



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

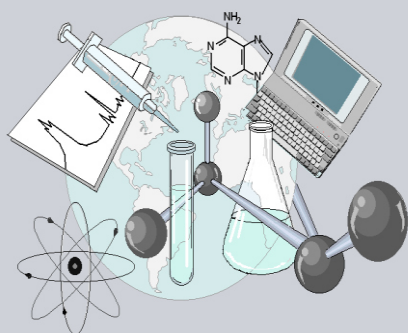
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudos Físico-Químicos do corante Rosa de Bengala B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas”

Dissertação apresentada por **Paulo Cesar de Souza Pereira** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

CE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, DEZEMBRO / 2013

PAULO CESAR DE SOUZA PEREIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Estudos Físicos-Químicos do corante Rosa de Bengala B e seus derivados ésteres visando aplicações fotodinâmicas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Wilker Caetano

MARINGÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P436e Pereira, Paulo Cesar de Souza
 Estudos Físicos-Químicos do corante Rosa de
Bengala B e seus derivados ésteres visando
aplicações fotodinâmicas / Paulo Cesar de Souza
Pereira. -- Maringá, 2013.
 155 f. : il. color., figs., tabs.

 Orientador: Prof. Dr. Wilker Caetano

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento
.Química, Programa de Pós-Graduação em Química,
2013.

 1. Corante Rosa de Bengala - Terapia
fotodinâmica. 2. Corante Rosa de Bengala -
Inativação fotodinâmica - Microorganismos. 3.
Corantes Xantenos - Fotosensibilizadores. 4.
Sistemas surfactantes - Solubilização - Drogas
hidrofóbicas. 5. Corante Rosa de Bengala -
Modificação estrutural. 6. Corante Rosa de Bengala -
Corantes Xantenos - Propriedades fotofísicas.
Caetano, Wilker, orient. II. Universidade Estadual
de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento
Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III.
Título.

CDD 21.ed.541.35

Zss-2024



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Paulo Cesar de Souza Pereira**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 12 de dezembro de 2013.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Wilker Caetano
Presidente - DQI/UEM

Prof. Dr. Noboru Hioka
Membro - DQI/UEM

Profa. Dra. Christiane Philippini Ferreira Borges
Membro - UEPG

*À Taysi pelo apoio e compreensão, mesmo
em meio às turbulências.*

*Aos meus pais, Zilda e Carlinhos, pela 1ª
educação – aquela que não se aprende na
escola – e a meus irmãos Gislaine e Geovani
pela divertida amizade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, Criador do Universo, por ser a força motriz da minha vida e trabalho.

Ao professor Dr. Wilker Caetano, pela orientação, apoio, confiança e amizade.

Aos professores Dr. Douglas Dragunski por semear a semente da pesquisa; Dr. Noboru Hioka por acreditar e acolher um forasteiro; Dr. André Tessaro, Dr. Emerson Giroto e Dra. Daniela Martins F. de Oliveira pelas valiosas sugestões. E também a Dra. Elza Kimura e Dr. Adley Forti Rubira por cederem a infra-estrutura de vossos laboratórios.

Aos amigos e “professores particulares” Diogo Pellosi e Adriana Passarela.

Aos integrantes da República Cabelin: Bruno Vilsinski, Jessi Bertolo e Jonathan Vilsinski pelo companheirismo que leva a rir ou chorar, se for preciso.

Ao pessoal do “Xanteno’s Group”: Bianca Estevão, Paulo Fernando, Italo Calori e Camila Colega, pela contribuição direta no trabalho e disposição para compartilhar a síndrome da mão cor-de-rosa.

Aos companheiros de laboratório: Cris Santi, Gabriel Baptista, Renato Sonchini, Gustavo Braga, Vagner Batistela, Fernando Carvalho, Bruno Rabelo, Layane Santos, Adriana Wences e demais membros do grupo.

Aos todos os servidores do departamento de química, especialmente ao Claudemir e a Cristina, por darem suporte ao avanço do nosso programa de Pós-graduação.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária (SETI-Pr) pelo suporte financeiro.



“Só para loucos, isso é só para loucos! Caretas não...”

Ventania

Lâmpada para os meus pés é a Tua palavra e Luz para os meus caminhos...

Salmo 119:115

RESUMO

Terapia fotodinâmica (TFD) e inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) são modalidades clínicas que se baseiam na excitação de um composto fotossensibilizador com luz, na região visível do espectro eletromagnético, para a geração de espécies químicas citotóxicas, dentre as quais se destaca o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). O corante xantênico Rosa de Bengala B (RBB) é um dos compostos conhecidos com maior rendimento quântico de geração de oxigênio singlete. No entanto, seu caráter, preferencialmente, hidrofílico não favorece sua interação com biomembranas, um dos principais sítios alvo de atuação da TFD e IFDMO.

No presente estudo foram avaliadas as propriedades físico-químicas e foto-físicas da RBB bem como alguns de seus derivados ésteres. A modificação da estrutura molecular da RBB foi feita pela inserção de cadeias alquílicas de diferentes tamanhos com o objetivo de tornar os derivados mais hidrofóbicos e dessa forma aumentar sua afinidade por sistemas modelo de membrana, formados por micelas.

Além da RBB foram avaliadas a RBB metil éster (RBBMET), RBB butil éster (RBBBUT) e RBB decil éster (RBBDEC) em ambiente aquoso e em micelas aniônicas (SDS), não iônicas (P-123) e catiônicas (CTAB). Foram avaliados o balanço hidrofílico- hidrofóbico, os equilíbrios ácido-base, os parâmetros de ligação e localização nos ambientes micelares, as propriedades fotofísicas como o rendimento quântico de fluorescência e de oxigênio singlete; e também a foto-atividade na inativação de microorganismos.

As sínteses dos derivados ésteres da RBB foram relativamente simples e reprodutíveis, com elevados rendimentos do produto puro. A determinação dos valores de pK_a relativos aos equilíbrios protolíticos da RBB mostrou-se uma tarefa complexa em virtude da coexistência de equilíbrios tautoméricos verificados nos corantes xantênicos. Entretanto, a utilização de metodologia quimiométrica com análise multivariada de dados, associada à comparação com os valores de pK_a dos derivados ésteres tornou possível a identificação e atribuição dos valores de pK_a da RBB. Um

efeito de inversão de pK_a entre os grupos fenol e carboxílico foi detectado quando a RBB está alocada no núcleo hidrofóbico das micelas.

A hidrofobicidade dos corantes foi avaliada mediante a medida de seu coeficiente de partição entre o sistema 1-octanol/água. Observou-se que o balanço hidrofílico/hidrofóbico dos derivados ésteres é modulada pela quantidade de carbonos que compõem a cadeia alquílica, sendo que o um maior número de unidades metilênicas resulta no aumento da hidrofobicidade dos corantes, favorecendo sua interação primária com biomembranas. Os ambientes micelares avaliados exercem influência sobre os espectros de absorção e emissão dos corantes, com a verificação de deslocamentos para o vermelho (batocrômico). Essas mudanças são atribuídas às diferenças de polaridade entre o interior da micela e a solução aquosa.

As constantes de ligação (corante-micela) foram moduladas pela hidrofobicidade dos corantes bem como pela carga dos grupos cabeça polar das moléculas de surfactantes. A profundidade relativa de alocação foi determinados por supressão de fluorescência, confirmando a influência da hidrofobicidade e das cargas dos corantes e micelas. A ordem das constantes de ligação foi RBBDEC > RBBBUT > RBBMET > RBB em todas as micelas e CTAB > P-123 > SDS para todos os corantes.

Os valores de rendimentos quânticos de fluorescência foram relativamente pequenos e apresentam um ligeiro aumento quando o corante se encontra encapsulado. Os rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete nas micelas são elevados e similares entre si, independente do corante ou do sistema surfactante avaliado.

Os ensaios sobre culturas de bactérias *S. aureus* mostraram que todos os corantes avaliados apresentam atividade foto-microbicida na inativação de microorganismos; e assim, são candidatos a fármacos fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD) e inativação fotodinâmica de micro-organismos (IFDMO).

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica. Inativação fotodinâmica de microorganismos.

Corantes xantenos. Sistemas surfactantes.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) and photodynamic inactivation of microorganisms (PDIMO) are clinical modalities that are based on the excitation of a photosensitizer compound with light in the visible region of the electromagnetic spectrum, to generate cytotoxic chemical species, among which stands out the oxygen singlet ($^1\text{O}_2$). The xanthene dye Rose Bengal B (RBB) is one of known compounds with a higher quantum yield of singlet oxygen generation. However, his character preferably hydrophilic not favor their interaction with biomembranes, a main target sites of action of PDT and PDIMO.

The present study evaluated the physico-chemical and photo-physical properties of the RBB and some of its derivatives esters. The modification on the molecular structure of RBB was made by insertion of alkyl chains of different sizes in order to make derivatives more hydrophobic and thus increase its affinity for membrane model systems formed by micelles.

Beyond to the RBB were evaluated RBB methyl ester (RBBMET) RBB butyl ester (RBBBUT) and RBB decyl ester (RBBDEC) in aqueous environment and anionic (SDS), nonionic (P-123), and cationic (CTAB) micelles. Were evaluated the hydrophilic-hydrophobic balance, the acid-base equilibrium, binding parameters and location in micellar environments. The photo-physical properties such as quantum yields of the fluorescence and singlet oxygen, as well as the photo-activity in the inactivation of microorganisms were also measured.

Synthesis of ester derivatives of RBB were relatively simple and reproducible, with high yields of purified product. The determination of pK_a values for the protolytic equilibriums of the RBB showed a complex task due to the coexistence of tautomeric equilibrium checked in xantênicos dyes. However, the use of multivariate chemometric methodology with data associated and compared with the pK_a of the ester derivatives made possible the identification and assignment of RBB pK_a values. An effect of reversing pK_a between phenol and carboxylic acid groups was detected when the RBB was allocated in the hydrophobic core of the micelles.

The hydrophobicity of the dyes was evaluated by measuring its partition coefficient between the 1-octanol/water system. It was observed that the hydrophilic/hydrophobic balance of ester derivatives is modulated by the amount of carbons that comprise the alkyl chain, and a greater number of the methylene units results in increased hydrophobicity of dyes, favoring their primary interaction with biological membranes. The micellar environments evaluated influence on the absorption and emission spectra of dyes, with verification of displacements to the red (bathochromic shift). These changes are attributed to differences in polarity between the microenvironment inside the micelle and the aqueous solution.

Binding dye-micelle constants were modulated by the hydrophobicity of the dyes as well as by the charge of the polar head groups of the surfactant molecules. The relative depth of location was determined by fluorescence quenching, which confirmed the influence of the hydrophobicity and charge of the dyes and micelles. The order of the binding constant values was RBBDEC > RBBBUT > RBBMET > RBB for all micelles, and CTAB > P-123 > SDS for all dyes.

The values of fluorescence quantum yields are relatively small and have slightly increased when the dye is encapsulated. The values of the quantum yields of singlet oxygen formation inside of the micelles are high and similar to each other, independently of the dye or surfactant system evaluated.

Assays with cultures of bacteria *S. aureus* showed which all evaluated dyes have activity against microorganism by photo-inactivation, and so are candidates to photosensitizer drugs for use in photodynamic therapy (PDT) and photodynamic inactivation of micro-organisms (PDIMO).

Keywords: Photodynamic therapy. Photodynamic inactivation of microorganisms. Xanthene dyes. Surfactants systems.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Processos fotofísicos	22
1.2 Terapia Fotodinâmica	24
1.2.1 Perspectiva histórica	25
1.2.2 Mecanismos de ação	26
1.2.3 Fotossensibilizadores em TFD	27
1.2.4 Oxigênio singlete	29
1.3 Inativação Fotodinâmica de Microorganismos (IFDMO)	31
1.4 Corantes xantênicos como fotossensibilizadores	33
1.4.1 Rosa de Bengala B	37
2. OBJETIVOS	45
3. PARTE EXPERIMENTAL	47
3.1 Materiais e equipamentos	47
3.2 Métodos	48
3.2.1 Síntese dos derivados éster da Rosa de Bengala	48
3.2.2 Determinação dos valores de pKa	50
3.2.3 Determinação do coeficiente de Partição (K_p) dos FS no sistema bifásico água/1-octanol	51
3.2.4 Determinação da constante de Ligação (K_b) dos FS nos sistemas micelares	52
3.2.5 Determinação de variações na anisotropia de fluorescência dos FS nas interações FS-surfactante	52
3.2.6 Estudos de supressão de fluorescência e determinação da Constante de Stern-Volmer (K_{sv})	53
3.2.7 Determinação do rendimento quântico de Fluorescência (Φ_f) dos FS	53
3.2.8 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta^1O_2}$) dos FS	54
3.2.9 Ensaio de foto-atividade sobre microorganismos - <i>S. Aureus</i>	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 Caracterização estrutural dos derivados ésteres da Rosa de Bengala	58
4.1.1 Caracterização da RBBMET	59

