

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas
(Bioquímica)**

HELENA COUTO JUNQUEIRA

**SÍNTESE E ESTUDO DAS PROPRIEDADES
FOTOINDUZIDAS DE DERIVADOS
FENOTIAZÍNICOS EM SISTEMAS BIOMIMÉTICOS**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/10/2008

HELENA COUTO JUNQUEIRA

**SÍNTESE E ESTUDO DAS PROPRIEDADES
FOTOINDUZIDAS DE DERIVADOS
FENOTIAZÍNICOS EM SISTEMAS BIOMIMÉTICOS**

*Tese apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)*

*Orientador: Prof. Dr. Mauricio da Silva
Baptista*

São Paulo

2008

Helena Couto Junqueira

Síntese e estudo das propriedades fotoinduzidas de derivados fenotiazínicos em sistemas biomiméticos

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Para Maria Luiza, Airton, Mariana e Tiago.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Maurício pela sua paciência, orientação e apoio desde a iniciação científica.

Ao Prof. Willi e seus alunos pela ajuda e compartilhamento de aparelhos e reagentes.

Ao Prof. Mauro Bertotti pelas discussões e colaborações.

À Sílvia por sua eficiência e disposição de sempre ajudar.

Aos antigos e atuais colegas de laboratório Adjaci, Alan, Alexandre, Carla Pedriali, Carla Oliveira, Cíntia, Chris, Dani, Décio, Dino, Divino, Elisa, Fábio, Fernando, Luís, Mandela, Michelle, Milton, Patrícia, Rodrigo, Robson, Tathy, Thati, Vanessa, Vinícius e Vivi pela convivência, discussões, colaborações e cafezinhos.

À querida amiga Dayane pela sua grande amizade e companheirismo desde o primeiro dia de aula.

Às queridas amigas Camila, Kerlley, Milena e Sueli por todo o convívio durante a faculdade.

Às grandes amigas Amira, Karen e Thais por sempre me apoiar, ajudar e torcer por mim e principalmente por estarem presentes em todos os momentos.

Às minas Aninha, Anona, Fer, Érica, Gabi, Helen, Leila, Lepa, Mara, Maiara, Nath, Regi, Thaizinha e aos técnicos Binho, Du e Carlitos por sermos uma família unida.

Aos queridos amigos Thiago, Ju, Angerson, Escobar, Raquel, Lolo, Aline, Marcão, Joana e Pop.

À toda a minha família por sempre acreditar em mim.

Aos meus pais e irmã pelo imenso apoio incondicional.

Ao Pé por sua paciência, carinho, atenção e amor.

À FAPESP e CNPq pelo financiamento.

RESUMO

Junqueira, H. C., **Síntese e estudo das propriedades fotoinduzidas de derivados fenotiazínicos em sistemas biomiméticos**, 2008, 174p, Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho são apresentados estudos do efeito de interfaces nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas do azul de metileno (AM) e de derivados fenotiazínicos com o intuito de avaliar o potencial destes compostos como fotossensibilizadores (FS) em terapia fotodinâmica. As propriedades físico-químicas do AM foram estudadas em soluções de SDS e observou-se que a presença do AM em solução altera o equilíbrio entre as micelas de SDS, diminuindo o valor da concentração micelar crítica de 7mmolL^{-1} para $70\mu\text{molL}^{-1}$. A presença das micelas em solução também interfere nas propriedades do AM. Em baixas concentrações de SDS há formação de dímeros de AM, constatados pelo aumento da absorbância em 580nm e diminuição da emissão de fluorescência. A caracterização das espécies transientes mostrou a existência de moléculas de azul de metileno no estado triplete (^3AM) e de oxigênio singlete em soluções com altas concentrações de SDS e a formação de espécies radicalares do AM em baixas concentrações do tensoativo. Esta observação sugere que o mecanismo fotoquímico do AM é dependente da sua concentração local próxima de interfaces carregadas.

As interações do AM e de alguns de seus derivados fenotiazínicos (tionina, azure A e azure B) com vesículas e com células HeLa foram estudadas e em ambos os casos observou-se que as moléculas com estruturas assimétricas são incorporadas em maior extensão. Em estudos de fototoxicidade, os compostos assimétricos apresentaram maior nível de morte celular do que o verificado para os compostos simétricos. Entretanto, ao se considerar a incorporação em células, os compostos simétricos se mostraram mais eficientes por molécula. Foi desenvolvido um método para determinação do logP dos fotossensibilizadores (FS) por voltametria com microeletrodos que se mostrou reprodutível.

Novos FSs assimétricos derivados do Azure A com duas caudas hidrofóbicas de 4, 6 e 8 carbonos (AzC_4 , AzC_6 e AzC_8) foram sintetizados. Esses novos compostos possuem eficiências de fluorescência semelhantes ao AM. O composto

AzC₄ apresenta eficiência de geração de oxigênio singlete bem próxima à do AM (0,56), enquanto os outros dois compostos têm uma eficiência de geração de oxigênio singlete cerca de duas vezes menor. Este comportamento se deve ao fato dos FSs com cadeias carbônicas maiores interagirem mais fortemente entre si, apresentando maior grau de agregação. Os compostos sintetizados apresentam maior incorporação em vesículas que os compostos anteriormente estudados, indicando que a assimetria da molécula favorece a incorporação, assim como, o comprimento da cadeia hidrofóbica. Resultados de incorporação em células HeLa, mostraram que o composto AzC₄ interage mais facilmente com a membrana celular e apresenta maior nível de morte celular devido à sua maior incorporação.

Palavras-chave: Azul de metileno, fenotiazinas, interfaces, oxigênio singlete, terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

Junqueira, H. C., **Synthesis and study of photoinduced properties of phenothiazine derivatives on biomimetic systems**, 2008, 174p, PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The effect of interfaces on photophysical and photochemical properties of methylene blue (MB) and its derivatives was studied in this work, aiming to exploit their potential as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy. The presence of MB in SDS solutions affect the micelle equilibrium decreasing the apparent critical micelle concentration of SDS from 7mmolL^{-1} to $70\mu\text{molL}^{-1}$. The properties of MB were also affected. At low SDS concentrations the formation of MB dimers was detected by the increase in the absorption in 580 nm and decrease of fluorescence emission. The characterization of transient species of MB showed the existence of MB molecules in the triplet state and emission of singlete oxygen at large SDS concentration and the formation of MB radicals in small surfactant concentration. These observations suggest that the photochemical mechanism of MB depends on its local concentration close to charged interfaces. The interactions of MB as well as other phenotiazine derivatives with synthetic vesicles and HeLa cells were studied. In both cases, the PS with asymmetrical structure presented higher degrees of incorporation. Studies of phototoxicity showed that the PS with asymmetrical structures present higher degree of cell death than the symmetrical compounds. However, if one consider the degree of incorporation the symmetrical compounds are more efficient per molecule. A method to determinate logP by voltammetry with microelectrodes was developed, showing good repeatability. New asymmetric photosensitizers derived from Azure A with two hydrophobic chains of 4, 6 or 8 carbons (AzC_4 , AzC_6 e AzC_8) were synthesized in order to study structure/activity relationship. These new compounds presented similar fluorescence efficiency to MB. The oxygen singlet generation efficiency of AzC_4 is similar to MB, while the efficiency of the other PSs was twice smaller. This behavior was explained in terms PS aggregation, due to their longer hydrophobic chains. The synthesized PSs presented larger degree of incorporation than the commercial PSs, showing the role of asymmetry and hydrophobicity in incorporation yields. Incorporation in HeLa cells showed that AzC_4 interacts more

strongly with cells than the other synthesized PSs due to the rigidity of plasmatic membrane. Under the same illumination conditions, AzC₄ was the PS that presented higher degree of cell death as a result of its larger incorporation in cells.

Keywords: Methylene Blue, phenothiazines, interfaces, singlet oxygen, photodynamic therapy.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Terapia fotodinâmica: histórico e mecanismos	1
1.2. Mecanismos de fotooxidação e agregação	6
1.3. Morte celular fotoinduzida	12
1.4. Sistemas miméticos de membranas	16
1.5. Log P	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Materiais	22
3.1.1. Síntese e purificação dos novos FSs	22
3.1.2. Estudos espectroscópicos	22
3.1.3. log P e ligação em vesículas	23
3.1.4. Estudo em células	23
3.2. Equipamentos	23
3.3. Métodos	25
3.3.1. Preparação dos sistemas biomiméticos	25
3.3.2. Rendimento quântico de fluorescência	26
3.3.3. Eficiência de geração de 1O_2	26
3.3.4. Fotólise de relâmpago a laser	27
3.3.5. Estudo da agregação	28
3.3.6. Coeficiente de Partição	29
3.3.7. Incorporação em vesículas	30
3.3.8. Incorporação em células HeLa	31
3.3.9. Citotoxicidade em células HeLa	32
3.3.10. Viabilidade celular em células HeLa	34
3.3.11. Fototoxicidade dos compostos	35
3.3.12. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	36
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. Efeito de sistemas biomiméticos nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas do azul de metileno	38
4.2. Ligação em membranas e fotoatividade em culturas de células	77
4.3. Novos fotossensibilizadores	92

4.3.1. Síntese e purificação	92
4.3.2. Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos.....	106
5. CONCLUSÕES	135
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	138
APÊNDICES.....	146
SÚMULA CURRICULAR.....	162

1. INTRODUÇÃO

1.1. Terapia fotodinâmica: histórico e mecanismos

Novas metodologias baseadas em iluminação com luz visível têm revolucionado os campos de tratamento e diagnóstico de câncer e de outras doenças onde se deseja destruir células ou tecidos. A interação da luz com compostos específicos adsorvidos em tecidos a serem tratados desencadeia uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos, gerando espécies reativas (espécies tripletes, radicalares, oxigênio singlete e outras espécies ativas de oxigênio ou nitrogênio), que destroem as células e/ou tecidos tumorais [Ochsner, 1997]. Esta metodologia de tratamento é denominada Terapia Fotodinâmica (PDT, do inglês, photodynamic therapy) [Henderson; Dougherty, 1992; Ochsner, 1997].

O composto fotossensível é introduzido no paciente e se acumula preferencialmente em tecidos que se reproduzem rapidamente. Esses tecidos são posteriormente irradiados com laser ou com outras fontes de luz. A luz, tipicamente entre 600 e 800 nm, ativa o fotossensibilizador (FS) que através de mecanismos fotofísicos que envolvem oxigênio molecular, geram as espécies reativas, levando à ação curativa do paciente [Williams; Smith, 1993] (Figura 1).

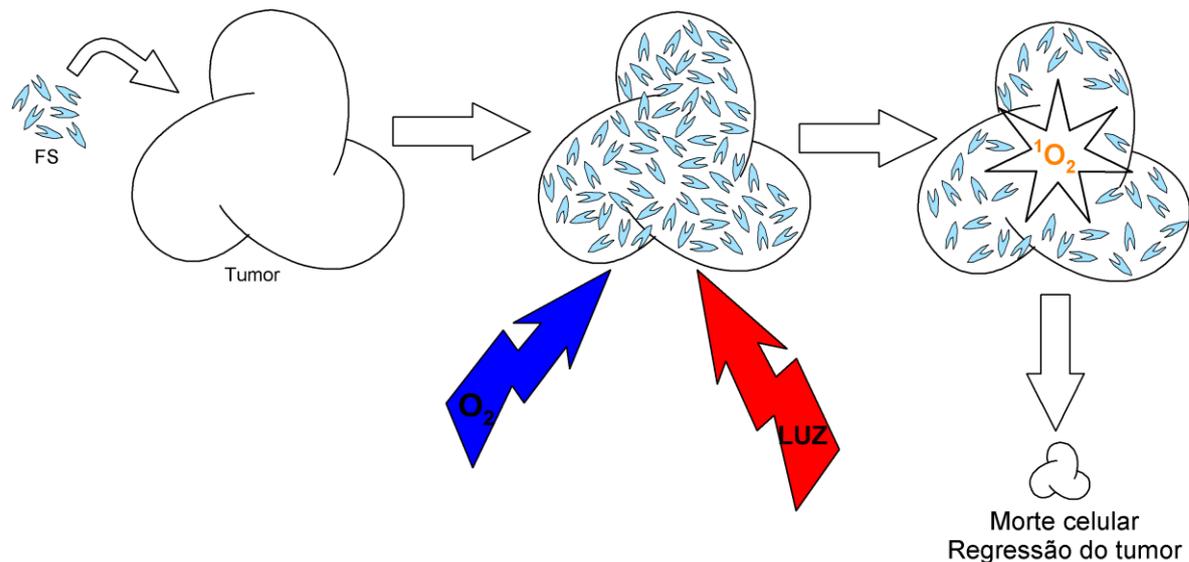


Figura 1 – Esquema do funcionamento da terapia fotodinâmica (PDT). O fotossensibilizador (FS) é aplicado no tumor, que é irradiado na presença de oxigênio, gera espécies citotóxicas (neste caso representadas pelo oxigênio singlete) causando morte celular e regressão do tecido doente, levando à ação curativa do paciente.

Para que um tratamento de PDT seja eficiente, a luz deve conseguir penetrar profundamente no tecido doente, isso significa que a luz deve ter comprimento de onda maior que 600 nm. Em comprimentos de ondas maiores que 800 nm e menores que 600 nm a luz é absorvida por cromóforos endógenos (melanina, hemoglobina, água), além de sofrer espalhamento que aumenta com a diminuição do comprimento de onda. Assim, existe uma janela terapêutica entre 600 e 800 nm, onde o tratamento de PDT é mais eficiente [Castano et al., 2004].

Além das propriedades absorptivas, o tempo entre a administração do fármaco e o tratamento e o tipo de exposição à luz são fatores determinantes na eficácia da PDT. Outros fatores como polaridade, distribuição de cargas e propriedades de agregação dos FSs devem ser também consideradas [Castano et al., 2004].

A aplicação do FS no paciente pode ser tópica, intravenosa ou intralesional [Nunes et al., 2004; Primo et al., 2007; Sibata et al., 2004]. Após a administração intravenosa, o FS liga-se fortemente a proteínas séricas e é distribuído pelo sistema

sanguíneo e transportado ao tecido tumoral com certa seletividade, que geralmente aumenta com o caráter lipofílico do agente sensibilizador [Ochsner, 1997]. Embora o fenômeno de localização do FS no tumor venha sendo extensivamente estudado, os mecanismos envolvidos ainda não são muito bem entendidos [Castano et al., 2005b; Henderson; Dougherty, 1992]. A retenção do FS por tecidos tumorais e o tempo entre a administração e o nível máximo de FS no tecido são as principais diferenças farmacocinéticas entre os FSs [Henderson; Dougherty, 1992].

Há muita especulação sobre o mecanismo de acúmulo do FS no tecido. Os FSs podem ser divididos em três classes dependendo das propriedades de adsorção e direcionamento em tecidos: i) compostos relativamente hidrofílicos que se ligam primariamente à albumina; ii) compostos anfifílicos e assimétricos que são inseridos nos fosfolipídios externos das lipoproteínas; e iii) compostos hidrofóbicos que requerem um veículo de solubilização como lipossomos e que se localizam no núcleo lipídico interno de lipoproteínas [Castano et al., 2005b, Nunes et al., 2004]. De fato, FSs hidrofóbicos como a protoporfirina ou moderadamente hidrofóbicos como as hematoporfirinas ligam-se fortemente à lipoproteínas no plasma. [Jori; Reddi, 1993; Mazière et al., 1991].

Um exemplo clássico da relação entre a localização, o efeito fotodinâmico e a hidrofobicidade é o da hematoporfirina (Hpd). Os monômeros de Hpd, embora tenham características fotoquímicas apropriadas para aplicação em PDT, não apresentam uso clínico, pois são rapidamente eliminados após a administração, não se acumulando em tumores. Já os seus oligômeros, acumulam-se preferencialmente na vasculatura tumoral, sendo que a droga resultante (Fotofrin[®]), tem sido a mais utilizada durante o desenvolvimento de PDT e que ainda hoje está em uso clínico [Henderson; Dougherty, 1992; Ochsner, 1997].

Na década de 60 os estudos de Lipson e Baldes com o derivado oligomérico da hematoporfirina foram os pioneiros nos estudos mecanísticos e nas aplicações clínicas de PDT [Kessel, 2004]. O primeiro FS que foi liberado para uso em pesquisa clínica foi uma preparação semi-purificada de derivado de hematoporfirina, hoje conhecido como Fotofrin[®]. A aprovação do derivado oligomérico da Hpd para uso clínico em 1994 teve grande impacto na comunidade médica e fotoquímica inaugurando uma nova modalidade terapêutica. As pesquisas e estudos clínicos realizados por Dougherty e colaboradores tiveram importância fundamental para que a PDT se tornasse uma realidade clínica. [Dougherty et al., 1978; Dougherty et al., 1998]. Dougherty e colaboradores, demonstraram que o Fotofrin[®] acumula-se na vasculatura do tumor e sob iluminação destrói parcialmente esta vasculatura dificultando a irrigação e causando hipoxia e necrose do tecido. O corte de suprimento de oxigênio, devido ao próprio tratamento, causa a diminuição da sua eficiência [Dougherty et al., 1978; Dougherty et al., 1998].

A irradiação com altas taxas de fluência de luz gera oxigênio singlete em uma velocidade que acaba com o oxigênio molecular mais rápido do que este é repostado, limitando o dano celular gerado pelo oxigênio singlete. Alguns métodos estão sendo estudados para diminuir esse problema [Detty et al., 2004]. A adição de emulsões que aumentam a oxigenação do tecido e o fracionamento da irradiação, que permite a reposição de oxigênio durante os períodos de escuro, aumentam a eficiência da PDT em algumas condições [Fingar et al., 1988]. No entanto, mesmo com estas estratégias considera-se que a diminuição do suprimento de oxigênio durante a PDT é a principal causa de recorrência de tumores.

O Fotofrin[®] por ser uma mistura de vários derivados de hematoporfirina, apresenta diversas desvantagens e efeitos colaterais: i) longa fotossensibilidade da

pele, sendo que os pacientes devem ficar até 8 semanas evitando a luz solar; ii) coeficiente de absorvidade molar pequeno na janela terapêutica, necessitando a utilização de lasers de maior potência para que a fotossensibilização seja eficiente; iii) dificuldade no controle de qualidade da preparação farmacêutica.

Acredita-se que para melhorar a eficiência da PDT, o FS deve ter algumas características: i) alto coeficiente de absorvidade molar na janela terapêutica (600 – 750 nm) para melhorar a penetração de luz no tecido; ii) ter nível de energia para produzir oxigênio singlete com alta eficiência; iii) ter afinidade seletiva pelos tecidos a serem tratados; iv) ser facilmente sintetizado a partir de compostos prontamente disponíveis para uma produção em larga escala; v) deve ser um composto puro de composição conhecida; vi) ser estável e preferencialmente solúvel em meios aquosos; vii) deve ter pequena toxicidade no escuro; viii) não deve agregar em sistemas biológicos para não reduzir sua eficiência fotodinâmica; ix) deve ter eliminação farmacocinética rápida, permitindo que o paciente não sofra com a fotossensibilidade [Castano et al., 2004; Detty et al., 2004].

Na década de 80, com os trabalhos pioneiros de Oseroff houve uma mudança de perspectiva na área. Oseroff propôs a utilização de FSs que tivessem alvos intracelulares ao invés da vasculatura do tumor [Oseroff et al., 1986; Modica-Napolitano et al., 1990]. Oseroff e colaboradores propuseram utilizar compostos que tem uma partição octanol/água adequada que permitem a partição na membrana e localização intracelular, especialmente compostos carregados positivamente que seriam atraídos e acumulariam na mitocôndria. Após iluminação estes compostos gerariam ROS justamente na mitocôndria, que é uma organela central no controle da vida ou da morte celular. Atualmente a busca de compostos que causem danos na

mitocôndria é uma realidade não só em PDT, mas também em oncologia em geral [Oseroff et al., 1986; Modica-Napolitano et al., 1990].

1.2. Mecanismos de fotooxidação e agregação

Desde o trabalho de Oseroff um dos objetivos de pesquisa em PDT é o desenvolvimento de FSs que danifiquem diretamente e especificamente organelas celulares (por exemplo, mitocôndria) de tumores induzindo a apoptose. Os corantes positivos, principalmente das classes das fenotiazinas e dos triarilmetanos, por serem relativamente lipofílicos e possuírem carga positiva, atravessam membranas e são atraídos pelo potencial negativo das mitocôndrias, devendo atuar diretamente nesta organela [Junqueira et al., 2002; Mellish et al., 2002; Severino et al., 2003; Wainwright, 2005]. Estudos do uso de fenotiazinas em terapia fotodinâmica têm concentrado predominantemente no azul de metileno e seus análogos desmetilados [Tardivo et al., 2005; Wainwright, 2005] (Figura 2).

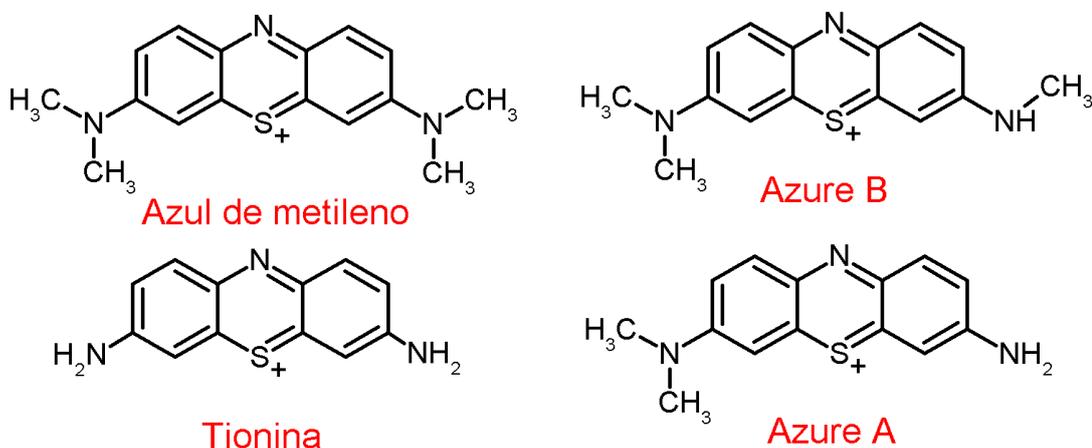


Figura 2 - Estrutura molecular dos cátions do azul de metileno, tionina, azure A e azure B. Diversos contra-íons têm sido utilizados, especialmente cloretos.

O azul de metileno (AM) e outros compostos fenotiazínicos têm sido usados extensivamente por mais de um século para corar células. É empregado em diagnósticos clínicos de uma variedade de doenças e como marcador de tumor em

cirurgias [Wainwright, 1996]. Apresenta também uso clínico difundido em condições de metahemoglobinemia. Seu uso como agente de PDT não é muito difundido no meio médico, mesmo com a facilidade comercial do AM. Acredita-se que a razão principal é porque o AM é reduzido a forma leuco azul de metileno (LAM) pelas coenzimas celulares NADH e FADH₂ [Gabrielli et al., 2004]. A redução de AM pelas células tumorais significa que a eficácia da fotossensibilização é diminuída, isto porque LAM é incolor e fotoquimicamente inativo [Wainwright, 1996].

No entanto, a eficácia do tratamento de vários tipos de tumores tem sido demonstrada em animais e recentemente em pacientes [Tardivo et al., 2005, 2006]. O azul de metileno exibe fototoxicidade em uma variedade de tumores celulares in vitro [Mellish et al., 2002]. A tionina mostra fototoxicidade equivalente ao azul de metileno em células de camundongo enquanto que o azul C foi menos fototóxico que o azul de metileno em células de carcinoma de vesícula humana [Mellish et al., 2002].

Depois da absorção de luz, o FS passa do estado fundamental singlete para um estado eletronicamente excitado (singlete) que através do cruzamento intersistemas passa para um estado excitado triplete. Por serem reativos e terem tempo de vida relativamente longo (μs – ms) estados tripletes são os principais envolvidos nas reações fotoquímicas relacionadas com PDT.

FSs no estado triplete podem reagir por dois tipos principais de mecanismos: mecanismo Tipo I, que ocorre através de uma reação de transferência de elétrons com alvos biológicos produzindo radicais ou íons radicais, que interagem com o oxigênio gerando produtos oxigenados como o ânion radical superóxido (O_2^-); ou pelo mecanismo Tipo II, onde há uma transferência de energia para o oxigênio, formando oxigênio singlete, que é altamente eletrofílico e reativo [Foote, 1968;

Foote, 1991] (Figura 3). O oxigênio singlete é o principal agente citotóxico responsável pela fotoinativação de células [Foote, 1968].

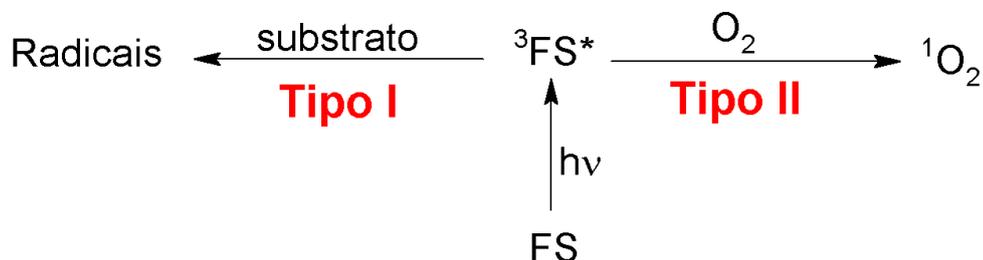


Figura 3 – Representação dos tipos de mecanismos fotoquímicos do fotossensibilizador. Tipo I: O FS reage com um substrato produzindo espécies radiculares; Tipo II: O FS reage primariamente com o oxigênio, gerando oxigênio singlete.

Mecanismos Tipo I e Tipo II podem ocorrer simultaneamente e a relação de velocidade entre os dois processos depende do FS, do microambiente em que o fotossensibilizador está e da concentração de oxigênio. Processos Tipo I são favorecidos em meio polar; por outro lado, a solubilidade e o tempo de vida do oxigênio molecular são muito maiores em solventes lipofílicos e como consequência, mecanismos Tipo II predominam nestes ambientes. Estudos demonstram que a proximidade e/ou a ligação de FSs a substratos macromoleculares, que é particularmente comum em organismos vivos, facilita o mecanismo Tipo I [Baptista; Indig, 1998; Henderson; Dougherty, 1992; Ochsner, 1997; Wainwright, 1996].

${}^1\text{O}_2$ é uma espécie transiente que surge da interação de estados excitados, normalmente estados tripletes, com oxigênio molecular. Após sua formação, ${}^1\text{O}_2$ pode reagir com substratos biológicos assim como o estado fundamental do seu sensibilizador, produzindo reações químicas não observadas em meios anaeróbicos. O ${}^1\text{O}_2$ é um agente oxidante forte, suas reações incluem a adição às duplas ligações de biomoléculas, de particular importância na peroxidação de lipídeos [Cosa; Scaiano, 2004].

Embora seja possível separar as contribuições dos mecanismos de fotoxidação tipo I e tipo II em sistemas simples, em meios biológicos isto não é possível. De fato, o mecanismo fotoquímico e a eficiência de PDT parecem dependentes da localização celular do fotossensibilizador. A localização, além de alterar o alvo celular principal de ataque fotoquímico, pode alterar as propriedades do sensibilizador no estado fundamental e no estado excitado [Wainwright, 1996]. Muitos estudos com membranas têm enfatizado o aumento em reações do Tipo II subsequente a ligação do sensibilizador na membrana, devido à diminuição na dimerização dos sensibilizadores (usualmente porfirinas e ftalocianinas) [Wainwright, 1996], no entanto, dependendo do sensibilizador e da interface, mecanismo Tipo I podem ser induzidos [Junqueira et al., 2002; Severino et al., 2003].

Existem diferenças nas propriedades fotoquímicas de FSs quando estes estão na forma de monômeros ou estão agregados e também em função do tipo de agregado [Baptista, 2002; Junqueira et al., 2002; Severino et al., 2003]. A fotoatividade de corantes pode ser modificada também pela ligação a polímeros solúveis em água ou em solventes polares [Caetano; Tabak, 2000; Gonçalves et al., 2006; Zhao et al., 2000]. A fotoquímica desses corantes próxima de interfaces negativamente carregadas não era conhecida, e a busca por essa resposta levou ao primeiro objetivo de trabalho dessa tese. Este conhecimento é fundamental quando se considera que o principal sítio de ação dos FSs carregados positivamente é a membrana interna da mitocôndria, que é uma interface carregada negativamente.

O microambiente em que o FS está localizado tem uma forte influência no seu estado de agregação. Altas concentrações de sal favorecem a formação de dímeros por aumentar a constante dielétrica da água, que diminui a repulsão eletrostática entre os monômeros [Arggawal; Borissevitch, 2006]. Polieletrólitos, micelas e

interfaces podem induzir a formação de agregados por concentrarem os corantes na interface [Caetano; Tabak, 2000; Gonçalves et al., 2006]. Foi demonstrado que alguns dímeros e oligômeros não fluorescem, nem mostram atividade fotoquímica em reações de transferência de energia, provavelmente devido ao aumento da conversão interna [Bourdelande et al., 1997; Sommer et al., 1997; Zhao et al., 2000]. Além disto, dependendo do tipo de interface na qual o sensibilizador se liga, tipos diferentes de agregados podem ser induzidos gerando tipos diferentes de espécies citotóxicas, ou seja, tipos diferentes de mecanismos fotoquímicos [Junqueira et al., 2002].

A agregação dos FS tem sido estudada em diversos sistemas. Os dímeros podem ser classificados em dois grupos de acordo com os seus momentos de transição: dímero tipo H e tipo J. O ângulo (α) entre a transição de dipolo de cada molécula e a linha de referência que conecta os centros das moléculas e a fenda da transição eletrônica em dois níveis singlete são características relacionadas com esses tipos de dímeros. Em dímero tipo J, $\alpha=0$ e a transição permitida é para o nível singlete menor e em dímero tipo H, $\alpha=90$ e a transição permitida é para o nível singlete maior. Entretanto, existem muitas possibilidades de variação de ângulo e é difícil de serem observados dímeros tipo J ou H puros (Figura 4).

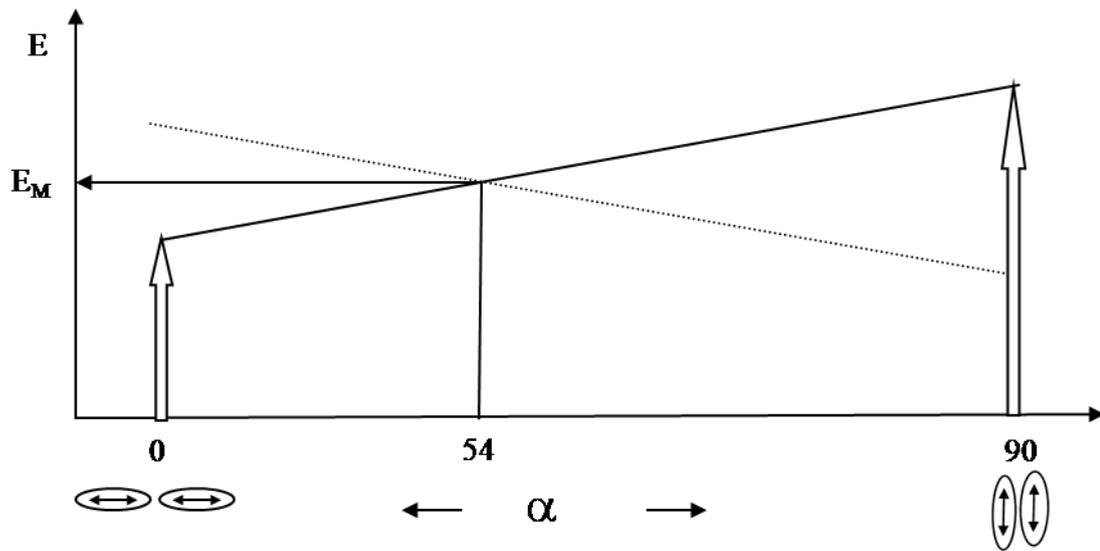


Figura 4 – Representação esquemática da energia das transições eletrônicas permitidas de monômeros e dímeros como função de α , que é o ângulo entre a transição de dipolo de moléculas individuais e a linha de referência que conecta os centros das moléculas individuais.

Após a ligação não covalente do FS no polímero ou polieletrólito a formação de agregados do sensibilizador é favorecida com o aumento da razão sensibilizador/polieletrólito [Borissevitch et al., 1996]. A formação desses agregados em solução produz efeitos na reatividade química e fotoquímica nestes meios. A tendência de um substrato se agregar na superfície de um polieletrólito pode ser vista com base na tendência do substrato formar agregados em água pura [Bourdelande et al., 1997; Zhao et al., 2000]. Substratos de tamanho médio tendem a se ligar em polieletrólitos naturais ou sintéticos primeiramente como monômeros quando a razão substrato/polieletrólito é baixa. Quando esta relação é menor que 10^{-3} , a formação de agregados no polieletrólito é muito difícil de ser detectada e caracterizada experimentalmente. Em casos onde a relação dímero/monômero está entre 10^{-2} e 5, a caracterização do agregado em solução é fácil de ser detectada por técnicas como espectroscopia eletrônica e de fluorescência [Baptista, 2002]. Embora os efeitos hidrofóbicos e eletrostáticos controlarem a estabilidade dos complexos substrato-polieletrólito, a combinação de interações altamente específicas baseadas

no reconhecimento molecular devem aumentar grandemente a estabilidade desses complexos.

Rosa de bengala, compostos pirrólicos, porfirinas e ftalocianinas têm sido ancorados ou incluídos em polímeros. Em alguns casos, a reatividade fotoquímica desses sistemas foi comparada com de corantes isolados e, em outros casos, sua eficiência como sensibilizadores de oxigênio singlete molecular tem sido testada [Baptista, 2002; Bourdelande et al., 1997; Sommer et al., 1997; Zhao et al., 2000]. Estudos espectroscópicos e fotoquímicos de tetracarboxiftalocianinas metálicos, especialmente na geração de oxigênio singlete e reações de transferência de carga, têm sido feitos em meios homogêneos e microheterogêneos e suas propriedades fotofísicas foram correlacionadas com o grau de agregação [Arggawal; Borissevitch, 2006; Bouderlande et al., 1997].

1.3. Morte celular fotoinduzida

A morte celular após a PDT pode ocorrer de duas formas principais, a necrose ou a apoptose. A morte por necrose está associada com a perda do controle homeostático, inchamento e rompimento da membrana celular ocorrendo vazamento dos restos intracelulares no tecido, causando uma resposta inflamatória intensa. Na morte por apoptose há contração da célula e perda do contato com células vizinhas, formação de vacúolos, quebra do DNA nuclear, evitando seu extravasamento e por fim a fagocitose dos restos celulares, sem ocorrer lesão às estruturas vizinhas [McConkey, 1998; Williams; Smith, 1993].

O mecanismo de morte celular provocada por PDT é dependente do fotossensibilizador, da célula e das condições de tratamento empregadas [Castano et al., 2005a]. Embora o assunto ainda seja objeto de conjectura, sabe-se que $^1\text{O}_2$

tem a tendência a induzir a morte celular por apoptose enquanto radicais derivados de sensibilizadores têm a tendência a induzir morte por necrose [Kochevar et al., 2000]. A indução de danos em organelas chaves como a mitocôndria também favorece apoptose enquanto que a cisão na membrana citoplasmática induz necrose [Jori; Fabris, 1998; Kochevar et al., 2000; Modica-Napolitano et al., 1990; Morgan; Oseroff, 2001]. Além destes fatores vale lembrar que o nível celular de ATP é fundamental para o processo apoptótico [Oleinick, et al., 2002].

Existem muitos estudos in-vitro do azul de metileno e de seus derivados alquilados sobre suas atividades fotodinâmicas. Foi mostrado que a localização subcelular inicial é o lisossomo, e depois da exposição à luz foi observada diferenças na realocação dos corantes, dependendo da hidrofobicidade do corante [Mellish et al., 2002]. A combinação de uma carga positiva e de hidrofobicidade moderada tem facilitado a realocação na mitocôndria, enquanto que somente pequenas espécies hidrofílicas são capazes de penetrar nos poros nucleares [Biolo et al., 1996; Mellish et al., 2002; Simplicio et al., 2002]. O aumento da hidrofobicidade desses compostos deve também resultar em melhores localizações do tumor e a atividade fotodinâmica in vivo; que está atualmente sob investigação [Biolo et al., 1996; Mellish et al., 2002; Simplicio et al., 2002].

O estudo de Mellish com compostos sintéticos de diferentes tamanhos de fragmentos alifáticos mostrou não somente um compromisso da lipofilicidade do corante com sua afinidade por células de fibrosarcoma RIF-1, mas também uma citotoxicidade associada a uma elevada partição do corante à membrana celular [Mellish et al., 2002]. Estes efeitos indicam que a partição do fotossensibilizador deve ser tal que propicie uma ligação lábil a membrana, de modo a permitir sua permeação e liberação no meio intracelular. As características estruturais e físico-

químicas que permitem tal transporte não são completamente compreendidas para estes fotossensibilizadores.

A interação de fotossensibilizadores ou outras drogas com sistemas biológicos pode ser avaliada pelo coeficiente de partição (P), isto é, pela razão da concentração de um composto em um sistema orgânico/aquoso bifásico. É conhecido que o sistema n-octanol/água é um bom sistema mimético para a interface água/membrana, e o parâmetro $\log P$ é avaliado pela medida da concentração de uma dada espécie em ambas as fases. Este parâmetro tem sido extensivamente usado para prever a tendência relativa dos compostos de interagir e incorporar em membranas biológicas [Engelmann et al., 2007b]. Entretanto, há poucos estudos sistemáticos correlacionando estrutura molecular, propriedades de ligação em membranas e eficiência fotodinâmica [Ben-Dror et al., 2006; Bronshtein et al., 2004; Engelmann et al., 2007a; Kepczynski et al., 2002; Lavi et al., 2002].

A natureza da carga elétrica dos FS é de grande importância na interação com alvos biológicos e eficiência fotodinâmica. Alguns compostos positivamente carregados acumulam mais rapidamente nas células em cultura, sugerindo uma significativa contribuição eletrostática [Engelmann et al., 2007a]. Por outro lado, a sub-localização celular é afetada pela lipofilicidade do FS. Já foi reportado que as propriedades fotofísicas do azul de metileno são dependentes do potencial de membrana da mitocôndria [Gabrielli et al., 2004].

A eficiência de ligação de FSs catiônicos em membranas depende primariamente de interações não específicas que podem ser avaliadas por seus coeficientes de partição. Entretanto, a estrutura molecular é importante quando a distribuição dos grupos hidrofóbicos e hidrofílicos na molécula é otimizada para gerar espécies anfifílicas. A contribuição de efeitos estruturais não podem ser

propriamente medidos pelo logP indicando interações mais específicas com membranas. Isto está provavelmente associado com uma semelhança estrutural otimizada que permite a incorporação dos FSs anfífilos na membrana aumentando sua eficiência fotodinâmica [Engelmann et al., 2007b].

Pensando em melhorar a localização do MB em células tumorais sintetizamos derivados assimétricos que são compostos químicos novos (Figura 5). Foram sintetizados os compostos 3-dimetilamino-7-dibutilamino-5-fenotiazina, que para simplificar será chamado de AzC₄, 3-dimetilamino-7-dihexilamino-5-fenotiazina, que será chamado de AzC₆, e 3-dimetilamino-7-dioctilamino-5-fenotiazina, chamado de AzC₈. Os estudos fotofísicos e fotoquímicos em solução aquosa, membranas e células com esta série de fotossensibilizadores devem resultar no aumento do conhecimento da relação estrutura-atividade de sensibilizadores fenotiazínicos.

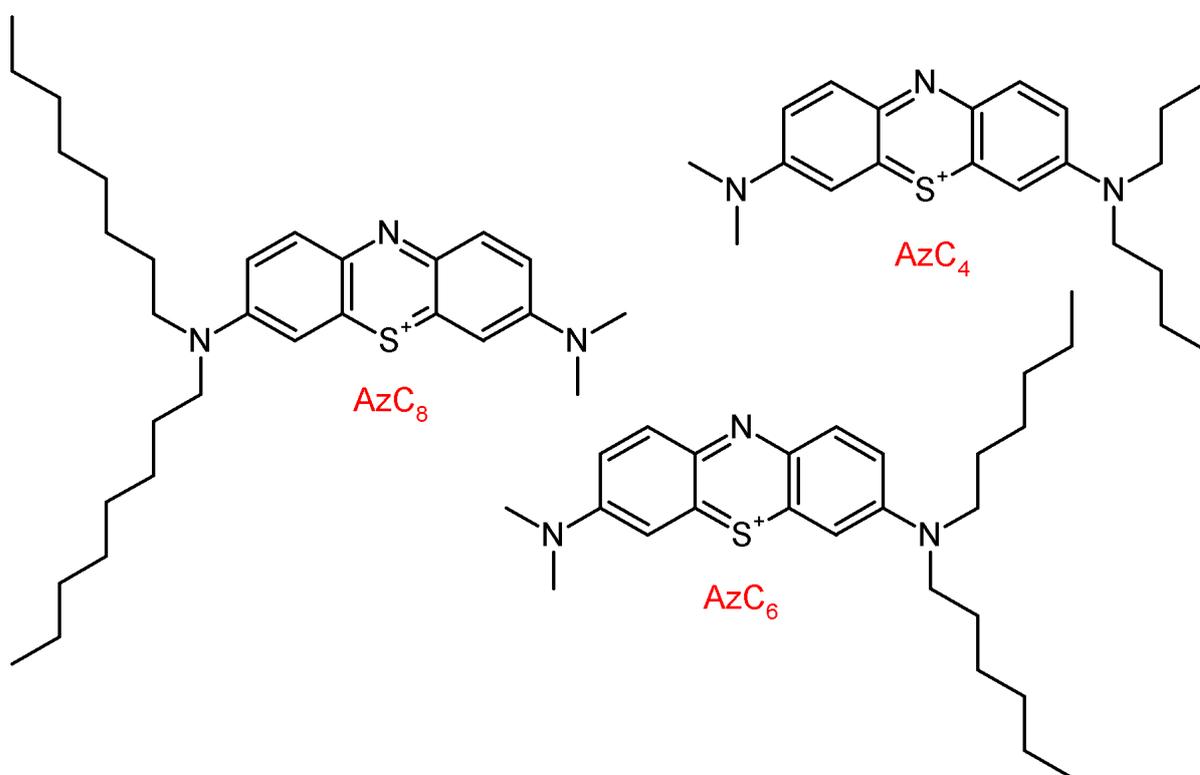


Figura 5- Estrutura química dos cátions dos derivados fenotiazínicos que foram sintetizados neste trabalho.

1.4. Sistemas miméticos de membranas

Anfifílicos como surfactantes e lipídeos podem se associar em uma variedade de estruturas em soluções aquosas. As micelas, micelas reversas, monocamadas e bicamadas constituem os sistemas miméticos de membranas, isto é, sistemas que imitam as membranas biológicas (Figura 6).

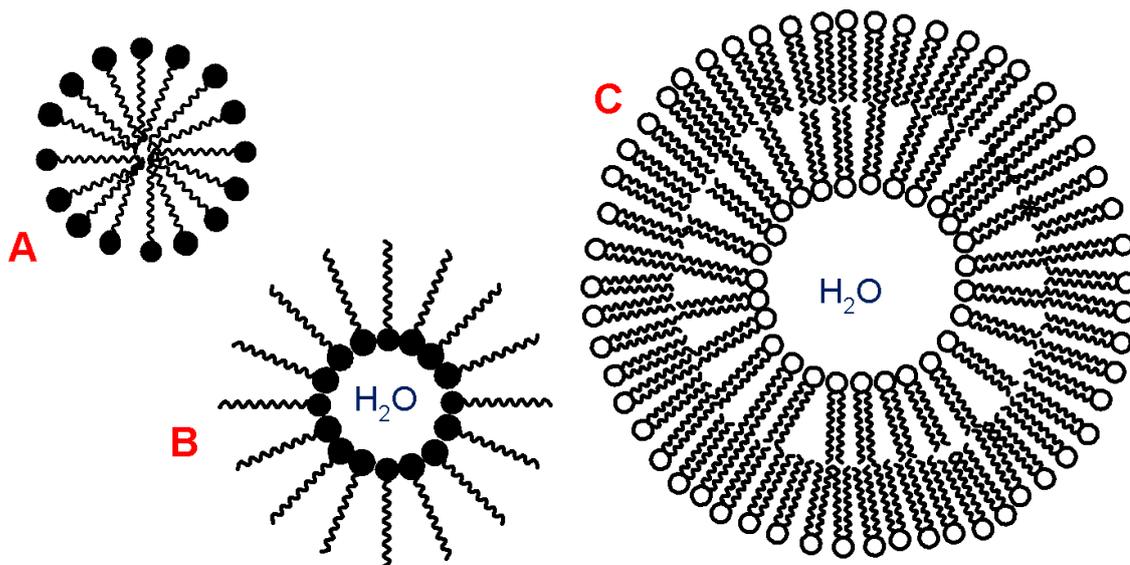


Figura 6 – Esquema representativo dos sistemas biomiméticos usados neste trabalho. **A)** Micela normal, **B)** micela reversa e **C)** vesícula unilamelar.

Estes sistemas são vantajosos porque são sistemas simplificados, de fácil obtenção e que mantêm algumas características das membranas permitindo o seu uso em estudos mecanísticos. Estas estruturas podem sofrer alteração de forma pela mudança das condições da solução, como a concentração do eletrólito ou do anfifílico, pH ou temperatura. A maioria dos surfactantes com uma cadeia simples forma micelas, enquanto que a maioria dos tensoativos com duas cadeias hidrofóbicas forma bicamadas.

Agregados de surfactantes se formam quando há igualdade no potencial químico das moléculas no estado agregado e monomérico. Em baixas concentrações, a maioria das moléculas em solução estará como monômeros. Em

concentrações maiores poderá haver a formação de agregados de tamanho definido, que são conhecidos como micelas. A concentração de monômero em que ocorre a formação de micelas é chamada de concentração micelar crítica (cmc).

Vesículas são agregados de fosfolípidos em que a fase aquosa é englobada por uma bicamada fosfolipídica e são consideradas como um modelo simplificado para membranas biológicas. Vesículas são muito empregadas em investigações de incorporação de droga, especialmente no estudo dos fotossensibilizadores para uso em PDT [Hoebeke, 1995; Kepczynski et al., 2002, Nunes et al., 2004]. A incorporação de sensibilizadores em vesículas lipídicas pode ser quantificada e descrita por constantes de ligação [Ehrenberg, 1992; Engelmann et al., 2007a, 2007b; Roslaine et al., 2000]. Estudos da ação de FSs em membranas miméticas são importantes para o entendimento dos mecanismos da PDT. O dano em membranas é o passo chave da morte celular [Valenzeno, 1987]. Caetano e colaboradores mostraram as modificações induzidas pela iluminação de soluções de vesículas gigantes contendo azul de metileno revelando uma cascata de eventos que levam à destruição das vesículas, em um processo iniciado por $^1\text{O}_2$ [Caetano et al., 2007].

Os lipossomos são também utilizados como transportadores de drogas para tecidos alvos, fato que é muito importante para PDT [Nunes et al., 2004]. Tedesco e colaboradores investigaram algumas propriedades fotoquímicas de ftalocianinas em lipossomos. Mostraram que quando o FSs está incorporado em lipossomos a associação com BSA é aumentada comparada com meio orgânico [Nunes et al., 2004], sugerindo a melhor localização em tecidos tumorais, uma vez que a albumina sérica é um dos componentes principais no sangue que influenciam na distribuição das drogas.

1.5. Log P

Como já definido no item 1.3, o logP é um parâmetro físico-químico que é utilizado para prever a afinidade de uma determinada molécula entre uma fase lipofílica (que pode ser a membrana celular) e uma hidrofílica. Normalmente os solventes 1-octanol e água são utilizados para imitar a interface água/lipídeo da membrana celular. Deste modo, pode-se inferir sobre a tendência das moléculas em interagir com membranas biológicas.

O logP de um composto pode ser determinado pelo método shake-flask, que não requer compostos padrões e é baseado na determinação direta das concentrações do equilíbrio de partição de um composto em um sistema bifásico n-octanol e água [Dearden; Bresnen, 1988]. As determinações podem ser realizadas por muitos métodos analíticos que permitem uma medida conveniente da concentração em ambas as fases como cromatografia gasosa e espectrofotometria.

No entanto, os valores de logP de FSs reportados apresentam variações muito maiores do que aquelas aceitáveis dentro do erro experimental sendo que a maioria destas determinações foi realizada utilizando a espectrofotometria de absorção na região UV-VIS [Dearden; Bresnen, 1988]. A discrepância nos resultados deve-se a erros sistemáticos nas medidas, pois os FSs têm tendência a se agregarem e adsorverem em superfícies como vidro e plástico. Após a partição, pode ocorrer também a mudança no índice de refração da fase aquosa pela presença de n-octanol que interfere na medida da absorbância [Dearden; Bresnen, 1988]. Neste trabalho, decidimos testar a utilização de outra técnica para determinar as concentrações dos corantes. Uma vez que os compostos fenotiazínicos são eletroativos, a voltametria cíclica com microeletrodos foi utilizada para medir as concentrações de corantes antes e após a partição.

Voltametria cíclica é uma das técnicas eletroquímicas mais versáteis para o estudo de espécies eletroativas. Sua versatilidade combinada com a facilidade de utilização tem resultado no extensivo uso dessa técnica em eletroquímica, química orgânica, química inorgânica e bioquímica [Evans et al., 1983]. A voltametria cíclica consiste na variação do potencial de um eletrodo (imerso numa solução) e a medida da corrente resultante. O potencial do eletrodo de trabalho é variado linearmente com o tempo, partindo de uma condição inicial até alcançar outro valor de potencial pré-determinado para em seguida retornar ao potencial inicial, fechando um ciclo (Figura 7) [Kissinger e Heineman, 1983; Van Benschooten et al., 1983].

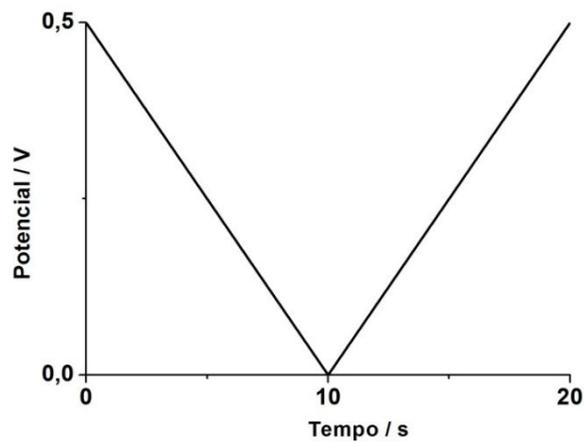


Figura 7 - Representação de um ciclo de potencial elétrico.

A utilização da voltametria com microeletrodos apresenta algumas características vantajosas em relação aos eletrodos convencionais como elevada relação corrente faradaica / corrente capacitiva e alta eficiência no transporte de massa [Bond et al., 1989; Correia et al., 1995]. No que tange a determinação de coeficientes de partição de corantes fenotiazínicos, a principal vantagem é a possibilidade de execução de voltamogramas em meios com baixa condutividade elétrica devido à baixa intensidade de corrente fornecida pelos microeletrodos [Bond et al., 1989; Correia et al., 1995], ou seja, não há necessidade de adição de eletrólito

suporte à solução aquosa para a medição. A presença de sal na solução aquosa certamente afeta a partição e a agregação destes compostos.

A corrente-limite para um sistema controlado por difusão utilizando microeletrodo é descrita pela seguinte equação [Baur; Wightman, 1991]:

$$i_l = 4nFCDr \quad (1)$$

Onde n é o número de elétrons que participa da reação, F é a constante de Faraday, C é a concentração em mol cm^{-3} , D é o coeficiente de difusão em $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$, e r é o raio do eletrodo em cm. Nota-se que a corrente é diretamente proporcional à da espécie eletroativa (corante no caso do presente estudo).

Deste modo, propusemos desenvolver um método baseado nos seguintes passos: (i) obtenção do voltamograma do composto fenotiazínico na fase aquosa inicial, (ii) partição do composto em volumes iguais de n-octanol e água (método shake-flask) por 5 minutos, (iii) obtenção de outro voltamograma na fase aquosa após a partição.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi estudar mecanismos envolvidos no processo fotodinâmico de FSs positivos, dando ênfase ao efeito de interfaces.

