do estado excitado singlete e rearranjo estrutural no estado excitado tripleto têm sido propostos (Pohlers 1999, Bartl 1990, Jarikov 2001).

Estudos sobre o efeito de proteínas séricas no mecanismo de ação de CV foi investigado (Baptista 1997, Baptista 1998). Ao ligar-se na albumina as propriedades fotofísicas e fotoquímicas deste corante alteram-se (Bartlett 1999). Observa-se um

aumento de diversas ordens de magnitude no tempo de vida e na reatividade das espécies excitadas (singletes, tripletes) e radicalares. Comprovou-se um mecanismo envolvendo transferência de elétrons de aminoácidos da proteína para o corante (Baptista 1997, Baptista 1998, Bartlett 1999). A absorção da luz pelo corante gera espécies tripletes e radicalares que podem interagir diretamente na célula cancerosa.

Foi reportado que CV inativa o parasita *Trypanosoma cruzi*, responsável pela doença de Chagas (Docampo 1983). Esta droga também tem sido utilizada como anti-séptico em cordão umbilical de recém-nascidos e queimaduras de pele (Bale 1981). Indig *et al* observaram que CV apresenta uma alta fototoxicidade em células com leucemia e baixa toxicidade em células hematopoiéticas normais (Indig 2000). Um estudo do fotodano em hexoquinase e DNA provocado por uma série de corantes TAM revelou que CV foi o mais promissor fotossensibilizador uma vez que não foi necessário oxigênio para o efeito danoso ocorrer (Lewis 2002). Dentre os corantes TAM, CV é o que apresenta mais indicações médicas (Harrelson 1982, Indig 2000) e por esta razão foi utilizado nesta tese.

Interfaces negativas são ambientes atrativos para incorporação de corantes positivos. Dentro do ambiente celular, mitocôndrias são as organelas que apresentam potencial transmembranar negativo na face interna. Isto deve-se principalmente ao bombeamento de prótons pelo complexo da cadeia de transporte de elétrons para o espaço intermembranas. Outro fator é o maior conteúdo do lipídeo cardiolipina na face interna da membrana interna mitocondrial, que possui carga negativa (Daum 1985, Mannella 2006, Hauff 2006). Estas duas características proporcionam à mitocôndria uma interface interna negativa, o que deve favorecer incorporação de corantes positivos. De fato, um estudo com mitocôndrias isoladas mostrou que CV foi eficientemente acumulado em mitocôndrias (Kowaltowski 1999). No entanto, ainda não há um estudo detalhado dos mecanismos envolvidos do CV em interfaces negativas. Devido à simplicidade dos sistemas modelos estes são de especial interesse para os estudos de ligação de corantes positivos em interfaces negativas, por exemplo. Dentre tais sistemas, micelas reversas criam ambientes com interfaces

interna negativas servindo portanto como mimetizadores de organelas negativas.

5.4 FOTOSSENSIBILIZADOR AZUL DE METILENO

Azul de metileno (MB) é um fotossensibilizador que pertence à classe dos corantes fenotiazínicos. Possui carga positiva e forma agregados de acordo com as condições do meio, veja Figura 2. Dependendo do seu estado de agregação, diversas características fotofísicas e fotoquímicas são drasticamente alteradas. Estas mudanças de agregados podem ser controladas pela ligação do corante num substrato.

Comparações entre fenotiazonas têm demonstrado que MB apresenta características mais favoráveis para o uso em PDT. Pode se citar, por exemplo, um estudo que mostrou que MB apresenta cinética de incorporação celular mais rápida e fotoinativação maior que a obtida por azul de toluidina (Cañete 1993). Assim, estudos do uso de fenotiazonas em PDT têm se concentrado predominantemente em azul de metileno e seus análogos demetilados, exemplo azure C.

MB é conhecido sofrer reações de redução após excitação eletrônica, gerando radical semi-reduzido e leuco-MB. Estas reações têm sido caracterizadas em meios orgânicos e biológicos. Em meios orgânicos, devido à facilidade do sistema, é possível identificar detalhadamente o mecanismo envolvido. Após a transferência de elétron, há formação de radical MB e posteriormente um próton e mais um elétron são também transferidos sequencialmente, gerando leuco-MB, as constantes das semi-reações de cada etapa da fotoredução foram determinadas. Além disso, observou-se que esta reação compete com a transferência de elétrons entre os radicais do par parental (Liu 2001). Em sistemas biológicos, foram identificados os doadores de elétrons que podem reduzir o MB. Como exemplo, NAD(P)H e ascorbato (Tuite 1993). Além disso, observou-se que a fotoredução de MB por

ascorbato torna-se reversível quando não há mais incidência de luz (Harmatz 1983).

Ligação de moléculas em interfaces, membranas e proteínas alteram as propriedades pode causar alterações nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas do corante. Nosso grupo estudou as propriedades do MB no estado fundamental e excitado em micelas normais e reversas, vesículas e solução de sal cloreto de sódio. Observou-se que há formação de dímeros dependendo da relação concentração de MB e número de agregados supramoleculares ou da concentração de sais no meio (veja equação 5 do esquema 3) (Junqueira 2002). A formação dos dímeros ocorre no estado fundamental e é favorecida em algumas situações, como por exemplo, em altas concentrações de sal (isso provoca aumento da constante dielétrica da água diminuindo a repulsão eletrostática entre os monômeros), em todas interfaces utilizadas (há um aumento local da concentração de MB). Caracterizou-se o tipo de dímero formado, trata-se de um intermediário mais próximo do dímero tipo H. A constante de dimerização é de $3,8 \cdot 10^3 \text{M}^{-1}$ em água e pode aumentar com o aumento da força iônica do meio (Severino 2003). Além disso, agregados maiores podem ser conseguidos quando MB é aderido em argila. Pode se conseguir monômeros, dímeros, trímeros e agregados maiores (Cione 2000).

Verificou-se que a dimerização provoca diminuição no rendimento quântico de fluorescência e favorece reações de transferência de elétrons (Junqueira 2002). Através de espectros de variação de absorção por flash fotólise, foi possível identificar todas as espécies. Assim sendo, há formação dos radicais semi-reduzido $\text{MB}^\bullet$ e semi-oxidado $\text{MB}^{2+\bullet}$ (veja esquema 3 abaixo) em micela normal de dodecil sulfato de sódio. Sendo que o ^3MB aparece depois de 50ns após o pulso do laser, o $\text{MB}^\bullet$ depois de 250ns e o $\text{MB}^{2+\bullet}$ depois de 10 μs (Severino 2003). Há portanto favorecimento do mecanismo tipo I quando há dímeros de MB. Já para o caso de monômeros há transferência de energia do ^3MB para o oxigênio molecular gerando oxigênio singlete (reação 2 do esquema 3), seguindo o mecanismo tipo II. Portanto, dependendo do estado de agregação de MB, este fotossensibilizador pode atuar tanto pelo mecanismo tipo I quanto tipo II. Esta característica de MB permite-no atuar

sobre condições adversas do tumor, como por exemplo em situações de hipóxia, no qual somente o mecanismo tipo I pode ocorrer (Severino 2003).

A facilidade do uso de sistemas simples ajuda a compreender os fenômenos observados em sistemas complexos. Por exemplo, observou-se que MB provoca fotodano em lipossomos de lecitina via geração de oxigênio singlete, causando lise dos lipossomos (Muller-Runkel 1981). Além disso, observou-se peroxidação lipídica quando da excitação de MB próxima de lipídeos, como a concentração de oxigênio é maior em membranas do que em água, o mecanismo tipo II é favorecido (Tuite 1993). Isso torna possível o entendimento do dano que MB provoca após excitação em membranas lisossomais, por exemplo. O dano gerado na membrana causou liberação de enzimas lisossomais (Santus 1983). Utilizando a técnica de Ressonância Eletrônica Paramagnética identificou-se também a presença de radical superóxido em células incubadas com MB em alta concentração (em torno de 270 μ M) seguidas de irradiação. Verificou-se dano na membrana plasmática, havendo diminuição na fluidez da membrana (Dube 2000 – eles estudaram um bacilo).

A fotooxidação de aminoácidos sensibilizada por MB tem sido observada. MB reage com os aminoácidos triptofano, histidina, metionina e cisteína, os quais podem estar isolados, em peptídeos ou em proteínas (Tuite 1993). A reação geralmente envolve abstração de um elétron ou de hidrogênio do aminoácido, porém este mecanismo não ocorre em metionina, triptofano, histidina e tirosina, os quais são oxidados por oxigênio singlete gerado pelo MB excitado. O rendimento quântico de fotoredução do corante aumenta com o aumento da concentração do aminoácido (Knowles 1972). Assim sendo, mecanismos tipo I ou II podem ocorrer (Nilsson 1972, Tuite 1993). Os produtos da fotooxidação de triptofano sensibilizado por MB têm sido identificados, pelo menos nove produtos foram detectados (Inoue 1982).

Derivados de MB têm sido propostos para PDT. Análogos com cadeia alquílica alongada apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção deslocados para a região do vermelho do espectro e apresentam também maior fototoxicidade em relação ao MB

(Mellish 2002). Os derivados 1-metil MB e o 1,9 dimetil MB apresentam maior fototoxicidade do que MB, porém apresentam também maior toxicidade no escuro. Além disso, o aumento na dose de luz aumentou a fototoxicidade de MB, e teve pouca influência sobre os demais derivados (Wainwright 1997).

Os análogos de MB têm sido propostos para PDT. Observou-se que um derivado de MB pode induzir apoptose em células tratadas com dose LD90, a dose LD₅₀ aparentemente não causou apoptose em células (Ball 1998). Os diversos derivados de MB com cadeias alquílicas longas têm apresentado toxicidade no escuro distintas. MB é o menos tóxico e o derivado n-pentil é o que apresentou maior toxicidade. A geração de oxigênio singlete é quase a mesma para a série de derivados de cadeia metal até n-hexil. MB apresentou habilidade de fotossensibilizar um pouco maior que os demais (de 5 a 12%), como medido pela fotooxidação de 1,3-difenilbenzofurano, o qual é uma sonda para oxigênio singlete. Além disso, MB fotooxida quase 100 vezes mais triptofano do que o derivado n-hexil, provavelmente devido à agregação que ocorre com os derivados de cadeia longa. Entretanto, comparando a fototoxicidade em células RIF-1, MB causou a menor fototoxicidade (130 vezes menor do que para o n-propil) (Mellish 2002).

O entendimento do mecanismo de fotoindução de morte celular é uma importante direção para a busca por novos e mais eficiente tratamentos para doenças neoplásicas. Por exemplo, a indução da apoptose ou necrose pode ser regulada pelo tipo de mecanismo fotoquímico (tipo I ou tipo II) (Kochevar 2000).

Sabe-se que alguns tumores apresentam o caráter de resistência a multidroga (MDR). As células neste tipo de tumor apresentam uma glicoproteína P que bombeia as drogas para fora das células (Gottesman 1993). Assim, a ação requerida da droga contra o tumor é pouco eficiente. Para esse tipo de tumor são necessários além da droga contra o tumor, compostos adicionais para reverter o fenótipo MDR. Um estudo de células com caráter MDR incubadas com MB mostrou que esta droga reduziu a viabilidade de células após o tratamento de PDT e que não houve diferença na sensibilidade entre células de mesma origem com ausência ou presença

do caráter MDR, o que indica a ação de MB como agente que reverte o caráter MDR e como agente fotodinâmico (Trindade 2000).

Fototoxicidade em uma série de tumores *in vitro*, incluindo carcinoma de bexiga de rato (Gill 1987) e humana (Yu 1990), adenocarcinoma cervical (Schmidt 1991) e linfoma da célula T humana (Boehncke 1996) tem sido observada com incubação com MB e fotoirradiação. Ensaios em animais com células de tumores transplantadas e tratadas com MB e luz mostraram que 75% dos tumores foram eliminados utilizando um único tratamento de PDT (Orth 1998).

Nosso grupo em colaboração com o Dr. João Paulo Tardivo tem estudado as propriedades de MB nos diferentes ambientes para compreender melhor a ação desta droga no tecido tumoral. Estudos em solução aquosa mostram que MB não sofre agregação tendo altos rendimentos quânticos de formação de tripletes e de oxigênio singlete (Tardivo 2005). Já quando em interfaces, este fotossensibilizador possui fotoquímica diferenciada de acordo com o estado de agregação e com o tipo de agregado formado o qual é dirigido pela interface, como já comentado anteriormente. Uma vez da interação com membranas, MB após fotoexcitação pode causar lipoperoxidação em vesículas de lecitina. Em organelas, a diferença de potencial transmembranar existente na matriz mitocondrial atrai MB, como verificado por experimentos de incubação de em suspensão de mitocôndrias (Tardivo 2005). Uma vez do seu alto acúmulo em mitocôndrias, MB agrega formando dímeros, diminuindo assim a geração de oxigênio singlete via excitação de MB. Os estudos de MB em células e publicados estão descritos no decorrer desta tese. Em microorganismos, tem-se observado que MB provoca inativação após incidência de luz. MB provoca inativação de bactérias via mecanismos I e II. MB foi capaz de matar fungos dermatófitos. Além disso, MB erradicou *C. albicans* de cavidades orais (Tardivo 2005).

Novos tipos de tratamento têm sido proposto com o objetivo de alcançar melhores resultados a um custo baixo. Temos utilizado uma fonte de luz de custo baixo chamada RL50 que emite luz em toda a região de 600 a 750nm. Empregou-se

MB topicamente seguido de RL50 em pacientes com tumor superficial uma vez por semana ou uma vez por mês (Tardivo 2005). Nenhuma toxicidade foi observada com MB, porém coceira e dor foram observadas de acordo com a sensibilidade de cada paciente. A dose de luz foi de 18 a 36 J/cm². Pacientes com carcinoma basal celular apresentaram resposta à PDT com MB e RL50 após três sessões. O tratamento evitou cirurgia podendo comprometer o órgão interno (Tardivo 2005). Pacientes com melanoma encontram dificuldade de tratamentos com PDT, uma vez que ALA ou derivados de porfirina não apresentam resultados promissores. Pacientes com melanoma foram submetidos à PDT com MB seguido de RL50, a dose foi de 18J/cm². Após o tratamento cinco das seis lesões desapareceram, meses depois do tratamento houve diminuição do tumor. Isto indica que MB empregado topicamente seguido de aplicação de RL50 pode ser usado para o tratamento de doenças neoplásicas (Tardivo 2005).

Esquema 3: Rotas de reação do Azul de Metileno (MB), onde MB^+ , ${}^1\text{MB}^{+\ast}$, ${}^3\text{MB}^{+\ast}$, são MB nos estados fundamental, singlete e triplete, respectivamente. $\text{MB}^\bullet$ e $\text{MB}^{2+\bullet}$ são radicais semi-reduzidos e semi-oxidados do MB, respectivamente. Ω_1 é absorção luminosa e ϕ_f , ϕ_{nr} e ϕ_T são os rendimentos quânticos de fluorescência, de decaimento não radiativo e de formação de triplete.

5.5 PARES IÔNICOS

Pares iônicos são formados entre duas espécies de cargas opostas que não são totalmente separadas em solução (Taft 1985, Szpakowska 2006). Eles são presentes em superfícies carregadas e interfaces, e portanto, são importantes em todos os campos da ciência (Yamamoto 2003, Nagy 2000, Taguchi 1996). Reatividade química e fotoreatividade de moléculas são relacionadas não somente à formação de pares iônicos mas também a presença ou ausência de moléculas de solvente entre as duas espécies que o formam (Nagy 2000, Taguchi 1996, Borba 2000, Chatterjee 1990, Yang 1992). Em áreas como química medicinal e de materiais, pares iônicos tem papel importante. Partição de drogas em membranas, sua distribuição farmacocinética e consequentemente sua eficiência são dependentes da presença de pares iônicos (Kaschak 1999). Filmes finos são frequentemente construídos baseados na formação de pares iônicos (Kaschak 1999, Zucolotto 2005). Em termos de bioquímica e biologia, pares iônicos são importantes para entendimento da estrutura e funcionalidade de membranas, proteínas e DNA. Algumas questões fundamentais na bioquímica, por exemplo, como os íons afetam a estrutura e dinâmica de membranas, e qual é o papel dos pares iônicos na manutenção da conformação nativa das proteínas, não têm sido completamente respondidas (Rodenbeck 2001, Arnold 1995, Dias 2002).

A formação de pares iônicos está relacionada com várias forças que afetam o potencial químico das espécies livres solvatadas e dos próprios pares iônicos (Nagy 2000). Espécies carregadas solúveis usualmente formam pares iônicos em solventes de constante dielétrica baixa. Em solventes polares como a água, as interações de solvatação superam as interações de pares iônicos (Taft 1985, Szpakowska 2006, Nagy 2000, Taguchi 1996).

Os pares iônicos são classificados em pares iônicos de contato e separados por molécula do solvente (Taft 1985, Szpakowska 2006, Yamamoto 2003, Nagy 2000). Pares iônicos de contato são formados sem possuir nenhuma molécula de

solvente entre eles e os íons estão em contato, vide Figura 3. Aumentando o poder de solvatação do íon e a constante dielétrica do meio, um outro tipo de par iônico é gerado, o par iônico separado por solvente (Figura 3). Entretanto a distinção experimental desses tipos de pares iônicos não é facilmente obtida. Portanto, as designações par iônico de contato e par iônico separado por solvente são muitas vezes não distinguidas. Os íons podem ainda serem totalmente solvatados pelas moléculas de solventes e dissociados conduzindo aos íons livres em solução.