4.1.2 Caracterização da RBBBUT	60
4.1.3 Caracterização da RBBDEC	61
4.2 Estudos espectroscópicos dos FS: Caracterização dos perfis de absorção eletrônica UV-Vis e de emissão de Fluorescência	63
4.3 Determinação dos valores de pKa	67
4.3.1 Determinação dos valores de pKa em tampão aquoso	68
4.3.2 Determinação dos valores de pK _a dos FS xantênicos em meio micelar	72
4.4 Determinação do Coeficiente de Partição(K _p) no sistema 1-octanol/água.....	87
4.5 Avaliação da interação com os sistemas micelares.....	89
4.5.1 Determinação da constante de ligação (K _b) com os sistemas micelares	89
4.6 Determinação das constantes de supressão de Stern-Volmer (K _{SV})	105
4.7 Determinação das propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores	113
4.7.1 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ _f).....	114
4.7.2 Determinação do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Φ _Δ ¹ O ₂)	116
4.8 Determinação dos parâmetros de atividade foto-microbicida dos FS contra bactérias S. aureus.	122
4.8.1 Efeito do tempo de iluminação dos FS xantenos encapsulados no copolímero P-123 sobre a inativação fotodinâmica de microorganismos.....	124
4.8.2 Efeito da concentração dos FS xantenos encapsulados no copolímero P-123 sobre a inativação fotodinâmica de microorganismos	128
4.8.3 Eficiência foto-microbicida do FS RBBDEC e efeito da concentração do copolímero Plurônico® P-123 sobre atividade dos FS xantenos na inativação fotodinâmica de microorganismos.....	132
5 CONCLUSÕES.....	138
REFERÊNCIAS	140
ANEXOS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Jablonski, representação esquemática do processos de absorção e desativação do estado excitado. As transições envolvendo processos radiativos são representadas pelas setas retas, e processos não radiativos pelas setas onduladas (VALEUR, 2002).....	22
Figura 2: Representação esquemática dos principais mecanismos de ação citotóxica presentes na terapia fotodinâmica (adaptado de MACHADO, 2000).....	26
Figura 3: Profundidade de penetração da luz na pele em função do comprimento de onda (adaptado de www.stelisi.co.nz).	28
Figura 4: Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-positiva (+), Gram-negativa (-) e fungo (Daí, 2009).	32
Figura 5: Representação esquemática genérica para alguns corantes Xantênicos. No destaque, estrutura do anel xantênico.	34
Figura 6: Estruturas protolíticas e tautoméricas propostas para a Rosa de Bengala. NE (neutra), MA (monoaniônica) e DA (dianionica) (Mchedlov-Petrosyan, 1994).	36
Figura 7: Representação esquemática da estrutura molecular dos corantes xantênicos: Rosa de Bengala (RBB), RBB Metil éster (RBBMET), RBB Butil éster (RBBBUT) e RBB Decil éster (RBBDEC).	38
Figura 8: (1) Representação esquemática da secção transversal da membrana biológica com seus principais constituintes; (2) Vista em corte de duas estruturas formadas por fosfolípidios auto-associados; (3) Representação esquemática de surfactante e micela.	40
Figura 9: Estrutura dos surfactantes aniônico SDS e catiônico CTAB e representação da secção transversal de suas respectivas micelas.....	42
Figura 10: (A) Estrutura geral do monômero de um copolímero da classe dos Plurônicos®. Para P-123; $x=z=20$ e $y=70$. (B) Representação esquemática de uma micela polimérica em meio aquoso. .	44
Figura 11: Representação esquemática da reação de esterificação para a obtenção da Rosa de Bengala Metil Éster (RBBMET).	49
Figura 12: Representação esquemática da reação de esterificação para a obtenção da Rosa de Bengala Butil Éster (RBBBUT).	50
Figura 13: Representação esquemática da reação de esterificação para a obtenção da Rosa de Bengala Decil Éster (RBBDEC).	50
Figura 14: (A) Representação esquemática e (B) fotografia da Biotable equipada com LEDs SMD (1 W de potência, com $\lambda_{m\acute{a}x} = 570$ nm), porta amostras de 1 mL e com regulagem de altura da interface de iluminação.....	56

Figura 15: Numeração atômica para a Rosa de bengala B (2,4,5,7-tetraiodo-3,4',5',6'-tetraclorofluoresceína) segundo a IUPAC.	58
Figura 16: Estrutura molecular e numeração atômica para a RBBMET.....	59
Figura 17: Estrutura molecular e numeração atômica para a RBBBUT.	60
Figura 18: Estrutura molecular e numeração atômica para a RBBDEC.	61
Figura 19: Espectros dos FS xantenos em (1) etanol, (2) SDS, (3) P-123 e (4) CTAB: (A) absorção ([FS] = $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e (B) emissão de fluorescência ([FS] = $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) a 30°C. RBB ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$); ésteres ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) para todos os corantes (10/10, nm/nm).....	64
Figura 20: Diagrama de energia com efeito de estabilização dos níveis energéticos pela presença de ligações de hidrogênio para corantes xantênicos. (Adaptado de Martin, 1976).....	65
Figura 21: Gráficos de Absorbância <i>versus</i> concentração de FS, em etanol a 30°C, utilizados para determinação dos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) dos FS.....	66
Figura 22: Espectros de absorção da RBB e RBBMET em tampão aquoso, em diversos pHs, [FS] = $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, [NaCl] = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 30,0 °C. As setas indicam a variação espectral conforme se aumenta o valor do pH da solução.	68
Figura 23: (A) Curva de titulação espectrofotométrica da RBB, por análise univariada. Comprimento de onda analítico $\lambda_{\text{anal}} = 550 \text{ nm}$. (B) Primeira derivada da curva de titulação.	69
Figura 24: Curvas de concentração relativa de cada espécie protolítica em diversos pHs para RBB e RBBMET obtidas a partir da análise quimiométrica multivariada.	70
Figura 25: Espectros das espécies puras da RBB e RBBMET obtidos em água pelo método da matriz-K (Sena, 2000).....	71
Figura 26: Equilíbrios protolíticos propostos para a RBB, no intervalo de pH avaliado (0-8).....	72
Figura 27: Espectros de absorção dos FS xantenos em meio aquoso micelar de SDS, obtidos em diferentes pHs. [FS]= $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, [NaCl]= $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 30°C.....	74
Figura 28: Curvas de pKa para os FS xantênicos em SDS. Curvas geradas por metodologia quimiométrica através do software MASDA.....	75
Figura 29: Espectros de absorção dos FS em diferentes pHs, obtidos em sistema P-123.....	78
Figura 30: Curvas de pKa, obtidas pelo software MASDA, para os FS xantênicos em P-123. (A)RBB e (B) RBBBUT.....	78
Figura 31: Espectros de absorção dos FS em diferentes pHs, obtidos em sistema CTAB.....	80
Figura 32: Curvas de pKa, obtidas pelo software MASDA, para os FS xantênicos em CTAB.	81
Figura 33: Estimativa dos espectros das espécies puras obtidos pelo método da Matriz K (Sena, 2000) ...	83

Figura 34: Estruturas protolíticas e tautoméricas propostas para a Rosa de Bengala. NE (neutra), MA (monoaniônica) e DA (dianionica) (Mchedlov-Petrosyan e Kleschvnikova, 1994).....	86
Figura 35: Variação na emissão de fluorescência dos FS como uma função da concentração de SDS em água. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. RBB ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); Derivados ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm); pH = 7,25 $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	90
Figura 36: (A) Isotermas de ligação dos FS em SDS, com seus respectivos ajustes teóricos. (B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão como uma função da concentração de surfactante.	90
Figura 37: Variação na emissão de fluorescência dos FS como uma função da concentração de P-123 em água. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. RBB ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); Derivados ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm); pH = 7,25 $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	93
Figura 38: (A) Isotermas de ligação dos FS em P-123, com seus respectivos ajustes teóricos. (B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão como uma função da concentração de surfactante.	93
Figura 39: Cinética de incorporação da RBBDEC em micelas de P-123. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, em micelas de $[P-123] = 4\% \text{ m/v}$ a 30°C , pH = 7,25 e $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	95
Figura 40: Isotermas de ligação e ajustes teóricos da RBBDEC em P-123: (A) Isoterma obtida no tempo t_0 e (B) Comparação entre as isotermas obtidas nos tempos t_0 e t_{Eq} . $[RBBDEC] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm).....	96
Figura 41: Variação na emissão de fluorescência dos FS como uma função da concentração de CTAB em água. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. RBB ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); Derivados ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm); pH = 7,25 $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$	97
Figura 42: (A) Isotermas de ligação dos FS com CTAB, com seus respectivos ajustes teóricos. (B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão como uma função da concentração de surfactante.	97
Figura 43: (A) variação espectral da RBBBUT em CTAB ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); como uma função da concentração de surfactante em água. (B) Isoterma de ligação ($\lambda_{emis} = 575 \text{ nm}$). No detalhe, ampliação do intervalo de concentração de CTAB (região pré-micelar) onde ocorre a formação de agregados FS/CTAB.	98
Figura 44: (— □ —) variação da anisotropia de fluorescência com excitação contínua em 520 nm, monitorado em 590 nm e (— —) variação do sinal de RLS obtido em modo síncrono, $\Delta\lambda = 0$ ($\lambda_{exc} = \lambda_{emis}$) para RBBBUT em função da concentração de CTAB. $T=30^\circ\text{C}$, pH = 7,25.....	100
Figura 45: Emissão de fluorescência dos FS em água, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET e (C) RBBBUT. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $T=30^\circ\text{C}$, RBB ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); ésteres ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$).	106

Figura 46: Emissão de fluorescência dos FS em SDS, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET, (C) RBBBUT, (D) RBBDEC. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, [NaCl] = 0,1 mol L ⁻¹ , T=30°C, RBB (λ_{exc} = 490 nm); ésteres (λ_{exc} = 520 nm).	107
Figura 47: Emissão de fluorescência dos FS em P-123, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET, (C) RBBBUT, (D) RBBDEC. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, [NaCl] = 0,1 mol L ⁻¹ , T=30°C, RBB (λ_{exc} = 490 nm); ésteres (λ_{exc} = 520 nm).	108
Figura 48: Emissão de fluorescência dos FS em CTAB, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET, (C) RBBBUT, (D) RBBDEC. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, [NaCl] = 0,1 mol L ⁻¹ , T=30°C, RBB (λ_{exc} = 490 nm); ésteres (λ_{exc} = 520 nm).	109
Figura 49: Gráficos de Stern-Volmer dos xantenos, obtidos através dos estudos de supressão de fluorescência. [corantes] = 5,0x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ , pH 7,25, [NaCl]=0,1 Mol L ⁻¹ , 30,0 °C em: (A) água; (B) SDS; (C) P-123 and (D) CTAB.....	110
Figura 50: Sobreposição dos espectros de (A) absorção e (E) emissão da RBBMET.....	114
Figura 51: Sobreposição dos espectros de intensidade de emissão do LED ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 520 nm), absorção eletrônica UV-Vis do ácido úrico (AU) ($\lambda_{m\acute{a}x}$ = 292 nm) e dos FS em etanol.....	116
Figura 52: (A) Variação nos espectros de absorção eletrônica UV-Vis do ácido úrico (AU) (5,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹) na presença dos FS xantenos em etanol, com a irradiação contínua de luz verde (LED com $\lambda_{m\acute{a}x}$ = 518 nm). (B) Cinética de degradação do ácido úrico em 293 nm. [FS] = 5x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , T=30°C. Os índices 1, 2, 3 e 4 referen-se aos FS RBB, RBBMET, RBBBUT e RBBDEC, respectivamente.....	118
Figura 53: Gráficos da constante de decaimento da concentração de ácido úrico pela oxidação fotoinduzida via ¹ O ₂ (k ₁) versus número de fótons absorvidos pelos FS em diferentes concentrações.	120
Figura 54: Parâmetros utilizados para cálculo do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1O_2$) (Equação 9): (A) Espectro de Emissão de fosforescência do ¹ O ₂ e (B) ajuste exponencial de primeira ordem para a curva de decaimento de fosforescência do ¹ O ₂ gerado pela RBBDEC em meio micro-heterogêneo formado por micelas de P-123.....	121
Figura 55: (A) representação esquemática e em perspectiva do layout típico de um LED SMD. (B) Sobreposição dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis dos FS em P-123 e do espectro de emissão do LED SMD (intensidades não escaladas).....	123
Figura 56: Gráficos comparativos da inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) dos FS xantenos como uma função do tempo de iluminação. Culturas de bactéria <i>S. aureus</i> , [RBB] = 5,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ , [RBBMET] = 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ , [RBBBUT] = 1,0x10 ⁻⁵ mol L ⁻¹ e [P-123] = 2% m/v.	125

