Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÍSICO-QUÍMICA

ESTUDO FOTOFÍSICO DA ADSORÇÃO DE MOLÉCULAS ORGÂNICAS EM ARGILAS

Mariana Valim Buk

Dissertação apresentada ao
Instituto de Química de São Carlos,
da Universidade de São Paulo como
requisito para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Físico-Química)

Orientadora: Prof^a. Dra. Carla C. Schmitt Cavalheiro

São Carlos, 2018

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família e amigos pelo apoio;

À Profa. Dra. Carla C. C. Schmitt pela orientação e pela oportunidade de realização do Mestrado;

À Dra. Alessandra L. Poli pelas suas contribuições;

Aos amigos dentro do Grupo de Fotoquímica;

Ao Prof. Dr. Mauricio S. Baptista e à Dra. Helena C. Junqueira pela colaboração;

A CAPES pelo apoio financeiro;

À Universidade de São Paulo.

“Nunca se limite por causa da
imaginação limitada dos outros,
nunca limite os outros por causa de
sua própria imaginação limitada.”

Mae Jemison

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Disposição das camadas de argilas.	16
Figura 2: Tipos de interação entre tactóides.....	16
Figura 3: Estrutura da Laponita.	17
Figura 4: Esquema da preparação de um híbrido argila-composto orgânico. Em (a): a argila pura em suspensão aquosa; em (b) a interação do composto orgânico com a superfície da argila; em (c) há a adsorção do composto orgânico na camada interlamelar da argila.	19
Figura 5: Estruturas da Berberina e da Palmatina.	21
Figura 6: Diagrama de Jablonski.	21
Figura 7: Supressão de fluorescência por transferência de energia	25
Figura 8: Espectro de UV-Vis da berberina em solução aquosa (3×10^{-5} mol L ⁻¹).	32
Figura 9: Espectros de absorção de diferentes concentrações da berberina em solução aquosa.	34
Figura 10: Gráfico dos valores da absorbância da berberina em solução aquosa para diferentes concentrações nos comprimentos de onda: (a) $\lambda = 325$ nm, (b) $\lambda = 344$ nm e (c) $\lambda = 425$ nm.	34
Figura 11: Gráfico de absorvidade em função do comprimento de onda da berberina	36
Figura 12: Espectros de UV-Vis da berberina (8×10^{-6} mol L ⁻¹) em solução aquosa, em suspensão de SWy-2 (8×10^{-2} mol g ⁻¹) e em suspensão de laponita (8×10^{-2} mol g ⁻¹).	37
Figura 13: Comportamento espectral da berberina (3×10^{-5} mol L ⁻¹) em função do tempo nos seguintes sistemas: (a) em suspensão de argila SWy-2 (0,11 g L ⁻¹) e (b) em suspensão de argila laponita (0,11 g L ⁻¹).	38
Figura 14: Espectros de UV-Vis e emissão imediatamente após a adição de berberina em suspensão de laponita nas razões Ber/Lap 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g ⁻¹ em água. Em (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 350$ nm e (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 430$ nm.	39
Figura 15: Espectros da berberina em suspensão de SWy-2 nas razões Ber/SWy-2 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g ⁻¹ de (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 350$ nm e (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 430$ nm.	42

Figura 16: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da berberina (8×10^{-6} mol L ⁻¹) em suspensão de laponita (8×10^{-2} mol g ⁻¹).	46
Figura 17: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da berberina (8×10^{-6} mol L ⁻¹) em suspensão de SWy-2 (8×10^{-2} mol g ⁻¹).	46
Figura 18: Sinal de decaimento de luminescência do oxigênio singlete coletado por 5 minutos nas amostras (a) berberina (8×10^{-6} mol L ⁻¹) em solução de D ₂ O e (b) Ber/Lap 0,1 mmol.g ⁻¹ em D ₂ O.	49
Figura 19: Espectro de UV-Vis da palmatina em solução aquosa (3×10^{-5} mol L ⁻¹)	51
Figura 20: Espectros de absorção de diferentes concentrações da palmatina em solução aquosa.	52
Figura 21: (a) Gráfico dos valores da absorbância da palmatina ($\lambda = 340$ nm) em solução aquosa para diferentes concentrações, (b) Gráfico dos valores da absorbância da palmatina ($\lambda = 420$ nm) em solução aquosa para diferentes concentrações.	53
Figura 22: Gráfico de absorvidade da palmatina em função do comprimento de onda.	54
Figura 23: Espectros de UV-Vis da palmatina (8×10^{-6} mol L ⁻¹) em solução aquosa, em suspensão de SWy-2 (8×10^{-2} mol g ⁻¹) e em suspensão de laponita (8×10^{-2} mol g ⁻¹).	55
Figura 24: Comportamento espectral da palmatina (3×10^{-5} mol L ⁻¹) em função do tempo nos seguintes sistemas: (a) em suspensão de argila SWy-2 (0,11 g L ⁻¹) e (b) em suspensão de argila laponita (0,11 g L ⁻¹).	56
Figura 25: Espectros da palmatina em suspensão de laponita nas razões Pal/Lap 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g ⁻¹ de: (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 340$ nm, (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 420$ nm e (d) espectro de excitação em $\lambda_{em} = 545$ nm.	57
Figura 26: Espectros da palmatina em suspensão de SWy-2 nas razões Pal/SWy-2 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g ⁻¹ de: (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 340$ nm, (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 420$ nm e (d) espectro de excitação em $\lambda_{em} = 545$ nm.	60
Figura 27: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da palmatina (8×10^{-6} mol L ⁻¹) em suspensão de laponita (8×10^{-2} mol g ⁻¹).	65

Figura 28: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da palmatina ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em suspensão de SWy-2 ($8 \times 10^{-2} \text{ mol g}^{-1}$).....	65
Figura 29: (a) Cinética de degradação da solução rubreno ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ciclohexano) devido à produção de oxigênio singleto pela palmatina ($1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol). (b) Absorbâncias obtidas nos diferentes tempos em $\lambda = 545 \text{ nm}$ para a solução de palmatina ($1,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol) e rubreno ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em ciclohexano).....	68
Figura 30: Diagrama de energia da palmatina e do híbrido palmatina-argila.	70
Figura 31: Sinal de decaimento de luminescência do oxigênio singleto para (a) palmatina ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de D_2O ; e (b) palmatina em suspensão de laponita $0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$ em D_2O	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento quântico de fluorescência da berberina em diversos sistemas..... 44

Tabela 2: Parâmetros de tempo de vida do singlete da berberina em suspensão de argila. 47

Tabela 3: Rendimento quântico de fluorescência da palmatina em diversos sistemas. 63

Tabela 4: Parâmetros de tempo de vida de fluorescência da palmatina em suspensão de argila. 66

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Processos não radiativos.....	22
Equação 2: Processos radiativos.....	24
Equação 3: Lei de Lambert-Beer	29
Equação 4: Cálculo do rendimento quântico de fluorescência	30
Equação 5: Cálculo do rendimento quântico de oxigênio singlete	31

SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO.....	14
1. Argilas	15
1.1. Composição e estrutura das argilas.....	15
1.2. Propriedades.....	17
1.3. Híbridos formados por argila e compostos orgânicos	18
2. Moléculas orgânicas: Berberina e Palmatina	19
3. Princípios de fotofísica	21
2.1. Processos não radiativos	22
2.2. Processos radiativos	23
2.3. Supressão de fluorescência	24
OBJETIVOS.....	26
MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
1. Materiais.....	27
2. Equipamentos	27
3. Purificação da argila SWy-2	27
4. Preparo da argila Laponita RD para utilização em suspensão.....	28
5. Adsorção das moléculas orgânicas berberina e palmatina nas argilas	28
6. Caracterização dos compostos orgânicos e dos compostos adsorvidos nas argilas	29
6.1. Espectroscopia de UV-visível.....	29
6.2. Tempo de vida do estado singlete usando fluorescência (τ_F)	29
6.3. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F).....	30
6.4. Rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi\Delta$).....	30
6.5. Detecção de oxigênio singlete pelo método direto	31
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
1. Estudos da Berberina em argilas Laponita e SWy-2	32

1.1. Espectro de absorção UV-Vis da berberina em solução aquosa	32
1.2. Determinação do coeficiente de absorptividade molar (ϵ) da berberina em solução aquosa.....	33
1.3. Berberina em suspensões de Lap e SWy-2	36
1.4. Estudo do rendimento quântico de fluorescência da berberina.....	39
1.5. Estudo do tempo de vida de fluorescência do estado excitado da berberina nas argilas laponita e SWy-2.....	45
1.6. Estudo da produção de oxigênio singlete pela berberina em suspensões de laponita pelo método direto	48
2. Estudos da Palmatina em argilas Laponita e SWy-2.....	50
2.1. Espectro de absorção UV-Vis da palmatina em solução aquosa	50
2.2. Determinação do coeficiente de atenuação molar (ϵ) da palmatina em solução aquosa	51
2.3. Palmatina em suspensões de SWy-2 e laponita	54
2.4. Estudo do rendimento quântico de fluorescência da palmatina	57
2.5. Estudo do tempo de vida de fluorescência do estado excitado da palmatina em argilas SWy-2 e laponita.....	64
2.6. Estudo do rendimento quântico de oxigênio singlete da palmatina.....	67
2.7.1 Método indireto utilizando a palmatina em solução de etanol	67
2.7.2. Método direto: detecção do oxigênio singlete por luminescência.....	70
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS	75

RESUMO

Híbridos argila-moléculas orgânicas são facilmente obtidos a partir da sorção das moléculas em suspensões aquosas de argila e possuem diversas aplicações, dentre elas o aumento da ação antimicrobiana dos compostos orgânicos (Bujdak, Jurecekova *et al.*, 2009; Bujdak, Ratulovska *et al.*, 2016). Estudos também indicam que as estruturas formadas geram propriedades fotofísicas diferentes da solução unicamente formada por compostos orgânicos, em geral apresentando maior fluorescência e maior produção de oxigênio singlete. Neste projeto, foram investigadas propriedades fotofísicas de híbridos formados por argilas montmorilonita e laponita e alcaloides berberina e palmatina. Para este estudo foram utilizadas espectroscopia de UV-Visível, técnicas de fluorescência estática e dinâmica e estudos de produção de oxigênio singlete. Os híbridos formados pelos alcaloides berberina e palmatina com as argilas laponita e SWy-2 apresentaram maiores intensidades de fluorescência e rendimentos quânticos de fluorescência que os resultados observados para os alcaloides em solução aquosa. Entretanto, a produção de oxigênio singlete observada para os híbridos não foi significativamente mais alta que os resultados observados para a palmatina e a berberina individualmente.

ABSTRACT

Hybrid materials produced from clay and organic molecules are easily obtained by molecule sorption in aqueous clay suspensions. These composites usually show many applications, among them the increase in antimicrobial activity (Bujdak, Jurecekova *et al.*, 2009; Bujdak, Ratulovska *et al.*, 2016). Studies also show that these new structures originate new photophysical properties, with increased luminescence and singlet oxygen production. This project aimed to investigate photophysical properties of new clay-alkaloids composite materials. In this project we used UV-Visible spectroscopy, static and dynamic fluorescence techniques and studied singlet oxygen production. The hybrids formed by alkaloids berberine and palmatine with laponite and SWy-2 clays presented larger fluorescence intensity and fluorescence quantum yield than the results obtained for the alkaloids themselves. However, singlet oxygen production observed was not meaningfully different than the results collected for berberine and palmatine.

INTRODUÇÃO

A sorção de moléculas orgânicas em materiais inorgânicos estruturados em camadas gera híbridos com novas funcionalidades e bastante versáteis. As novas propriedades são decorrentes da sorção de moléculas orgânicas nas argilas, que promovem mudanças estruturais nos grupos cromóforos, agregação molecular e estabilização das moléculas através de interações como troca iônica ou transferência de energia (Lofaj, Valent *et al.*, 2013). A estrutura de camadas de silicato expansíveis de argilas, a alta capacidade de absorção e o baixo custo são características que fazem delas bons materiais de suporte para a sorção de moléculas orgânicas. Usualmente escolhe-se uma molécula orgânica que absorve no UV-visível para ser adsorvida na argila. Os espectros são particularmente úteis como meio de informação sobre como a adsorção ocorreu, especialmente em argilas com alta densidade de carga (Gessner, Schmitt *et al.*, 1994; Ogawa, Kawai *et al.*, 1996; Bujdak, Iyi *et al.*, 2002).