Os objetivos específicos foram:

- Estudar o efeito de interfaces nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas do azul de metileno e de outros derivados desmetilados do AM;
- Sintetizar e caracterizar novos fotossensibilizadores para uso em PDT;
- Relacionar a estrutura molecular, a partição em membranas e a fotoatividade destes novos FSs;
- Desenvolver um novo método para determinação de log P.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

A água utilizada foi filtrada, destilada e desionizada em equipamento de vidro através de sistema milli Q (Millipore).

3.1.1. Síntese e purificação dos novos FSs

A tionina e o azure A foram obtidos da Sigma-Aldrich. O propileno carbonato, o 1-bromo-butano e o 1-bromo-octano foram obtidos da Aldrich Chemical, USA. O 1-hexanol, o etanol, o metanol e o clorofórmio foram obtidos da Synth. O bicarbonato de sódio foi obtido da CRQ Indústrias Químicas. As colunas cromatográficas foram de alumina neutra da Sigma. Os espectros de RMN-¹H foram obtidos utilizando-se clorofórmio deuterado (Cambridge Isotope Laboratories). Os solventes acetonitrila e metanol ultrapuros (grau HPLC) foram adquiridos da Sigma-Aldrich e a solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) foi adquirida da Alfa Aesar - Lancaster. Todas as soluções utilizadas no HPLC foram filtradas com filtros de teflon (politetrafluoroetileno – PTFE) de poros de 0,5µm adquiridos da Sigma-Aldrich antes de serem injetadas no equipamento de HPLC. As amostras foram concentradas e dessalinizadas antes de serem analisadas por espectrometria de massas utilizando ponteiros ZipTip (Millipore).

3.1.2. Estudos espectroscópicos

Os corantes azul de metileno, tionina, azure A e azure B foram obtidos da Sigma-Aldrich. Foram utilizados metanol, clorofórmio e isooctano obtidos da Synth. O dodecil sulfato de sódio (SDS) foi obtido da Sigma-Aldrich, o cetiltrimetilamônio (CTAB) foi obtido da Acros Organics e o bis-2-etilhexil sulfocinato de sódio (AOT) foi obtido da Fluka. O tampão Tris (tri-hidroximetil-aminometano) foi obtido da Sigma-

Aldrich. O cloreto de sódio, o ácido bórico e o acetato de sódio foram obtidos da Synth.

3.1.3. *log P e ligação em vesículas*

O 1-octanol foi obtido da Sigma. O ácido clorídrico foi obtido da Synth. As vesículas multilamelares foram preparadas utilizando-se os lipídios cardiolipina (CL) e 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC) que foram adquiridos da Avanti Polar Lipids®.

3.1.4. *Estudo em células*

Os meios de cultura celular Dulbecco MEM (DMEM) e a solução de tripsina foram adquiridos da Cultilab. O tampão fosfato de sódio (PBS) foi preparado com cloreto de sódio, cloreto de potássio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de potássio monobásico todos adquiridos da Synth. O corante azul de tripan e o MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O dimetil sulfóxido (DMSO) foi obtido da Synth.

3.2. Equipamentos

Os espectros de absorção foram obtidos no espectrofotômetro Shimadzu (UV-2401PC) e os espectros de fluorescência foram medidos no espectrofluorímetro SPEX (DM3000F).

A determinação de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete foi realizada monitorando-se a intensidade de fosforescência do $^1\text{O}_2$ em 1270 nm através de um sistema composto de um laser Nd:YAG (Continuum Surelite III) pulsado em 532 nm, com tempo de duração de pulso de 5 ns e energia de 5

mJ/pulso, um monocromador e uma fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu (modelo R5509) resfriada a -80°C . Um sistema de detecção composto por uma placa de aquisição rápida (modelo Becker & Hickl GmbH MAS – 300). Esse equipamento foi montado pela Edinburgh Analytical Instruments (Edinburgh).

A instrumentação de fotólise por pulso de laser é composta de laser Nd:Yag da Spectron Laser System, emitindo em 532 nm com aproximadamente 20 mJ/pulso, lâmpada pulsada de Xe de 150 W, sistemas de controle eletrônico da Applied Photophysics e osciloscópio Hewlett-Packard 54510B.

As células HeLa foram cultivadas em estufa Thermo Electron Corporation – HEPA (classe 100), a 37°C e 5% de CO_2 . Foi utilizada uma centrífuga Excelsa II modelo 206BL da FANEM, uma centrífuga Mini Spin Plus da Eppendorf e um agitador de tubos modelo AP56 da Phoenix.

Nos experimentos de voltametria cíclica foi utilizado um bipontenciostato Autolab PGSTAT 30 (Eco Chemie) com um software de aquisição de dados disponibilizado pelo fabricante (GPES 4.8 version). Os experimentos foram realizados em uma célula eletrolítica com um eletrodo de referência Ag/AgCl (saturado com KCl) e um fio de platina como eletrodo auxiliar. Como eletrodo de trabalho foi utilizado um microeletrodo de fibra de carbono de 14 μm de raio.

O sistema de HPLC utilizado foi um equipamento modular que consiste num degaseificador (modelo DGU-20A₅), duas bombas (modelo LC-6AD), um forno (modelo CTO-10AS_{VP}), um detector UV-vis (modelo SPD-20A) e um controlador (modelo CBM-20A). As colunas utilizadas são de fase reversa revestida com octadecilsilano (LC column – Shim pack) de 4,6 x 250 mm e de 20 x 250 mm.

Os espectros de absorção no infravermelho foram realizados no equipamento FTIR Bomem MB100, os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos

espectrômetro de RMN Bruker DPX300 e o analisador de massas utilizado foi o analisador tipo íon trap LC-MS/MS(n)-Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, todos disponíveis na Central Analítica do Instituto de Química.

3.3. Métodos

Quando não estiver descrito de forma contrária os experimentos aqui reportados foram realizados em água milli-Q recém destilada e filtrada com pH em torno de 6,5. A razão de não utilizarmos soluções tampão nos estudos fotofísicos e fotoquímicos e de tensão superficial é que o tampão afeta as propriedades de agregação do azul de metileno e de interação com surfactantes. Por outro lado, o AM não tem nenhum equilíbrio de estado fundamental que é afetado na faixa usual de pH. No que concerne as propriedades do estado excitado estas sofrem influência do pH como será apresentado mais a frente.

3.3.1. Preparação dos sistemas biomiméticos

As soluções de micelas normais foram preparadas dissolvendo-se a massa necessária do surfactante em água milli-Q. Para a preparação das micelas reversas a massa de surfactante foi dissolvida em isooctano. As vesículas foram obtidas da seguinte forma: os lipídeos foram dissolvidos em clorofórmio na proporção adequada e secos sob fluxo de argônio formando um filme. Uma solução aquosa era adicionada ao filme e essa suspensão era homogeneizada mecanicamente e passada 10 vezes em extrusor com uma membrana com poros de 0,1 μm (Avanti Polar Lipids).

3.3.2. *Rendimento quântico de fluorescência*

O rendimento quântico de luminescência de um composto é definido como a fração de moléculas que emitem um fóton depois da excitação direta. Esta quantidade não é a mesma que o quociente entre número total de fótons emitidos que emergem da amostra e o número total de fótons absorvidos, embora, muitas vezes as duas quantidades sejam muito próximas [Demas; Crosby, 1971].

Para determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência foram preparadas soluções dos corantes sintetizados e do azul de metileno em metanol, todas com valores de absorvância iguais a 0,05 em 580 nm, para levar o mesmo número de moléculas por área no estado excitado. Para determinar-se o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) utilizou-se da seguinte relação [Demas; Crosby, 1971]:

$$\phi_{fX} = \frac{(1 - T_{MB})F_X\phi_{fMB}}{(1 - T_X)F_{MB}} \quad (2)$$

onde F_X e F_{MB} são as intensidades integradas de fluorescência (área sob o espectro de emissão) da amostra e do padrão (azul de metileno). T_X e T_{MB} são as transmitâncias em 580 nm da amostra e do padrão. O valor do ϕ_f do azul de metileno é 0,03 em metanol [Olmsted, 1979].

3.3.3. *Eficiência de geração de 1O_2*

Oxigênio singlete (1O_2) emite no infravermelho próximo, com um máximo em 1270nm. Esta emissão é chamada fosforescência, dado que o oxigênio singlete se regenera ao oxigênio triplete no estado fundamental depois de um cruzamento intersistema radiativo. Para estudar-se a eficiência de FSs, é de prática comum determinar-se o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) em soluções equilibradas com ar. O Φ_Δ pode ser determinado pela comparação do sinal de um

padrão selecionado previamente com aquele resultante de uma solução opticamente semelhante da droga em estudo, imediatamente após o pulso de laser, no mesmo solvente e sob a mesma pressão de oxigênio [Cosa; Scaiano, 2004].

Para os experimentos de emissão do oxigênio singlete soluções dos FSs e do AM foram preparadas em clorofórmio com valores de absorvância iguais a 0,1 em 532 nm. A relação utilizada para os cálculos de ϕ_{Δ} é dada pela equação 3:

$$\phi_{\Delta} = \phi_{\Delta}^P \cdot \frac{I}{I^P} \cdot \frac{abs^P}{abs} \quad (3)$$

onde abs e abs^P são as absorvâncias da amostra e do padrão no comprimento de onda de excitação. ϕ_{Δ}^P é o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete do padrão e I e I^P são as intensidades máximas de emissão, num determinado tempo, desde que seja igual para todas as amostras e para o padrão.

3.3.4. Fotólise de relâmpago a laser

É uma técnica que envolve observação de um estado excitado que foi gerado por um pulso de laser intenso. Esta técnica consiste da construção ponto por ponto de espectros de absorvância de compostos que são intermediários reativos ou produtos induzidos por absorção luminosa. O sinal de decaimento da espécie transiente é gravado em vários comprimentos de onda utilizando o mesmo intervalo de tempo. No tempo zero o espectro representa o transiente presente imediatamente após a excitação. O espectro de absorção do transiente mostra a diferença entre o espectro do transiente e do seu precursor [Hadel, 1989].

Espectros transientes de soluções de azul de metileno foram estudados pela técnica de fotólise de relâmpago a laser. Para caracterização dos espectros de absorção eletrônica do dímero e do monômero de azul de metileno, foram

preparadas soluções de azul de metileno $30 \mu\text{molL}^{-1}$ em 1 e 50mmolL^{-1} de SDS. Para os experimentos em função do pH, as soluções de azul de metileno eram de $10 \mu\text{molL}^{-1}$ em soluções tampão acetato e borato de sódio $50 \mu\text{molL}^{-1}$ na presença de 5molL^{-1} de NaCl, 4 ou 12mmolL^{-1} de SDS para indução de tipos diferentes de dímeros.

3.3.5. Estudo da agregação

A agregação dos compostos foi estudada em sistemas micelares com base nos resultados previamente reportados para o azul de metileno [Junqueira et al., 2002]. Foi utilizada uma solução de SDS 50mmolL^{-1} em tampão Tris 5mmolL^{-1} . Foram preparadas soluções dos corantes em tampão e em SDS onde a absorbância destas soluções eram próximas de 0,1. A concentração de corante nas duas soluções foi mantida constante. Medidas de absorção das soluções dos corantes em função da concentração de SDS foram realizadas. Para isso eram adicionados volumes crescentes das soluções de corantes em SDS nas soluções de corantes em tampão Tris.

Também foram realizados experimentos onde foram acompanhadas as absorbâncias de soluções dos compostos em função da temperatura para se determinar os fatores termodinâmicos da agregação. Foram preparadas soluções dos compostos sintetizados em tampão Tris 5mmolL^{-1} . A solução foi colocada numa cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm e sua absorbância era medida. Variou-se a temperatura de 10°C a aproximadamente 70°C , com incrementos de 5°C (no início) ou 10°C (no final). Para cada aumento de temperatura era esperado pelo menos 5 minutos para a estabilização e então o espectro era obtido. O composto AzC₄ foi estudado em duas concentrações diferentes, uma solução com absorbância

inicial de aproximadamente 0,15 e outra solução com absorvância inicial de aproximadamente 1,0. Os demais compostos foram estudados em soluções com absorvância de 0,15.

3.3.6. Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição dos compostos foi determinado por voltametria cíclica com microeletrodos. Primeiramente era preparado um volume suficiente de uma solução aquosa de $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ dos corantes para fazer o experimento em triplicata. Em 1 mL desta solução era adicionado um pequeno volume de solução ácida concentrada para o pH final ser aproximadamente 1,4 e um voltamograma cíclico era obtido. 1 mL de n-octanol era adicionado à solução (sem ácido) e a mistura era agitada por 5 minutos no agitador de tubos. A mistura era deixada em repouso por mais 5 minutos para que as fases se separassem completamente. Após a separação das fases, o voltamograma da fase aquosa era obtido em meio ácido. O cálculo do coeficiente de partição era obtido através da relação entre as correntes limites na fase orgânica e na fase aquosa. A medida voltamétrica só foi obtida na fase aquosa, uma vez que a fase orgânica é muito viscosa e não existe um eletrólito suporte, tornando muito difícil a detecção. Deste modo, utilizou-se a seguinte equação para o cálculo de P:

$$P = \frac{i_{\text{octanol}}}{i_{\text{água}}} = \frac{i_{\text{antes}} - i_{\text{depois}}}{i_{\text{depois}}} \quad (4)$$

Onde i_{octanol} e $i_{\text{água}}$ são as correntes limites na fase orgânica e aquosa respectivamente; e i_{antes} e i_{depois} são as correntes limites antes e depois da partição na fase aquosa.

3.3.7. Incorporação em vesículas

Para os experimentos de incorporação dos corantes em vesículas foram preparadas suspensões de vesículas multilamelares. Foram dissolvidos 6,3 mg (8 μmols) de DSPC e 3,0 mg (2 μmols) de CL em clorofórmio, que foi evaporado em fluxo de argônio formando um filme na parede do tubo de ensaio. 2 mL da solução tampão Tris 5 mmolL^{-1} foi adicionado e o sistema foi agitado vigorosamente por 3 min. A suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 14000 rpm e o sobrenadante contendo vesículas menores foi descartado. O precipitado foi ressuspensão em 2 mL da solução tampão. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes para ficarem somente vesículas multilamelares em suspensão.

Para a incorporação dos corantes nas vesículas, foi preparado 1 mL de soluções de corantes com valores de absorbância em aproximadamente 0,1 e a elas foi adicionado 50 μL da suspensão de vesículas e cada frasco foi agitado vigorosamente. Os corantes ficaram incubados por 1 hora. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 14000 rpm onde as vesículas decantaram carregando os corantes incorporados. O sobrenadante e o precipitado foram separados. O precipitado foi ressuspensão em solução tampão Tris 5 mmolL^{-1} . Ao precipitado e ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de solução de SDS 100 mmolL^{-1} garantindo assim que não haveria agregados em solução. Foram então obtidos os espectros de absorção do sobrenadante e do precipitado. (Figura 8)

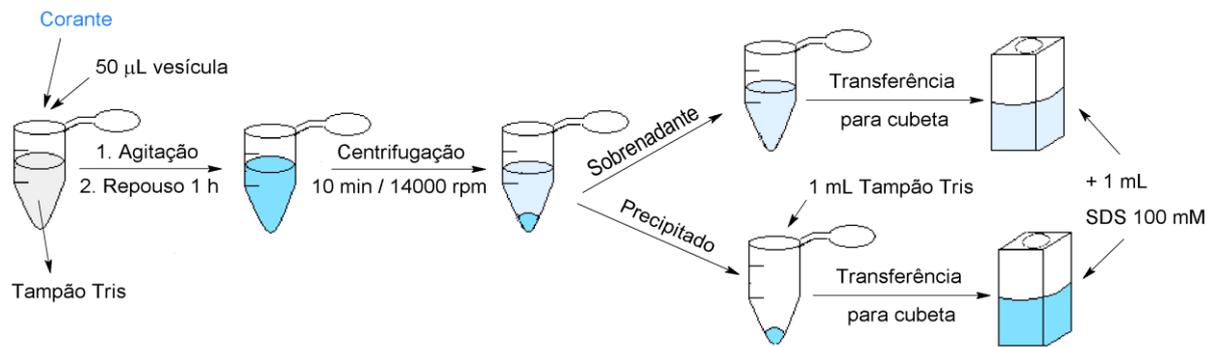


Figura 8 - Protocolo do experimento de incorporação dos corantes em vesículas.

A partir desses espectros foi possível calcular a porcentagem de incorporação dos corantes através da seguinte equação:

$$\% \text{Incorporação} = \frac{Abs_P}{Abs_S + Abs_P} \quad (5)$$

Onde Abs_P e Abs_S são os valores de absorbâncias obtidas no comprimento de onda de máxima absorção para o precipitado e para o sobrenadante, respectivamente.

3.3.8. Incorporação em células HeLa

Neste experimento 1×10^5 células foram plaqueadas no dia anterior à incubação (cerca de 20 horas). Primeiramente era obtido o espectro de absorção na solução de incubação ($20 \mu\text{molL}^{-1}$) do fotossensibilizador. Esse espectro é correspondente ao total de fotossensibilizador que foi incubado nas células. 1 mL dessa solução era adicionado às células e ficava incubado por 3 horas. Após esse período a solução de incubação era retirada e reservada. As células eram então rapidamente lavadas com solução de PBS gelado a fim de se evitar o efluxo da droga das células, e 1 mL de solução de SDS 50 mmolL^{-1} era adicionado. Essa solução de SDS é utilizada para quebrar a membrana celular, provocando a morte

das células e liberando o corante que foi incorporado. O espectro da desta solução era obtido (lisado de células). Ao sobrenadante, que foi reservado, era adicionado 1 mL de solução de SDS 100 mmolL⁻¹, ficando na mesma condição que o lisado de células. O cálculo de incorporação foi realizado da seguinte maneira:

$$\%Incorporação = \frac{Abs_{células}}{Abs_{células} - Abs_{sobrenadante}} \times 100 \quad (6)$$

Onde $Abs_{células}$ é a absorbância para o lisado de células e $Abs_{sobrenadante}$ é a absorbância do sobrenadante, ambos os valores no comprimento de onda de absorção máxima para cada corante.

3.3.9. Citotoxicidade em células HeLa

Células HeLa foram cultivadas em garrafa plástica de crescimento celular com meio de cultura DMEM e mantidas na estufa. Após o crescimento das células, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão PBS. Esse tampão foi descartado e então foi adicionado 1,5 mL de solução de tripsina. A garrafa foi colocada de volta na estufa por aproximadamente 5 minutos. Durante esse tempo a tripsina ataca as membranas celulares fazendo com que as células se soltem da garrafa, devendo-se tomar cuidado para não exceder esse tempo porque a tripsina continua atacando e pode destruir a membrana das células, matando-as. Após esse tratamento, toda a tripsina com a suspensão de células eram transferidas para um tubo Falcon e são centrifugadas por 2 minutos a 3500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células que precipitaram, foram ressuspensas em 1 mL de meio de cultura. A partir dessa suspensão as células são contadas.

Para se fazer a contagem, foram adicionados 10 µL de azul de tripan em 90 µL dessa suspensão e foram homogeneizados. O azul de tripan só atravessa

membranas de células mortas. Assim somente as células mortas ficarão azuis e as células vivas, que foram excluídas continuarão brilhantes quando vistas no microscópio. Uma alíquota desta solução foi colocada num hematocitômetro (Câmara de Neubauer). Utilizou-se metodologia clássica para contar as células e garantir a precisão no volume de amostragem (Figura 9):

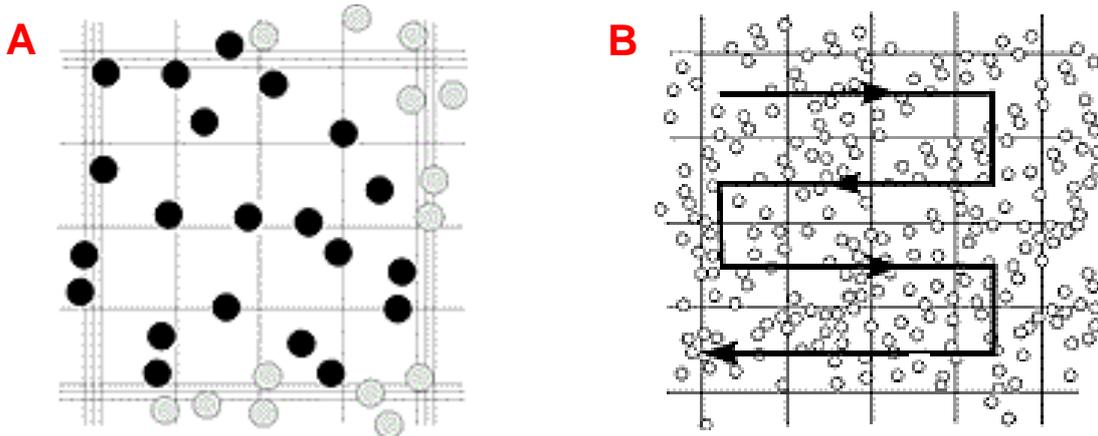


Figura 9 – Esquema de contagem de células na câmara de Neubauer. **A)** Em preto são as células contáveis e em branco são as células descartadas na contagem. **B)** Sentido da contagem das células.

As células que ficam em cima da linha tripla das laterais são contadas somente do lado superior, do lado esquerdo, garantindo que as células não serão contadas duas vezes (Figura 9 - A). A contagem é feita a partir da primeira linha da esquerda para a direita. Na segunda linha é feita da direita para a esquerda e assim sucessivamente até o quadrado inferior esquerdo (Figura 9 - B).

O número total de células que foram contadas foi dividido pelo volume da câmara de Neubauer que é $0,2 \times 10^{-3}$ mL. Assim tem-se o número de células por mL de solução com azul de tripan (concentração). Da solução de $100 \mu\text{L}$, $90 \mu\text{L}$ eram de suspensão de células, deve-se acertar esse valor com a diluição.

$$C_{\text{suspcel}} = \frac{C_{\text{soltripan}} \times V_{\text{soltripan}}}{V_{\text{suspcel}}} = \frac{(n/0,2 \times 10^{-3}) \times 100}{90} \quad (7)$$

Com essa concentração de células (equação 7) na suspensão é possível saber o número de células totais multiplicando o valor da concentração pelo volume de meio de cultura utilizado para ressuspender as células.

Para o experimento de citotoxicidade foram utilizadas duas placas de 12 poços que foram incubadas com 1×10^5 células em cada poço e ficaram na estufa por 24 horas para que as células que estavam em suspensão aderissem na placa. Após este período, o meio de cultura de cada poço foi retirado e as células foram lavadas com PBS. Retirou-se o PBS e colocou-se 1 mL das soluções de corantes em meio de cultura. Todos os experimentos foram feitos em triplicata: 3 poços sem droga (branco) e 3 com cada FS. As células ficaram incubadas com as drogas por 3 horas na estufa. As soluções eram então retiradas, as células foram soltas com tripsina e foi colocado 1 mL de meio de cultura em cada poço e fez-se a contagem das células como descrito anteriormente. A solução de azul de metileno preparada para este experimento foi de $20 \mu\text{molL}^{-1}$ e as soluções dos demais corantes tinham uma absorvância igual a 0,3 nos respectivos comprimentos de onda onde a intensidade de absorção era máxima.

3.3.10. Viabilidade celular em células HeLa

A viabilidade celular foi determinada com o ensaio de atividade metabólica com MTT após 24 horas da incubação. Numa placa de 12 poços foram incubadas 1×10^5 células por poço. Foi estudada a toxicidade no escuro de três concentrações diferentes de fotossensibilizador: 5, 10 e $20 \mu\text{molL}^{-1}$. O branco é referente a poços onde nenhuma droga foi colocada. No momento da incubação com as drogas, era colocado nesses poços meio de cultura incolor sem droga. O meio de cultura celular foi retirado e uma solução de MTT 2 mg/mL foi adicionada às células. A placa

contendo as células foi colocada novamente na estufa por 3 horas, onde o MTT é reduzido formando cristais de formazan. Após esse período, a solução de MTT foi retirada cuidadosamente para não danificar os cristais formados e é adicionado DMSO para a solubilização desses que formam uma solução de coloração roxa que pode ser determinado colorimetricamente. Esse solvente não precisa ser estéril, uma vez que, neste momento do ensaio não existem mais células vivas. Após um tempo de espera de aproximadamente 30 a 40 minutos, necessários para a solubilização completa com o DMSO, foi feita a medida de absorbância em 580 nm.

A redução do MTT em cristais de formazan só ocorre quando a enzima redutase mitocondrial está ativa, assim a conversão pode ser diretamente relacionada ao número de células viáveis [Mosmann, 1983].

Foram realizados experimentos testes de toxicidade com azul de metileno e azure B, que é o precursor das moléculas sintetizadas, e com os novos compostos, variando-se a concentração dos mesmos. Esses experimentos foram realizados em placas de 12 poços, e a leitura espectrofotométrica da solução final de cada poço foi feita no espectrofotômetro com uma cubeta de quartzo.

3.3.11. Fototoxicidade dos compostos

Para cada experimento de fototoxicidade foram utilizadas duas placas de 12 poços que foram incubadas com 1×10^5 células em cada poço e ficaram na estufa por 24 horas para que as células que estavam em suspensão aderissem na placa. Após este período, o meio de cultura de cada poço era retirado e as células eram lavadas com PBS. O PBS era retirado e era colocado 1 mL das soluções de fotossensibilizadores em meio de cultura ($20 \mu\text{molL}^{-1}$). As células eram incubadas com as drogas por 3 horas na estufa. As soluções eram então retiradas e 1 mL de

meio de cultura incolor era adicionado. Neste momento, uma placa era colocada de volta na estufa, e a outra placa era irradiada com laser de comprimento de onda 650 nm. Após a irradiação a placa ficava na estufa por 24 horas, assim como a placa que não sofreu irradiação. No dia seguinte o meio de cultura era retirado, as células eram soltas com tripsina e era colocado 1 mL de meio de cultura em cada poço e a contagem das células era feita.

A irradiação das células foi feita em 6 ciclos de claro e escuro, onde as células eram irradiadas por 60 s e ficavam 60 s no escuro. A dose total de irradiação que as células receberam foi de $0,4 \text{ Jcm}^{-2}$.

3.3.12. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Inicialmente foram obtidos cromatogramas com os corantes comerciais azul de metileno, tionina e azure B na coluna analítica (4,6 x 250 mm) a fim de se definir os parâmetros de corrida, como o fluxo, tempo de corrida e a melhor mistura para fase móvel, além de se familiarizar com o programa de aquisição de dados e com a técnica.

Foram realizados vários testes para a determinação do melhor método para separar corantes fenotiazínicos, como os reportados nos trabalhos de van Bommel (2007) e Tanaka (2007). O método utilizado para a separação dos compostos foi baseado no trabalho de Van Liedekerke (1989), no qual a fase móvel utilizada é uma mistura de acetonitrila e solução aquosa de tetrametilamônio (TMAH) $0,124 \text{ molL}^{-1}$, na proporção 68:32. A mistura de solventes era passada pelo sistema no modo isocrático. O fluxo total era de $0,6 \text{ mL/min}$, a temperatura do forno era de 35°C . O comprimento de onda utilizado para fazer as aquisições era 650 nm, mas também foi

monitorado em 600 nm. As amostras de corantes eram dissolvidas na mistura de solventes igual à fase móvel.

As frações recolhidas foram concentradas e dessalinizadas utilizando-se uma pipeta automática com uma ponteira ZipTip que possui uma resina com C₁₈ na extremidade. Essa resina serve como uma microcoluna e o objetivo é que a amostra fique retida na resina enquanto se efetua o processo de concentração da amostra, depois ela é retirada com um solvente apropriado, ficando concentrada e livre dos sais que estavam presentes anteriormente. As amostras então

O protocolo para utilização da ponteira Ziptip foi o sugerido no manual de instruções: (i) a ponteira foi lavada com uma mistura de 50% acetonitrila: 0,5% de ácido fórmico por 5 vezes, aspirando e dispensando vagarosamente a solução; (ii) lavar a ponteira com 0,1% de ácido fórmico, aspirando e descartando por 5 vezes, para equilibrar o pH; (iii) carregar a amostra na ponteira, aspirando e dispensando 10 vezes vagarosamente; (iv) lavar novamente com 0,1% de ácido fórmico aspirando e dispensando no descarte por 5 vezes; (v) eluir a amostra em 5 µL de 80% de acetonitrila: 0,5% de ácido fórmico, aspirando e dispensando 10 vezes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de sistemas biomiméticos nas propriedades fotofísicas e fotoquímicas do azul de metileno

Para compreender os mecanismos fotoquímicos envolvidos na geração de espécies citotóxicas, as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do azul de metileno foram estudadas detalhadamente em solução e em sistemas biomiméticos [Junqueira et al., 2002]. A ligação de moléculas em membranas e interfaces pode causar alterações nas propriedades do seu estado fundamental e conseqüentemente nos processos fotoquímicos e fotofísicos em que eles estão envolvidos [Borba et al., 2000; Strauss et al., 1998]. Os detalhes desses processos precisam ser investigados no caso de FSs utilizados em terapia fotodinâmica, uma vez que o efeito fotodinâmico irá acontecer em células ou tecidos onde os fotossensibilizadores irão interagir com macromoléculas ou membranas [Strauss et al., 1998; Baptista; Indig, 1998; Baptista; Indig, 1997].

Os sistemas biomiméticos (vesículas, micelas e micelas reversas) têm sido usados para estudar o efeito das membranas e interfaces em muitos fenômenos incluindo reações químicas e bioquímicas e processos fotoinduzidos e bioenergéticos [Junqueira et al., 2002; Hoebeke, 1995]. São ferramentas úteis no estudo desses fenômenos porque é possível mudar os equilíbrios e as propriedades dinâmicas da interface de maneira controlada.

O azul de metileno é um FS que tem características fotoquímicas interessantes incluindo alto rendimento quântico de cruzamento intersistema e sensibilização do oxigênio singlete ($\phi_{\Delta} \sim 0,5$), triplete com tempo de vida longo, baixo tempo de vida e rendimento quântico de fluorescência e baixo potencial de redução [Chan and Bolton, 1980; Misran et al. 1994; Tuite and Kelly, 1993; Wilkinson, et al.,

1993]. A agregação no estado fundamental do azul de metileno era conhecida e discutida com precisão, no entanto o efeito de interfaces carregadas nos equilíbrios de estado fundamental e nas propriedades fotoquímicas não estava descrita. Este estudo é fundamental para entender a fotoquímica do azul de metileno em células.

A Figura 10 mostra os espectros de absorção do monômero e do dímero do azul de metileno [Bergmann and O'Konski, 1963; Rabinowitch and Epstein, 1941]. É possível observar que as duas espécies possuem espectros de absorção distintos. O monômero do azul de metileno apresenta uma banda de absorção com o máximo em 664 nm enquanto o dímero mostra absorção máxima em 590 nm. No espectro do monômero ainda é possível observar que também existe um ombro em 610 nm. Em solução aquosa existe um equilíbrio entre as duas espécies e observa-se que ocorre aumento de absorção em 590 nm à medida que a concentração do AM aumenta em solução, como será visto adiante (Figura 11).

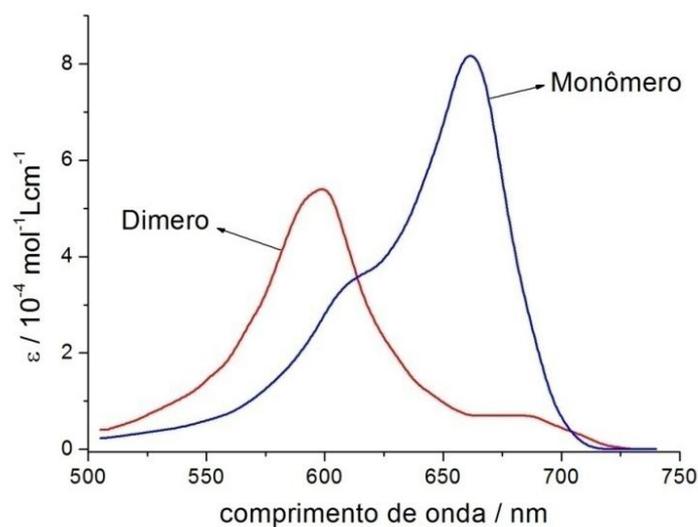


Figura 10 - Espectros de absorção do monômero (azul) e do dímero (vermelho) do azul de metileno [Bergmann; O'Konski, 1963].

Conhecendo-se esses espectros, o primeiro objetivo do trabalho foi confirmar o valor da constante de dimerização (K_D) do azul de metileno reportada na literatura

com o valor de $4 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ [Bergmann; O'Konski, 1963; Rabinowitch; Epstein, 1941]. Foram obtidos espectros de absorção variando-se a concentração do corante de 30 a $300 \mu\text{molL}^{-1}$ (Figura 11).

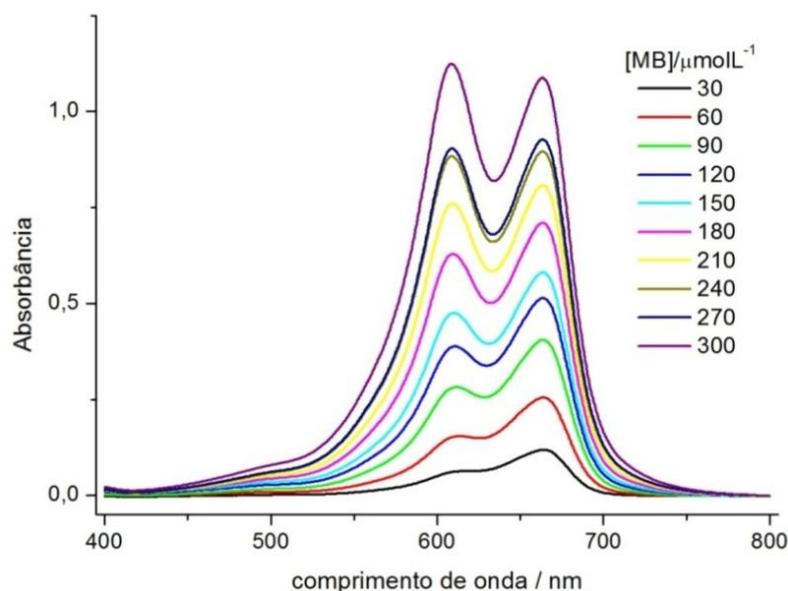
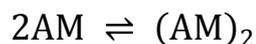


Figura 11 - Espectros de absorção de soluções aquosas do azul de metileno em diferentes concentrações.

Em baixas concentrações de azul de metileno o espectro é característico do monômero, onde o pico de absorbância máxima é em 664 nm. À medida que a concentração de azul de metileno é aumentada, é observada a definição do outro pico por volta de 590 nm, característico do dímero de azul de metileno (Figura 11). O equilíbrio de agregação em solução pode ser tratado como:



Onde se tem:

$$K_D = \frac{[\text{D}]}{[\text{M}]^2} \Rightarrow [\text{M}]^2 = K_D [\text{D}] \quad (8)$$

e:

$$C_T = [\text{M}] + 2[\text{D}] \Rightarrow [\text{D}] = \frac{C_T - [\text{M}]}{2} \quad (9)$$

Substituindo (9) em (8), tem-se:

$$[M] = \frac{[(1 + 8K_D C_T)^{1/2} - 1]}{4K_D}$$

Onde K_D é a constante de dimerização, $[M]$ é a concentração de azul de metileno na forma monomérica, $[D]$ é a concentração de azul de metileno na forma dimérica e C_T é a concentração analítica de azul de metileno em solução.

A partir da Lei de Lambert-Beer, pode-se escrever a seguinte equação:

$$\text{Abs} = \varepsilon_M [M]l + \varepsilon_D [D]l$$

Onde l é o caminho óptico, Abs o valor de absorvância e ε é o coeficiente de absorvância molar do monômero (ε_M) e do dímero (ε_D).

Reescrevendo as equações:

$$\text{Abs} = \varepsilon_M [M]l + \frac{\varepsilon_D (C_T - [M])l}{2}$$

Chega-se à seguinte equação:

$$\text{Abs} = \frac{l\varepsilon_M [(1+8K_D C_T)^{1/2}-1]}{4K_D} + \frac{l\varepsilon_D [C_T - [(1+8K_D C_T)^{1/2}-1]]}{4K_D} \quad (10)$$

Assim, fazendo-se o gráfico do valor da absorvância do azul de metileno em 664nm em função da sua concentração na solução, foi possível obter o valor da constante de dimerização e do coeficiente de absorvância molar do dímero (Figura 12).

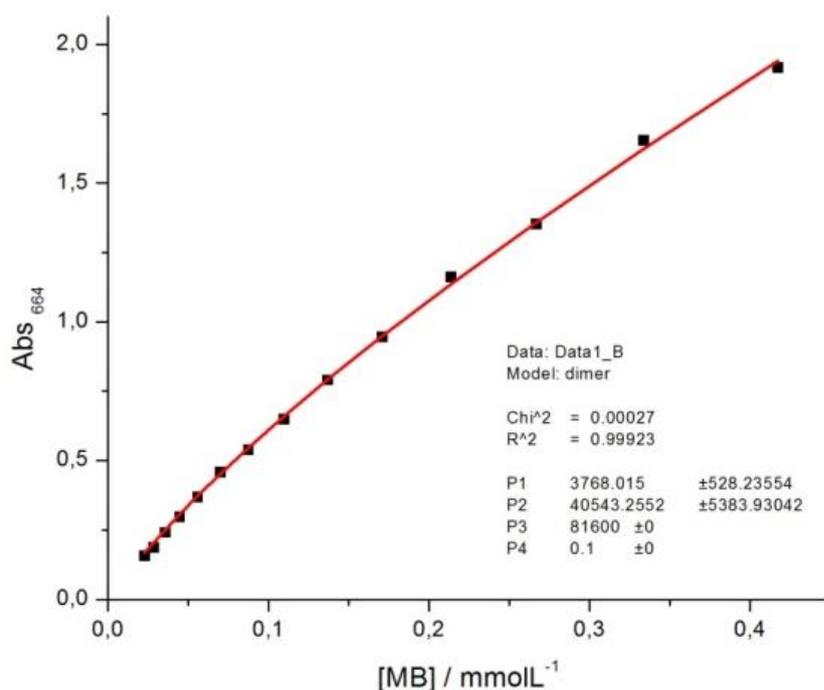


Figura 12 - Valores de absorvância obtidos em 664 nm em função da concentração de azul de metileno em solução aquosa.

Através do ajuste da curva pela equação 10 obtém-se um valor da constante de dimerização de $3,8 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{L}$, que corrobora com aqueles encontrados na literatura. Também foi obtido o valor do coeficiente de absorvância molar para o dímero de $4,0 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{Lcm}^{-1}$.

A partir desses resultados, o objetivo foi estudar o efeito do azul de metileno no equilíbrio de soluções de SDS e nas suas propriedades interfaciais. A molécula de azul de metileno é positivamente carregada e tem uma atração eletrostática forte por moléculas de SDS. Essa interação pode alterar o equilíbrio entre as micelas de SDS e seus monômeros livres em solução. Esse efeito do azul de metileno nas propriedades interfaciais do SDS foi observado inicialmente em experimentos de medida de tensão superficial (γ) em função da concentração de SDS em várias concentrações de azul de metileno (Figura 13).

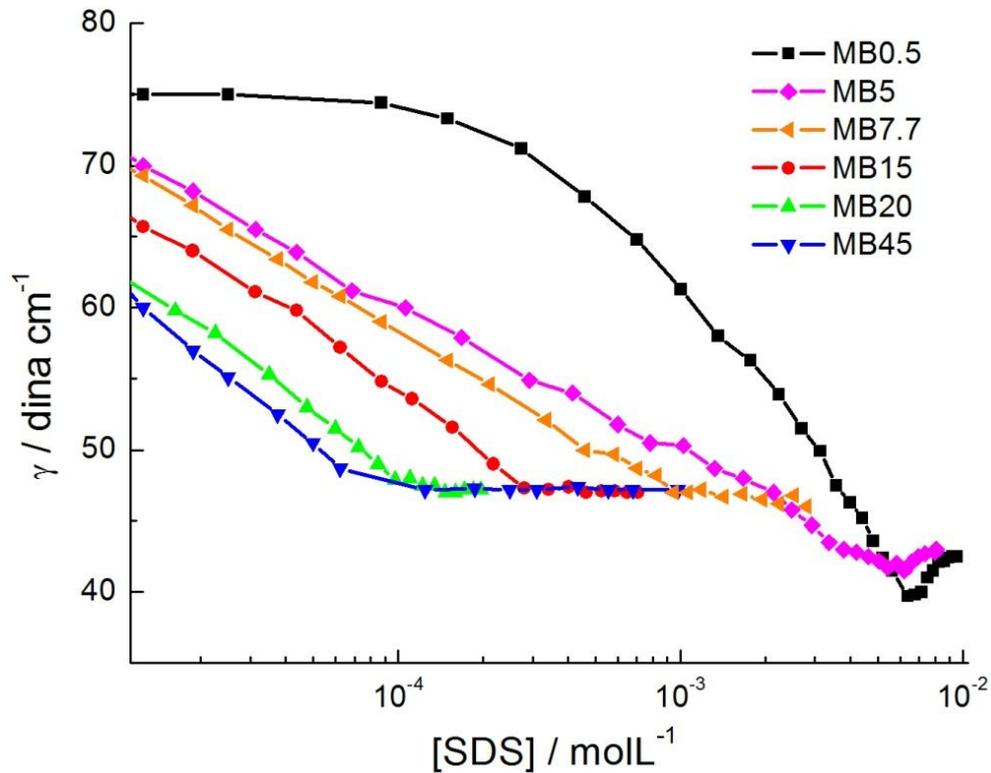


Figura 13 - Tensão superficial em função da concentração de SDS em diferentes concentrações de azul de metileno (■)0,5, (◆)5, (▲)7,7, (●)15, (▲)20 e (▼)45 μM .

Na Figura 13 pode-se observar na presença de $0,5 \mu\text{molL}^{-1}$ de AM (■) que a tensão superficial diminui conforme a concentração de SDS é aumentada e há uma mudança brusca no perfil da curva de tensão superficial pela concentração indicando a saturação da superfície com monômeros de SDS e o início da agregação em solução. Esta concentração é denominada de concentração micelar crítica (cmc). Na curva onde a concentração de azul de metileno é pequena ($0,5 \times 10^{-6} \text{molL}^{-1}$) observa-se que a cmc do SDS é de $7 \times 10^{-3} \text{molL}^{-1}$ e esse valor é muito próximo daquele observado para a cmc do SDS puro ($8,2 \times 10^{-3} \text{molL}^{-1}$) [Lianos; Zana, 1981]. Com o aumento da concentração de azul de metileno no sistema observa-se que o valor de concentração que permite a saturação da superfície é cada vez menor, alcançando valores de $70 \times 10^{-6} \text{molL}^{-1}$ quando a concentração de azul de metileno é de $45 \times 10^{-6} \text{molL}^{-1}$.

É sabido que altas concentrações salinas (na ordem de $1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) diminuem a repulsão eletrostática entre os monômeros na interface micelar e, conseqüentemente, diminuem a concentração micelar crítica [Tanford, 1980]. Entretanto, baixas concentrações de azul de metileno (na ordem de $1 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) são suficientes para mudar a cmc em duas ordens de magnitude (Figura 13).

A função excesso de concentração superficial (Γ), que é a quantidade de monômeros por unidade de área de superfície pode ser calculada por um modelo simplificado da isoterma de Gibbs, considerando a solução diluída e a temperatura constante (equação 11).

$$\left(\frac{\delta\gamma}{\delta c}\right)_T = -\frac{RT\Gamma_S}{c} \quad (11)$$

Como é conhecida a dependência entre a tensão superficial (γ) e a concentração do surfactante, é possível calcular o excesso de concentração superficial e estimar a área ocupada por uma molécula do surfactante na superfície.

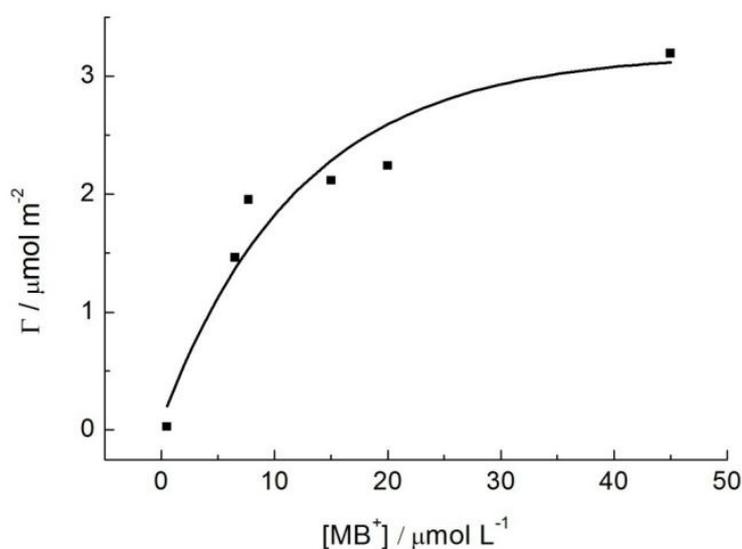


Figura 14 - Função excesso de concentração superficial (Γ) do SDS em função da concentração de azul de metileno. Dados extraídos da Figura 13.

Observa-se o aumento exponencial de Γ com o aumento da concentração de azul de metileno (Figura 14). Este efeito pode ser explicado pela formação de pares iônicos entre SDS e AM (SDS-AM). Devido à carga neutralizada, estes têm uma grande tendência de ficar na superfície, e conseqüentemente ocorre diminuição da área ocupada por cada molécula de SDS na superfície, o que explica o aumento na função excesso e a diminuição da cmc. O equilíbrio de ligação SDS-AM está envolvido no aumento da estabilidade do SDS na interface ar/água. Surge a questão se o equilíbrio entre monômeros e dímeros do AM também é afetado pela presença de SDS.

Com o objetivo de caracterizar o efeito do SDS nas propriedades do AM, foram obtidos espectros de absorção do azul de metileno em soluções com diferentes concentrações de SDS. Mantendo-se constante a concentração de azul de metileno ($20 \times 10^{-6} \text{ molL}^{-1}$) e variando-se a concentração de SDS foram observadas mudanças interessantes nos espectros de absorção (Figura 15).

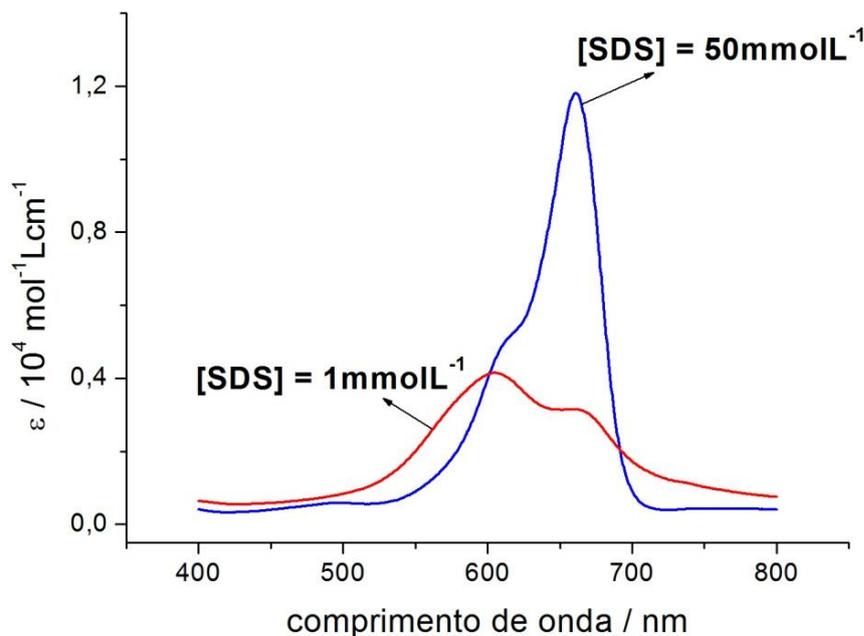


Figura 15 - Espectros de absorção do azul de metileno em 1 mmolL^{-1} de SDS (vermelho) e 50 mmolL^{-1} de SDS (azul). A concentração de azul de metileno é de $20 \mu\text{molL}^{-1}$ em ambos espectros.

Em baixas concentrações de SDS (1 mmolL^{-1}) o espectro de absorção tem um pico de absorção máxima por volta de 580-590 nm, que é no mesmo comprimento de onda do dímero, e quando a concentração de SDS é aumentada (50 mmolL^{-1}) o pico de absorção máxima é em 665 nm, assemelhando-se ao espectro do monômero de azul de metileno. Esses resultados indicam que em baixas concentrações de SDS, isto é, quando a relação entre a concentração de micelas e a concentração de azul de metileno é pequena, há a formação de dímeros de azul de metileno em solução.

A razão entre os valores de absorbância em 580 e 665 nm dá uma estimativa qualitativa da concentração relativa de monômeros e dímeros em solução. O espectro de absorção de uma solução de azul de metileno $8 \mu\text{molL}^{-1}$ foi monitorado em função do aumento da concentração de SDS e CTAB e o valor da razão entre as absorbâncias de dímero e monômero foi calculado (Figura 16). Deste modo é possível visualizar a formação de dímeros no sistema e então estudar as propriedades fotoquímicas do azul de metileno em condições diferentes de agregação.

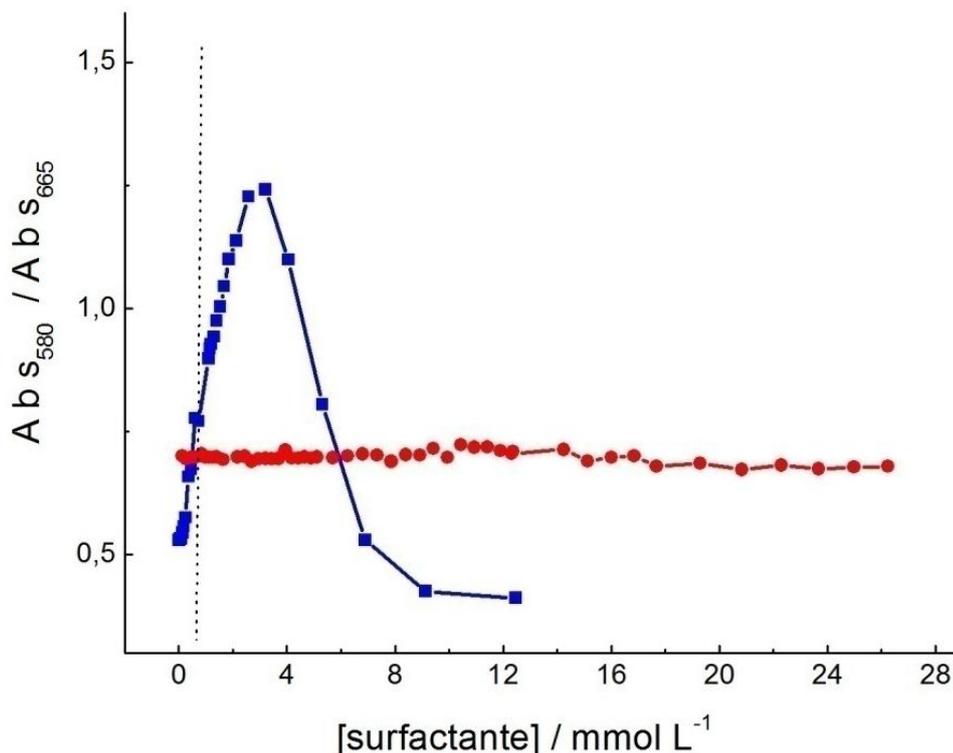


Figura 16 - Razão dos valores de absorvância em 580 e 665 nm (Abs_{580}/Abs_{665}) em função da concentração de SDS (azul) e CTAB (vermelho). A linha preta indica a cmc do SDS nesta solução de azul de metileno, $[AM] = 8 \mu mol L^{-1}$.

Monitorando-se o espectro de absorção do azul de metileno à medida que se aumenta a concentração de CTAB que possui carga positiva, não foi possível observar mudanças na razão entre dímeros e monômeros (Figura 16 (●)). Neste caso há uma repulsão entre as moléculas presentes em solução impedindo a ligação na interface micelar e conseqüentemente nos equilíbrios do estado fundamental do azul de metileno (Figura 16).