Figura 57: Ajustes teóricos para os pontos experimentais, utilizados para o cálculo do valor D_{90} da foto-atividade dos FS contra culturas de bactéria <i>S. aureus</i>	126
Figura 58: Representação esquemática da aproximação/ligação de FS aniônicos à parede celular de bactérias Gram positivas. Proteínas de membrana catiônicas e uma camada de contra-íons (cátions) formam sítios de ligação para os FS aniônicos. (Daí, 2009; Nazzal, 2011).....	128
Figura 59: Gráficos comparativos da inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função da concentração dos FS xantenos. Culturas de bactéria <i>S. aureus</i> . Tempo de iluminação igual a 4 minutos para RBB e 15 minutos para os derivados ésteres. [P-123] = 2% m/v.....	129
Figura 60: Ajustes teóricos para os pontos experimentais, utilizados para o cálculo do valor Z_{90} da foto-atividade dos FS contra culturas de bactéria <i>S. aureus</i>	130
Figura 61: Inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função do tempo de iluminação da RBBDEC e ajuste teórico dos pontos experimentais. Culturas de bactéria <i>S. aureus</i> . Tempo de iluminação igual a 15 e [P-123] = 1% m/v.	133
Figura 62: Gráficos da inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função da concentração do surfactante polimérico P-123, para o FS RBBDEC. [RBBDEC] = 5×10^{-6} e tempo de iluminação igual a 15 min.	134
Figura 63: Inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função do tempo de iluminação da RBBDEC e ajuste teórico dos pontos experimentais. Culturas de bactéria <i>S. aureus</i> . [RBBDEC] = 5×10^{-6} mol L ⁻¹ e [P-123] = 0,25 % m/v.....	136
Figura 64: Inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função da concentração de FS e ajuste teórico dos pontos experimentais. Culturas de bactéria <i>S. aureus</i> , Tempo de luz = 15 min e [P-123] = 0,25 % m/v.....	136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio.	29
Tabela 2: Dados de Ressonância Magnética Nuclear em DMSO-d ₆ da RBBMET.	59
Tabela 3: Dados de Ressonância Magnética Nuclear em DMSO-d ₆ da RBBBUT.	61
Tabela 4: Dados de Ressonância Magnética Nuclear em DMSO-d ₆ da RBBDEC.	62
Tabela 5: Valores de pK _a dos derivados xantênicos obtidos por quimiometria e os valores do coeficiente de absorvidade molar das espécies protolíticas nos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}), obtidos através do método da Matriz-K (Sena, 2000).	71
Tabela 6: Valores de pK _a dos derivados xantênicos medidos em SDS, valores de referência (pK _{a-água}) e valores calculados de ΔpK_a	75
Tabela 7: Valores de pK _a dos derivados xantênicos medidos em P-123, valores de referência (pK _{a-água}) e valores calculados de ΔpK_a	79
Tabela 8: Valores de pK _a e ΔpK_a dos derivados xantênicos em CTAB.	81
Tabela 9: Comparação dos valores de pK _a da RBB (pK _a 1 e pK _a 2) com o valor de referência (RBBMET), em diferentes meios, para a atribuição dos grupos protolíticos.	84
Tabela 10: Valores de coeficiente de partição (K_p) dos xantenos em 1-octanol/água (1:1, v/v); sendo: Fase aquosa pH 7,25 em tampão McIlvaine, ([Na ₂ HPO ₄] = [ácido cítrico] = 7,5x10 ⁻³ mol L ⁻¹) e [NaCl] = 0,10 mol L ⁻¹ . [FS] = 3,00x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹	88
Tabela 11: Constantes de ligação (K_b), parâmetros N e CMC, obtidos pela Equação 2 para os corantes xantênicos (5,0 x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹) em micelas de SDS a 30,0 °C, pH = 7,25 e [NaCl] = 0,10 mol L ⁻¹	92
Tabela 12: Valores de constantes de ligação (K_b), parâmetros N e CMC obtidos através de titulação fluorimétrica dos corantes xantênicos (5,0 x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹) com micelas de P-123 a 30,0 °C, pH= 7,25 e [NaCl] = 0,10 mol L ⁻¹	94
Tabela 13: Constantes de ligação (K_b), parâmetros N e CMC, obtidos pela equação 2 para os corantes xantênicos (5,0 x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹) em micelas de CTAB a 30,0 °C, pH= 7,25 e [NaCl] = 0,10 mol L ⁻¹	99
Tabela 14: Valores de constante de Stern-Volmer (K_{sv}) calculadas através da Equação 3, para estimativa da supressão de fluorescência dos xantenos pelo iodeto.	111
Tabela 15: Valores de rendimento quântico de Fluorescência (Φ_F) dos FS em meio homogêneo (água). [corantes] = 5,0x10 ⁻⁷ Mol L ⁻¹ . [SDS] = 5,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [P-123] = 1,7x10 ⁻³ mol L ⁻¹ ; [CTAB] = 4,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ , pH=7,25, [NaCl] = 0,1 mol L ⁻¹ , T = 30°C.	115

Tabela 16: Número de fótons absorvidos pelos FS com iluminação LED ($\lambda_{\text{máx}} = 218 \text{ nm}$) e constantes de velocidade (k_1) determinadas nos experimentos de oxidação fotoinduzida do AU.....	119
Tabela 17: Valores de eficiência fotodinâmica química (γ_{Δ}) obtidos através da Equação 7 para os FS xantenos em etanol.....	120
Tabela 18: Valores de rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) dos FS em meio homogêneo (etanol) e micro-heterogêneo (surfactantes). [corantes] = $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. [SDS] = $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [P-123] = $1,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; [CTAB] = $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, pH=7,25, [NaCl] = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, T = 30°C	122
Tabela 19: Valores de tempo de iluminação necessários para inativação de 90% das unidades formadoras de colônias (D_{90}). Culturas de bactéria <i>S. aureus</i> incubadas na presença de FS xantenos formulados em P-123, 2% m/v ($3,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).	127
Tabela 20: Valores de concentração de FS necessários para inativação de 90% das unidades formadoras de colônias (Z_{90}). Culturas de bactéria <i>S. aureus</i> expostas a formulados de FS xantenos em P-123, 2% m/v.	131
Tabela 21: Proporções FS-micela para uma concentração de RBBDEC fixa e igual a $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes concentrações do copolímero Plurônico P-123.....	135

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CTAB	Brometo de Cetiltrimetilamônio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FS	Fotossensibilizador
IFDMO	Inativação Fotodinâmica de microorganismos
K_b	Constante de ligação às micelas
K_p	Coefficiente de partição 1-octanol/água
K_{SV}	Constante de supressão de Stern-Volmer
m	Sinal de RMN em multiplete
P-123	Plurônico Polimérico Tribloco P-123
RBB	Rosa de Bengala B
RBBBUT	Rosa de Bengala Butil Éster
RBBDEC	Rosa de Bengala Decil Éster
RBBMET	Rosa de Bengala Metil Éster
RLS	Ressonante light scattering – Espalhamento de luz ressonante
s	Sinal singlete de RMN
SBPM	Surfactantes de baixo peso molecular
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
t	Sinal de RMN em tripleto
TFD	Terapia Fotodinâmica
TSA	Trypticase Soy Agar (Agar Soja Trypticaseína)
TSB	Trypticase Soy Broth (Caldo Soja Trypticaseína)

UFC	Unidade formadora de colônias de bactérias
δ	Deslocamento químico - espectros de RMN
ϵ	Coefficiente de Absortividade Molar
λ	Comprimento de onda
Φ_F	Rendimento Quântico de Fluorescência
$\Phi_{\Delta}^1O_2$	Rendimento Quântico de formação de oxigênio Singlete

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processos fotofísicos

A luz visível e suas diferentes cores sempre fascinaram o ser humano. Desde a antiguidade, embora ainda não se compreendesse o processo da fotossíntese, a luz do Sol já era, por si só, sinônimo de boas colheitas e prosperidade. Ainda hoje, em meio a tantos avanços tecnológicos, a variedade de matizes de um campo florido atrai e chama a atenção por sua beleza. A existência das diferentes cores está ligada à natureza ondulatória da luz e aos processos de absorção e emissão de luz por compostos cromóforos. Estes processos, de natureza fotofísica, podem ser compreendidos simplificada através do diagrama de Jablonski (Figura 1). Nele estão esquematizados os processos radiativos de absorção e emissão, os processos não radiativos (setas onduladas), bem como estados de energia dos elétrons.

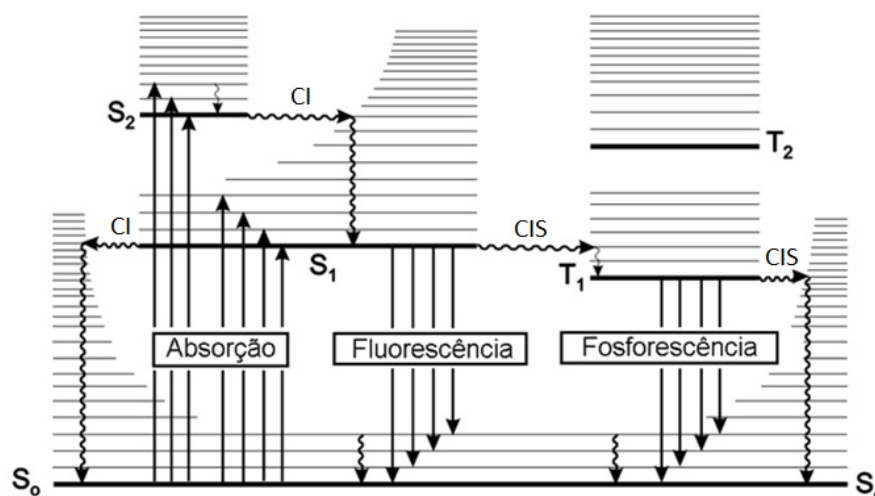


Figura 1: Diagrama de Jablonski, representação esquemática do processos de ativação e desativação do estado excitado. As transições envolvendo processos radiativos são representadas pelas setas retas. Os processos não radiativos de conversão interna (CI) e cruzamento inter-sistema (CIS) são representadas por setas onduladas (VALEUR, 2002, p.35).

A multiplicidade de spin eletrônico do tipo singlete é representada por S e a triplete por T. A numeração (0, 1, 2 ... n) representa os nível de energia eletrônica, onde zero é o estado fundamental, 1 é o primeiro estado excitado, e assim por diante.

Quando o sítio cromofórico de uma molécula absorve um fóton, elétrons do orbital HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) são promovidos para o orbital LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital), ou seja, os elétrons que ocupam o orbital molecular de maior energia, absorvem a energia do fóton sendo promovidos para o orbital desocupado de menor energia. Quando a desativação ocorre, o elétron retorna ao orbital de origem liberando o excesso de energia de forma radiativa ou térmica (não radiativa). O decaimento a partir dos níveis energéticos superiores até o primeiro estado excitado ($S_n \rightarrow S_1$) se dá de forma rápida ($\sim 10^{-12}$ s) e não radiativa, num processo chamado conversão interna (CI), no qual a desativação se dá por meio de colisões que dispersam a energia através dos movimentos de vibração, rotação e translação das moléculas. Na Figura 1, os níveis energéticos vibracionais são representados pelas linhas tênues. Uma vez no nível vibracional zero do primeiro estado excitado (S_1), o elétron permanece por um tempo de vida da ordem de 10^{-9} s, e segue no processo de desativação, que pode continuar por meio de conversão interna, ou pela dissipação de energia através de emissão de fluorescência, processo radiativo que leva a molécula a um estado vibracional preferencial, com imediata relaxação para o nível vibracional fundamental do estado S_0 . Todos os processos mencionados até aqui, ocorrem sem que haja mudanças de multiplicidade do spin do elétron (LAKOWICZ, 2006; VALEUR, 2002).

Entretanto, além da CI existe um mecanismo que compete com a emissão de fluorescência na desativação do estado S_1 . Este processo consiste na mudança de multiplicidade do estado excitado singlete para o estado excitado triplete ($S_1 \rightarrow T_1$) e denomina-se cruzamento inter-sistema (CIS), ocorrendo quando existe um nível vibracional comum, isto é, de mesma energia, para ambos. Embora seja um processo quântico proibido (ocorra com menor probabilidade), a mudança no spin eletrônico pode ocorrer se o acoplamento dos momentos magnéticos gerados pelo spin e pela órbita do elétron for grande o suficiente para torná-lo possível. A presença de átomos de grande volume como bromo e iodo aumenta o acoplamento spin-órbita, favorecendo o CIS.

O elétron no estado triplete excitado (T_1) pode sofrer novo cruzamento inter-sistema, retornando ao estado singlete em um nível vibracional mais energético que o estado fundamental, sofrendo imediata desativação por conversão interna (CI); ou ainda, sofrer decaimento por emissão de fosforescência, um processo radiativo, porém mais duradouro que a fluorescência. A proibição de spin, válida também para a transição no sentido inverso ($T \rightarrow S$), explica o maior tempo de vida de fosforescência, que varia da ordem de 10^{-6} até 1 s (VALEUR, 2002).

1.2 Terapia Fotodinâmica

Os processos fotofísicos vistos na seção anterior, que ocorrem na região do UV-Vis do espectro eletromagnético, conferem às moléculas que contém sítios cromofóricos aquilo que é comumente chamado de cor, por isso, tais compostos são popularmente conhecidos como corantes. No entanto, o termo técnico utilizado para designar um corante, quando o mesmo é utilizado em aplicações fotodinâmicas, é fotossensibilizador (FS).

A iluminação e, conseqüente, ativação de um fotossensibilizador (FS) utilizando luz de comprimento de onda adequado ao seu intervalo de absorção eletrônica, na presença de oxigênio, consiste no princípio fundamental das modalidades clínicas conhecidas como terapia fotodinâmica (TFD) e inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO). Ao receber a energia do fóton em comprimento de onda (λ) específico, o FS passa para o estado excitado singlete (S_1), que sofre cruzamento inter-sistema chegando ao estado excitado triplete (T_1), que é a condição favorável para a transferência de energia para as moléculas de oxigênio. Como o oxigênio molecular tem, naturalmente, a multiplicidade triplete, a aquisição de energia, a partir do FS, fica facilitada, uma vez que a troca de energia entre moléculas triplete-triplete é quanticamente permitida. Ao receber a energia proveniente do FS, a molécula de oxigênio passa para o estado excitado singlete (S_1), espécie altamente reativa que

ataca substratos biológicos tais como membranas biológicas, moléculas de DNA, proteínas, entre outras. Esta série de interações forma o mecanismo de ação fotodinâmica do tipo II. Existe ainda o mecanismo de ação fotodinâmica do tipo I, que ocorre concomitantemente ao do tipo II e é caracterizado pela formação das chamadas espécies reativas de oxigênio (ERO's), tais como hidróxidos, peróxidos, superóxidos e radicais hidroxil que, assim como o oxigênio singlete, também reagem com os substratos biológicos causando danos em sua estrutura (SIMPLÍCIO, 2002). A elucidação e otimização dos processos, bem como o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, com características que potencializem a eficácia dos tratamentos é o que norteia as atuais pesquisas voltadas para a terapia fotodinâmica.