A aplicação destes híbridos formados por argilas e moléculas orgânicas é bastante diversificada. A sorção em argilas controla as moléculas orgânicas, impedindo de se agregarem e alterando sua fotoatividade (Bujdak, 2015). A eficiência da adsorção de corantes e resíduos químicos por argilas possibilita também um aprimoramento no tratamento de poluentes (Bujdak, 2006). Estudos indicam o potencial destes híbridos como materiais antimicrobianos. De acordo com Bujdak, Jurecekova *et al.* (2009), o corante azul de metileno apresenta maior efeito antimicrobiano quando adsorvido em argilas do tipo montmorilonitas, e Nir, Undabeytia *et al.* (2000) e Nguemtchouin, Ngassoum *et al.* (2013) relataram que pesticidas de formulações compostas por moléculas orgânicas tornam-se mais eficientes quando adsorvidos em argila. Há indícios também que híbridos de argilas aumentem a fluorescência e fosforescência das moléculas orgânicas adsorvidas, consequentemente aumentando a produção de oxigênio singlete destas moléculas (Bujdak, Ratulovska *et al.*, 2016). Essa propriedade tornaria tais híbridos viáveis para a aplicação em terapia fotodinâmica, na medicina.

A terapia fotodinâmica (*photodynamic therapy* em inglês, abreviada como PDT) é estudada como uma alternativa aos tradicionais modelos de

tratamento para câncer. A PDT utiliza drogas que, ao serem irradiadas em determinado comprimento de onda, são capazes de produzir oxigênio singlete no meio celular que consequentemente destruirá as células. Espécies citotóxicas de curtos tempos de vida são mais indicadas para a PDT. Assim, os danos são bastante localizados, garantindo alta especificidade deste tratamento (Andreazza, Vever-Bizet *et al.*, 2016; Liu, Ma *et al.*, 2017).

1. Argilas

Em sua definição clássica, argila é um material natural, terroso, com granulação fina de diâmetro esférico equivalente ou menor que 2 μm e que adquire certa plasticidade quando umedecido em água. A argila é constituída por argilominerais resultantes da fragmentação de rochas. Além disso, são da classe dos filossilicatos e apresentam propriedades tais como absorção, inchamento, capacidade de troca iônica e baixo custo. Estas características permitem que as argilas sejam aplicadas em diversos campos da indústria e devido às suas propriedades peculiares tem sido extensivamente estudadas na academia (Santos, 1975; Gomes, 1988).

1.1. Composição e estrutura das argilas

As argilas estruturam-se em folhas, camadas ou lamelas de silicatos hidratados. Essas folhas podem se combinar originando dois tipos de argilominerais. O tipo 1:1 possui camadas compostas por uma folha tetraédrica e uma octaédrica; já o tipo 2:1 possui duas folhas tetraédricas e uma octaédrica, como exposto na Figura 1. Como exemplos, é possível citar as caulinitas do tipo 1:1 e as esmectitas do tipo 2:1. As esmectitas são divididas em subgrupos: as hectoritas e as montmorilonitas. O grupo das hectoritas possui íons divalentes (como Mg^{2+}) no centro do octaedro, o que permite que todos os sítios octaédricos estejam ocupados e classifica-as como trioctaédricas. Já as montmorilonitas possuem íons trivalentes (Fe^{3+} , Al^{3+}), e são classificadas como dioctaédricas. Apenas 2/3 dos sítios octaédricos estão ocupados pelas argilas dioctaédricas. (Santos, 1975; Neumann, Gessner *et al.*, 2000).

As montmorilonitas são argilas naturais que possuem camadas que quando dispersas em água se agregam, formando estruturas conhecidas por tactóides. Os tactóides podem interagir face-a-face, face-a-aresta ou aresta-a-aresta, como apresentado na Figura 2 (Swartzen.SI e Matijevi.E, 1974; Santos, 1975). A formação destes tactóides permite a adsorção de íons catiônicos nos espaços interlamelares da montmorilonita.

Figura 1: Disposição das camadas de argilas.

Adaptado de Bensasson, Land *et al.* (1983)

Figura 2: Tipos de interação entre tactóides.

Fonte: Adaptado de Santos (1975)

As laponitas (Lap) são argilas sintéticas livre de impurezas e de propriedades consideradas idênticas às hectoritas naturais. A laponita possui forma de discos (não-lamelar), que é facilmente dispersa em água, como

apresenta a Figura 3. Esta característica permite maior área superficial em comparação a outras argilas, como a montmorilonita.

Argilas do tipo laponita possuem uma baixa porcentagem de ferro (aproximadamente 0,06%) em sua composição (Neumann, Gessner *et al.*, 2000). Este metal é um conhecido supressor de fluorescência (Shichi e Takagi, 2000). Outros tipos de argilas, como as montmorilonitas, possuem aproximadamente 3% de ferro em sua composição, de acordo com Source Clays, The Clay Minerals Society, University of Missouri, Columbia MO. Essas propriedades tornam a laponita uma boa opção para formação de híbridos de argila com materiais orgânicos catiônicos.

Figura 3: Estrutura da Laponita.

Fonte: Adaptado de Haraguchi (2011)

1.2. Propriedades das argilas

A possibilidade de troca iônica das argilas com o meio, chamada de capacidade de troca catiônica (CTC), é uma propriedade de grande interesse. Nas camadas tetraédricas das esmectitas, íons Si^{4+} podem ser substituídos por

íons trivalentes como Al^{3+} . O raio similar dos átomos não gera distorção na estrutura da argila. Mas a diferença nas cargas cria uma carga negativa que deve ser compensada por cátions na região interlamelar. Este fenômeno é conhecido como substituição isomórfica.

A região interlamelar ainda permite a troca de seus cátions por outros compostos catiônicos do meio. A facilidade com que essa troca ocorre determina a densidade de carga na superfície das camadas e permite ou não a acomodação de moléculas orgânicas iônicas na região interlamelar (Santos, 1975). As esmectitas com capacidade de troca iônica (CTC) de valores entre 30-100 meq/100 g possuem alta capacidade de inchamento e, portanto, são ideais para sorção de materiais orgânicos catiônicos.

Outra característica relevante das argilas é sua capacidade de inchamento, na qual ela se expande além do seu limite original devido à adsorção de água nos espaços interlamelares. Para isso, é necessário que exista certa densidade de carga na superfície da camada, de maneira que a água do meio consiga permear entre as lamelas. A capacidade de inchamento é uma importante característica das argilas montmorilonitas por causa da sua estrutura lamelar, que permite que a água seja acomodada nas suas camadas interlamelares. Além disso, pode-se medir o grau de inchamento das partículas através do número de lamelas agregadas face-a-face: quanto mais agregada a argila, menor seu grau de inchamento.

Ao dispersar a argila em água, a introdução de cátions nos sítios interlamelares é facilitada, de maneira que as cargas negativas da argila são predominantes e a floculação não ocorre. A adição de uma espécie catiônica, como um corante orgânico catiônico, permite a troca dos cátions da superfície da argila, como o Na^+ , sejam trocados pela espécie catiônica introduzida no meio até que o ponto de saturação seja atingido. Após esse ponto, os cátions presentes neutralizam as cargas negativas das partículas de argila e as forças atrativas predominam, ocorrendo floculação (Santos, 1975).

1.3. Híbridos formados por argila e compostos orgânicos

A presença de compostos orgânicos catiônicos em uma suspensão aquosa de argila permite a troca catiônica entre os cátions da camada

interlamelar da argila e as espécies químicas catiônicas do meio. Este processo de sorção dos compostos orgânicos é bastante simples. No esquema da Figura 4a, os pontos azuis representam as cargas negativas derivadas da substituição isomórfica das argilas. Quando espécies catiônicas são adicionadas ao meio, num primeiro momento há a interação destas espécies com a superfície da argila, como ilustrado na Figura 4b. A entrada dos compostos orgânicos nas camadas interlamelares da argila e consequente troca com os cátions naturais dessa região não é instantânea, e está apresentada na Figura 4c (Neumann, Gessner *et al.*, 2000; Ruiz-Hitzky, Aranda *et al.*, 2010).

Figura 4: Esquema da preparação de um híbrido argila-composto orgânico. Em (a): a argila pura em suspensão aquosa; em (b) a interação do composto orgânico com a superfície da argila; em (c) há a adsorção do composto orgânico na camada interlamelar da argila.

Fonte: adaptado de Ruiz-Hitzky, Aranda *et al.* (2010)

2. Moléculas orgânicas: Berberina e Palmatina

O tratamento de diversas patologias utilizando plantas medicinais é disseminado há anos em culturas tradicionais como a chinesa e a hindu. Com o avanço da ciência, os constituintes ativos de tais plantas foram isolados e

identificados, e atualmente são muito utilizados para a fabricação de medicamentos pela indústria farmacêutica. Algumas moléculas orgânicas podem ser extraídas de plantas, cuja função é protegê-las contra bactérias, vírus e fungos, além de repelir insetos e animais herbívoros e atrair aqueles insetos que contribuem com a dispersão de pólenes e sementes. Quando extraídas, apresentam propriedades antissépticas, fungicidas, bactericidas, virucidas, antimicrobianas, analgésicas, sedativas, anestésicas, antimicrobianas e anti-inflamatórias. Ainda, são muito utilizadas na indústria de cosméticos por suas fragrâncias (Bakkali, Averbeck *et al.*, 2008).

A berberina (Ber) e a palmatina (Pal) são alcalóides isolados de diversas plantas medicinais das famílias Ranunculaceae, Rutaceae e Berberidaceae (Waang 2017). Extratos de tais plantas têm sido usados na medicina Ayurveda para tratamento de feridas, infecções, controle de obesidade, desinteria, indigestão e picadas de cobras (Khan 2016). Alcalóides desta família possuem propriedades antifúngicas, antioxidante, antimicrobianas, anti-inflamatórias, antimaláricas, antioxidantes e antiplasmódicas (Li, Xu *et al.*, 2009; Costa, Pinheiro *et al.*, 2010; Lyamzaev, Pustovidko *et al.*, 2011; Rabelo, Pinheiro *et al.*, 2014).

Estudos de Andreazza, Vevert-Bizet *et al.* (2016) e de Bhattacharyya, Saha *et al.* (2017) apresentaram resultados favoráveis sobre o uso de berberina como fotosensibilizador para aplicação na terapia fotodinâmica, mas o mecanismo de foto-oxidação da berberina ainda não é conhecido. Além disso, a berberina adsorvida em argila do tipo saponita mostrou-se mais eficiente como antimicrobiano que amostras de berberina em solução aquosa e de amostras de argila em solução aquosa (Bujdak, Ratulovska *et al.*, 2016). Até o momento, não foi definido ainda como o híbrido berberina-argila interage para que isto seja possível.

Dumont e Monari (2015) estudaram a habilidade de gerar $^1\text{O}_2$ *in situ* ao interagir palmatina com moléculas de DNA, alterando sua estrutura e sua função biológica, danificando-as. Assim, estes autores propõem que este alcalóide seja usado para promover a destruição de tecidos cancerígenos.

Figura 5: Estruturas da Berberina e da Palmatina.

3. Princípios de fotofísica

Quando uma determinada molécula recebe radiação eletromagnética, o campo elétrico desta radiação perturba a espécie gerando um dipolo elétrico. Esta radiação pode ter frequência de oscilação bastante diferente da frequência de vibrações inerente à molécula, e neste caso a espécie química não será modificada. Mas, quando a radiação possui a mesma frequência das vibrações da molécula, a ressonância gerada permite a absorção de luz pela molécula, promovendo-a para um estado excitado. O retorno subsequente da molécula ao seu estado fundamental ocorre por determinadas vias, como mostra o Diagrama de Jablonski apresentado na Figura 6 (Turro, 1991).

Figura 6: Diagrama de Jablonski.