Par iônico de contato

Pares iônicos separados por solvente

Figura 3: Representação esquemática de pares iônicos de contato e separados por solvente.

Em solução aquosa, há um equilíbrio entre os diferentes tipos de pares iônicos. O modelo sugerido para a formação dos pares iônicos em solução afirma que os íons combinam-se num primeiro momento com as suas camadas de hidratação intactas, formando os pares iônicos separados por solvente. Isso segue-se

com uma sucessiva perda de moléculas de água, formando os pares iônicos compartilhando solvente e por fim os pares iônicos de contato (Eigen 1962).

Devido à dificuldade de se caracterizar pares iônicos utilizando técnicas espectroscópicas, estudos teóricos utilizando simulação dinâmica computacional têm sido empregados. A dinâmica, estrutura, comprimento das distâncias entre as moléculas envolvidas nos diversos pares iônicos e o número de moléculas de água que envolvem os íons foram determinados. Observou-se que com o aumento da concentração dos constituintes do par iônico em solução há favorecimento do par iônico de contato (Heuft 2006).

Simulações computacionais também têm ajudado a estudar pares iônicos formados entre grupos polares de dois surfactantes de cargas opostas (dodeciltrimetilamônio e dodecilsulfato) (Rodriguez 2005). O par iônico formado mais estável é do tipo de contato envolvendo os grupamentos polares. A distância entre os constituintes do par é de aproximadamente 5Å neste caso. A energia livre de ativação para dissociação do par iônico formando o separado por solvente pode ser estimada de maneira simples comparável à energia térmica típica, o valor obtido é de 1 kcal/mol, e neste caso a distância passa a 7Å (Rodriguez 2005).

Pares iônicos radicalares de contato de benzofenona com derivados de anilina foram observados serem formados no estado excitado através da transferência de elétron entre o par. O par iônico de contato radicalar decai por dois caminhos na escala de pico segundo, ou através da transferência de próton dentro do par geminativo ou através da separação difusional para formar par iônico radicalar separado por solvente (Guldi 2006, Heeb 2006).

Superfícies e interfaces são regiões complexas nas quais, numa extensão de poucos angstroms, há diferenças nas forças de solvatação e constante dielétrica, a qual afeta a interação dos íons e conseqüentemente a dinâmica e a estrutura da superfície (Yamamoto 2003, Romsted 2001, Buurma 2004, Faeder 2000, Mafe 1997).

A caracterização dos diversos tipos de pares iônicos em ambientes interfaciais é difícil mas é um aspecto de extrema importância pois define as propriedades estruturais e conformacionais das interfaces.

5.6 SISTEMAS MIMÉTICOS DE MEMBRANAS

Os sistemas miméticos de membranas são constituídos de moléculas que se auto organizam formando estruturas compartimentalizadas que adquirem forma e muitas vezes função própria. Agregados de moléculas anfifílicas dispersas num solvente orgânico ou aquoso podem formar vesículas, monocamadas, bicamadas, micelas, microemulsões, dentre outras estruturas (Tanford 1991), conforme pode ser observado na Figura 4. Esses agregados podem adquirir diferentes conformações sendo importantes no desenho de sistemas químicos utilizados para a catálise, para o controle de reatividade e de transporte de compostos, dentre outras aplicações (Friberg 1998, Urban 1999, Lu 2005, Fendler 1982, Pileni 1989).

Além de aplicações tecnológicas, as micelas reversas, as monocamadas e as bicamadas (representadas pelos vários tipos de vesículas) são mimetizadores das membranas, ou seja, imitam a porção lipídica das membranas biológicas. Esses sistemas são simplificados e de fácil obtenção, logo a sua utilização facilita o estudo das propriedades das membranas biológicas (Fendler 1982).

Os sistemas biomiméticos promovem distribuição diferencial de substratos, intermediários e produtos nas regiões orgânica, aquosa e interfacial. Isto se deve à combinação entre efeito hidrofóbico e interação eletrostática que esses sistemas possuem (Wennerström 1979).

O interesse em se utilizar micelas reversas neste trabalho é principalmente motivado pela importância prática destes sistemas na variação precisa de propriedades interfaciais e água de solvatação. Uma vez que micelas reversas podem

solubilizar enzimas e proteínas, há também um interesse crescente em compreender as interações biopolímeros-micelas reversas (Barni 1991).

Figura 4: Representação simplificada de estruturas organizadas formadas por moléculas anfífilas em diferentes meios (Fendler 1982).

5.7 MICELAS REVERSAS

As micelas reversas se formam espontaneamente e são termodinamicamente estáveis. Elas formam soluções isotrópicas, usualmente transparentes ou translúcidas (Langevin 1988). Na maioria dos casos, a formação da micela ocorre quase instantaneamente ao se misturar a água, o solvente orgânico e o anfifílico, a constante de velocidade deste processo é da ordem de $1,4$ a 3 s^{-1} (Battistel 1989).

Forças atrativas e repulsivas são as responsáveis pela formação de micelas reversas. Interações dipolo-dipolo e íon-dipolo entre os grupos polares do anfifílico. Já a perda da liberdade translacional e rotacional dos grupos hidrofílicos do anfifílico se opõem à formação de micelas reversas (Ruckenstein 1980, Attwood 1983).

O mecanismo de formação das micelas reversas varia com o tipo de tensoativo (Fendler 1982). No caso de tensoativos que se comportam idealmente, por exemplo, AOT, acima de certa concentração crítica, denominada de cmc, e na presença de água ou de uma mistura contendo solução aquosa e solvente orgânico, as moléculas anfifílicas se agregam adquirindo uma forma geométrica que se assemelha a uma esfera (os modelos que explicam a estrutura micelar, consideram-na parcialmente esférica). As cadeias hidrocarbonadas longas se agrupam e se entrelaçam superficialmente na esfera hidrofóbica e as extremidades iônicas situam-se internamente no poço aquoso, formando a micela reversa (Fendler 1982, Gruen 1985). Essas micelas podem conter dezenas de moléculas anfipáticas, que agregam-se espontaneamente, sendo desta forma estruturas termodinamicamente estáveis, (a variação de energia livre de Gibbs de micelização é negativo) (Tanford 1991, Israelachvili 1992). Existem outros tipos de agentes anfifílicos, por exemplo, propionato de dodecilamônio (DAP), onde um valor de cmc não é claramente definido, uma vez que o número de agregação e conseqüentemente o tamanho dos agregados varia com a concentração de detergente (Fendler 1982).

A geometria molecular do anfifílico está relacionada com o tipo de agregado

formado. O AOT, por exemplo, possui volume molecular igual a $600\text{\AA}^3$, comprimento de cauda hidrocarbonada de $8\text{\AA}$ e área por cabeça de $60\text{\AA}^2$, a relação entre esses parâmetros indicam que a molécula de AOT forma micelas reversas espontaneamente (Pileni 1989).

A solubilização de água por estas soluções é uma forte indicação da formação de agregados. Um exemplo dramático desta solubilidade é o caso do tensoativo aniônico bis-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio, AOT, que pode solubilizar até 60 moléculas de água por cada molécula de surfactante (Eicke 1980), vale lembrar que a solubilidade de água em isooctano é de apenas cerca de 10^{-3}M . Esta solubilização de água em micelas reversas deve-se à interações íon-dipolo do grupamento iônico com as moléculas de água, e pontes de hidrogênio entre os anfífilos não iônicos e água. Porém o acúmulo de água no poço interno é conseguido até um determinado raio micelar, a partir da qual, o processo de aumento da micela reversa pára e o excesso de água é rejeitada no poço e passa a formar uma nova fase. Isto deve-se ao fato de que a energia interfacial associada a formação da nova fase é menor do que a energia de curvatura da camada do anfífilo.

Assim sendo, micelas reversas são sistemas microheterogêneos constituídos de solvente orgânico, interface anfífila e poço aquoso interno (Fendler 1982). Estes micro-agregados são microemulsões diluídas de água em óleo conforme pode ser observado na Figura 4.

A água da periferia micelar tem sua estrutura e estado alterado pelo aumento da relação de concentração molar entre água e anfífilo ($W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{anfífilo}]$) (Wong 1977, Kawai 1992). Descontinuidade de diversas propriedades físico-químicas da água solubilizada são observadas em micelas reversas de AOT (Hauser 1989, Hamada 2001). A relação aproximada entre o raio do poço aquoso e o conteúdo de água é:

$$R_w = 1,5 W_0 \quad (\text{Pileni 1989})$$

A discussão na literatura sobre a água dentro de micelas reversas de AOT é extensa. Existem diversas propostas para o número de populações de água existentes, desde apenas uma, duas, três e contínua (inúmeras) (Kawai 1992, Goto 1995, Fendler 1982, El Seoud 1994, Neuman 1999). Claramente há pelo menos duas populações. Uma delas presente na região interfacial possui dinâmica e estrutura de ligação de hidrogênio diferentes da água isotrópica. Com o aumento do valor de W_0 acima de 10, pode-se observar populações de água *bulk*, ou seja, tem propriedades semelhantes à água isotrópica.

Além das alterações relacionadas com o W_0 outras propriedades da solução como concentração de surfactante, força iônica, temperatura, composição da fase orgânica, aditivos diversos alteram as propriedades e estruturas das micelas reversas.

As micelas reversas podem ser formadas na ausência de água solubilizada. No entanto, neste caso, os agregados são pequenos e polidispersos. Micelas reversas de AOT sem água apresentam um empacotamento tal que há um volume vazio no centro de 4,4Å (Pileni 1989).

Além dos usos clássicos, por exemplo, na lavagem a seco, no encapsulamento de drogas, no resfriamento de ferramentas de corte, na preparação de emulsões fotográficas e no processo de tingimento, outras aplicações de micelas reversas têm surgido recentemente, podendo-se citar: a recuperação terciária de petróleo, como meio para a polimerização; e na preparação de partículas finamente divididas, quase monodispersas, como, por exemplo, óxido de ferro e carbonato de cálcio (Barni 1991, Duxbury 1993, Friberg 1998, Lu 2005).

6. OBJETIVOS

Para propor drogas e protocolos melhores dos que estão sendo utilizados presentemente em PDT é necessário ter um conhecimento profundo dos mecanismos fotodinâmicos em sistemas modelos. Nosso grupo de pesquisa tem se concentrado na caracterização destes mecanismos. O efeito fotodinâmico de sensibilizador ocorre em ambientes próximos a proteínas e membranas. Uma vez que o efeito fotodinâmico *in vivo* dos corantes MB e CV ocorre em ambientes próximos a membranas e proteínas tornou-se fundamental compreender o efeito de interface nas propriedades destes corantes. Desta forma, um dos objetivos deste trabalho é a **caracterização do efeito de interfaces nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas de CV**, utilizando-se de micelas reversas como modelos de interface. No mesmo período, estes estudos foram realizados por outras pessoas do nosso grupo com outra droga de nosso interesse, MB. Ao final deste processo, tivemos a caracterização fotofísica e fotoquímica destes corantes em meios micelares (Junqueira 2002, Severino 2003, Oliveira 2006) e para MB também em mitocôndrias (Gabrielli 2004). Com este conhecimento adquirido tornou-se possível ampliar os estudos para o ambiente celular. **Pretendemos comparar eficiência e mecanismos fotodinâmicos dos dois corantes nas células.** Para tanto, estudou-se a distribuição e a caracterização da fotodinâmica de CV e MB em células tumorais HeLa.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1 SOLVENTES, REAGENTES E SOLUÇÕES

Clorofórmio (Synth P.A.) foi refluxado e destilado na presença de pentóxido de fósforo (P_2O_5) 97%, descartando-se a primeira e a última fração. Guardou-se a fração intermediária do destilado em frasco âmbar previamente lavado e seco em estufa. Este foi posteriormente conservado na geladeira. Ciclohexano foi destilado da mesma maneira que o clorofórmio. 2,2,4 trimetil-pentano (isooctano), tricloroetileno, clorobenzeno, diclorobenzeno, hexano, acetona, etanol, glicerol e dodecano (Synth ou Fluka) já estavam previamente purificados e disponíveis no laboratório. A água utilizada para o preparo de todas soluções-estoque sempre foi bidestilada, deionizada e filtrada (padrão Milli-Q). A água deuterada (Acros Organics) utilizada sem tratamento prévio.

O tensoativo bis-2-etilhexil sulfosuccinato de sódio (AOT) (Sigma) foi purificado através de refluxo em solução metanólica com carvão ativo. A mistura foi filtrada e o solvente extraído a vácuo. AOT foi também seco sob vácuo e armazenado em dessecador contendo P_2O_5 e $CaCl_2$. Dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) já estava purificado no laboratório.

MB (Synth) e CV (Fluka) foram solubilizados em etanol, filtrados à quente e à vácuo. Posteriormente o solvente foi removido por rota-evaporador e o filme formado foi retirado. Leuco-CV e cetona de Michler (Aldrich) não sofreram tratamento prévio. Valinomicina (Aldrich), azida (Aldrich), ascorbato (Aldrich) e iodeto de propídeo (Aldrich) não sofreram preparo prévio.

Para a manutenção da cultura celular utilizou-se as soluções estéreis: tripsina, tampão fosfato (PBS) (Biowhittake), meio de cultura DMEM 4,5 g/L glicose (Cultilab) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de penicilina:estreptomicina (Biowhittake).

Todas as soluções utilizadas durante os experimentos foram preparadas no mesmo dia do uso. Para retirar o ar de algumas soluções, borbulhou-se gás argônio no solvente do experimento durante 30 a 40 minutos. Seguem abaixo os detalhes de preparação de cada solução:

Solução de AOT: preparou-se uma solução translúcida de concentração final de 0,2M de AOT em isooctano.

Solução de albumina: solução da proteína albumina bovina (Aldrich). A solução da proteína albumina bovina (BSA, Aldrich) foi preparada utilizando como solvente tampão fosfato 10mM pH=7,2, de forma que sua concentração fosse de $50 \cdot 10^{-6}$ M.

Solução de CV em diversos solventes: adicionou-se cristais do corante no solvente (clorofórmio, isooctano, clorofórmio:dodecano 6:4, entre outros) em uso e efetuou-se várias diluições para obter uma solução sem vestígios de cristais em suspensão.

O vidro de octa-acetato de sacarose (SOAG): foi preparado esquentando sólidos de SOAG em banho de óleo com temperatura em torno de 120°C e dissolvendo solução metanólica de CV no SOAG liquefeito. Após resfriamento o vidro é formado.

7.2 EQUIPAMENTOS E MÉTODOS

7.2.1 EXPERIMENTO COM SOLUÇÕES ISOTRÓPICAS (SOLVENTES)

Utilizaram-se os equipamentos Espectrofotômetro Shimadzu UV-2101PC e Shimadzu UV-2401PC para medidas de absorção. Empregou-se o Fluorímetro Spex DM3000-F modo estacionário com excitação constante em 580nm e emissão variável de 590-800nm.

O preparo da solução estoque de CV nos diversos solventes, incluindo água, clorofórmio, clorobenzeno, acetona, etanol e tricloroetileno, foi efetuado da seguinte maneira: em 3 mL de solvente adicionou-se CV, agitou-se bastante e deixou-se estabilizar. A concentração da solução estoque foi determinada utilizando-se a Lei de Lambert-Beer, ou seja, determinou-se a concentração de uma amostra através da intensidade de luz que a mesma absorve num determinado comprimento de onda. Utilizou-se valores de absortividade molar previamente determinados. Os diversos valores de absortividade usados estão na Tabela I.

Tabela I: valores de absortividade de CV em diferentes solventes:

	Absortividade molar x $10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
Água	0,95
Etanol	1,1
Acetona	1,0
Clorofórmio	1,0
Clorobenzeno	1,0
Tricloroetileno	0,84

(Oliveira 2002)

Para garantir que a solução estoque estava estabilizada procedeu-se esta medida diversas vezes por um certo intervalo de tempo (30 minutos).

Para os experimentos em que a concentração de CV foi variada, obteve-se os espectros de absorção em função da concentração de CV, adicionando-se, gradualmente, alíquotas da solução estoque na cubeta.

O valor da absortividade de MB utilizado foi de $81600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Tuite 1993).

7.2.2 PARÂMETRO $\lambda_{\text{MÁX}}$

Este parâmetro representa o comprimento de onda correspondente ao máximo

de absorção. Para que todos os comprimentos de onda do $\lambda_{\text{máx}}$ e do λ_{ombro} (definido mais adiante) fossem encontrados da mesma maneira nos diversos experimentos, houve a necessidade de se estabelecer um protocolo padronizado, o qual correspondeu que a cada espectro obtido fosse efetuada uma diferencial, conforme visto na Figura 5.

É possível determinar o ponto de máximo de um espectro através da diferencial do mesmo. Quando o par de coordenadas do ponto apresentar valor zero no eixo das ordenadas, o valor correspondente no eixo das abscissas representará exatamente ao valor do comprimento de onda do máximo de absorção (vide Figura 5).

Figura 5: Espectro de absorção (linha contínua) e diferencial do espectro de absorção (linha tracejada) de CV em água.

7.2.3 PARÂMETRO λ_{OMBRO}

Através da diferencial do espectro de absorção foi possível notar a presença de dois pontos de inflexão na região do ombro (vide Figura 5), então por meio destes pontos utilizaram-se os valores do eixo das ordenadas e efetuou-se uma média. Com o valor obtido encontrou-se o correspondente valor do ponto médio no eixo das abscissas (ou seja, o comprimento de onda). Este valor representa o comprimento de onda do ombro (λ_{ombro}) e através dele é possível encontrar no espectro de absorção o valor da absorvância do ombro.