1.2.1 *Perspectiva histórica*

Embora a TFD seja considerada uma técnica relativamente nova, existem registros de que o seu princípio já era utilizado no Egito antigo, onde pessoas com doenças de pele como o vitiligo ingeriam plantas contendo psoralenos e se expunham à luz solar. (ROBERTS; CAIRDUFF, 1995; STERNBERG; et al., 1998). Já no século 20, Raab (1900) utilizou corantes de acridina e iluminação solar para matar organismos unicelulares (gênero *Paramecium*). Trappeiner (1903) utilizou o corante eosina e exposição à luz para o tratamento de câncer de pele. Em 1907, von Tappeiner e A. Jodlbauer introduziram o termo “fotodinâmica”. Em 1913, Friedrich Meyer-Betz conduziu o primeiro estudo com terapia fotodinâmica em humanos. Ele utilizou hematoporfirina em suas próprias mãos. Mais recentemente, em 1975, Thomas Dougherty tratou, com sucesso, o câncer de pele em pacientes humanos. Então, em 1999, a companhia canadense QLT Inc. conseguiu aprovação para comercializar o Photofrin®, sendo o primeiro medicamento autorizado para tratamentos utilizando TFD (SIMPLÍCIO, 2002; DOLMANS et al, 2003). Desde então, a terapia fotodinâmica (TFD) tem sido usada como modalidade médica para o tratamento de doenças caracterizadas pelo crescimento anormal dos tecidos, tais como artrite reumatóide,

miopia patológica, degeneração macular da retina, doenças de pele, assim como para os diversos tipos de câncer. A TFD também tem sido aplicada na inativação fotodinâmica de micro-organismos (IFDMO), combatendo moléstias como infecções fúngicas, virais e bacterianas. Embora o foco principal das pesquisas em TFD esteja voltado para o tratamento do câncer, a IFDMO tem se mostrado promissora, havendo relatos da inativação, até mesmo, do vírus HIV em amostras de plasma sanguíneo. (WAINWRIGHT, 1998; STERNBERG et al., 1998; SIMPLÍCIO et al., 2002; DOLMANS et al., 2003).

1.2.2 Mecanismos de ação

A degradação de substratos biológicos pela ação do oxigênio pode ocorrer através de dois mecanismos principais, ilustrados na Figura 2.

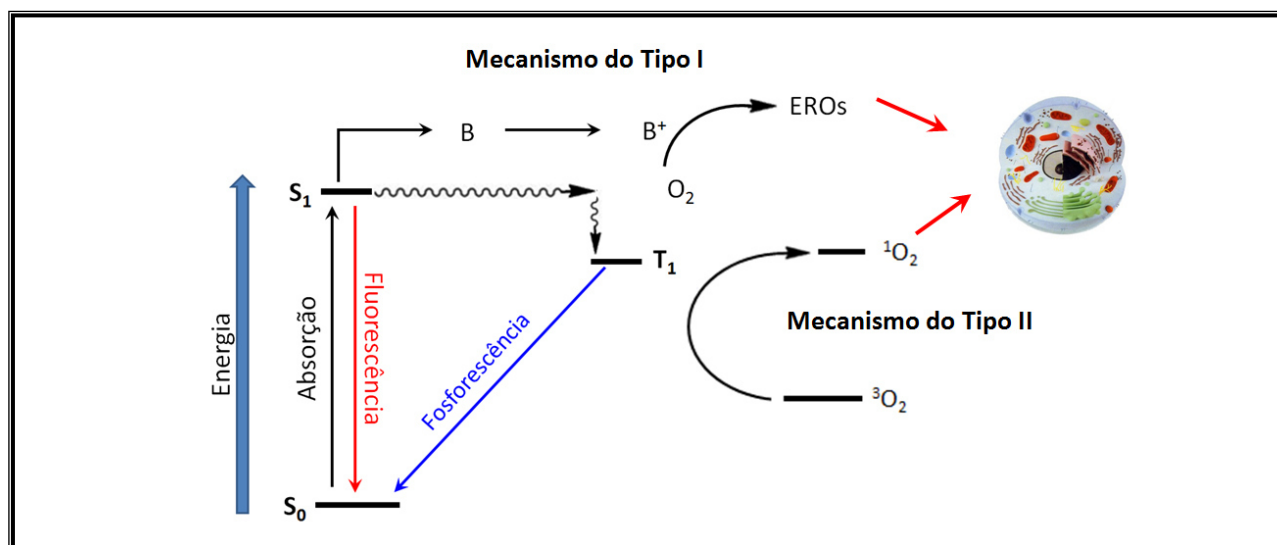


Figura 2: Representação esquemática dos principais mecanismos de ação citotóxica presentes na terapia fotodinâmica (adaptado de MACHADO, 2000).

O mecanismo do Tipo I consiste na transferência de elétrons ou a abstração de um átomo de hidrogênio entre uma biomolécula (B) e o fotossensibilizador. Essa transferência ocorre preferencialmente com o FS no estado excitado, pois a sobreposição dos orbitais é mais favorável nestas condições. Dessa forma, a biomolécula se torna um íon-radicalar, que tende a reagir com o oxigênio molecular,

formando produtos oxidados e espécies reativas de oxigênio (EROs) que, naturalmente, atacam tecidos biológicos como a membrana plasmática. (MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO, 2002; DeROSA, 2002).

O mecanismo do Tipo II, envolve transferência direta de energia do FS no estado excitado para a molécula de oxigênio, que passa do seu estado natural triplete ($^3\text{O}_2$) para o estado excitado singlete ($^1\text{O}_2$), espécie altamente citotóxica, atacando membranas e organelas celulares. As lesões oxidativas causadas pelo $^1\text{O}_2$ desencadeiam os processos de necrose ou apoptose dos tecidos alvo. A formação de oxigênio singlete tem sido considerada a principal via de ação da TFD. (MACDONALD, 2001; FOOTE, 1995)

1.2.3 Fotossensibilizadores em TFD

Algumas características são desejáveis para que um corante seja utilizado como fotossensibilizador em TFD. Ele deve apresentar, por exemplo, baixa toxicidade no escuro, formulação simples e reprodutível, alta estabilidade do formulado, seletividade pelo tecido alvo, farmacocinética favorável, baixo custo de obtenção e outros fatores que favorecem uma administração facilitada, não dispendiosa e segura (ALLISON, 2004).

Além das características gerais citadas, as propriedades fotofísicas dos FS são de particular importância. Destacam-se as seguintes (ALLISON, 2004; SIMPLÍCIO, 2002):

- Alto rendimento quântico do estado triplete, que leva a um alto rendimento quântico de oxigênio singlete;
- Baixo rendimento quântico de reações de fotobranqueamento, onde a estrutura do corante se modifica, resultando na perda dos sítios cromofóricos.
- Alto coeficiente de absorvidade molar em comprimentos de onda situados no intervalo de 600-800 nm, faixa do espectro eletromagnético conhecida como janela fotodinâmica ou janela fototerapêutica.

Se o FS tiver sua banda de absorção eletrônica situada dentro da janela fototerapêutica o processo de iluminação torna-se otimizado, pois a luz nesse intervalo de comprimentos de onda tem maior penetração nos tecidos, conforme pode ser observado na Figura 3.

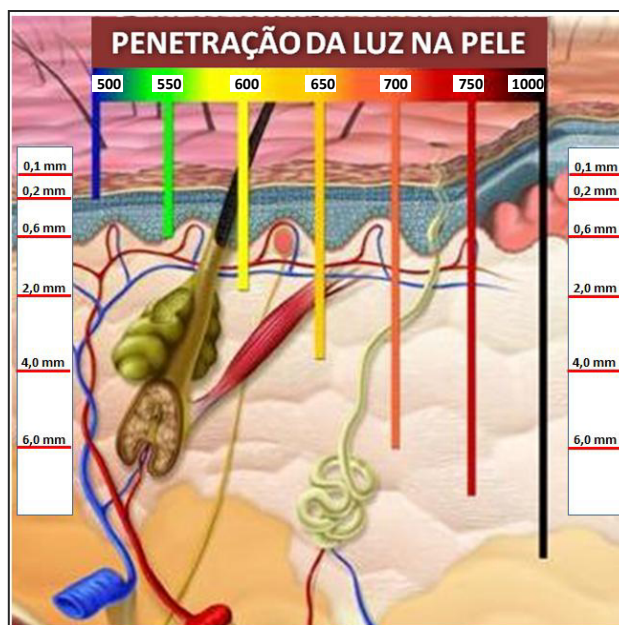


Figura 3: Profundidade de penetração da luz na pele em função do comprimento de onda (adaptado de www.stelisi.co.nz).

Além disso, a localização do fotossensibilizador é de particular importância, pois tanto as EROs como o $^1\text{O}_2$ possuem tempos de vida (τ) curtos e alta reatividade, dependentes do meio em que se encontra. Por isso, se o FS estiver alocado longe do tecido alvo, as espécies geradas podem ter seus estados excitados desativados antes de atingirem o tecido alvo, ou simplesmente reagir com outro substrato biológico presente no sistema. Por outro lado, estes mesmos fatores conferem à TFD uma vantagem sobre os tratamentos convencionais, que é alta seletividade dos tecidos a serem tratados, pois os processos se desencadeiam especificamente sobre o tecido iluminado (ZHU; FINLAY, 2006).

Uma elevada partição do fotossensibilizador para os tecidos alvos, ocorre em função do grau de lipofilicidade do mesmo, possibilitando que ele se aloque em diferentes regiões da membrana plasmática, ou a atravesse, chegando a organelas internas como os lisossomos e mitocôndria (GABRIELLI, 2004). Em micro-organismos, o

ataque pode ser direcionado às membranas das organelas internas, de acordo com as características de hidrofobicidade e carga elétrica de cada FS (DEMIDOVA, 2004; PERUSSI, 2007).

1.2.4 Oxigênio singlete

Oxigênio singlete ou singleto (1O_2), são denominações dadas aos estados eletrônicos excitados do oxigênio molecular (3O_2). Quando no estado fundamental, o oxigênio molecular possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais antiligantes de mesma energia, π^*_x e π^*_y . O estado de mais baixa energia, é atingido quando os dois elétrons possuem o mesmo spin. Por isso o estado fundamental do oxigênio molecular é um tripleto (notação espectroscópica $^3\Sigma_g$). Quando todos os seus elétrons de valência estão emparelhados, diz-se que o oxigênio está num estado excitado tripleto. A configuração tripleto, bem como as três configurações singlete possíveis são apresentadas na tabela 1, com suas respectivas energias (MACHADO, 2000).

Tabela 1: Distribuição eletrônica nos orbitais moleculares antiligantes para os estados eletrônicos do oxigênio.

Estado	Orbital molecular anti-ligante	Energia [#] , kJ mol ⁻¹
$^3\Sigma_g$	$[\uparrow]\pi^*_x [\uparrow]\pi^*_y$	0
$^1\Delta_x$	$[\uparrow\downarrow]\pi^*_x []\pi^*_y$	92,4
$^1\Delta_y$	$[]\pi^*_x [\uparrow\downarrow]\pi^*_y$	92,4
$^1\Sigma_g$	$[\uparrow]\pi^*_x [\downarrow]\pi^*_y$	159,6

[#] Relativa ao estado fundamental

Como pode-se observar na tabela 1, o oxigênio singlete possui duas formas com simetrias distintas. O primeiro estado excitado, duplamente degenerado ($^1\Delta_g \approx ^1\Delta_x = ^1\Delta_y = 92,4 \text{ kJ mol}^{-1}$) e o segundo, com a mesma simetria do estado fundamental, porém com os spins paralelos e energia mais alta ($^1\Sigma_g$, $159,6 \text{ kJ mol}^{-1}$). Esse segundo estado excitado possui o tempo de vida muito curto (10^{-11} s), decaindo rapidamente para $^1\Delta_g$, uma vez que essa transição é permitida por spin (FOOTE, 1995; MACHADO, 2000). Já o

decaimento do primeiro estado excitado ($^1\Delta_g$) para o estado fundamental ($^3\Sigma_g$) é proibida por spin, conferindo as espécies $^1\Delta_g$ um tempo de vida relativamente maior (10^{-6} s), o que permite a reação com moléculas orgânicas, especialmente aquelas com elevada densidade eletrônica (DeROSA, 2002; MACHADO, 2000).

Tanto em TFD quanto na IFDMO, o oxigênio singlete é apontado como a principal espécie que desencadeia os processos de necrose e apoptose dos tecidos, pois os produtos de degradação gerados são característicos da reação com o mesmo (KORYTOWSKI, 1992; GEIGER, 1995). Entretanto, além de curto, o tempo de vida (τ) do oxigênio singlete é altamente dependente do meio. Em água, por exemplo, o τ fica em torno de 4 μ s, chegando 70 μ s em água deuterada e 250 μ s em clorofórmio (MACHADO, 2000). Então, considerando o coeficiente difusional do oxigênio em meio aquoso, seu raio efetivo de ação fica limitado a distâncias menores que 20 nm. No citoplasma os valores de τ são inferiores a 0,3 μ s, indicando rápida oxidação das insaturações presentes nas biomoléculas do meio intracelular (OCHSNER, 1997, CAETANO, 2007).