Fonte: Adaptado de Drummen (2012)

Na Figura 6, os estados eletrônicos S_0 , S_1 e S_n representam o estado fundamental da molécula, o primeiro estado excitado e os estados excitados subsequentes, respectivamente. As linhas mais grossas simbolizam o nível vibracional mais baixo do estado em questão, enquanto as linhas mais finas equivalem aos níveis energéticos vibracionais mais altos. Além disso, os estados triplete excitados são representados por T_1 e T_n . As linhas verticais ilustram transições de natureza rápida o suficiente para não haver deslocamento significativo do núcleo, e este fenômeno é conhecido como Princípio de Franck-Condon (Turro, 1991).

2.1. Processos não radiativos

Processos de transição não-radiativa são uma forma de relaxação eletrônica que liberam energia cinética e são associados a movimentos vibracionais nucleares. Há dois tipos de processos não radiativos: aqueles que ocorrem entre estados eletrônicos excitados num mesmo nível vibracional, e aqueles que ocorrem entre o menor nível vibracional de um estado eletrônico excitado e o estado fundamental de mesma multiplicidade de spin (Turro, 1991).

O processo de conversão interna é aquele no qual o elétron excitado relaxa rapidamente para o nível mais baixo do estado singlete excitado S_1 , o que ocorre tipicamente na ordem de 10^{-12} segundos (Lakowicz, 2006).

As moléculas que se encontram no nível mais baixo de S_1 podem também inverter os spins de seus elétrons, se convertendo ao estado triplete T_1 . A inversão do spin demanda energia, e por isso T_1 é menos energético que S_1 . Este processo é chamado de conversão intersistemas (Lakowicz, 2006).

Em suma, podemos equacionar os processos não radiativos de uma espécie química R da seguinte maneira:

Equação 1: Processos não radiativos

Na Equação 1, R representa uma espécie química, S_n , S_1 e S_0 representam estados singlete, T_n , T_1 e T_0 representam estados triplete, $^{**}R$ e *R representam estados excitados, $h\nu$ representa absorção de luz e Δ representa calor emitido (Turro, 1991).

2.2. Processos radiativos

A emissão de luz por uma substância, chamada luminescência, ocorre devido ao decaimento dos estados eletrônicos excitados. Divide-se o fenômeno da luminescência em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência. Estes processos são favorecidos quando há a presença de grupos cromóforos rígidos, que não permitem movimentos vibracionais ou rotacionais, como grupos aromáticos.

A fluorescência se origina de transições permitidas por spin. Portanto, ocorre quando o elétron no estado eletrônico excitado, singlete, está com o spin emparelhado com o spin do elétron no estado fundamental singlete. A transição mais usual é a $S_1 \rightarrow S_0$. O decaimento é então rápido, emitindo um fóton cujo tempo médio para seu retorno ao estado fundamental, conhecido como tempo de vida de fluorescência (τ_F), é tipicamente 10^{-8} segundos. Por outro lado, o processo de conversão interna ocorre em um tempo mais curto, aproximadamente 10^{-12} segundos.

Quando o elétron do estado eletrônico excitado está com o spin desemparelhado com o do elétron no estado fundamental singlete, ou seja, o elétron excitado está no estado triplete, o processo emissivo é chamado de fosforescência. Este tipo de transição depende de transições proibidas por spin, e.g. $T_1 \rightarrow S_0$. Para que este decaimento seja possível, o elétron deve primeiro inverter o seu spin, de maneira que os elétrons do estado excitado e do estado fundamental se emparelhem, e só então o decaimento ocorre. Assim, o tempo de vida deste fenômeno é mais longo, da ordem de milissegundos a segundos. Entretanto, em soluções fluidas a temperatura

ambiente, a fosforescência é dificilmente observada em meio fluido. Processos como emissões não radiativas e supressão de processos radiativos desativam a emissão radiativa, prejudicando a ocorrência da fosforescência (Turro, 1991; Lakowicz, 2006).

Representa-se os processos radiativos pelas seguintes equações:

Equação 2: Processos radiativos

Na Equação 2, R representa uma espécie química, S_1 e S_0 representam estados singlete, T_1 e T_0 representam estados triplete, *R representa um estado excitado e $h\nu$, $h\nu'$ e $h\nu''$ representam emissão e absorção de luz (Turro, 1991).

2.3. Supressão de fluorescência

A supressão de fluorescência consiste em qualquer processo que diminui a intensidade de fluorescência de uma molécula. Processos comuns deste tipo são rearranjo molecular, reações no estado excitado, formação de complexos no estado fundamental e supressão por colisão (ou supressão dinâmica).

Um supressor bastante conhecido é o oxigênio molecular. O mecanismo mais aceito para este processo é que a interação com o oxigênio gera um processo de cruzamento intersistemas do fluoróforo que o leva ao estado triplete. Halogênios também podem suprimir a emissão de fluorescência através de cruzamentos intersistemas. A presença de oxigênio molecular em medidas de rendimento quântico frequentemente suprime a fluorescência de moléculas, e portanto nesses casos a retirada do oxigênio molecular da solução implica num aumento da confiabilidade dos resultados (Lakowicz, 2006).

A formação de um complexo entre o fluoróforo e o supressor pode acarretar na transferência de elétrons entre o doador excitado e o receptor. Por

estar excitado, o doador possui um elétron no seu orbital desocupado de menor energia (LUMO – lowest unoccupied molecular orbital), que será transferido para o aceitador. O aceitador receberá o elétron no seu orbital ocupado de maior energia (HOMO – highest occupied molecular orbital). Este elétron então deve retornar ao doador, deixando o aceitador no seu estado excitado. Metais como ferro são conhecidos como supressores de moléculas fluorescentes, por mecanismos de transferência de elétrons, ilustrada na Figura 7 (Dellaguardia e Thomas, 1983).

Figura 7: Supressão de fluorescência por transferência de energia

Fonte: adaptado de Lakowicz (2006).

Outra possibilidade é a transferência de elétrons fotoinduzida, na qual um complexo carregado se forma entre o doador (D) e o aceitador (A) de elétrons (D^+A^-). Este complexo retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton, e então o elétron extra do aceitador retorna ao doador (Lakowicz, 2006).

A supressão também depende do solvente e da viscosidade do meio. Em geral solventes mais polares suprimem mais a fluorescência, assim amostras que apresentam pouca fluorescência podem ser estudadas em meios não-polares para medidas mais relevantes. Efeitos estéricos também influenciam na supressão da fluorescência de uma amostra: se o supressor tem mais acesso ao fluoróforo, maior é a supressão (Lakowicz, 2006).

OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal a formação dos híbridos Berberina-Laponita, Berberina-SWy-2, Palmatina-Laponita e Palmatina-SWy-2.

Os objetivos secundários deste trabalho são:

- Análise das propriedades fotofísicas da berberina e da palmatina em suspensões aquosas de laponita e de SWy-2;
- Avaliação da fluorescência dos híbridos formados;
- Avaliação da capacidade de produção de oxigênio singlete destes híbridos.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Materiais

Para este trabalho foram utilizadas dois tipos de argila. A argila do tipo montmorilonita SWy-2 foi adquirida do Source Clays, The Clay Minerals Society, University of Missouri, Columbia MO, e possui fórmula geral $\text{Na}_x[(\text{Al}_{2-x}\text{Mg}_x)\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH}_2)]$ (Rawat, Agarwal *et al.*, 2014). A argila do tipo hectorita laponita RD (Lap), obtida da Laporte Industries – UK, possui fórmula $\text{Na}^{+0.7}[(\text{Si}_8\text{Mg}_{5.5}\text{Li}_{0.3})\text{O}_{20}(\text{OH})_{2.5}\text{F}_{1.5}]$ segundo o fabricante. A berberina, a palmatina e os solventes utilizados foram obtidos da Sigma-Aldrich Co.

2. Equipamentos

As medidas de absorbância no UV-visível foram realizadas num espectrofotômetro UV-Vis (Shimadzu, UV2550); e para as medidas de emissão fluorescência e fosforescência utilizou-se um espectrofluorímetro (Hitachi, F4500).

3. Purificação da argila SWy-2

A argila montmorilonita SWy-2 foi purificada pelo método descrito por Gessner, Schmitt *et al.* (1994).

Em 1,5 L de água destilada dispersou-se 30,0 g da argila SWy-2 que permaneceu sob agitação constante durante 2 horas. Com agitação constante adicionou-se uma solução de HCl 2,0 mol L⁻¹ até pH 3,5 para remoção de carbonatos. Após 20 minutos a solução foi centrifugada com velocidade de 10.000 rpm e temperatura de 25 °C por 30 minutos. O procedimento foi repetido por mais duas vezes para eliminar sais solúveis. O sedimento centrifugado foi ressuspensionado em 1,5 L de água destilada e sob agitação constante foi adicionada uma solução de NaOH até se obter pH 8,0. A suspensão foi deixada em repouso por 12 horas. O sobrenadante foi sifonado e guardado em béquer. O sedimento depositado foi ressuspensionado novamente em pH 8,0. Esse procedimento foi repetido até que o sobrenadante se tornou

claro, sem material em suspensão. Quando o sobrenadante se tornou claro, o material depositado no fundo do béquer foi descartado. Sob agitação constante foi adicionada a solução de HCl ao sobrenadante sifonado até atingir pH 3,5, em seguida foi adicionado solução saturada de NaCl para deixar a argila na forma homoiônica (argila – Na⁺). A solução permaneceu em repouso por aproximadamente 12 horas até floculação total da argila. Após floculação rejeitou-se o sobrenadante, e a argila foi dializada em água deionizada e passada em sistema de purificação Easypure® RoDi até teste negativo para íons cloreto com AgNO₃ 0,1M. A argila purificada foi liofilizada. O produto final obteve coloração clara e consistência parecida com algodão.

Após esse processo de purificação, as suspensões aquosas de argila foram preparadas um dia antes do uso e mantidas sob agitação constante até a adsorção dos compostos orgânicos nas argilas, para que finalmente que as amostras pudessem ser caracterizadas e amplamente estudadas.

4. Preparo da argila Laponita RD para utilização em suspensão

A Laponita RD é uma argila sintética e foi utilizada como recebida. Antes do material ser utilizado para preparar as suspensões de argila, apenas realizou-se um procedimento de suspensão e liofilização.

5. Adsorção das moléculas orgânicas berberina e palmatina nas argilas

Soluções aquosas das moléculas orgânicas berberina e palmatina foram adicionadas às suspensões aquosas de argila nas seguintes proporções: 0,1; 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹, escolhidas com base nos bons resultados obtidos por Bujdak, Ratulovska *et al.* (2016). As medidas experimentais realizadas foram obtidas imediatamente após este procedimento.

6. Caracterização dos compostos orgânicos e dos compostos adsorvidos nas argilas

6.1. Espectroscopia de UV-visível

A lei de Lambert-Beer descreve uma relação linear entre a concentração e absorbância de uma amostra em soluções bem diluídas. Em altas concentrações, as interações entre as moléculas tornam-se muito significativas e não permitem que esta relação seja aplicada.

A lei de Lambert-Beer pode ser expressa numericamente pela Equação 3, na qual *Abs* é a absorbância da amostra, ϵ é o coeficiente de absortividade molar da amostra, *b* é o caminho óptico da luz e *c* é a concentração da amostra (Skoog, 1985).

Equação 3: Lei de Lambert-Beer

$$Abs = \epsilon . b . c$$

6.2 Tempo de vida do estado singlete usando fluorescência (τ_F)

Define-se tempo de vida da espécie excitada singlete (τ_F) pela fluorescência de uma molécula como o tempo de permanência das espécies excitadas antes de retornarem ao estado fundamental. O τ^S corresponde ao inverso da constante de velocidade k^S e, portanto, ao inverso da soma das constantes de todos os processos radiativos (k_r^S) e não radiativos (k_{nr}^S), isto inclui a emissão, conversão interna e conversão intersistemas (Lakowicz, 2006).

Para a determinação experimental do τ_F , dos compostos estudados, utilizou-se o método estraboscópico. Neste método, o detector é acionado imediatamente após o pulso, de maneira a registrar a intensidade da fluorescência e obter a curva de decaimento fluorescente (EasyLife V User's Manual, 2007).

6.3. Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

O rendimento quântico de fluorescência Φ_F é a relação entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Para a determinação de Φ_F foi utilizado o método de Fery-Forgues e Lavabre (1999), que relaciona o Φ_F de um composto já determinado (padrão secundário) com o da amostra e é descrito pela Equação 4.