7.2.4 PARÂMETRO $\Delta\nu$

Este parâmetro representa a distância entre o comprimento de onda no máximo de absorção e o comprimento de onda do ombro formado no espectro de absorvância, em unidades de números de onda. Com os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e do λ_{ombro} obtidos segundo descrito acima, efetuou-se o seguinte cálculo para obtenção de $\Delta\nu$:

$$\Delta\nu = (1/\lambda_{\text{ombro}} - 1/\lambda_{\text{máx}}) \times 10^7 \text{ cm}^{-1}$$

7.2.5 EXPERIMENTOS COM MICELAS REVERSAS DE AOT

Os experimentos foram realizados com diferentes valores de W_0 , o qual determina a quantidade de água solubilizada nas micelas reversas, através da relação molar entre a água e o tensoativo utilizado $W_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{anfifílico}]$. Para determinar o valor de W_0 considerou-se em todos os experimentos que a concentração da água na solução de CV ($\sim 5\mu\text{M}$) era igual a 55,4M, ou seja, igual à da água pura. Esta

consideração é totalmente justificável dada a pequena concentração de CV.

Como o AOT é higroscópico houve a necessidade de se confirmar a quantidade de água neste surfactante. A determinação de água foi realizada pelo método de Karl Fischer. A água reage com este reagente num processo de duas etapas, no qual uma molécula de iodo desaparece por cada molécula de água presente (Vogel 1981), como pode ser observada nas equações 3 e 4 abaixo.

Titulando-se o surfactante com este reagente é possível determinar a quantidade de água. O experimento revelou que há $1,1 \cdot 10^{-4}$ g de água por grama de AOT. Calculando-se W_0 , este mostrou ser igual a 0,003 e portanto pôde-se considerar como zero o valor de W_0 sem adição de água ao meio.

Na preparação de micelas reversas inicialmente uma solução do anfífilico em solvente orgânico foi preparada segundo as condições descritas no item anterior. O espectro de absorção e de emissão desta solução foi obtido utilizando-se como branco o respectivo solvente orgânico. Os equipamentos Espectrofotômetro Shimadzu UV-2101PC e Shimadzu UV-2401PC e o Fluorímetro Spex DM3000-F modo estacionário com excitação constante em 580nm e emissão variável de 590-800nm foram empregados.

Adicionou-se à cubeta uma alíquota de solução estoque de CV em água (ou no solvente apropriado para cada tipo de experimento), de forma a obter

concentração em torno de 5 μM (a concentração da solução estoque foi previamente determinada espectrofotometricamente).

Para os experimentos em que W_0 foi alterado, adicionou-se alíquotas de solução de CV = 5 μM em água, desta forma o valor de W_0 era alterado sem variar a concentração de CV. Espectros de absorção e emissão foram obtidos em função de W_0 nas micelas reversas estudadas.

Para os experimentos em que a concentração do tensoativo foi variável, acrescentou-se gradualmente alíquotas da solução concentrada do anfifílico e com corante em uma cubeta com a solução corante. Todas as soluções foram devidamente centrifugadas.

7.2.6 DETERMINAÇÃO DA LOCALIZAÇÃO DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Os experimentos foram realizados com o equipamento de Ressonância Magnética Nuclear Bruker DRX 500 a 500MHz.

Preparou-se amostras nas quais duas apresentaram $W_0=0,2$ e as duas $W_0=20$. Em duas delas ($W_0=0,2$ e $W_0=20$) acrescentou-se CV. Utilizou-se D_2O em todas as soluções para variar W_0 . Para as análises dos espectros foram identificados os picos correspondentes ao isooctano (solvente que solubiliza o AOT) e descartados. Com base na literatura, identificou-se os picos correspondentes aos prótons do tensoativo AOT (Lissi 1993, Silverstein 1994).

Devido à variação dos deslocamentos químicos quando acrescenta-se CV, tornou-se necessário caracterizar alguns parâmetros para facilitar a análise dos dados. “ $\Delta\nu_{\text{rmn}}$ ” representa a variação da frequência (multiplicou-se o deslocamento químico da amostra com CV subtraída da amostra sem CV em MHz por 500MHz, esta é a frequência do equipamento) e $\Delta\nu/\Delta\nu_0$ dividiu-se todas variações de frequência pela primeira variação do carbono mais afastado do grupo polar do

tensoativo AOT para obter variações relativas ao carbono mais afastado da interface.

7.2.7 CÁLCULOS QUÂNTICOS QUÍMICOS

As geometrias moleculares foram calculadas por meio do método semi-empírico PM3 (Del Nero 2003). A estrutura de CV livre foi otimizada na simetria D_3 . Posteriormente, calculou-se o local de equilíbrio do contra-íon, Cl^- e AOT^- , inicialmente posicionado a 4Å acima do carbono central em CV. As estruturas foram otimizadas utilizando o método semi-empírico PM3 e posteriormente submetidas ao cálculo de orbital molecular ZINDO-CI. As estruturas químicas tridimensionais foram obtidas pelo software ArgusLab 4.0.1. Todos os cálculos foram realizados pelo Dr. Erick L. Bastos no Laboratório de Computação Científica Avançada da Universidade de São Paulo (Frisch 2004).

7.2.8 FOTÓLISE DE RELÂMPAGO A LASER

Utilizou-se o sistema de Fotólise de Relâmpago a Laser da Applied Photophysics. Um pulso de luz laser (comprimento de onda 532nm, 30mJ/pulso, 10-20ns) incide sobre a amostra proporcionando excitação eletrônica. Com a finalidade de se verificar a formação e o tempo de vida dos estados excitados ou outros intermediários reativos, a variação de absorbância antes e após excitação eletrônica da amostra é acompanhada por um feixe óptico (lâmpada de Xenônio) em função do tempo. Este monitora o desaparecimento da espécie no estado fundamental ou o aparecimento da espécie excitada ou radical. O feixe do laser é posicionado a 90° do feixe de monitoramento (Figura 6). Shutters são usadas em ambos os feixes de excitação e de monitoramento para proteger a amostra de fotólise. O detector nesta técnica consiste de uma combinação de monocromador com fotomultiplicadora, esta

última está situada na saída do monocromador (Applied Photophysics). A resposta da fotomultiplicadora (Applied Photophysics) é lida num osciloscópio digital (Tektronix 2230), cujos dados são subsequentemente transferidos para o micro computador. Todo o sistema é controlado pelo micro computador, o qual emite sinais para a abertura simultânea do laser e para as janelas entre a lâmpada de Xenônio e a amostra. Os sinais obtidos são transferidos para o micro onde são, por fim, analisados (Hadel, Bonneau 1995). A resolução temporal do instrumento é em torno de 50ns.

Preparou-se duas soluções sendo uma de AOT em isooctano ([AOT]=0,2M) com $W_0=0,14$, $W_0=20$ e outra de albumina bovina, ([BSA]=50 μ M, pH=7,2, NaPO₄=10mM), ambas as soluções continham CV e sua absorção foi ajustada para aproximadamente DO=1. Retirou-se 4mL da solução de AOT 0,2M e degaseificou-se com o uso de nitrogênio gasoso após este passar por um frasco de lavagem contendo AOT 0,2M sem CV. Outras maneiras de degaseificação (ciclos de congelamento e vácuo) foram experimentadas mas não obtivemos sucesso devido às dificuldades experimentais (contaminação com graxa).

Sobre as três soluções (AOT 0,2M degaseificado, AOT 0,2M equilibrado com ar e albumina bovina equilibrada com o ar) incidiu-se o pulso do laser e mediu-se a variação de transiente de absorção de luz em função do tempo. Repetiu-se o experimento quatro vezes e obteve-se a média destes quatro transientes. Cada média foi fitada por duas exponenciais segundo a equação abaixo (Equação 5). O fit utilizando apenas uma exponencial apresentou desvios grosseiros em relação ao dado experimental e não pode ser utilizado.

$$A_1 e^{(-x/\tau_1)} + A_2 e^{(-x/\tau_2)} \quad (5)$$

Equação 5: Somatória da primeira exponencial com a segunda exponencial, onde A_1 e A_2 são os fatores pré-exponenciais e τ_1 e τ_2 os tempos de vida.

Os espectros resolvidos no tempo foram obtidos anotando-se o valor mediano da absorção em tempos específicos: 70ns, 120ns e 200ns. Assim cada curva representa os valores de absorção em função do comprimento de onda para cada um desses tempos nas três soluções. Variou-se o comprimento de onda de 300 a 650nm e obteve-se transientes a cada 15nm.

Figura 6: Esquema simplificado do aparelho de fotólise de relâmpago a laser.

7.2.9 FOTÓLISES CLÁSSICAS

Os experimentos de fotólise foram realizados com o uso de laser Nd:YAG λ excitação 532nm, cuja luz incide numa cubeta contendo uma barra magnética para garantir a homogeneização. Um banho termostático garante a temperatura do meio em torno de 20°C. O feixe de luz é posicionado de encontro com a amostra. Agitação magnética garantiu a homogeneização da amostra.

Preparou-se duas soluções de AOT em isooctano ([AOT]=0,2M), uma com $W_0=0,14$ e outra com $W_0=25,2$. Adicionou-se às soluções uma alíquota de solução estoque de CV de maneira a obter absorção em torno de $DO \cong 1$.

Incidiu-se a luz de excitação sobre as soluções individualmente, tendo-se o cuidado de marcar o tempo de excitação com um cronômetro, ao fim de cada excitação media-se o espectro de absorvância. A amostra foi mantida na temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ por um banho termostatzado.

7.2.10 IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE FOTÓLISE

Primeiro realizou-se fotólise de CV em diferentes meios sob irradiação de laser com energia variada sob temperatura controlada. Secou-se o solvente da solução fotolisada a gás argônio. Posteriormente tratou-se a amostra fotolisada com acetato de etila. Introduziu-se a amostra na coluna de sílica gel de 0,5cm de diâmetro adicionou-se sílica gel 60 (230-400 mesh) grau 9385. CV ficou retido na coluna pois apresenta carga positiva. Os produtos de fotólise foram analisados por cromatografia de camada fina (TLC). Foram então aplicados em placas de TLC (placa cromatográfica de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck) e posteriormente analisados por espectroscopia UV-VIS.

Os padrões utilizados foram 4,4',4''- metildinitro (N,N-dimetilanilina) (leuco-CV) e 4,4' - bis (dimetilamino) benzofenona (cetona de Michler-MK). O solvente de

corrida empregado foi hexano:acetato de etila (2:1) e a cuba foi pré equilibrada com este solvente por cerca de 30 minutos. Introduziu-se a placa na cuba e fechou-a. Após o término, anotou-se as cores das manchas na placa, esta foi revelada em câmara de iodo e determinou-se as razões entre as distâncias percorridas pela amostra e pelo solvente na placa (Rf). O produtos de fotólises, que não foram utilizados na TLC, foram redissolvidos em hexano e determinou-se os espectros de absorção das soluções.

7.2.11 EQUIPAMENTO DE EMISSÃO NO INFRA-VERMELHO

Os experimentos de emissão no infra-vermelho próximo (em torno de 1270nm) foram realizados num sistema desenvolvido pela Edinburg Analytical Instruments (Reino Unido). Este sistema é composto por um laser Nd-YAG CONTINUUM SURELITE III (Q-switched variável). O qual fornece 10 pulsos por segundo. Há um compartimento de cubeta com agitação de solução com temperatura controlável. Tem-se um monocromador com grade de difração para região do infra-vermelho próximo (M300, Edinburg Analytical Instruments), uma fotomultiplicadora NIR R5509 da Hamamatsu Photoniks Company (Japão), sensível à região do infra-vermelho próximo (800-1400nm) dispostos conforme a Figura 7. Um micro-computador é conectado ao sistema e a análise dos transientes é efetuada por duas placas de aquisições F900 e MSA-250 (Edinburgh Analytical Instruments, Reino Unido).

A fotomultiplicadora foi resfriada a -80°C por um sistema utilizando nitrogênio líquido, durante 1h e esperou-se a sua estabilização por 2h antes de iniciar o experimento.

Experimentos de fotossensibilizadores em micelas reversas e em células foram realizados. Para micelas reversas, soluções do corante preparadas como descritas anteriormente foram utilizadas. A descrição do experimento em células

está abaixo.

Figura 7: Sistema de emissão no infra-vermelho.

7.2.12 PROCEDIMENTOS PARA A CULTURA CELULAR

7.2.12.1 *Manutenção da cultura celular HeLa*

O meio de cultura utilizado foi DMEM (Cultilab) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Biowhittaker). Ainda utilizou-se PBS (Biowhittaker) para lavagem e tripsina (Biowhittaker) para desprendimento das células das garrafas de cultura, por tratar-se de células aderentes. A cultura de células HeLa (adenocarcinoma epitelial do cérvix) foi dividida a cada dois ou três dias em duas novas culturas. As células foram mantidas em incubadora com temperatura (37°C) e fluxo de gás carbônico controlável (5%) Shel Lab. Os experimentos foram realizados em ambiente estéril (capela de fluxo laminar Nuair Class II type A/B3 com lâmpada de UV), com material estéril (Autoclave Stermax) e as células visualizadas em microscópio invertido Nikon Eclipse TS100.

7.2.12.2 *Congelamento das matrizes*

Para o congelamento, as células foram lavadas com PBS, ressuspensas em meio de cultura e colocadas em tubos criogênicos acrescidas de 10% de dimetil sulfoxido (DMSO). Os tubos criogênicos foram colocados em freezer a -80°C em câmara de congelamento a 1°C/minuto por no mínimo cinco horas. Após este período, os tubos foram armazenados em nitrogênio líquido.

7.2.12.3 *Plaqueamento das células para os diversos experimentos*

As células foram ressuspensas, contadas (acrescentando azul de tripan) e distribuídas na placa com o número de células desejado para cada experimento. As placas foram posteriormente mantidas em incubadora por aproximadamente 18

horas. Após o período, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS. As células foram incubadas com CV ou MB em meio DMEM ausente de vermelho de fenol por tempos determinados descritos no texto, decorrido o período o sobrenadante das mesmas foi retirado e as células plaqueadas foram lavadas com PBS a 10°C cuidadosamente para que não houvesse desprendimento das células. Posteriormente seguiu-se o procedimento do experimento em questão.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, os dados descritos no texto representam a média $\pm$ SD.

7.2.12.4 Ensaios de incorporação de fotossensibilizadores em células

Após o plaqueamento como descrito anteriormente, o meio foi removido cuidadosamente e centrifugado. Algumas células que desprenderam e que ficaram no meio eram separadas do mesmo por centrifugação, tinha-se então a fração sobrenadante e as células plaqueadas constituía a fração celular.

Posteriormente para ambas as frações adicionou-se dodecil sulfato de sódio (SDS), sendo que para as células plaqueadas empregou-se SDS a 50mM no mesmo volume de incubação e para o sobrenadante SDS a 100mM, o volume é o dobro da incubação porém a concentração de SDS final é a mesma (50mM) isto garante que ambas as amostras tenham SDS na mesma concentração. Como as soluções sobrenadante e precipitado (células) tem SDS na mesma concentração, elas são comparáveis. Mediu-se espectros de absorção e os valores obtidos para o sobrenadante foram multiplicados por dois (pois o volume do mesmo foi dobrado com a adição de SDS). Determinou-se então a taxa de incorporação como a relação entre a absorção de MB ou CV obtida nas células e no total (absorção nas células e no sobrenadante) (Kessel e Luo 1997).

A razão da alta concentração de SDS é para desfazer os dímeros de MB. A presença de dímeros pode mascarar o valor real da concentração de MB no meio. O SDS, usado para provocar lise das células, foi empregado em alta concentração

(50mM), a qual provoca a desagregação do MB, já que SDS, nesta concentração, altera a relação dímero/monômero do MB (Severino 2003). Assim, após a extração com SDS tem-se monômeros de MB, os quais podem ser quantificados por espectrofotometria. O corante CV não forma dímeros nas nossas condições experimentais mas a concentração do mesmo foi quantificada na presença de SDS para facilitar a comparação com os experimentos realizados com MB.

7.2.12.5 Determinação da relação D/M de MB em células HeLa utilizando espectrômetro de superfície

O espectrômetro de superfície (Ocean Optics) consta de uma lâmpada de xenônio, uma fibra óptica, e um detector. A lâmpada de Xenônio (PX-2 Ocean Optics) emite luz do UV-visível e incide na amostra através da fibra óptica R400-7-UV/Vis (Ocean Optics). A amostra absorve uma fração da luz e reflete uma outra fração que não é absorvida. A luz refletida é coletada pela fibra. Assim, a luz que é absorvida pela amostra é determinada indiretamente. A distância da fibra até a amostra é mantida fixa. Um esquema do sistema encontra-se na Figura 8.