Entretanto, com o SDS foi observado um aumento na razão Abs_{580}/Abs_{665} até $3 \times 10^{-3} mol L^{-1}$ de SDS, indicando a formação de dímeros, e a partir deste ponto a relação entre os valores de absorvância diminui, mostrando que o equilíbrio é deslocado para a formação de monômeros novamente (Figura 16).

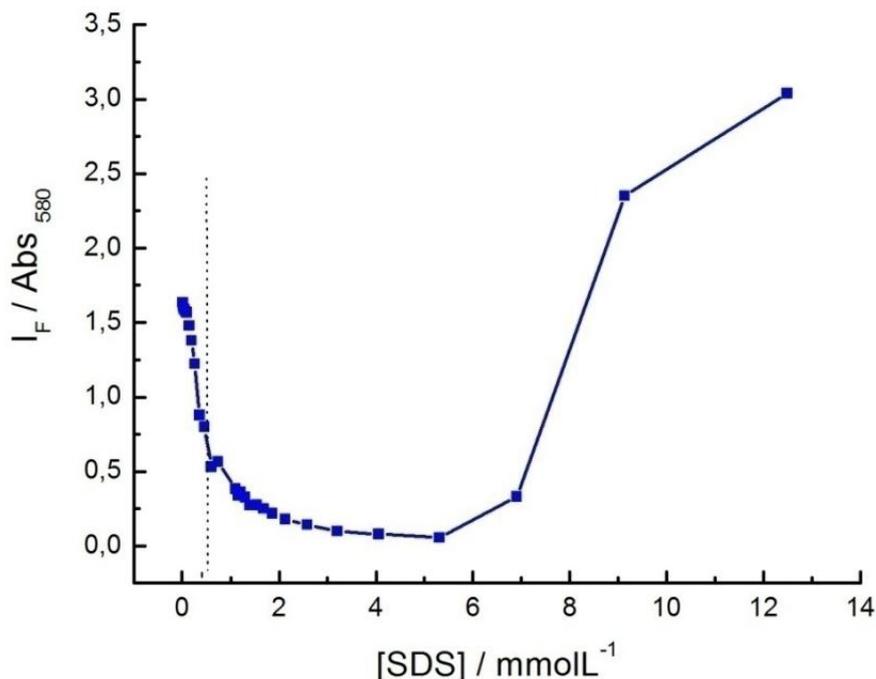


Figura 17 - Intensidade de fluorescência integrada dividida pela fração de luz absorvida no comprimento de onda de excitação em função da concentração de SDS ($\lambda_{excitação} = 580\text{nm}$). A linha preta indica a cmc do SDS nesta solução de azul de metileno, $[AM] = 8 \mu\text{molL}^{-1}$.

Paralelamente, a emissão de fluorescência dessa solução também foi monitorada (Figura 17). É observado que quando a razão dímero/monômero aumenta a intensidade de emissão dividida pela fração de luz absorvida diminui, indicando a presença de dímeros. Estes dímeros são provavelmente do tipo H, que não são fluorescentes e tem máximo de absorção deslocado para a região azul do espectro. [Bergmann and O’Konski, 1963; Rabinowitch and Epstein, 1941]. Em altas concentrações de SDS, praticamente todas as moléculas de azul de metileno estão ligadas às micelas. Porque há um grande excesso de micelas em relação às moléculas de azul de metileno, os dímeros são desfavorecidos pela distribuição de monômeros em diferentes micelas estabilizados pela formação de par-iônico SDS-AM. Em concentrações intermediárias, as moléculas de azul de metileno são também fortemente atraídas às micelas. Por causa do pequeno volume da pseudo-

fase micelar nessas condições, uma maior concentração local de azul de metileno é induzida e a formação de dímeros é maximizada.

Com esses resultados foi possível aplicar um modelo que ajuda a prever qualitativamente a variação das concentrações de monômeros e dímeros em função da concentração de surfactante.

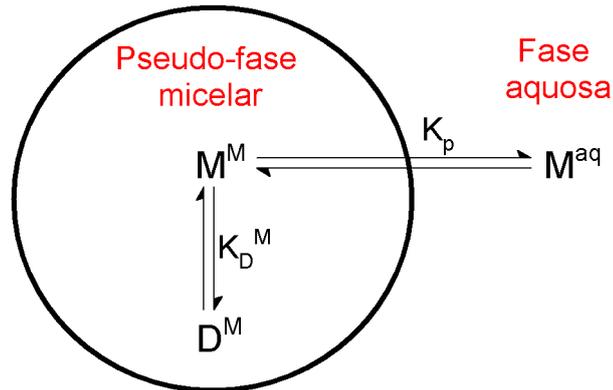


Figura 18 – Modelo da pseudo-fase para a ligação e dimerização do azul de metileno em soluções micelares. M e D representam os monômeros e dímeros, respectivamente. Os sobrescritos M e aq representam a pseudo-fase micelar e a fase aquosa, K_D^M é a constante de dimerização e K_p a constante de partição.

As equações que descrevem esse equilíbrio são o balanço de massa (equação 11), a relação entre concentração micelar local e a concentração analítica de cada espécie envolvida (equação 12), a constante de equilíbrio de partição (equação 13), e a constante de dimerização na fase micelar.

$$C_T = [M^{aq}] + [M^M] + 2[D^M] \quad (12)$$

Onde C_T é a concentração total de azul de metileno e os sobrescritos M e aq indicam a pseudo-fase micelar e a fase aquosa, respectivamente.

$$[X_{micela}] = \frac{[X_{analitica}]}{C_D V} \quad (13)$$

Onde $[X_{analitica}]$ é a concentração de X calculada por medidas de absorção, $[X_{micela}]$ é concentração local na pseudo-fase micelar, C_D é a concentração de

surfactante micelizado ($[\text{SDS}] - \text{cmc}$) e V é o volume molar da micela ($0,39 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ para o SDS).

$$K_P = \frac{([M^M] + 2[D^M])/C_D V}{[M^{aq}]} \quad (14)$$

$$K_D^M = \frac{[D^M]/C_D V}{([M^M]/C_D V)^2} = \frac{[D^M]C_D V}{[M^M]^2} \quad (15)$$

Em condições onde a relação dímero/monômero diminui a relação de concentração entre SDS e AM é de cerca de 10^2 - 10^3 . Considerando a forte interação entre AM/SDS, pode-se assumir que nesta condição todas as moléculas de AM estão na pseudo-fase micelar, conseqüentemente, as concentrações de monômeros e dímeros obtidas nos espectros de absorção são suas respectivas concentrações na pseudo-fase micelar. Com a equação 14 foi possível calcular o K_D^M ($295 \text{ mol}^{-1}\text{L}$) que é cerca de 10 vezes menor que a dimerização em água ($K_D=3,8 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{L}$). O decréscimo no K_D é resultado da decomposição distinta de forças na micela: i) menor interação hidrofóbica entre as moléculas do corante no ambiente micelar comparado com a interação hidrofóbica em água; ii) estabilidade do par iônico AM/SDS desfavorecendo a agregação. Com este modelo, o aumento na concentração de dímeros em soluções micelares é explicado somente pelo volume muito menor da pseudo-fase micelar em baixas concentrações de SDS. A constante de partição foi calculada como sendo $2,5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L}$, que é compatível com a forte interação SDS/AM. Utilizando-se esses valores para as constantes, as concentrações M^{aq} , M^M e D^M foram calculadas em função da concentração de SDS micelizado ($[\text{SDS}]-\text{cmc}$) [Figura 19].

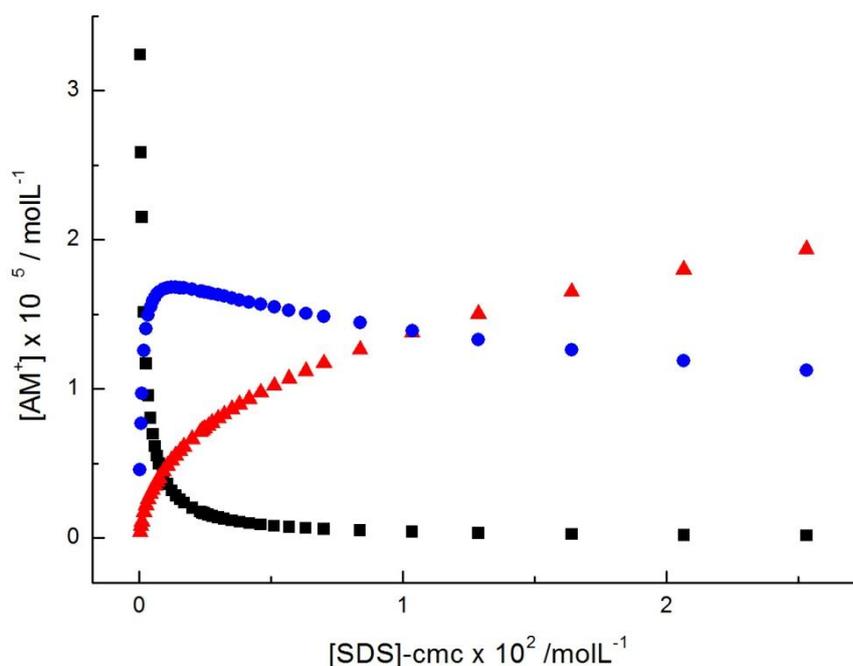


Figura 19 – Concentração dos dímeros na pseudo-fase micelar (●), dos monômeros na fase micelar (▲) e dos monômeros em solução (■) em função da concentração de SDS micelizado ($C_D=[\text{SDS}]-\text{cmc}$). Os valores de D^M , M^M e M^{aq} foram obtidos das equações 13 e 14.

Pode ser observado que em baixas concentrações de SDS o modelo prediz um decréscimo na concentração de monômeros em solução (M^{aq}) com um aumento das concentrações de dímeros e de monômeros na pseudo-fase micelar. Enquanto a concentração de M^M aumenta de forma hiperbólica, a concentração de D^M alcança um máximo e depois decai. Estes comportamentos corroboram qualitativamente com aqueles que foram observados experimentalmente (Figura 16).

Conhecendo-se o efeito do SDS na dimerização do azul de metileno, foram realizados estudos sobre a modulação das propriedades fotoquímicas do azul de metileno. Os intermediários fotoquímicos formados pela excitação do azul de metileno por um pulso laser em 532 nm foram monitorados por fotólise de relâmpago a laser. Transientes foram obtidos de soluções de $30 \mu\text{molL}^{-1}$ de azul de metileno na presença de 1 e 50mmolL^{-1} de SDS, ou seja, em soluções onde só há a presença

de dímeros e monômeros, respectivamente, num intervalo de comprimento de onda de emissão de 300 a 700 nm.

Na Figura 20-A são mostrados os espectros transientes obtidos para a solução de $30\mu\text{molL}^{-1}$ de azul de metileno na presença de excesso de micelas (50mmolL^{-1} de SDS) obtidos em 0,1; 1; 4 e 14 μs depois do pulso de laser. Pode-se notar que existe um máximo em 420 nm. Este transiente já havia sido caracterizado na literatura como sendo o tripleto do azul de metileno [Kato et al., 1964, Danziger et al., 1967, Nilsson et al., 1972].

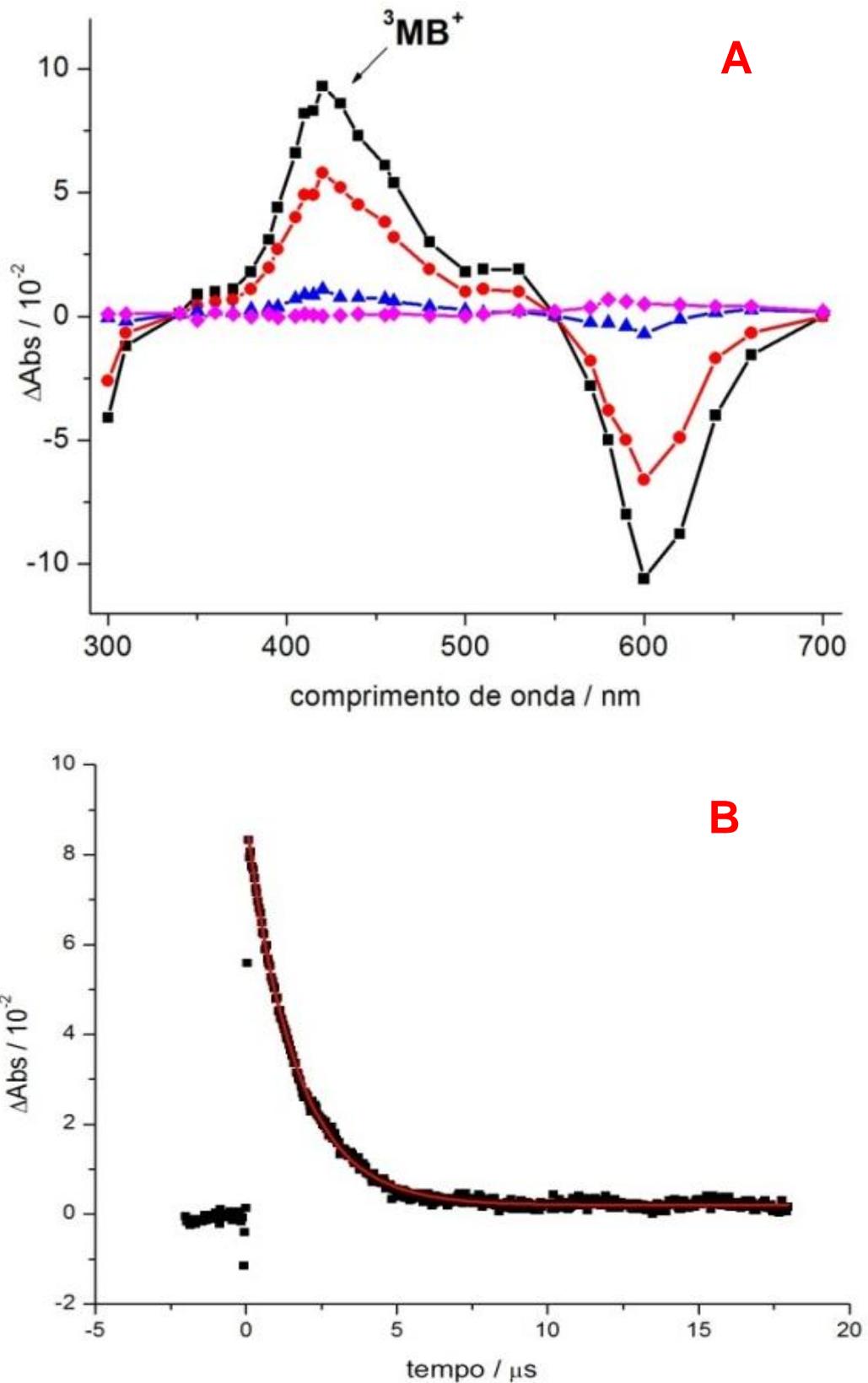


Figura 20 – A) Variação da absorção do azul de metileno contendo 50 mmolL^{-1} de SDS em função do comprimento de onda obtidos em 0,1(■), 1(●), 4(▲) e 14(◆) μs depois do pulso de laser. Excitação em 532 nm , $[\text{AM}]=30 \mu\text{molL}^{-1}$. **B)** Variação de ΔAbs em função do tempo medido em 420 nm , tempo de vida calculado, $\tau=1,6\mu\text{s}$.

O tempo de vida da espécie triplete ($1,6 \mu\text{s}$) foi calculado com o sinal do transiente ($\Delta\text{Abs} \times \text{tempo}$) obtido para essa solução em 420 nm (Figura 20-B), que corrobora com aquele já reportado na literatura [Kato et al., 1964, Danziger et al., 1967, Nilsson et al., 1972].

Esses resultados são compatíveis com o principal processo de desativação de tripletes de azul de metileno, que é a colisão difusional com o oxigênio formando o oxigênio singlete. Em soluções com altas concentrações de micelas, o azul de metileno tem comportamento muito semelhante àquele observado em soluções isotrópicas, ou seja, tem uma alta eficiência de geração de espécies tripletes que geram também eficientemente o oxigênio singlete. Ou seja, o principal mecanismo fotoquímico exercido pelo azul de metileno nessas condições é o tipo II, onde a energia do triplete é transferida ao oxigênio, formando oxigênio singlete.

A Figura 21-A mostra os espectros transientes obtidos de solução de azul de metileno na presença de baixa concentração de micelas de SDS (1 mmolL^{-1}) obtidos em 0,035; 0,15; 1; 2; 7 e 15 μs depois do pulso de laser.

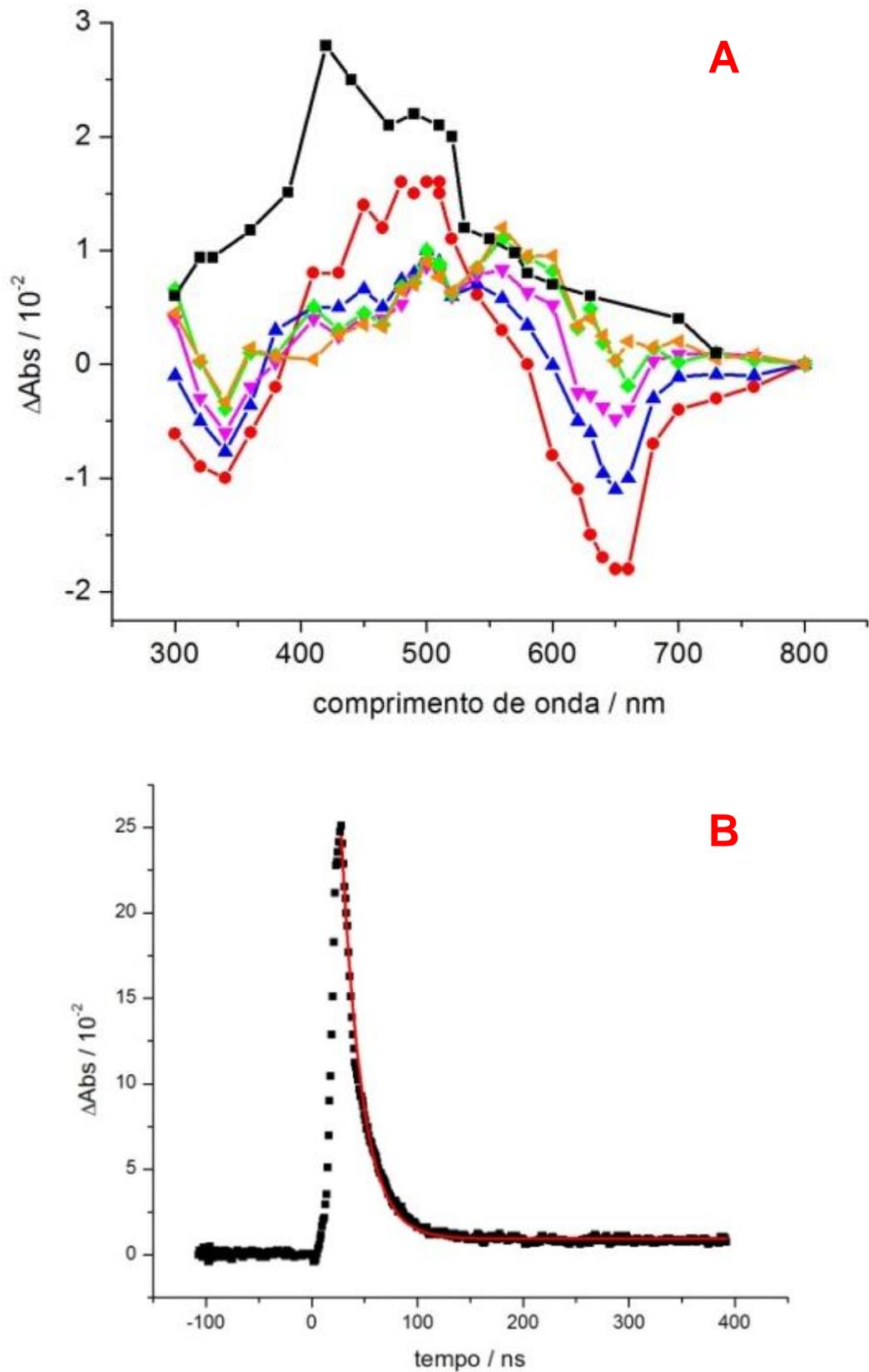


Figura 21 – A) Variação da absorção do azul de metileno contendo 1 mmolL^{-1} de SDS em função do comprimento de onda medidos em 0,035(■), 0,15(●), 1(▲), 2(▼), 7(◆) e 15(◄) μs depois do pulso de laser. Excitação em 532 nm, $[\text{AM}]=30 \mu\text{molL}^{-1}$. **B)** Variação de ΔAbs em função do tempo medido em 420 nm, tempo de vida calculado, $\tau = 40 \text{ ns}$.

O espectro transiente obtido de soluções contendo 1 mmolL^{-1} de SDS (Figura 21-B) é diferente daquele observado para soluções com excesso de micelas de SDS (Figura 20-A). No primeiro transiente obtido 35 ns após o pulso de laser observa-se a presença do triplete do azul de metileno com pico de absorção em 420 nm como também outra espécie com pico de absorção em 500 nm (o radical semi-reduzido), ambas já descritas na literatura [Kato et al., 1964; Danziger et al., 1967; Nilsson et al., 1972]. A espécie que absorve em aproximadamente em 500 nm é o radical semi-reduzido do AM (AM^\bullet).

A absorção do triplete desaparece em escala de nanosegundos após o pulso do laser, $\tau \sim 40 \text{ ns}$ como é mostrada na Figura 21 - B, que é muito mais rápido do que o tempo de vida medido em soluções com excesso de SDS ($\tau \sim 1,6 \mu\text{s}$) (Figura 20-B). A partir de $1 \mu\text{s}$ após o pulso do laser (Figura 21-A – linha azul) observa-se apenas o sinal de absorção devido ao radical semi-reduzido do azul de metileno. O AM^\bullet decai com um tempo de vida de aproximadamente $1,6 \mu\text{s}$, que também é compatível com um mecanismo de desativação pelo oxigênio formando ânion superóxido. Nesses experimentos somente os dímeros no estado fundamental estão sendo excitados (em 532 nm, o coeficiente de absorvidade molar do dímero é cerca de 3 vezes maior que o do monômero e o dímero está em excesso de 4 para 1). Desta forma, é possível que a origem do AM^\bullet seja devido à transferência de elétron entre os monômeros da espécie dimérica do AM.

Diversas evidências para esse mecanismo foram obtidas, entre elas foram realizados experimentos de excitação do dímero de azul de metileno na ausência e na presença de oxigênio (Figura 22). É possível observar que em 420 nm (Figura 22-A) o transiente é independente da presença de oxigênio, que é compatível com a rápida desativação por transferência de elétron. O transiente, de AM^\bullet , em 530 nm é

dependente da concentração de oxigênio. O seu tempo de vida em equilíbrio com o ar é 4 vezes menor que o tempo de vida em atmosfera de nitrogênio (Figura 22 - B), que está de acordo com o mecanismo de supressão por oxigênio. Por causa da supressão do radical do azul de metileno por oxigênio ser um processo eficiente, não é permitida a transferência de elétron quantitativa entre o par redox formado ($AM^{2+\bullet}$ e AM^\bullet). A presença do radical semioxidado $AM^{2+\bullet}$ foi comprovada através da reatividade com agentes redutores [Junqueira et al., 2002]. Deste modo, pudemos construir um esquema fotoquímico de reações do azul de metileno, quando está na forma monomérica e dimérica (Figura 23).

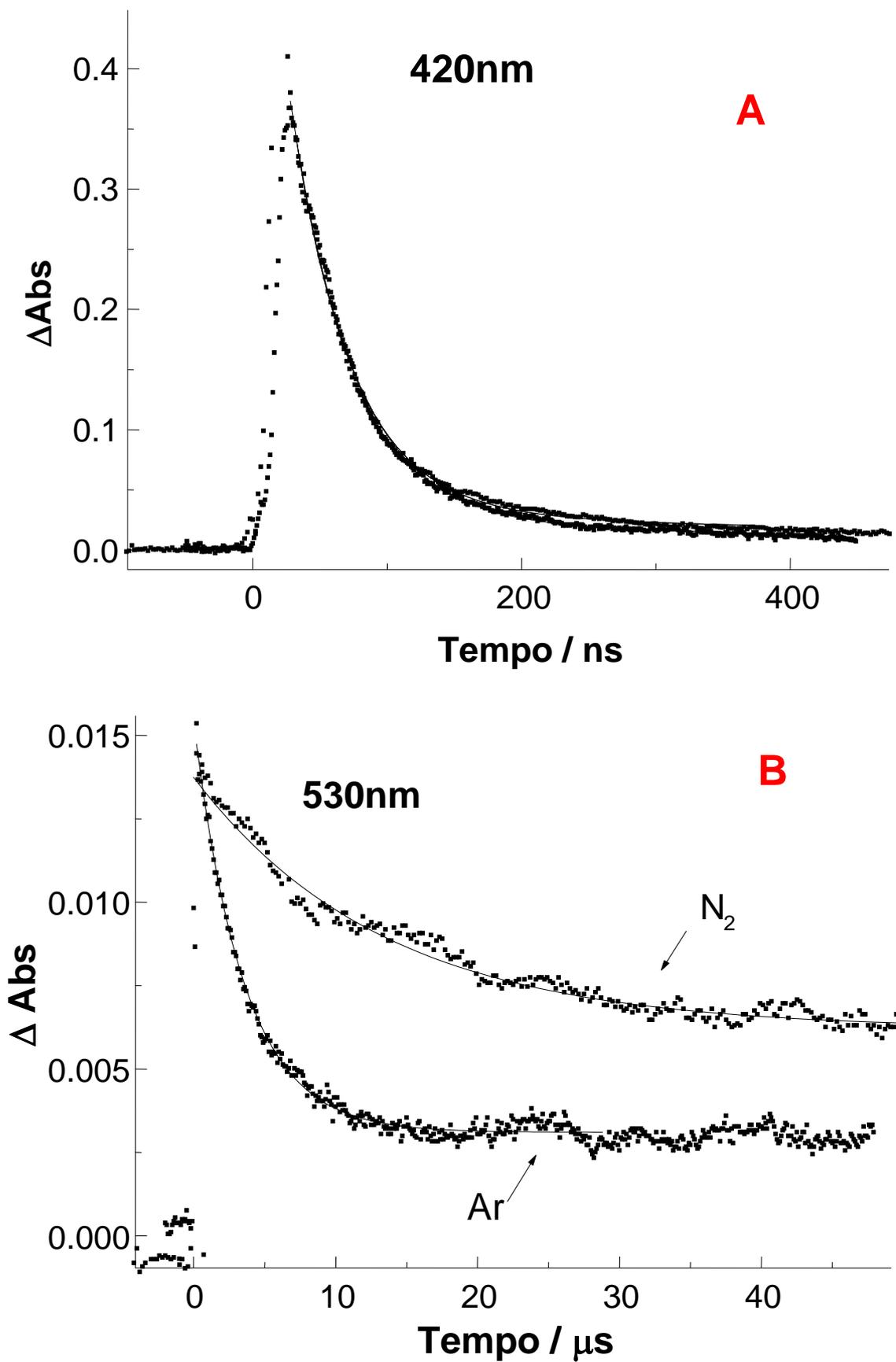


Figura 22 – Variação de ΔAbs em função do tempo em (A) 420 nm e (B) 530 nm em solução de SDS em equilíbrio com o ar e purgado com nitrogênio. $[\text{AM}] = 30 \mu\text{molL}^{-1}$ e $[\text{SDS}] = 1 \text{mmolL}^{-1}$.

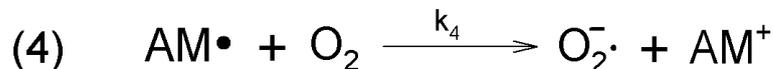
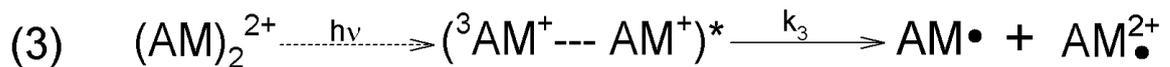
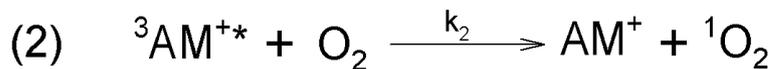
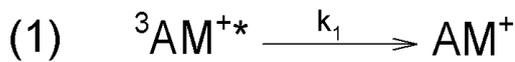
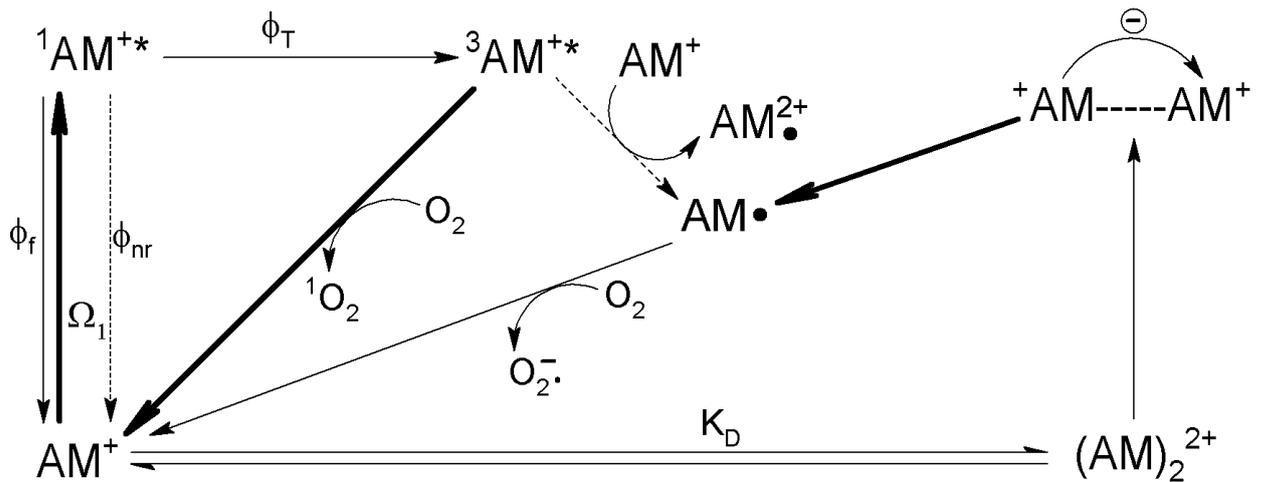


Figura 23 – Esquema das reações fotoquímicas do azul de metileno. AM^+ , ${}^1\text{AM}^{+*}$, ${}^3\text{AM}^{+*}$ são azul de metileno no estado fundamental, no singlete excitado e triplete excitado, respectivamente; $\text{AM}\bullet$ e $\text{AM}_2^{\bullet+}$ são radicais do azul de metileno semi-reduzido e semi-oxidado, respectivamente; Ω_1 é absorção da luz, ϕ_f , ϕ_{nr} , ϕ_T são rendimentos quânticos de fluorescência, não-radiativo e triplete, respectivamente. As reações representam: (1) o decaimento espontâneo do ${}^3\text{AM}^{+*}$, (2) reação do ${}^3\text{AM}^{+*}$ com oxigênio molecular, (3) supressão redox depois da excitação do dímero no estado fundamental, (4) oxidação do $\text{AM}\bullet$ pelo oxigênio molecular retornando ao estado fundamental e gerando radical superóxido e (5) dimerização do AM^+ no estado fundamental.

O mecanismo fotoquímico indica que a produção de oxigênio singlete deve se aproximar de zero em condições onde o equilíbrio monômero-dímero está deslocado para o dímero na pseudo-fase micelar. Assim medidas de emissão de luz em 1270 nm, que é característica espectroscópica do oxigênio singlete foram realizadas em função da concentração de SDS (Figura 24).

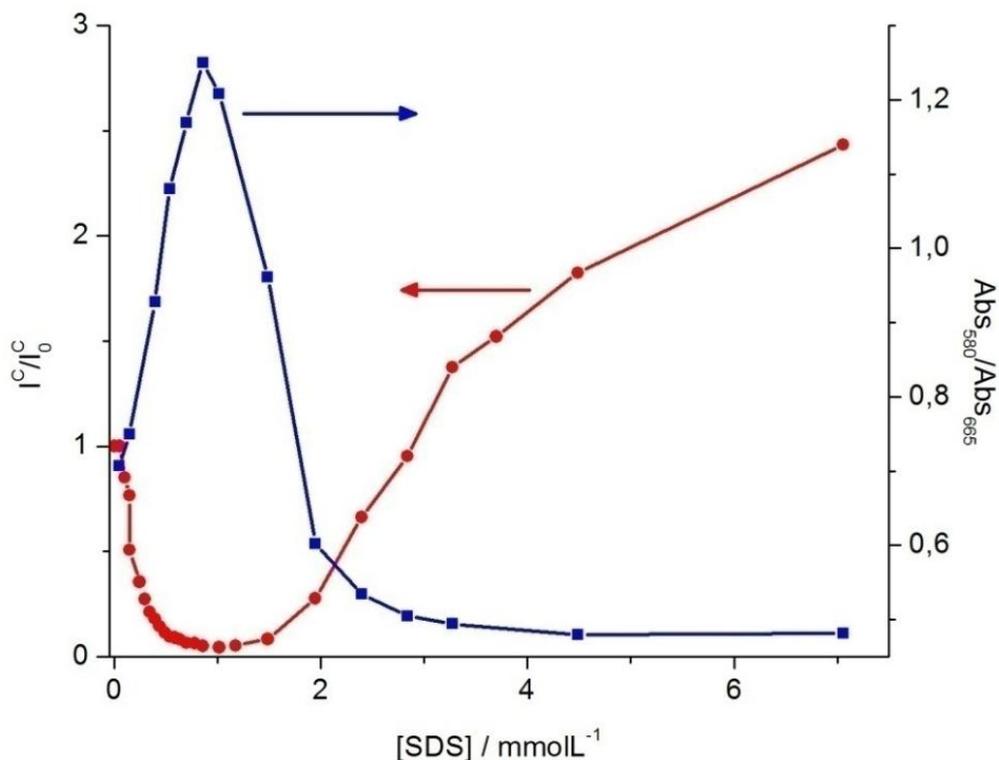


Figura 24 - Eixo esquerdo: Intensidade relativa de emissão em 1270 nm em função da concentração de SDS. I^c é a intensidade de emissão em 1270 nm dividida pela fração de luz absorvida em 532 nm na presença de SDS e I^0 na ausência de SDS. Eixo direito: Absorbância do azul de metileno em 580 nm dividida pela absorvância em 665 nm em função da concentração de SDS. $[AM]=30 \mu\text{molL}^{-1}$ em D_2O , $\lambda_{exc}=532 \text{ nm}$, 15 mJ/pulso.

Com o aumento da concentração de SDS a intensidade de emissão do 1O_2 diminui até uma concentração que corresponde à quantidade máxima de dímeros, comprovando a diminuição da geração de 1O_2 pelo equilíbrio monômero-dímero e a alteração nos processos de transferência de elétron e de energia para o O_2 de acordo com o esquema da Figura 23. Acima dessa concentração, a emissão de luz aumenta à medida que a concentração de dímeros diminui com o aumento da concentração de micelas presentes em solução. Em altas concentrações de SDS a emissão do oxigênio singlete é maior que a emissão observada em água por causa do aumento da formação de triplete e aumento da concentração de oxigênio dissolvido em 50 mmolL^{-1} de SDS quando comparada com água. Esse experimento mostra que a eficiência de geração de oxigênio singlete pelo azul de metileno pode

ser modulada pela presença da quantidade certa de micelas de SDS e de azul de metileno.

As propriedades do estado fundamental e excitado do AM também foram estudadas em soluções de vesículas carregadas negativamente, de micelas normais e reversas e de cloreto de sódio (Figura 25). É possível observar em todos os sistemas investigados que com o aumento da concentração de dímeros (aumento de Abs_{580}/Abs_{665}) há uma diminuição da intensidade de fluorescência, sugerindo que dímeros tipo H são formados em todos os casos. Porém há diferenças no decaimento da fluorescência para cada caso. Pode-se notar que a intensidade de fluorescência diminui na seguinte ordem: micela reversa > sal > vesículas > micela normal.

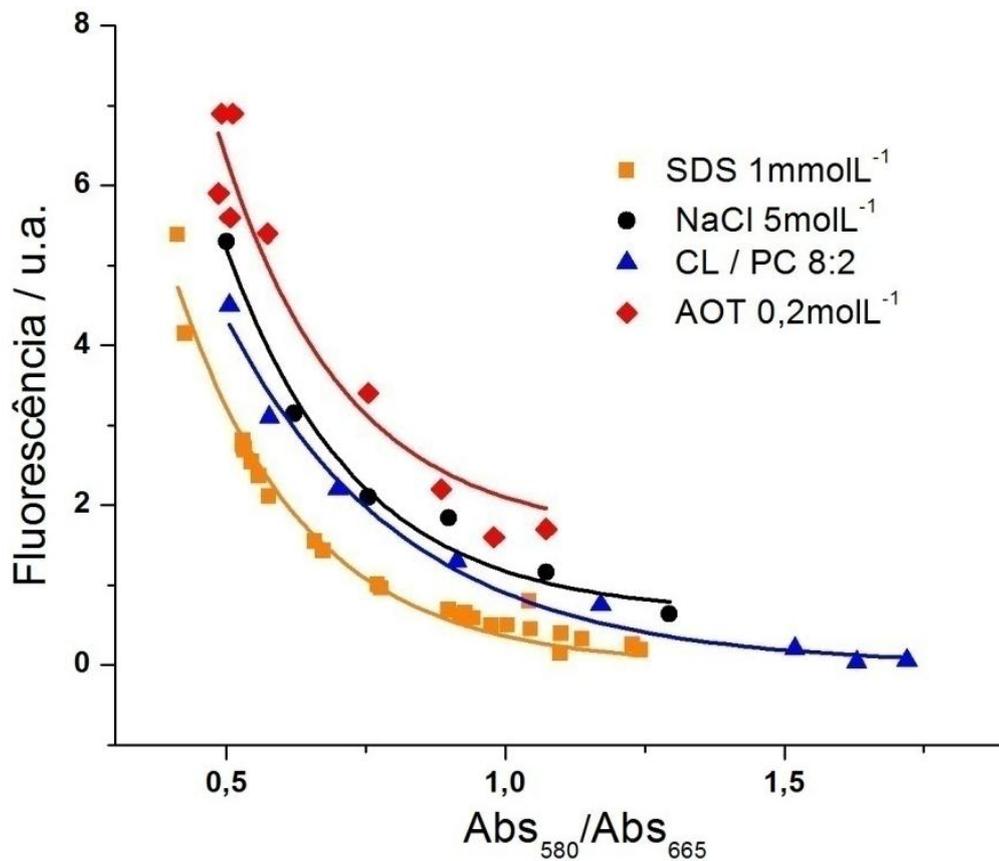


Figura 25 – Intensidade de fluorescência em função da razão dímero/monômero em diferentes meios: (■) micela normal de SDS 1 mmolL⁻¹, (●) NaCl 5 molL⁻¹, (▲) vesículas de cardiolipina/lecitina, 8:2 e (◆) micela reversa de AOT 0,2 molL⁻¹. [AM] = 30 μmolL⁻¹.

Vale notar que a variação da intensidade de fluorescência em função da relação dímero/monômero deve ter a interferência de diversos fatores, incluindo sobreposições espectrais diferentes entre monômeros e dímeros gerados em cada interface e diferentes coeficientes de absorvidade molar. O resultado mostra que os dímeros nas micelas normais de SDS devem ter uma configuração na qual a fluorescência seja suprimida mais eficientemente que nos outros casos, provavelmente pelo maior favorecimento na supressão do singlete.

Para estudar os tipos de dímeros foram obtidos espectros de espalhamento de luz ressonante (ELR) de soluções de AM em diversos meios (Figura 26). Na presença de micelas de SDS na condição em que os dímeros estão presentes (2 mmolL^{-1}) observa-se um espectro ressonante, que não existe para o caso onde há excesso de micelas (30 mmolL^{-1} de SDS). Esse fato indica que somente em casos onde há dímeros é possível observar o espectro ELR.

A forma do espectro ELR é dependente de diversos fatores como o ângulo e a distância entre os monômeros e o tamanho dos agregados. Observamos na Figura 26 que ambos os espectros apresentam deslocamento para a região azul quando comparados com o comprimento de onda de máxima absorção dos monômeros (664 nm) indicando a presença de dímeros tipo H de acordo com os resultados mostrados anteriormente. Também nota-se que há diferença nos espectros obtidos em micelas normais e micelas reversas. O espectro obtido em SDS está deslocado para comprimentos de onda maiores (região do vermelho) em relação ao espectro obtido em micela reversa (AOT). Essas diferenças no máximo do espectro ELR devem ser pelas diferentes estruturas dos dímeros e pelos diferentes tamanhos de agregados formados em cada caso.

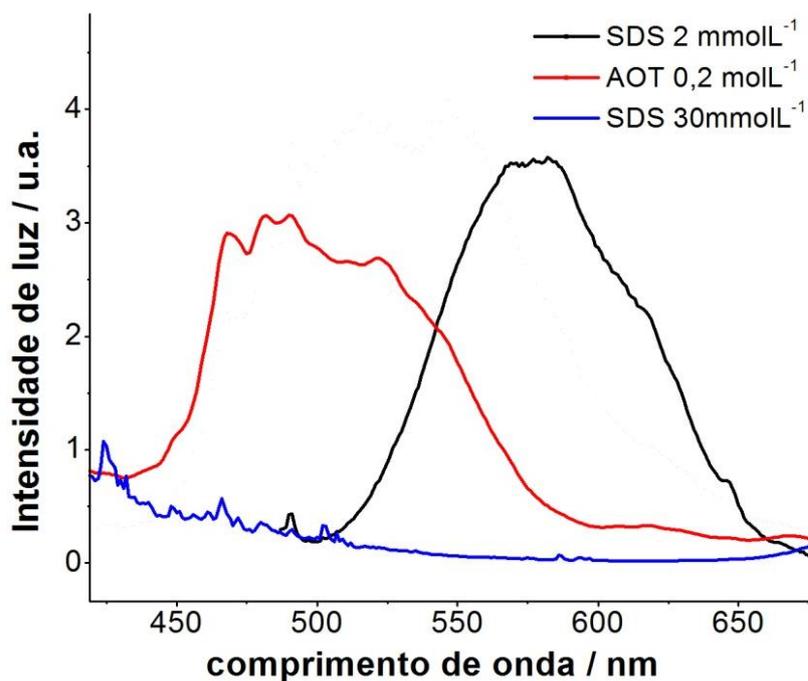


Figura 26 – Espectros ressonantes de luz para soluções de AM em SDS 2mmolL⁻¹ (preto); SDS 30mmolL⁻¹ (azul) e AOT 0,2 molL⁻¹ (vermelho). [AM]= 50μmolL⁻¹.

Como esses espectros ELR são similares aos espectros de absorção e como não há informações sobre formação de agregados maiores que dímeros, pois não há espalhamento clássico de luz [Lee et al.; 1999], concluímos que a diferença nos espectros ressonantes é devido às diferentes formas dos dímeros.

Para investigar com maiores detalhes as propriedades fotoquímicas dos dímeros de AM foram realizados experimentos de emissão de luz em 1270 nm (característico do ¹O₂) nos dois sistemas estudados: micelas de SDS e micelas reversas de AOT (Figura 27).

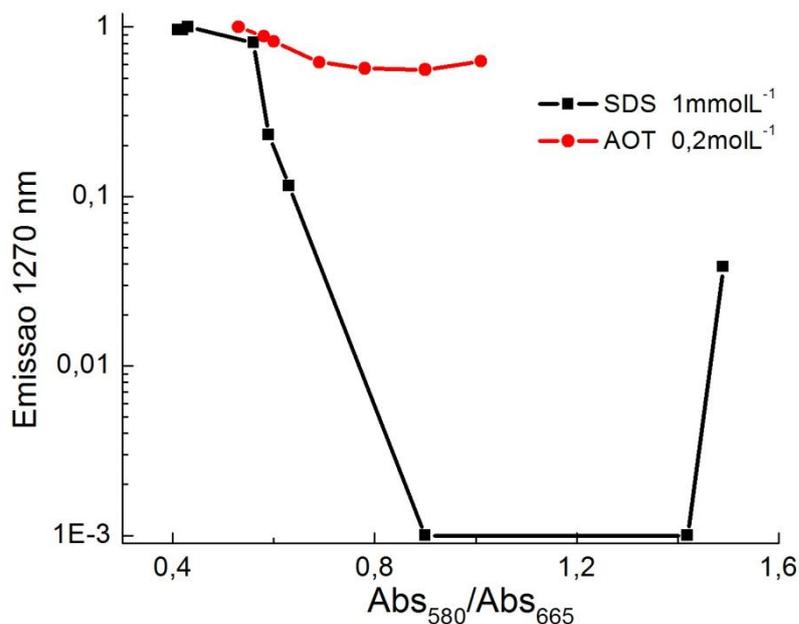


Figura 27 – Intensidade de emissão do oxigênio singlete em 1270 nm em função da razão dímero/monômero em diferentes meios: (■) micela normal de SDS 1 mmolL⁻¹ (●) micela reversa de AOT 0,2 molL⁻¹.

Na Figura 27 é possível notar que a emissão de luz em 1270 nm referente ao oxigênio singlete é diferente para os dois casos. Em micelas reversas há uma pequena variação na intensidade de emissão quando aumenta a concentração de dímeros, indicando que o triplete gerado nessas condições é capaz de transferir energia ao oxigênio presente em solução formando o oxigênio singlete. Em micelas de SDS há uma diminuição na intensidade de emissão de luz em 1270 nm, aproximando-se de zero quando a relação dímero monômero se aproxima de 1,3, resultado este que está de acordo com o processo de desativação dos tripletes formando as espécies radicalares (AM²⁺ e AM^{*}).

Pode-se concluir que em micelas reversas a excitação de dímeros no estado fundamental leva a formação de espécies tripletes com comportamento semelhante àquele observado quando monômeros são excitados, ou seja, mesmos espectros transientes, tempo de vida do triplete, eficiência de geração de ¹O₂. Em baixas concentrações de micelas de SDS há transferência de elétrons entre os monômeros

gerando os radicais AM^{2+} e AM^{\bullet} . Estas diferenças fotoquímicas podem ser relacionadas com os dados de espectros ELR e fluorescência. Para as micelas reversas, os dímeros induzidos são dímeros superficiais que estão fracamente associados, enquanto que para as micelas de SDS os dímeros apresentam ângulos diferentes entre as espécies monoméricas e se mantêm associados na interface mostrando aumento no rendimento do cruzamento intersistema e reações de transferência de elétrons no estado excitado. Ou seja, o menor rendimento da transferência de elétrons observados para dímeros em micelas reversas de (AOT) comparadas com micelas de SDS e em razões dímero/monômero similares foi relacionado com diferentes tipos de agregados induzidos por cada interface [Severino et al., 2003]. No entanto, não se pode descartar a possível dissociação do dímero no estado excitado como causadora deste fato. Nesta hipótese, dependendo do tipo de interface o dímero poderia se dissociar no estado excitado permitindo a formação de 1O_2 .

O triplete de azul de metileno (AM) sofre equilíbrio de protonação. Em soluções aquosas a cinética deste processo é da ordem de microsegundos e depende do pH. O aumento de tempo de vida do estado triplete em pHs maiores é devido a um equilíbrio ácido-base no estado triplete excitado. O estado triplete é uma base mais forte (pK_a 6,5) do que o estado fundamental (pK_a 1,9) [Tuite; Kelly, 1993]. A forma monocatiônica é a espécie estável no estado fundamental na maioria das condições (Figura 28).

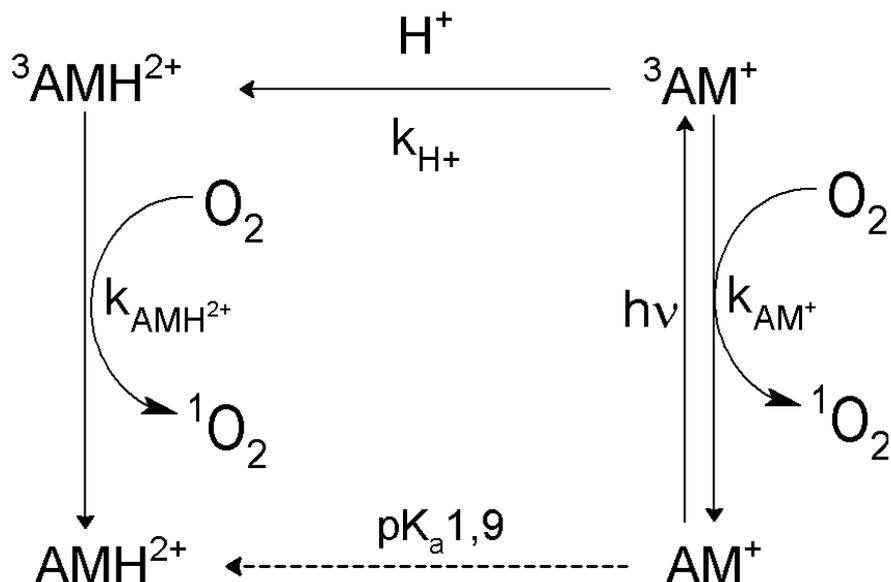


Figura 28 - Equilíbrio de protonação do azul de metileno no estado fundamental e no estado excitado.

As espécies triplete protonada e desprotonada podem ser distinguidas pelos seus espectros além de terem tempos de vida muito diferentes [Haugen; Hardwick, 1963]. O estado triplete é eficientemente suprimido por oxigênio, com constantes de velocidade de $1,3 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{L}$ para o AMH^{2+} e $26 \times 10^8 \text{ mol}^{-1}\text{s}^{-1}\text{L}$ para o AM^+ [Bonneau et al., 1975]. Esta supressão causa o aumento do rendimento de oxigênio singlete de 4 vezes de pH 5 para pH 9 [Bonneau et al., 1975; Pottier et al., 1975]. Esta dependência do rendimento de $^1\text{O}_2$ com o pH pode ser significativa para experimentos de oxidação biológica em diferentes pHs.

Para investigar a possível dissociação do dímero, foram realizados experimentos de fotólise de relâmpago a laser para estudar o equilíbrio de protonação do azul de metileno no estado excitado em algumas interfaces. Inicialmente, foram feitas medidas da absorção do triplete de azul de metileno para soluções em meio ácido (pH 3,8) e em meio básico (pH 10,8) contendo monômeros de azul de metileno. Note que o AM no estado fundamental não apresenta equilíbrio de protonação nesta faixa de pH (Figura 29- A).