Equação 4: Cálculo do rendimento quântico de fluorescência

$$\Phi_F = \frac{F_a \times A_p \times \eta_a^2}{F_p \times A_a \times \eta_p^2} \Phi_{Fp}$$

Na Equação 4 **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, F é a integral da área sob a curva de emissão de fluorescência, A refere-se à absorbância no comprimento de onda de excitação e η o índice de refração dos solventes utilizados; e os índices a e p indicam a amostra e o padrão, respectivamente.

6.4. Rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ)

A determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete Φ_Δ é um parâmetro importante, uma vez que a habilidade de geração de oxigênio singlete pelo híbrido alcalóide-argila implica na sua possível aplicação tanto na terapia fotodinâmica quanto como material antimicrobiano.

O rendimento quântico de oxigênio singlete foi obtido a partir do método indireto apresentado por Spiller, Kliesch *et al.* (1998), que usa um supressor de oxigênio singlete. Neste método, acompanha-se a cinética de degradação do supressor pela amostra utilizando medidas de UV-Vis e compara-se com a cinética de degradação do mesmo supressor por um padrão conhecido. O supressor deve apresentar bandas de absorção numa região onde a amostra e o padrão apresentem bandas desprezíveis, para que não haja interferências na medida. Além disso, a amostra e o padrão devem apresentar absorção de UV-Vis na mesma região.

O supressor escolhido neste estudo foi o rubreno, e a quantificação dos rendimentos quânticos foi comparada com uma solução de Φ_{Δ} conhecido. A determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete é realizada utilizando a Equação 5.

Equação 5: Cálculo do rendimento quântico de oxigênio singlete

$$\Phi_{\Delta} = \frac{k_a \times (1 - 10^{Abs_p}) \times \eta_p^2}{k_p \times (1 - 10^{Abs_a}) \times \eta_a^2} \Phi_{\Delta p}$$

Na Equação 5, **k** é a constante de velocidade de fotodecomposição do rubreno, **η** é o índice de refração dos solventes usados, **Abs** é a absorbância do fotossensibilizador no comprimento de onda da irradiação e os índices **p** e **a** identificam o padrão e a amostra, respectivamente.

6.5. Detecção de oxigênio singlete pelo método direto

O tempo de vida do oxigênio singlete produzido pelos alcalóides berberina e palmatina foi determinado em suspensão de argila do tipo laponita utilizando um fluorímetro resolvido no tempo composto por um laser Nd: YAG Brilliant B acoplado a um sistema OPO, excitando em 436 nm com pulso de 5 ns e energia 3 mJ/pulso, um monocromador e uma fotomultiplicadora Hamamatsu modelo R5509, com detecção no infravermelho próximo. Após a fotoexcitação em 436 nm, obteve-se o tempo de vida do transiente do oxigênio singlete gerado na amostra em 1270 nm. O tempo de vida foi determinado utilizando um ajuste para decaimento exponencial de primeira ordem no software Origin.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudos da Berberina em argilas Laponita e SWy-2

1.1. Espectro de absorção UV-Vis da berberina em solução aquosa

O espectro de UV-Vis da berberina em solução aquosa ($3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) foi obtido como parte de sua caracterização e está apresentado na Figura 8. Nela estão destacadas as principais bandas cujos máximos estão centrados em 228, 265, 345 e 425 nm. As duas últimas bandas são atribuídas às transições $\pi-\pi^*$ e $n-\pi^*$ da molécula, como já reportado por Bujdak, Ratulovska *et al.* (2016).

Figura 8: Espectro de UV-Vis da berberina em solução aquosa ($3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$).

1.2. Determinação do coeficiente de absorptividade molar (ϵ) da berberina em solução aquosa

Obtiveram-se espectros de UV-Vis da berberina em solução aquosa em diferentes concentrações para analisar a formação de agregados em soluções diluídas, de acordo com a Lei de Lambert-Beer (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Na Figura 9 estão apresentados os espectros de UV-Vis da berberina em solução aquosa em concentrações variadas. Até a concentração analisada de $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ não foram observados formação, desaparecimento ou deslocamento de bandas, indicando que não houve formação de agregados nessas concentrações.

Além disso, pela Figura 10 nota-se uma relação linear entre as concentrações e absorbâncias das soluções de berberina em água e portanto, nesta faixa de concentração a lei de Lambert-Beer se aplica para berberina em solução aquosa. Pode-se então determinar o coeficiente de atenuação molar utilizando o coeficiente linear obtido destes gráficos. Para os comprimentos de onda 325, 344 e 425 nm obteve-se os valores de ϵ iguais a $1,62 \times 10^4$, $2,29 \times 10^4$ e $4,86 \times 10^3 \text{ mol (L cm)}^{-1}$, respectivamente. O coeficiente de absorptividade molar encontrado para $\lambda = 344 \text{ nm}$ condiz com o valor encontrado na literatura $\epsilon_{(\lambda=344 \text{ nm})} = 2,28 \times 10^4 \text{ mol (L cm)}^{-1}$, determinado por Rytwo, Varman *et al.* (2011). A Figura 11 apresenta um gráfico de absorptividade da berberina em função do comprimento de onda.

Figura 9: Espectros de absorção de diferentes concentrações da berberina em solução aquosa.

Figura 10: Gráfico dos valores da absorbância da berberina em solução aquosa para diferentes concentrações nos comprimentos de onda: (a) $\lambda = 325$ nm, (b) $\lambda = 344$ nm e (c) $\lambda = 425$ nm.

Figura 11: Gráfico de absortividade em função do comprimento de onda da berberina

1.3. Berberina em suspensões de Lap e SWy-2

Para caracterização da berberina em suspensões de argila, obtiveram-se os espectros de absorbância das amostras estudadas, imediatamente após o seu preparo. Os espectros de UV-Vis da berberina em solução aquosa ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e em suspensões de SWy-2 ($8 \times 10^{-2} \text{ mol g}^{-1}$) e laponita ($8 \times 10^{-2} \text{ mol g}^{-1}$) estão apresentados na Figura 12.

Figura 12: Espectros de UV-Vis da berberina (8×10^{-6} mol L⁻¹) em solução aquosa, em suspensão de SWy-2 (8×10^{-2} mol g⁻¹) e em suspensão de laponita (8×10^{-2} mol g⁻¹).

Em suspensões de argila as bandas referentes às ligações $\pi-\pi^*$ (345 nm) e $n-\pi^*$ (425 nm) sofrem um deslocamento batocrômico para 350 e 430 nm, respectivamente. A alteração no perfil do espectro de absorbância da Figura 12 sugere um rearranjo estrutural na molécula de berberina após a interação com a argila. Essas mudanças podem ter ocorrido devido à adsorção da berberina tanto na laponita quanto na SWy-2, aumentando a rigidez das moléculas nos seus espaços interlamelares (Neumann, Gessner *et al.*, 2000). Em argilas do tipo saponita a alteração dos espectros UV-Vis sugere que a molécula foi adsorvida, como mostra o estudo de Bujdak, Ratulovska *et al.* (2016).

Figura 13: Comportamento espectral da berberina ($3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo nos seguintes sistemas: (a) em suspensão de argila SWy-2 ($0,11 \text{ g L}^{-1}$) e (b) em suspensão de argila laponita ($0,11 \text{ g L}^{-1}$).

1.4. Estudo do rendimento quântico de fluorescência da berberina

O rendimento quântico de fluorescência da berberina em suspensão das argilas laponita e SWy-2 foi determinado a partir dos espectros de emissão e UV-Vis das amostras nas seguintes razões berberina/argila: 0,1; 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹.

Figura 14: Espectros de UV-Vis e emissão imediatamente após a adição de berberina em suspensão de laponita nas razões Ber/Lap 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹ em água. Em (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 350$ nm e (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 430$ nm.

Nos espectros da Figura 14 é possível observar que o perfil dos espectros de absorvância manteve-se o mesmo, sem o deslocamento das

bandas em 350 e 430 nm. O perfil dos espectros de emissão também apresentou as bandas centradas em 525 nm para todas as razões utilizadas de berberina adsorvida em laponita.

Embora as concentrações utilizadas de berberina foram as mesmas, o rendimento quântico de fluorescência aumenta a medida que a razão Ber/Lap diminui. O aumento da concentração de berberina em relação à argila permite que mais alcalóides entrem em sítios da argila já ocupados por outras moléculas. Um processo de transferência de carga de uma molécula no estado singlete para outra no estado fundamental pode causar auto supressão da berberina, implicando em menores intensidades de fluorescência observadas. Outros estudos também observaram aumento de fluorescência em menores concentrações de molécula adsorvida para argila, como o de Bujdak, Ratulovska *et al.* (2016), que estudou berberina adsorvida em saponita, e o de (Villemure, Detellier *et al.*, 1991), que estudou a sorção do paraquat em montmorilonitas e em hectoritas.

Figura 15: Espectros da berberina em suspensão de SWy-2 nas razões Ber/SWy-2 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹ de (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm e (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{\text{ex}} = 430$ nm.

A Figura 15 apresenta os espectros obtidos para as amostras de Ber/SWy-2. Aqui, as emissões de fluorescência foram muito menores em relação às obtidas para as amostras de Ber/Lap para ambas as excitações em 350 e 430 nm. A argila montmorilonita SWy-2 provém de fontes naturais e possui alta concentração de ferro em sua composição na forma de Fe_2O_3 . Os cátions Fe^{3+} são supressores eficientes de moléculas orgânicas em estado singlete, causando a diminuição na intensidade de fluorescência destas amostras (Shichi e Takagi, 2000).

Além disso, as maiores intensidades foram observadas para a amostra de razão Ber/SWy-2 1,0 mmol.g⁻¹. O alto teor ferro presente na argila do tipo montmorilonita implica em mais supressores de fluorescência em diversos sítios da argila. Johnston e Cardile (1987) sugerem que a localização do ferro nestas argilas está nas camadas tetraédrica e octaédrica, e aumentam a carga negativa dos espaços interlamelares. Com o aumento da carga, surge um aumento da afinidade destas regiões por moléculas catiônicas. A berberina em suspensão de argila SWy-2 então seria adsorvida primeiro nestas regiões nas quais a emissão de fluorescência pelo híbrido será menor. A adição de maiores

concentrações de berberina permitiria então a ocupação de sítios na argila capazes de emitir mais fluorescência. Assim, diferente do observado da sorção de berberina na laponita, há mais emissão de fluorescência em maiores razões berberina/SWy-2.

Tabela 1: Rendimento quântico de fluorescência da berberina em diversos sistemas.

Sistema	Comprimento de onda de excitação	Proporção Berberina/Argila (mmol.g ⁻¹)	ϕ_F	Variância	Desvio Padrão
Berberina em suspensão de laponita	$\lambda = 430$ nm	1,0	$2,1 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-5}$	$8,2 \times 10^{-3}$
		0,5	$2,9 \times 10^{-2}$	$9,1 \times 10^{-5}$	$9,6 \times 10^{-3}$
		0,1	$6,1 \times 10^{-2}$	$1,4 \times 10^{-4}$	$1,2 \times 10^{-2}$
	$\lambda = 350$ nm	1,0	$2,9 \times 10^{-2}$	$7,3 \times 10^{-5}$	$8,5 \times 10^{-3}$
		0,5	$4,5 \times 10^{-2}$	$6,8 \times 10^{-5}$	$8,2 \times 10^{-3}$
		0,1	0,101	$5,6 \times 10^{-5}$	$7,4 \times 10^{-3}$
Berberina em suspensão de SWy-2	$\lambda = 430$ nm	1,0	$6,7 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-3}$
		0,5	$4,0 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-4}$
		0,1	$5,0 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,2 \times 10^{-3}$
	$\lambda = 350$ nm	1,0	$8,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,0 \times 10^{-3}$
		0,5	$5,8 \times 10^{-3}$	$7,0 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-4}$
		0,1	$5,6 \times 10^{-3}$	$4,3 \times 10^{-7}$	$6,5 \times 10^{-4}$

A Tabela 1 apresenta as médias dos valores determinados de rendimento quântico da berberina, calculados a partir da Equação **Erro! Fonte de referência não encontrada.** e utilizando os espectros obtidos nas Figura 14 e Figura 15 e a riboflavina em etanol como padrão. A riboflavina em etanol apresenta rendimento quântico de fluorescência de valor 0,3 (Koziol, 1966). Em solução aquosa a berberina não apresenta fluorescência (Bujdak, Ratulovska *et al.*, 2016). As medidas deste experimento foram realizadas em triplicata.