Após incubamento com MB conforme descrito anteriormente, espectros de reflectância de luz na superfície das amostras foram medidos. Estes espectros são convertidos em espectros de absorção pelo próprio software. Mediu-se, então, a absorção de MB em células no tampão. Posteriormente, retirou-se o tampão, lavou-se as células cuidadosamente e mediu-se novamente os espectros, tem-se, então, a relação D/M no ambiente celular. A relação D/M foi determinada pela razão entre as absorbâncias a 610nm e 665nm, que correspondem aos picos de absorção dos dímeros e dos monômeros de MB, respectivamente

7.2.12.6 Determinação da viabilidade celular

Para alguns ensaios iniciais de viabilidade celular na presença de corantes e para manutenção diária da cultura celular utilizou-se o teste com azul de tripan. As células mortas apresentam membrana rompida o que possibilita a internalização do corante azul de tripan. Pela coloração das células de azul, estima-se a porcentagem de células mortas.

O teste consiste na remoção de uma alíquota da suspensão celular, seguido da adição de 10% em volume de solução de azul de tripan a 0,4% (Biowhittaker). Faz-se a contagem do número de células utilizando um hematocitometro e um microscópio convencional. A contagem é feita em quatro quadrantes dos campos

Figura 8: Sistema simplificado do espectrômetro de superfície.

existentes. Através do número médio de células contadas, obtém-se uma amostragem estatística de toda a cultura celular. Os resultados obtidos para a manutenção da cultura mostraram viabilidade em torno de 95%.

Investigou-se a viabilidade celular através do ensaio do MTT. Esse ensaio monitora a atividade enzimática da succinato desidrogenase mitocondrial da célula. Após incubação com fotossensibilizador, seguida de lavagem, adicionou-se MTT 1,5mg/mL e incubou-se por 3 horas. Após este período, retirou-se MTT e adicionou-se DMSO para solubilizar os cristais de formazan formados na célula. Posteriormente, mediu-se o espectro de absorção (Uehlinger 2000).

Determinou-se a curva de crescimento das células após um período expostas ao fotossensibilizador. Plaqueou-se 10^5 células/mL em 66 frascos de cultura celular. Após 18 horas, removeu-se o meio, lavou-se com PBS e incubou-se com MB em meio DMEM sem vermelho de fenol por 3 horas. As células que serviram de branco, sofreram o mesmo tratamento porém com meio ausente de MB. Decorrido o período, retirou-se o meio de incubação, lavou-se com PBS e adicionou-se meio de cultura e colocou-se em estufa a 37°C e na presença de 5% de CO₂. A cada 8 horas, realizou-se contagem em duplicata, utilizando azul de tripan e microscópio convencional. Os frascos utilizados na contagem eram descartados.

7.2.12.7 Sobrevivência celular após incubação com droga e irradiação a laser

Após 3 horas de incubação com a droga, o meio de incubação foi removido, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) a 10°C e seguidas de irradiação. O experimento foi realizado sem iluminação ambiente. O tempo de iluminação foi de 50 segundos de irradiação intercalados com 50 segundos no escuro. Realizou-se 7 ciclos de irradiação de 50 segundos (laser Inova 665nm para MB e laser Morgotron 532nm para CV) e de ausência de luz. A dose de luz utilizada para 532nm foi igual a de 665nm, aproximadamente $1,7\text{J}/\text{cm}^2$ e apresenta taxa de sobrevivência celular acima de 98% após irradiação ausente de droga. Após estes ciclos, acrescentou-se

meio de cultura DMEM e guardou-se as células em incubadora a 37°C e com atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, as células foram removidas via tripsina e realizou-se contagem com azul de tripan utilizando microscópio convencional. As células somente foram contadas e 24 horas após irradiação, pois processos apoptóticos (se houverem) são relativamente lentos, podendo ocasionar erros (células aparentemente vivas mas que já iniciaram processo de morte) se a contagem fosse realizada imediatamente após a irradiação.

7.2.12.8 Ensaio de apoptose utilizando citometria de fluxo

Citometria de fluxo (Fluorescence Activated Cell Sorting ou FACS) permite a contagem e análise de atributos físicos e moleculares de células em meio líquido. O princípio da citometria de fluxo consiste em analisar o conteúdo de DNA em diferentes fases do ciclo celular. A análise é baseada na interação do DNA com uma molécula fluorescente iodeto de propídeo (IP). Esta molécula intercala entre as bases em ácidos nucleicos de dupla fita. A técnica consiste de um laser de comprimento de onda apropriado que incide sobre a amostra com IP. Esta por sua vez, ao ser excitada, perde a energia adquirida por fluorescência, além de outros processos. Uma vez que o IP está ligado ao DNA, a fluorescência de IP por molécula de DNA indica o conteúdo do DNA. Isso permite identificar as células nas várias fases do ciclo celular, S, G1, G2 e M. Durante a apoptose, o DNA é clivado, formando fragmentos de tamanhos definidos. O IP liga-se a esses fragmentos de DNA, e revela o conteúdo de células com DNA fragmentado. Isto forma um pico característico no histograma chamado de sub G1, que revela a presença de apoptose. Os resultados foram obtidos no CellQuest Software, Becton Dickinson, CA.

Foram plaqueadas aproximadamente 120.000 células HeLa em placas de 35 mm de diâmetro. Estas foram mantidas em estufa a 37 °C e com atmosfera de 5% de CO₂ por aproximadamente 12 horas. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas com diferentes concentrações de MB em meio cultura DMEM

sem vermelho de fenol em estufa por 3 horas. Posteriormente, retirou-se o meio de incubação, lavou-se com PBS, adicionou-se PBS. As células foram então irradiadas por 350 segundos (50 segundos de irradiação seguidos de 50 segundos de intervalo, seguiu-se este procedimento até completar 350 segundos de irradiação) com laser (Line Inova 60mW 664nm). Após a irradiação, retirou-se o PBS e acrescentou-se meio DMEM com soro e indicador de pH. As amostras permaneceram em estufa por 14 ou 36 horas. Após cada um destes períodos, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para tubos de 15 mL. As células foram lavadas cuidadosamente com PBS e acrescidas de 300 µL de tripsina por 5 minutos. Adicionou-se, então, 1mL de meio DMEM com indicador de pH. As células foram ressuspensas e transferidas para os mesmos tubos de 15 mL. Estes foram centrifugados a 1.500 RPM por 5 minutos. Depois rapidamente retirou-se o sobrenadante e o precipitado foi ressuspensado com 1 mL de PBS a 10°C. Os tubos foram novamente centrifugados a 1.500 RPM por 5 minutos, retirou-se o PBS e adicionou-se 2 mL de etanol 70% a – 20 °C. Por fim, homogenizou-se as amostras e estas foram estocadas em freezer a – 20 °C.

Para realizar as medidas no FACS as amostras foram centrifugadas a 1.500 RPM por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante (álcool). Adicionou-se 1µL de RNase A (Fermentas), fornecendo concentração final igual a 1 µg/mL em temperatura ambiente por 1 hora. Decorrido o tempo, a reação foi interrompida no gelo e adicionou-se 185 µL de IP de concentração final igual a 50 µg/mL. As amostras foram transferidas para microtubos e a fluorescência do IP foi medida por citometria de fluxo (Spector, Goldman, 1998).

7.2.12.9 Determinação de oxigênio singlete em células incubadas com fotossensibilizadores

Para este ensaio várias configurações experimentais foram testadas no sentido de melhorar o resultado obtido. Inicialmente, mediu-se a emissão no infra-vermelho

próximo nas próprias placas com as células. Posteriormente, tentou-se outros tipos de plásticos nos quais as células poderiam aderir e que o sinal do oxigênio singlete obtido fosse adequado. Tentou-se também lâminas de vidro. As mesmas foram preparadas com poli-lisina para garantir que as células aderissem, o que realmente ocorreu, porém o sinal obtido não foi satisfatório. Para todos esses casos, o próprio plástico ou a lâmina já produziam oxigênio singlete, o que impossibilitava a aquisição de um sinal adequado. Finalmente, resolveu-se medir as células ressuspensas. Essa não é a melhor condição fisiológica para células aderentes mas garantiu um sinal com melhor valor da razão sinal/ruído. Para o plaqueamento e a incubação seguiu-se o mesmo procedimento já descrito anteriormente. Após o período de incubação, retirou-se o meio de incubação das células, lavou-se as mesmas com PBS a 10°C vagarosamente e descolou-se as células utilizando um removedor mecânico de células próprio para essa finalidade. Essa etapa foi realizada com muito cuidado para evitar que as células sejam danificadas com o atrito, mesmo assim, sabemos que algumas delas podem ter sofrido algum dano na membrana. As células foram ressuspensas com água deuterada e rapidamente mediu-se a emissão em 1270nm.

7.2.12.10 Rendimento Quântico de geração de oxigênio singlete

O cálculo do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) em uma amostra desconhecida é baseado na comparação com o valor do mesmo para uma solução de referência, já determinado na literatura (Tanielian 1995). A comparação é corrigida pela intensidade de luz transmitida no comprimento de onda de excitação e pelo índice de refração dos solventes utilizados (Baptista 1998). O cálculo realizado é:

$$\phi_{A \rightarrow A} = \frac{1 - T_B \times I_A \times n_A^2 \times \phi_{A \rightarrow B}}{1 - T_A \times I_B \times n_B^2}$$

sendo:

T : transmitância

n^2 : índice de refração

I: intensidade de emissão de oxigênio singlete

Índice A: amostra desconhecida

Índice B: amostra de referência

O procedimento experimental é o mesmo descrito anteriormente para medidas de intensidade de emissão de oxigênio singlete em células. Obteve-se também a intensidade de emissão de oxigênio singlete em solução etanólica de MB. O experimento foi realizado em triplicata.

7.2.12.11 Obtenção de imagens por microscopia de fluorescência

Utilizou-se o microscópio Nikon Eclipse TE2000-U acoplado com câmera Roper Scientific Photometrics Cascade 512B e fonte de excitação lâmpada de Mercúrio 100W Chiw Technical Corporation.

Para garantir a fixação das células na placa durante o experimento, utilizou-se DPBS após a incubação. Este contém cálcio, elemento fundamental para proteínas de adesão na membrana celular (Wu 2006, Jumblatt 1980, Jones 1966, Jones 1966).

As imagens foram tratadas com o uso do software MetaMorph da Molecular Devices. Utilizou-se o processo de deconvolução 2D para retirar manchas nas vizinhanças da imagem. Uma vez estabelecidos os parâmetros do processo de tratamento, os mesmos foram mantidos para todas as figuras.

Os marcadores utilizados foram a rodamina 123 (R123) que cora

mitocôndrias; lysotracker que marca lisossomos, H33342 que identifica núcleos e bodipy TR-C que cora complexo de golgi (Kessel 1997 e 1998). Vários trabalhos na literatura já empregaram R123, este composto já está bem estabelecido ser um marcador para mitocôndria (Schneckenburger 2004, Klein 1993, Johnson 1980). Assim, utilizamos R123 para mapear a localização das mitocôndrias em células HeLa.

O que atrai R123 para mitocôndrias é o potencial eletroquímico da membrana interna da mitocôndria (Maftah 1994). Assim, condições adversas que provoquem despolarização do potencial mitocondrial fazem com que a R123 não localize especificamente na mitocôndria, vazando por toda a célula. Uma vez que altas concentrações de R123 provocam despolarização do potencial eletroquímico da membrana interna da mitocôndria e consequentemente vazamento do corante por toda a célula, diversos experimentos foram realizados afim de se obter a menor concentração de R123 que proporcionasse imagens com perfeito mapeamento das mitocôndrias (dados não apresentados). Portanto, procurou-se trabalhar com a menor concentração de Rodamina possível que garanta a obtenção de boas imagens das mitocôndrias.

Experimentos iniciais foram necessários para determinar a menor concentração necessária para marcar a célula com cada corante e tempo de incubação necessário (dados não apresentados). Isto garante uma menor perturbação no ambiente fisiológico ideal para as células. Além disso, a saturação da sonda numa organela impede que outras moléculas sejam incorporadas na mesma organela, impossibilitando análises de colocalização celular.

A Figura 9 apresenta os espectros de absorção e de emissão dos fotossensibilizadores e marcadores utilizados. Como pode ser observado, a excitação na região de máxima absorção dos marcadores não coincide com a dos fotossensibilizadores. E a emissão dos marcadores também não coincide com a região de emissão dos fotossensibilizadores. Isto indica de que não há reações de transferência de energia quando essas moléculas são excitadas.

Filtros de excitação e de emissão foram utilizados de acordo com o comprimento de onda (λ) em que há máxima absorção e o comprimento de onda em que há máxima emissão de cada corante empregado, veja Tabela II.

Figura 9: Espectros de absorção e de fluorescência dos marcadores Rodamina 123 (painel A), Lysotracker (painel B) e dos fotossensibilizadores CV (painel C) e MB (painel D).

Tabela II: Corantes e filtros com o par de λ excitação e emissão utilizados para os experimentos de microscopia de fluorescência e cor das imagens obtidas:

Corante	Filtros: λ_{exc} – λ_{emis}	Cor da imagem
CV, MB	590-685	Vermelho
R123	490-528	Verde
H33342	403-457, 360-457	Azul
Lysotracker	403-457	Azul
Bodipy	555-617	Laranja

A palavra imagem será utilizada neste trabalho para indicar a figura obtida pela fluorescência do corante numa específica região intracelular.

7.2.12.12 Medida de colocalização de imagens

Para determinar a colocalização de imagens obtidas com diferentes corantes na mesma célula, utilizou-se o programa MetaMorph da Molecular Devices. Determinou-se a integral da área obtida pela fluorescência do corante em questão numa dada região x, y. O mesmo foi feito para a imagem obtida pelo outro corante desejado. Determinou-se, então, a porcentagem de colocalização das áreas integradas.

7.2.3 SOFTWARES

Os seguintes softwares foram utilizados no tratamento de dados:

- Grams 5.0 (Galatic) utilizado para tratamento de espectros diversos
- Origin 6.0 (Microcal) utilizado para tratamento de dados e composição de gráficos
- Software do laser (F900) utilizado para aquisição e tratamento de dados obtidos pelo equipamento de emissão no infra-vermelho
- OOIBase 32 (OceanOptics) utilizado para aquisição de dados pelo espectrômetro de superfície
- CellQuest Software (Becton Dickinson) utilizado para aquisição e tratamento de dados obtidos pelo citômetro em fluxo.

8. RESULTADOS E DISCUSSÕES

8.1 EFEITO DO SOLVENTE SOBRE AS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CV

Os espectros de absorvância do CV em água, clorofórmio e uma mistura de clorofórmio com dodecano na proporção de 1:1, estão apresentados na Figura 10. Observa-se que quando o solvente é clorofórmio não há presença do ombro, em solução aquosa nota-se a presença de um discreto ombro, já em 50% de dodecano o ombro é acentuado. Observa-se também que há variações no valor do comprimento de onda no máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) nestes três solventes. No inserto da Figura 10 está apresentada a variação do $\lambda_{\text{máx}}$ em função da porcentagem de dodecano no meio. Observa-se que com o aumento de porcentagem de dodecano ocorre aumento gradativo no valor de $\lambda_{\text{máx}}$.

Para facilitar a caracterização das variações espectrais de CV, procedeu-se a determinação de parâmetros espectroscópicos através do espectro diferencial (Figura 5). Nota-se que o valor zero no espectro diferencial equivale ao valor de $\lambda_{\text{máx}}$ e a distância média entre os dois pontos de inflexão corresponde ao valor do λ_{ombro} (Figura 5). Com os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e λ_{ombro} assim obtidos é possível calcular a energia de separação do ombro em relação a banda principal no vermelho (Δv) (vide Parte Experimental).

Figura 10: Espectros de absorção de CV em água (■), clorofórmio (•) e clorofórmio:dodecano (1:1) (▲). Insete: Variação do comprimento de onda no máximo de absorção de CV em função da porcentagem de dodecano na solução clorofórmio:dodecano

Existem vários modelos que explicam a presença de duas bandas de absorção no espectro de CV. A possibilidade de ser apenas um ombro vibro-eletrônico foi descartada (Lewis 1942). O modelo proposto por Lueck e Korpi-Tomola (Korpi-Tommola 1984) considera que a interação da molécula de CV com solvente (por exemplo por pontes de hidrogênio ou doação de elétron) ou com contra-íon diminui

a simetria da molécula e causa uma separação na energia dos níveis eletrônicos S_1 e S_2 . Isto explicaria a presença do ombro existente no espectro de CV. Dados recentes demonstram a presença de dois isômeros em solução um sendo o isômero simétrico (com simetria semelhante a D_3 , absorção deslocada para o azul) e outro o isômero assimétrico (com simetria semelhante a C_3 , absorção deslocada para o vermelho) devido a interação com solvente ou com contra-íon (Maruyama 1996, Ishikawa 1999, Oliveira 2002, Oliveira 2006). Embora a razão estrutural da presença do ombro no espectro de CV seja ainda objeto de conjectura, é bem estabelecido que a intensidade do ombro, bem como, $\Delta\nu$ estão relacionados com a quebra da simetria de uma população de moléculas de CV decorrente de interações solvente/soluto ou devido a formação de pares iônicos (Lewis 1942, Korpi-Tommola 1984, Lueck 1992, Maruyama 1996, Ishikawa 1999, Oliveira 2002, Oliveira 2006).

Como descrito acima, a simetria de CV pode ser diminuída através da interação com o solvente (doação de elétrons e pontes de hidrogênio) e/ou formação de par iônico. Sabe-se que solventes apolares, que têm constantes dielétricas baixas, favorecem a formação de par iônico e aqueles que apresentam constantes dielétricas altas não favorecem (Israelachvili 1992). Os solventes polares, água, por exemplo, provocam uma solvatação eficiente capaz de envolver os íons não possibilitando a formação do par iônico. O ombro no espectro de absorção da água (vide Figura 10), se deve principalmente a formação de pontes de hidrogênio (Lewis 1942, Korpi-Tommola 1984, Lueck 1992, Maruyama 1996, Ishikawa 1999, Oliveira 2002).