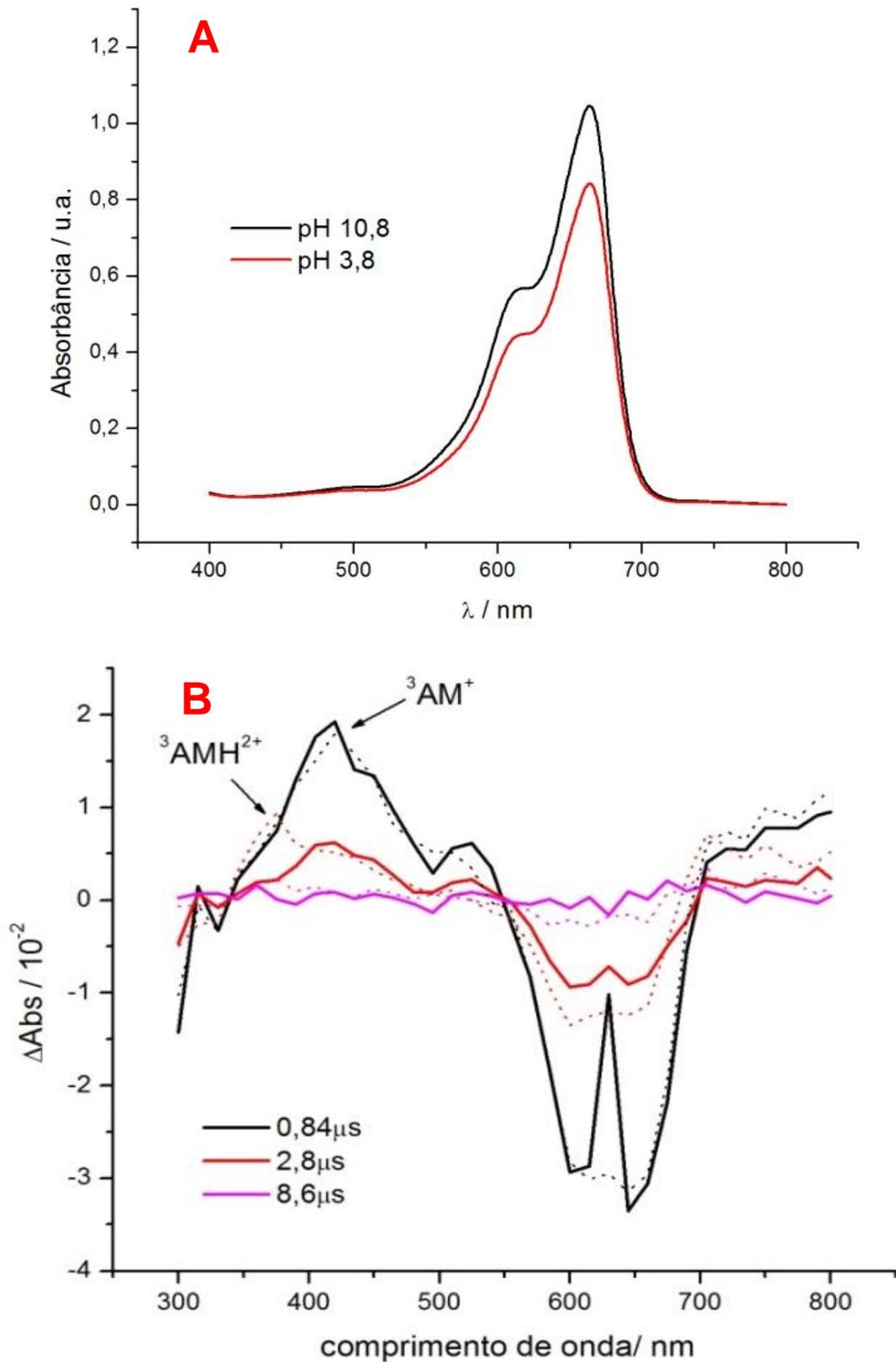


Figura 29 – A) Espectros de absorção das soluções de azul de metileno em pH 3,8 (vermelho) e pH 10,8 (preto), mostrando a presença de monômeros. **B)** Espectros de absorção transiente observados em diferentes tempos após a excitação com pulso de laser da solução de monômeros de azul de metileno em pH 3,8 (linhas pontilhadas) e 10,8 (linhas contínuas). As cores indicam o tempo em μs após o pulso do laser. $\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$; $[\text{AM}]=10 \mu\text{molL}^{-1}$; $[\text{tampão}]=50 \mu\text{molL}^{-1}$.

Logo após o pulso de laser ($0,84 \mu\text{s}$) observa-se o triplete do azul de metileno em ambas as soluções ($\lambda_{\text{max}} = 420 \text{ nm}$) (Figura 29- B). $2,8 \mu\text{s}$ após o pulso do laser é possível observar a presença do triplete protonado na solução de azul de metileno de pH 3,8 ($\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$ – linha pontilhada). Na solução de azul de metileno de pH 10,8 (linha contínua) observa-se apenas a diminuição da absorção do triplete desprotonado. Isto ocorre porque o triplete gerado se torna uma base mais forte do que o AM no estado fundamental. Assim, dependendo do pH da solução o ^3AM é protonado.

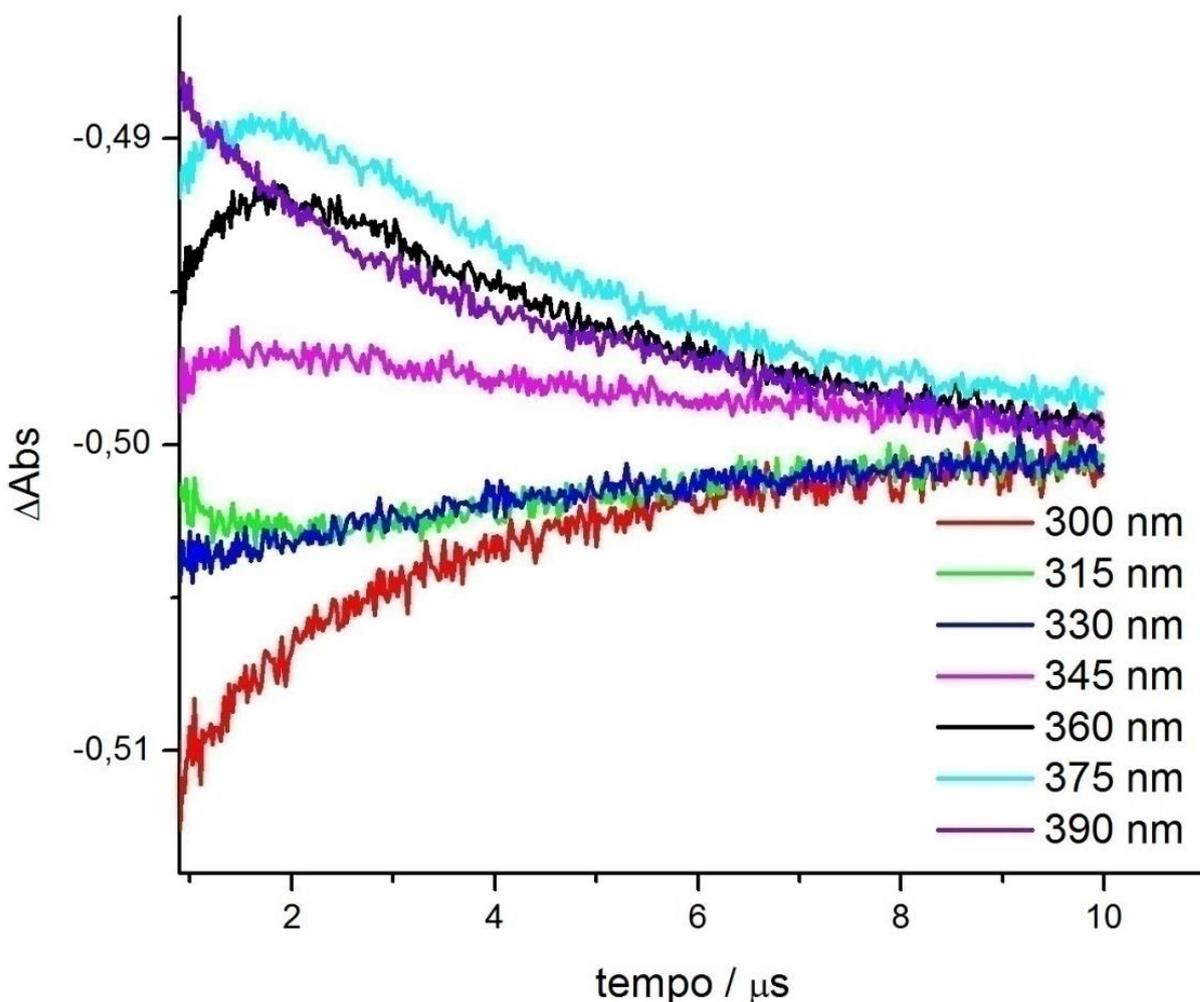


Figura 30 - Transientes obtidos em diferentes comprimentos de onda após excitação com pulso de laser de solução de monômeros de azul de metileno em pH 3,8. $\lambda_{\text{exc}} = 532 \text{ nm}$; $[\text{AM}] = 10 \mu\text{molL}^{-1}$; $[\text{tampão}] = 50 \mu\text{molL}^{-1}$.

Analisando-se os sinais transientes em cada comprimento de onda (Figura 30), percebe-se que em 345, 360 e 375 nm uma nova espécie que está sendo formada (o triplete está sendo protonado), pois o valor da absorbância é máximo somente 1,7 μs após o pulso do laser.

Utilizando a curva obtida em 375 nm, foi calculado a constante de velocidade de protonação do triplete, através da cinética de uma reação de pseudo-primeira ordem em relação ao triplete, considerando excesso de prótons (Figura 31).

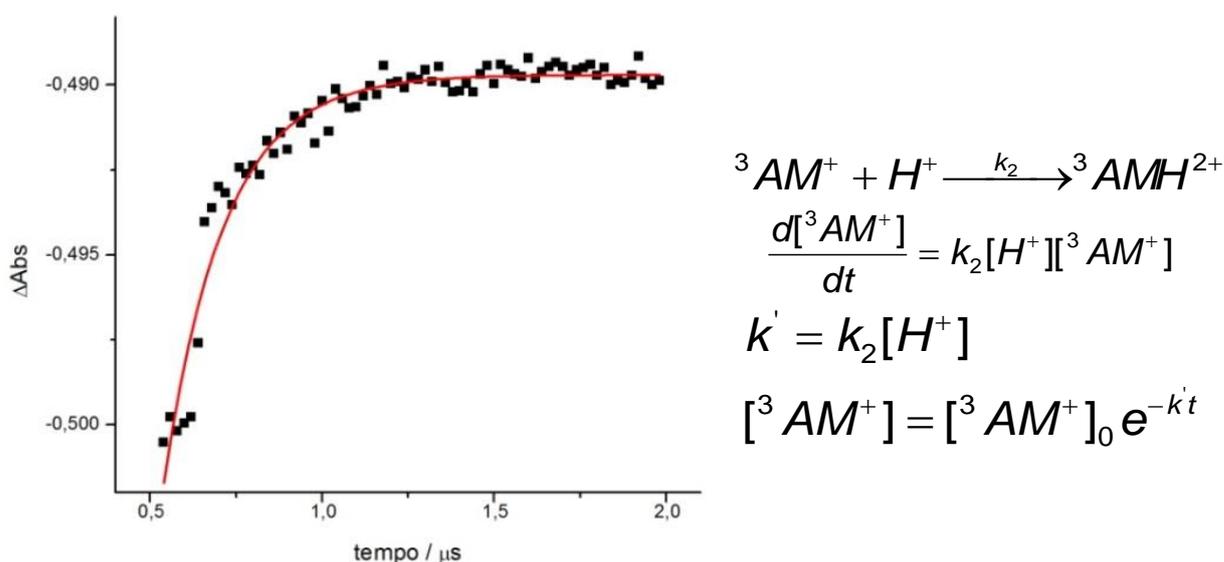


Figura 31 – Transiente obtido em 375 nm da solução de azul de metileno em pH 3,8 após a excitação por pulso de laser. $\lambda_{exc}=532$ nm; $[AM]=10 \mu\text{molL}^{-1}$; $[\text{tampão}]=50\mu\text{molL}^{-1}$.

Ajustando-se os pontos à equação obteve-se uma constante de velocidade de primeira ordem (k') de $5,67 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ e uma constante k_2 de $3,6 \times 10^{10} \text{ s}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$ (Figura 31). Os tempos de vida das espécies protonadas e desprotonadas foram calculados, respectivamente, $4,3 \times 10^{-6} \text{ s}$ e $1,4 \times 10^{-6} \text{ s}$ (Figura 32). O maior tempo de vida da espécie protonada ocorre devido à maior energia do triplete e menor eficiência da reação de transferência de energia ao oxigênio para formar oxigênio singleto [Tuite; Kelly, 1993].

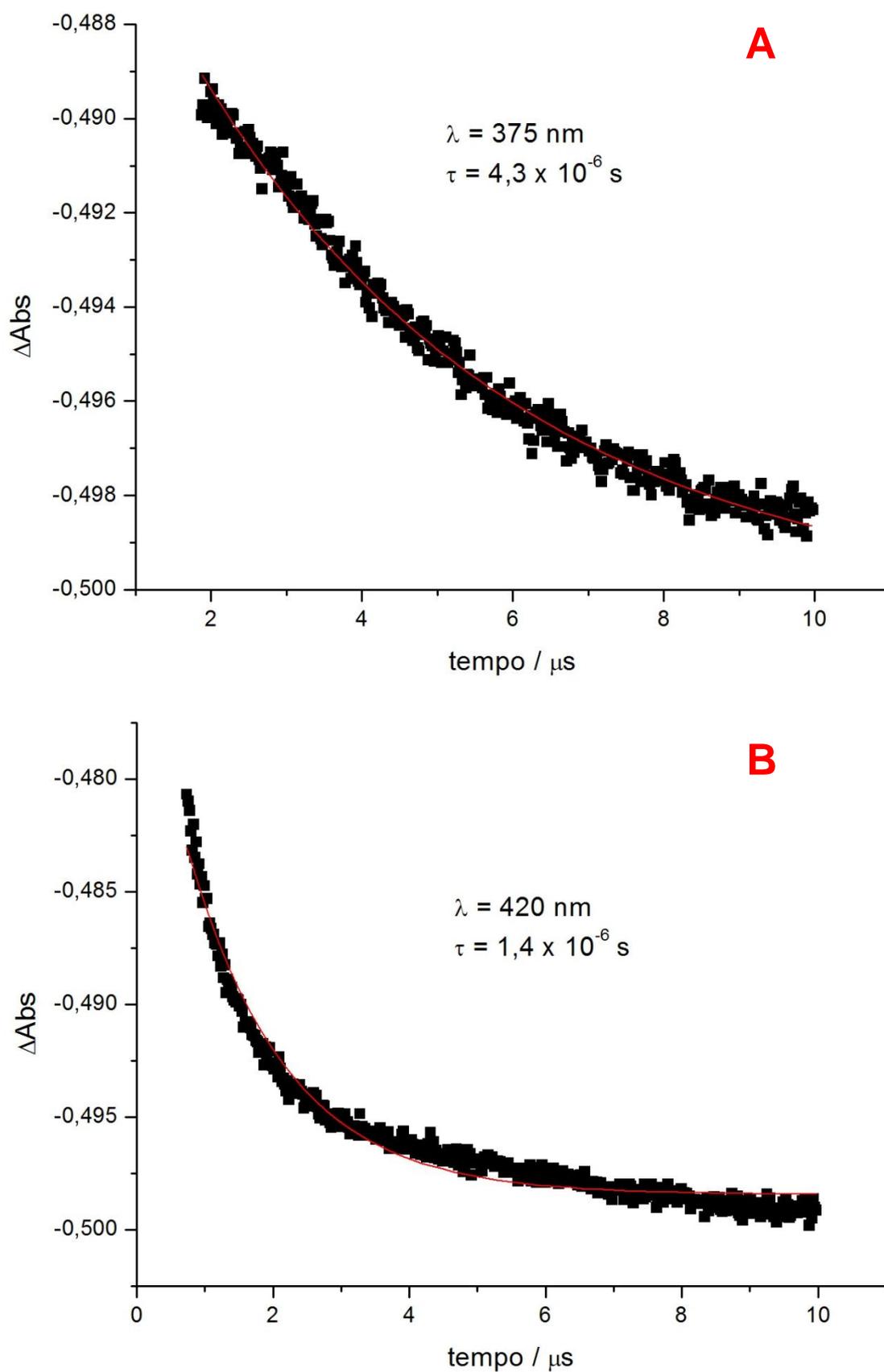


Figura 32 – Transientes obtidos em (A) 375 e (B) 420 nm da solução de azul de metileno em pH 3,8 após a excitação por pulso de laser. $\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$; $[\text{AM}]=10 \mu\text{molL}^{-1}$; $[\text{tampão}]=50\mu\text{molL}^{-1}$.

A caracterização da protonação do triplete obtido a partir da excitação de dímeros de azul de metileno pode ajudar a elucidar se ocorre a dissociação de tripletes no estado excitado. Desta forma, os mesmos experimentos reportados acima foram realizados em soluções com dímeros de azul de metileno, induzidos por NaCl 5M (Figura 33- A). Observa-se no espectro transiente das soluções que continham dímeros (Figura 33- B), que logo após o pulso de laser, forma o triplete do azul de metileno, que absorve em 420 nm, tanto em pH 3,8 quanto em pH 10,8. Depois de 2,8 μ s do pulso do laser, não se formou a espécie protonada em 375 nm como visto na solução de monômeros em meio ácido, sugerindo que o dímero de azul de metileno não é dissociado no estado excitado.

É interessante notar (compare os espectros transientes da solução de monômeros (Figura 29- B) e dímeros (Figura 33- B) que em ambos os casos, existe o triplete de azul de metileno, mas só conseguimos ver a protonação do triplete nas soluções de monômeros, ou seja, conclui-se que o triplete gerado a partir do dímero em NaCl não deve dissociar no estado excitado.

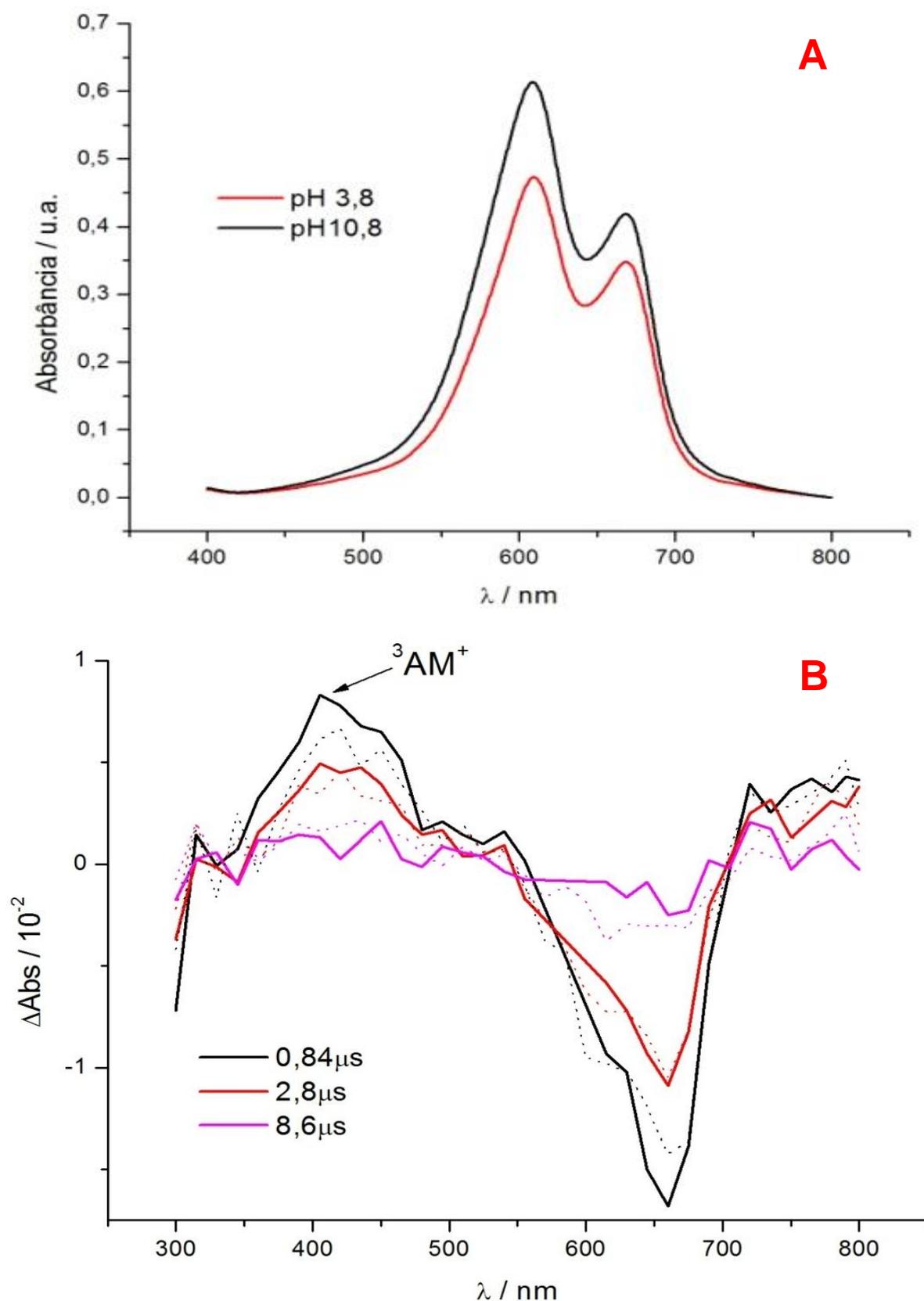


Figura 33 – A) Espectros de absorção das soluções de azul de metileno em pH 3,8 (vermelho) e pH 10,8 (preto), mostrando a presença de dímeros. **B)** Espectros de absorção transiente observados em diferentes tempos após a excitação com pulso de laser da solução de dímeros de azul de metileno induzidos por 5 molL^{-1} de NaCl em pH 3,8 (linhas pontilhadas) e 10,8 (linhas contínuas). As cores indicam o tempo em μ s após o pulso do laser. $\lambda_{exc}=532 \text{ nm}$; $[AM]=10 \mu\text{molL}^{-1}$; $[tampão]=50 \mu\text{molL}^{-1}$.

O mesmo estudo foi realizado em soluções de SDS como intuito de identificar se com os dímeros gerados em SDS há protonação do triplete e se ocorre a dissociação do dímero. Foram obtidos espectros transientes de soluções de monômeros de azul de metileno na presença de SDS (Figura 34).

Pode ser observado pelo espectro de absorção dessas soluções que numa concentração de 12 mmolL^{-1} de SDS existem somente monômeros em solução (Figura 34- A). Estas soluções também foram preparadas em soluções tampão de pH 3,8 e 10,8. Nestas condições, em meio ácido, observou-se o triplete protonado, que absorve em 375 nm e foi observada a espécie triplete somente nas soluções básicas como era esperado. Portanto, mesmo na presença de micelas, o monômero de AM tem o mesmo comportamento no estado excitado que nas outras condições, onde o triplete sofre protonação (Figura 34- B).

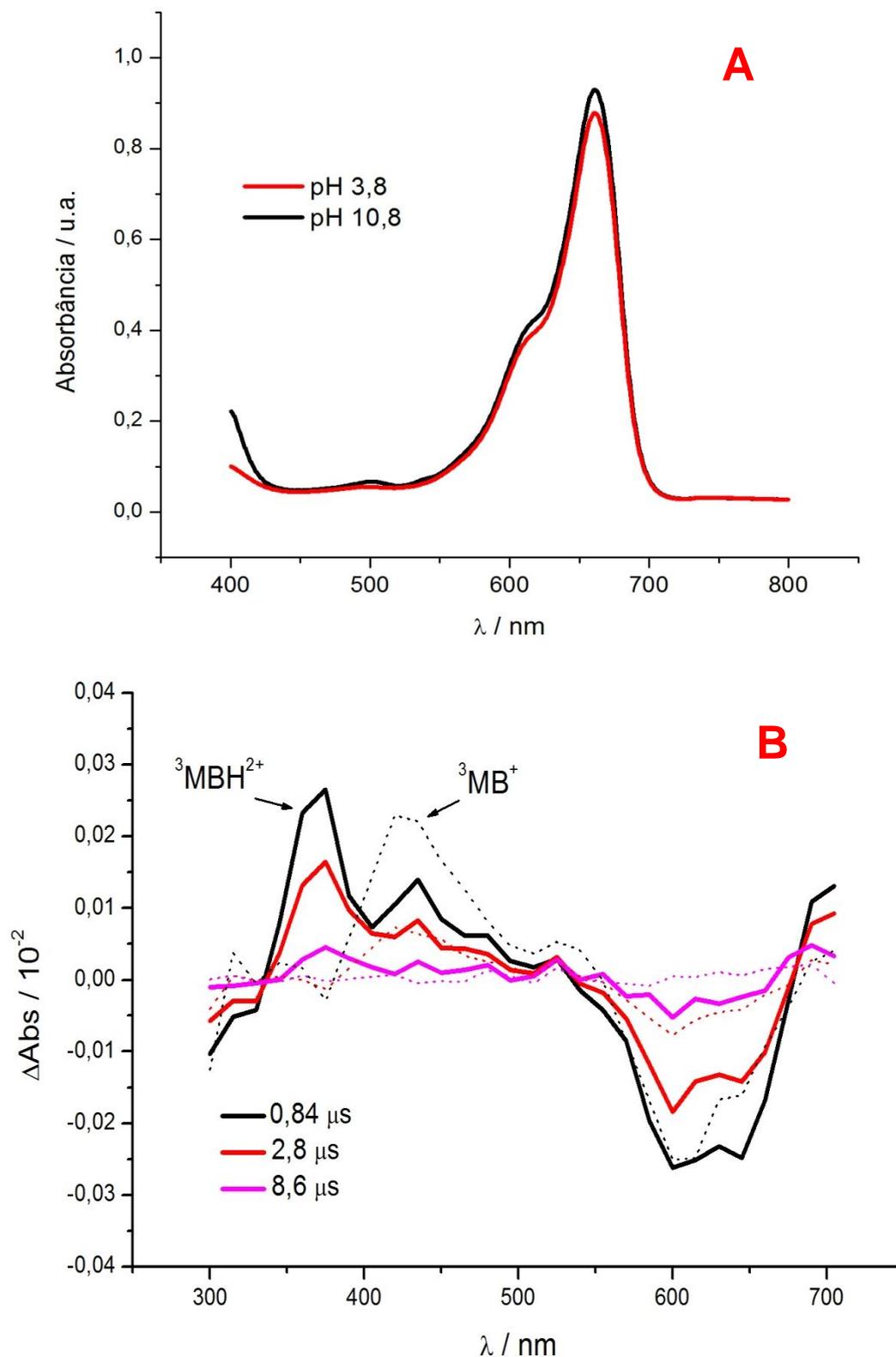


Figura 34 – A) Espectros de absorção de soluções de monômeros de azul de metileno induzidos por 12 mmolL^{-1} de SDS em pH 3,8 (vermelho) e 10,8 (preto). **B)** Espectros de absorção transiente observados em diferentes tempos após a excitação com pulso de laser da solução de monômeros de azul de metileno induzidos por 12 mmolL^{-1} de SDS em pH 3,8 (linhas pontilhadas) e 10,8 (linhas contínuas). As cores indicam o tempo em μs após o pulso do laser. $\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$; $[\text{AM}]=10 \mu\text{molL}^{-1}$; $[\text{tampão}]=50 \mu\text{molL}^{-1}$.

A formação de dímeros de azul de metileno foi induzida por uma solução de SDS 4 mmolL^{-1} . Pode-se notar pelos espectros de absorção que nesta concentração de SDS a espécie predominante na solução é o dímero (Figura 35 - A). Nestas condições em pH 3,8 pôde-se observar as espécies AM^\bullet (500 nm), $\text{AM}^{\bullet 2+}$ (590 nm) e $^3\text{AM}^*$ (405 nm), esta última aparece logo após o pulso de laser e desaparece rapidamente ($0,84 \mu\text{s}$) (Figura 35 - B).

Em pH 10,8 logo após o pulso do laser aparece o triplete e também desaparece rápido. Não foi observado o triplete protonado nas soluções de dímeros de AM, indicando que este tipo de dímero formado em micelas de SDS também não sofre dissociação no estado excitado. Os resultados obtidos no estudo de protonação do triplete no estado excitado mostraram que o dímero no estado excitado não deve dissociar, indicando que as diferenças nas propriedades dos dímeros em diferentes interfaces devem ser devidas à indução de diferentes tipos de dímeros.

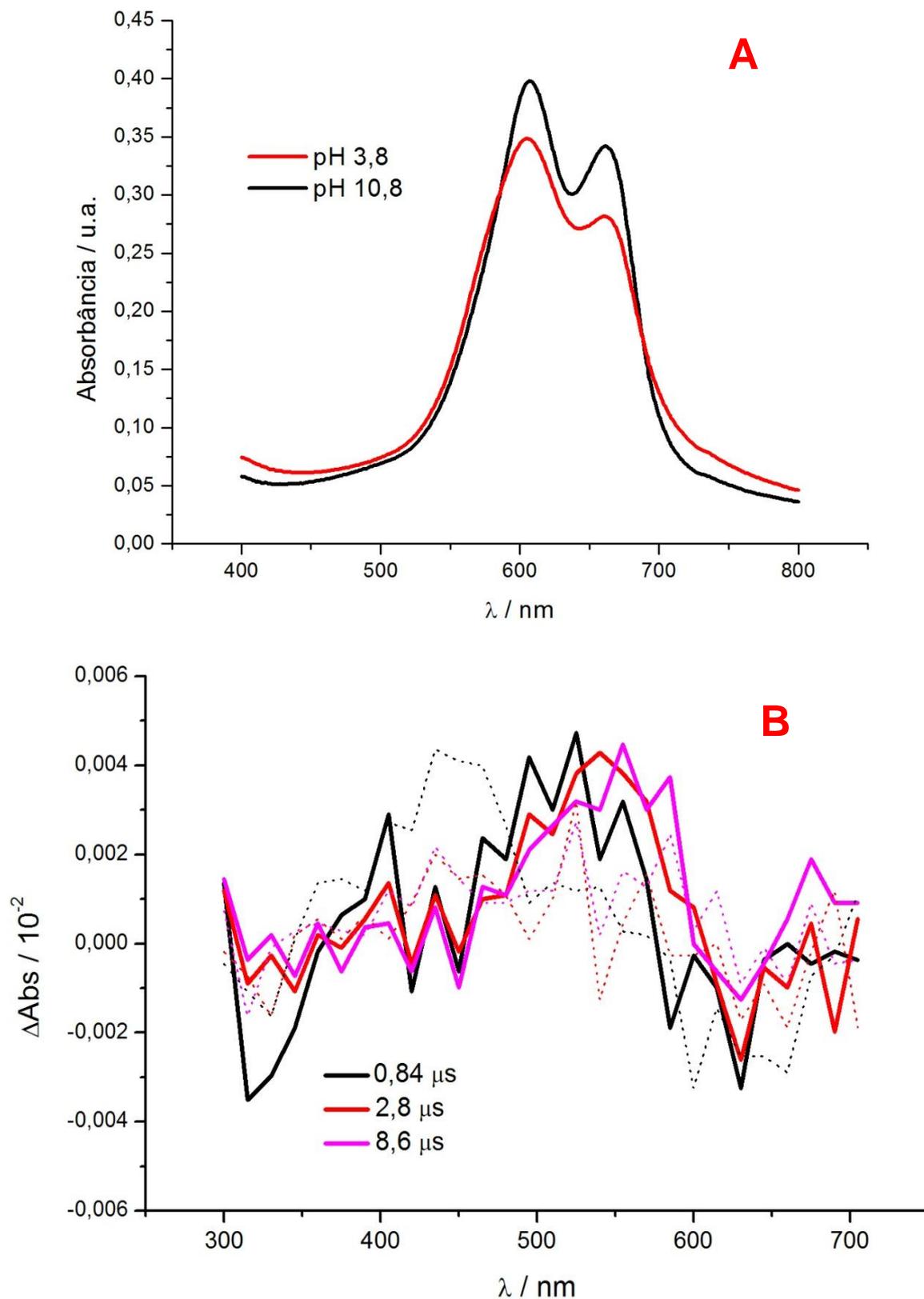


Figura 35 - A) Espectros de absorção de soluções de dímeros de azul de metileno induzidos por 4 mmolL^{-1} de SDS em pH 3,8 (vermelho) e 10,8 (preto). **B)** Espectros de absorção transiente observados em diferentes tempos após a excitação com pulso de laser da solução de dímeros de azul de metileno induzidos por 4 mmolL^{-1} de SDS em pH 3,8 (linhas pontilhadas) e 10,8 (linhas contínuas). As cores indicam o tempo em μ s após o pulso do laser. $\lambda_{\text{exc}}=532 \text{ nm}$; $[AM]=10 \mu\text{molL}^{-1}$; $[\text{tampão}]=50 \mu\text{molL}^{-1}$.

Concluindo, nossos resultados mostram que o azul de metileno e SDS formam complexos em solução e estes complexos mudam tanto as propriedades do corante quanto das micelas. Interfaces carregadas negativamente induzem a formação de dímeros e assim são capazes de mudar o mecanismo fotoquímico do tipo II para transferência de elétron entre corantes, praticamente abolindo a formação de oxigênio singlete. Essa mudança de comportamento é muito importante no entendimento da terapia fotodinâmica, considerando que os fotossensibilizadores nas células estão em contato direto com membranas carregadas negativamente como a membrana citoplasmática ou a membrana mitocondrial interna.

4.2. Ligação em membranas e fotoatividade em culturas de células

Conhecendo o comportamento fotoquímico do azul de metileno em sistemas biomiméticos o foco do trabalho foi direcionado para o estudo de interação com membranas. Nesta etapa foram estudados juntamente com o azul de metileno outros fotossensibilizadores fenotiazínicos (mostrados na Figura 2), que diferem quanto ao número de grupos metila na molécula, atribuindo um caráter menos hidrofóbico e mais anfifílico (no caso do azure A) em relação ao azul de metileno.

O coeficiente de partição é um bom parâmetro para prever a tendência de um composto interagir com a membrana biológica das células. Tentamos determinar diversas vezes o coeficiente de partição de compostos fenotiazínicos por espectrofotometria de absorção na região UV-VIS. São apresentados na Tabela 1 os resultados obtidos de coeficiente de partição calculados utilizando os resultados obtidos através da técnica espectrofotométrica.

Tabela 1 - Valores calculados de P e $\log P$ dos corantes estudados utilizando três medições independentes de espectroscopia no UV-VIS. *valores médios e o desvios padrões para $\log P$. Para estas medidas as concentrações das soluções de corante eram de $20 \mu\text{molL}^{-1}$.

azul de metileno		tionina		azure B	
P	$\log P$	P	$\log P$	P	$\log P$
0,086	-1,07	0,251	-0,60	0,502	-0,30
0,238	-0,62	0,095	-1,02	0,160	-0,80
0,131	-0,88	0,339	-0,47	0,224	-0,65
$\log P$		$\log P$		$\log P$	
$-0,9 \pm 0,2^*$		$-0,7 \pm 0,3^*$		$-0,6 \pm 0,3^*$	

Note que os desvios padrões são muito elevados (20 – 50%) e não existe concordância entre a estrutura molecular dos compostos e os valores de $\log P$. Era esperado que o azul de metileno, que é o composto mais hidrofóbico desta série, tivesse o maior valor de $\log P$, seguido pelo azure B e a tionina com o menor valor de $\log P$. Observa-se que o azul de metileno possui $\log P$ de $-0,9 \pm 0,2$, que é o valor mais baixo apresentado na tabela. A tionina por sua vez apresenta um valor intermediário ($-0,7 \pm 0,3$) e o azure B apresenta o maior valor ($-0,6 \pm 0,3$), ou seja, através destas medidas poderia-se concluir que o AM é o composto mais polar da série uma vez que apresenta $\log P$ mais negativo e o azure B seria o mais apolar. Esta conclusão não está de acordo com a estrutura molecular dos corantes, uma vez que se espera que o AM pó possuir mais grupos metilenos seja o composto mais polar dos três. No entanto, devido ao fato dos corantes fenotiazínicos adsorverem em superfícies como plástico e vidro, os resultados obtidos nas diversas tentativas foram sempre pouco reprodutíveis [Dearden; Bresnen, 1988].

A realização dos experimentos de partição utilizando concentrações maiores deveria possibilitar esta medida, uma vez que nesta condição a ligação de corantes nos frascos seria desprezível em relação à concentração de corante solubilizado. No entanto, essas medidas são difíceis por espectrofotometria de absorção na região UV-VIS devido aos elevados valores de absorvidade molar. Considerando-se que a família de corantes estudada é eletroativa [Kissinger; Heineman, 1983], desenvolvemos um método para calcular logP baseado na técnica de voltametria cíclica com microeletrodos. Assim obteve-se uma série de voltamogramas em função da concentração do azul de metileno como um teste inicial (Figura 36 - A).

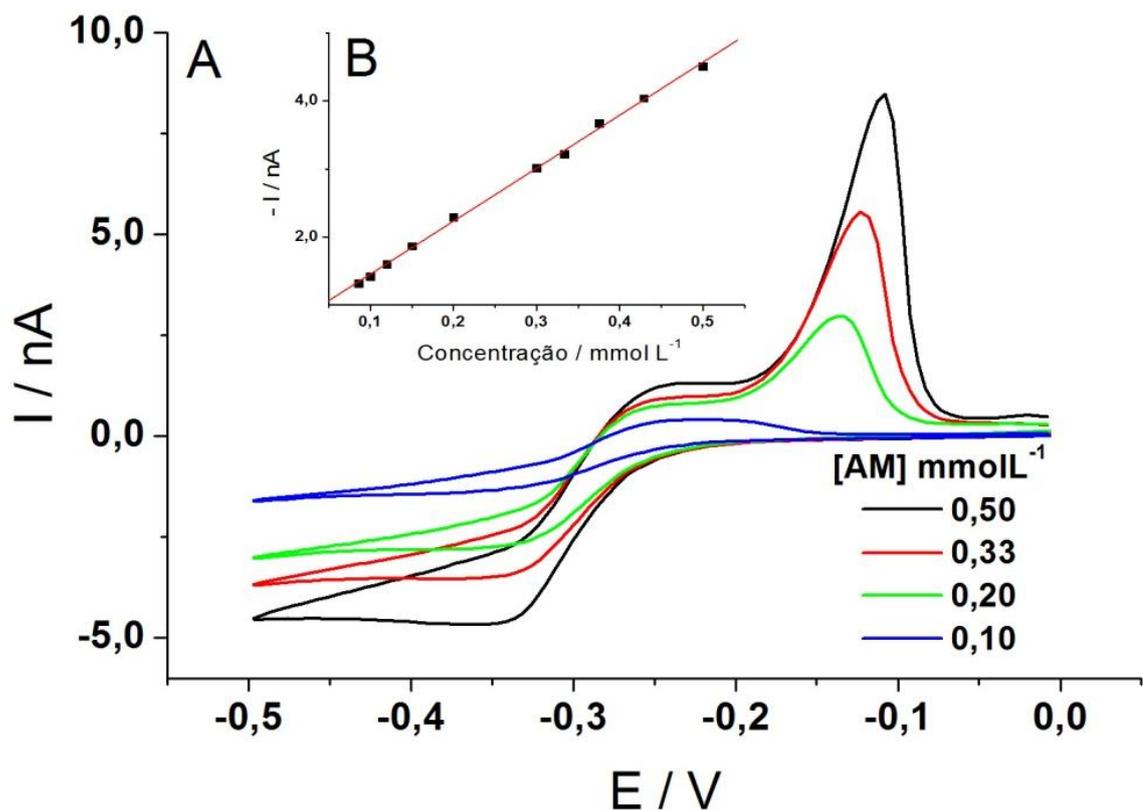


Figura 36 - A) Voltamogramas cíclicos de soluções aquosas de azul de metileno em diferentes concentrações. **B)** Variação da corrente limite em função da concentração de AM (0,086 – 0,50 mmolL⁻¹).

Observa-se na Figura 36 que existe um sinal de corrente que varia com a concentração de AM. A corrente limite aumenta conforme a concentração de azul de metileno aumenta. Assim, pode-se calcular o coeficiente de partição pela razão entre as correntes limites na fase aquosa antes e depois da partição. O passo seguinte foi fazer as medidas de partição dos corantes. Foram obtidos os voltamogramas da fase aquosa antes e depois da partição em meio ácido (Figura 37 – A a C). Estes experimentos foram realizados em triplicata.

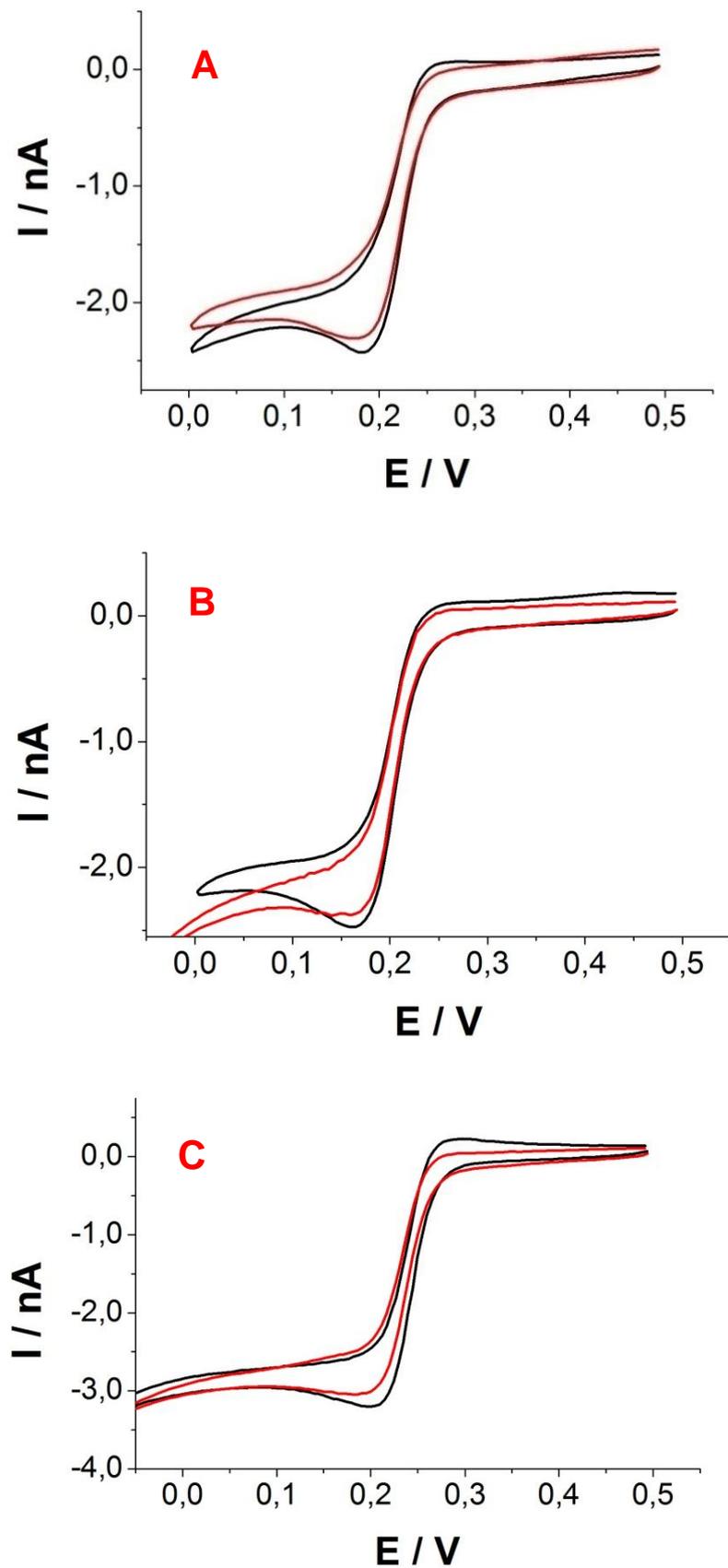


Figura 37 - Voltamogramas cíclicos de soluções aquosas de azul de metileno (**A**), azure B (**B**) e tionina (**C**), antes (preto) e depois (vermelho) da partição em octanol/água. Concentração dos corantes antes da partição era de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. Voltamogramas obtidos em meio ácido (pH 1,4).

Observa-se nos voltamogramas da Figura 37 que há uma diminuição da corrente limite depois da partição, indicando que a concentração na fase aquosa é menor depois da partição com n-octanol. Isto nos mostra que todos esses corantes se particionam parcialmente no n-octanol. Observa-se também que a diferença entre as correntes limites antes (-2,61nA) e depois da partição (-1,97nA) é maior para o azul de metileno (Figura 37 - A) do que para os outros compostos (Figura 37 – B e C), indicando que o azul de metileno é o que mais se particiona em n-octanol.

Na Figura 37-B pode-se notar que a diferença entre as correntes dos voltamogramas antes e depois da partição do azul B é menor que a observada para o azul de metileno, mostrando que o azul B é menos hidrofóbico que o azul de metileno. Isto se deve ao menor número de grupos metila presentes na molécula. A tionina, por não possuir grupos metila, apresenta uma partição ainda menor em n-octanol, ou seja, é o composto mais hidrofílico. Na Figura 37-C observa-se que existe uma diferença reprodutível entre as correntes limite antes (-2,8nA) e depois (-2,7nA) da partição, mas esta diferença é muito pequena.

Pela relação entre as correntes limites, é possível calcular o coeficiente de partição como descrito anteriormente (equação 4). Os coeficientes de partição (P) para os compostos em estudo foram então calculados, conforme é mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores calculados de P e $\log P$ para os corantes estudados utilizando três medições independentes de voltametria cíclica com microeletrodos. *valores médios e o desvios padrões para $\log P$.

azul de metileno		Tionina		azure B	
P	logP	P	logP	P	logP
0,090	-1,05	0,055	-1,26	0,016	-1,80
0,070	-1,15	0,076	-1,12	0,031	-1,51
0,100	-1,00	0,049	-1,31	0,038	-1,42
logP		logP		logP	
-1,07 ± 0,08*		-1,2 ± 0,1*		-1,6 ± 0,2*	

Com os valores apresentados na tabela, pode-se observar mais claramente como a partição dos compostos está relacionada com a estrutura molecular. O azul de metileno possui o maior coeficiente de partição da série estudada, sendo o composto mais hidrofóbico. O azure B e a tionina apresentam coeficientes de partição menores que o azul de metileno, indicando que são compostos mais hidrofílicos, o que é compatível com as respectivas estruturas moleculares.

Pode-se observar também para cada um dos corantes que desvios padrões menores que 10% foram calculados, mostrando a reprodutibilidade desta técnica. Portanto, pode-se dizer que a técnica voltamétrica apresenta vantagens na obtenção de valores de coeficiente de partição.

Em continuidade aos estudos de interação com membranas biológicas, foram realizados experimentos de incorporação em vesículas de fosfolipídios (DSPC:CL, 8:2) com os corantes azul de metileno, azure A, azure B e tionina. Os experimentos foram realizados como descrito na seção de métodos e em triplicata.

As Figuras 38 e 39 mostram os espectros de absorção dos sobrenadantes e dos precipitados com vesículas para o azure A, azure B, tionina e azul de metileno, respectivamente. Em cada figura observam-se 3 espectros de absorção do sobrenadante (S) e 3 espectros de absorção dos precipitados (P). O SDS é adicionado para evitar interferência da agregação nas quantificações de concentrações. Na Tabela 3 é mostrada a incorporação dos corantes em vesículas, calculados segunda a equação 5, e os valores de log P calculados por voltametria (repetidos da tabela 2 para facilitar a comparação com os dados de incorporação).

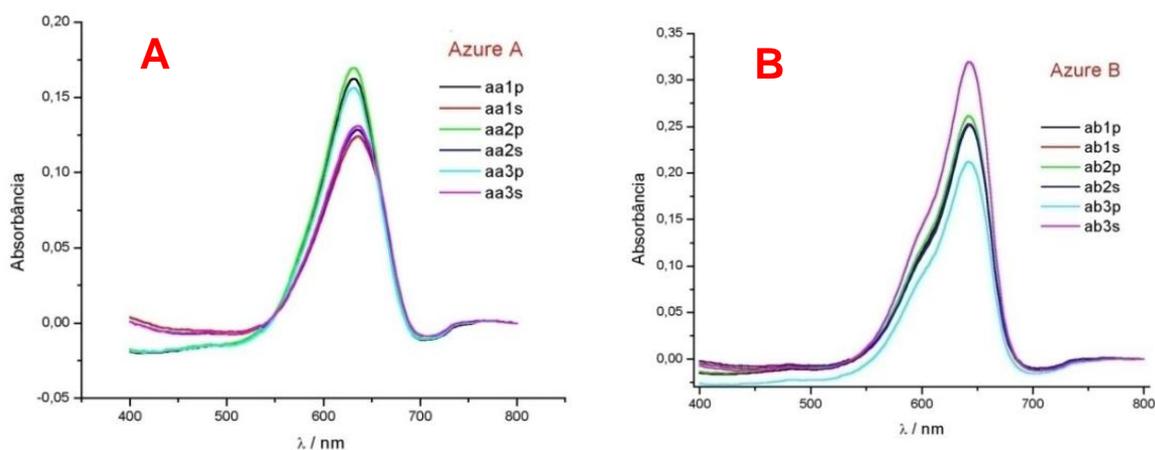


Figura 38 - Espectros de absorção do azure A (A) e do azure B (B) em tampão Tris 5 mmolL^{-1} , pH 7,3 e SDS 50 mmolL^{-1} . Na legenda do gráfico, os números 1, 2 e 3 são as replicatas e as letras P e S são precipitado e sobrenadante respectivamente.

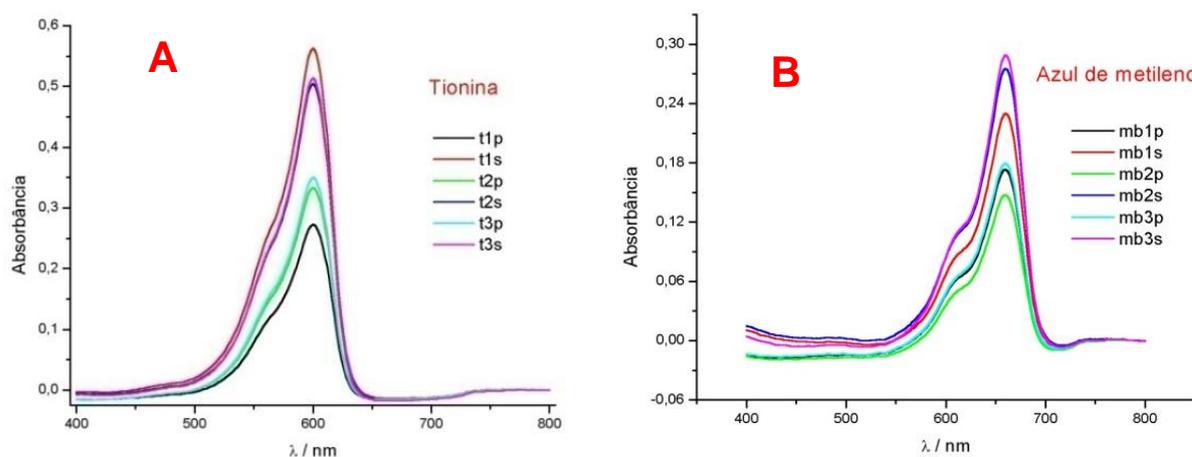


Figura 39 - Espectros de absorção da tionina (A) e do azul de metileno (B) em tampão Tris 5 mmolL^{-1} , pH=7,3 e SDS 50 mmolL^{-1} . Na legenda do gráfico, os números 1, 2 e 3 são as replicatas e as letras P e S são precipitado e sobrenadante respectivamente

Tabela 3 - Incorporação dos corantes em vesículas.

Composto	Incorporação	log P
azul de metileno	0,39 ± 0,04	-1,07 ± 0,08
Tionina	0,38 ± 0,04	-1,2 ± 0,1
azure B	0,47 ± 0,06	-1,6 ± 0,2
azure A	0,56 ± 0,01	---

O aumento de incorporação nas vesículas segue a ordem: tionina ~ azul de metileno < azure B < azure A. Os azures, que têm porcentagens de incorporação praticamente iguais, incorporam mais em vesículas do que a tionina e o azul de metileno. Note que a incorporação não segue a ordem que seria esperada baseado no logP, ou seja, o AM que tem logP maior não liga mais do que os azures. Sabendo que as moléculas de azul de metileno e de tionina são simétricas e que o azure A é mais assimétrico que o azure B (azure B possui 3 grupos metila e azure A possui 2 grupos metila ligados ao mesmo átomo de nitrogênio) os resultados indicam que a incorporação em vesículas está relacionada com a simetria da molécula, ou seja, observamos que moléculas mais simétricas (AM e tionina) incorporam menos em vesículas que as moléculas assimétricas (azures). A assimetria da molécula deve favorecer a interação entre o corante e a membrana, assim, os azures devem penetrar mais na bicamada lipídica.

Sabendo-se que os corantes assimétricos têm uma interação maior com vesículas sintéticas, pode-se hipotetizar que estes devem ser mais internalizados em células. Para testar esta hipótese, realizou-se experimentos de incorporação em células HeLa. A Figura 40 mostra a porcentagem de incorporação desta série de corantes em células HeLa.