Os maiores valores de rendimento quântico de fluorescência determinados foram os das amostras de berberina em suspensão de laponita, em especial para a razão 0,1 mmol.g⁻¹ excitando em 350 nm, cujo valor foi de $\phi_F = 0,101$. Este valor é considerado baixo em relação à outros compostos fluorescentes, como a Rodamina 6G cujo rendimento quântico de fluorescência é de 0,95 em água quando excitada em 488 nm (Magde, Rojas *et al.*, 1999), ou

a fluoresceína em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ NaOH a 22°C cujo rendimento quântico de fluorescência é também 0,95 quando excitada em 496 nm (Lakowicz, 2006). Este dado está de acordo com as intensidades obtidas de fluorescência na Figura 14, nas quais as maiores intensidades obtidas foram as das amostras de razão Ber/Lap $0,1 \text{ mmol.g}^{-1}$. Mais uma vez, o resultado sugere que o aumento da concentração de berberina em suspensão de laponita favorece a ocupação de sítios da argila por mais moléculas de berberina, ocasionando em auto supressão de fluorescência e a consequente redução dos valores de rendimento quântico de fluorescência das amostras.

As amostras de berberina em suspensão de SWy-2 apresentaram diferenças nos seus valores determinados de rendimento quântico de fluorescência em comparação às amostras em suspensão de laponita. Observa-se que os maiores rendimentos quânticos de fluorescência foram obtidos nas amostras de maior razão Ber/SWy-2, refletindo novamente os efeitos da presença de um supressor de fluorescência na composição da SWy-2: a maior afinidade dos sítios com maior índice de ferro da argila induz a ocupação deste primeiro, portanto quantidades baixas de berberina geram menor intensidade de fluorescência e consequente rendimento quântico de fluorescência mais baixo. O aumento da concentração de berberina para uma mesma quantidade de argila ocasiona em maior rendimento quântico de fluorescência, como apresentado nos dados da Tabela 1.

1.5. Estudo do tempo de vida de fluorescência do estado excitado da berberina nas argilas laponita e SWy-2

Para as medidas de tempo de vida de fluorescência, utilizou-se um LED de 445 nm como fonte de excitação e um filtro “*long pass*” de 530 nm. Como solução de espalhamento foi usado o LUDOX, para obtenção da função de resposta do instrumento. Em cada medida, o número de canais foi 600 e o tempo de integração foi 4s. A precisão dos resultados foi determinada pelos valores de χ^2 , que devem ser próximos de 1, e pelo parâmetro Durbin-Watson (DW) que determina a aleatoriedade do padrão residual. Para um ajuste satisfatório o valor de DW deve ser próximo a 2 (Sevilla, Garcia-Blanco *et al.*, 2009).

Os decaimentos de tempo de vida de fluorescência do estado excitado da berberina em suspensão de laponita e SWy-2 estão apresentados nas Figura 16 e Figura 17, respectivamente. Para este experimento, todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Figura 16: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da berberina ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em suspensão de laponita ($8 \times 10^{-2} \text{ mol g}^{-1}$).

Figura 17: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da berberina ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em suspensão de SWy-2 ($8 \times 10^{-2} \text{ mol g}^{-1}$).

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos de tempo de vida de fluorescência do estado excitado da berberina em suspensão de argilas laponita e SWy-2. Em solução aquosa, a berberina não apresenta fluorescência (Inbaraj, Kukienczak *et al.*, 2001). Logo, não foi possível determinar o tempo de vida de fluorescência para a berberina em água. Em ambas as suspensões de laponita e SWy-2, o comportamento do tempo de vida de fluorescência para a berberina no estado excitado foi monoexponencial.

Tabela 2: Parâmetros de tempo de vida do singlete da berberina em suspensão de argila.

Amostra (mmol.g ⁻¹)	τ_1 (ns)	a ₁	χ^2	DW	Variância	Desvio Padrão	
Ber/Lap	0,1	3,24	0,36	1,04	1,76	0,70	0,844
	0,5	1,39	0,67	0,80	1,89	0,11	0,34
	1,0	1,61	0,62	1,06	1,92	0,11	0,34
Ber/SWy-2	0,1	0,46	1,85	0,92	1,83	0,01	0,09
	0,5	0,73	1,34	0,92	1,82	0,02	0,14
	1,0	0,67	1,38	1,04	1,92	0,00	0,02

Os dados da Tabela 2 apresentam as médias obtidas dos valores de tempo de vida de fluorescência maiores para as amostras de berberina em suspensão de laponita. Em suspensão de SWy-2, os tempos de vida de fluorescência do estado excitado da berberina obtidos foram menores em comparação com os das amostras em suspensão de laponita. Este resultado pode estar relacionado com os diferentes teores de íons Fe³⁺ contidos nas duas argilas, que como já mencionado é capaz de suprimir a fluorescência de moléculas orgânicas adsorvidas na argila.

Além disso, os tempos de vida de berberina no estado singlete obtidos para as amostras com a menor razão Ber/Lap de 0,1 mmol.g⁻¹ foram significativamente mais longos que para as outras amostras estudadas. Estes resultados condizem com os maiores valores de intensidade de fluorescência e rendimento quântico de fluorescência obtidos para estas amostras. Essa tendência sugere mais uma vez o aumento da supressão de fluorescência com o aumento da razão entre as concentrações de berberina e argila, devido ao aumento das moléculas de berberina nos mesmos sítios de laponita.

A berberina em suspensão de SWy-2 apresenta rendimento quântico de fluorescência significativamente menores que quando em suspensão de laponita, resultado da alta supressão de fluorescência pelos íons ferro presentes na montmorilonita. Além disso, estes íons possuem maior carga positiva, favorecendo a ocupação destas regiões das áreas interlamelares por moléculas capazes de neutralizá-las, como é o caso da berberina. Estes sítios serão mais facilmente ocupados pela berberina, mas não são capazes de emitir fluorescência. Com o aumento da concentração de berberina, mais moléculas podem ser adsorvidas em regiões de menor teor de ferro e, portanto mais prováveis de emitir fluorescência. Este comportamento resulta em maiores rendimentos quânticos de fluorescência em amostras de maior razão Ber/SWy-2.

Com base nestes resultados, foi realizado um estudo sobre a capacidade de produção de oxigênio singlete pela berberina em suspensão de laponita na razão Ber/Lap 0,1 mmol.g⁻¹, que gerou melhores resultados.

1.6. Estudo da produção de oxigênio singlete pela berberina em suspensões de laponita pelo método direto

Para o estudo da produção de oxigênio pela berberina em suspensões de argila, optou-se pela utilização da argila Laponita na proporção 0,1 mmol.g⁻¹ Ber/Lap. Além disso, foi utilizada solução de D₂O por gerar maior tempo de vida do oxigênio singlete que H₂O (Junqueira, Severino *et al.*, 2002). As curvas de decaimento de luminescência de oxigênio singlete obtidas estão apresentadas na Figura 18, já com os ajustes exponenciais determinados pelo software Origin.

Figura 18: Sinal de decaimento de luminescência do oxigênio singleto coletado por 5 minutos nas amostras (a) berberina (8×10^{-6} mol L⁻¹) em solução de D₂O e (b) Ber/Lap 0,1 mmol.g⁻¹ em D₂O.

Os valores de tempo de vida do oxigênio singleto determinados para a solução de berberina em D₂O foi de 22,3 μ s, e para a solução Ber/Lap 0,1 mmol.g⁻¹ em D₂O foi 22,7 μ s. A diferença portanto não foi significativa,

indicando que não houve diferença na produção de oxigênio singlete entre as amostras estudadas de berberina em suspensão de laponita.

A capacidade antimicrobiana das argilas montmorilonitas foi descrita por diferentes autores (Rawat, Agarwal *et al.*, 2014; Wei, Wang *et al.*, 2014; Lombardo, Poli *et al.*, 2016). Da mesma forma, Rawat, Agarwal *et al.* (2014) descreveram a atividade antimicrobiana de laponita em relação a efeitos antimicrobianos. Os mecanismos envolvidos são descritos em termos das propriedades das argilas.

Bujdak (2015) estudou a atividade antimicrobiana da berberina em suspensões coloidais de argila saponita em duas condições: sob incidência de luz e no escuro. As amostras descritas apresentaram melhores propriedades antimicrobianas quando fotossensibilizadas por luz. Entretanto, não é proposto o mecanismo envolvido para esse melhor desempenho. Um mecanismo possível para a destruição de tecidos biológicos seria pelo aumento da produção de oxigênio singlete quando a berberina adsorvida pela argila é fotossensibilizada, análogo ao estudo da interação da palmatina com DNA de Hirakawa e Hirano (2008). Nossos resultados referentes à produção de oxigênio singlete indicam que a atividade antimicrobiana da berberina em suspensão coloidal de argila não está relacionada com nenhum aumento na produção de oxigênio singlete pela interação da berberina com a argila. Portanto, deve haver outro mecanismo envolvido para que o aumento da atividade antimicrobiana seja possível.

2. Estudos da Palmatina em argilas Laponita e SWy-2

2.1. Espectro de absorção UV-Vis da palmatina em solução aquosa

O espectro UV-Vis da palmatina em solução aquosa (3×10^{-5} mol L⁻¹) está apresentado na Figura 19. Nele, há quatro bandas de absorção com máximos centrados em 224, 273, 340 e 422 nm. A presença de bandas em comprimentos de onda acima de 300 nm nesta molécula sugere seu potencial para atuar como fotosensibilizador. Atribui-se as duas ultimas bandas às

transições π - π^* e n - π^* , de maneira análoga ao encontrado para a berberina num estudo realizado por Bujdak, Ratulovska *et al.* (2016).

Figura 19: Espectro de UV-Vis da palmatina em solução aquosa (3×10^{-5} mol L $^{-1}$)

2.2. Determinação do coeficiente de atenuação molar (ϵ) da palmatina em solução aquosa

Analizou-se os espectros de diferentes concentrações de UV-Vis da palmatina em solução aquosa, a fim de determinar o coeficiente de atenuação molar (ϵ) em 340 e 420 nm. Nota-se, pela Figura 20, que não ocorreu formação, desaparecimento ou deslocamento das bandas, sugerindo que o alcalóide não forma agregados em concentrações até 10^{-5} mol L $^{-1}$.

Figura 20: Espectros de absorção de diferentes concentrações da palmatina em solução aquosa.

Na Figura 21 observa-se a relação linear entre as absorbâncias e as concentrações das soluções de palmatina até a concentração $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Assim como as soluções aquosas de berberina, as soluções de palmatina em água também seguem a lei de Lambert-Beer. O coeficiente de atenuação molar determinado a partir da inclinação deste gráfico para os comprimentos de onda 320 nm e 420 nm foi igual a $3,38 \times 10^4 \text{ mol cm}^{-1}$ e $7,14 \times 10^3 \text{ mol (L cm)}^{-1}$, respectivamente. Até o momento, não foram encontrados valores de ϵ da palmatina na literatura para comparação. O gráfico de absorvidade pelo comprimento de onda está apresentado na Figura 22.

Figura 21: (a) Gráfico dos valores da absorbância da palmatina ($\lambda = 340 \text{ nm}$) em solução aquosa para diferentes concentrações, (b) Gráfico dos valores da absorbância da palmatina ($\lambda = 420 \text{ nm}$) em solução aquosa para diferentes concentrações.

Figura 22: Gráfico de absorptividade da palmatina em função do comprimento de onda

2.3. Palmatina em suspensões de SWy-2 e laponita

A Figura 23 apresenta os espectros da palmatina em solução aquosa e na presença de uma suspensão aquosa de SWy-2 e laponita. As bandas que aparecem em 340 nm (π - π^*) e 420 nm (n - π^*) no espectro da palmatina em solução aquosa sofrem deslocamento batocrômico para 350 nm e 430 nm no espectro da palmatina adsorvida em argila, um indício de que ocorreram mudanças na estrutura eletrônica da palmatina após a adsorção sobre a superfície das argilas.