Portanto, enfatiza-se a localização do fotossensibilizador junto às organelas celulares (principalmente em nível de membranas) como um fator preponderante para eficiência clínica da terapia fotodinâmica (MACHADO, 2000; DOUGHERTY, 1998).

Um dos métodos diretos para se estudar as cinéticas de reação, bem como o tempo de vida do 1O_2 é a medida resolvida no tempo de sua fosforescência na região do infravermelho (1270 nm). Mesmo com o baixo rendimento quântico de fosforescência na maioria dos solventes, o desenvolvimento de detectores de alta sensibilidade baseados em fotodiodos de germânio tornou possível a medida do decaimento da luminescência do 1O_2 , possibilitando assim a determinação do seu tempo de vida. Embora esse tipo de medida se torne cara, devido ao alto nível de sofisticação do aparato instrumental, é possível avaliar com precisão o decaimento fosforecente do 1O_2 em escalas de tempo da ordem de 1 ns (WILKINSON, 1993; Idem, 1995).

1.3 Inativação Fotodinâmica de Microorganismos (IFDMO)

Os princípios da terapia fotodinâmica (TFD), utilizados no combate a tecidos indesejáveis ou que apresentem um crescimento desordenado (tumores) são também aplicados na inativação ou na destruição de microorganismos como bactérias, vírus, fungos e leveduras (PERUSSI, 2007). Embora se faça a distinção terminológica, a inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) também se utiliza da excitação de um FS com luz visível, em um comprimento de onda favorável à absorção de fótons, visando a ocorrência dos fenômenos fotofísicos que levam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e principalmente das reações providas pelo oxigênio singlete. Portanto, a diferença entre as técnicas está relacionada, principalmente, no que diz respeito ao tecido alvo, que na TFD são células indesejáveis do próprio organismo do paciente, enquanto na IFDMO são microorganismos causadores de patologias. Muitos trabalhos não fazem distinção entre as técnicas e se referem à IFDMO como TFD aplicada a infecções localizadas (DAI, 2009; RIORDAN, 2005).

As próprias origens das aplicações fotodinâmicas estão ligadas a inativação de microorganismos; mas o surgimento dos antibióticos como a penicilina fez com que o interesse pela TFD em aplicações antimicrobianas fosse reduzido (DOLMANS, 2003). Entretanto, a rápida adaptação/mutação dos microorganismos acabou resultando no surgimento de linhagens resistentes aos fármacos, que causa um grande número de casos de infecções hospitalares que não podem ser combatidas com antibióticos. Neste cenário a IFDMO volta a figurar como alternativa viável no combate a microorganismos, pois o ataque via $^1\text{O}_2$ alcança mesmo as linhagens mais resistentes e torna improvável o surgimento de resistência nas cepas tradicionais, uma vez que a funcionalidade do FS é física e não bioquímica (PERUSSI, 2007). A seletividade da técnica fotodinâmica também ajuda a conservar a flora de microorganismos probióticos (amigáveis) (WAINWRIGHT, 1998). A literatura reporta o uso da IFDMO na esterilização de bolsas de sangue, na odontologia contra infecções periodontais, tratamentos de água, controle bacteriano em alimentos, tratamento de lesões

superficiais contaminadas com bactérias gram (+) e gram (-), assim como infecções em cavidades do corpo que geralmente respondem mal a ação de antibióticos administrados de forma sistêmica, tais como infecções no trato urinário, otite média e doenças periodontais (PERUSSI, 2007).

O principal sítio alvo da ação fotodinâmica contra microorganismos é sua parede celular, que uma vez danificada causa a exposição do DNA (SCHAFER, 2000). Com poucas exceções as bactérias tem uma membrana celular fosfolipídica, revestida por uma camada de peptídeoglicano que contribui para a rigidez mecânica da parede celular como um todo (Figura 4). Todas as bactérias gram-negativas possuem uma camada adicional na estrutura de sua parede celular, situada fora do peptídeoglicano formando uma estrutura compostas de três camadas (DAI, 2009).

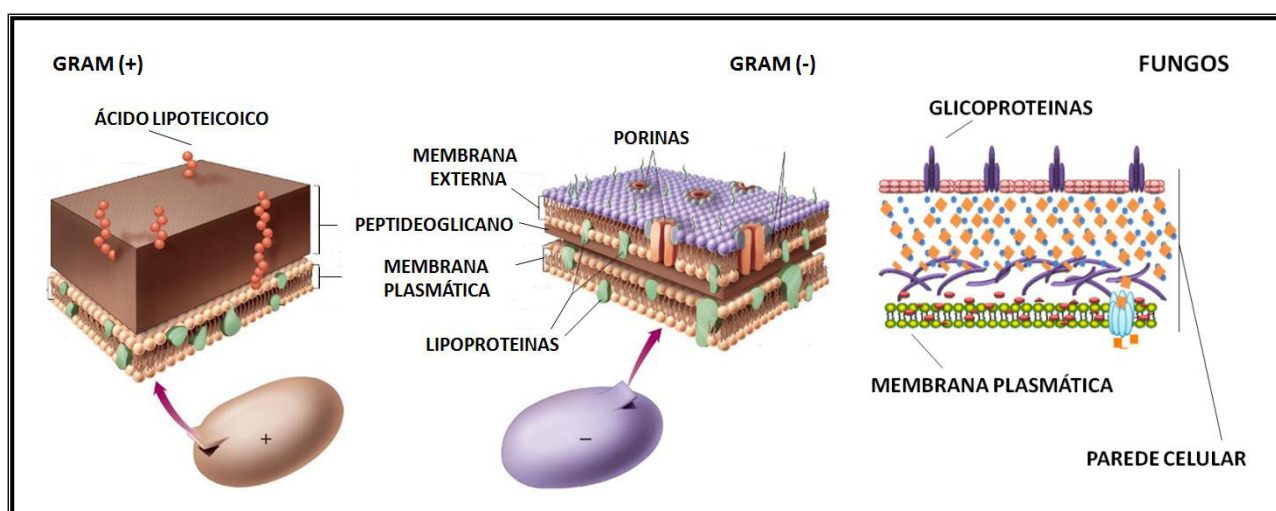


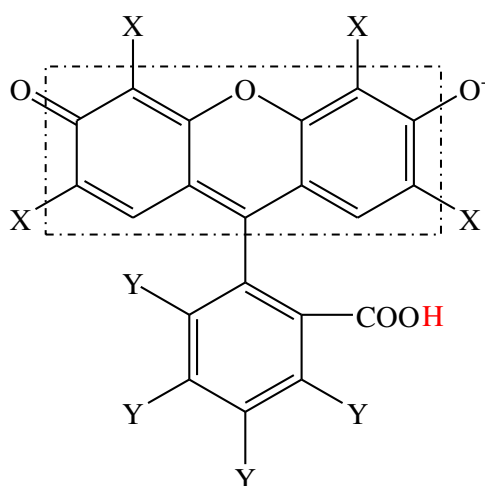
Figura 4: Representação esquemática da parede celular de bactérias Gram-positiva (+), Gram-negativa (-) e fungo (Adaptado de DAI, 2009).

A membrana externa é uma organela de proteção para o micro-organismo. No caso específico da IFDMO ela serve de barreira física, impedindo a passagem do FS ou servindo como escudo contra o ataque do $^1\text{O}_2$. As porinas, estruturas que compõem a membrana, formam canais hidratados que permitem a difusão de nutrientes e outros solutos hidrofílicos, mas barram compostos hidrofóbicos e moléculas grandes, que são características comuns dos FS. Dessa forma, a busca de meios que possam desestabilizar a membrana externa tornando-a permeável o bastante para que os FS

alcancem a membrana plasmática é uma questão chave para a inativação fotodinâmica de bactérias gram-negativas (MALIK, 1990). A literatura reporta a existência – tanto em bactérias gram-positiva, quanto gram-negativa – de sítios específicos para a ligação de moléculas catiônicas, o que favoreceria a eficiência de FS com carga positiva em comparação aos FS de molécula neutra e aniônica (WAINWRIGHT, 2003). Além disso, existe o interesse da aplicação da IFDMO contra fungos e leveduras. O estudo dessa classe de microorganismos objetiva tanto a aplicação clínica direta, no tratamento de moléstias oriundas das infecções fúngicas, quanto a utilização dos mesmos como sistema modelo para se avaliar os danos induzidos por procedimentos fotodinâmicos em células eucarióticas superiores (LAMBRECHTS, 2005; LYON, 2010).

1.4 Corantes xantênicos como fotossensibilizadores

Os xantenos são compostos cíclicos que apresentam três anéis aromáticos em arranjo linear, apresentando um átomo de oxigênio no anel central (Figura 5). A Fluoresceína, Eosina Y, Eritrosina B e a Rosa de Bengala B, são alguns exemplos desta classe de corantes (PERUSSI, 2007). Os corantes xantênicos halogenados absorvem luz visível num comprimento de onda máximo entre 480 - 550 nm (NECKERS, 1989; PELLOSI, 2012), ou seja, fora da denominada janela fototerapêutica em TFD (região entre 600 - 800 nm). Mesmo assim, eles apresentam propriedades interessantes e têm sido utilizados em TFD aplicada na superfície corpórea, contra tumores que possam ser iluminados através de sondas introduzidas nas cavidades corpóreas, em aplicações odontológicas e também na inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) (WACHTER, 2003; DEMIDOVA, 2004; WOOD, 2006; PERUSSI, 2007, GARG, 2012).



Corante	X	Y
Fluoresceína	H	H
Eosina Y	Br	H
Eritrosina B	I	H
Rosa de Bengala B	I	Cl

Figura 5: Representação esquemática genérica para alguns corantes Xantênicos. No destaque, estrutura do anel xantênico.

Por exemplo, a fluoresceína é o composto xantênico com estrutura molecular mais simples, servindo como estrutura básica para outros corantes da mesma classe. Em meio aquoso com pH fisiológico a fluoresceína, como os demais xantenos, se encontra na forma dianiônica ($pK_{a1} = 2,5$ e $pK_{a2} = 6,2$; BATISTELA, 2011), apresentando elevado valor de rendimento quântico de fluorescência ($\Phi_F = 0,93$) sendo assim, o composto mais comumente utilizado como sonda de fluorescência (SJÖBACK et al., 1995). Devido a essas propriedades, a fluoresceína tem sido utilizada em pesquisas científicas, indústria e, com destaque, na medicina como contraste no diagnóstico de doenças oculares através do exame de angiografia, por se acumular facilmente na retina e outros pontos do sistema vascular do olho (ETER, 2003; KANG, 2004; MAIA, 2005).

Embora o uso da fluoresceína em medicamentos comerciais represente uma vantagem, seu elevado rendimento quântico de fluorescência não favorece a formação de oxigênio singlete, pois o processo de formação do mesmo exige que a molécula do corante, uma vez no estado excitado, sofra cruzamento inter-sistema para o estado triplete, ao invés de emitir radiação de fluorescência. Nesse sentido, os derivados halogenados da fluoresceína apresentam maior potencial para serem usados como FS, pois apresentam um maior rendimento quântico do estado triplete (VALDES; NECKERS, 1989). Mesmo assim, o estudo da estrutura da fluoresceína ainda contribui para a elucidação de muitas questões relativas à classe dos corantes

xantênicos (BATISTELA, 2010). Um ponto fundamental é a disposição espacial das duas partes da molécula. O anel xantênico – planar – se encontra rotacionado a um ângulo de aproximadamente 90° em relação ao anel benzóico (YAMAGUCHI et al., 1997). Devido a essa geometria quase perpendicular entre os dois planos, os orbitais moleculares têm pouca sobreposição, de forma que não existe efeito de conjugação entre as duas partes (SONG, 2000; ZHANG, 2010). Como as características fotofísicas dessa classe de corantes se deve aos sítios cromofóricos situados na porção xantênica da molécula, modificações na região do anel benzóico não afetariam propriedades importantes como o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (AMAT-GUERRI, 1990; MIURA, 2003).

No entanto, essas mesmas propriedades são extremamente dependentes da estrutura e forma protolítica da molécula. A literatura reporta (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1994; BATISTELA, 2010) quatro formas protolíticas possíveis para os xantenos, dependendo do pH e do solvente, sendo as formas: catiônica, neutra, monoaniônica e dianiônica. Entretanto, a molécula também apresenta equilíbrios tautoméricos conforme ilustrado na Figura 6. As formas catiônica e dianiônica não apresentam equilíbrios tautoméricos (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1994). Já para a forma neutra (NE) os tautômeros propostos são lactona (NEL), quinoide (NEQ) e zwitteriônica (NEZ). Esta hipótese está baseada em estudos das estruturas cristalinas da fluoresceína (ANTHONI, 1995). A forma NEZ é somente proposta para o estado sólido, mediante o estudo comparativo dos espectros de infravermelho, que apontam semelhanças com a estrutura cristalina de sais de pirílio, sendo sua existência pouco provável em solução (Idem; MARKUSZEWSKI; DIEHL, 1980). As estruturas NEQ e NEL podem ser encontradas em solução, porém a NEQ é favorecida em ambientes polares como, por exemplo, soluções aquosas. Já a NEL passa a ser favorecida com a diminuição da polaridade do solvente, chegando a representar 100% das formas tautoméricas no equilíbrio em ambientes apróticos e de baixa polaridade. Com a formação da ligação lactona a ressonância do anel xantênico é quebrada devido à hibridização sp^3 do carbono de ligação entre os anéis xantênico e benzênico, tornando a solução incolor (MCHEDLOV-PETROSSYAN e MAYORGA, 1992; SAIMOILOV, 2000).