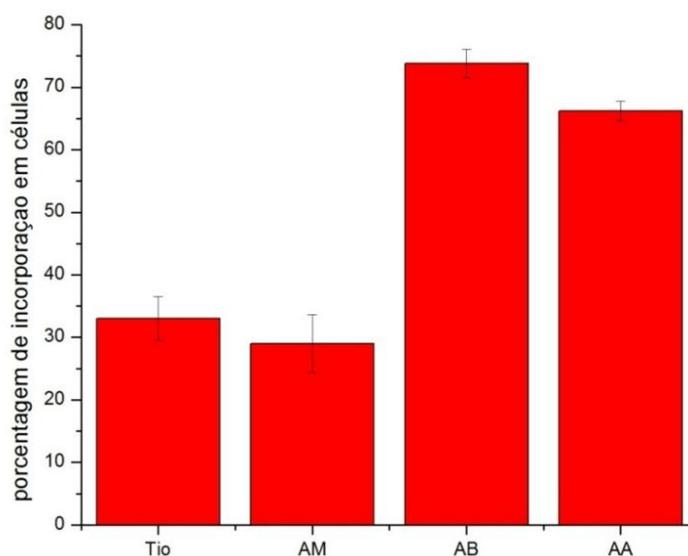


Figura 40 - Porcentagem de incorporação da tionina (T), azul de metileno (AM), azure A (AA) e azure B (AB) em células HeLa. Concentração dos corantes era de $20 \mu\text{molL}^{-1}$.

Observa-se que o azul de metileno e a tionina têm praticamente a mesma incorporação em células HeLa, de cerca de 30%, enquanto os corantes assimétricos têm uma taxa de incorporação maior (66% para o azure A e 74% para o azure B). Esse resultado corrobora com aquele apresentado para incorporação desses corantes em vesículas, onde foi mostrado que os corantes assimétricos incorporam mais que os simétricos.

Na Figura 41 é mostrado um gráfico onde se compara a incorporação nos dois sistemas. Pode-se observar novamente que os corantes assimétricos têm incorporação maior tanto em vesículas como em células do que os corantes simétricos. A tionina apresenta uma incorporação semelhante nos dois sistemas. O azul de metileno incorpora mais em vesícula do que em células, mas as porcentagens de incorporação não são muito diferentes. O azure B e o azure A mostram uma incorporação maior em células, sendo que azure B apresenta uma diferença bastante significativa entre os dois sistemas.

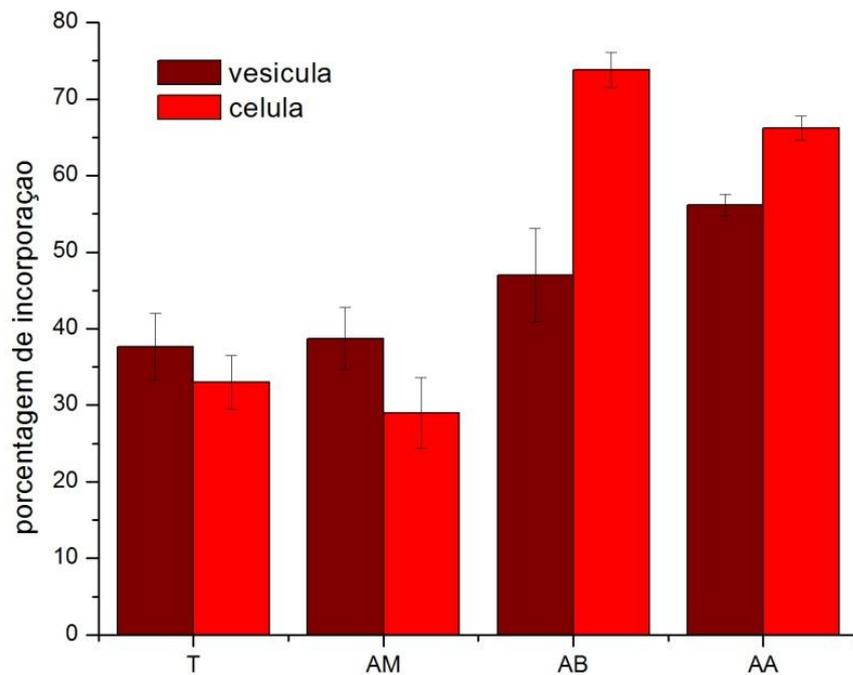


Figura 41 - Comparação entre as incorporações da tionina (T), azul de metileno (AM), azure A (AA) e azure B (AB) em vesículas e células HeLa. $[FS] = 20 \mu\text{molL}^{-1}$.

Resultados semelhantes foram reportados para porfirinas [Engelmann et al., 2007b]. É provável que a ligação maior em células do que em vesícula seja devido ao fato que a assimetria favoreça também a permeação no ambiente intracelular e a ligação nas diferentes membranas de organelas.

Depois de determinar qual dos fotossensibilizadores é incorporado mais eficientemente em células HeLa, foram realizados experimentos de viabilidade celular. Esses experimentos mostram o quanto cada um dos corantes é tóxico no escuro e serve de controle para os experimentos de irradiação com laser que serão apresentados posteriormente. Para cada composto foram testadas três concentrações diferentes (Figuras 42 a 45).

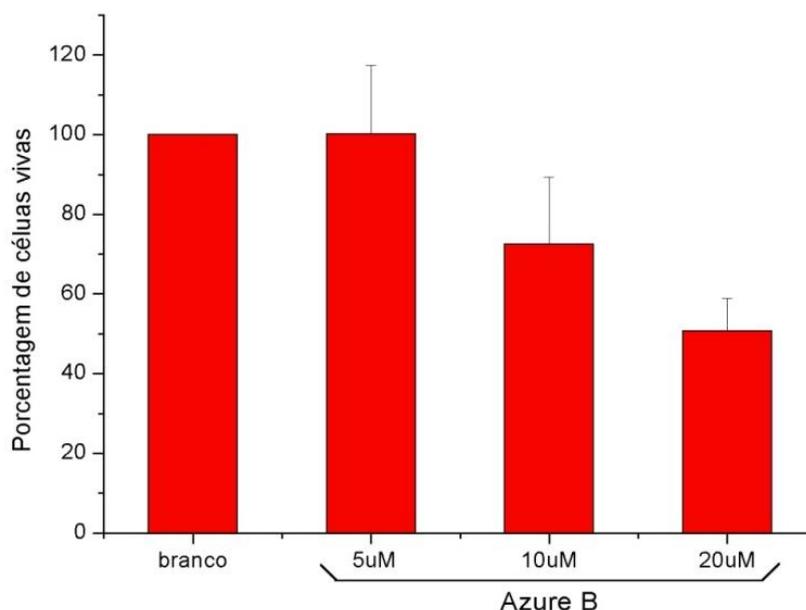


Figura 42 - Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de azure B após 3 horas de incubação. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e em pH 7, mas em dois poços do branco as células morreram antes da incubação com MTT.

Os resultados mostram que com aumento da concentração de azure B há uma diminuição de células vivas em comparação com a quantidade de células que foram incubadas sem nenhum fotossensibilizador (Figura 42). Pode ser observado que com uma solução contendo $5 \mu\text{molL}^{-1}$ de azure B a porcentagem de células vivas é de $100 \pm 17 \%$, o que nos mostra que não há morte celular no escuro com essa concentração de corante. Quando a concentração é aumentada para $10 \mu\text{molL}^{-1}$ $72 \pm 17\%$ das células permanecem vivas após a incubação. A porcentagem de células vivas diminui pela metade quando essas são incubadas por 3 horas com $20 \mu\text{molL}^{-1}$ de azure B no escuro.

Os experimentos realizados com os outros corantes comerciais mostram que eles têm comportamento razoavelmente distinto do azure B. A viabilidade celular com azul de metileno $5 \mu\text{molL}^{-1}$ é igual a do branco, e só há morte quando as células são incubadas com 10 e $20 \mu\text{molL}^{-1}$ de corante (Figura 43). Nestas concentrações

de corante cerca de 65% das células permanecem vivas. Com o azure A somente houve morte celular significativa quando foi utilizado $20 \mu\text{molL}^{-1}$ de FS (Figura 44). Em concentrações menores a viabilidade é igual a do branco. Para a tionina, todas as concentrações utilizadas mostraram o mesmo resultado que o branco, indicando que não houve morte celular no escuro (Figura 45).

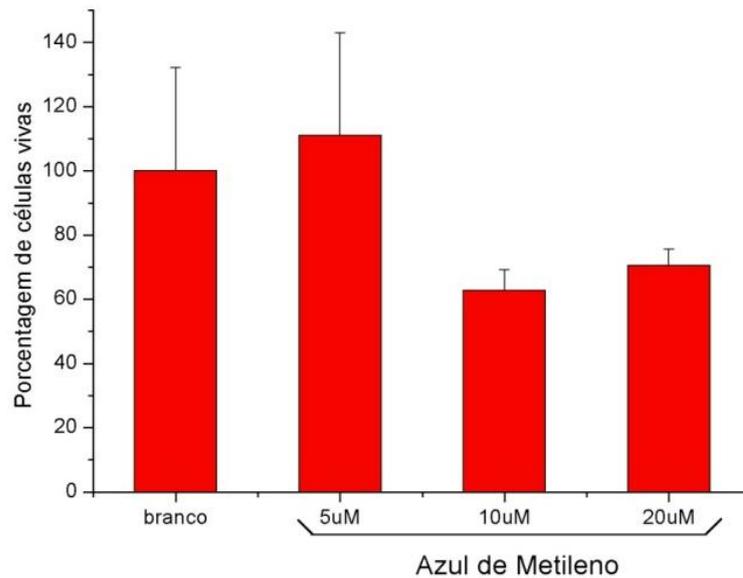


Figura 43 - Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de azul de metileno após 3 horas de incubação. Experimentos realizados em triplicata e em pH 7.

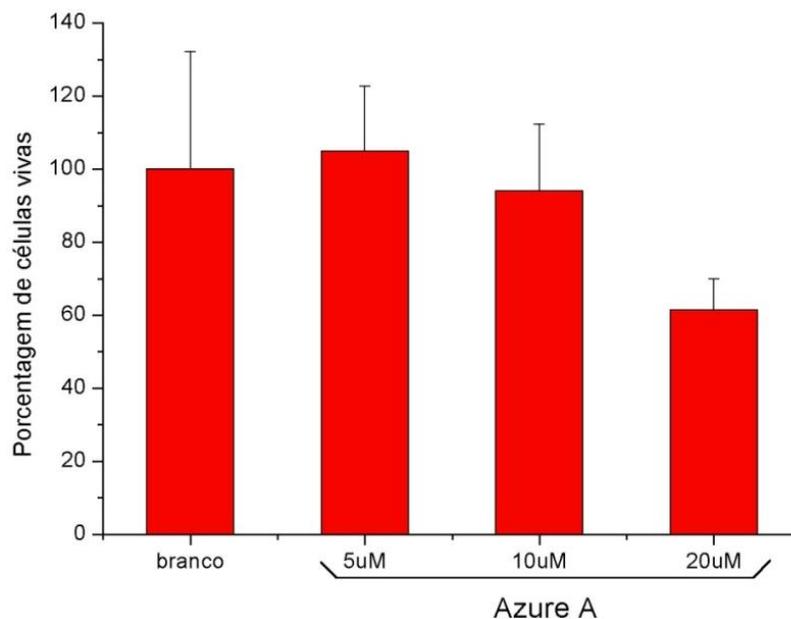


Figura 44 - Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de azure A após 3 horas de incubação. Experimentos realizados em triplicata e em pH 7.

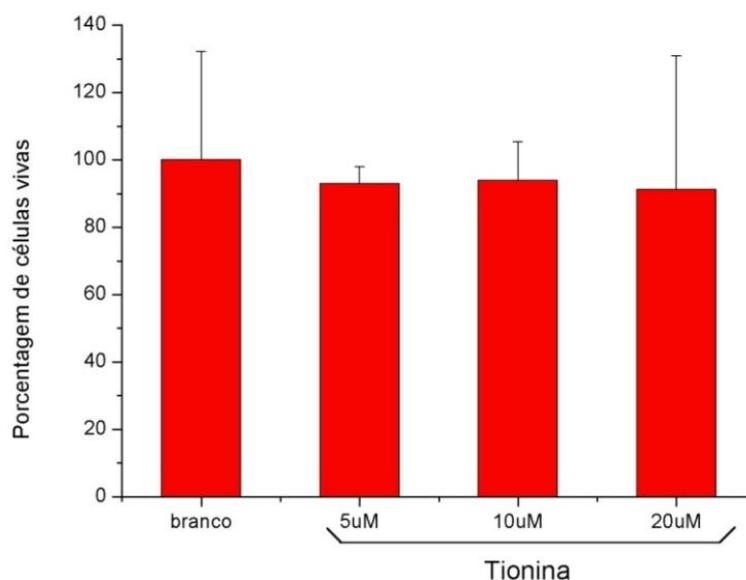


Figura 45 - Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de tionina após 3 horas de incubação. Experimentos realizados em triplicata e em pH 7.

A toxicidade do azure B está relacionada com o fato do corante ser muito incorporado pelas células. Em concentrações de $20 \mu\text{molL}^{-1}$, 74% do corante é incorporado (Figura 41). A fototoxicidade desses fotossensibilizadores também foi estudada (Figura 46). A concentração utilizada foi de $20 \mu\text{molL}^{-1}$ e as amostras foram irradiadas por 6 ciclos de um minuto no claro e um minuto no escuro.

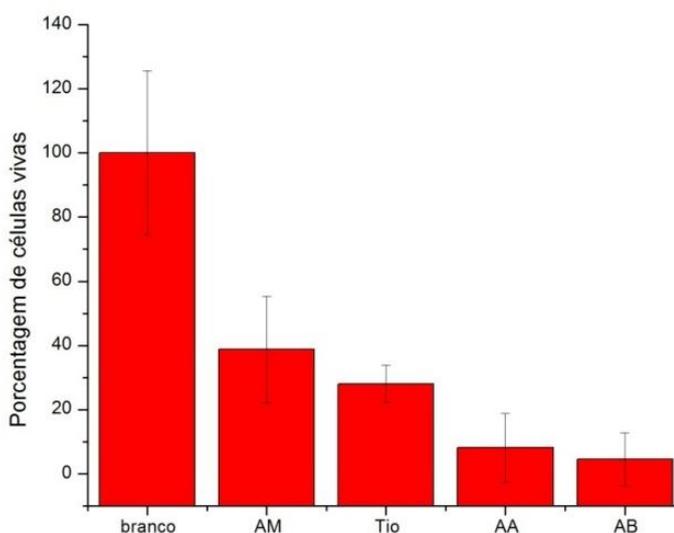


Figura 46 – Porcentagem de células vivas depois de serem incubadas por 3 horas com soluções de $20 \mu\text{molL}^{-1}$ dos corantes azul de metileno, tionina, azure A e azure B e após irradiação com laser vermelho ($\lambda_{\text{exc}}=664\text{nm}$).

Observa-se que para todos os corantes houve morte celular após a irradiação, mostrando que há fototoxicidade nesta concentração. Pode-se notar que o azul de metileno é o corante que tem a menor fototoxicidade, matando cerca de 60% das células com o tratamento de PDT. A tionina apresenta uma fototoxicidade semelhante, onde 70% das células foram mortas. Os corantes assimétricos da série azure (azure A e B), apresentam maior fototoxicidade, causando a morte de cerca de 90% das células.

O fato dos azures A e B apresentarem morte celular maior não quer dizer que sejam mais fototóxicos por molécula, uma vez que estes FSs incorporam mais nas células. Calculando a razão entre a porcentagem de morte celular depois do tratamento de PDT e a incorporação para cada FS, chegamos à relação da Tabela 4. Os corantes AM e tionina apresentam uma relação entre morte celular e incorporação de 2 e os azures apresentam a relação de 1,3.

Tabela 4 – Relação entre morte celular e incorporação dos fotossensibilizadores comerciais em porcentagem.

Composto	$\frac{\% \text{morte celular}}{\% \text{incorporação}}$
tionina	2,2
azul de metileno	2,1
azure A	1,4
azure B	1,3

Deste modo, pode-se concluir que os fotossensibilizadores simétricos se mostram mais eficientes por molécula do que os FS assimétricos. Este fato nos mostra que ser melhor incorporado nas células não significa que a eficiência por moléculas será maior. Outros fatores como citolocalização podem ser mais

importantes para explicar a eficiência fotodinâmica por molécula. Para entender em maior detalhe a relação entre a estrutura molecular e a eficiência de PDT é necessário ampliar o número de estruturas a serem estudadas. Cabe enfatizar que para PDT o importante é a eficiência geral (Figura 46), que engloba as eficiências de internalização e de morte por molécula. Desta forma, optou-se por sintetizar uma série de fenotiazinas assimétricas.

4.3. Novos fotossensibilizadores

4.3.1. Síntese e purificação

Com o conhecimento adquirido nos estudos dos corantes comerciais propusemos a síntese de novos compostos com o objetivo de entender a relação estrutura/atividade e talvez conseguir fotossensibilizadores otimizados. Esses novos compostos deveriam ser derivados fenotiazínicos que mantivessem as propriedades fotoquímicas daqueles estudados, mas que pudessem ser melhor incorporados em células. Para alcançarmos esse objetivo, sintetizamos compostos mais hidrofóbicos e que fossem assimétricos, pois a assimetria favorece a incorporação em membranas (Figura 41). Estes compostos possuem o núcleo fenotiazínico, assim como aqueles que foram estudados, mas diferem na sua estrutura por possuírem caudas hidrofóbicas de quatro, seis e oito carbonos (Figura 47). São compostos assimétricos por apresentarem duas caudas hidrofóbicas em apenas um dos lados da molécula. O outro nitrogênio possui dois grupos metilas, originais do azure A.

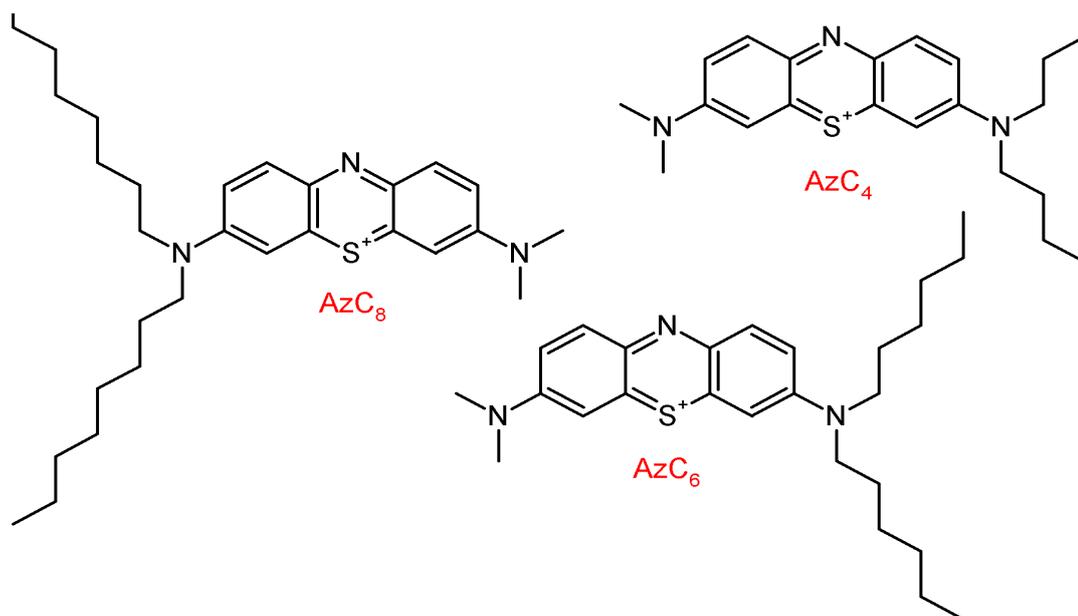


Figura 47 - Estrutura molecular dos derivados fenotiazínicos sintetizados neste projeto.

Para sintetizar estes novos fotossensibilizadores foi desenvolvida uma rota sintética baseada na alquilação das aminas primárias de fenotiazinas com um haleto de alquila apropriado (Figura 48). Inicialmente testou-se a reação com a tionina, que apresenta duas aminas primárias.

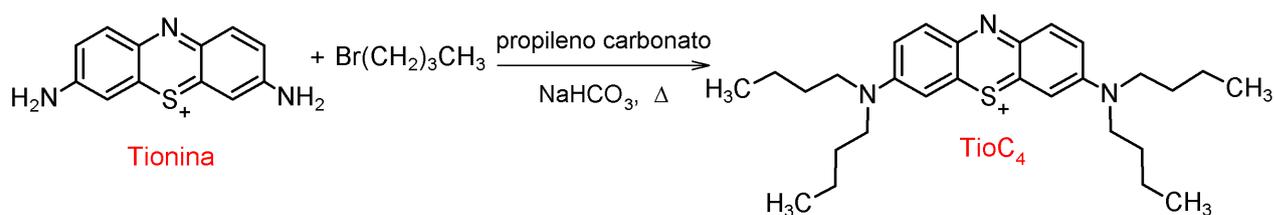


Figura 48 - Reação entre a tionina e 1-bromo-butano formando o composto 3,7- bis(dibutilamino)-5-fenotiazina que será chamado de TioC₄.

4 mg de tionina foram dissolvidos em 2 mL de propileno carbonato, depois foram adicionados 2 mL de 1-bromo-butano e a mistura reacional foi mantida sob refluxo. Rapidamente a coloração da solução passou de roxa azulada para cinza azulada. Contudo, o espectro eletrônico registrado em etanol apresentou o mesmo

perfil que o da solução inicial, o que sugere que mesmo após 6 horas de refluxo não houve nenhuma mudança indicando reação química.

A reação foi repetida, desta vez adicionando-se 0,1 g de bicarbonato de sódio à mistura reacional em refluxo que rapidamente tornou-se vermelha e aproximadamente em 10 minutos, evoluiu a um azul intenso semelhante a uma solução de azul de metileno. O espectro eletrônico mostrou um deslocamento da banda de absorção máxima de 598 nm para 670 nm (Figura 49). Este deslocamento espectral está de acordo com o esperado para o aumento de radicais alquílicos ligados aos nitrogênios.

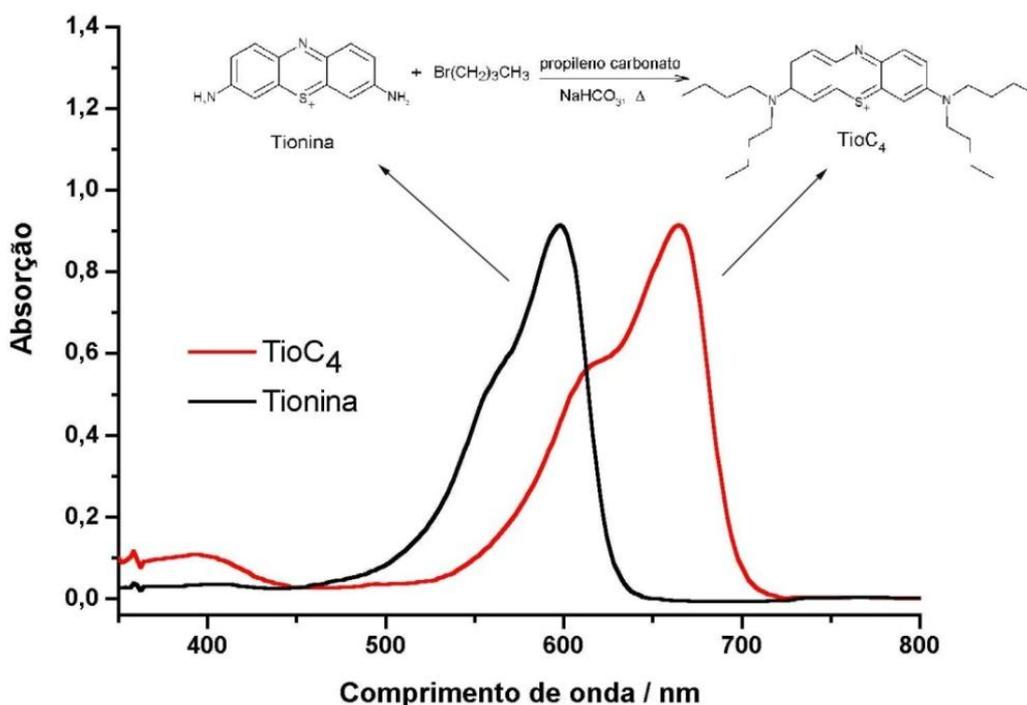


Figura 49 - Espectro eletrônico da tionina e do derivado alquilado obtido.

O sistema reacional foi mantido em refluxo por mais 30 minutos. Posteriormente foi realizada uma evaporação à vácuo para remover o excesso de 1-bromo-butano e o produto foi purificado por cromatografia de coluna em sílica gel eluída com clorofórmio/etanol.

O produto obtido foi analisado por RMN-¹H e COSY (Anexos I e II). O resultado mostra que realmente o 1-bromo-butano reagiu com a molécula de tionina, e pela proporção entre os prótons pode-se concluir que quatro caudas hidrofóbicas estão ligadas, duas em cada átomo de nitrogênio da tionina. Além disso, outra evidência do sucesso da reação é a alta solubilidade do produto em clorofórmio, diferentemente da tionina.

É importante ressaltar que a reação foi efetiva somente com a adição de NaHCO₃ ao meio reacional. O objetivo da adição de uma base foi neutralizar os prótons que são produtos da reação das aminas da tionina com o 1-bromo-butano. Se não fossem removidos, estes prótons se acumulariam na solução e estabeleceriam rapidamente um equilíbrio de protonação das aminas diminuindo o caráter básico destes grupos. Contudo, pode ser também que em propileno carbonato o NaHCO₃ desprotone as aminas primárias da tionina, formando um produto mais reativo que dá à solução uma coloração vermelha. À medida que este produto reage com o brometo de alquila a solução adquire a cor do produto final, que é uma evidência de que as aminas tenham sido completamente alquiladas.

O produto desta síntese não era uma novidade, uma vez que já tinha sido obtido e estudado por Mellish et al. (2002). Todavia a rota sintética desenvolvida é muito mais rápida, simples e econômica que as estratégias (Mellish et al., 2002). Ao invés de diversas etapas de sínteses e purificações dos intermediários, nossa estratégia permite obter o produto proposto em apenas uma etapa de preparação de 30 minutos e outra de purificação de mais 30 minutos. Além disso, ela utiliza como reagente de partida, corantes comercialmente baratos.

Deste modo, foram feitas diversas reações para acertar as melhores condições experimentais, que são descritas e discutidas abaixo, chegando finalmente aos produtos de interesse do presente trabalho.

Utilizando a mesma rota sintética, foi utilizado o azure A como reagente ao invés da tionina. O azure A possui uma das aminas metiladas, de modo que somente a outra amina pode ser alquilada pela reação descrita acima, como mostrado na Figura 50.

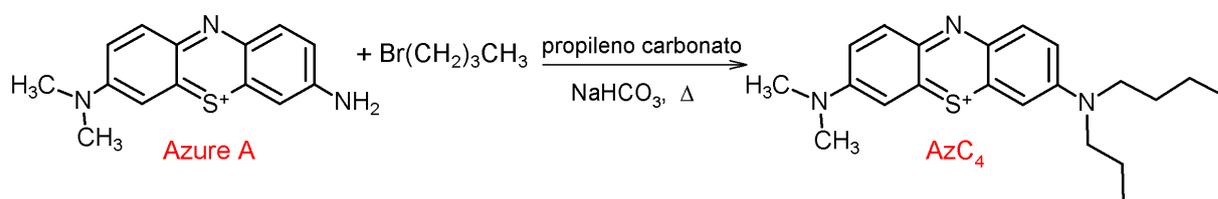


Figura 50 - Reação do azure A (A) com 1-bromo-butano formando o composto 3-dimetilamino-7-dibutilamino-5-fenotiazina que será chamado de AzC₄.

Foi observado que a reação só ocorre eficientemente em temperaturas acima de 150° C, e solventes como etanol e metanol apresentaram péssimo rendimento. Os solventes que apresentaram melhores resultados foram o propileno carbonato e a dimetilformamida. O rendimento da reação com este último solvente é muito bom, todavia há formação de subproduto incolor que não é removido na cromatografia, e que torna o composto de interesse muito higroscópico. A conclusão foi que o propileno carbonato é o melhor dos solventes testados para esta reação, porque é o que melhor solubiliza o azure A e que proporciona maior eficiência da reação.

Fez-se novamente a reação com propileno carbonato. Desta vez com o mínimo possível de solvente para solubilizar o corante. 30 mg de azure A foram dissolvidos em 1 mL de propileno carbonato e depois foram adicionados 0,4 g de NaHCO₃ e 3 mL de 1-bromo-butano, este último adicionado vagorosamente em alíquotas de 200 μL, e a reação ficou sob refluxo por 30 minutos. A formação do

produto desejado foi monitorada pela medida da absorvância em 670 nm (Figura 51).

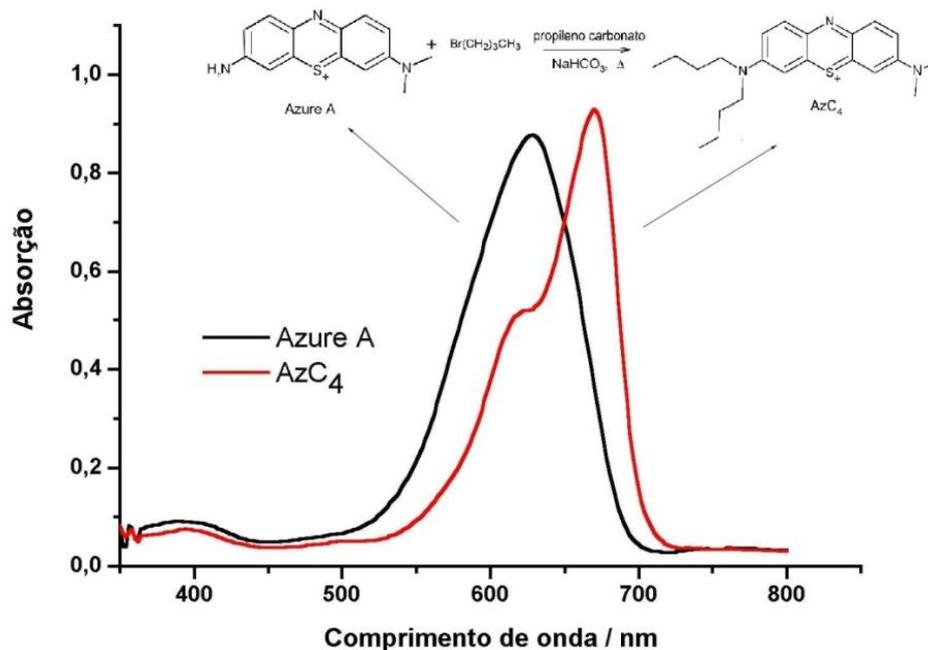


Figura 51 - Espectro eletrônico do azure A e do AzC₄.

Depois de terminada a reação, o produto obtido foi seco por rotoevaporação para eliminar o 1-bromo-butano em excesso e o propileno carbonato. Depois foi feita uma cromatografia de coluna utilizando alumina neutra, utilizando clorofórmio e metanol como eluentes. A fração mais intensa com banda de absorção em 670 nm foi caracterizada por RMN-¹H e ¹H—¹H COSY (Anexos III e IV), onde foi possível atribuir os sinais para os ¹H.

O triplete em δ 0,9 corresponde ao hidrogênio do grupo metila da cadeia alifática (-NCH₂CH₂CH₂CH₃), que está acoplado com o hidrogênio vizinho (-NCH₂CH₂CH₂CH₃) em δ 1,35, visto no ¹H—¹H COSY. Há também o acoplamento de -NCH₂CH₂CH₂CH₃ com o hidrogênio vizinho -NCH₂CH₂CH₂CH₃ (δ 1,62) e o acoplamento deste com -NCH₂CH₂CH₂CH₃ (δ 3,48). Este último sinal tem um deslocamento maior característico de hidrogênios ligados a carbono ligado a um

átomo de nitrogênio. Os sinais descritos acima são multipletes, mostrando que há sobreposição de sinais. Isso pode ser um indício da ligação de duas cadeias alifáticas no átomo de nitrogênio. O hidrogênio da metila ligado ao nitrogênio (-NCH₃) apresenta um deslocamento em δ 3,3 e a partir do valor da integral desse sinal e a proporção com as demais integrais, comprova-se que houve a ligação de duas cadeias alifáticas. Nesses espectros também foram identificados os prótons aromáticos em δ 7,21 (d, J=9,3), 7,34 (s) e 7,84 (d, J=9,6), que já tinham sido caracterizados para a molécula de tionina (Figura 52).

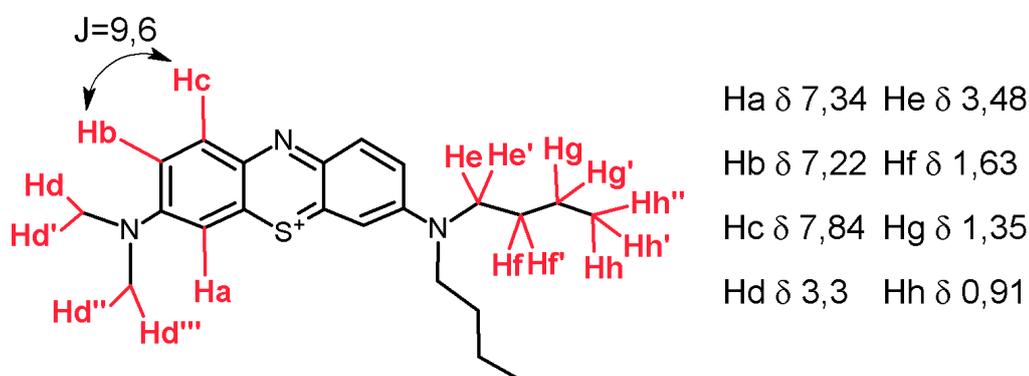


Figura 52 - Estrutura química do produto obtido com os prótons identificados por RMN-¹H (em vermelho), mostrando os deslocamentos químicos e a constante de acoplamento entre os prótons igual a que foi caracterizada para a tionina.

Foi obtido para essa molécula o espectro de massa (Anexo V), que suporta as afirmações que é realmente o produto esperado. Este produto foi chamado de AzC₄. Para a melhor caracterização desse produto foi feita a separação por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se colunas de fase reversa.

Primeiramente, para se familiarizar com a nova técnica e determinar os parâmetros, foram obtidos os cromatogramas dos corantes comerciais azul de metileno e azure B, com um fluxo total de 0,6 mL/min e temperatura de 35°C e o detector fazendo a aquisição em 650 nm (Figura 53). Dos cromatogramas mostrados

na Figura 53, pôde-se observar o tempo de retenção de cada um dos corantes comerciais, mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Tempo de retenção na coluna de fase reversa dos corantes comerciais.

Corante	Tempo de retenção /min	
	Pico principal	Pico 2
azure B	4,71	4,99
azul de metileno	4,96	5,23

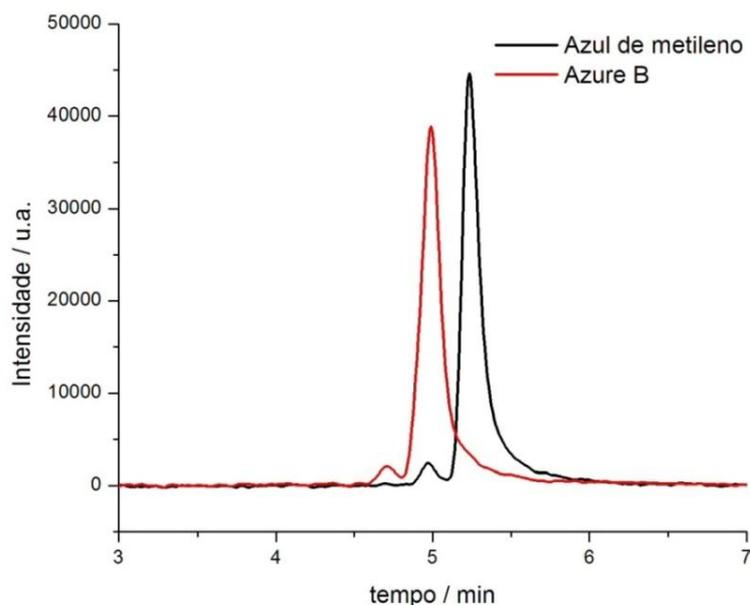


Figura 53 - Cromatograma dos corantes comerciais azure B e azul de metileno obtido em coluna analítica (4,6 x 250 mm). Fluxo total: 0,6 mL/min; T = 35°C, λ = 650 nm.

O tempo de retenção de cada um dos corantes é condizente com sua respectiva estrutura. O azul de metileno que possui quatro grupos metila em sua estrutura tem um tempo de retenção maior que o azure B que possui 3 grupos metila. Observa-se que cada um dos corantes apresenta um outro pico em tempos menores que os picos principais e com intensidade menor. Esses picos são

impurezas encontradas nos corantes. E como no cromatograma do azul de metileno observa-se que a impureza tem o mesmo tempo de retenção que o azure B, pode-se dizer que o azure B é um subproduto do processo de síntese do azul de metileno. Da mesma forma pode-se inferir que o pico de menor intensidade do azure B corresponde ao seu derivado desmetilado, azure A.

Conhecendo-se o cromatograma de cada um dos compostos, foi obtido o cromatograma de uma mistura de azul de metileno e azure B para definir melhor os parâmetros para uma separação (Figura 54).

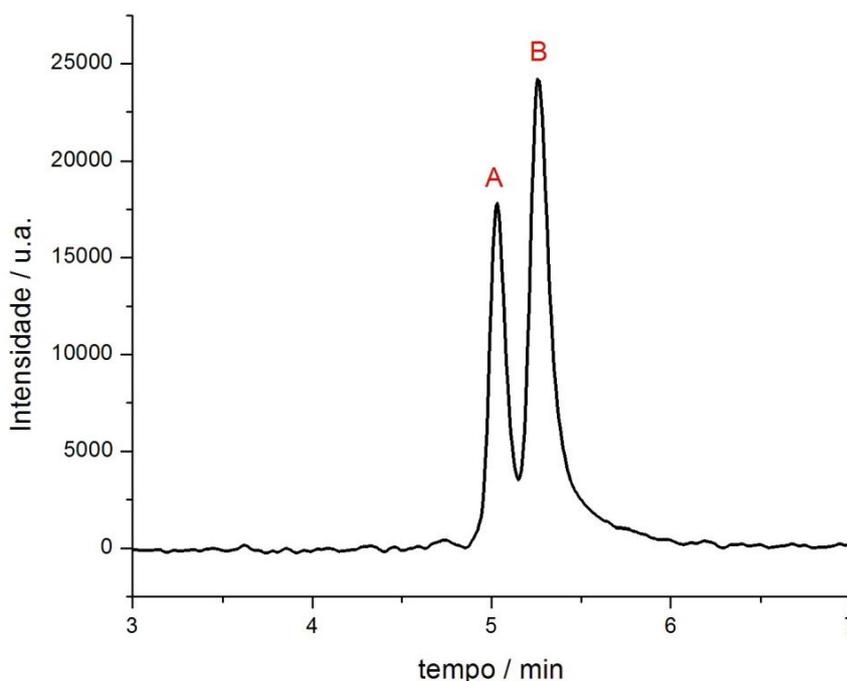


Figura 54 - Cromatograma de uma mistura dos corantes azure B e azul de metileno obtido em coluna analítica (4,6 x 250 mm). Fluxo total: 0,6 mL/min; T = 35°C, $\lambda = 650$ nm.

No cromatograma obtido da mistura de corantes, pode-se observar dois picos (A e B) com tempos de retenção de 5,03 e 5,23 min. Esses tempos de retenção são os mesmos daqueles obtidos para cada corante separadamente, e cada pico tem uma resolução bem definida, mostrando que todos os parâmetros ajustados são suficientes para fazer uma boa separação dos corantes.

O passo posterior foi injetar o AzC₄ numa concentração maior por uma coluna preparativa (20 x 250 mm) para poder coletar as frações separadamente e fazer as respectivas análises para caracterizar as estruturas e as propriedades. Os parâmetros da corrida cromatográfica, como anteriormente, foram definidos utilizando-se o azure B (Figura 55).

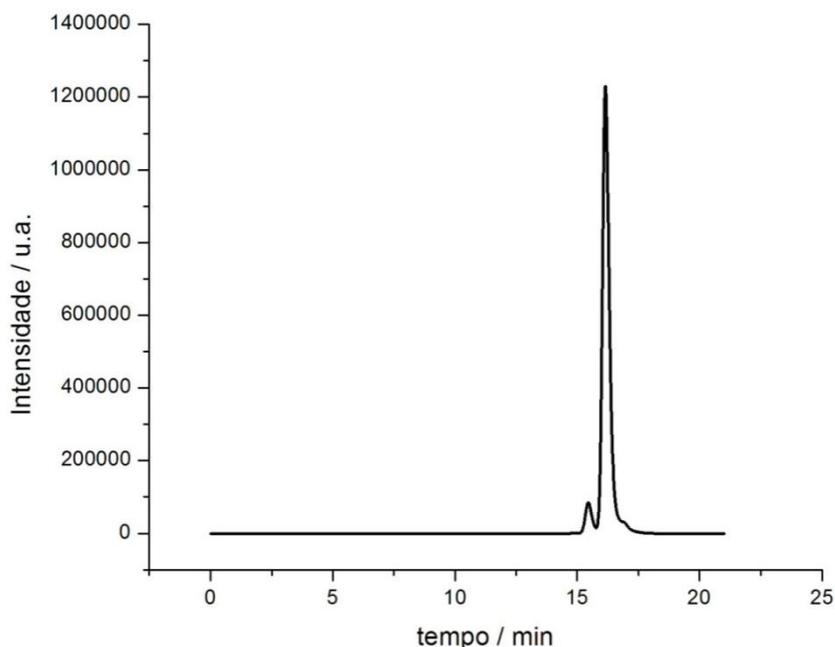


Figura 55 - Cromatograma do azure B obtido em coluna preparativa (20 x 250 mm). Fluxo total: 3mL/min; $\lambda = 650$ nm.

O cromatograma do azure B na coluna preparativa apresenta dois picos sendo um principal de intensidade alta (16,1 min) e um com intensidade e tempo de retenção menor (15,5 min), mostrando a presença de um composto com uma metila a menos que pode ser o azure A. O perfil observado é o mesmo da coluna analítica, mas por causa do tamanho da coluna, é observado um tempo de retenção maior. O fluxo total definido para essa coluna é de 3 mL/min. No entanto, não foi possível ter um controle de temperatura, uma vez que a mesma não cabe no interior do forno.

Com os mesmos parâmetros ajustados foi realizada uma corrida com o composto AzC₄, cujo cromatograma é mostrado na Figura 56.

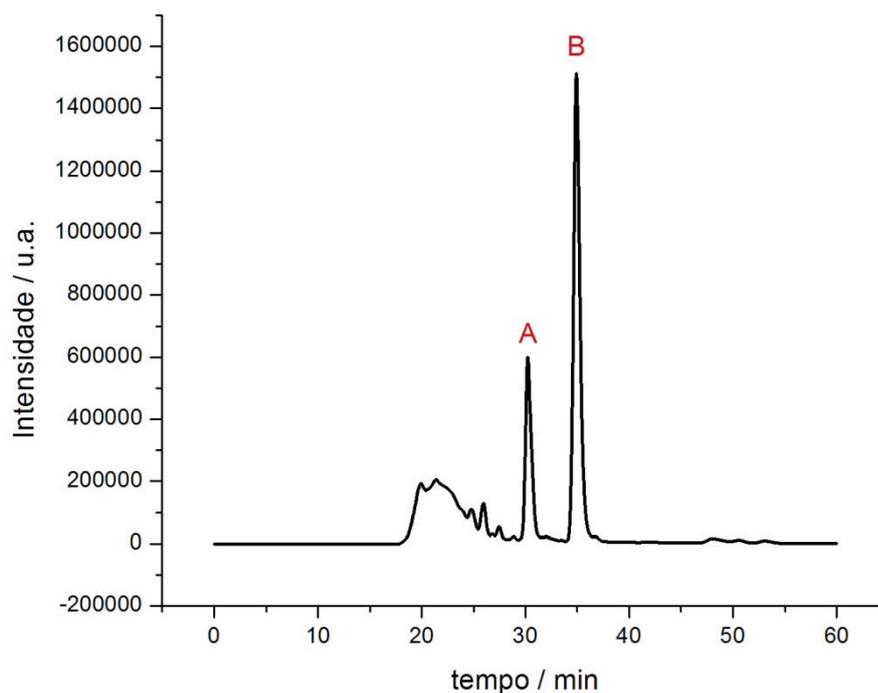


Figura 56 - Cromatograma obtido do AzC₄ em coluna preparativa (20 x 250 mm). Fluxo total: 3 mL/min; $\lambda = 650$ nm.

O perfil obtido com a coluna preparativa mostra que a separação não está boa para aqueles picos observados no início do cromatograma. Houve uma sobreposição de picos sem resolução. Porém os picos mais intensos (A e B) se mostram com resolução completa e com intensidades bem maiores que os demais. É possível que os picos não resolvidos com tempo de migração em torno de 20 minutos sejam devido a agregação dos corantes.

As frações recolhidas correspondentes aos picos A e B foram concentradas, dessalinizadas e posteriormente analisadas por espectrometria de massas. Os espectros de massa da fração correspondente ao pico B são mostrados nas Figuras 57 e 58.

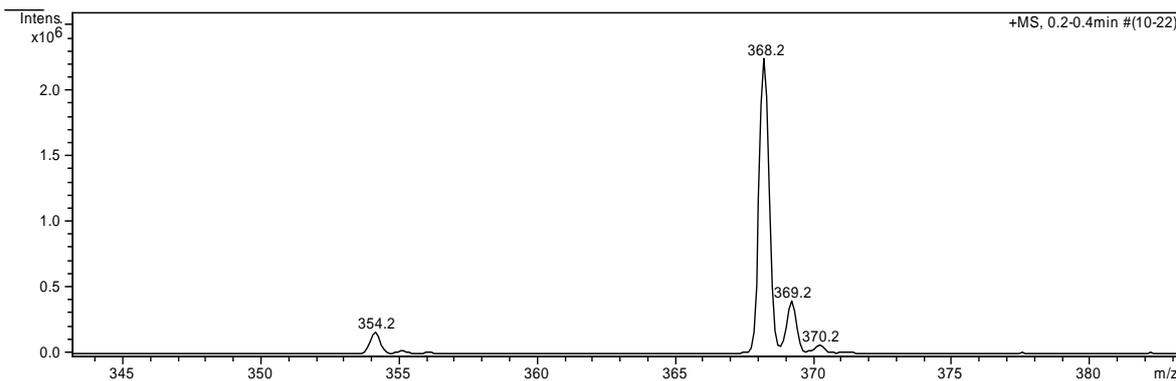


Figura 57 - Espectro de massa obtido para a fração B.

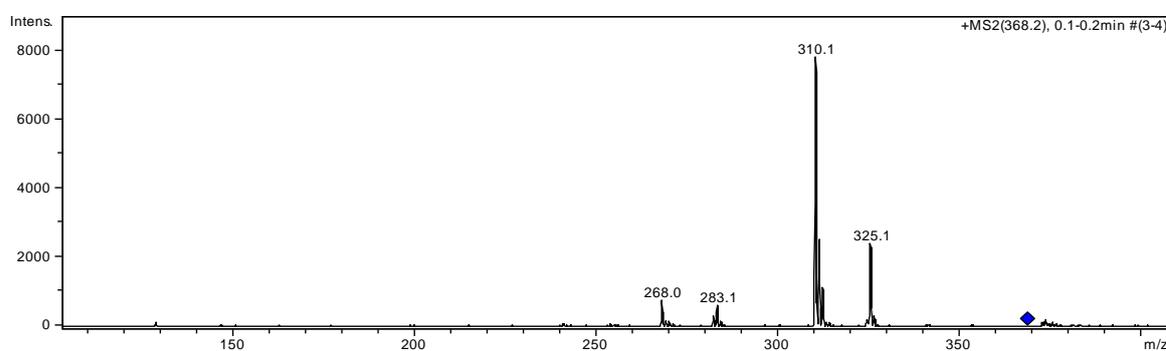


Figura 58 - Espectro MS/MS do fragmento de massa/carga 368,2 mostrado na Figura 48.

O espectro de massa obtido para a fração B (Figura 57) mostra um pico base de m/z 368,2 e dois picos isotópicos (369,2 e 370,2). O pico base tem uma relação massa/carga igual ao do composto esperado e o MS/MS também apresenta uma fragmentação característica àquela esperada para uma cadeia alquílica sendo o último fragmento observado com m/z igual ao azure B (268,0).

Na Figura 59 é mostrado o espectro de massa para a fração correspondente ao pico A do cromatograma e na Figura 60 o espectro MS/MS do fragmento de relação massa/carga 354,2.

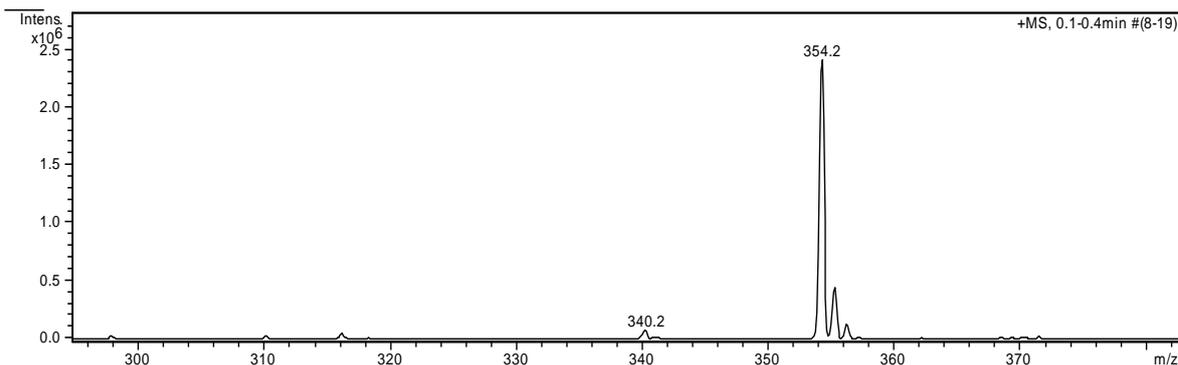


Figura 59 - Espectro de massa para a fração A.

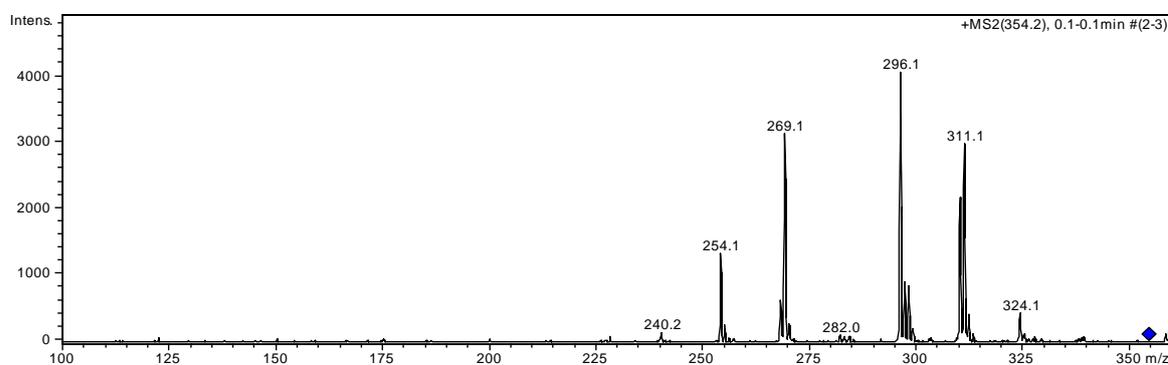


Figura 60 - Espectro MS/MS do fragmento de massa/carga 354,2 mostrado na Figura 46.

No espectro de massas obtido para a fração obtida do pico A do cromatograma, observa-se um pico base em m/z 354,2 e mais dois picos ($M+1$ e $M+2$), que pela proporção entre suas alturas e pela suas massas, indicam que são picos isotópicos.

O composto AzC_4 , mostrado na Figura 47, deve apresentar um padrão de fragmentação de acordo com aquele de cadeias alquílica [Silverstein, 1994], onde há perda de massa referente a um grupo $-CH_2$ ($m/z = 14$). Isso é observado nos espectros obtidos, onde o pico base tem uma relação m/z de 354,2 que representa a perda de um grupo $-CH_2$ do composto de m/z 368. No espectro mostrado na Figura 60 pode-se observar a diferença de m/z entre cada pico de 14 unidades, indicando esse padrão de fragmentação, sendo que os picos de menor m/z observados são de

269,1, 254,1 e 240,2 que são as relações esperadas para os corantes azure B, azure A e azure C, respectivamente, mostrando então que houve a alquilação da molécula de partida. Pode-se concluir que A deve ser também AzC₄ e o composto AzC₄ está puro. Estes resultados corroboram com aqueles apresentados anteriormente para o produto antes de ser purificado por HPLC (AzC₄ - Figura 52).