Figura 23: Espectros de UV-Vis da palmatina (8×10^{-6} mol L⁻¹) em solução aquosa, em suspensão de SWy-2 (8×10^{-2} mol g⁻¹) e em suspensão de laponita (8×10^{-2} mol g⁻¹).

O comportamento espectral em função do tempo da palmatina em suspensão de SWy-2 está apresentado na Figura 24a. No início, os máximos de absorção estão em 350 e 430 nm. Após 4h, há uma diminuição na absorção da banda em 350 nm e formação de um isobéstico em 356 nm ao mesmo tempo em que ocorre um deslocamento da outra banda de 440 nm para 444 nm, também com formação de um isobéstico em 442 nm. Este deslocamento dos máximos de absorção sugere que possa estar ocorrendo adsorção da palmatina em diferentes sítios da argila.

Na Figura 24b estão apresentados os espectros da palmatina em suspensão de laponita em diferentes tempos. Inicialmente os máximos de absorção estão em 350 nm e 430 nm, mas ao longo do tempo observa-se um deslocamento da banda de 430 para 440 nm, indicando que também há mudanças na estrutura da palmatina em suspensão de laponita em relação à palmatina em solução aquosa.

Figura 24: Comportamento espectral da palmatina ($3 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) em função do tempo nos seguintes sistemas: (a) em suspensão de argila SWy-2 ($0,11 \text{ g L}^{-1}$) e (b) em suspensão de argila laponita ($0,11 \text{ g L}^{-1}$).

2.4. Estudo do rendimento quântico de fluorescência da palmatina

A fim de se determinar o rendimento quântico de fluorescência da palmatina em suspensão das argilas laponita e SWy-2, foram obtidos os espectros de emissão e UV-Vis das amostras palmatina/argila utilizando as razões 0,1; 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹ apresentados nas Figura 25 e Figura 26. Segundo os estudos de Bujdak, Ratulovska *et al.* (2016), as intensidades de fluorescência devem aumentar com menores proporções da molécula orgânica em relação à argila. Este comportamento também foi observado nos estudos realizados neste presente trabalho para o alcalóide berberina. A determinação dos rendimentos quânticos de fluorescência das amostras estudadas neste trabalho também apresenta valores maiores para menores proporções berberina/argila. As medidas deste experimento foram realizadas em triplicada.

Figura 25: Espectros da palmatina em suspensão de laponita nas razões Pal/Lap 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹ de: (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 340$ nm, (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{ex} = 420$ nm e (d) espectro de excitação em $\lambda_{em} = 545$ nm.

A Figura 25 apresenta os espectros obtidos de UV-Vis, emissão e excitação para as amostras de palmatina em suspensão de laponita nas razões 0,1; 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹. Nota-se que mesmo em proporções diferentes de Pal/Lap não há alteração no perfil dos espectros de absorvância, como a formação, o desaparecimento ou o deslocamento de bandas.

A amostra de Pal/Lap 0,1 mmol.g⁻¹ foi a que apresentou as maiores intensidades de fluorescência. O perfil dos espectros de emissão manteve-se o mesmo para todas as amostras, com o máximo de emissão centrado em 530 nm. Estes resultados sugerem que, assim como foi o resultado obtido para as análises realizadas com berberina adsorvida em argila, as amostras de menores concentrações evitam o acúmulo de moléculas orgânicas nas camadas interlamelares da laponita, não permitindo a ocorrência de auto supressão de fluorescência.

Não foi observado qualquer efeito pronunciado com relação a deslocamento de bandas para as excitações nos comprimentos de onda 340 e 420 nm.

Figura 26: Espectros da palmatina em suspensão de SWy-2 nas razões Pal/SWy-2 0,1, 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹ de: (a) UV-Vis, (b) emissão de fluorescência em $\lambda_{\text{ex}} = 340$ nm, (c) emissão de fluorescência em $\lambda_{\text{ex}} = 420$ nm e (d) espectro de excitação em $\lambda_{\text{em}} = 545$ nm.

A Figura 26 apresenta os espectros de UV-Vis, emissão e excitação das amostras de Pal/SWy-2. Observa-se que não há deslocamento, formação ou desaparecimento de bandas com a alteração da proporção Pal/SWy-2 no espectro de absorbância. As maiores intensidades de fluorescência obtidas foram para a amostra de $1,0 \text{ mmol.g}^{-1}$. Além disso, o perfil dos espectros de emissão e excitação das amostras de diferentes razões Pal/SWy-2 manteve-se o mesmo, com bandas centradas em 530 nm.

O alto teor de íons Fe^{3+} da SWy-2 suprime a fluorescência da palmatina adsorvida, explicando as baixas intensidades de fluorescência obtidas aqui em relação às amostras em suspensão de laponita. Além disso, o aumento da carga negativa das camadas interlamelares em função do ferro presente na composição da argila aumenta a afinidade da montmorilonita pelas moléculas de palmatina. Estas regiões são ocupadas preferencialmente, mas não emitem fluorescência. A adição de palmatina neste caso permite que mais moléculas ocupem regiões com menores concentrações de supressores, aumentando a fluorescência da molécula. Assim, amostras com maiores razões Pal/SWy-2 são capazes de emitir maiores intensidades de fluorescência.

A Tabela 3 apresenta os valores determinados de rendimentos quânticos utilizando a riboflavina em etanol ($\phi_F = 0,3$) (Koziol, 1966) como padrão. Estes valores representam as médias das medidas realizadas em triplicata.

Tabela 3: Rendimento quântico de fluorescência da palmatina em diversos sistemas.

Sistema	Comprimento de onda excitado	Proporção Palmatina/Argila (mmol.g ⁻¹)	Φ_F	Variância	Desvio Padrão
Palmatina em suspensão de laponita	$\lambda = 420$ nm	1,0	0,012	$1,7 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-3}$
		0,5	0,011	$8,6 \times 10^{-6}$	$2,9 \times 10^{-3}$
		0,1	0,049	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-3}$
	$\lambda = 340$ nm	1,0	0,022	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,1 \times 10^{-3}$
		0,5	0,024	$4,0 \times 10^{-6}$	$2,0 \times 10^{-3}$
		0,1	0,097	$3,3 \times 10^{-5}$	$5,8 \times 10^{-3}$
Palmatina em suspensão de SWy-2	$\lambda = 420$ nm	1,0	$4,8 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^{-7}$	$5,1 \times 10^{-4}$
		0,5	$3,1 \times 10^{-3}$	$6,3 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-4}$
		0,1	$3,2 \times 10^{-3}$	$3,3 \times 10^{-9}$	$5,7 \times 10^{-5}$
	$\lambda = 340$ nm	1,0	$8,5 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-7}$	
		0,5	$4,7 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-8}$	$1,7 \times 10^{-4}$
		0,1	$4,0 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-7}$	$3,8 \times 10^{-4}$
Palmatina em solução aquosa	$\lambda = 420$ nm	-	$6,0 \times 10^{-4}$		
	$\lambda = 340$ nm	-	$5,0 \times 10^{-4}$		

A amostra no sistema palmatina em suspensão de laponita na razão 0,1 mmol.g⁻¹ excitando em 340 nm apresentou como resultado o maior rendimento quântico de fluorescência 0,049 comparando aos demais sistemas estudados. Este resultado se comparado com outros compostos fluorescentes, tais como Rodamina 6G ($\lambda_{ex} = 488$ nm, água) de rendimento quântico de fluorescência 0,95 (Magde, Rojas *et al.*, 1999) e fluoresceína ($\lambda_{ex} = 496$ nm, 0,1 mol.L⁻¹ NaOH a 22°C) de rendimento quântico de fluorescência 0,95 (Lakowicz, 2006), o rendimento quântico de fluorescência obtido para o sistema Pal/Lap 0,1 mmol.g⁻¹ é relativamente baixo, mas nota-se o aumento significativo deste valor em relação à palmatina em água, cujo rendimento quântico de fluorescência é da ordem de 10⁻⁴.

Os valores determinados para o rendimento quântico de fluorescência da palmatina estão em concordância com as intensidades obtidas de fluorescência apresentadas na Figura 25 e Figura 26. Estes resultados sugerem mais uma vez que maiores proporções de palmatina em relação à

laponita favorecem a auto supressão de fluorescência, levando a consequente diminuição do rendimento quântico de fluorescência da Pal/Lap.

As amostras de palmatina em suspensão de SWy-2 apresentam rendimento quântico de fluorescência mais altos para proporções maiores de Pal/SWy-2. Este resultado está de acordo com os espectros obtidos das intensidades de fluorescência, apresentados Figura 26. O comportamento observado pode ser explicado mais uma vez pela supressão de fluorescência causada pelo ferro da montmorilonita. A adição de palmatina nesta argila permite maiores rendimentos quânticos de fluorescência, pois possibilita a adsorção de palmatina em regiões que não suprimem fluorescência na SWy-2.

2.5. Estudo do tempo de vida de fluorescência do estado excitado da palmatina em argilas SWy-2 e laponita

Realizou-se o estudo do tempo de vida de fluorescência do estado excitado da palmatina em suspensão de argila usando um LED de 445 nm como fonte de excitação e um filtro “*long pass*” de 530 nm. O LUXOD foi utilizado como solução de espalhamento, para obtenção da função de resposta do instrumento. Para todas as medidas, o número de canais foi 600 e o tempo de integração foi 4s. A precisão dos resultados foi determinada pelos valores de χ^2 , que devem ser próximos de 1, e pelo parâmetro Durbin-Watson (DW) que determina a aleatoriedade do padrão residual. Para um ajuste satisfatório o valor de DW deve ser próximo a 2 (Sevilla, Garcia-Blanco *et al.*, 2009).

O decaimento do tempo de vida de fluorescência da Pal/Lap e Pal/SWy-2 estão apresentados nas Figura 27 e Figura 28, respectivamente. O tempo de vida de fluorescência determinado para a palmatina em suspensão de laponita apresentou um comportamento biexponencial como indicado na Tabela 4. Em suspensão de SWy-2, o comportamento da palmatina foi monoexponencial. Os valores apresentados na Tabela 4 são as médias dos resultados obtidos em triplicata para este experimento.

Figura 27: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da palmatina ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em suspensão de laponita ($8 \times 10^{-2} \text{ mol g}^{-1}$).

Figura 28: Decaimento do tempo de vida de fluorescência da palmatina ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em suspensão de SWy-2 ($8 \times 10^{-2} \text{ mol g}^{-1}$).

Tabela 4: Parâmetros de tempo de vida de fluorescência da palmatina em suspensão de argila.

Amostra (mmol.g⁻¹)	τ_1 (ns)	a_1	τ_2 (ns)	a_2	χ^2	DW
Pal/Lap 0,1	5,62	0,23 (41%)	8,07	0,35 (60%)	0,94	1,83
Pal/Lap 0,5	0,85	0,59 (61%)	5,45	0,37 (38%)	1,03	1,84
Pal/Lap 1,0	0,69	0,67 (63%)	4,45	0,39 (36%)	1,08	1,86
Pal/SWy-2 0,1	0,63	1,46 (100%)	-	-	1,10	1,90
Pal/SWy-2 0,5	0,63	1,34 (100%)	-	-	1,00	1,91
Pal/SWy-2 1,0	0,81	1,14 (100%)	-	-	0,89	1,84

As argilas montmorilonitas, como a SWy-2, provém de fontes naturais, contendo assim, ferro na forma de Fe₂O₃. Os cátions de Fe³⁺ são conhecidos por agirem como eficientes supressores de estado singlete excitado das moléculas de corantes (Shichi e Takagi, 2000).

As amostras no sistema palmatina-laponita apresentaram dois tempos de vida de fluorescência. Os tempos de vida mais longos indicam que as moléculas orgânicas estão em sítios de adsorção capazes de manter a palmatina numa conformação mais rígida, tornando mais favorável a excitação das moléculas para o estado singlete e consequentemente emitindo mais luz fluorescente. Os tempos de vida de maior porcentagem representam sítios de adsorção mais prováveis de encontrar palmatina adsorvida, portanto são regiões de maior afinidade pela molécula. No caso da amostra no sistema Pal/Lap 0,1 mmol.g⁻¹, a região de maior afinidade possui tempo de vida mais longo, e as amostras Pal/Lap 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹ apresentam tempos de vida mais curto.