Dois tipos de pares iônicos são possíveis: par iônico de contato e par iônico separado por solvente. No primeiro os íons de carga oposta são atraídos mutuamente e entram em contato. Já no último, há pelo menos uma molécula do solvente (tipicamente água) entre os íons do par iônico (Masunov 2003, Kang 2002).

Para caracterizar a presença de par iônico, nota-se que se a concentração de CV no meio for aumentada pelo equilíbrio termodinâmico abaixo, a reação no sentido de formação de par iônico será favorecida.

Desta maneira, parâmetros espectroscópicos de CV podem indicar a presença de pares iônicos, veja Figura 11. Conforme pode-se observar na Figura 11 painel A, etanol, água, acetona e diclorobenzeno não apresentam variação de $\lambda_{\text{máx}}$ em função da concentração de CV. Apenas três dos solventes testados, que são, clorofórmio, tricloroetileno e clorobenzeno, apresentaram variação de $\lambda_{\text{máx}}$, o que possivelmente está relacionado com o deslocamento do equilíbrio (Equação 6) e com a formação do par iônico.

Conforme pode-se observar na Figura 11 painel B, os mesmos três solventes citados acima, apresentaram mudanças significativas de $\Delta\nu$. O aumento da concentração de CV no meio provocou maior distanciamento entre o ombro e o máximo, ou seja, um aumento da assimetria das moléculas. Esta alteração se deve preponderantemente a alterações no $\lambda_{\text{máx}}$. De fato, o λ_{ombro} do espectro de absorção de CV nestes solventes não sofre alterações com o aumento da concentração de CV, veja inserto na Figura 11 painel A.

Nota-se na Tabela III que os três solventes que apresentam variação de $\Delta\nu$ e $\lambda_{\text{máx}}$ em função da concentração de CV possuem constantes dielétricas (ϵ) pequenas. Assim, a diminuição da eficiência com que esses solventes solvatam o CV e seu contra-íon favorece a formação de pares iônicos. Isto demonstra a relação entre a variação do $\Delta\nu$ e $\lambda_{\text{máx}}$ com a formação do par iônico (Oliveira *et. al.* 2002).

Figura 11: $\Delta\lambda_{\text{max}}$ (Painel A) e $\Delta\nu$ (Painel B) do espectro de absorção de CV em função da concentração de CV em água (■), clorofórmio (•), tricloroetileno (O), clorobenzeno (▲), diclorobenzeno (▼), acetona (◆) e etanol (◇). O inserto no painel A mostra a variação no comprimento de onda do ombro ($\lambda_{\text{shoulder}}$) do espectro de absorção de CV em clorofórmio (•), tricloroetileno (O), clorobenzeno (▲).

Nos solventes de baixa constante dielétrica, a energia livre para manter íons afastados é grande (Israelachvili 1992). Sendo assim, é provável que os pares iônicos formados nestes meios sejam de contato (Oliveira *et. al.* 2002).

Tabela III: Efeito de Concentração de CV nas propriedades espectrais de CV em vários solventes

	Variação de $\Delta\nu$, cm ⁻¹	Variação de $\lambda_{\text{máx}}$, nm	$\epsilon^{(a)}$
Água	0	0	80,1
Acetona	0	0	21,0
Etanol	0	0	25,3
Clorobenzeno	330	11,8	5,7
Clorofórmio	280	9,6	4,8
Tricloroetilen	310	11	3,3
o			

a - valores da constante dielétrica do meio foram obtidos da ref. David 1996.

Além do efeito sobre formação de pares iônicos, o meio pode ainda alterar as propriedades fotofísicas de CV. O canal de desativação do estado excitado singlete de CV está relacionado com pequenos movimentos no eixo rotacional dos anéis benzênicos. Tais movimentos têm pequena energia e ocorrem livremente a temperatura ambiente. Como resultado, o tempo de vida do estado excitado singlete de CV em solução (etanol, por exemplo) é de apenas alguns pico-segundos (Ben-Amotz 1985) e o rendimento quântico de emissão (ϕ_f) (número de fótons emitidos/número de fótons absorvidos), é usualmente pequeno para CV em soluções de viscosidade baixa (vide Tabela IV).

Tabela IV: Efeito da viscosidade no rendimento quântico de fluorescência de CV ^(a)

	ϕ_f	Viscosidade, CP
Acetonitrila	3×10^{-5}	0,38
Água	$5,6 \times 10^{-5}$	1,00
Glicerol	$9,2 \times 10^{-3}$	14,0
Vidro de octa-acetato de glicose (SOAG)	0,14	-
Albumina bovina	$7,5 \times 10^{-3}$	-

(a) Os dados desta tabela foram obtidos das refs. Baptista 1997 e 1998.

Aumentando-se a viscosidade do meio os movimentos de rotação dos anéis ficam restringidos, resultando em aumento do tempo de vida de CV no estado excitado e consequentemente de ϕ_f (Tabela IV). Nota-se na Tabela IV o aumento significativo de ϕ_f entre acetonitrila e meio rígido de vidro (SOAG). Dados da literatura mostram que o tempo de vida do estado excitado singlete de CV é aproximadamente 130ps quando ligado em proteína e 1-5ps para corante livre em solventes de baixa viscosidade (Bhasikuttan 2002). Nota-se também que quando o corante liga-se a sítios hidrofóbicos rígidos (por exemplo em albumina bovina) ocorre também aumento considerável de ϕ_f (~100 vezes).

8.2 ESTUDO DAS PROPRIEDADES ESPECTROSCÓPICAS DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT

8.2.1 LOCALIZAÇÃO DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de RMN tem se tornado uma ferramenta fundamental para a caracterização de micelas normais e reversas (Chachaty 1987, Tiddy 1980, Nagy 1989). A estrutura e o estado da água em micelas reversas têm sido investigada por RMN de ^1H e ^{13}C (Wong 1977, El Seoud 1994). A estabilização de íons (Nagy 1989) e corantes (Shah 1982) e suas interações com a estrutura micelar também foram estudadas por esta técnica.

A nuvem eletrônica existente em compostos com polianéis aromáticos exerce um efeito de blindagem nos prótons circunvizinhos, de forma que estes apresentam variações nos deslocamentos químicos observados (Silverstein 1994). O CV apresenta três núcleos aromáticos e conseqüentemente, pôde-se utilizar deste efeito para observar a posição em que este corante se situa na interface micelar. Outro efeito importante que pode provocar variação é o efeito da carga. CV possui uma carga positiva podendo, portanto, influenciar nos deslocamentos de grupos vizinhos a ele (Silverstein 1994 e Lissi 1993). Além disso, o deslocamento da água interfacial pode também afetar o deslocamento químico dos prótons e carbonos de AOT.

A Tabela V apresenta as variações nos deslocamentos químicos observados nos espectros de RMN de ^1H de AOT na presença e na ausência de CV. Observe na Tabela V, que ocorrem variações relativas nos deslocamentos químicos principalmente nos prótons C, D e F, a variação alcança até 500% (próton D) em relação ao primeiro pico. Na Figura 12 os prótons mais afetados pela presença do CV estão circundados. Devido à desproteção exercida pela proximidade da carga positiva do corante, tais prótons aparecem em campo baixo. É interessante ressaltar

que os prótons D e F, que são os que apresentam variações mais proeminentes, estão mais próximos da porção hidrofílica do AOT, indicando a presença do CV próximo da carga negativa do AOT.

Os prótons mais afastados da carga do tensoativo mostram variações menos significativas, também de acordo com a localização do CV sendo próxima da porção hidrofílica interfacial.

As mudanças nos deslocamentos químicos dos prótons na presença de CV, não foram de menor magnitude em micelas com W_0 maior. Note que ocorre variações de 50% no máximo para o carbono 'd'. Mesmo assim, isto é indicativo de que o corante deve estar próximo da interface o suficiente para interagir levemente com a mesma.

Figura 12: Estrutura molecular de AOT, as letras com circunferência indicam os prótons e os carbonos que apresentaram maiores deslocamentos químicos.

Tabela V: Variação absoluta (Δv_{rmn}) e relativa ($\Delta v/v_0$) do deslocamento químico de RMN ^1H de micelas reversas de AOT a $W_0=0,1$ e $W_0=20,0$ na ausência e na presença de CV.
 $W_0=0.1$ $W_0=20.0$

Amostras 1 e 2			Amostras 3 e 4			
* (a)	Δv_{rmn} (Hz) (b)	$\Delta v/v_0$ (c)	* (a)	Δv_{rmn} (Hz) (b)	$\Delta v/v_0$ (c)	
A (1,1)	3,92	1,00	a (1,0)	-58,08	1,00	
	3,95			-51,45		
	3,95					
			b (1,2)	-52,74	0,91	
B (1,3)	3,93	1,00				
	3,94	1,00	c (3,3)	-58,77	1,01	
	3,95	1,01		-75,93	1,31	
				-73,39	1,26	
C (3,5)	5,25	1,33		-69,39	1,20	
	5,26	1,34		-64,07	1,10	
				-69,62	1,19	
D (4,2)	12,40	3,16				
	12,14	3,10	d (4,1)	-85,82	1,48	
	20,72	5,29		-88,98	1,53	
	20,75	5,29		-85,92	1,48	
E (4,4)	2,15	0,55	e (4,3)	-60,31	1,04	
	2,36	0,60		-60,37	1,04	
	2,68	0,68		-60,35	1,04	
				-63,52	1,09	
F (4,6)	6,09	1,55		-64,84	1,12	
	6,45	1,65		-70,47	1,21	
	6,11	1,55				
	6,14	1,57	f (4,4)	-59,13	1,02	
				-59,01	1,02	
				-59,00	1,02	
				-59,03	1,02	

*[AOT] = 0.4 mol L⁻¹ and [CV] = 4.0 mmol L⁻¹.

(a) As letras correspondem aos prótons que apresentaram variações nos deslocamentos químicos após a adição de CV, os valores entre parênteses representam os deslocamentos químicos reais obtidos em ppm. Veja Figura 12 para designação dos prótons.

(b) Δv_{rmn} : Variação relativa do deslocamento químico dos prótons da molécula de AOT a $W_0 = 0,14$ e $W_0 = 20$, na presença e na ausência de CV, em Hertz.

(c) $\Delta v/v_0$: Porcentagem da variação, v_0 é o deslocamento químico do grupo metileno terminal (A).

O RMN de ^{13}C também pode revelar a posição de CV. A Tabela VI apresenta as variações dos deslocamentos químicos absolutos e relativos para o caso de ^{13}C e na Figura 12 os carbonos mais afetados pela presença do CV estão circundados.

Nota-se que os carbonos que mais sofrem deslocamentos químicos com a adição do corante são os próximos da região polar tanto a W_0 pequenos quanto elevados, indicando novamente que provavelmente CV encontra-se localizado nesta região.

A carga positiva do CV provoca deslocamento para campo baixo em todos os carbonos com exceção dos três últimos da tabela (j, l, m), que apresentam variação para campo alto. Essas diferenças de sinais de $\Delta\nu$ podem estar relacionadas com o efeito da blindagem do CV sobre determinados átomos de AOT ou ainda mudanças na solvatação de AOT (Novaki 2000 e El Seoud 2001).

Comparando a magnitude das variações de ^1H e ^{13}C observadas em determinados prótons e carbonos pode-se concluir que o corante está próximo da região hidrofílica da molécula de AOT em ambos os W_0 . Vale notar que para W_0 elevado, o efeito observado é menor, demonstrando que CV encontra-se próximo da interface, porém com um grau menor de interação comparado com W_0 pequeno.

Tabela VI: Variação absoluta (Δv_{rnm}) e relativa ($\Delta v/v_0$) do deslocamento químico de RMN ^{13}C de micelas reversas de AOT a $W_0=0,1$ e $W_0=20,0$ na ausência e na presença de CV.

Amostras 1 e 2				Amostras 3 e 4		
* (a)	Δv_{rnm} (Hz) (b)	$\Delta v/v_0$ (c)		* (a)	Δv_{rnm} (Hz) (b)	$\Delta v/v_0$ (c)
a (11,2)	3,75	1,00		a (10,6)	144,70	1,00
	3,05					
				b (13,9)	146,30	1,01
b (14,3)	1,55	0,41			147,55	1,02
	2,70	0,72				
				c (23,0)	144,05	0,99
c (23,4)	1,10	0,29				
				d (23,5)	146,65	1,01
d (23,8)	0,55	0,15			146,50	1,01
	0,50	0,13			142,50	0,99
	0,50	0,13				
				e (28,9)	147,80	1,02
e (29,4)	1,85	0,49				
	0,50	0,13		f (33,3)	156,00	1,08
f (33,5)	11,80	3,15		g (38,6)	145,60	1,01
					144,40	0,99
g (38,2)	2,40	0,64				
	2,80	0,75		h (61,7)	152,05	1,05
	0,55	0,15				
				i (67,2)	147,15	1,02
h (61,7)	9,75	2,60			147,75	
i (67,2)	2,20	0,59		j (68,3)	139,70	0,97
					139,75	
j (68,6)	-8,80	-2,35				
				l (168,8)	131,50	0,97
l (169,9)	-17,50	-4,67				
				m (171,4)	148,00	0,91
m (171,7)	-5,50	-1,47				

*[AOT] = 0.4 mol L⁻¹ and [CV] = 4.0 mmol L⁻¹.

(a) As letras correspondem aos carbonos que apresentaram variações nos deslocamentos químicos após a adição de CV, os valores entre parênteses representam os deslocamentos químicos reais obtidos em ppm. Veja Figura 12 para designação dos carbonos.

(b) Δv_{rnm} : Variação relativa do deslocamento químico dos carbonos da molécula de AOT a $W_0 = 0,14$ e $W_0 = 20$, na presença e na ausência de CV, em Hertz.

(c) $\Delta v/v_0$: Porcentagem da variação, v_0 é o deslocamento químico do grupo metileno terminal (A).

8.2.2 PARES IÔNICOS DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT

Com o aumento de W_0 o tamanho bem como outras propriedades físico-químicas das micelas reversas, por exemplo, micropolaridade e microviscosidade do poço aquoso são drasticamente alteradas (Fendler 1982).

Na Figura 13 estão apresentados os espectros de absorção de CV em clorofórmio (painel A) e em micelas reversas de AOT (painel B). Note que com o aumento da concentração de CV, há mudanças espectrais, ou seja, há um aumento do $\lambda_{\text{máx}}$ e há um aumento de absorção em 540nm (Figura 13 painel A). Estas características são típicas da presença de pares iônicos. Conforme dito anteriormente o clorofórmio favorece a formação de pares iônicos. Note também que com o aumento da concentração de AOT ocorrem as mesmas mudanças espectroscópicas nos espectros de CV (Figura 13, painel B).

Estas características espectrais indicam a presença de pares iônicos (Figura 13 painel B). No entanto, note que na concentração de CV de 1,2 μM (painel B) não há praticamente par iônico de CV com íon cloreto (compare com o painel A). Isto sugere que o par iônico formado deve ser com o AOT (Oliveira, *et. al.* 2006). Para comprovar esta hipótese a solubilidade de CV em isooctano foi medida com o aumento da concentração de AOT (Figura 14). Note que a solubilidade de CV aumenta como o aumento da concentração de AOT. Isto demonstra que há uma interação entre AOT e CV de maneira que há formação de um complexo neutro. Dessa forma, este complexo torna-se solúvel em isooctano. Sugerindo também que, pares iônicos de contato devem ser responsáveis por esta solubilização.

Estão apresentados na Figura 15 painel A os espectros de absorção de CV em micelas reversas de AOT a W_0 crescentes e no painel B os valores de $\lambda_{\text{máx}}$ em função de W_0 para micelas reversas de AOT obtidos a partir dos espectros mostrados no painel A, mantendo-se constante a concentração de anfílico e de CV. Observa-se que com o aumento de W_0 , o $\lambda_{\text{máx}}$ de CV em micelas reversas de AOT diminui, ou seja direciona-se para a região azul do espectro.

Figura 13. (A) Espectros de Absorção de CV com o aumento da concentração do corante em clorofórmio, de (a) para (b) $[CV]$ em $\mu\text{mol L}^{-1}$ = 0,3; 0,9; 1,5; 2,1; 3,4; 4,0; 4,9; 6,1; 7,4; 8,6; 13,1; 16,7; 20,4; 37,3; 49,3; 72,8; 108,7; 178,1; 636,3; 900,1. (B) Espectros de Absorção de CV com o aumento da concentração de AOT em clorofórmio, $[AOT]$ de (a) para (b): 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 1 mmol L^{-1} , 7 mmol L^{-1} , 10 mmol L^{-1} , 50 mmol L^{-1} , 70 mmol L^{-1} , 100 mmol L^{-1} e $[CV] = 1.2 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Figura 14: Solubilidade de CV em isooctano em função da concentração de AOT.

Figura 15. (A) Espectros de Absorção de CV em micelas reversas de AOT em W_0 crescentes de a para b: $W_0=0,7; 1,1; 1,5; 1,6; 2,0; 2,4; 2,5; 3,4; 4,3; 5,2; 6,0; 7,0; 8,2; 10,0; 12,0; 13,4; 14,2; 15,0; 16,7; 21,4; 25,3; 40,0$. (B) $\lambda_{\text{máx}}$ de CV em micelas reversas de AOT em função do W_0 . $[\text{AOT}] = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{CV}] = 5,9 \text{ mmol L}^{-1}$. Para comparação o $\lambda_{\text{máx}}$ em água é também mostrado. Uma quebra no eixo Y entre 591 e 598 nm foi inserida para clareza.