O log P deste composto foi calculado pelo método de voltametria com microeletrodos e foi obtido um valor de -0,43, mostrando que o composto é mais hidrofóbico que os corantes comerciais, o que está de acordo com a sua estrutura molecular.

Sintetizamos outros compostos utilizando brometos de alquila de tamanhos variados. A primeira reação foi realizada com 1-bromo-octano. Foram solubilizados 45 mg de azure A em 0,5 mL de propileno carbonato e adicionados, vagarosamente, 5 mL de 1-bromo-octano, 0,4g de NaHCO₃ e a mistura ficou em refluxo. Esta reação foi mais demorada que as anteriores e o produto foi chamado de AzC₈.

Para fazer o derivado com caudas de seis carbonos foi necessário antes preparar o 1-bromo-hexano (Figura 61). Para isso foram misturados 30 mL de hexanol, 45 mL de ácido bromídrico 48% em 30 mL de tolueno num balão acoplado com um Dean-Starck. Então o produto é destilado para separá-lo do tolueno. Junto com o 1-bromo-hexano deve ser destilado também um pouco de hexanol que pode ter sobrado da reação, mas este álcool não deve interferir na reação com o azure A.



Figura 61 - Reação de formação do 1-bromo-hexano

Depois de ter preparado o 1-bromo-hexano, foi feita a reação deste com o azure A. 30 mg de azure A foram solubilizados em 1 mL de propileno carbonato. Então foram adicionados 0,4 g de bicarbonato de sódio e 2 mL de 1-bromo-hexano e deixado sob refluxo por 30 minutos. O 1-bromo-hexano foi adicionado vagarosamente. O produto desta reação tem uma banda de absorção em 662 nm em água e foi chamado de AzC₆.

4.3.2. Estudos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos

Com esses novos compostos foram realizados experimentos fotofísicos e fotoquímicos, com o intuito de comparar o potencial de aplicação em PDT com o azul de metileno e com os outros derivados fenotiazínicos.

Para o experimento de eficiência de fluorescência, foram preparadas soluções dos compostos sintetizados em metanol, e a absorbância em 580 nm de todas as soluções foram ajustadas para 0,05 (Figura 62) e os espectros de fluorescência foram obtidos (Figura 63).

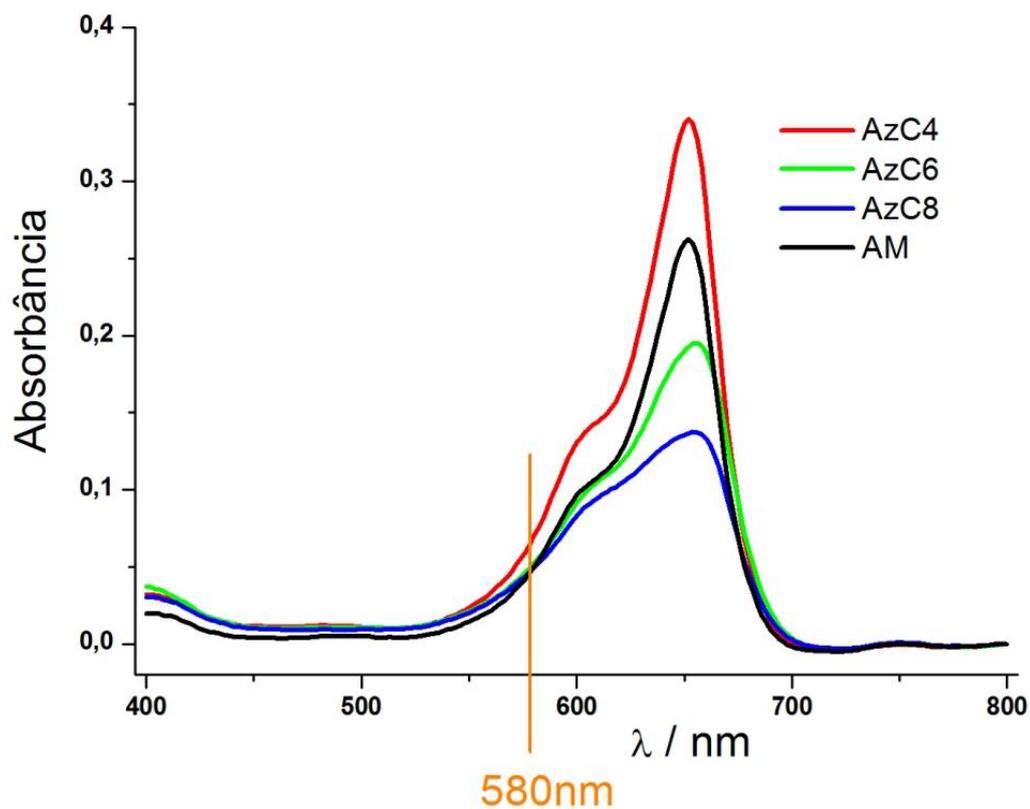


Figura 62 - Espectro de absorção no visível de soluções dos compostos sintetizados AzC_4 , AzC_6 , AzC_8 e do AM em metanol.

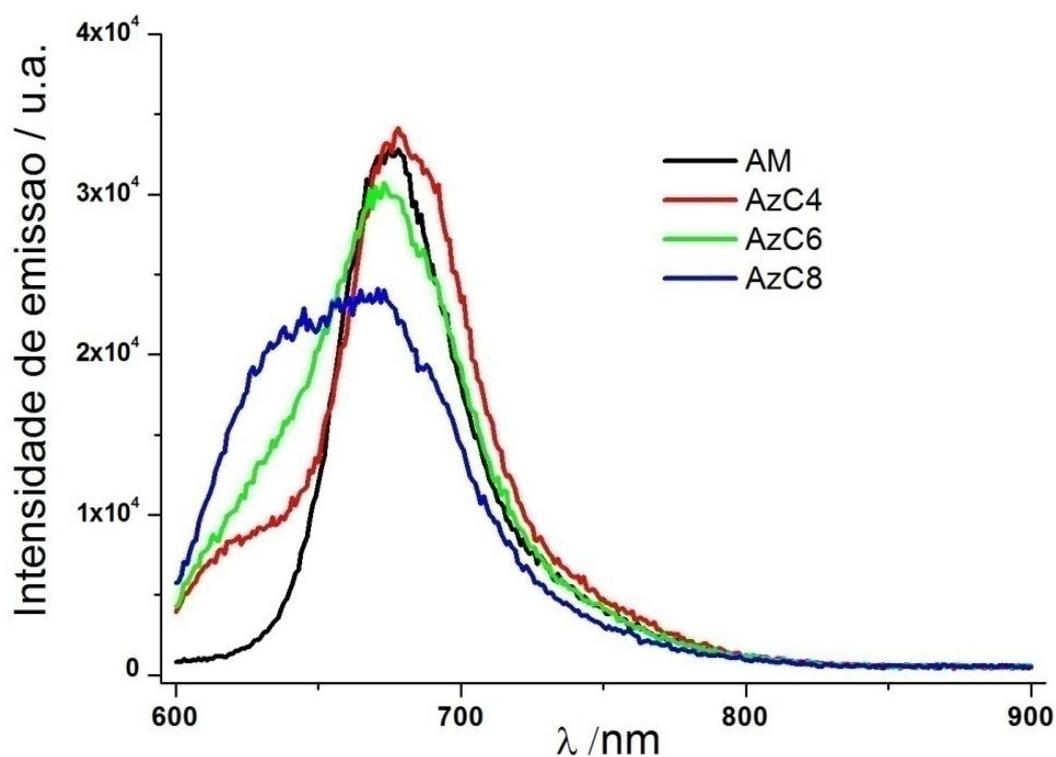


Figura 63 - Espectro de emissão de fluorescência de soluções dos compostos sintetizados AzC_4 , AzC_6 , AzC_8 e do AM em metanol, obtidos com excitação das amostras em 580nm.

Pode-se notar nos espectros de absorção dos compostos AzC₆ e AzC₈ que há um alargamento da banda de absorção e diminuição da absorvidade no máximo. Esse alargamento de bandas também é observado nos espectros de emissão de fluorescência. Isto pode indicar a formação de agregados desses compostos com uma cauda hidrofóbica maior no estado fundamental, que se mantêm no estado excitado, uma vez que nos espectros de emissão de fluorescência pode-se observar a mudança no comprimento de onda máximo de emissão. Esse deslocamento é mais pronunciado quanto maior é a cauda hidrofóbica do composto. As eficiências de fluorescência (φ_f) calculadas para os compostos utilizando-se a equação 2 estão na Tabela 6.

Tabela 6 – Eficiência de fluorescência calculadas para os compostos AzC₄, AzC₆ e AzC₈ em relação ao AM.

Composto	φ_f
AM	0,03 ^a
AzC ₄	0,03
AzC ₆	0,04
AzC ₈	0,04

^a Olmsted, 1979.

Pode-se observar que praticamente não há diferenças significativas entre os φ_f calculadas dos compostos. Além disso, são todos valores bem parecidos com o azul de metileno. Observa-se também que todos os valores de eficiência de fluorescência são pequenos, que é compatível com a utilização destes compostos como FSs na PDT, ou seja, estes compostos no estado excitado singlete estão

perdendo energia por outra via que não é a emissão de fluorescência. Se esta via for a formação de tripletes, favorece a formação do oxigênio singlete.

Para verificar a formação de oxigênio singlete, foram calculadas as eficiências de geração de oxigênio singlete ($\eta\Delta$) de cada composto sintetizado. Para isso foram preparadas soluções dos compostos em clorofórmio e a absorbância de todas as soluções foi ajustada próxima a 0,1 em 532 nm (Figura 64). Nesta condição o mesmo número de fótons é absorvido pelas amostras. Os decaimentos de emissão de oxigênio singlete em 1270nm dessas soluções foram registrados (Figura 65).

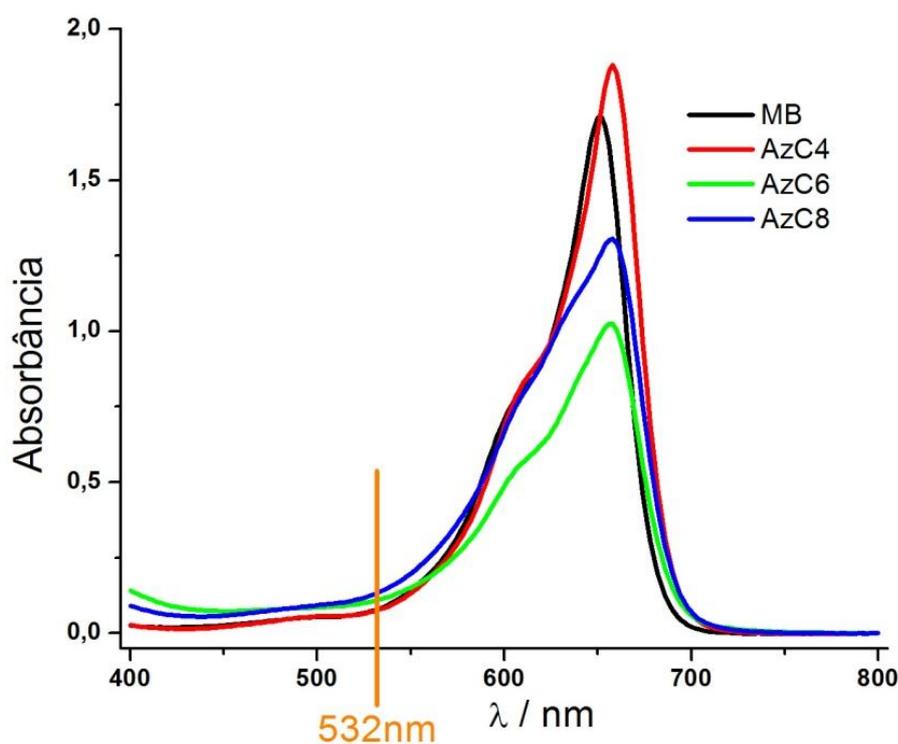


Figura 64 - Espectro de absorção de todos os compostos sintetizados (AzC_4 , AzC_6 , AzC_8) e do AM em clorofórmio.

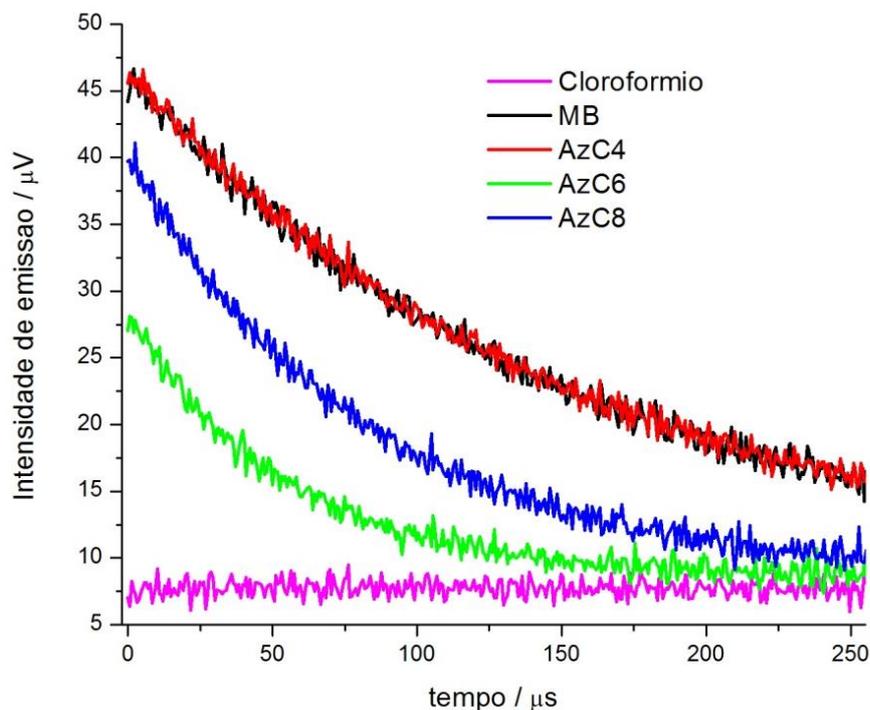


Figura 65 - Decaimento de emissão de 1O_2 em 1270nm de soluções dos compostos AzC₄, AzC₆, AzC₈ e do AM em CH₃Cl. A excitação das soluções foi em 532nm, onde as soluções tinham absorvância igual a 0,1.

Na Figura 65 observa-se que a intensidade de emissão do oxigênio singlete é diferente na série de compostos sintetizados. Esse efeito está relacionado com a eficiência de geração de oxigênio singlete. Com esses resultados e utilizando-se a equação 3, foram calculadas as eficiências de geração de 1O_2 (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores da intensidade de emissão do 1O_2 e valores da eficiência de geração de oxigênio singlete em clorofórmio.

Composto	$I_{\text{emissão}} / \mu V$	η_{Δ}
AM	44,17	0,52
AzC ₄	45,58	0,56
AzC ₆	27,05	0,23
AzC ₈	39,73	0,28

Para o azul de metileno e para o composto AzC₄ a eficiência de geração de ¹O₂ são bem próximas (0,52 e 0,56). Para os compostos AzC₆ e AzC₈ obteve-se valores de η_{Δ} duas vezes menores.

Com esses resultados pode-se concluir que o AzC₄ é o composto que tem maior eficiência de geração de oxigênio singlete em relação aos outros inclusive ao azul de metileno, sendo possivelmente uma molécula mais eficiente para o uso em terapia fotodinâmica (considerando também uma possível maior afinidade em membranas). Entretanto, não era esperado que os outros compostos tivessem uma eficiência de geração de oxigênio singlete tão menor que a do azul de metileno, visto que o núcleo fotoativo das moléculas é o mesmo. Uma hipótese para explicar esse fato é que as caudas presentes nas moléculas facilitariam a agregação das mesmas, principalmente para aquelas que têm as caudas maiores (AzC₆ e AzC₈).

Para verificar essa hipótese foram realizados estudos de agregação desses compostos em micelas de SDS, comparável àquele estudo realizado para o azul de metileno descrito nas Figuras 15 e 16. Primeiramente foram obtidos espectros de absorção dos compostos em água (Figura 66) que foram comparados com espectros obtidos em 1-octanol (Figura 67).

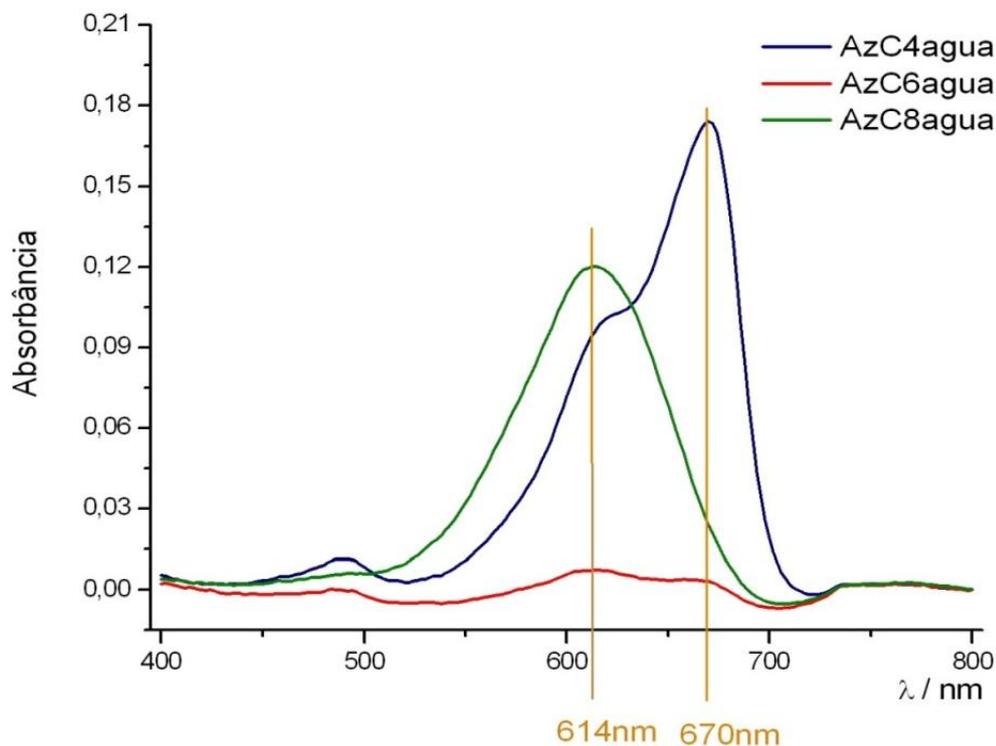


Figura 66 - Espectros de absorção dos compostos AzC₄, AzC₆ e AzC₈ em água.

Nos espectros de absorção dos compostos obtidos em água (Figura 66), pode-se observar que os compostos mais hidrofóbicos possuem bandas em 614 nm (AzC₆ e AzC₈) e o composto com a menor cauda hidrofóbica tem uma banda de absorção em 670 nm. Note também que as bandas de absorção de AzC₆ e AzC₈ (principalmente AzC₈) são mais alargadas e conseqüentemente compatíveis com a formação de agregados. O deslocamento do máximo de absorção para o azul e o alargamento da banda são característicos de agregados tipo H, de forma que fica claro que estes corantes agregam em água [Junqueira et al., 2002].

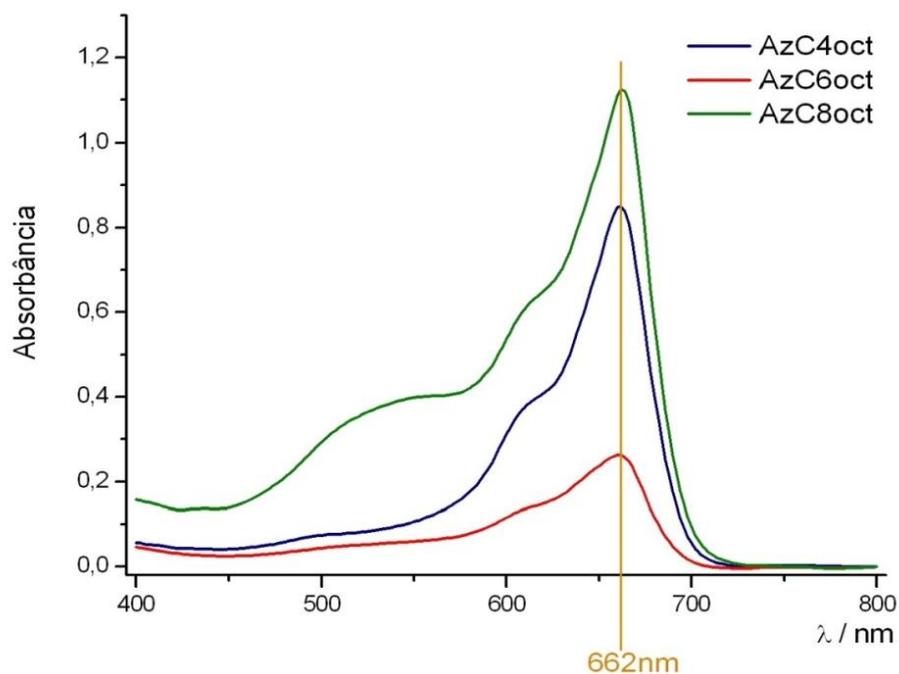


Figura 67 - Espectros de absorção dos compostos AzC_4 , AzC_6 e AzC_8 em 1-octanol.

Nos espectros de absorção obtidos para esses mesmos compostos em 1-octanol (Figura 67), pode-se notar que todos os três compostos possuem bandas em 662 nm e a banda em 614 nm existente nos espectros em água aparece somente como um ombro nos espectros em 1-octanol. Para o composto AzC_4 , o formato do espectro não é muito diferente nos dois solventes (água e 1-octanol), somente observa-se um alargamento da banda de absorção no espectro em água, sugerindo também uma pequena agregação. Sendo assim, o espectros eletrônicos sugerem que todos estes corantes, em maior ou menor grau, agregam em água.

A agregação dos compostos foi também estudada em soluções de SDS. É conhecido que o azul de metileno em soluções de SDS (50 mmolL^{-1}) se apresenta na forma monomérica com máximo de absorção em 664 nm e em soluções mais diluídas de SDS (1 mmolL^{-1}) a forma dimérica, com máximo de absorção em 580 nm, é a espécie predominante [Junqueira et al., 2002] (Figura 15). Para os novos compostos sintetizados foram obtidos espectros de absorção em função da

concentração de SDS. Na Figura 68, pode-se observar a mudança do espectro de absorção do composto AzC₄.

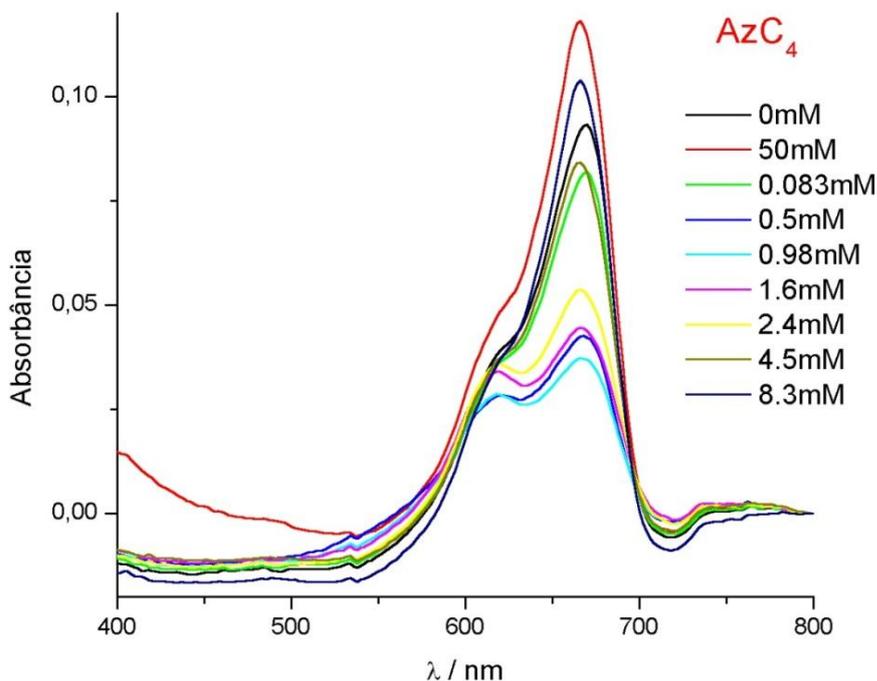


Figura 68 - Espectros de absorção do composto AzC₄ em soluções aquosas de diferentes concentrações de SDS variando de 0 a 50 mmolL⁻¹.

Na ausência de SDS o máximo de absorção para esse composto em solução tampão é de 668 nm. Aumentando-se gradativamente a concentração de SDS de 0,083 mmolL⁻¹ a 0,98 mmolL⁻¹, esse máximo diminui e há a formação de uma banda com máximo de absorção em 620 nm indicando a formação de agregado. Aumentando-se ainda mais a concentração de SDS o pico em 620 nm diminui e o outro pico em 666 nm volta a aumentar de intensidade. Este comportamento é bastante semelhante ao do azul de metileno. Como citado anteriormente, em baixas concentrações de SDS, a razão entre dímero e monômero é maior que 1 e em altas concentrações de SDS essa razão diminui, aumentando a concentração de monômeros presentes em solução [Junqueira et al., 2002] (Figuras 15 e 16).

Para o composto AzC_6 existe também uma variação nos espectros de absorção em função da concentração de SDS (Figura 69). Pode-se observar que na ausência de SDS o espectro de absorção tem uma forma alargada mostrando dois picos de mesma intensidade em 616 nm e 660 nm, indicando que em solução tampão existem agregados (razão entre as absorbâncias em 616 e 660 é 1). Em baixas concentrações de SDS ($0,33 \text{ mmolL}^{-1}$) o máximo em 616 nm se torna mais intenso, mas à medida que se aumenta a concentração de SDS a absorbância em 660 nm aumenta gradativamente e a absorbância em 616 nm diminui. Nestas condições a concentração de monômero em solução é maior que a de agregado.

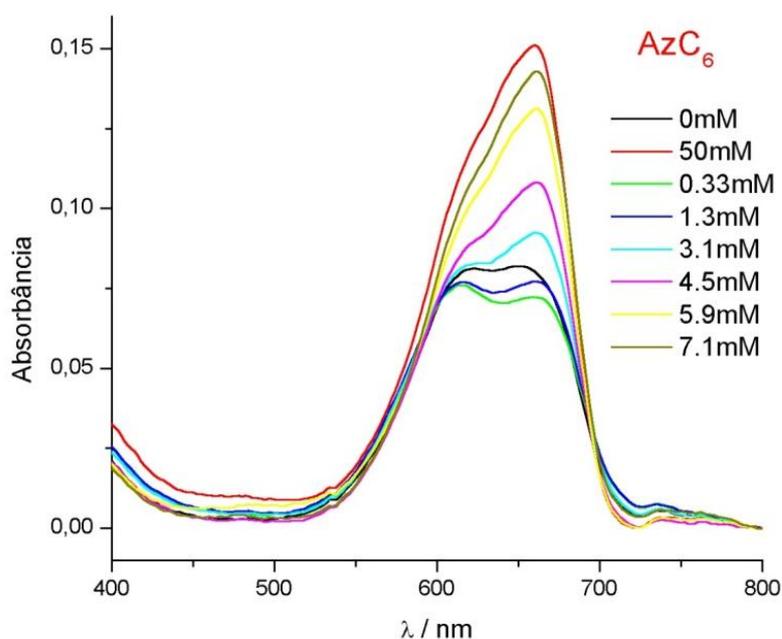


Figura 69 - Espectros de absorção do composto AzC_6 em soluções aquosas de diferentes concentrações de SDS variando de 0 a 50 mmolL^{-1} .

Para o composto AzC_8 , um comportamento semelhante ao AzC_6 é observado (Figura 70). Na ausência de SDS na solução o composto apresenta um espectro de absorção bastante alargado com um máximo de absorbância em 614 nm. Com o aumento da concentração de SDS, essa banda diminui e começa a formar uma banda em 638 nm que aumenta gradativamente. A formação de agregados para

este composto é facilitada, uma vez que é necessária uma concentração maior de SDS ($3,1 \text{ mmolL}^{-1}$) para a razão entre os picos em 614 e 638 nm ser igual a 1.

Pode-se observar também que existe outro pico de absorção em 482 nm que aparece quando o pico em 614 nm começa a diminuir. Em concentrações onde o espectro tem uma forma mais alargada, isto é, onde a razão das intensidades em 614 nm e 638 nm ($\text{Abs}_{614}/\text{Abs}_{638}$) é próxima ou igual a 1, o pico em 482 nm atinge a sua intensidade máxima. Esta banda com o máximo em 482 nm pode ser associada à formação de agregados maiores.

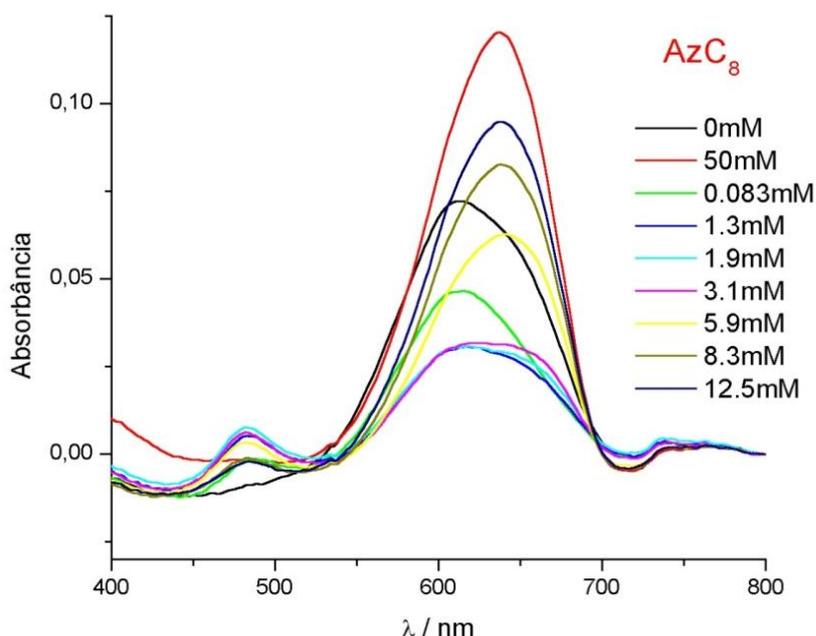


Figura 70 - Espectros de absorção do composto AzC_8 em soluções aquosas de diferentes concentrações de SDS variando de 0 a 50 mmolL^{-1} .

Nos resultados mostrados nos experimentos de agregação realizados com AzC_4 , AzC_6 e AzC_8 é observado que todos os compostos sofrem agregação em soluções aquosas. Em soluções com baixas concentrações de SDS a concentração de agregados aumenta e à medida que a concentração de SDS aumenta ocorre a dissociação dos agregados. É interessante saber se a agregação destes compostos é um fenômeno dirigido por entalpia ou por entropia. Desta maneira experimentos de

absorção em função da temperatura foram realizados primeiramente para o azul de metileno. A partir dos espectros de absorção obtidos em função da temperatura, pôde-se obter a curva da relação dímero/monômero em função da temperatura para uma solução de azul de metileno (Figura 71).

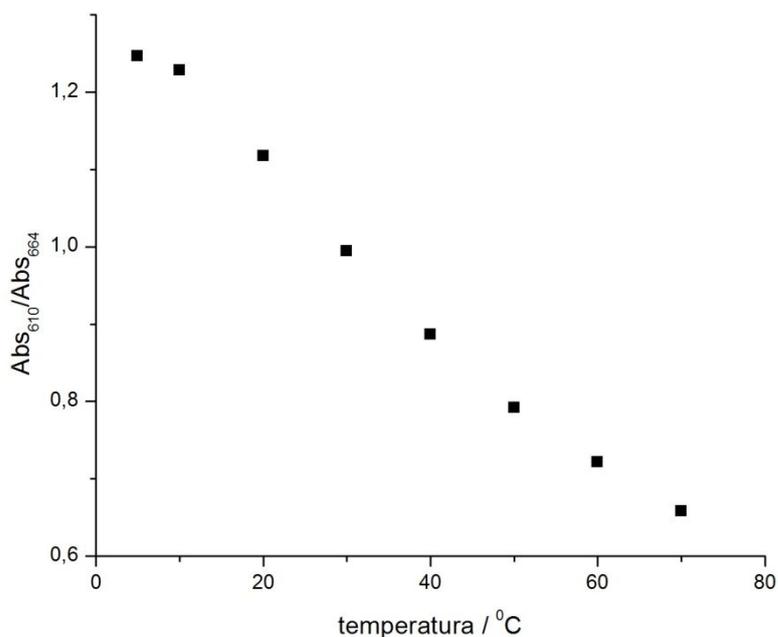


Figura 71 – Razão dímero/monômero em função da temperatura para solução aquosa de azul de metileno $25 \mu\text{molL}^{-1}$.

O valor da constante de dimerização (K_D) para cada temperatura foi obtido deconvoluindo e quantificando a presença de dímeros e monômeros e pela equação de van't Hoff (equação 15) determinou-se os valores de ΔH , ΔG e ΔS (Equações 16 e 17) a 25°C :

$$\frac{d \ln K_D}{dT} = \frac{-\Delta H}{R} \quad 15$$

$$\ln K = \frac{-\Delta G}{RT} \quad 16$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H - \Delta G}{T} \quad 17$$

Foram obtidos os valores de $\Delta H = - 29,3 \text{ kJmol}^{-1}$, $\Delta G_{298} = - 26,5 \text{ kJmol}^{-1}$ e $\Delta S_{298} = - 9,40 \times 10^{-3} \text{ kJmol}^{-1}$. Estes resultados nos mostram que a 25°C a dimerização do azul de metileno é um processo preponderantemente dirigido pela entalpia, devido à contribuição das forças de interação não covalentes. O valor negativo do ΔS ($\Delta S_{298} = - 9,4 \times 10^{-3} \text{ kJmol}^{-1}$) indica que a contribuição entrópica é desfavorável, ou seja, a dimerização do AM não é direcionada pelo efeito hidrofóbico e sim por forças de interação intermolecular. Com o aumento da temperatura, ocorre o aumento da contribuição desfavorável do fator entrópico, causando aumento do valor de ΔG e diminuição do K_{eq} de dimerização. Para avaliar a termodinâmica de agregação do AzC₄, AzC₆ e AzC₈ os espectros de absorção destes compostos foram obtidos em função da temperatura (Figuras 72 a 75).

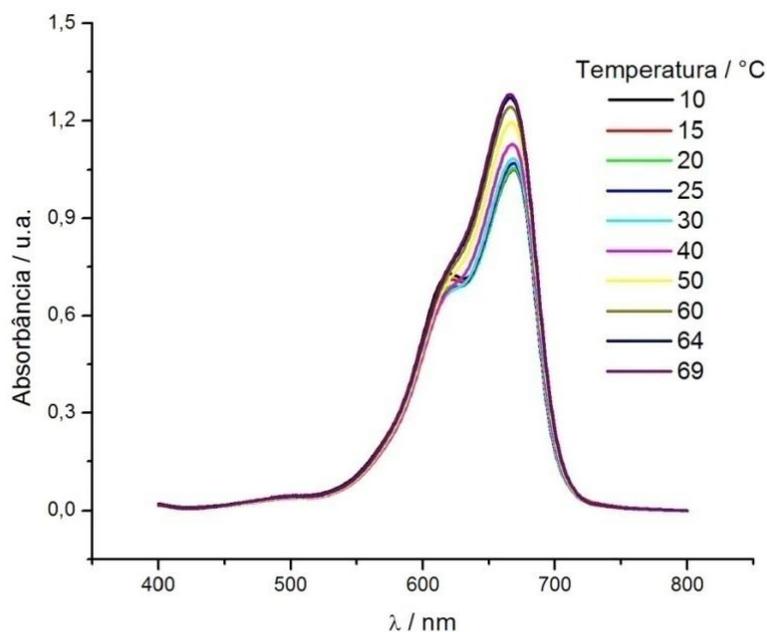


Figura 72 - Espectros de absorbância do composto AzC₄ [$30 \mu\text{molL}^{-1}$] em solução tampão Tris 5 mmolL^{-1} , pH 7,3, em função da temperatura. Absorbância inicial do composto em 10°C é 1,05.

Os espectros de absorbância do composto AzC₄ a $30 \mu\text{molL}^{-1}$ em função da temperatura são mostrados na Figura 72. Pode-se observar o aumento da absorbância no comprimento de onda de 665 nm, que se refere ao monômero e a

diminuição da absorbância em 621 nm, que se refere ao dímero. É importante ressaltar também a ausência de um ponto isosbético, sugerindo a presença de mais espécies em solução além do dímero e do monômero. Note que o espectro de absorção apresenta uma banda alargada na região de 500nm, que pode ser devido a agregados maiores (trímeros, tetrâmeros, etc).

No sentido de minimizar a presença de agregados maiores outro experimento foi realizado com o composto AzC₄ em concentração menor (Figura 73). Pode-se observar que ocorre o mesmo efeito observado para o composto em alta concentração. A presença de máximo de absorção que diminui com o aumento temperatura em 530 nm foi ainda mais evidente do que a apresentada na Figura 72, indicando que realmente ocorrem agregados maiores do que dímeros possivelmente trímeros. Este equilíbrio se desloca para formação de dímero e de monômero com o aumento da temperatura. Uma vez que o AzC₄ já se mostrou agregado em baixas concentrações, para os demais corantes esse experimento foi realizado somente em concentrações baixas (Figuras 74 e 75).

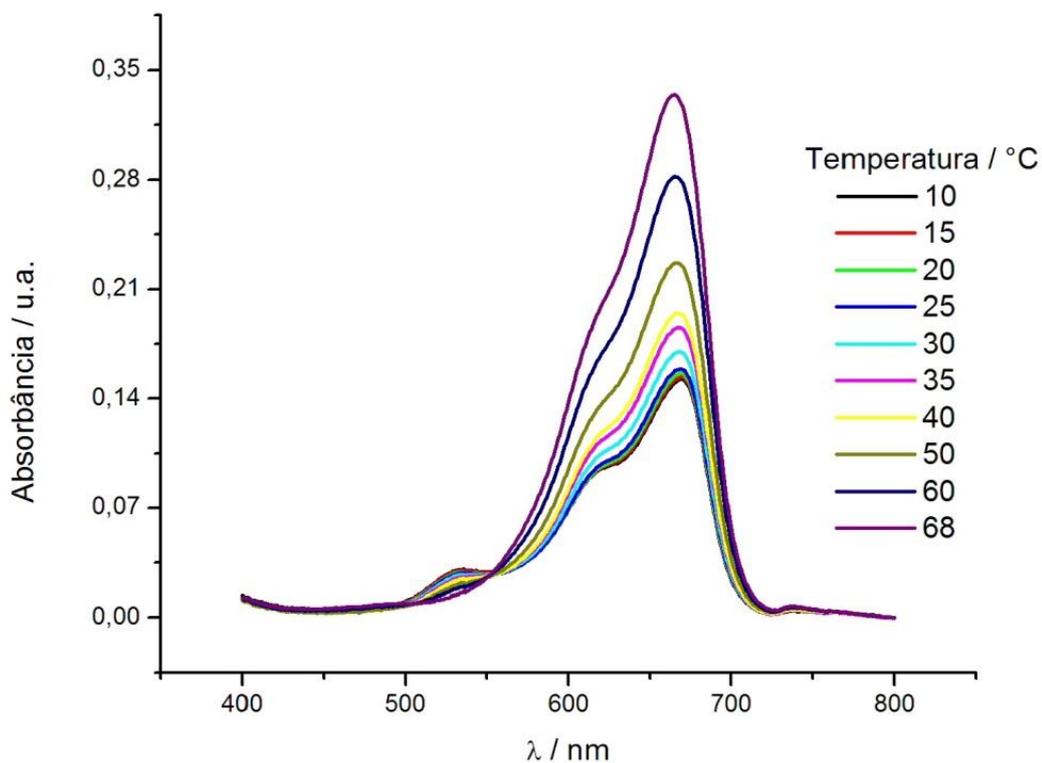


Figura 73 - Espectros de absorvância do composto AzC_4 [$5 \mu\text{molL}^{-1}$] em solução tampão Tris 5 mmolL^{-1} , pH 7,3, em função da temperatura. A absorvância inicial do composto em 10°C é 0,15.

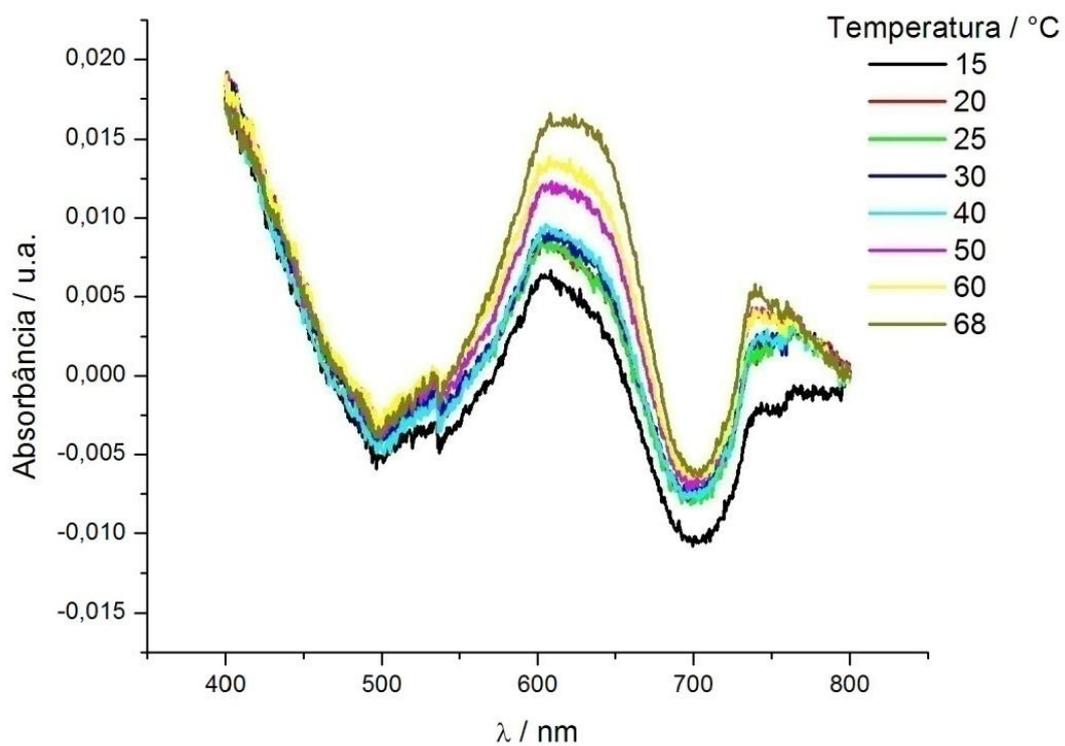


Figura 74 - Espectros de absorvância do composto AzC_6 em solução tampão Tris 5 mmolL^{-1} , pH 7,3, em função da temperatura. A absorvância inicial do composto em 15°C é 0,006.

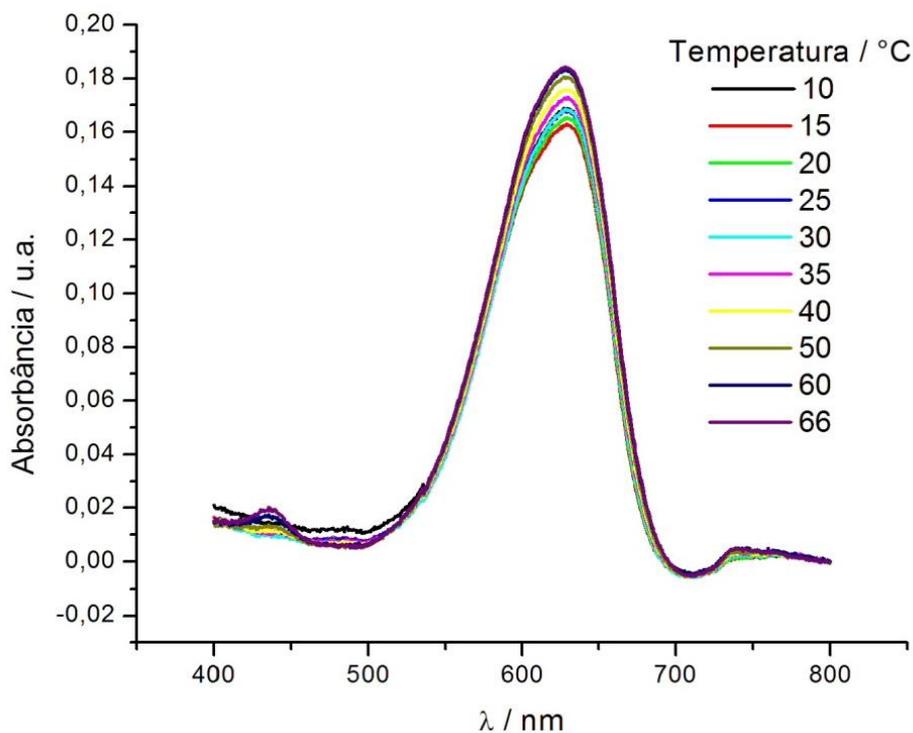


Figura 75 - Espectros de absorvância do composto AzC_8 em solução tampão Tris 5 mmolL^{-1} em função da temperatura. A absorvância inicial do composto em 10°C é 0,17.

Observa-se nas Figuras 74 e 75, a diminuição da absorvância nos comprimentos de onda de máxima absorção do dímero e aumento da absorção do monômero em função do aumento da temperatura, mostrando que todos os compostos inicialmente estão na forma de agregados e com o aumento da temperatura eles sofrem desagregação. A agregação desses compostos é mais pronunciada na temperatura ambiente quando comparada com a agregação do azul de metileno [Junqueira et al., 2002]. Este efeito já era esperado considerando-se que os compostos sintetizados apresentam caudas hidrofóbicas em suas estruturas.

A Figura 76 apresenta um gráfico da absorvância no comprimento de onda máximo de cada composto em função da temperatura. A absorvância foi corrigida, subtraindo-se o valor da absorvância em cada temperatura pelo valor em 10°C para que todas as curvas começassem do mesmo ponto e assim pôde-se fazer uma

comparação direta entre elas. Pode-se observar na Figura 76 que o composto com cadeia alquílica de 4 carbonos é aquele que mais desagrega com o aumento da temperatura, enquanto que os outros compostos com cadeias carbônicas maiores apresentam uma dissociação bem menor.

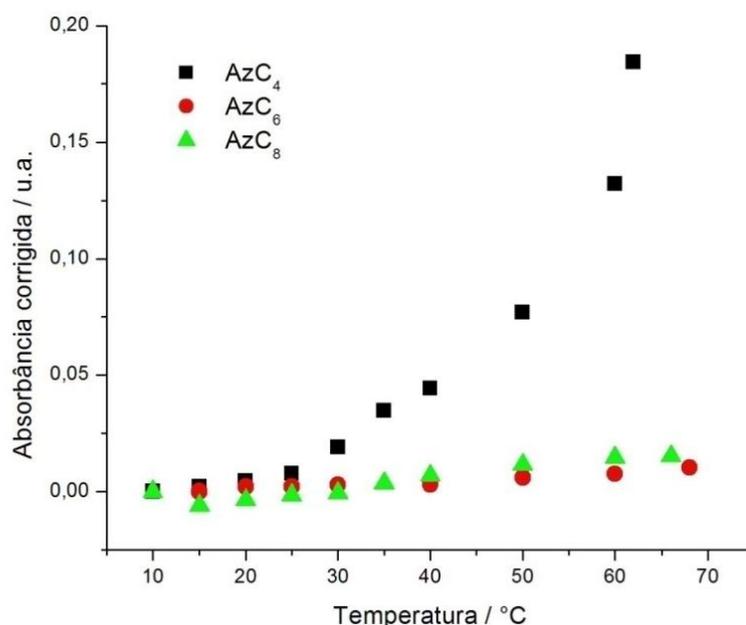


Figura 76 - Absorbância corrigida no comprimento de onda máximo de cada composto em função da temperatura.

No caso do azul de metileno a agregação é um fenômeno dirigido preponderantemente pela entalpia (Figura 71). Embora não se possam calcular os parâmetros de maneira precisa para os novos compostos sabemos também que a entalpia é o fator principal para a agregação. No entanto, para os compostos AzC₆ e AzC₈ não há efeito da temperatura. Para estes compostos é provável que a variação da entropia de agregação seja positiva de tal forma que o aumento da temperatura não leve a diminuição de ΔG de agregação, ou seja, não leve à desagregação. A justificativa da hipótese do ΔS ser positivo é devido ao fato que o aumento da cadeia carbônica leva a um aumento do efeito hidrofóbico. Em outras palavras a energia fornecida ao sistema com o aumento da temperatura não é suficiente para diminuir

as interações hidrofóbicas entre os compostos de caudas maiores. Isso mostra que, como esperado, as interações hidrofóbicas são mais fortes nos compostos com cadeias carbônicas mais extensas.

Sabendo-se que os novos compostos são mais hidrofóbicos que o azul de metileno foram realizados experimentos de incorporação em vesículas e em células HeLa. Nas Figuras 77 a 79 são apresentados os resultados de incorporação em vesículas dos compostos AzC₄, AzC₆ e AzC₈. Os protocolos são os mesmos dos descritos anteriormente.

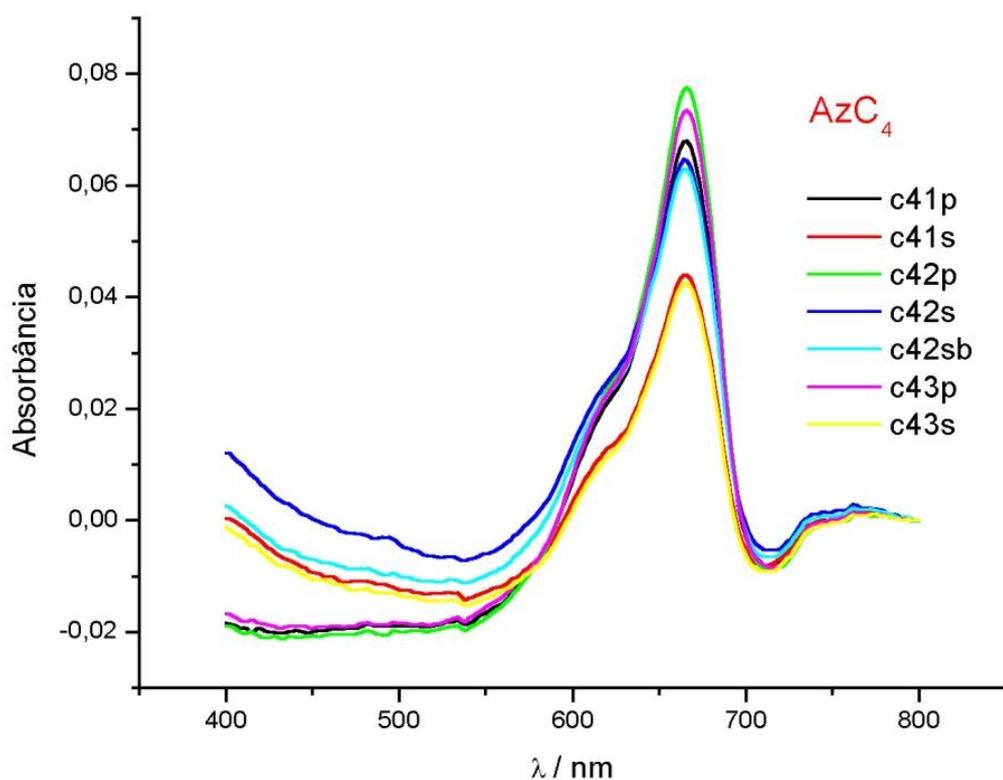


Figura 77 - Espectros de absorção do AzC₄ em tampão Tris 5 mmolL⁻¹, pH 7,3 e SDS 50 mmolL⁻¹. Na legenda do gráfico os números são para as replicatas e as letras P e S para precipitado e sobrenadante, respectivamente.