Os tempos de vida mais curtos para o sistema Pal/Lap podem se referir a dois sítios de adsorção possíveis. Um são sítios com maior teor de íons ferro, que suprimem a fluorescência da palmatina, e outro são regiões mais superficiais da laponita, que não permitem que a molécula adote uma estrutura planar e rígida. As moléculas da área superficial da laponita não são capazes de emitir fluorescência pois sofrem processos de decaimento não-radiativos

devido à menor rigidez e consequente maior capacidade de vibração da molécula.

Observa-se diferentes tempos de vida obtidos nas proporções 0,1; 0,5 e 1,0 mmol.g⁻¹. O aumento da concentração de palmatina para uma concentração fixa de laponita sugere que mais moléculas de palmatina estão ocupando os mesmos sítios de adsorção, gerando uma auto supressão de fluorescência. As moléculas excitadas podem transferir carga para moléculas de palmatina no estado fundamental, gerando auto supressão de fluorescência. Os tempos significativamente mais longos da amostra 0,1 em relação às outras amostras sugerem que esta razão é mais indicada para obter sistemas mais fluorescentes.

Em contrapartida, os resultados obtidos de tempo de vida para as amostras de palmatina em suspensão de SWy-2 foram muito mais curtos que no caso da laponita. O aumento no teor de ferro desta argila permite mais sítios capazes de suprimir fluorescência da palmatina. Também, as regiões com mais cátions ferro entre as folhas tetraédrica e octaédrica tornam as camadas interlamelares com cargas mais negativas, e, portanto mais propícias a receber moléculas catiônicas como a palmatina. A sorção de palmatina na argila montmorilonita ocorrerá então primeiro nestas regiões de baixa fluorescência.

2.6. Estudo do rendimento quântico de oxigênio singlete da palmatina

2.7.1 Método indireto utilizando a palmatina em solução de etanol

Dumont e Monari (2015) relataram que em solução aquosa, a palmatina apresenta produção de oxigênio singlete desprezível. Este comportamento é observado também em outros alcalóides similares à palmatina, como a berberina (Inbaraj, Kukienczak *et al.*, 2001). Por sua vez, híbridos berberina-argila apresentam valores significativos de fluorescência e produção de oxigênio singlete (Bujdak, Ratulovska *et al.*, 2016). Neste contexto, a produção de oxigênio singlete para a palmatina em solução de etanol foi estudada aqui a partir do método indireto.

Para a quantificação do rendimento quântico de oxigênio singleto, utilizou-se o rubreno como supressor de oxigênio singleto e como padrão a tetrafenilporfirina (TPP) em tolueno ($\phi_{\Delta} = 0,11$) (Nardello, Marti *et al.*, 1999; Grampp, Justinek *et al.*, 2009). A escolha do rubreno se deu devido às bandas de UV-Vis apresentadas em 490 nm e 525 nm. Nesta região, a palmatina e o TPP apresentam bandas desprezíveis, portanto pode-se acompanhar a degradação do rubreno sem interferências nos espectros de absorção. Acompanhou-se a variação da banda do espectro de UV-Vis no comprimento de onda 535 nm em função do tempo, e obteve-se o perfil de gráfico apresentado na Figura 29.

Figura 29: (a) Cinética de degradação da solução rubreno (2×10^{-4} mol L⁻¹ em ciclohexano) devido à produção de oxigênio singleto pela palmatina ($1,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em etanol). (b) Absorbâncias obtidas nos diferentes tempos em $\lambda = 545$ nm para a solução de palmatina ($1,3 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em etanol) e rubreno (2×10^{-4} mol L⁻¹ em ciclohexano).

A diminuição da banda centrada em 535 nm com o tempo sugere que o rubreno foi oxidado devido ao oxigênio singlete que foi produzido no meio pela palmatina.

Com os valores de absorbância da amostra e do padrão, a constante de formação e o rendimento quântico de oxigênio singlete foram determinados, obtendo $k = 0,154 \text{ min}^{-1}$ e $\phi_{\Delta} = 0,023$. Outros estudos encontraram uma maior produção de oxigênio singlete para alcalóides em solventes orgânicos, como a acetonitrila e o diclorometano (Inbaraj, Kukielczak *et al.*, 2006) e também em microambientes mais hidrofóbicos que a água, como o DNA (Hirakawa, Hirano *et al.*, 2012).

Neste último estudo, Hirakawa, Hirano *et al.* (2012) determinaram a energia da transferência de carga (E^{CT}) usando seus potenciais redox. Relatou-se que o complexo palmatina/DNA possui potencial redox 0,124 V mais alto que o da palmatina. Os autores atribuíram esse aumento devido à interação eletrostática do complexo. Além disso, o microambiente hidrofóbico do DNA não favorece o processo de transferência de elétrons, beneficiando a

ocorrência de outros processos como a excitação do complexo para o estado tripleto. A interação da palmatina com o DNA apresentou tempo de fluorescência maior que o da palmatina, portanto aumentando também seu rendimento quântico de fluorescência e o tempo de vida do estado foto-excitado, gerando mais moléculas de $^1\text{O}_2$, como mostra a Figura 30. Estes resultados sugerem que a interação entre a palmatina e as camadas interlamelares da argila pode gerar também melhores resultados de rendimento quântico de oxigênio singleto.

Nesse contexto, foi realizado um estudo da palmatina em suspensão de argila para confirmar se houve ou não um aumento na produção de oxigênio singleto com a formação do híbrido. Porém, o método indireto não seria viável porque o rubreno, que agiria como supressor, não é solúvel em meio aquoso. Foi utilizado então um método direto de detecção de oxigênio singleto.

Figura 30: Diagrama de energia da palmatina e do híbrido palmatina-argila.

Fonte: Adaptado de Hirakawa e Hirano (2008)

2.7.2. Método direto: detecção do oxigênio singleto por luminescência

Com o método direto, o oxigênio singleto produzido pela palmatina em suspensão de laponita foi detectado e seu tempo de vida foi determinado e comparado ao de uma solução aquosa de palmatina.

Figura 31: Sinal de decaimento de luminescência do oxigênio singleto para (a) palmatina ($8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em solução de D_2O ; e (b) palmatina em suspensão de laponita 0,1 mmol.g^{-1} em D_2O .

Assim como no experimento realizado com a berberina, o D₂O foi utilizado ao invés de H₂O, pois o isótopo deuterado permite maior tempo de relaxação do oxigênio gerando ¹O₂ com maior tempo de vida (Junqueira, Severino *et al.*, 2002). As amostras escolhidas para este experimento foram a palmatina em suspensão de laponita com proporção 0,1 mmol.g⁻¹ em D₂O e a palmatina em solução de D₂O. A Figura 31 apresenta os gráficos obtidos do sinal de decaimento de luminescência do oxigênio singlete para as amostras. O ajuste exponencial das curvas foi necessário para a determinação do tempo de vida do oxigênio singlete detectado em solução, que foi de 24 μs para a palmatina em solução de D₂O e 23 μs para a palmatina em suspensão de argila em D₂O. Este resultado indica que não há aumento de produção de oxigênio singlete com a sorção da palmatina em laponita, em contraste com o esperado.

A amostra utilizada para o método indireto de detecção de oxigênio singlete estava em meio etanólico, que é mais polar que a água. A interação do alcalóide em um meio mais polar gera maior produção de oxigênio singlete, como já foi descrito por (Inbaraj, Kukielczak *et al.*, 2006). A comparação da produção de oxigênio molecular com e sem a formação do híbrido alcalóide-argila deve ser realizada, portanto, no mesmo solvente. Este experimento apenas confirmou a produção de oxigênio singlete pela palmatina.

A realização do segundo experimento, pelo método direto, comparou a produção do oxigênio molecular entre o alcalóide em meio aquoso e em suspensão de argila. A palmatina adsorvida em argila sofre impedimento estérico, dificultando a interação com oxigênio do meio para formação de oxigênio singlete. Além disso, o complexo palmatina-DNA produz um potencial redox no meio que favorece a formação de transientes tripletes e a consequente produção de oxigênio singlete. No complexo palmatina-argila, não foi observada transferência de elétrons via reações redox. Todos estes fatores podem contribuir para que o resultado de produção de oxigênio singlete pelo complexo palmatina-argila não seja significativo.

CONCLUSÕES

Este estudo comprovou a sorção dos alcalóides berberina e palmatina nas por dois tipos de argilas: uma montmorilonita SWy-2 e uma hectorita Laponita RD. Observou-se que há um deslocamento dos sítios de adsorção das argilas com o decorrer do tempo, pois os máximos dos espectros de absorção da berberina e da palmatina se deslocam.

As intensidades de fluorescência dos complexos alcaloide-argila se mostraram maiores em especial na razão 0,1 mmol.g⁻¹, assim como os resultados do estudo dos rendimentos quânticos de fluorescência. O aumento da fluorescência se deve à estrutura planar e rígida dos alcaloides quando adsorvido nas argilas. O alto teor de ferro da argila SWy-2 suprimiu parte da fluorescência dos alcaloides adsorvidos, e por isso estes sistemas foram os que apresentaram menores intensidades e rendimentos quânticos de fluorescência. O híbrido alcaloide-laponita apresentou resultados significativamente mais intensos para emissão de fluorescência e rendimento quântico de fluorescência em relação aos alcaloides em solução aquosa, assim como os resultados observados no estudo de Bujdak, Ratulovska *et al.* (2016) para berberina adsorvida em saponita. O aumento da concentração de alcaloides em relação à argila em suspensão suprime a fluorescência das moléculas palmatina e berberina.

Os híbridos adsorvidos em SWy-2 apresentaram resultados melhores para a razão alcaloide/SWy-2 1,0 mmol.g⁻¹. Isto decorre de dois fatores: o primeiro é a alta capacidade de supressão de fluorescência da argila montmorilonita devido à presença de íons Fe³⁺ em sua composição. Outro é que as regiões com estes íons supressores de fluorescência tem maior afinidade com os alcaloides e, portanto, são ocupados primeiro. A adição de mais moléculas de alcaloide no meio permite a sorção destas moléculas em sítios da argila que emitirão fluorescência.

O tempo de vida de fluorescência mais longo foi observado para os sistemas Ber/Lap e Pal/Lap na razão 0,1 mmol.g⁻¹ para Ber/Lap e Pal/Lap, sugerindo que nestas razões as moléculas de alcaloide estão em sítios de adsorção da argila capazes de manter tais moléculas em estruturas mais rígidas e emitindo mais fluorescência. Para Pal/Lap 0,1 mmol.g⁻¹, estas regiões

também são as de maior afinidade devido à alta porcentagem de moléculas no tempo de vida mais longo.