Estas mudanças espectroscópicas já foram caracterizadas em meios isotrópicos (Oliveira *et. al.* 2002) e estão relacionadas com a formação de pares iônicos de contato. O valor de $\lambda_{\text{máx}}$ observado, em torno de 608nm (vide Figura 15 painel A) é maior que o obtido em tricloroetileno, onde pares iônicos são formados (Oliveira *et. al.* 2002). Como a concentração de AOT é muito maior que a do íon cloreto (uma diferença de 30000 vezes maior para AOT), pode-se inferir que o contra-íon do par iônico é o grupo sulfocinato do AOT e que o par iônico é do tipo de contato.

Com o aumento de W_0 ocorre diminuição de $\lambda_{\text{máx}}$ indicando que os pares

iônicos de contato formados foram modificados. Porém nota-se que o valor do $\lambda_{\text{máx}}$ para W_0 altos é maior do que o obtido para CV livre em água, vide Figura 15 painel B. Comparando o valor do $\lambda_{\text{máx}}$ encontrado em micelas reversas de W_0 elevados e o obtido em água *bulk*, indica que CV não está livre no poço aquoso interno. Como há moléculas de água suficiente para envolver o par iônico, e devido ao alto valor de $\lambda_{\text{máx}}$ comparado com o obtido na água *bulk*, conclui-se que o par iônico é do tipo separado por solvente (Oliveira 2006). Vale notar que no caso de micelas reversas de AOT o corante é muito pouco solúvel na fase orgânica ficando restrito ao poço aquoso.

Ao se aumentar o W_0 cria-se um ambiente favorável para a interação de moléculas de água com CV e conseqüentemente na modificação do par iônico, deixando de ser par iônico de contato para ser separado por moléculas de solvente (Figura 15). Estes resultados corroboram com os dados de RMN que também mostraram que ao aumentar o W_0 há uma modificação na interação de CV com a micela, que passa a ser de menor magnitude comparado com W_0 baixos. Isto comprova a alteração no tipo de comportamento do par iônico, ou seja, deixa de ser de contato para o separado por solvente.

A simetria de CV diminui quando há a formação do par iônico. A solvatação de CV por moléculas de álcool envolve a mudança de um isômero simétrico de alta energia (estrutura tipo hélice, simetria D_3) para um isômero piramidal de baixa energia (simetria C_3) (Maruyama 1996). Investigou-se então a interação de CV com contra-íon AOT^- e Cl^- através do cálculo de orbital molecular ZINDO-CI (vide Materiais e Métodos), utilizando estruturas otimizadas de CV, AOT, CV-AOT, CVCl, como pares iônicos de contato e separado por solvente. A Figura 16 apresenta as estruturas otimizadas destas moléculas. Observe que na ausência de contra-íon, CV assume simetria D_3 e tem $\lambda_{\text{máx}}$ igual a 434,7nm. O par iônico CVCl apresenta simetria C_3 e um $\lambda_{\text{máx}}$ igual a 592,4nm, já o par CV-AOT tem simetria C_1 e $\lambda_{\text{máx}}$ igual a 599,3nm. Portanto, este par de baixa simetria é deslocado para a região espectral vermelha (aproximadamente 7nm). Isto está em concordância com o alto

valor de $\lambda_{\text{máx}}$ observado em soluções de CV-AOT em clorofórmio e em micelas reversas (Figuras 13 e 15). Além disso, note que o par iônico formado entre CV e AOT separado por solvente apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ menor que o $\lambda_{\text{máx}}$ obtido para o par iônico de contato, vide Figura 16. De fato, um valor de $\lambda_{\text{máx}}$ menor é observado quando aumenta-se o W_0 em micelas reversas de AOT, vide Figura 15.

Figura 16: Estruturas otimizadas de CV, CVCl, CV-H₂O-AOT, CV-AOT. Os $\lambda_{\text{máx}}$ são também apresentados. A força do oscilador é mostrada entre parênteses.

Destes resultados, pode-se inferir que a presença de ambos Cl⁻ e AOT como contra-íons de CV causa uma diminuição na sua simetria, o qual resulta em

deslocamentos no $\lambda_{\text{máx}}$. O efeito reverso disto ocorre quando uma molécula de água está presente entre o par iônico, isto é, um deslocamento com $\lambda_{\text{máx}}$ menor em comparação ao $\lambda_{\text{máx}}$ observado para o par iônico de contato. Estes resultados corroboram com a interpretação de que em micelas reversas de AOT em valores baixos e altos de W_0 pares iônicos de contato e separados por solvente são respectivamente, as espécies predominantes na solução.

Como as propriedades fotofísicas de CV (por exemplo, intensidade de emissão) dependem do meio em que este se encontra, é importante investigar a viscosidade do microambiente do CV em micelas reversas de AOT em função de W_0 .

De uma maneira simples, estimou-se a viscosidade do microambiente sentido por CV em micelas reversas de AOT. Montou-se curvas padrões da fluorescência de CV em função da viscosidade em misturas de solventes, cujas viscosidades são conhecidas. A intensidade de fluorescência de CV integrada de 593 a 790nm dividida pela absorção no comprimento de onda de excitação (580nm) em função da viscosidade de água:glicerol está apresentada na Figura 17 painel A e em água:etileno glicol no painel B. Note que há um aumento considerável de fluorescência com o aumento da viscosidade da solução. Os pontos experimentais das duas figuras foram ajustados a uma função exponencial simples:

$$y = A_1 \cdot e^{x/x_0} \quad (7)$$

na qual, y é a fluorescência integrada (593 a 790nm) corrigida pela absorção no comprimento de onda de excitação (580nm), A_1 é o fator pré-exponencial e x é a viscosidade. Para obter o valor da viscosidade (valor da abscissa), a equação torna-se:

$$x = x_0 \cdot \ln (y/A_1) \quad (8)$$

Figura 17: Intensidade de fluorescência integrada de 593 a 790nm dividida pela absorção no comprimento de onda de excitação (580nm) em função da viscosidade da mistura água:glicerol (painel A) e água:etileno glicol (painel B). $[CV]=5,3 \cdot 10^{-6}M$.

Desta forma, foi possível determinar a viscosidade do microambiente de CV na micela reversa de AOT a diversos valores de W_0 . A Tabela VII apresenta os valores obtidos.

Tabela VII: Valores de viscosidade do microambiente de CV na micela reversa de AOT a diferentes valores de W_0 :

Micelas Reversas de AOT 0,2M	$\int_{600}^{800} I_F(\lambda) d(\lambda) / \text{Abs}(\lambda_{\text{exc}})$	Aumento de fluorescência	de Viscosidade, cp
$W_0 = 0,1$	258352138	3,54	775
$W_0 = 5$	72913513	1,57	635
$W_0 = 9$	46286303	1	15

Note que a viscosidade do microambiente de CV decresce consideravelmente conforme aumenta-se o valor de W_0 em micelas reversas de AOT. Nas micelas reversas de AOT em W_0 baixos, o microambiente micelar restringe a movimentação dos anéis aromáticos de CV, proporcionando um aumento no tempo de vida do estado excitado singlete de CV e conseqüentemente do seu rendimento quântico de fluorescência, como verificado anteriormente. Este efeito é semelhante à restrição observada em meios altamente viscosos com $\text{cp} \sim 775$. (Baptista 1997, Baptista 1998)

Para micelas de AOT a W_0 elevado, a baixa viscosidade do meio possibilita a rotação dos anéis de CV, assim a perda de energia ocorre da forma não radioativa. Isso indica que CV apresenta comportamento fotofísico e fotoquímico diferenciado de acordo com o W_0 .

Outras sondas têm sido utilizadas para estudar microviscosidade em micelas reversas. A auramina O é uma sonda com estrutura molecular semelhante à do CV. Um estudo comparou a eficiência da fluorescência de CV e de auramina O alterando a viscosidade dos solventes por pressão. As duas moléculas apresentam o mesmo perfil, ou seja, a intensidade de fluorescência depende da viscosidade do meio (Brey 1977). Outro estudo relacionou a sonda auramina O com o ambiente das micelas reversas de AOT. Observou-se que processos de relaxação não radiativo da auramina O excitada é aproximadamente uma ordem de grandeza mais lenta em micelas reversas de AOT do que em água. Essa diminuição foi atribuída à

viscosidade local das micelas reversas de AOT, além de outros fatores (Hirose 2004).

Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos por RMN para CV nas micelas reversas de AOT, vide seção anterior. A W_0 baixos, CV está localizado num microambiente rígido que os dados de RMN mostraram tratar-se da interface de AOT. Com o aumento de W_0 , o microambiente é menos viscoso, mas ainda apresenta viscosidade superior à da água e do isooctano (solventes utilizados para as micelas reversas de AOT), e há interação em menor grau de CV com a interface de AOT, como confirmado por RMN.

8.2.3 ESTUDOS DAS PROPRIEDADES FOTOQUÍMICAS DE CV

Fotólises clássicas de CV em micelas reversas e em soluções aquosas foram realizadas. Verificou-se o consumo de reagente e a formação de produtos em função do tempo na presença de luz. As mudanças de concentrações de reagentes e produtos podem ser observadas pelo decréscimo da absorção em determinadas regiões do espectro e aumento em outras, (Figura 18 painel A). Como pode ser observado na Figura 18 A há alterações no espectro de absorvância de CV. Nota-se uma diminuição da absorção no $\lambda_{\text{máx}}$ de CV, indicando o consumo do mesmo. Também pode-se observar o aparecimento de absorção por volta de 270nm, o que demonstra a formação de produtos provenientes da reação fotoquímica (a identificação dos produtos será discutida adiante).

A Figura 18 painel B ilustra o percentual da variação de absorvância no máximo de absorção de CV em micelas reversas de AOT com $W_0=0,14$ e $W_0=20$ em função do tempo de irradiação das amostras. Nota-se que para as micelas reversas de $W_0=0,14$ há maior variação percentual em relação a micela de $W_0=20$. Em micelas reversas de AOT com valores pequenos de W_0 , o corante encontra-se num microambiente micelar de maior restrição, como verificado anteriormente, logo a perda de energia adquirida pela molécula de CV devido aos movimentos dos anéis

aromáticos é diminuída. Com tempo de vida maior (Jones 1991, Ishikawa 1999, Abedin 1995, Sundström 1984), a energia de excitação da molécula de CV pode ser utilizada para desencadear processos fotoquímicos. O mesmo não ocorre com elevados valores de W_0 devido a maior liberdade que os anéis aromáticos apresentam, ocasionando a perda da energia principalmente sob a forma de calor. Esses dados indicam que CV em micelas reversas de AOT reage quimicamente sob excitação luminosa.

Figura 18: Painei A: Espectros de absorvância de CV em micelas reversas de AOT em intervalos de tempo de irradiação, totalizando 5000 segundos de irradiação. Painei B: absorvância do máximo dividida pela absorção do máximo inicial de CV em função do tempo de excitação da amostra em micelas reversas de AOT com $W_0=0,14$ (■) e $W_0=20$ (●). $[AOT]=0,2M$; $[CV]=12,8\mu M$

Para saber o mecanismo da reação fotoquímica de CV em micela reversa é necessário estudar os intermediários da reação. Como a fotofísica de CV é influenciada pelo ambiente no qual este se encontra foi preciso investigar o efeito de W_0 sobre a formação de intermediários excitados de CV por fotólise de relâmpago a laser.

A Figura 19 apresenta o ΔAbs de CV em função do tempo em micela reversa de AOT em $W_0=0,1$ e em $W_0=20$. Nota-se na Figura 19 e Tabela VIII que para a micela com valor pequeno de W_0 , o valor da ΔAbs foi 5 vezes maior do que o observado para micela com W_0 elevado. Este aumento é semelhante ao aumento observado na fluorescência devido ao aumento da microviscosidade (vide Tabela VII). Portanto, com o aumento da microviscosidade ocorre também o aumento da eficiência de formação espécies intermediárias, que neste caso podem ser tripletes ou radicais (Bhasikuttan 1995, Bhasikuttan 1997).

Tabela VIII: Variação de ΔAbs de CV no pico em micelas reversas de AOT com diferentes valores de W_0 .

Micela reversa de AOT	ΔAbs
$W_0=0,1$	0,03332
$W_0=20$	0,00678

Figura 19: Δ Abs de CV em função do tempo em micela reversa de AOT a $W_0=0,1$ (■) e $W_0=20$ (●). $[AOT]=0,2M$, $[CV]=1.10^{-5}M$; $\lambda_{exc}=532nm$; $\lambda_{monitoramento}=415nm$; Energia=30mJ/pulso

Para caracterizar os intermediários da reação fotoquímica de CV em micelas reversas de AOT, experimentos de fotólise de relâmpago a laser foram realizados. Por motivos de comparação, realizaram-se também experimentos de CV em proteína albumina bovina. Na Figura 20 pode-se observar os espectros do transiente de CV em proteína albumina bovina (painel A) e em micelas reversas de AOT a W_0 baixo (painel B). Note que o espectro do transiente possui um região de máxima absorção sem possuir um pico distinto em proteína albumina (painel A), diferentemente do obtido em micelas reversas de AOT (painel B). Esta diferença fica ainda mais

evidente ao colocar os dois espectros juntos, vide Figura 20 painel C. O espectro com um máximo alargado do transiente de CV na presença de albumina já foi caracterizado anteriormente (Baptista 1998, Jones 1991, Jones 1986, Bhasikuttan 1994, Jockusch 1996, Jockusch 1992), que corresponde ao tripleto de Etil Violeta e Cristal Violeta, já o ânion radical apresenta um espectro com máximo de absorção em 410nm (Baptista 1998, Jones 1991, Jones 1986, Bhasikuttan 1994, Jockusch 1996, Jockusch 1992). Por motivos de comparação com os dados em micelas reversas, somente os transientes iniciais de CV em albumina estão apresentados. Neste período a absorção de CV ligado em albumina praticamente não muda.

O espectro observado em micelas reversas possui um máximo de absorção a 410nm (Figura 20 painéis B e C). Não é possível distinguir tripletes de radicais, de fato, ambos devem estar presentes neste espectro. No entanto, o fato do espectro de CV apresentar banda com máximo ‘agudo’ em 410nm mostra que há a presença de CV[•]. A formação de par iônico de CV com o seu contra-íon (AOT) pode favorecer processos de transferência de elétrons direcionando a fotoquímica para radicais.

Determinou-se o espectro de absorção do transiente em diversos meios que sabidamente favoreçam a presença de tripletes com a finalidade de caracterizar a(s) espécie(s) transiente(s) obtidas em micelas reversas de AOT. A Figura 21 apresenta os espectros do transiente de CV em diversos meios, glicerol (painel A), micelas reversas de AOT (painel B), octa-acetato de sacarose (painéis B). Observe que o espectro do transiente de CV em glicerol apresenta uma banda alargada com máximo entre os comprimentos de onda 415 a 425nm, vide Figura 21 painel A. Essa banda larga é característica da presença de espécies tripletos de corantes triarilmetanos. Meios de alta viscosidade diminuem a velocidade de desativação não radiativa do singleto e propiciam a formação de tripletos, assim como o sítio de ligação hidrofóbico da albumina bovina, já anteriormente descrita (Magde 1974, Baptista 1998).

Figura 20: Valores de Δ Absorção de CV em função do comprimento de onda obtidos a diversos intervalos de tempos após o pulso de laser (70ns, 120ns e 200ns) em: (A) albumina bovina, (B) micelas reversas de AOT $W_0=0,14$ e (C) albumina bovina e micelas reversas de AOT a 70ns. Em 70ns os valores acima de 600nm foram desprezados pois há a interferência da fluorescência de CV. $[BSA]=50.10^{-6}M$, $[AOT]=0,2M$, $\lambda_{exc}=532nm$ e Energia=30mJ/pulso

Figura 21: Paineis A, B e C: Valores de Δ Absorção de CV em função do comprimento de onda obtidos a diversos intervalos de tempo após o pulso do laser ($0,2\mu\text{s}$; $1,2\mu\text{s}$; $3,5\mu\text{s}$; $6\mu\text{s}$) em glicerol. Paineis B e C: Valores de Δ Absorção de CV em função do comprimento de onda para AOT $W_0=0,14$ (■) a 70ns, vidro de octa-acetato de sacarose (●) a 400ns e glicerol (▲) a $0,2\mu\text{s}$; Paineis C: os mesmos espectros do painel B, apenas destacando a região de interesse. $[\text{AOT}]=0,2\text{M}$

Outro meio da alta viscosidade que pode ser utilizado para induzir a formação de tripletes e visualizar as suas características espectrais é o vidro de octa-acetato de sacarose (SOAG). A Figura 21 painel B mostra os espectros do transiente de CV em SOAG, em glicerol e em micelas reversas de AOT $W_0=0,14$. Note que apesar de apresentarem um máximo de absorção na mesma região, os espectros em SOAG e em glicerol apresentam uma banda bem larga, com máximo entre 380 a 440nm. Contudo para AOT, o aspecto da curva é mais agudo e há um máximo de absorção em torno de 410nm, veja o destaque na Figura 21 painel C. Como já mencionado, a banda larga é indicativa da presença de espécies tripletos de TAM e o espectro de absorção com máximo mais bem definido em torno de 410nm é indicativo do radical semi-reduzido de triarilmetanos. Não é possível identificar somente uma das espécies no espectro obtido em micelas reversas de AOT, dessa forma, ambas as espécies triplete e radical devem estar presentes. A presença de um pico em 410nm confirma a presença de $CV^\bullet$. O micro ambiente relativamente viscoso em que CV se situa em micelas reversas de AOT a baixos valores de W_0 favorece a formação de pares iônicos de contato. A proximidade entre CV e seu contra-íon, neste caso grupo sulfocinato induz processos de transferência de elétrons após excitação eletrônica, explicando a formação de $CV^\bullet$.