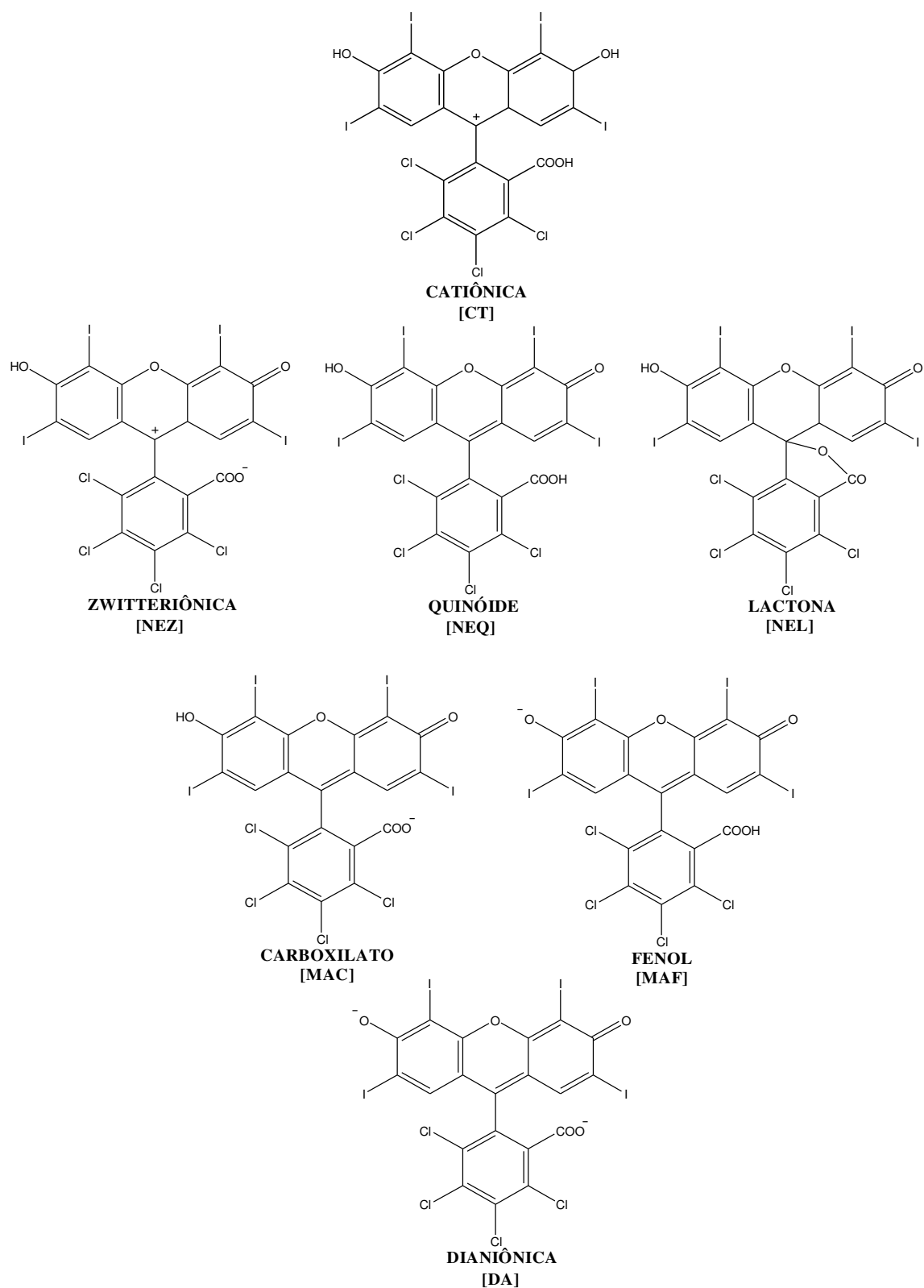


Figura 6: Estruturas protolíticas e tautoméricas propostas para a Rosa de Bengala. **NE** (neutra), **MA** (monoaniônica) e **DA** (dianionica) (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1994).

Para a forma monoaniônica, por sua vez, são apresentados dois tautômeros possíveis: monoaniônica carboxilato (MAC) e monoaniônica fenolato (MAF). Sabe-se que em água, os ácidos benzoicos são mais ácidos que fenóis (CRC Handbook of Physics and Chemistry, 2005), assim espera-se que a forma MAC seja favorecida neste meio (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1992; MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1994). Estudos de modelagem molecular com a fluoresceína confirmam que a forma MAC realmente prevalece em meio aquoso, provavelmente devido à interferência da nuvem de elétrons do anel xantênico sobre a densidade eletrônica do grupo carboxilato, tornando-o mais ácido que o grupo fenol, neste ambiente (BATISTELA, 2010).

1.4.1 Rosa de Bengala B

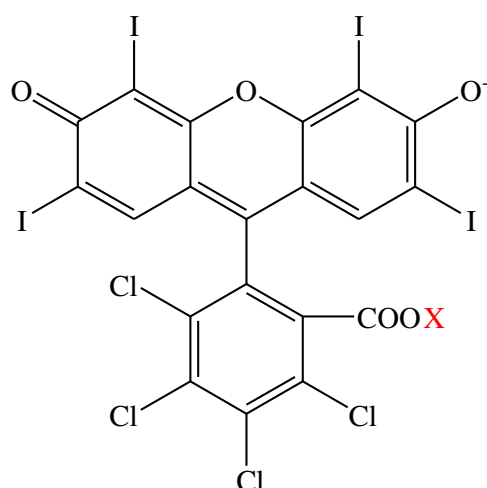
Os fotossensibilizadores avaliados nesse estudo são xantenos derivados ésteres do composto 2,4,5,7- tetraiodo-3,4',5',6'-tetraclorofluoresceína ou Rosa de Bengala B (RBB) como é conhecido comercialmente. Como se pode observar na Figura 7, a RBB possui quatro átomos de iodo substituídos diretamente na estrutura xantênica e quatro átomos de cloro ligados ao anel benzóico. O composto foi sintetizado originalmente por Gnem para ser usado como corante de tecido em Bengala, na Índia. Historicamente, seu nome também é ligado com a tradição hindu das mulheres casadas usarem um ponto vermelho na testa para se diferenciarem das solteiras (NECKERS, 1989). O composto sólido apresenta coloração rosa-púrpura e, dentre outras aplicações comerciais, tem sido utilizado na formulação de colírios, com o objetivo de fazer a marcação de lesões oculares (WILSON; RONCADA, 1985; GOTO, 2002). A literatura também reporta o uso do corante na inativação de microorganismos em diversos contextos (SCHAFER, 2000; TSAI, 2009), inclusive no combate à placa bacteriana dental (SHRESTHA, 2012).

Comercialmente, a RBB é encontrada como sal dissódico e apresenta propriedades interessantes para o uso como fotossensibilizador tais como: elevado coeficiente de absorvidade molar, elevado rendimento quântico do estado triplete,

elevado rendimento na supressão do estado triplete pelo oxigênio molecular. Isto faz da RBB o corante com o maior rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1O_2$) dentre os xantenos tradicionais: 0,75 em água e 0,86 em etanol, desde que em concentrações menores que 10^{-5} mol L⁻¹, a partir da qual começa a sofrer efeitos de auto-agregação (VALDES-AGUILERA; NECKERS, 1988). Além disso, apresenta baixa taxa de foto-branqueamento (degradação na presença de luz) em solventes polares próticos (NECKERS, 1989).

Contudo, a molécula apresenta um caráter hidrofílico alto, o que diminui consideravelmente a sua interação com membranas biológicas, que devido a sua natureza lipídica tem maior afinidade com compostos mais hidrofóbicos, salvo os efeitos de carga em fosfolípidios aniônicos, onde as forças eletrostáticas modulam a interação droga-membrana (HAAS, 2001).

A hipótese trabalhada neste estudo foi a modificação estrutural da RBB com o objetivo de torna-la mais hidrofóbica. Esta modificação foi feita especificamente sobre o anel benzóico pois, como visto anteriormente, as propriedades fotofísicas desta classe de corantes são inerentes à estrutura xantênica, sendo o sítio cromofórico quase independente do restante da molécula.



Corante	X
RBB	H
RBBMET	CH ₃
RBBBUT	[CH ₂] ₃ – CH ₃
RBBDEC	[CH ₂] ₉ – CH ₃

Figura 7: Representação esquemática da estrutura molecular dos corantes xantênicos: Rosa de Bengala (RBB), RBB Metil éster (RBBMET), RBB Butil éster (RBBBUT) e RBB Decil éster (RBBDEC).

1.5 Sistemas micelares como modelo de membranas biológicas

A eficiência clínica de um FS e o decorrente sucesso da TFD é um processo complexo e depende de vários fatores. O ambiente em que o FS está alocado, por exemplo, interfere diretamente em suas propriedades físico-químicas e fotofísicas. Uma vez que a estrutura química de um composto determina sua interação com o micro ambiente em que está inserido, é importante conhecer o comportamento do FS em sistemas biológicos vivos para se certificar se ocorre a manutenção de suas propriedades medidas *in vitro* (STYLISS; KAYE, 2006). Assim, a incorporação do FS no tecido alvo e o seu comportamento foto-físico nesse meio passam a ser questões primordiais.

Tanto em microorganismos como em tecidos eucariontes doentes, os alvos da ação fotodinâmica são as membranas celulares, tanto a membrana plasmática, como as membranas das organelas internas responsáveis pelas funções morfológicas, bioquímicas e energéticas da célula. Se essas funções forem comprometidas pode-se desencadear a sua apoptose, processo não inflamatório que elimina a célula doente. (PLAETZER, 2003; DEMIDOVA, 2004). Dessa forma, avaliar a interação do FS com as membranas torna-se fundamental. Entretanto, a membrana celular (Figura 8) é um ambiente extremamente complexo, de difícil avaliação e que requer um estudo substancial em diferentes níveis, principalmente no que se refere aos processos que ocorrem em nível de interface das membranas biológicas. O uso de sistemas modelo, que mimetizam as biomembranas, surge como alternativa viável para essa questão (FENDLER, 1982; SCRIMIN, 1999).

Uma maneira simplificada de fazer previsões sobre a interação do FS com as membranas é a medida do seu coeficiente de partição (K_p), usualmente entre as fases líquidas de um sistema bifásico constituído por água e um solvente orgânico lipossolúvel, a fim de se obter o balanço hidrofílico/lipofílico da molécula (SMITH, 2012).

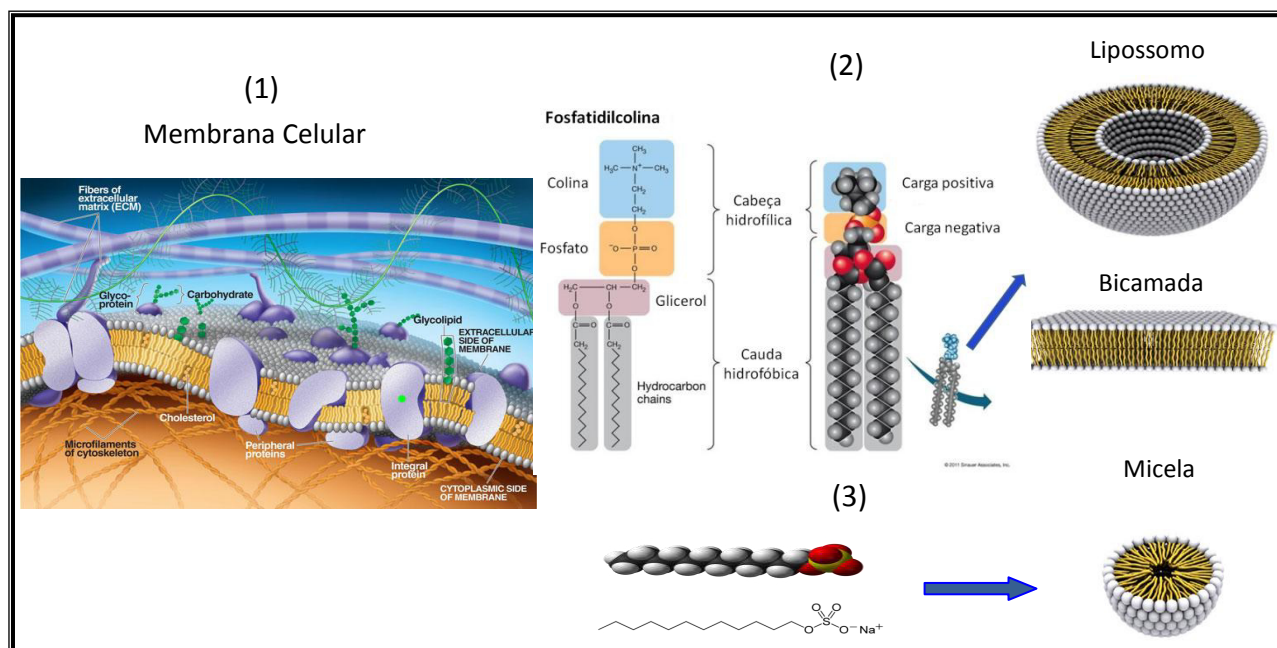


Figura 8: (1) Representação esquemática da secção transversal da membrana biológica com seus principais constituintes; (2) Vista em corte de duas estruturas formadas por fosfolipídios auto-associados; (3) Representação esquemática de surfactante e micela.