Os resultados obtidos de produção de oxigênio singlete para as amostras de palmatina e berberina em suspensão de laponita não foram significativos em relação à palmatina e berberina em solução de D₂O. Isto indica que estes híbridos formados não formam complexos capazes de produzir mais oxigênio singlete que estes alcaloides e a laponita separadamente. Ainda, sugere que os resultados de outros estudos sobre a capacidade de destruição de tecido biológico da palmatina e da berberina (Costa, Pinheiro *et al.*, 2010; Andreazza, Vever-Bizet *et al.*, 2016; Bujdak, Ratulovska *et al.*, 2016; Bhattacharyya, Saha *et al.*, 2017) não deveria ser decorrente da produção de oxigênio singlete. Neste contexto, mais estudos devem ser realizados a fim de entender melhor o mecanismo destas moléculas orgânicas que as permitem agir como antimicrobianos e possíveis fotossensibilizadores de terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

- ANDREAZZA, N. L.; VEVERT-BIZET, C.; BOURG-HECKLY, G.; SUREAU, F.; SALVADOR, M. J.; BONNEAU, S. Berberine as a photosensitizing agent for antitumoral photodynamic therapy: Insights into its association to low density lipoproteins. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 510, n. 1, p. 240-249, Aug 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; WAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb 2008.
- BENSASSON, R. V.; LAND, E. J.; TRUSCOTT, T. G. **Flash Photolysis and Pulse Radiolysis**. Elsevier Ltd., 1983.
- BHATTACHARYYA, R.; SAHA, B.; TYAGI, M.; BANDYOPADHYAY, S. K.; PATRO, B. S.; CHATTOPADHYAY, S. Differential modes of photosensitisation in cancer cells by berberine and coralyne. **Free Radical Research**, v. 51, n. 7-8, p. 723-738, 2017.
- BUJDAK, J. Effect of the layer charge of clay minerals on optical properties of organic dyes. A review. **Applied Clay Science**, v. 34, n. 1-4, p. 58-73, Oct 2006.
- BUJDAK, J. Hybrid systems based on organic dyes and clay minerals: Fundamentals and potential applications. **Clay Minerals**, v. 50, n. 5, p. 549-571, Dec 2015.
- BUJDAK, J.; IYI, N.; FUJITA, T. Aggregation and stability of 1,1'-diethyl-4,4'-cyanine dye on the surface of layered silicates with different charge densities. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 207, n. 1-3, p. 207-214, Jul 30 2002.
- BUJDAK, J.; JURECEKOVA, J.; BUJDAKOVA, H.; LANG, K.; SERSEN, F. Clay Mineral Particles As Efficient Carriers of Methylene Blue Used for Antimicrobial Treatment. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 16, p. 6202-6207, Aug 15 2009.
- BUJDAK, J.; RATULOVSKA, J.; DONAUEROVA, A.; BUJDAKOVA, H. Hybrid Materials Based on Luminescent Alkaloid Berberine and Saponite. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 7801-7804, Aug 2016.
- COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SALVADOR, M. J.; MAIA, B. H. L. N. S.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N. Alkaloids from the Bark of *Guatteria hispida* and Their Evaluation as Antioxidant and Antimicrobial Agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1180-1183, Jun 2010.
- DELLAGUARDIA, R. A.; THOMAS, J. K. PHOTOPROCESSES ON COLLOIDAL CLAY SYSTEMS - TRIS(2,2'-BIPYRIDINE)RUTHENIUM(II) BOUND TO COLLOIDAL KAOLIN AND MONTMORILLONITE. **Journal of Physical Chemistry**, v. 87, n. 6, p. 990-998, 1983.
- DRUMMEN, G. P. C. Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques - Illuminating Biological and Biomedical Research. **Molecules**, v. 17, n. 12, p. 14067-14090, Dec 2012.
- DUMONT, E.; MONARI, A. Interaction of Palmatine with DNA: An Environmentally Controlled Phototherapy Drug. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 119, n. 2, p. 410-419, Jan 15 2015.

FERY-FORGUES, S.; LAVABRE, D. Are fluorescence quantum yields so tricky to measure? A demonstration using familiar stationery products. **Journal of Chemical Education**, v. 76, n. 9, p. 1260-1264, Sep 1999.

GESSNER, F.; SCHMITT, C. C.; NEUMANN, M. G. TIME-DEPENDENT SPECTROPHOTOMETRIC STUDY OF THE INTERACTION OF BASIC-DYES WITH CLAYS .1. METHYLENE-BLUE AND NEUTRAL RED ON MONTMORILLONITE AND HECTORITE. **Langmuir**, v. 10, n. 10, p. 3749-3753, Oct 1994.

GOMES, C. F. **Argilas: o que sao e para que servem**. Fundação Calouste Gulbenkian, 1988. ISBN 9789723100273. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=bztfNQAACAAJ> >.

GRAMPP, G.; JUSTINEK, M.; LANDGRAF, S.; ANGULO, G.; LUKZEN, N. Viscosity dependence of rubrene fluorescence quenching by organic radicals via energy transfer. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, n. 11, p. 1595-1602, 2009.

HARAGUCHI, K. Synthesis and properties of soft nanocomposite materials with novel organic/inorganic network structures. **Polymer Journal**, v. 43, n. 3, p. 223-241, Mar 2011.

HIRAKAWA, K.; HIRANO, T. The microenvironment of DNA switches the activity of singlet oxygen generation photosensitized by berberine and palmatine. **Photochemistry and Photobiology**, v. 84, n. 1, p. 202-208, Jan-Feb 2008.

HIRAKAWA, K.; HIRANO, T.; NISHIMURA, Y.; ARAI, T.; NOSAKA, Y. Dynamics of Singlet Oxygen Generation by DNA-Binding Photosensitizers. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 9, p. 3037-3044, Mar 2012.

INBARAJ, J. J.; KUKIELCZAK, B. M.; BILSKI, P.; HE, Y. Y.; SIK, R. H.; CHIGNELL, C. F. Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.). 2. Palmatine, hydrastine, canadine, and hydrastinine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 6, p. 739-744, Jun 2006.

INBARAJ, J. J.; KUKIELCZAK, B. M.; BILSKI, P.; SANDVIK, S. L.; CHIGNELL, C. F. Photochemistry and photocytotoxicity of alkaloids from Goldenseal (*Hydrastis canadensis* L.) 1. Berberine. **Chemical Research in Toxicology**, v. 14, n. 11, p. 1529-1534, Nov 2001.

JOHNSTON, J. H.; CARDILE, C. M. IRON SUBSTITUTION IN MONTMORILLONITE, ILLITE, AND GLAUCONITE BY FE-57 MOSSBAUER-SPECTROSCOPY. **Clays and Clay Minerals**, v. 35, n. 3, p. 170-176, Jun 1987.

JUNQUEIRA, H. C.; SEVERINO, D.; DIAS, L. G.; GUGLIOTTI, M. S.; BAPTISTA, M. S. Modulation of methylene blue photochemical properties based on adsorption at aqueous micelle interfaces. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 4, n. 11, p. 2320-2328, 2002.

KOZIOL, J. STUDIES ON FLAVINS IN ORGANIC SOLVENTS-I. SPECTRAL CHARACTERISTICS OF RIBOFLAVIN, RIBOFLAVIN TETRABUTYRATE AND LUMICHROME. **Photochemistry and Photobiology**, v. 5, p. 41-54, 1966.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 2a. edição. New York: Springer, 2006.

LI, C.; XU, Q.; LI, J.; JIA, X. Highly effective binding and inverse fluorescent behavior of palmatine and l-tetrahydropalmatine alkaloids by p-sulfonatocalixarenes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 64, n. 1-2, p. 37-42, Jun 2009.

LIU, Y. M.; MA, K.; JIAO, T. F.; XING, R. R.; SHEN, G. Z.; YAN, X. H. Water-Insoluble Photosensitizer Nanocolloids Stabilized by Supramolecular Interfacial Assembly towards Photodynamic Therapy. **Scientific Reports**, v. 7, Feb 2017.

LOFAJ, M.; VALENT, I.; BUJDAK, J. Mechanism of rhodamine 6G molecular aggregation in montmorillonite colloid. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 10, p. 1606-1619, Oct 2013.

LOMBARDO, P. C.; POLI, A. L.; CASTRO, L. F.; PERUSSI, J. R.; SCHMITT, C. C. Photochemical Deposition of Silver Nanoparticles on Clays and Exploring Their Antibacterial Activity. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 33, p. 21640-21647, Aug 2016.

LYAMZAEV, K. G.; PUSTOVIDKO, A. V.; SIMONYAN, R. A.; ROKITSKAYA, T. I.; DOMNINA, L. V.; IVANOVA, O. Y.; SEVERINA, I. I.; SUMBATYAN, N. V.; KORSHUNOVA, G. A.; TASHLITSKY, V. N.; ROGINSKY, V. A.; ANTONENKO, Y. N.; SKULACHEV, M. V.; CHERNYAK, B. V.; SKULACHEV, V. P. Novel Mitochondria-Targeted Antioxidants: Plastoquinone Conjugated with Cationic Plant Alkaloids Berberine and Palmatine. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2883-2895, Nov 2011.

MAGDE, D.; ROJAS, G. E.; SEYBOLD, P. G. Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes. **Photochemistry and Photobiology**, v. 70, n. 5, p. 737-744, Nov 1999.

NARDELLO, V.; MARTI, M. J.; PIERLOT, C.; AUBRY, J. M. Photochemistry without light: Oxidation of rubrene in a microemulsion with a chemical source of singlet molecular oxygen ($O_2(^1\Delta_g)$). **Journal of Chemical Education**, v. 76, n. 9, p. 1285-1288, Sep 1999.

NEUMANN, M. G.; GESSNER, F.; CIONE, A. P. P.; SARTORI, R. A.; CAVALHEIRO, C. C. S. Interações entre corantes e argilas em suspensão aquosa. **Química Nova**, v. 23, p. 818-824, 2000.

NGUEMTCHOUIN, M. G. M.; NGASSOUM, M. B.; CHALIER, P.; KAMGA, R.; NGAMO, L. S. T.; CRETIN, M. Ocimum gratissimum essential oil and modified montmorillonite clay, a means of controlling insect pests in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 52, p. 57-62, Jan 2013.

NIR, S.; UNDAHEYTIA, T.; YARON-MARCOVICH, D.; EL-NAHHAL, Y.; POLUBESOVA, T.; SERBAN, C.; RYTWO, G.; LAGALY, G.; RUBIN, B. Optimization of adsorption of hydrophobic herbicides on montmorillonite preadsorbed by monovalent organic cations: Interaction between phenyl rings. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 7, p. 1269-1274, Apr 1 2000.

OGAWA, M.; KAWAI, R.; KURODA, K. Adsorption and aggregation of a cationic cyanine dye on smectites. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 40, p. 16218-16221, Oct 3 1996.

OPTICAL BUILDING BLOCKS CORPORATION. EasyLife™ X. Disponível em: <<http://www.obbcorp.com/brochures/EasyLife.pdf>>. Acesso em: 02/06/2016.

RABELO, D. D.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; SALOME, K. S.; COSTA, E. V.; DA SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. D. ISOQUINOLINE ALKALOIDS AND INVESTIGATION OF THE

ANTIBACTERIAL AND ANTIPLASMODIAL ACTIVITIES OF *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Quimica Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014.

RAWAT, K.; AGARWAL, S.; TYAGI, A.; VERMA, A. K.; BOHIDAR, H. B. Aspect Ratio Dependent Cytotoxicity and Antimicrobial Properties of Nanoclay. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 3, p. 936-944, Oct 2014.

RUIZ-HITZKY, E.; ARANDA, P.; DARDER, M.; RYTWO, G. Hybrid materials based on clays for environmental and biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 42, p. 9306-9321, 2010.

RYTWO, G.; VARMAN, H.; BLUVSHEIN, N.; KONIG, T. N.; MENDELOVITS, A.; SANDLER, A. Adsorption of berberine on commercial minerals. **Applied Clay Science**, v. 51, n. 1-2, p. 43-50, Jan 2011.

SANTOS, P. S. **Tecnologia de Argilas**. São Paulo - SP - Brasil: Edgard Blücher Ltda., 1975.

SEVILLA, P.; GARCIA-BLANCO, F.; GARCIA-RAMOS, J. V.; SANCHEZ-CORTES, S. Aggregation of antitumoral drug emodin on Ag nanoparticles: SEF, SERS and fluorescence lifetime experiments. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 11, n. 37, p. 8342-8348, 2009.

SHICHI, T.; TAKAGI, K. Clay minerals as photochemical reaction fields. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 1, n. 2, p. 113-130, 2000.

SKOOG, D. A. **Principles of instrumental analysis**. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1985.

SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WOHRLE, D.; HACKBARTH, S.; RODER, B.; SCHNURPFEIL, G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 2, n. 2, p. 145-158, Mar-Apr 1998.

SWARTZEN.SL; MATIJEVI.E. SURFACE AND COLLOID CHEMISTRY OF CLAYS. **Chemical Reviews**, v. 74, n. 3, p. 385-400, 1974.

TURRO, N. J. **Modern molecular photochemistry**. 1991.

VILLEMURE, G.; DETELLIER, C.; SZABO, A. G. FLUORESCENCE OF METHYLVIOLGEN INTERCALATED INTO MONTMORILLONITE AND HECTORITE AQUEOUS SUSPENSIONS. **Langmuir**, v. 7, n. 6, p. 1215-1221, Jun 1991.

WEI, J. C.; WANG, Y. T.; LIN, J. J. First evidence of singlet oxygen species mechanism in silicate clay for antimicrobial behavior. **Applied Clay Science**, v. 99, p. 18-23, Sep 2014.