Esses dados estão de acordo com os dados da literatura. Por exemplo, Jockush et. al. observaram que benzofenona no estado triplete transfere elétron para CV formando $CV^\bullet$ e o radical cátion da benzofenona (Jockush 1992). Além disso, este $CV^\bullet$ pode transferir o elétron eficientemente, por exemplo para fulereno C_{60} , o que causa retorno da molécula para o estado fundamental e formação de ânion radical C_{60} (Bhasikuttan 2001).

Para verificar o efeito do oxigênio molecular sobre o processo de desativação do transiente, mediu-se o tempo de decaimento dos transientes através de experimentos de Fotólise de Relâmpago a Laser realizados em soluções de CV em micelas reversas de AOT e por motivos de comparação também em proteína albumina bovina.

A Figura 22 painel A apresenta as variações da variação de absorção de CV em micelas reversas de AOT equilibrado com o ar ou purgado com nitrogênio e no inserte em proteína albumina bovina todos em função do tempo após excitação eletrônica de CV nessas amostras observadas no comprimento de onda de 415nm. Nota-se que os transientes de CV obtidos em AOT $W_0=0,14$ apresentam decaimentos com tempos de vida muito inferiores ao obtido em albumina (Figura 22 inserte), porém as magnitudes das variações de absorção máximas são muito próximos. Os três transientes podem ser adequadamente fitados com dupla exponencial, o fit com monoexponencial não ficou adequado. A Tabela IX apresenta os tempos de vida dos transientes de CV em albumina bovina e em micelas reversas de AOT.

Tabela IX: Tempos de vida (τ) em micro segundos do transiente de CV em soluções de albumina bovina (BSA) ou em micelas reversas de AOT equilibrados com o ar ou purgados com nitrogênio:

	τ_1	τ_2
BSA, ar	5,1	19,5
BSA, N ₂	10,0	48,0
AOT, ar	0,11	0,17
AOT, N ₂	0,11	1,9

Nota-se que os transientes de CV gerados após excitação luminosa apresentam diferenças de acordo com o meio em que são gerados (proteína ou micela reversa) de acordo com a concentração de oxigênio, (vide Tabela IX). Comparando-se a razão entre os valores de τ_2 da amostra purgada com a amostra equilibrada com o ar, observa-se que o tempo de vida do transiente de CV diminui de 2,5 vezes em BSA enquanto que para AOT diminui de 11,2 vezes. A pequena diferença observado em BSA é decorrente do ambiente restrito que se CV se

encontra, ou seja CV liga-se ao sítio hidrofóbico da proteína estando assim protegido do oxigênio. Já no caso da micela reversa o oxigênio difunde-se livremente em todas as fases, portanto o τ_2 na sua presença é bem menor.

Figura 22: Δ absorção de CV em micelas reversas de AOT purgado com nitrogênio ou equilibrado com o ar em função do tempo. No inserte tem-se Δ absorção de CV em albumina bovina equilibrada com ar em função do tempo. $\lambda_{exc}=532nm$; $\lambda_{monitoramento}=415nm$; energia=30mJ/pulso. Painel B: Variação na absorção no máximo de CV em função do tempo de irradiação em micelas reversas de AOT em amostra purgada com argônio (●) e equilibrada com ar (■). energia=67mJ. [CV]= $1.10^{-5}M$, [AOT]=0,2M $W_0=0,14$ e [albumina bovina]= $50.10^{-6}M$.

Comparando-se os valores de τ_1 de amostra purgada com a amostra equilibrada, nota-se que para BSA equilibrada com o ar o tempo de vida do intermediário excitado de CV é menor em relação à amostra de proteína purgada com nitrogênio em torno de duas vezes, praticamente igual à obtida para o τ_2 (2,5 vezes). Essa diferença indica a participação do oxigênio no canal de desativação do transiente de CV e que há uma mesma influência do oxigênio na desativação das espécies transientes. Na presença de albumina foi evidenciado anteriormente que os transientes de CV gerados envolvem tanto tripleto ^3CV quanto radicais $\text{CV}^\bullet$ (Baptista 1998). No entanto, o canal principal de sensitização é iniciado por espécies tripleto. A desativação do tripleto ^3CV envolve principalmente a transferência de elétrons por aminoácidos da proteína (Baptista 1998).

Para o caso de CV em micelas reversas em amostra equilibrada com o ar ou em solução purgada com nitrogênio, o τ_1 do transiente de CV é igual, vide Tabela IX. No entanto, τ_2 é em torno de 10 vezes maior na amostra purgada com nitrogênio. Tal fato evidencia que o oxigênio está relacionado com a desativação deste intermediário. Uma vez que o CV está formando par iônico de contato com o AOT, e há transferência de elétron após excitação eletrônica como observado nas seções anteriores, é possível que haja back-electron transfer do par redox recém gerado conduzindo o CV ao estado fundamental. De fato, o pequeno valor de τ_1 e a ausência do efeito de oxigênio comprovam a rápida reação envolvida. Já para o caso da espécie com tempo de vida τ_2 , ao sofrer colisão de núcleos, o transiente separa-se do seu contra-íon, o que torna ^3CV e $\text{CV}^\bullet$ susceptíveis à reação com oxigênio. Assim, a molécula de CV retorna ao estado fundamental, conforme visualizado pelo esquema 4.

Esquema 4: Esquema dos processos fotofísicos e fotoquímicos de CV em micelas reversas de AOT (as principais espécies excitadas estão em destaque).

De fato, oxigênio é um forte supressor de tripleto bem como do ânion radical do CV, ambos intermediários da reação fotoquímica (Leaver 1972). O efeito final é uma fotólise menos favorecida, conforme pode ser observado na Figura 22 painel B. Esta Figura mostra a variação de absorção no $\lambda_{\text{máx}}$ de CV em micelas reversas de AOT em função do tempo de irradiação para amostras equilibradas com o ar e purgadas com argônio. Note que na amostra purgada com nitrogênio, a fotólise é mais eficiente. Portanto, a reação de supressão pelo oxigênio sobre os intermediários excitados de CV compete com a fotodegradação deste corante. Este resultado está de acordo com a designação do processo bifotônico para fotodegradação. Com a diminuição de oxigênio aumenta o tempo de vida do intermediário reativo, aumentando a eficiência de absorção bifotônica e de fotodegradação (vide abaixo).

Para averiguar se há formação de oxigênio singlete gerado via excitação luminosa de CV, mediu-se a intensidade de emissão de luz em 1270nm, que é o comprimento de onda de emissão específico do oxigênio singlete. A Figura 23 apresenta o decaimento de emissão de oxigênio singlete em micelas reversas de AOT e para comparação o sinal em glicerol, ambos contendo a mesma concentração de CV. Note que há uma formação de oxigênio singlete nas micelas reversas de AOT após excitação de CV. Intensidade de emissão de oxigênio singlete em função do comprimento de onda foi também obtido em soluções de CV fotoexcitado em micelas reversas de AOT, vide Figura 23 painel B. Note que há formação de oxigênio singlete via excitação de CV. Este dado comprova a presença de oxigênio singlete nessa solução de CV em micelas reversas de AOT.

Para glicerol, não se verificou emissão de oxigênio singlete (Figura 23). Não há emissão em glicerol indicando que a emissão observada no transiente de micela reversa não é devido a fluorescência do corante, glicerol é um solvente viscoso que favorece a fluorescência. Em meios de alta viscosidade (como em glicerol) há formação de tripletos de CV, Figura 21. Este ambiente restringe a velocidade de desativação não radiativa do singleto, favorecendo a formação de tripletos (Baptista 1998). Porém em meios viscosos a concentração e a difusividade de oxigênio são

bastante baixas, permitindo o decaimento espontâneo de tripleto. O valor obtido para glicerol é $[O_2]=7.10^{-5}M$, note que para isooctano o valor é maior ($[O_2]=3,3.10^{-3}M$) (Murov 1993). Logo a menor eficiência de geração de oxigênio singleto em solução de CV em glicerol deve-se a baixa concentração de oxigênio neste meio e a sua pequena difusividade.

Figura 23: Paine A: Transientes de emissão de 1O_2 em soluções de CV em glicerol (▲) e em micela reversa de AOT $W_0=0$ (■) $\lambda=1270nm$; 8,3mJ. Paine B: Intensidade de emissão de 1O_2 em função do comprimento de onda em solução de CV em micela reversa de AOT $W_0= 0$. $[AOT]=0,2M$; $[CV]=7\mu M$; 80mJ.

A partir dos dados da Figura 23, determinou-se o rendimento quântico de

emissão de oxigênio singlete em soluções de CV em micelas reversas de AOT após a excitação eletrônica do mesmo. O valor obtido está apresentado na Tabela X. Por motivos de comparação apresentou-se também o valor do rendimento quântico de emissão de oxigênio singlete obtido após excitação luminosa de MB em etanol.

Tabela X: Rendimento quântico de emissão de oxigênio singlete em diferentes meios:

Meios	ϕ_{Δ}
CV em AOT 0,2M $W_0 \approx 0$	0,01
MB em etanol	0,50

Note que a formação de oxigênio singlete em soluções contendo CV em micelas reversas de AOT após excitação eletrônica do corante é baixa. Há geração de oxigênio singlete nessas soluções, conforme visualizado na Figura 23, porém apenas 1% do ϕ_{Δ} é observado por esse caminho reacional, Tabela X. De qualquer forma, estes dados indicam que há formação de ^3CV e este reage com o oxigênio molecular produzindo oxigênio singlete em micelas reversas de AOT contendo CV e principalmente em solução etanólica de MB. O alto rendimento quântico de emissão de oxigênio singlete em solução de MB em etanol já é conhecido da literatura (Tanielian 1995 e Tanielian 1995).

Com a finalidade de verificar o efeito de W_0 sobre a eficiência da formação de oxigênio singlete em micelas reversas de AOT contendo CV, realizaram-se experimentos de emissão no infra-vermelho próximo nessas micelas reversas em função do W_0 (Figura 24 painel A). Observe que ocorre diminuição da intensidade do sinal de emissão conforme aumenta o valor de W_0 . Em micelas reversas de AOT com valores pequenos de W_0 , o corante encontra-se num microambiente restrito, isto impede a movimentação vibracional, favorecendo a formação do tripleto, o qual reage com o oxigênio molecular e este gera oxigênio singlete. Para o caso de valores

grandes de W_0 , a microviscosidade do ambiente micelar é reduzida, assim a energia adquirida pelo CV através da excitação luminosa é perdida principalmente sob a forma não radiativa. Ocorre diminuição da eficiência de formação de triplete e conseqüentemente de oxigênio singleto.

Figura 24: Painel A: Intensidade de emissão de 1O_2 em função do W_0 das micelas reversas de AOT. Painel B: Tempo de vida de 1O_2 em função do W_0 de micelas reversas de AOT contendo CV. $[AOT]=0,2M$; $[CV]=6,8.10^{-6}M$; energia=10mJ.

A alteração no W_0 também exerce efeito sobre o tempo de vida de oxigênio

singleto. A Figura 24 painel B apresenta os tempos de vida de oxigênio singleto em função do W_0 de micelas reversas de AOT. Note que ocorre uma diminuição no tempo de vida de oxigênio singleto com o aumento de W_0 . Esta diminuição deve-se à supressão de oxigênio singleto por água (Rodgers 1984). Apesar disso, o aumento no conteúdo de água do poço interno não proporcionou o mesmo tempo de vida de oxigênio singleto em água *bulk*. O τ_Δ em água é $4\mu\text{s}$ (Rodgers 1982) e em micela reversa a $W_0 \cong 30$ τ_Δ é $26\mu\text{s}$. O tempo de vida de oxigênio singleto em um meio microheterogêneo depende da partição do oxigênio singleto, do tempo de vida de oxigênio singleto e da fração de volume de cada uma das pseudo-fases. A fração de volume de água no nosso sistema é pequena e a partição para o meio orgânico é alta. Por isso o tempo de vida assemelha-se ao do meio orgânico (Lee 1983).

Reações fotoquímicas monofotônicas são aquelas em que cada fóton absorvido excita uma molécula e esta então reage (Rohatgi-Mukherjee 1986). Já reações bifotônicas estão relacionadas com a absorção de dois fótons. Estes fótons podem ser absorvidos instantaneamente ou seqüencialmente pela molécula. Quando os dois fótons são absorvidos instantaneamente ocorre a excitação para o estado excitado singleto S_2 diretamente ($S_0 \rightarrow S_2$) (Rohatgi-Mukherjee 1986). No caso de absorção fotônica seqüencial, após a absorção de um fóton a molécula atinge um estado excitado inicial e por relaxação atinge um novo estágio o qual passa a absorver um segundo fóton (Bhasikuttan 1995). Alguns processos envolvidos no estado excitado da molécula decorrentes destes tipos de absorção luminosa são proporcionais à intensidade de luz. Assim, por exemplo, a velocidade de fotodegradação de um composto em estudo que realiza absorção bifotônica será proporcional ao quadrado da intensidade da excitação luminosa (Rohatgi-Mukherjee 1986).

Existem diversos mecanismos de absorção de fótons que descrevem a fotoionização de corantes (Kalyanasundaram 1987). Identificou-se que hidrocarbonetos aromáticos como pireno e perileno fotoionizam por processos bifotônicos (Kalyanasundaram 1987). Investigou-se a influência micelar sobre este

mecanismo. Moléculas estruturalmente semelhantes, podem apresentar mecanismos distintos (mono ou bifotônico) de acordo com a ligação em um agregado supramolecular (Kalyanasundaram 1987). Há relatos na literatura de que a fotodegradação de CV pode ser iniciada pela absorção sequencial de dois fótons (Bhasikuttan 1995). Tornou-se necessário, portanto, entender se a fotoquímica de CV em micelas reversas é um processo induzido pela absorção de um ou dois fótons. Para tanto, decidiu-se dentro do fotociclo de CV caracterizar se a produção de oxigênio singlete e o desaparecimento do transiente de CV são processos relacionados com a absorção de um ou dois fótons.

Mediu-se a intensidade de emissão a 1270nm utilizando diferentes energias de excitação do laser. A Figura 25 painel A apresenta a variação da intensidade de emissão de oxigênio singlete em função da energia de excitação para solução de CV em micelas reversas de AOT.

Note que a formação de oxigênio singlete cresce linearmente com a energia do laser, revelando que CV no estado fundamental absorve um fóton passando a singlete e desta espécie alguns sofrem cruzamento entre sistemas (ISC) e chegam a tripleto. Estes, por sua vez, são suprimidos pelo oxigênio molecular que torna-se oxigênio singlete. Isto significa que a geração de oxigênio singlete e conseqüentemente de ^3CV dependem, como era esperado, da absorção de apenas um fóton, ou seja, trata-se de um processo monofotônico até este estágio.

Para averiguar se há outros processos no fotociclo de CV que dependem da absorção de dois fótons, determinou-se a velocidade de fotodegradação de CV em micelas reversas de AOT após fotólise utilizando diversos valores de energia de excitação. A Figura 25 painel B ilustra a variação de absorção no comprimento de onda do máximo de absorbância em função do tempo de irradiação para diferentes valores de energia de excitação. Note que os maiores valores de energia proporcionaram as mais eficientes fotólises.

Figura 25: Paineis A: Intensidade de emissão de $^1\text{O}_2$ de CV em micelas reversas de AOT $W_0=0$ em função da energia do laser de excitação. Paineis B: Variação da absorção no máximo em função do tempo de irradiação de CV em micelas reversas de AOT $W_0=0$ para diferentes valores de energia do laser de excitação. Paineis C: Velocidade de fotodegradação de CV em micelas reversas de AOT $W_0=0$ em função da energia de excitação do laser. $[\text{CV}]=1,33 \cdot 10^{-5}\text{M}$, $[\text{AOT}]=0,2\text{M}$, $\lambda=607\text{nm}$.

Determinou-se a velocidade de fotodegradação de CV em micelas reversas de AOT numa reação fotoquímica, através do coeficiente angular para cada curva apresentada na Figura 25 painel B nos tempos iniciais de fotólise. A Figura 25 painel C apresenta a velocidade de fotodegradação de CV em função da energia do laser de excitação para solução de CV em AOT $W_0=0$. Observe o aspecto exponencial da curva. Isto é indicativo de que há mais um fóton envolvido no processo. Como até a formação de oxigênio singlete está relacionado com a absorção de fóton pelo CV, a espécie excitada de CV que deve estar absorvendo o segundo é o tripleto de CV. Esses dados indicam que a fotoclareamento de CV em AOT trata-se de um processo bifotônico. O estado fundamental absorve um fóton e o tripleto absorve outro. A absorção de um segundo fóton pelo estado excitado singlete 1CV é pouco provável, uma vez que este apresenta tempo de vida curto, usualmente vive em torno de picosegundos (Engh 1985). A absorção de um segundo fóton pelo $^3CV^{**}$ pode levar a ejeção de elétron formando $CV^{2+•}$ (Bhasikuttan 1995, Kalyanasundaram 1987, Arce 2003, Nakai 1999, Al Rabaa 1999, Faria 1993, Buettner 1989).