Embora seja obtido através de um ensaio relativamente simples, o coeficiente de partição é útil para se estimar propriedades importantes para o desenvolvimento farmacológico de novas drogas, tais como bioacessibilidade, transporte passivo, assim como o grau de afinidade e de permeação do fármaco na membrana; sendo todos esses fatores de grande interesse para o tratamento de câncer via TFD (DI, 2009; BLOKHINA, 2013). A literatura reporta com bastante frequência a utilização do sistema água/1-octanol para estudos de coeficiente de partição pois a interface entre as fases é bem definida, servindo de modelo para a estimativa da distribuição de compostos na fronteira entre ambientes hidrofílico e lipofílico (RIM, 1986; POOLE, 2003; WAINWRIGHT, 2003).

Por outro lado, micelas e lipossomos (Figura 8) são estruturas anfífilas compostas de uma região hidrofóbica e outra hidrofílica. Em meio aquoso, no caso das micelas, a porção hidrofóbica fica voltada para dentro, formando um núcleo ou core lipofílico. Os lipossomos, por sua vez, são formados por uma bicamada, com outra região hidrofílica no núcleo mais interno, simulando com um bom nível de correlação a estrutura básica interfacial de uma membrana plasmática (LOH, 2002). As micelas

são estruturas auto-agregadas formadas pela junção dos monômeros de um surfactante (molécula anfifílica), tendo ampla aplicação nas áreas da química, agroquímica, alimentos, cosméticos, etc. Os surfactantes são compostos constituídos por uma cabeça polar ou iônica ligada a uma cadeia alquílica que forma uma cauda apolar (FENDLER, 1982). Em fase aquosa, a auto-estruturação, bem como a manutenção da estrutura micelar depende, além das características estruturais, também de um valor mínimo de concentração, denominado concentração micelar crítica (CMC) (BAGHA, 2013).

Surfactantes de baixa massa molecular (SBMM), com massa molar normalmente menor que 100 g/mol, têm sua CMC no intervalo de 10^{-3} a 10^{-4} Mol L⁻¹, com valores variando em função das condições de contorno como força iônica, temperatura, presença de substratos de nucleação, entre outros (KNOW, 2005; DANOV, 2013). O tipo de micela é determinado em função da polaridade do meio; assim, se o meio é polar haverá formação de micelas ordinárias e se o meio é apolar haverá a formação de micelas reversas (KLYACHKO; LEVASHOV, 2003; USKOKOVIC, 2007).

Os surfactantes podem ser classificados de acordo com seu estado de carga ou grupo cabeça polar, podendo ser aniônicos, catiônicos, zwitteriônicos e não iônicos. Assim, interações específicas resultantes da presença de cargas elétricas formais ou dipolos permanentes na molécula do FS podem ser avaliados pela utilização de micelas iônicas (KNOW, 2005; PREVIDELLO, 2006; SUCHETTI, 2007). Dessa forma, esses sistemas coloidais simplificados, formados por micelas com um core hidrofóbico em meio aquoso (microfase), fornecem um ambiente biomimético razoável para o estudo de interações específicas, bem como a penetração e localização do FS no meio intracelular, pois, apesar da relativa simplicidade, simulam a interface de uma biomembrana (FENDLER, 1982; SUCHETTI, 2007; AYDIN, 2009). Os surfactantes iônicos utilizados neste trabalho foram o dodecil sulfato de sódio (SDS – aniônico) e o brometo de cetil trimetilamônio (CTAB – catiônico). Suas estruturas são ilustradas na Figura 9.

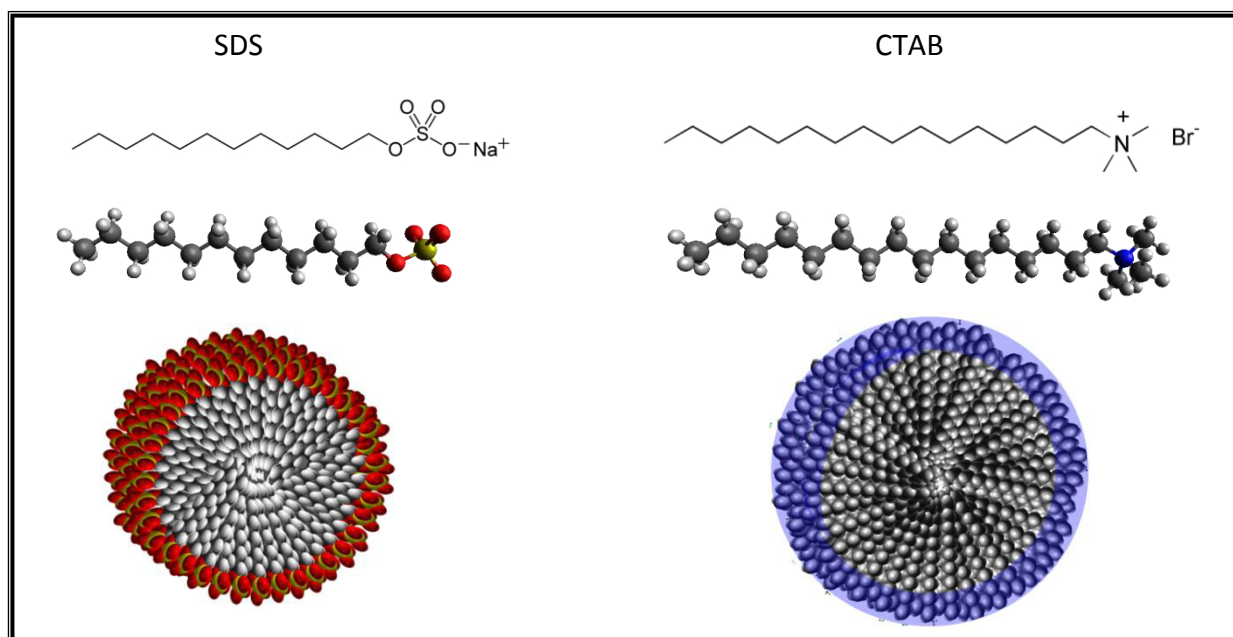


Figura 9: Estrutura dos surfactantes aniônico SDS e catiônico CTAB e representação da secção transversal de suas respectivas micelas.

Por exemplo, por meio da técnica de supressão de fluorescência é possível avaliar a profundidade relativa de alocação do FS na micela. Usa-se um composto supressor solúvel em água, capaz de desativar o estado excitado, diminuindo a emissão de luz. Por ser hidrofílico, o supressor tem sua penetração reduzida depois das primeiras unidades metilênicas da cadeia alquílica (FUJIMOTO, 2012), e sua acessibilidade ao FS é utilizada como parâmetro para se avaliar a profundidade do mesmo na micela (BLATT, 1985; FERNANDES, 2002; LAKOWICZ, 2006). Medidas de anisotropia de fluorescência são complementares aos estudos de supressão, pois permitem acompanhar a mudança de ambiente do FS em função da variação da microviscosidade local. Este parâmetro influi na restrição de mobilidade rotacional do FS, durante a emissão polarizada de luz. Sendo o interior da micela um meio mais rígido (viscoso), a liberdade rotacional da molécula de FS fica menor que em meio aquoso (RUIZ, 2000; GOEL, 2010).

1.5.1 Micelas na formulação de fármacos

A solubilidade, que está intimamente ligada ao caráter hidrofílico/lipofílico das moléculas, é uma propriedade desafiadora para a farmacologia em geral e mais ainda quando se trata de fármacos a serem aplicados em TFD (DI, 2009). Isso por que, como já visto, a atividade fotofísica do FS requer que ele se encontre na forma desagregada, sob pena de prejuízo no valor de rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) (CHEN, 1998).

Como os fluidos biológicos são polares (aquosos), a primeira impressão é que um FS de caráter hidrofílico seria mais promissor. Entretanto, uma boa circulação na corrente sanguínea não é garantia de que o FS será entregue no tecido alvo; pelo contrário, devido à natureza hidrofóbica das membranas celulares é mais provável que um composto hidrofílico não apresente uma interação satisfatória. Por outro lado um FS lipofílico, que tende a interagir bem com as biomembranas, sofreriam acentuada autoagregação no ambiente do plasma sanguíneo. Dado a essas particularidades o biotransporte e entrega do fármaco no tecido alvo torna-se um desafio em particular em TFD (KABANOV, 2002).

Estudos apontam para alto potencial das micelas, utilizadas como sistemas solubilizadores de fármacos. Entretanto, micelas formadas a partir de surfactantes de baixa massa molecular (SBMM) não permaneceriam estáveis na corrente sanguínea, visto que a concentração limite para a toxicidade em plasma sanguíneo está abaixo da sua CMC. Ou seja, em concentrações consideradas não tóxicas as micelas se desfariam expondo o FS ao ambiente aquoso (KNOW, 2005; PELLOSI, 2012). Como alternativa a esse infortúnio, muitos estudos têm sido desenvolvidos utilizando, por exemplo, os surfactantes poliméricos ou copoliméricos. Especial interesse tem sido dado à família de surfactantes pluronic[®] (ou Poloxâmeros) (BATRAKOVA, 2008). Os unímeros do copolímero (Figura 10) consistem em moléculas tribloco de unidades repetidas de oxietileno (PEO - hidrofílica) e oxipropileno (PPO - hidrofóbica) com a seguinte configuração: $(\text{PEO})_x(\text{PPO})_y(\text{PEO})_x$. Esse grupo de polímeros é não tóxico,

biocompatível e possui sítios de ligação adequados para a solubilização de drogas hidrofóbicas (RIJCKEN, 2007; TSAI, 2009; DING, 2011).

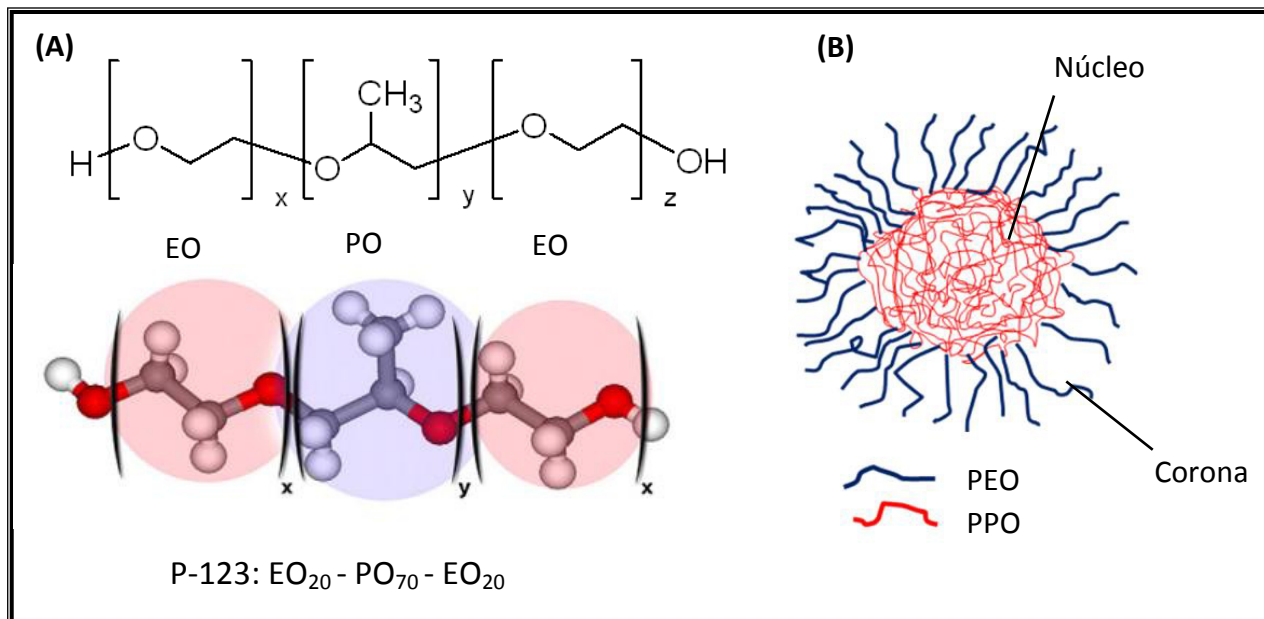


Figura 10: (A) Estrutura geral do monômero de um copolímero da classe dos Plurônicos®. Para P-123; $x=z=20$ e $y=70$. (B) Representação esquemática de uma micela polimérica em meio aquoso.

Além disso, copolímeros tribloco possuem baixos valores de CMC ($10^{-6} - 10^{-7}$ Mol L⁻¹) e as micelas formadas tem alta estabilidade termodinâmica e cinética, o que garante uma desestruturação lenta para unímeros, quando as mesmas são expostas a um ambiente onde a concentração esteja abaixo da CMC. Outro fator a ser considerado para os estudos com surfactantes poliméricos é a temperatura, pois o processo de micelização somente irá ocorrer acima de uma determinada temperatura denominada temperatura micelar crítica (TMC), que, por sua vez, é função da concentração do surfactante. Além disso, há evidências que aumentos na temperatura causem também um acréscimo no número de agregação (N_{ag}) dos copolímeros (ALEXANDRIDIS, 1994). Por isso é importante que o copolímero utilizado apresente TMC compatível com as condições necessárias para a aplicação que se objetiva (BOHORQUEZ, 1999; BAKSHI, 2006).