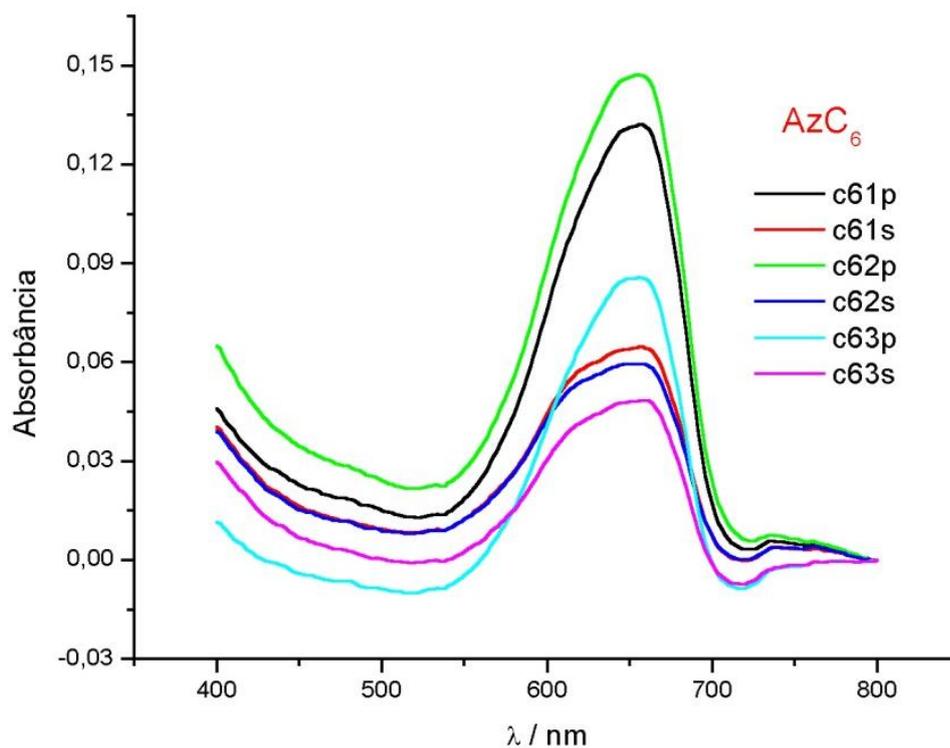


Figura 78 - Espectros de absorção do AzC₆ em tampão Tris 5mmolL⁻¹, pH 7,3 e SDS 50 mmolL⁻¹. Na legenda do gráfico os números são para as replicatas e as letras P e S para precipitado e sobrenadante, respectivamente.

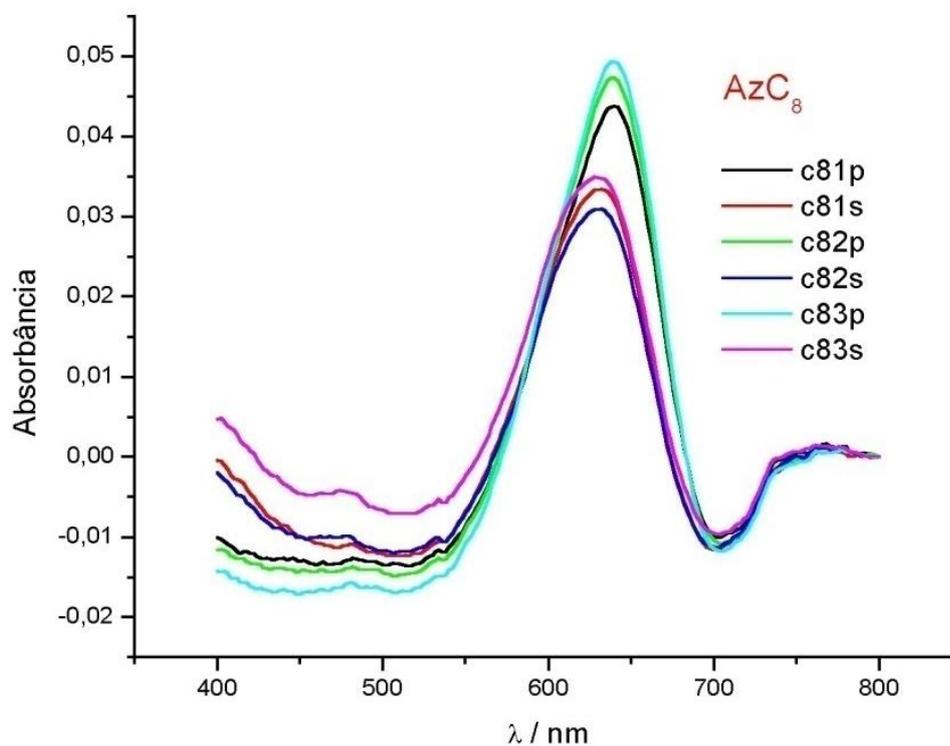
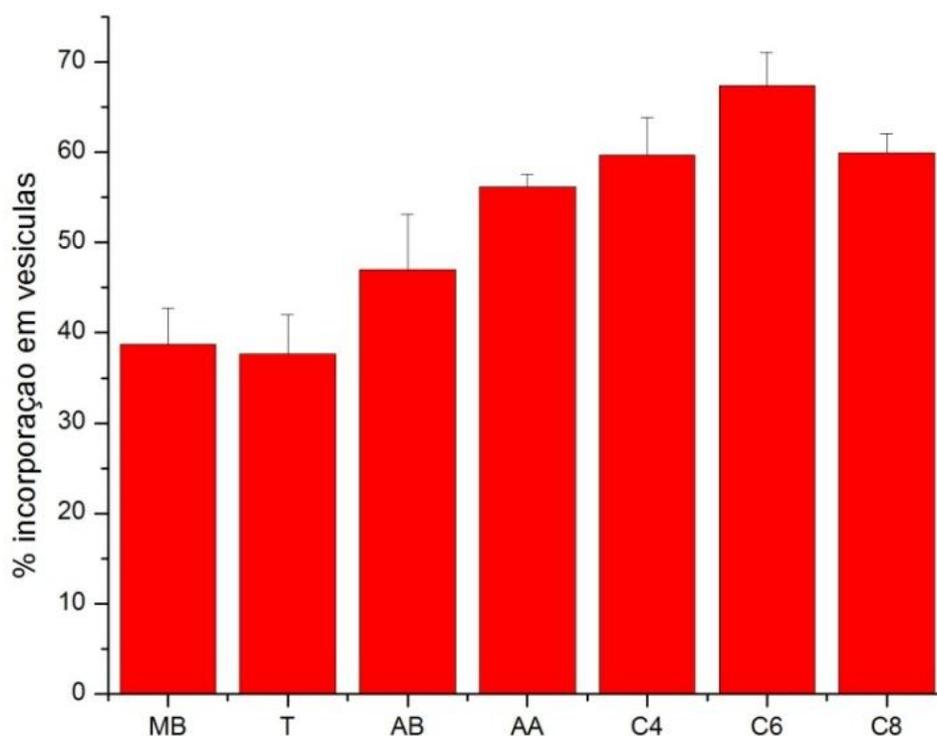


Figura 79 - Espectros de absorção do AzC₈ em tampão Tris 5 mmolL⁻¹, pH 7,3 e SDS 50 mmolL⁻¹. Na legenda do gráfico os números são para as replicatas e as letras P e S para precipitado e sobrenadante, respectivamente.

Tabela 8- Incorporação em vesículas dos compostos comerciais e sintetizados.

Composto	Incorporação
MB	0,39 ± 0,04
Tionina	0,38 ± 0,04
AzB	0,47 ± 0,06
AzA	0,56 ± 0,01
AzC ₄	0,60 ± 0,04
AzC ₆	0,67 ± 0,04
AzC ₈	0,60 ± 0,02

Os resultados apresentados na Tabela 8 e na Figura 80 mostram que os compostos AzC₄, AzC₆ e AzC₈ incorporam em torno de 40% mais em vesículas quando comparados com os outros fenotiazínicos.

**Figura 80** - Porcentagem de incorporação em vesículas dos corantes comerciais e dos compostos sintetizados.

A discussão sobre a influência da simetria na incorporação dos corantes em vesículas é evidenciada com os resultados mostrados na Figura 80. É possível observar o aumento da incorporação com o aumento da cauda hidrofóbica da molécula (até AzC₆) e da assimetria da molécula. Os compostos com caudas hidrofóbicas têm uma interação hidrofóbica maior com as vesículas, sendo ancorados com maior eficiência.

O estudo de incorporação em células HeLa foi realizado com todos os corantes sintetizados e comparados com o azul de metileno. A incorporação foi estudada com uma concentração de 20 μmolL^{-1} para todos os corantes (Figura 81). Pode-se observar que o composto AzC₄ é o que apresenta a maior taxa de incorporação seguida pelo AzC₆ e AzC₈, ou seja, a incorporação do corante não é proporcional ao tamanho da sua cauda hidrofóbica. Uma pequena cauda de quatro carbonos (AzC₄) permite que o corante se incorpore mais do que um composto com cauda maior (AzC₆ e AzC₈). Estes resultados são distintos daqueles obtidos com vesículas sintéticas (Figura 80), onde se observa maior incorporação com o aumento da cadeia. Na Figura 82, é apresentado o resultado da incorporação em vesículas juntamente com os resultados obtidos com as células HeLa.

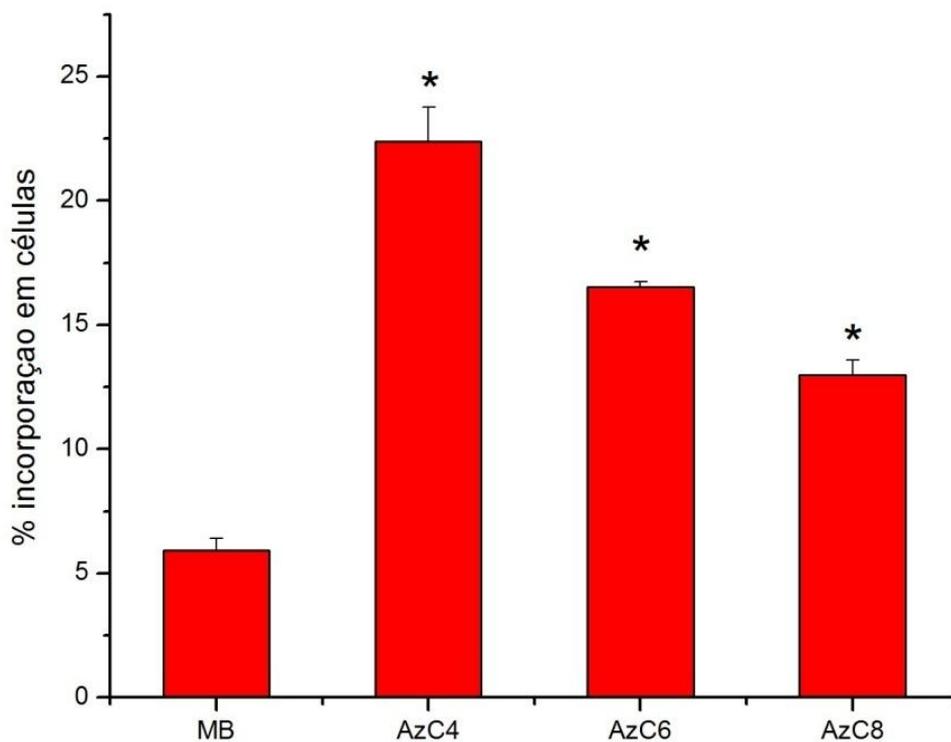


Figura 81 - Porcentagem de incorporação dos corantes AzC₄, AzC₆ e AzC₈ em células HeLa. *dados significativamente diferentes da incorporação do azul de metileno ($P < 0,05$).

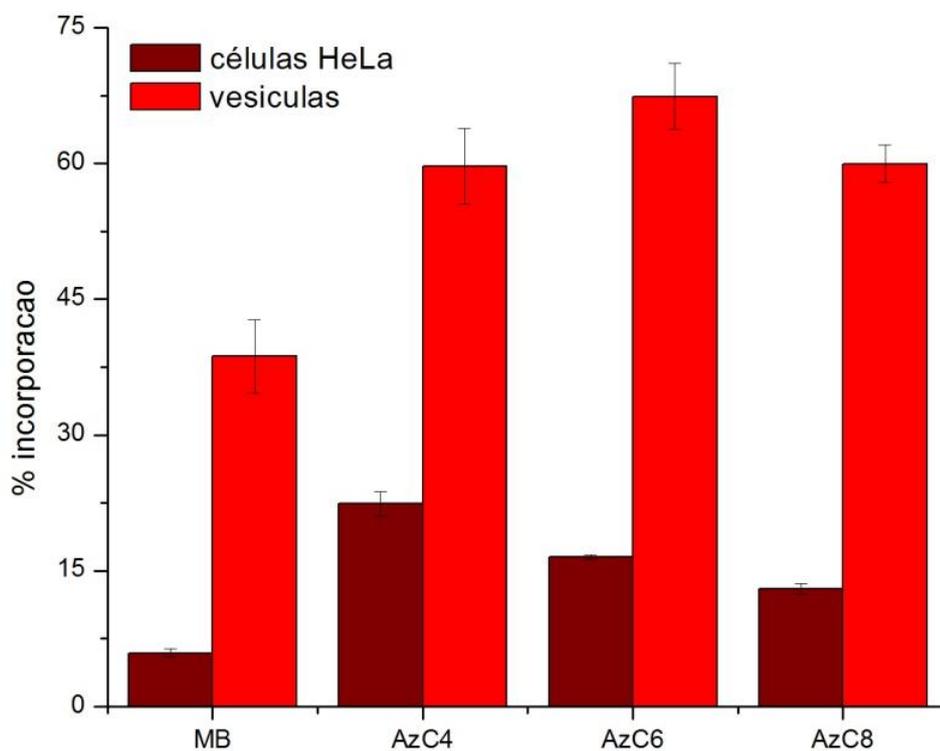


Figura 82 - Porcentagem de incorporação dos corantes AzC₄, AzC₆ e AzC₈ em células HeLa e em vesículas.

Anteriormente foi discutida a incorporação dos corantes em vesículas relacionando esse efeito à assimetria e ao aumento da porção hidrofóbica da molécula. O resultado obtido com células leva a outra discussão: além do efeito hidrofóbico entre as caudas hidrofóbicas dos corantes e dos lipídios na membrana ou na vesícula há também um efeito de agregação que é preciso considerar que há mais um equilíbrio que afeta a interação com as membranas. Outra questão que precisa ser considerada é a diferença de fluidez entre as membranas das vesículas e das células.

Todos os compostos estudados são igualmente carregados. A membrana celular possui lipídios que têm a cabeça polar carregada negativamente (5 - 10%), além de proteínas e carboidratos. Desta forma, os compostos vão ser primeiramente atraídos, por uma interação eletrostática. Próximo da membrana começa ocorrer a interação hidrofóbica entre as caudas não-polares dos lipídios e dos compostos. O primeiro passo (atração eletrostática) é igual para os compostos e o segundo passo (efeito hidrofóbico) é que causa diferença na incorporação dos corantes. No entanto, para os fotossensibilizadores se distribuírem nas membranas em função da tendência físico-química (efeito hidrofóbico) têm que vencer a barreira para poder penetrar na membrana. Esta barreira é dependente do empacotamento dos lipídios na membrana celular.

No resultado mostrado na Figura 82 é possível observar que a incorporação para ambos os casos aumenta até certo ponto à medida que a cauda hidrofóbica dos compostos é maior e depois volta a diminuir. que na série de compostos anfifílicos, o composto com a menor cauda hidrofóbica é o mais incorporado em células HeLa, ou seja, possivelmente as caudas hidrofóbicas maiores dos demais compostos causam uma dificuldade maior para penetrar e interagir com a parte

apolar dos lipídios por causa da rigidez da membrana celular e da possível agregação dos corantes. Em vesículas, compostos com cauda maior conseguem interagir mais com os lipídios porque eles estão mais acessíveis à droga, uma vez que a fluidez na vesícula é maior.

Foram realizados experimentos de viabilidade celular com os novos compostos sintetizados para comparar com o azul de metileno. As Figuras 83 a 85 mostram os resultados obtidos com as drogas moléculas AzC₄, AzC₆ e AzC₈.

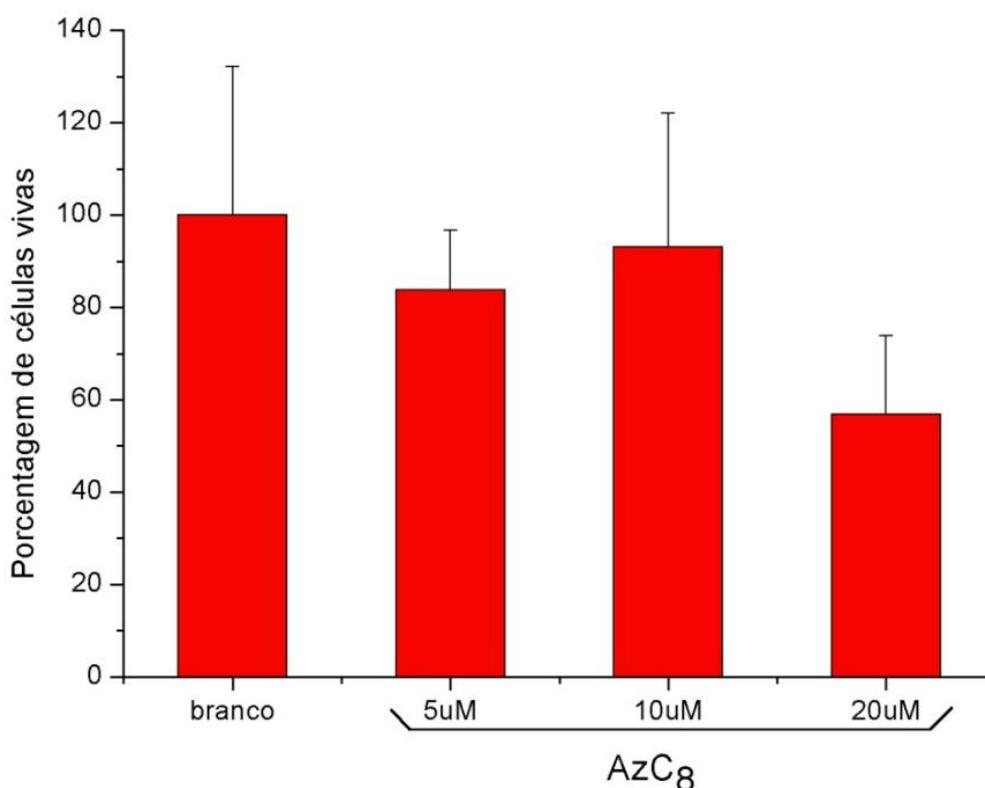


Figura 83 - Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de AzC₈ após 3 horas de incubação.

A viabilidade celular do composto AzC₈ é igual a do controle (considerando o erro estatístico) para as concentrações de 5 e 10 μmolL^{-1} . Somente quando foi utilizado 20 μmolL^{-1} de AzC₈ houve morte celular significativa, onde cerca de 60% das células permaneceram vivas após a incubação. O composto AzC₆ apresentou

menor toxicidade que o AzC₈. Todas as concentrações que foram aplicadas não induziram morte celular significativa (Figura 84).

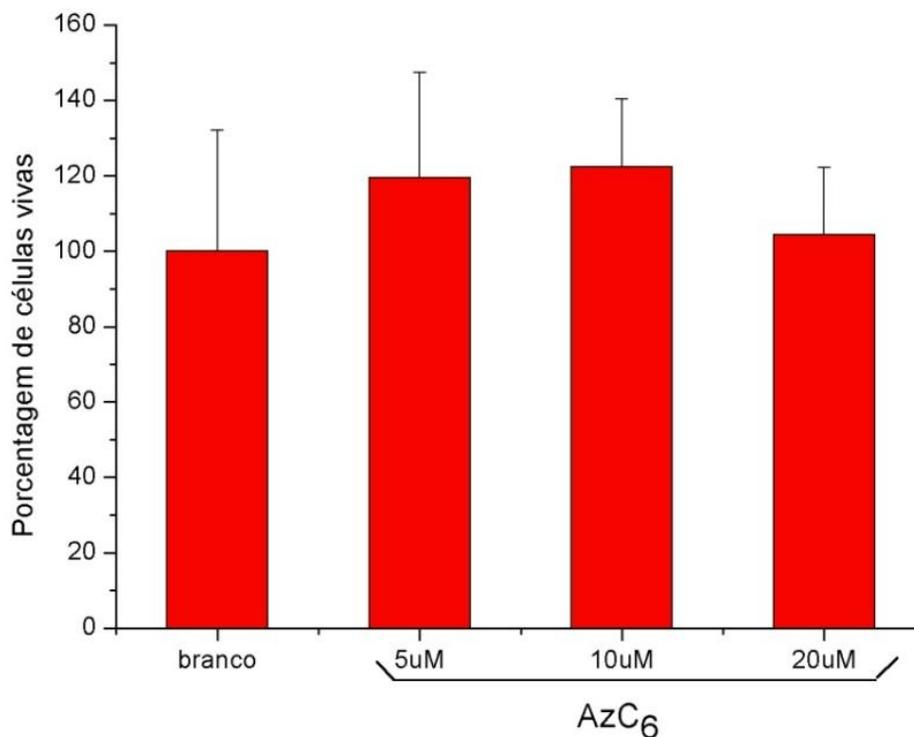


Figura 84 - Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de AzC₆ após 3 horas de incubação.

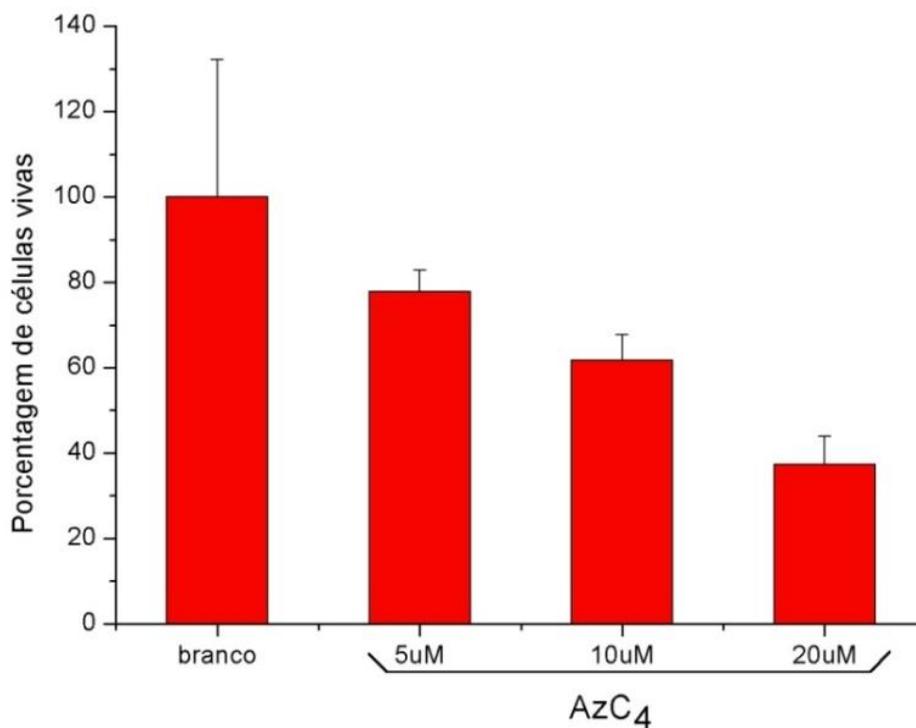


Figura 85 - Porcentagem de células HeLa vivas em função da concentração de AzC₄ após 3 horas de incubação.

Ao contrário, os resultados com o AzC₄ (Figura 85) mostram que a morte celular aumenta com a concentração do corante. Dentre todos os corantes estudados, esse é o único que já apresenta morte celular em baixa concentração de corante (5 μmolL^{-1}) e a medida que a concentração da droga aumenta a viabilidade celular diminui, provavelmente devido à maior incorporação deste composto. É interessante ressaltar que a viabilidade celular é bem menor quando comparada com os demais corantes fenotiazínicos. Com 5 μmolL^{-1} de AzC₄ as células apresentam uma porcentagem de morte que com outras drogas era observada somente com o dobro da concentração. Aumentando-se a dose da droga, aumenta-se linearmente a morte celular. 20 μmolL^{-1} de AzC₄ induz a cerca de 60% de morte celular. Este é, portanto, o composto que tem a maior toxicidade no escuro dentre todos os estudados. É possível que a maior morte celular no escuro do AzC₄ seja devido a sua maior incorporação em células HeLa (Figura 82).

Também foram realizados experimentos de fototoxicidade celular dos compostos. Para esse estudo escolhemos a concentração de 20 μmolL^{-1} . A Figura 86 mostra os resultados de fototoxicidade obtidos para o azul de metileno, AzC₄ e AzC₆.

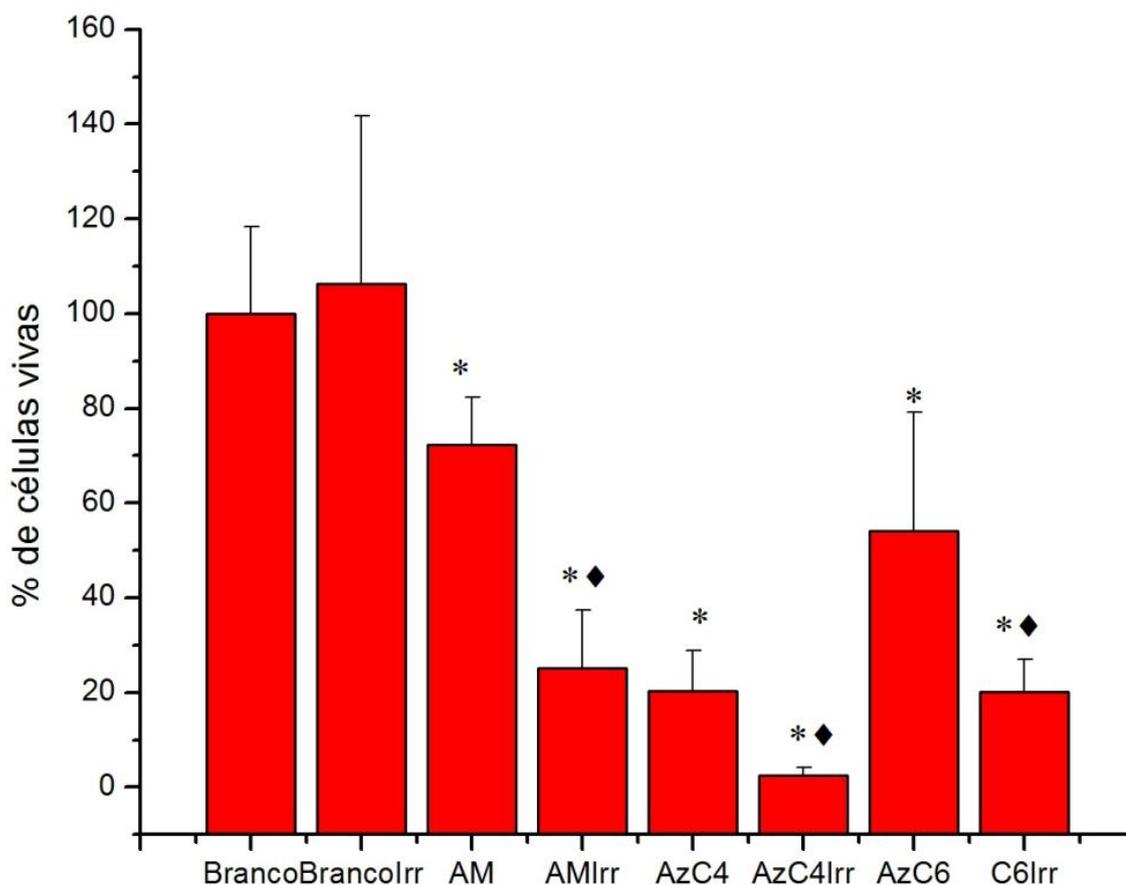


Figura 86 - Porcentagem de células HeLa vivas após tratamento com $20 \mu\text{molL}^{-1}$ dos corantes azul de metileno, AzC₄ e AzC₆. Branco, AM, AzC₄ e AzC₆ – sem irradiação (escuro); Branco Irr, AMIrr, AzC₄Irr e AzC₆Irr – irradiação com laser 650 nm. *dados significativamente diferente do Branco, ◆dados significativamente diferentes do composto não irradiado.

As células que não foram tratadas com nenhum fotossensibilizador (Branco) são consideradas como o número total de células vivas. Pode-se observar na Figura 86, que as células que não foram tratadas com fotossensibilizador, mas foram irradiadas com laser, não apresentam mudança significativa de viabilidade comparadas com o branco, indicando que o laser não provoca morte celular.

Tratando as células com azul de metileno no escuro, observa-se que cerca de 70% das células permanecem vivas após o tratamento. Depois de serem irradiadas, as células apresentaram uma sobrevivência de 25%. Quando as células foram

tratadas com AzC₄, houve grande morte celular no escuro (80%) e após o tratamento com o laser somente 2% das células permaneceram vivas.

O composto AzC₆ apresenta um comportamento bastante similar ao azul de metileno tanto no escuro quanto após o tratamento com o laser. Cerca de 50% das células sobrevivem no escuro e somente 20% permanecem vivas após a irradiação.

A Figura 87 apresenta os resultados obtidos para o composto AzC₈ assim como uma repetição do experimento com azul de metileno que é utilizado como padrão.

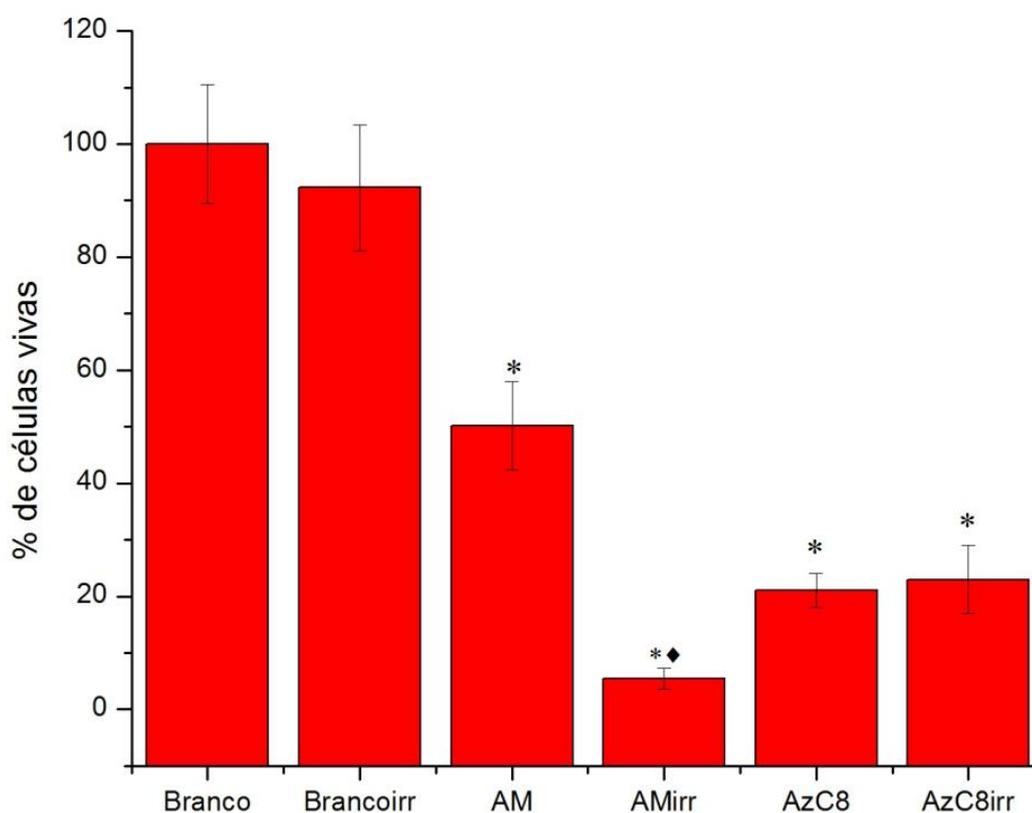


Figura 87 - Porcentagem de células HeLa vivas após tratamento com $20 \mu\text{molL}^{-1}$ dos corantes azul de metileno, AzC₈. Branco, AM, AzC₈ – sem irradiação (escuro); Branco Irr, AMIrr, AzC₈Irr – irradiação com laser 664 nm. *dados significativamente diferente do Branco, ♦dados significativamente diferentes do composto não irradiado.

Neste experimento as células tratadas com AzC₈ apresentaram sobrevivência de apenas 22% no escuro, metade do que foi apresentado na Figura 83. Este

resultado deve ser devido a agregação do composto que dificulta a reprodutibilidade. Após a irradiação o composto AzC₈ não apresentou morte celular maior que o tratamento no escuro. Esse fato indica que este composto não é um bom fotossensibilizador, uma vez que não há diferença significativa entre o tratamento no escuro e com irradiação laser.

5. CONCLUSÕES

A constante de dimerização do azul de metileno ($3,8 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{L}$) em soluções aquosas foi calculada corroborando com o valor encontrado na literatura de $4 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ [Bergmann e O'Konski, 1963]. Também foi obtido o valor do coeficiente de absorvidade molar do dímero do azul de metileno de $4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{L}$. O efeito da adição de AM em soluções de SDS foi estudado e observou-se que o AM diminui a concentração micelar crítica aparente do SDS de 7 mmolL^{-1} para $70 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$. Concomitantemente, o SDS também altera o equilíbrio monômero/dímero do AM, quando a concentração de SDS em solução é baixa, o equilíbrio do AM é deslocado para a formação de dímeros, efeito que foi observado pelo aumento da absorbância em 580 nm e com a diminuição da emissão de fluorescência. Em altas concentrações de SDS somente monômeros de AM estão presentes em solução. Estudos fotoquímicos mostraram a presença de diferentes espécies transientes dependentes das condições do sistema. Em altas concentrações de SDS foi observada a presença do triplete de azul de metileno, apresentando tempo de vida de $1,6 \text{ }\mu\text{s}$, que corrobora com o processo de desativação de tripletes por colisão com oxigênio, formando oxigênio singlete (mecanismo Tipo II). Em baixas concentrações de SDS, o triplete de AM foi observado, mas com um tempo de vida muito mais curto (40 ns). Depois de $1 \text{ }\mu\text{s}$ estava presente a espécie radical do AM (radical semi-reduzido) com tempo de vida compatível com mecanismo de desativação por oxigênio (mecanismo Tipo I). Estes resultados mostram que o mecanismo fotoquímico celular dos fenotiazínicos pode ser uma composição de reações iniciadas ou por oxigênio singlete ou por radicais.

Além da mudança fotoquímica dependente do equilíbrio monômero/dímero, foram observadas diferenças nos processos fotoquímicos dependentes do tipo de

sistema utilizado para a indução de dímeros em solução. Sistemas biomiméticos diferentes mostraram diferentes intensidades de fluorescência e diferentes espectros de espalhamento de luz ressonante (ELR), constatando-se a formação de diferentes tipos de dímeros. Concluiu-se que dímeros induzidos por micelas reversas apresentam comportamento semelhante àquele observado para monômeros em solução (formação de tripletes e conseqüentemente geração de 1O_2), indicando que esses dímeros estão fracamente associados na interface e sofrem dissociação no estado excitado. Dímeros induzidos por SDS, por sua vez, geram espécies radicalares no estado excitado apresentando reações de transferência de elétrons, indicando que se mantêm associados na interface no estado excitado.

Os experimentos de incorporação dos fotossensibilizadores fenotiazínicos, em vesículas e em células mostraram que moléculas assimétricas são mais incorporadas que as moléculas simétricas. A técnica de voltametria com microeletrodos que se mostrou promissora, os valores de logP foram calculados e se mostraram mais concordantes e apresentaram um menor desvio padrão comparados com aqueles obtidos por espectrofotometria e o procedimento também mostrou boa repetibilidade.

Os estudos de fototoxicidade com células HeLa dos compostos assimétricos apresentaram uma morte celular maior que os compostos simétricos. Calculando-se a razão entre a porcentagem de morte celular e a incorporação para cada FS, os compostos simétricos se mostraram mais eficientes por molécula que os compostos simétricos.

Dando continuidade ao estudo da relação estrutura/atividade, foi proposta a síntese de novos compostos. Foram sintetizados compostos derivados do Azure A, que possuem o núcleo fenotiazínico, mas com duas caudas hidrofóbicas de 4, 6 e 8

carbonos (AzC₄, AzC₆ e AzC₈). A eficiência de fluorescência desses novos compostos foram calculadas e apresentam valores semelhantes ao AM se mostrando que são promissores para o uso em PDT.

Em estudos de eficiência de geração de oxigênio singlete, o composto AzC₄ apresentou eficiência de geração de oxigênio singlete de 0,56. Os outros dois compostos apresentam uma eficiência de geração de oxigênio singlete cerca de duas vezes menor. O fato de possuírem caudas hidrofóbicas maiores facilita a interação hidrofóbica, aumentando a agregação destes compostos e tornando a eficiência de geração de oxigênio singlete menor.

A incorporação destes novos compostos em vesículas é maior que os compostos comerciais indicando que a assimetria da molécula e o comprimento da cauda hidrofóbica favorecem a incorporação. Resultados de incorporação em células HeLa mostram que o composto com menor cauda hidrofóbica incorpora mais que os de caudas maiores. Este resultado pode ser explicado pela maior dificuldade dos compostos com caudas maiores de interagirem com a membrana celular devido à sua maior rigidez comparada com a membrana das vesículas sintéticas. Nos estudos de toxicidade o composto AzC₄ é o que apresentou maior morte celular devido à maior incorporação do corante. Os resultados com fenotiazínicos assimétricos e com as novas moléculas sintetizadas mostraram que embora a assimetria molecular favoreça a ligação em membranas e a incorporação em células a eficiência fotodinâmica por molécula parece diminuir. A explicação desta diminuição ainda não é conhecida e sugere a necessidade de mais estudos no nível celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arggawal, L. P. F.; Borissevitch, I. E. "On the dynamics of the TPPS₄ aggregation in aqueous solution. Successive formation of H and J aggregates" *Spectrochimica Acta Part A*, **2006**, 63, 227-233.

Baptista, M. S.; Indig, G. L. "Mechanism of photobleaching of Ethyl Violet non-covalently bound to bovine serum albumin" *Chemical Communications*, **1997**, 18, 1791-1792.

Baptista, M. S.; Indig, G. L. "Effect of BSA binding on photophysical and photochemical properties of triarylmethane dyes" *Journal of Physical Chemistry B*, **1998**, 102, 4678-4688.

Baptista, M. em "Handbook of polyelectrolytes and their applications" Tripathy, S. K., Kumar, J. and Nalwa, H. S., American Scientific Publishers, **2002**, p.165-171.

Baur, J. E.; Wightman, R. M. "Diffusion Coefficients determined with microelectrodes" *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1991**, 305, 73-81.

Ben-Dror, S.; Bronshtein, I.; Wiehe, A.; Roder, B.; Senge, M. O.; Ehrenberg, B. "On the correlation between hydrophobicity, liposome binding and cellular uptake of porphyrin sensitizers" *Photochemistry and Photobiology*, **2006**, 82(3), 695-701.

Bergmann, K., O'Konski, C. T. "A spectroscopic study of methylene blue monomer, dimer, and complexes with montmorillonite" *Journal of Physical Chemistry*, **1963**, 67, 2169-2177.

Biolo, R.; Jori, G.; Soncin, M.; Rihter, B.; Kenney, M. E.; Rodgers, M. A. J. "Effect of Photosensitizer Delivery System and Irradiation Parameters on the Efficiency of Photodynamic Therapy of B16 Pigmented Melanoma in Mice" *Photochemistry and Photobiology*, **1996**, 63(2), 224-228.

Bond, A. M.; Oldham, K. B.; Zoski, C. G. "Steady-state voltammetry" *Analytica Chimica Acta*, **1989**, 216, 177-230.

Bonneau, R., Pottier, R., Bagno, O., Jousset-Dubien, J. "pH dependence of singlet oxygen production in aqueous solutions using thiazine dyes as photosensitisers" *Photochemistry and Photobiology*, **1975**, 21, 159-163.

Borba, E. B.; Amaral, C. L. C.; Politi, M. J.; Villalobos, R.; Baptista, M. S. "Photophysical and photochemical properties of pyramine/methyl viologen complexes in solution and in supramolecular aggregates: a switchable complex" *Langmuir*, **2000**, 16, 5900-5907.

Borissevitch, I. E.; Tominaga, T. T.; Iamasato, H.; Tabak, M. "Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation" *Journal of Luminescence*, **1996**, 69, 65-76.

Bourdelande, J. L.; Karzazi, M.; Dixelio, L. E.; Litter, M.I.; Tura, G. M.; Román, E. S.; Vinent, V. "Phtalocyanines Bound to Insoluble Polystyrene. Synthesis and Properties as Energy-Transfer Photosensitizers" *Journal of Photochemistry and Photobiology A - Chemistry*, **1997**, 108, 273-282.

Bronshtein, I.; Afri, M.; Weitman, H.; Frimer A. A.; Smith K. M.; Ehrenberg, B. "Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency" *Biophysical Journal*, **2004**, 87, 1155–1164.

Caetano, W.; Haddad, P. S.; Itri, R.; Severino, D.; Vieira, V. C.; Baptista, M. S.; Schroeder, A. P.; Marques, C. M. "Photo-Induced Destruction of Giant Vesicles in Methylene Blue Solutions" *Langmuir*, **2007**, 23, 1307-1314.

Caetano, W.; Tabak, M. "Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with anionic sodium dodecil sulfate (SDS) micelles: electronic absorption and fluorescence studies" *Journal of Colloid and Interface Science*, **2000**, 225, 69-81.

Castano, A. P.; Deminova, T. N.; Hamblin, M. R. "Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, 279-293.

Castano, A. P.; Deminova, T. N.; Hamblin, M. R. "Mechanisms in photodynamic therapy: part two – cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005a**, 2, 1-23.

Castano, A. P.; Deminova, T. N.; Hamblin, M. R. "Mechanisms in photodynamic therapy: part three – Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor, localization and modes of tumor destruction" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005b**, 2, 91-106.

Chan, M. S.; Bolton, J. R. "Structures, reduction potentials and absorption maxima of synthetic dyes of interest in photochemical solar-energy storage studies" *Solar Energy*, **1980**, 24, 561-574.

Correia, A. N.; Mascaro, L. H.; Machado, S. A. S.; Mazo, L. H.; Avaca, L. A. "Ultramicroeletrodos. Parte I: Revisão Teórica e Perspectivas" *Química Nova*, **1995**, 18(5), 475-80.

Cosa, G.; Scaiano, J.C. "Laser techniques in the study of drug photochemistry" *Photochemistry and Photobiology*, **2004**, 80, 159-174.

Danziger, R. M.; Bar-Eli, K. H.; Weiss, K., "The laser photolysis of methylene blue" *Journal of Physical Chemistry* **1967**, 71, 2633-2640.

Dearden, J. C.; Bresnen, G. M. "The measurement of partition coefficients" *Quantitative Structure-activity relationships*, **1988**, 7, 133-144.

Demas, J. N.; Crosby, G.A. "The measurement of photoluminescence quantum yields. A review." *The Journal of Physical Chemistry*, **1971**, 75(6), 991-1024.

Detty, M. R., Gibson, S. L.; Wagner, S.J. "Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy" *Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, 47, 3897-3915.

Dougherty, T. J.; Kaufman, J. E.; Goldfarb, A.; Weishaupt, K. R.; Boyle, D.; Mittleman, A. "Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors" *Cancer research*, **1978**, 38, 2628-35.

Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbek, M.; Moan, J.; Peng, Q. "Photodynamic therapy" *Journal of the National Cancer Institute*, **1998**, 90, 889-905.

Ehrenberg, B. "Assessment of the partitioning of probes to membranes by spectroscopic rotation" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1992**, 14, 383-386.

Engelmann, F. M.; Rocha, S. V. O.; Toma, H. E.; Araki, K.; Baptista, M. S. "Determination of n-octanol/water partition coefficient and membrane binding of cationic porphyrins" *International Journal of Pharmaceutics*, **2007a**, 329(1-2), 12-18.

Engelmann, F. M.; Mayer, I.; Gabrielli, D. S.; Toma, H. E.; Kowaltowski, A. J.; Araki, K.; Baptista, M. S. "Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes" *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **2007b**, 39(2), 175-85.

Evans, D. H.; O'Connell, K. M.; Petersen, R. A.; Kelly, M. J. "Cyclic voltammetry" *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60 (4), 290-92.

Fingar, V. H.; Mang, T. S.; Henderson, B. W. "Modification of photodynamic therapy-induced hypoxia by fluosol-DA (20%) and carbogen breathing in mice" *Cancer Research*, **1988**, 48, 3350-3354.

Foot, C. S. "Mechanisms of photosensitized oxidation" *Science*, **1968**, 162, 963-970.

Foote, C. S. "Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation" *Photochemistry and Photobiology*, **1991**, 54, 659.

Gabrielli, D. S.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A. J.; Baptista, M. S. "Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions" *Photochemistry and Photobiology*, **2004**, 79, 227-232.

Gonçalves, P. J.; Aggarwal, L. P. F.; Marquezin, C. A.; Ito, A. S.; De Boni, L.; Barbosa Neto, N. M.; Rodrigues Jr., J. J.; Zílio, S. C.; Borissevitch, I. E. "Effects of interaction with CTAB micelles on photophysical characteristics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin" *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2006**, 181, 378-384.

Hadel, L. M. em "Handbook of organic photochemistry" Scaiano, J. C., CRC Press: Boca Raton, **1989**, p.279-291.

Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. "How Does Photodynamic Therapy Work?" *Photochemistry and Photobiology*, **1992**, 55, 145-157.

Hoebeke, M. "The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1995**, 28, 189-196.

Jori, G. and Reddi, E. "The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers" *International Journal of Biochemistry*, **1993**, 25, 1369-1375.

Jori, G. and Fabris, C. "Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumor response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn(II)-phthalocyanines" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1998**, 43, 181-185.

Junqueira, H. C.; Severino, D.; Dias, L. G.; Gugliotti, M.; Baptista, M. S. "Modulation of the Methylene Blue Photochemical Properties Based on the Adsorption at Aqueous Micelle Interfaces" *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2002**, 4, 2320-2328.

Kato, S.; Morita, M.; Koizumi, M. "Studies of the transient intermediates in the photoreduction of methylene blue" *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **1964**, 37, 117.

Kepczynski, M.; Pandian, R.P.; Smith, K.M.; Ehrenberg, B. "Do liposome-binding constants of porphyrins correlate with their measured and predicted partitioning between octanol and water?" *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 76(2), 127-134.

Kessel, D. "Photodynamic therapy: from the beginning" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 1, 3-7.

Kissinger, P.T.; Heineman, W.R. "Cyclic Voltammetry" *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60 (9), 702-706.

Kochevar, I. E., Lynch, M. C., Zhuang, S., Lambert, C. R. "Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells" *Photochemistry and Photobiology*, **2000**, 72, 548-553.

Lavi, A.; Weitman, H.; Holmes, R. T.; Smith, K. M.; Ehrenberg, B. "The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency" *Biophysical Journal*, **2002**, 82(4), 2101-2110.

Lee, C.; Sung, Y. W.; Park, J. W. "Multiple equilibria of phenothiazine dyes in aqueous cyclodextrin solutions" *Journal of Physical Chemistry B*, **1999**, 103, 893-898.

Lianos, P.; Zana, R. "Fluorescence probe studies of the effect of concentration on the state of aggregation of surfactants in aqueous solution" *Journal of Colloid and Interface Science*, **1981**, 84, 100-107.

Mazière, J.C.; Morlière, P.; Santus, R. "The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the photodynamic therapy of tumors" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1991**, 8, 351-360.

McConkey, D. J. "Biochemical determinants of apoptosis and necrosis" *Toxicology Letters*, **1998**, 99, 157-168.

Mellish, K. J.; Cox, R. D.; Vernon, D. I.; Griffiths, J.; Brown, S. B. "In Vitro Photodynamic Activity of a Series of Methilene Blue Analogues" *Photochemistry and Photobiology*, **2002**, 75(4), 392-397.

Misran M.; Matheus, D.; Valente, P.; Hope, A. "Photochemical electron transfer between methylene blue and quinones" *Australian Journal of Chemistry*, **1994**, 47, 209-216.

Modica-Napolitano, J. S.; Joyal, J. L.; Ara, G.; Oseroff, A. R.; Aprille, J. R. "Mitochondrial Toxicity of Cationic Photosensitizers for Photochemotherapy" *Cancer Research*, **1990**, 50, 7876-7881.

Mosmann, T. "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays" *Journal of Immunological Methods*, **1983**, 65, 55-63.

Morgan, J.; Oseroff, A. R. "Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy" *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 49, 71-86.

Nilsson, R.; Kearns, D. R.; Merkel, P. B. "Kinetic properties of the triplet states of methylene blue and other photosensitizing dyes" *Photochemistry and Photobiology*, **1972**, 16, 109.

Nunes, S. M. T.; Sguilla, F. S.; Tedesco, A. C. "Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives" *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **2004**, 37, 273-284.

Ochsner, M. "Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1997**, 39, 1-18.

Oleinick, N. L.; Morris, R. L.; Belichenko, I. "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how" *Photochemical and Photobiological Sciences*, **2002**, 1, 1-21.

Olmsted, J. "Calorimetric determinations of absolute fluorescence quantum yields" *The Journal of Physical Chemistry*, **1979**, 83(20), 2581-2584.

Oseroff, A. R.; Ohuoha, D.; Ara, G.; McAuliffe, D.; Foley, J.; Cincotta, L. "Intramitochondrial dyes allow selective in vitro photolysis of carcinoma cells" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1986**, 83(24), 9729-33.

Pottier, R., Bonneau, R., Jousot-Dubien, J. "pH dependence of singlet oxygen production in aqueous solutions using toluidine blue as a photosensitizer" *Photochemistry and Photobiology*, **1975**, 22, 59-61.

Primo, F. L.; Macaroff, P. P.; Lavaca, Z. G. M.; Azevedo, R. B.; Morais, P. C.; Tedesco, A. C. "Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment" *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **2007**, 310, 2838-2840.

Rabinowitch, E.; Epstein, L. F. "Polymerization of Dyestuffs in Solution. Thionine and Methylene Blue" *Journal of American Chemical Society*, **1941**, 63, 69-78.

Roslaniec, M.; Weitman, H.; Freeman, D.; Mazur, Y.; Ehrenberg, B. "Liposome binding constants and singlet oxygen quantum yields of hypericin, tetrahydroxy helianthone and their derivatives: studies in organic solutions and in liposomes" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **2000**, 57, 149-158.

Severino, D.; Junqueira, H. C.; Gugliotti, M.; Gabrielli, D. S.; Baptista, M. S. "Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue" *Photochemistry and Photobiology*, **2003**, 77, 459-468.

Sibata, M. N.; Tedesco, A. C.; Marchetti, J. M. "Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phtalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use" *European Journal of Pharmaceutical Science*, **2004**, 23, 131-138.

Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N. "Terapia fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos" *Química Nova*, **2002**, 25,(5), 801-807.

Silverstein, R. M. "Identificação espectrométrica de compostos orgânicos", Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, **1994**.

Sommer, S.; Rimington, C.; Moan, J. "Porphyrin Derivates Having Physical and Chemical Characteristics Similar to Those of the Active Components of Hematoporphyrin Derivate and with Very Strong Photosensitizing Effects" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1987**, 1, 241-246.

Strauss, W. S. L.; Sailer, R.; Gschwend, M. H.; Emmert, H.; Steiner, R.; Schneckeburger, H. "Selective Examination of Plasma Membrane-Associated Photosensitizers Using Total Internal Reflection Fluorescence Spectroscopy: Correlation between Photobleaching and Photodynamic Efficacy of Protoporphyrin IX" *Photochemistry and Photobiology*, **1998**, 67, 363.

Tanaka, E.; Nakamura, T.; Terada, M.; Shinozuka, T.; Hashimoto, C.; Kurihara, K.; Honda, K. "Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography B*, **2007**, 854, 116-120.

Tanford, C. "The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes", New York: Wiley, **1980**.

Tardivo, J. P.; Giglio, A. D.; Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; Turchiello, R. F.; Baptista, M. S. "Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications" *Photodyagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, 175-191.

Tardivo, J. P.; Giglio, A. D.; Paschoal, L. H.; Baptista, M. S. "New photodynamic therapy protocol to treat AIDS-related Kaposi's Sarcoma" *Photomedicine and Laser Surgery*, **2006**, 24, 528-531.

Tuite, E. M., Kelly, J. M. "Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates" *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1993**, 21, 103-124.