Para finalizar o estudo fotoquímico do CV em micelas reversas de AOT é necessário identificar os produtos obtidos das reações fotoquímicas. Como já notificado anteriormente, após a fotólise há mudanças espectrais que ocorrem devido às alterações nas concentrações de reagentes e produtos presentes em solução, conforme pode ser visto na Figura 18A. Há uma gradual diminuição da absorvância no comprimento de onda do máximo de absorção, como já observado. Porém na região do ultra-violeta ocorre o oposto: há um aumento da absorção (note a região indicada pela seta), vide Figura 18A. Isto indica que há formação de fotoprodutos.

A variação de absorção para solução de CV em micelas reversas de AOT na região de 277nm em função dos tempos de irradiação pode ser observada na Figura 26. Note que ocorre um aumento significativo de absorção, aproximadamente 80%. Isto indica que nesta região há formação de produtos, semelhantemente ao

observado para o desaparecimento de CV (Figura 25). Tais dados estão de acordo com os reportados na literatura (Zhang 2001).

Figura 26: Variação da absorção em 277nm em função do tempo de irradiação de CV em micelas reversas de AOT $W_0=0$. $[CV]=1,33 \cdot 10^{-5}M$, $[AOT]=0,2M$, energia=150mJ.

Para identificação dos produtos de fotólise de CV utilizou-se de técnicas espectroscópicas e cromatográficas. Realizou-se fotólise de CV ($[CV] \cong 5 \cdot 10^{-3}M$) em micelas reversas de AOT $W_0 \cong 0$ equilibrado com o ar ou purgado com argônio durante 9 horas com 150 mJ/pulso de energia. A solução restante foi devidamente tratada como descrita nos Procedimentos Experimentais.

A solução final obtida foi aplicada em placa de cromatografia de camada delgada (TLC) juntamente com os padrões leuco-CV e 4,4'-bis (dimetilamino)

benzofenona (cetona de Michler) (MK). Os resultados obtidos e os Rf's calculados estão apresentados na Tabela XI.

Tabela XI: Resultados obtidos através da cromatografia de camada delgada

	Cores das bandas	Rf
Leuco-CV	Violeta suave	0,42
MK	Amarelo	0,24
Amostra equilibrada com ar	Amarelo	0,20
Amostra purgada com argônio	Violeta suave	0,42

Como pode ser observado, a amostra equilibrada com ar apresenta banda de migração e cor semelhantes a de MK. Portanto, isto é uma evidência de que este é composto presente na amostra. MK é uma cetona aromática. O oxigênio liga-se ao carbono central de CV, fazendo-o perder a ligação de um dos anéis aromáticos. Além disso, esse dado é corroborado pela literatura, já que a formação de cetona de Michler após fotólise de CV na presença de ar também foi identificada por outros autores (Indig 1997, Leaver 1972 e Iwamoto 1935).

Já a amostra purgada com nitrogênio apresentou características iguais as do leuco-CV. Esse composto apresenta muita semelhança ao CV mas difere-se devido à presença de um hidrogênio ligado covalentemente ao carbono central da molécula, destruindo a simetria e a planaridade desta (passa a adquirir uma geometria tetraédrica), conforme pode ser visualizado na Esquema 4. Isso rompe a delocalização de elétrons existentes entre os três anéis aromáticos e a molécula perde a sua cor característica, passando a absorver na região do ultra violeta do espectro. O dado encontrado sugere que na ausência de oxigênio CV é reduzido a leuco-CV.

Os fotoprodutos foram também caracterizados via absorção UV-VIS. A Figura 27 apresenta os espectros de absorção dos padrões utilizados (MK e leuco-CV) e a amostra (vide procedimentos na parte experimental), todos em hexano. Os espectros dos padrões apresentam máximo de absorção na região do UV ($\lambda_{\text{máx}}$ para MK é 332,21 nm, e para leuco-CV é 263,71 nm). Note que a amostra, equilibrada com ar, possui um máximo de absorção na mesma região espectral de MK. Observe que para a amostra purgada com argônio, o máximo de absorção é na região do leuco-CV, porém também apresenta absorção na região do MK.

Esses dados indicam que CV quando submetido a uma fotólise na presença de ar, reage com o oxigênio molecular e forma MK. Não houve formação de leuco-CV, pois não há absorção considerável na região do leuco (note Figura 27). Esses dados estão de acordo com os obtidos pela TLC (vide Tabela XI), o que confirma a formação da cetona.

Para a amostra purgada com argônio, houve formação preferencial de leuco-CV, conforme pode ser observado pelos espectros. Isto é indicativo de que nesta situação, CV é principalmente reduzido a leuco-CV. O que corrobora com os dados da TLC (Tabela XI). No entanto, há absorção também na região de MK. A produção de MK nesta solução indica que oxigênio não foi totalmente retirado. De fato, o método borbulhamento de gás argônio utilizado não elimina o oxigênio completamente.

É importante ressaltar que ambos os produtos (leuco-CV e MK) observados na TLC e no UV-VIS são originários da redução ou oxidação do ânion radical do CV[•], respectivamente.

Figura 27: Espectros de absorção de produtos de fotólise de CV e de padrões MK e leuco-CV em hexano.

8.2.4 REAÇÕES FOTOQUÍMICAS DE CV EM MICELAS REVERSAS DE AOT

Os estudos realizados por nós e por outros autores (Indig 1997, Leaver 1972, Iwamoto 1935, Jones 1986) até o momento, permitem-nos fazer um esquema das rotas e intermediários envolvidos na reação fotoquímica de CV em micelas reversas de AOT. O esquema 4 apresenta o mecanismo proposto. Após a excitação eletrônica, ^1CV sofre cruzamento inter-sistemas, formando ^3CV . O estado tripleto de

CV é geralmente assumido ser o responsável pela fotoredução (Jones 1986). Evidências da formação de $CV^\bullet$ foram obtidas (vide Figuras 20 e 21). O 3CV é também suprimido pelo oxigênio molecular formando oxigênio singleto, ainda que o rendimento quântico seja baixo ($\sim 1\%$), (Figura 25 painel A). Os dados de fotólise revelaram que a velocidade de fotodegradação de CV depende do quadrado da energia (vide Figura 25 painel C), portanto trata-se de absorção bifotônica. Como o 1CV vive pouco e como a formação de oxigênio singleto depende linearmente da energia de excitação (Figura 25 A), a absorção do segundo fóton deve-se ao 3CV , esquema 4.

Dados da literatura mostram que absorção bifotônica pode conduzir ejeção de elétron e geração de CV^{2+} , assim como há evidência da absorção de dois fótons pelo CV, é possível que $^3CV^{**}$ sofra fotooxidação gerando CV^{2+} e elétron solvatado. Elétron solvatado pode reagir com o oxigênio formando ânion superóxido. O intermediário CV^{2+} está envolvido em processos de N-demetilação, porém o rendimento desse processo para o nosso sistema é muito pequeno, de forma que não conseguimos observar formação de produtos demetilados.

Os mecanismos possíveis de formação do radical $CV^\bullet$ são através da redução direta das espécies excitadas $^3CV^*$ e $^3CV^{**}$ pelo contra-íon do surfactante (Esquema 4). O radical $CV^\bullet$ pode estar envolvido em diversas reações. Os dados de cinética de decaimento sugerem que as reações principais são a transferência de elétron com o seu contra-íon retornando ao estado fundamental e a reação com oxigênio gerando ânion superóxido. A presença do contra-íon próximo ao radical $CV^\bullet$ facilita a reação de *back electron transfer* sendo portanto esta reação favorecida no sistema. O oxigênio é um forte supressor de tripletes e de radicais assim é esperado que ele reaja eficientemente com o radical $CV^\bullet$ gerando ânion superóxido (Halliwell 2000). Dados da literatura mostram que somente na ausência de oxigênio molecular observa-se $CV^\bullet$ e quando da sua presença há formação de ânion superóxido e de peróxido de hidrogênio (Reszka 1986). Essas duas reações com $CV^\bullet$ são as

principais rotas de desativação deste radical.

Uma outra rota possível envolvendo o radical $CV^\bullet$ é a que leva ao fotocclareamento, vide esquema 4. Como é preciso muitas horas de irradiação luminosa de CV para tornar observável o fotocclareamento e a formação de fotoprodutos, conclui-se que este processo possui um rendimento muito baixo. De fato, já havia sido descrito que fotocclareamento de CV apresenta rendimento quântico muito baixo (Naguib 1996). A formação dos produtos cetona de Michler e de leuco-CV requer como intermediário o radical $CV^\bullet$, sendo assim mais uma evidência da presença deste radical (Baptista 1997, Baptista 1998). O oxigênio, presente no meio, pode reagir com o radical $CV^\bullet$ formando um intermediário dioxetano termodinamicamente instável. A clivagem deste intermediário gera a cetona de Michler, veja o esquema 4.

O mecanismo proposto em baixa concentração de oxigênio no meio também deve ocorrer por via radicalar. Leuco-CV é formado a partir da redução de CV com dois elétrons e um próton. Tal processo pode ser originado do encontro de duas moléculas de $CV^\bullet$ resultando em uma de leuco-CV e outra de CV. Este processo deve depender da concentração de $CV^\bullet$ e consequentemente de CV. Fotólises realizadas e, amostras degaseadas geram a forma leuco dos corantes TAM, como já investigado por Zhang *et al* para azul de metileno (Zhang 2001). Para formar leuco-CV, há necessidade de um segundo elétron e um próton. O possível doador do segundo elétron é o seu contra-íon $R-SO_3^\bullet$. A doação de elétron pelo radical $RO^\bullet$ para $CV^\bullet$ foi determinada anteriormente (Jones 1986). Jones *et al* verificou a captura do elétron do $RO^\bullet$ por $CV^\bullet$, resultando em leuco-CV (Jones 1986).

Em ambientes rígidos pode ocorrer a proteção dos tripletes da supressão por oxigênio, facilitando reações de transferência de elétrons por exemplo entre proteína e CV (Baptista 1998 e 1999). Em micelas reversas de AOT ocorre favorecimento dos processos fotoquímicos em valores pequenos de W_0 devido à restrição dos anéis aromáticos do CV.

9. CONCLUSÃO PARCIAL CV EM MICELAS REVERSAS

As propriedades dos estados excitado e fundamental do corante CV sofrem diversas alterações em função do solvente. Estas variações se devem à mudança na simetria da molécula decorrente de interações solvente/soluto ou formação de par iônico (Lewis 1942, Korpi-Tommala 1984, Lueck 1992, Maruyama 1996, Ishikawa 1999, Oliveira 2002). Investigou-se as propriedades de CV em soluções isotrópicas e verificou-se que solventes com constante dielétrica baixa apresentam variação de $\Delta\nu$ e $\lambda_{\text{máx}}$ no espectro eletrônico de CV, pois favorecem a formação do par iônico. Estes resultados foram descritos em maior detalhe em outra publicação (Oliveira 2002). Variações semelhantes nestes parâmetros, mas de menor magnitude, foram demonstradas em solventes que podem formar pontes de hidrogênio com CV (água) (Baptista e Tran 1997). A intensidade de fluorescência de CV é também alterada em função do meio. O aumento da viscosidade do meio provoca restrição do movimento de rotação dos anéis aromáticos, resultando em um aumento do tempo de vida de fluorescência e conseqüentemente no rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f). (Baptista 1997, Baptista 1998, Vogel 1985)

Utilizou-se o sistema de micelas reversas para investigar o efeito de interfaces sobre a fotofísica e fotoquímica do CV. Micelas reversas de AOT foram empregadas pois mimetizam interfaces negativas, este sistema auxilia a compreender a interação CV com ambientes com carga residual negativa, como por exemplo em mitocôndrias. Variações de $\lambda_{\text{máx}}$ e $\Delta\nu$ foram observadas em função do W_0 . Tais variações indicaram que em sistemas com W_0 pequenos, pares iônicos são formados em AOT.

Observou-se que há uma diminuição na microviscosidade sentida por CV nas micelas reversas de AOT ao aumenta-se o W_0 , indicando a migração do corante com o aumento de W_0 . Confirmou-se o local de solubilização de CV em micelas reversas de AOT a W_0 baixos e altos, através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de próton e de carbono 13. Verificou-se que CV encontra-se próximo à porção polar

da molécula de AOT tanto em baixos quanto em altos W_0 . Determinou-se então o contra-íon de CV em micelas reversas de AOT, trata-se do grupo sulfocinato do AOT. O par iônico é do tipo de contato quando o W_0 é baixo, porém quando o W_0 aumenta, há mudança no tipo de par iônico, sendo favorecido o par iônico separado por solvente (Oliveira 2006).

A caracterização do efeito de interfaces nas propriedades fotoquímicas de CV foi realizada em micelas reversas através de Fotólises Clássicas, Fotólises de Relâmpago a Laser e Emissão no infra-vermelho próximo. O fotobranqueamento de CV é maior em micelas reversas de W_0 menor, o que está de acordo com a menor fotoreatividade de CV a W_0 elevado. Este efeito está relacionado ao ambiente restrito de CV, à viscosidade do ambiente, bem como à presença de pares iônicos de contato em W_0 pequenos.

A comparação da eficiência de fotodegradação de CV em AOT em função do W_0 indicou que a fotoreatividade é maior em baixos valores de W_0 . Este efeito deve estar relacionado ao ambiente restrito de CV. A formação de intermediários reativos foi verificada através de Fotólise de Relâmpago a Laser, indicando a presença principalmente de espécies radicalares e tripletes de CV. Ressalva-se que o espectro de absorção do tripleto de CV é mais alargado que o do radical mas é difícil distinguir as duas espécies (Baptista 1998, Jones 1991, Bhasikuttan 1994, Jockusch 1996, Jockusch 1992).

Identificamos que o tempo de vida dos transientes aumenta na ausência de oxigênio e que a eficiência de geração do transiente diminui com o aumento de W_0 . Dois processos de desativação destes intermediários foram sugeridos. Um deles sendo independente da concentração de oxigênio, que está provavelmente relacionado com o *back electron transfer* entre o par-redox criado na fotoexcitação do par iônico. O outro, trata-se de uma reação de ^3CV ou $\text{CV}^\bullet$ com oxigênio molecular, no primeiro caso forma-se oxigênio singlete e no caso de $\text{CV}^\bullet$ forma-se ânion superóxido, veja esquema 4. Verificou-se a emissão de oxigênio singlete no meio na presença de CV. O que indica a existência de tripletes de CV.

Caracterizou-se o perfil de variação da intensidade de emissão do oxigênio e da velocidade de fotólise em função da energia de excitação. Determinou-se que a geração de oxigênio singlete é um processo relacionado com a absorção de um fóton (monofotônico). No entanto, a velocidade de fotobranqueamento é um processo relacionado com a absorção de dois fótons (esquema 4).

Após a absorção do segundo fóton ocorre a formação de um triplete de alta energia. A fotooxidação de $^3\text{CV}^{**}$ forma $\text{CV}^{2+\bullet}$ e elétron solvatado, vide esquema 4. O intermediário $\text{CV}^{2+\bullet}$ está envolvido com processo de N-demetilação, apesar de não conseguirmos medir produtos de N-demetilação no nosso sistema, não descartamos a possibilidade desta reação após a geração do intermediário $\text{CV}^{2+\bullet}$. Os tripletes $^3\text{CV}^*$ e $^3\text{CV}^{**}$ estão envolvidos na reação de transferência de elétron com o AOT e podem formar $\text{CV}^\bullet$.

A confirmação deste caminho reacional incluindo a presença do radical $\text{CV}^\bullet$ é a geração dos produtos leuco-CV e cetona de Michler. Tais produtos já estão reportados na literatura terem como intermediário o radical $\text{CV}^\bullet$ (Baptista 1997, Baptista 1998, Jones 1986, Iwamoto 1935).

Os produtos de fotólise foram identificados por técnicas cromatográficas. Na presença de oxigênio, houve maior formação de cetona de Michler. Na ausência de oxigênio, o produto observável foi leuco-CV, vide esquema 4. Este último composto é resultante da redução de CV com dois elétrons e um próton. Cabe ressaltar que tal processo é pouco eficiente, com rendimento menor que 1%. Destes estudos propomos o modelo do mecanismo de ação de CV. A excitação de CV em meios de alta viscosidade (ligado a membranas e proteínas) favorece a formação de tripletes e de oxigênio singlete. Ambos intermediários reativos oxigênio singlete e radicais livres são gerados com pequena eficiência (menor que 1%) em micelas reversas mesmo a valores pequenos de W_0 .

Este conhecimento prévio permite-nos propor estudos para o meio complexo celular. As diversas propriedades que este ambiente apresenta devem facilitar umas

e dificultar outras interações e reações dos fotossensibilizadores. Por exemplo, a diferença de potencial na membrana mitocondrial deve atrair esses fotossensibilizadores, uma vez que estes possuem carga positiva. (Hacham 1990, Baptista 1997, Baptista 1998, Foote 1968). Além disso, as células possuem diferentes sítios de ligação. Dessa forma, foi fundamental ampliar estes estudos empregando células cancerosas HeLa.