Valenzeno, D. P. "Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms" *Photochemistry and Photobiology*, **1987**, 46, 147-160.

van Benschoten, J. J.; Lewis, J. Y.; Heineman, W. R.; Roston, D. A.; Kissinger, P. T. "Cyclic Voltammetry Experiment" *Journal of Chemical Education*, **1983**, 60 (9), 772-76.

van Bommel, M. R.; Berghe, I. V.; Wallert, A. M.; Boitele, R.; Wouters, J. "High-performance liquid chromatography and non-destructive three-dimensional fluorescence analysis of early synthetic dyes", *Journal of chromatography A*, **2007**, 1157, 260-272.

van Liedekerke, B. M.; Nelis, H. J.; Lambert, W. E.; De Leenheer, A. P. "High-performance liquid chromatography of quaternary ammonium compounds on a polystyrene-divinylbenzene column" *Analytical Chemistry*, **1989**, 61(7), 728-32.

Wainwright, M. "Non-porphyrin Photosensitizers in Biomedicine" *Chemical Society Review*, **1996**, 25, 351-359.

Wainwright, M. "The development of phenothiazinium photosensitisers" *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, 263-272.

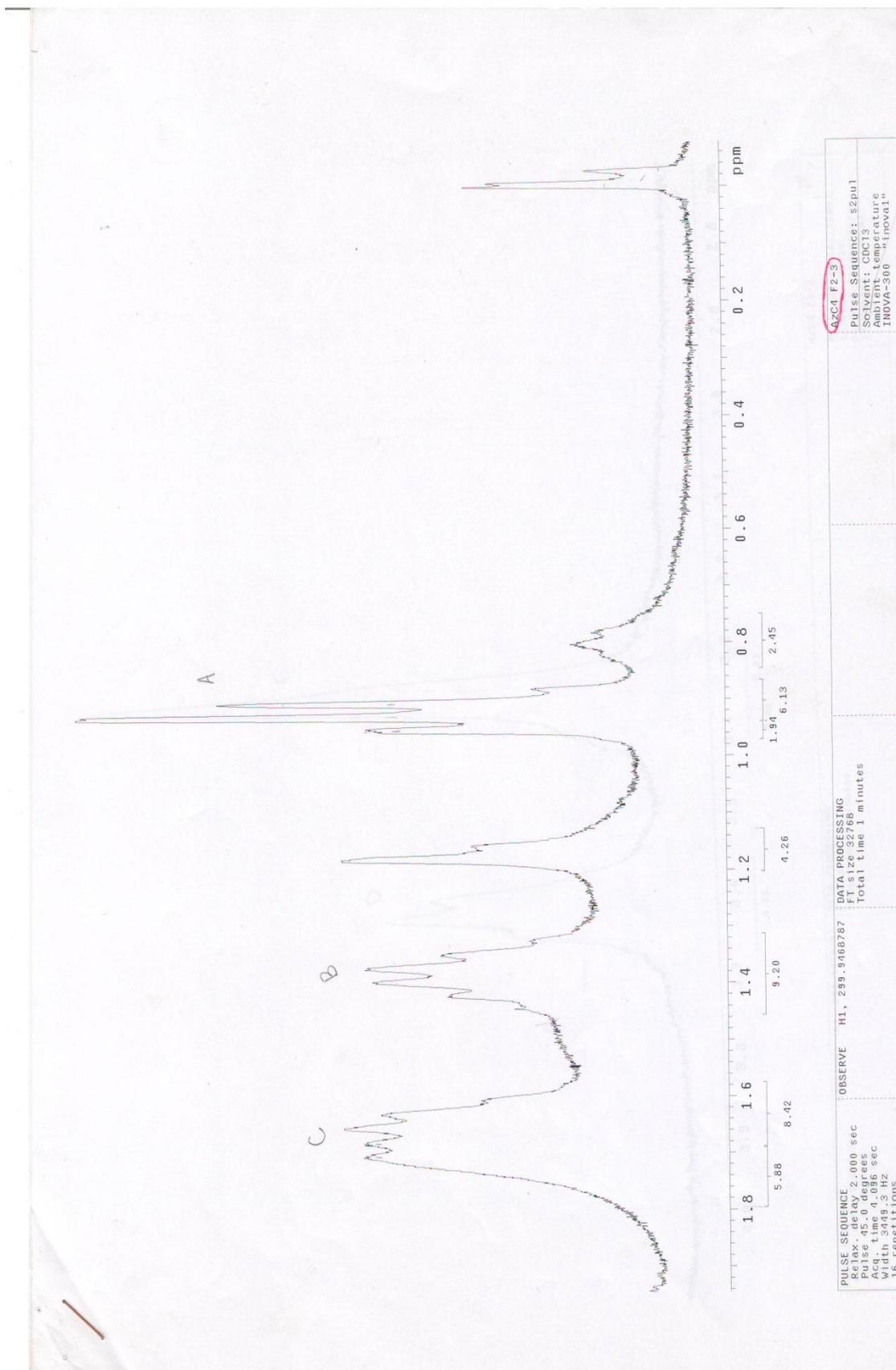
Wilkinson, F.; Helman W. P.; Ross, A. B. "Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution" *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **1993**, 22, 113-262.

Williams, G. T.; Smith, C. A. "Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death" *Cell*, **1993**, 74, 777-779.

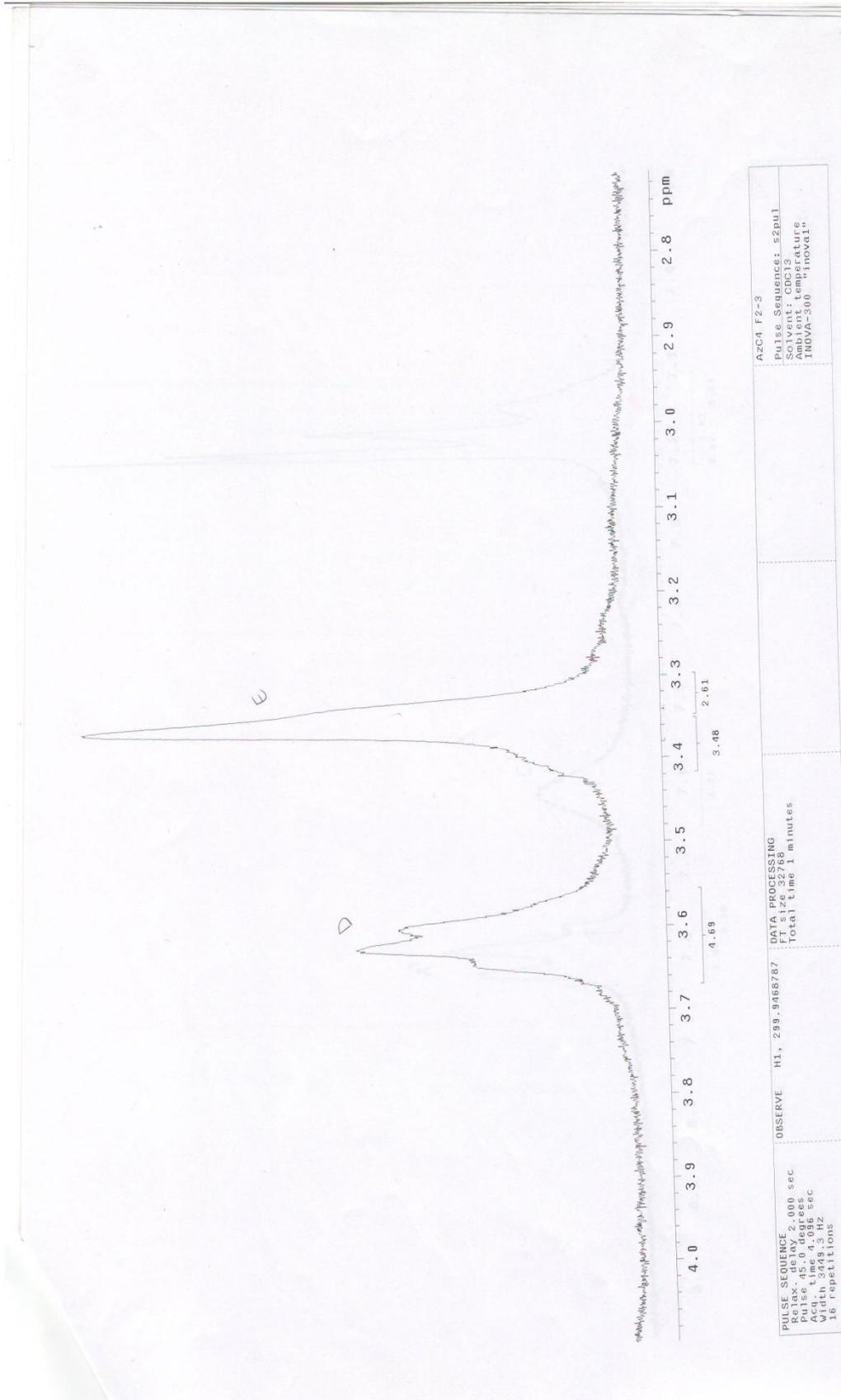
Zhao, Y.; Cohen, J.; Khutorsky, V.; Strashnikova, N.; Pines, E.; Priel, Z. "Demonstration of structure-selective binding of organic cations to anionic polyelectrolytes" *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry*, **2000**, 133(3), 197-204.

APÊNDICES

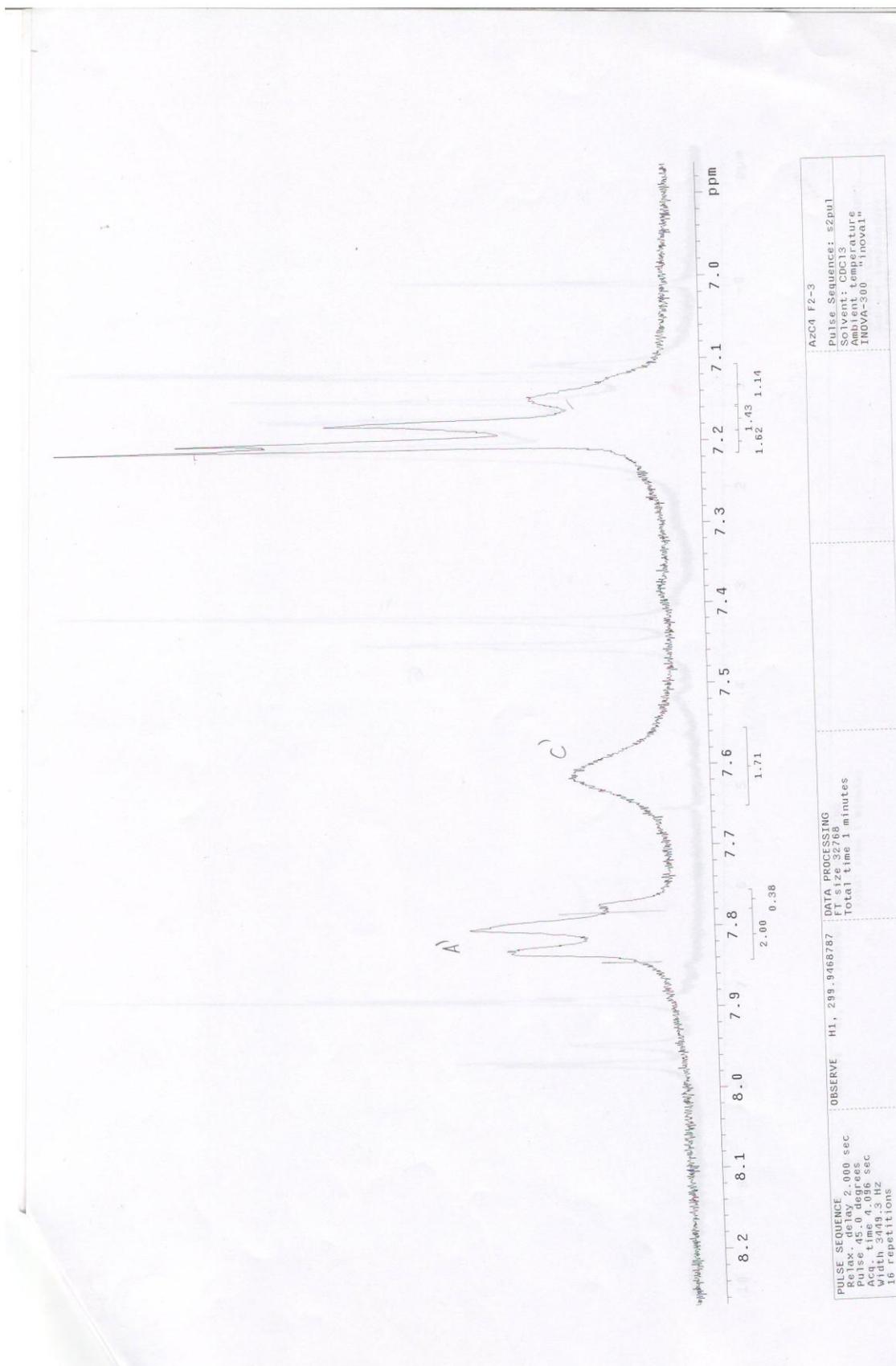
- Anexo I** – Espectro de RMN-¹H do composto sintetizado TioC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A',B'e C'são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos..... 147
- Anexo II** – COSY do composto sintetizado TioC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A',B'e C'são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos..... 151
- Anexo III** – Espectro de RMN-¹H do composto sintetizado AzC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A',B'e C'são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos..... 153
- Anexo IV**– COSY do composto sintetizado AzC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A',B'e C'são referentes aos 1H do s anéis aromáticos..... 158
- Anexo V**– Espectro de massa do composto sintetizado AzC₄. 161



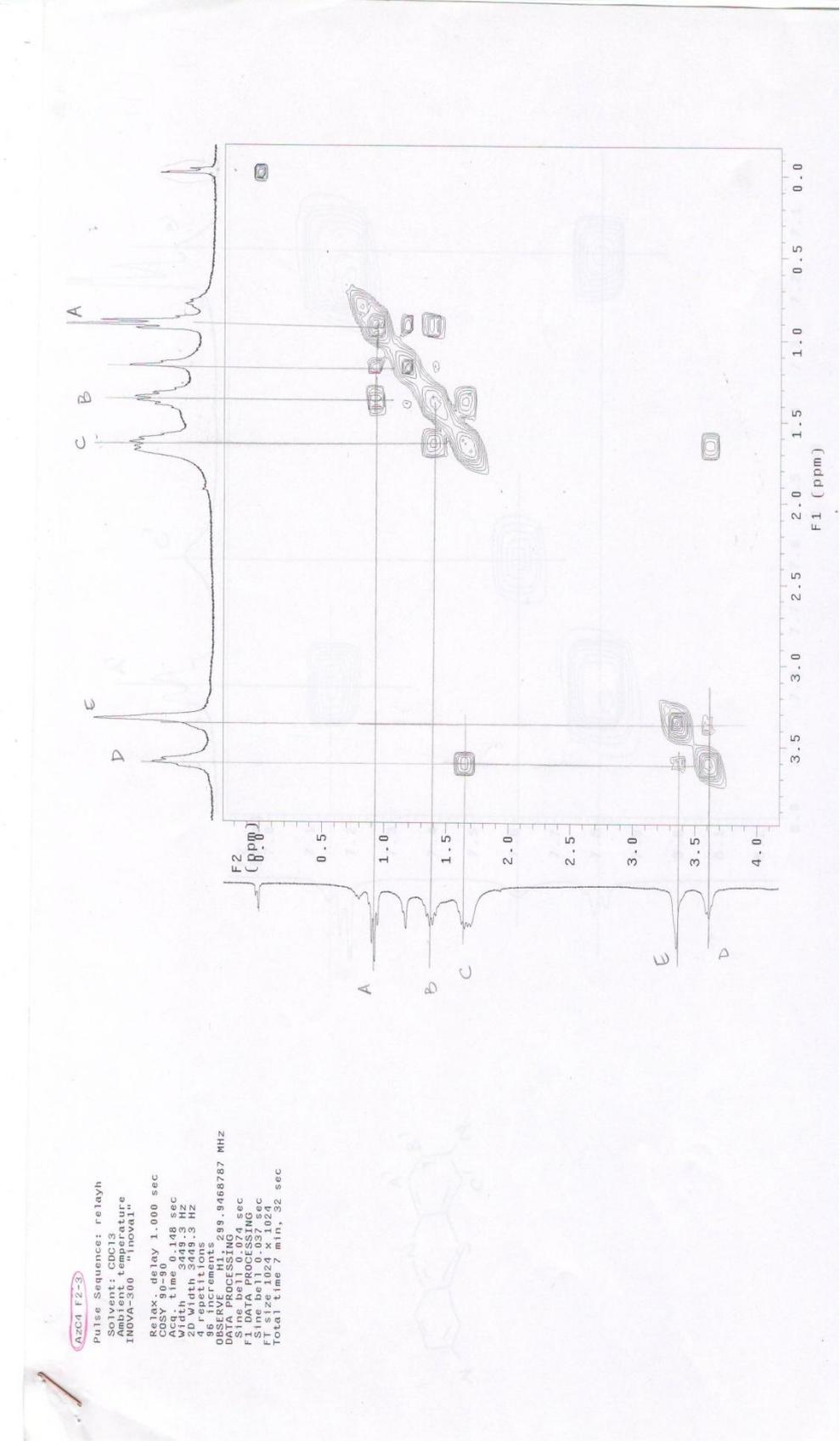
Coninuação do Anexo I – Espectro de RMN- ^1H do composto sintetizado TiO_2 . As letra A, B, C, D e E são referentes aos ^1H das cadeias alifáticas. A, B e C são referentes aos ^1H do s anéis aromáticos.



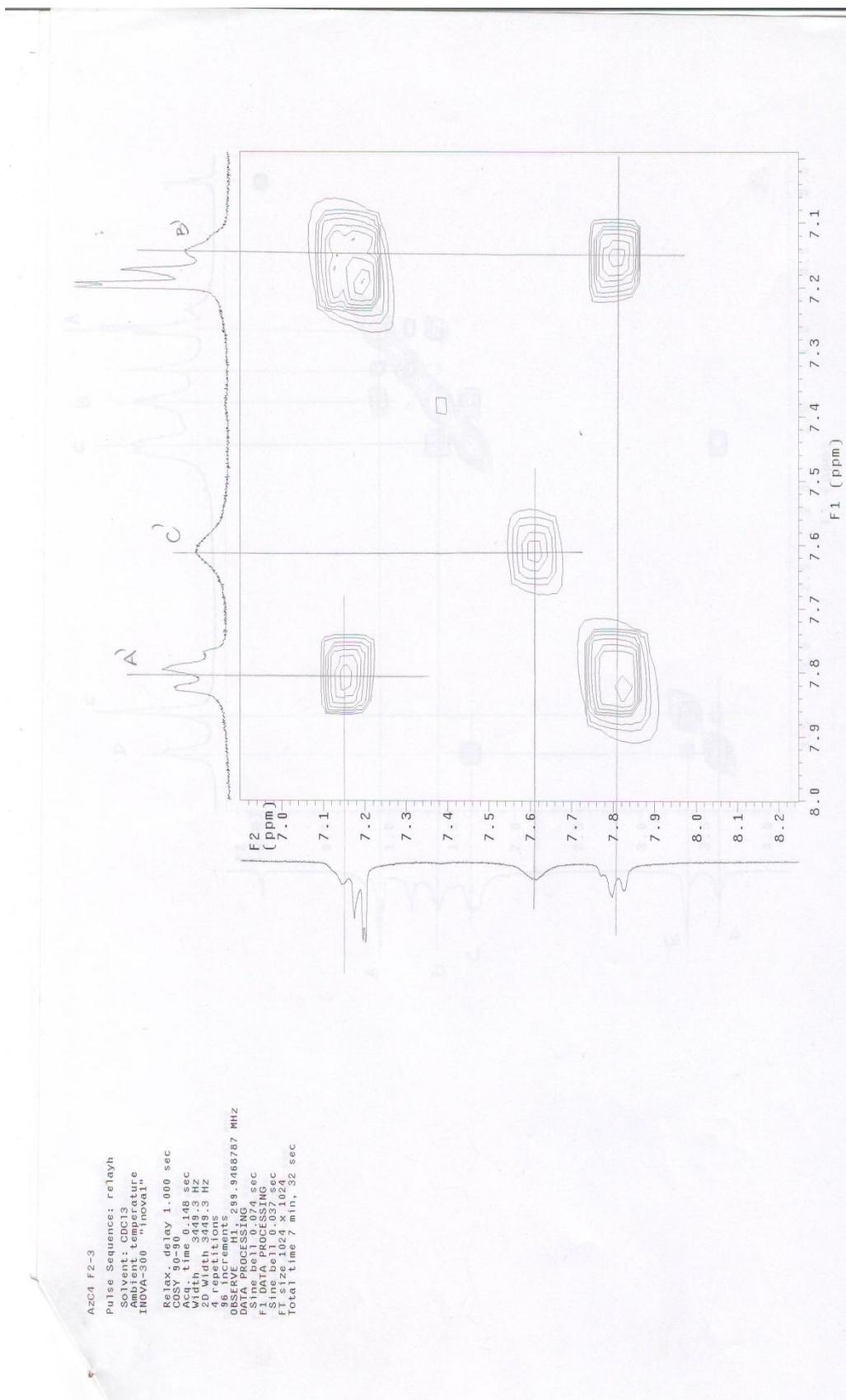
Coninuação do Anexo I – Espectro de RMN-¹H do composto sintetizado TiO₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos.



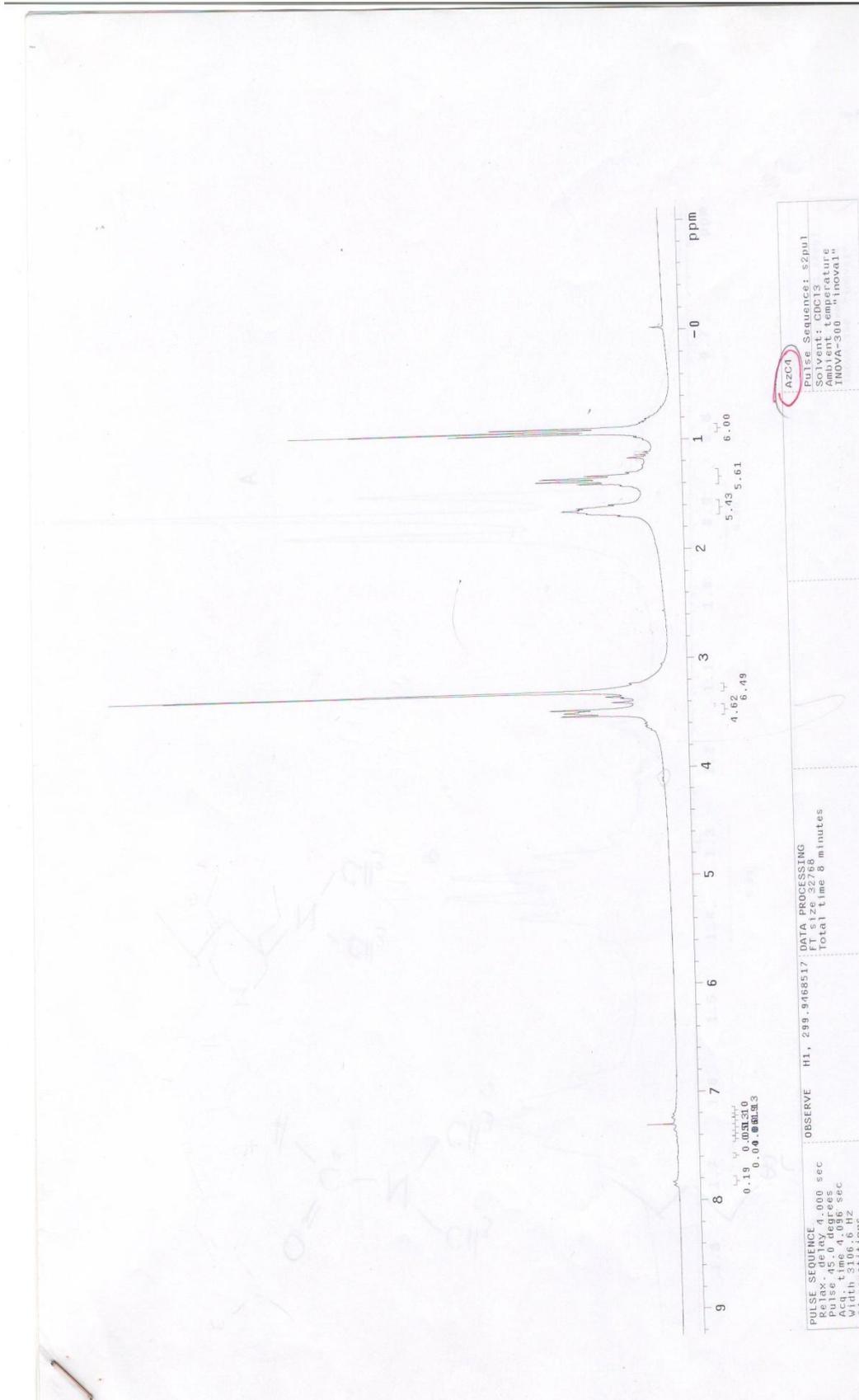
Coninuação do Anexo I – Espectro de RMN- ^1H do composto sintetizado TiO_4 . As letra A, B, C, D e E são referentes aos ^1H das cadeias alifáticas. A, B e C são referentes aos ^1H do s anéis aromáticos.



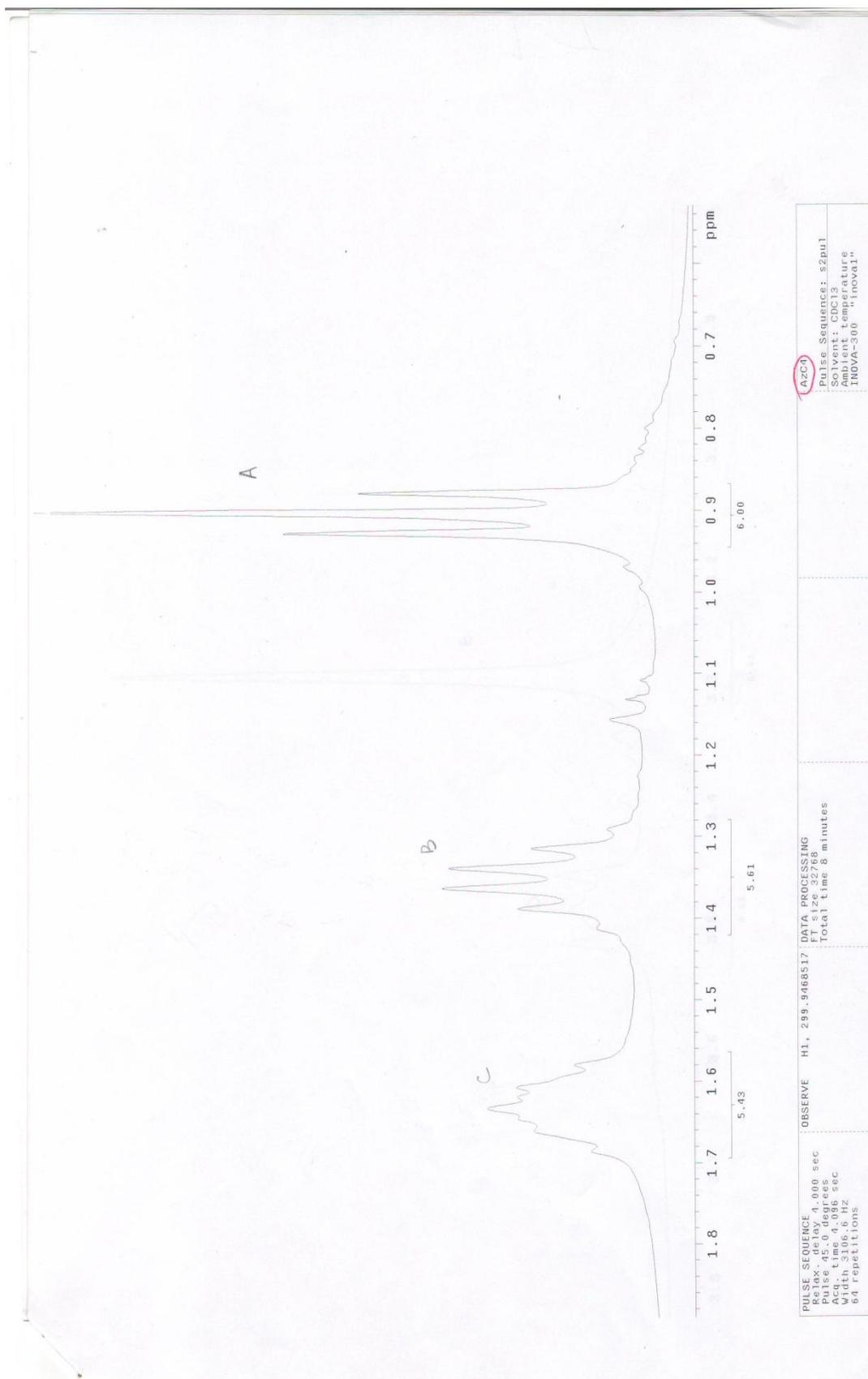
Anexo II – COSY do composto sintetizado TiO₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos.



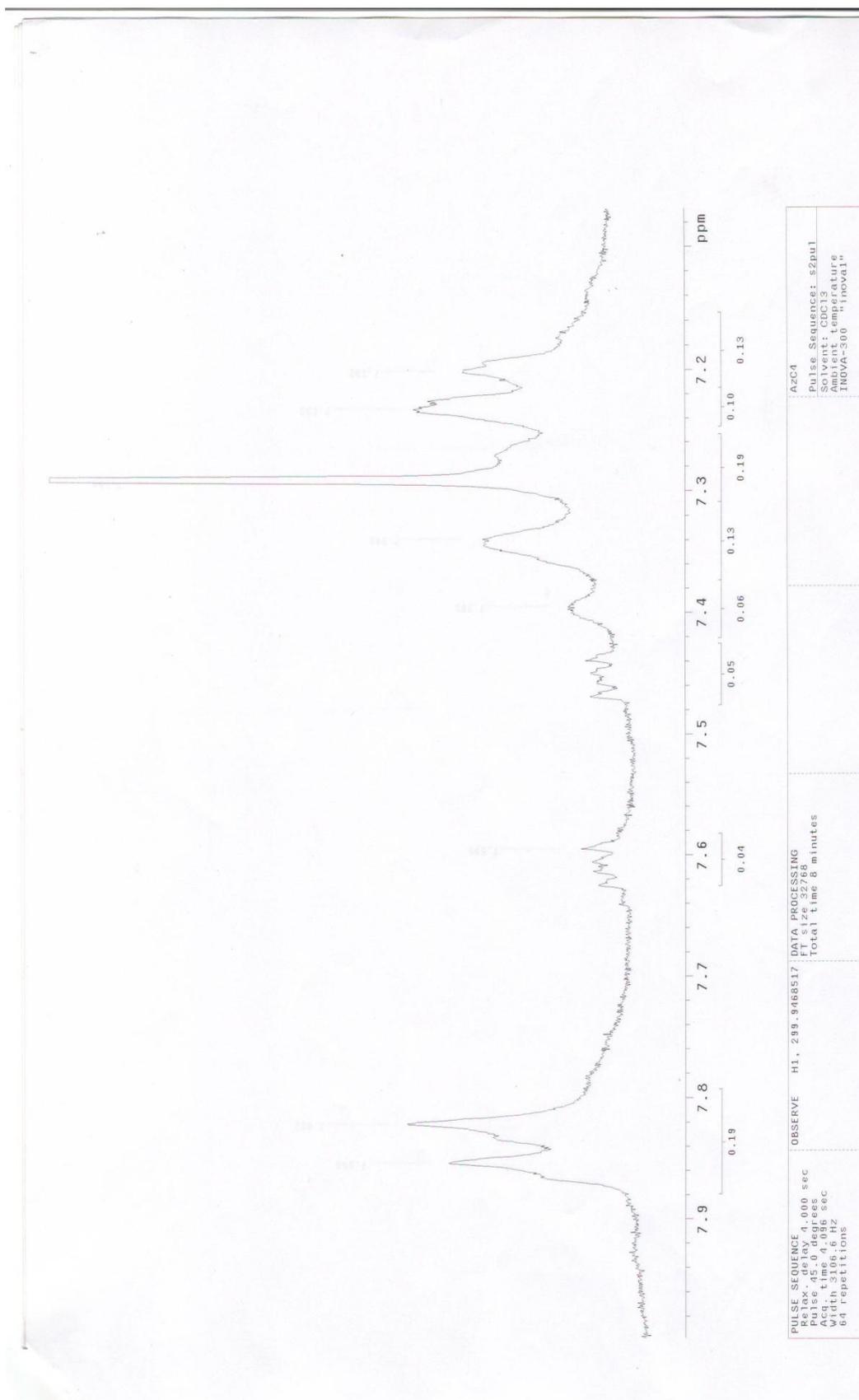
Coninuação do Anexo I – COSY do composto sintetizado TioC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos.



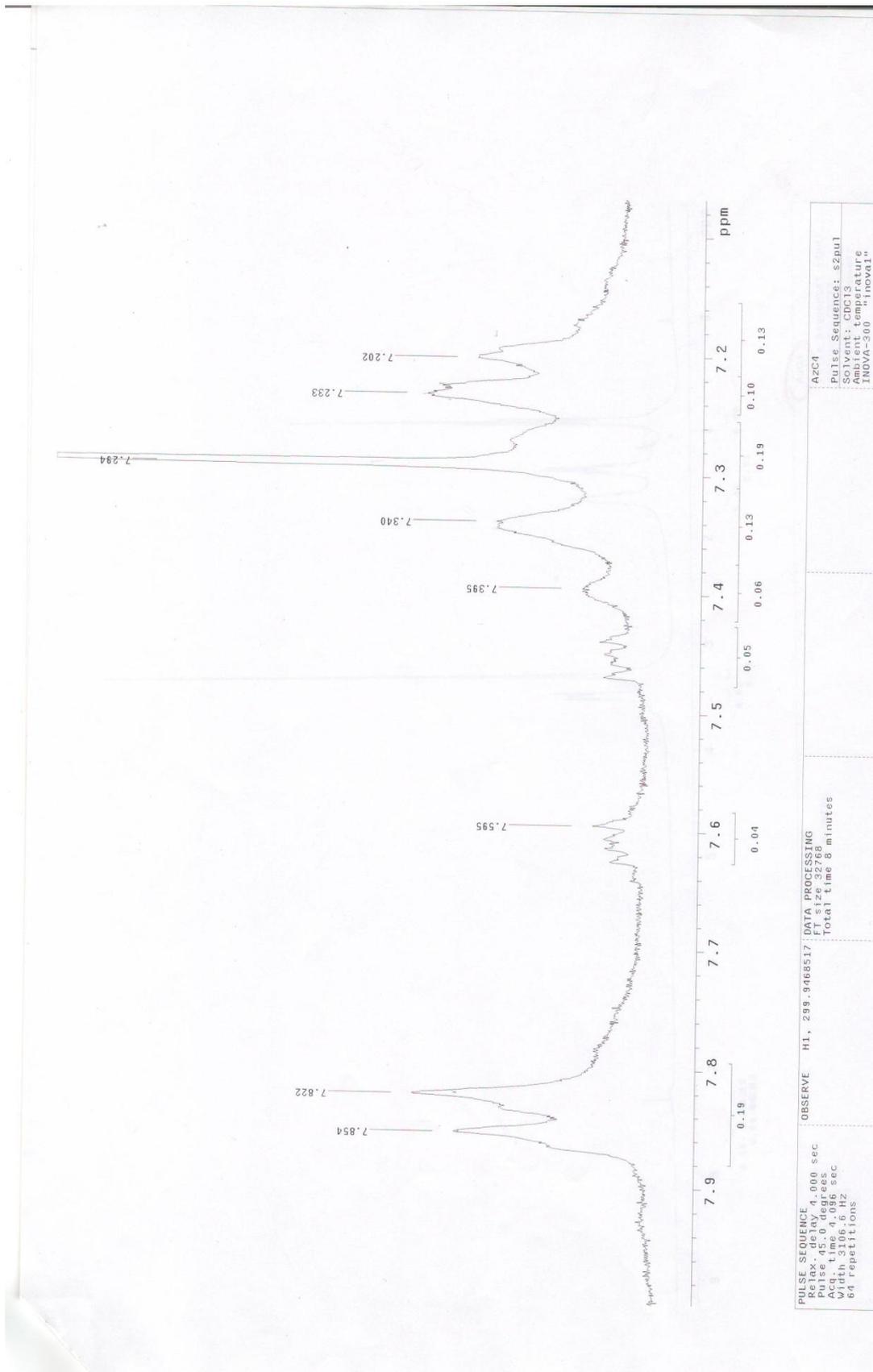
Anexo III – Espectro de RMN-¹H do composto sintetizado AzC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos.



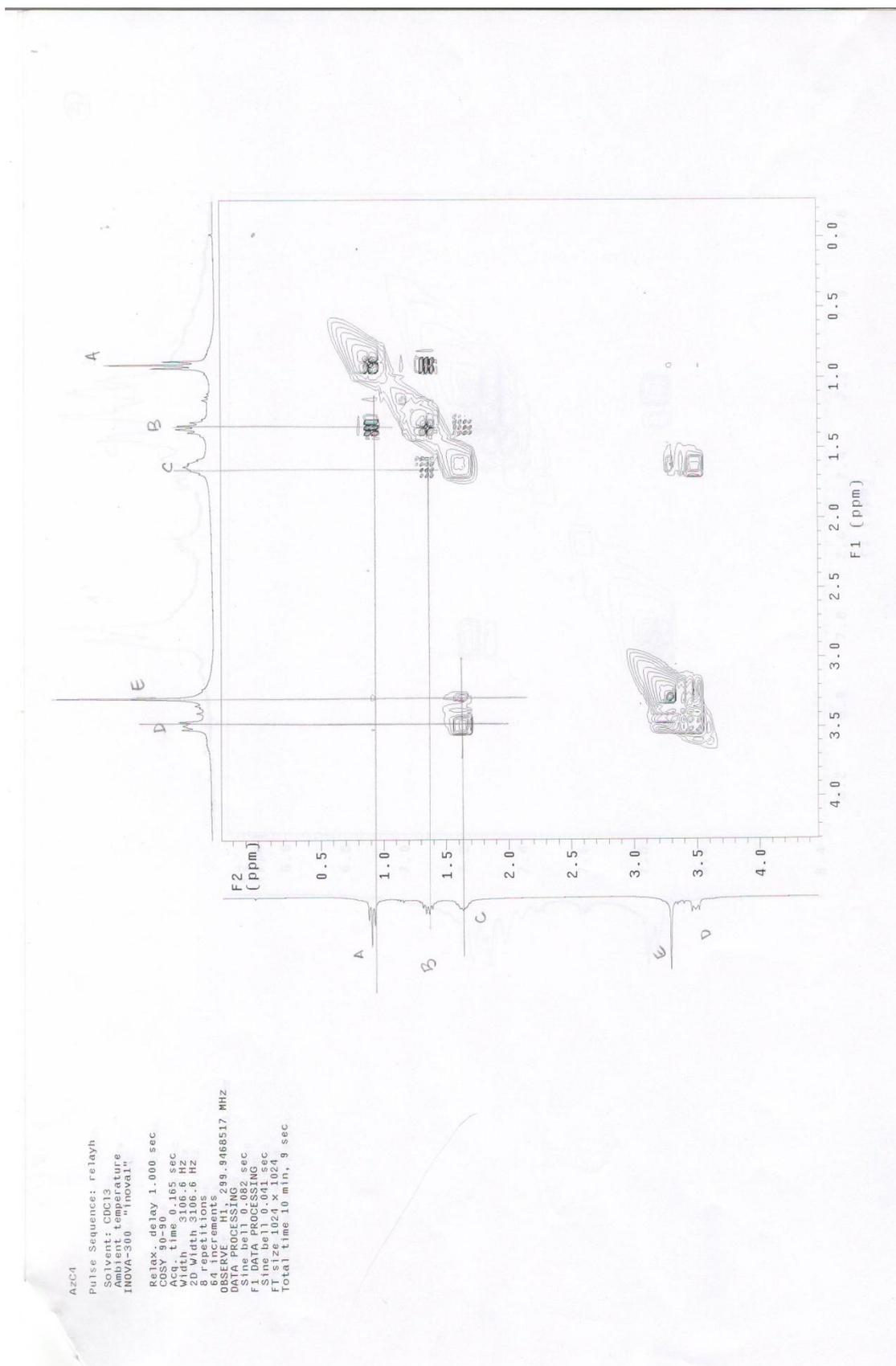
Coninuação do Anexo III – Espectro de RMN-¹H do composto sintetizado AzC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos.



Coninuação do Anexo III – Espectro de RMN-¹H do composto sintetizado AZC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ¹H dos anéis aromáticos.



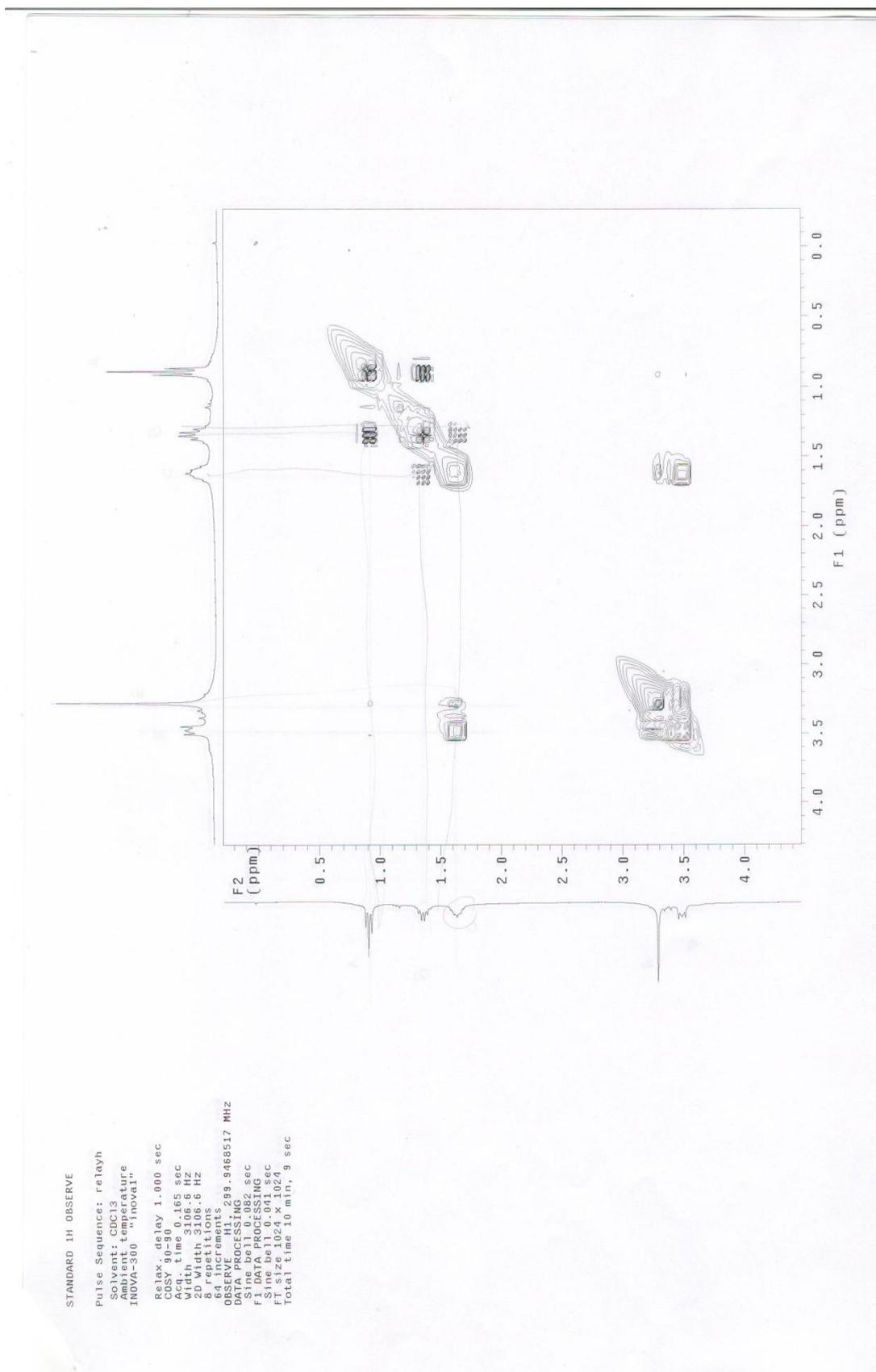
Coninuação do Anexo III – Espectro de RMN-¹H do composto sintetizado AzC₄. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ¹H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ¹H do s anéis aromáticos.



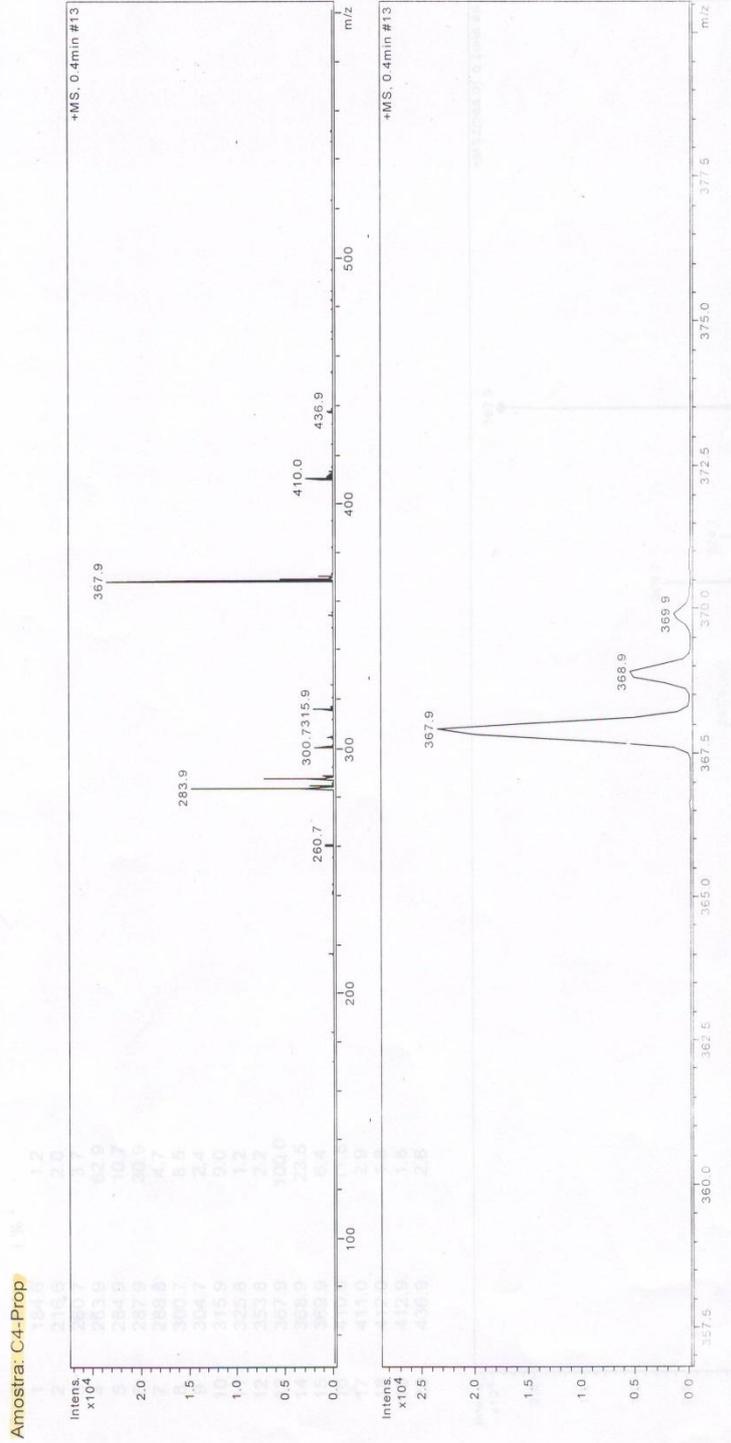
Anexo IV– COSY do composto sintetizado AZC4. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ^1H das cadeias alifáticas. A',B'e C'são referentes aos ^1H do s anéis aromáticos.



Continuação do Anexo IV – COSY do composto sintetizado AzC4. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ^1H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ^1H do s anéis aromáticos.



Continuação do Anexo IV– COSY do composto sintetizado AzC4. As letra A, B, C, D e E são referentes aos ^1H das cadeias alifáticas. A', B' e C' são referentes aos ^1H do s anéis aromáticos.



Anexo V– Espectro de massa do composto sintetizado AzC4.

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Helena Couto Junqueira

Nascida aos 19 de março de 1979 em São Paulo, SP

EDUCAÇÃO

Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008

Doutorado em Ciências - Bioquímica

Bacharelado em Química com atribuições em Biotecnologia

Bacharelado em Química com atribuições Industriais

Colégio Notre Dame, São Paulo, 1996

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, CNPq, 05/2003 – 08/2003

Bolsista de Doutorado, FAPESP, 09/2003 – 01/2008

PUBLICAÇÕES

Artigos completos publicado em periódicos

1. Junqueira, H. C.; Severino, D.; Dias, L. G.; Gugliotti, M.; Baptista, M. S. "Modulation of the Methylene Blue Photochemical Properties Based on the Adsorption at Aqueous Micelle Interfaces", *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2002**, 4, 2320-2328.
2. Severino, D.; Junqueira, H. C.; Gugliotti, M.; Gabrielli, D. S.; Baptista, M. S., "Influence of negatively charged interfaces on the ground and excited state properties of methylene blue", *Photochemistry and Photobiology*, **2003**, 77, 459-468.
3. Tardivo, J. P.; Giglio, A. D.; Oliveira, C. S.; Gabrielli, D. S.; Junqueira, H. C.; Tada, D. B.; Severino, D.; Turchiello, R. F.; Baptista, M. S., "Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications", *Photodyagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, 175-191.

4. Soares, V. A.; Severino, D.; Junqueira, H. C.; Tersariol, L. S.; Shida, C. S.; Baptista, M. S.; Nascimento, O. R.; Nantes, I. L., "Light-driven horseradish peroxidase cycle by using photo-activated methylene blue as the reducing agent", *Photochemistry and Photobiology*, **2007**, 83, 1-9.

Resumos em Congressos

FERREIRA, T. L.; JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. S.; BERTOTTI, M. "Studies on diffusion and n-octanol/water partition of phenothiazine dyes using microelectrode voltammetry" Em: 59th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, New Orleans, 2008.

FERREIRA, T. L.; JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. S.; BERTOTTI, M. "Determinação de coeficientes de partição de corantes fenotiazínicos em sistema n-octanol/água usando voltametria com microeletrodos" Em: 14° Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa, 2007.

JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. S. "Síntese e estudo das propriedades fotofísicas de derivados de tionina em sistemas biomiméticos e em células HeLa." Em: Terapia Fotodinâmica: Integração dos Aspectos Moleculares, Tecnológicos e Aplicações na Área de Saúde, São Pedro, 2007.

NÚÑEZ, S. C.; GARCEZ, A. S.; GOMES, L.; RIBEIRO, M. S.; JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. S. "Dinâmica de fotodegradação do azul de metileno em função da fluência e irradiância: implicações para a aplicação clínica da terapia fotodinâmica." Em: XXX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, São Lourenço, 2007.

JUNQUEIRA, H. C.; BAPTISTA, M. S. "Influência do pH nas propriedades fotofísicas do azul de metileno." Em: 28° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2005, Poços de Caldas, 2005.

JUNQUEIRA, H. C.; GOLDFEDER, M.; UCHOA, A.; BAPTISTA, M. S. "Influence of pH in the methylene blue photophysical properties." Em: XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2004, Caxambu, 2004.

JUNQUEIRA, H. C.; GABRIELLI, D.; SEVERINO, D.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. "Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State

Properties of Methylene Blue.” Em: XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, 2003

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; BAPTISTA, M. S. “Estudo da agregação de corantes da série da tionina em sistemas micelares.” Em: Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações. Aspectos Físicos, Químicos, Biológicos e Médicos, São Pedro, 2002.

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. “Modulação das propriedades fotoquímicas do azul de metileno baseada na adsorção em interfaces de micelas aquosas.” Em: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de caldas, 2002.

JUNQUEIRA, H. C.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. “Modulation of the methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces.” Em: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, 2001.