Por possuírem características favoráveis, os copolímeros tribloco da classe dos Plurônicos® são potencialmente úteis para utilização em sistemas de entrega e liberação controlada de fármacos (YOKOHAMA, 2005; KNOW, 2005; LOH, 2002;

KABANOV, 2002). O Plurônico® P-123, por exemplo, tem em solução aquosa de concentração de 1% m/v, TMC = 16°C (ALEXANDRIDIS, 1994), não oferecendo nenhum problema de desestabilização da micela (se [P-123]>1% m/v) na utilização do mesmo no biotransporte de fármacos em seres humanos (temperatura corporal ~ 37°C). Adicionalmente, o P-123 (MM = 5,750 g mol⁻¹) apresenta baixa CMC: 9,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ em água a 30 °C (ALEXANDRIDIS, 1994). As micelas formadas por copolímeros (Figura 10) são constituídas de uma corona hidrofílica, responsável pela estabilização da mesma em meio aquoso via ligação de hidrogênio, o que evita o seu reconhecimento, *in vivo*, pelo sistema retículo endotelial, permitindo um maior tempo de circulação na corrente sanguínea (SUN, 2011). O core hidrofóbico, por sua vez, é responsável pelo armazenamento do fármaco, por meio de interações hidrofóbicas ou ligação covalente nas unidades PO (KEDAR, 2010).

2. OBJETIVOS

Geral:

- Investigar as propriedades físico-químicas do corante Rosa de Bengala e de seus derivados ésteres em meio micelar, objetivando a compreensão das propriedades de interação FS-surfactantes para o desenvolvimento racional de formulações contendo possíveis candidatos a fármacos para a TFD e IFDMO.

Específicos:

- Sintetizar derivados ésteres lipofílicos da RBB, de forma que sua afinidade pelos sistemas modelo de biomembrana seja aumentada, sem prejuízo de suas características fotofísicas originais.

- Avaliar a modulação das características biofísicas dos FS sintetizados através da:
 - Determinação dos valores de pKa dos grupos ionizáveis das moléculas em meio homogêneo (aquoso) e micro-heterogêneo (aquoso-micelar), utilizando espectroscopia de absorção eletrônica e emissão de fluorescência, com análise dos resultados através de métodos quimiométricos.
 - Avaliação do balanço hidrofílico/hidrofóbico dos FS através de medidas de coeficiente de partição (K_p) dos mesmos no sistema bifásico 1-octanol/água.
 - Estudar, também, o grau de interação dos FS com as micelas, via isotermas de adsorção, e estimar suas respectivas constantes de ligação (K_b).
- Estimar a provável localização dos FS nas micelas através de estudos de supressão de fluorescência, via constantes de Stern-Volmer (K_{SV}).
- Determinar os parâmetros fotofísicos rendimento quântico de fluorescência e rendimento quântico de oxigênio singlete das moléculas em todos os meios avaliados.
- Avaliar os efeitos fotodinâmicos dos FS sobre microorganismos.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e equipamentos

O corante Rosa de Bengala B foi obtido comercialmente (**RBB**, Neon), e submetido à purificação por recristalização em acetato de Etila (AMAT-GUERRI, 1990). Os reagentes: Iodeto de metila, Brometo de Butila e Brometo de Decila, utilizados para reação de esterificação da RBB foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Os Surfactantes SDS, CTAB and P-123 (Sigma-Aldrich) foram secos, em dessecador a vácuo, durante 24 h antes da pesagem para preparo das soluções. As Soluções estoque dos xantenos ($\sim 1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) foram preparadas em DMSO e padronizados por espectrofotometria de UV-Vis. Todos os solventes utilizados eram de grau analítico e foram usados sem purificação adicional. A água utilizada foi bidestilada.

Exceto para os experimentos de determinação das constantes de ligação (K_b), os demais ensaios em sistemas coloidais foram realizados com a concentração dos surfactantes fixada em um valor acima dos valores de CMC e TMC (P-123), de forma a garantir a existência de micelas numa razão micela/corante maior que 1. As concentrações utilizadas foram: SDS $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (CMC = $1,1 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹), CTAB = $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (CMC = $1,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) (PELLOSI, 2011) e P-123 $1,7 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (CMC = $0,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e TMC = 16 °C, em [P-123] = 1% m/v) (ALEXANDRIDIS, 1994).

Os estudos para avaliação das propriedades fotofísicas foram realizados através de espectroscopia óptica: absorção eletrônica UV-Vis e técnicas de luminescência (fluorescência e fosforescência). As medidas de absorção eletrônica UV-Vis foram realizadas em um espectrofotômetro Beckman Colter DU-800 e as de emissão de fluorescência, anisotropia de fluorescência e de espalhamento de luz ressonante (RLS), em um espectrofluorímetro Varian Cary-Eclipse. Todas as medidas foram realizadas a 30°C, em solução aquosa com o pH = 7,25 controlado por tampão (McIlvaine, [Na₂HPO₄] = [ácido cítrico] = $7,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) e controle da força iônica pela adição de NaCl (0,10 mol L⁻¹). Para os experimentos de absorção eletrônica, a concentração dos

corantes foi $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e para as medidas de fluorescência $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ (absorbâncias menores do que 0,05 para minimizar efeitos de filtro interno) (LAKOWICZ, 2006).

Para avaliar a atividade foto-microbiológica, utilizou-se cepas da bactéria *Staphylococcus aureus* (ATCC 90028). Os materiais utilizados para a preparação e padronização das amostras biológicas foram meio TSA (trypticase soy agar), Caldo TSB (Tryptic soy broth), solução fisiológica peptonada (0,1%) e tampão fosfato salino (TFS) ([fosfato] = $10,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹).

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese dos derivados éster da Rosa de Bengala

A obtenção dos derivados ésteres da RBB com cadeias alquílicas de 1, 4 e 10 carbonos foi feita de acordo com metodologia descrita na literatura (AMAT-GUERRI, 1990). As estruturas dos derivados foram caracterizadas por RMN-H¹ (300 MHz) e RMN-C¹³ (75 MHz), utilizando técnicas de uma dimensão (H simples, C desacoplado e DEPT – 90 e 135) e duas dimensões (COSY e HSQC). As amostras para análise foram preparadas com 20 mg do respectivo composto diluído em 0,75 mL de DMSO-d₆ (Merck). Os espectros foram obtidos num espectrômetro Varian, modelo Mercury plus BB, 300 MHz (H) e 75 MHz (C), utilizando tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

- Síntese da Rosa de Bengala Metil Éster (RBBMET):

Uma massa de 0,500 g da RBB (0,491 mmol) foi solubilizada em uma mistura de 10 mL de acetona (Merck) e 5 mL de dimetil formamida (DMF – Synth). Posteriormente, adicionou-se à mistura 0,0318 g (0,3 mmol) de carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃ -Synth) e 2 equivalentes de iodeto de metila (0,982 mmol; Sigma-Aldrich). A mistura reacional foi mantida sob agitação constante a temperatura ambiente (~ 25 °C), ao abrigo da luz por 24 horas, sendo acompanhada por

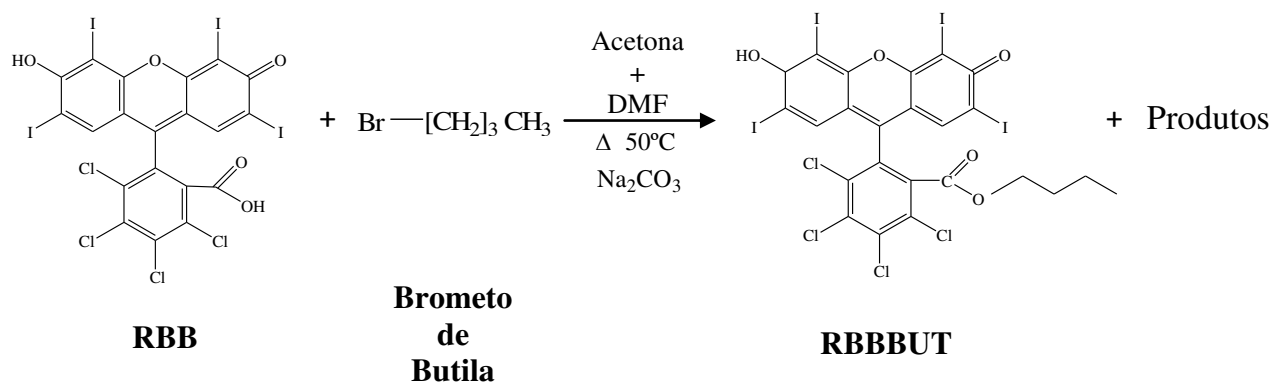


Figura 12: Representação esquemática da reação de esterificação para a obtenção da Rosa de Bengala Butil Éster (RBBBUT).

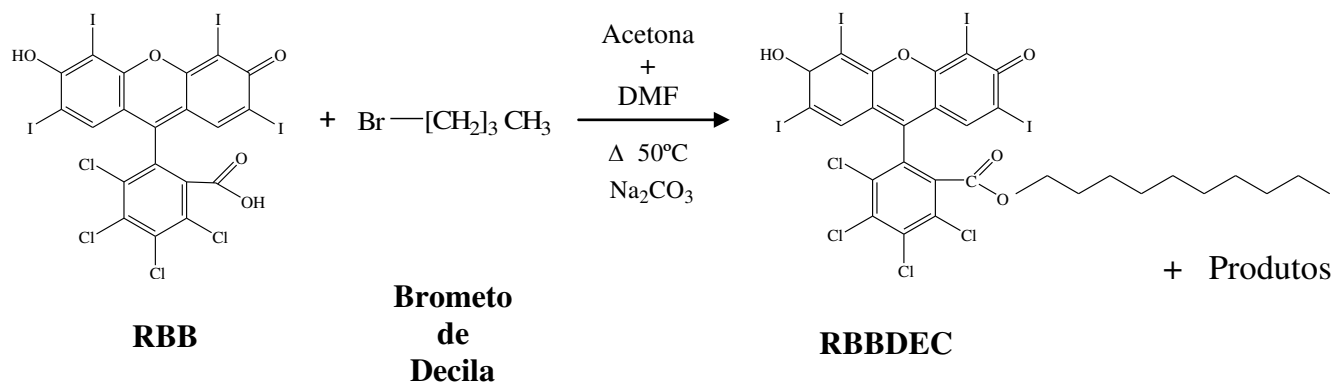


Figura 13: Representação esquemática da reação de esterificação para a obtenção da Rosa de Bengala Decil Éster (RBBDEC).

Os dois sistemas reacionais foram mantidos sob aquecimento a uma temperatura de 50 °C por 48 horas antes de se iniciarem os procedimentos de extração já descritos.

3.2.2 Determinação dos valores de pK_a

Os valores de pK_a dos FS, em soluções aquosas e nos sistemas micelares foram determinados através da análise espectrofotométrica (absorção eletrônica UV-Vis), em soluções dos FS, em diferentes pH, com valores variando entre -1 (fora da escala normal de pH) a 8. As amostras de pH abaixo de 2 foram preparadas a partir de

solução padrão de HCl. O pH das demais amostras foi ajustado pela adição de NaOH ou HCl (concentrado), em meio tamponado (tampão Mcllvaine $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = [\text{Ácido cítrico}] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e medidos num pHmetro Meterlab pHM 240 com eletrodo combinado de vidro tanto para as soluções aquosas quanto para os sistemas micelares. Nos sistemas do surfactante SDS foi utilizado eletrodo modificado com a substituição da solução interna de KCl por NaCl a fim de evitar a precipitação dos íons K^+ com anions SD^- (PREVIDELLO, 2006). Todos os FS foram analisados na concentração de $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Os dados foram tratados por metodologia quimiométrica utilizando análise multivariada conforme descrito na literatura para o sistema protolítico da fluoresceína (MARÇO; SCARMÍNIO, 2007; BATISTELA, 2010).

3.2.3 Determinação do coeficiente de Partição (K_p) dos FS no sistema bifásico água/1-octanol

Adicionou-se o FS ($3,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) em um funil de separação contendo uma mistura água/1-octanol 50% (v/v), a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$). Em seguida, promoveu-se agitação e posterior repouso da mistura, ao abrigo da luz, por 48h. Ao término do período de separação, a concentração dos fotossensibilizadores foi determinada, por espectrofotometria em ambas as fases, sendo os valores de coeficiente de absorvidade molar em octanol determinados na comparação direta com os valores obtidos em etanol. Com os valores da concentração do FS em água ($[\text{FS}]_{\text{water}}$) e em 1-octanol ($[\text{FS}]_{\text{oct}}$), foi determinado o K_p através da equação 1, sendo os valores expressos em Log K_p (PELLOSI, 2012).

$$K_p = \frac{[\text{PS}]_{\text{oct}}}{[\text{PS}]_{\text{água}}} \quad (1)$$

3.2.4 Determinação da constante de Ligação (K_b) dos FS nos sistemas micelares

Os parâmetros da ligação entre os FS e as micelas de surfactante foram mensurados através da emissão de fluorescência dos compostos, excitados em 520 nm, na presença de surfactantes e temperatura fixa em 30°C. Foram preparadas soluções aquosas de cada corante ($5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹) e após cada adição de alíquota conhecida de surfactante, proveniente de uma solução estoque, a amostra era sujeita a agitação intensa e, então, registrava-se um novo espectro. A partir dos dados obtidos na titulação espectrofotométrica (espectros de emissão), foi selecionado o comprimento de onda de máxima emissão ($\lambda_{\text{máx}}$), do qual foram coletado os valores de fluorescência para o ajuste teórico dos pontos experimentais, através da Equação 2 (CAETANO, 1999).

$$F = F_f + \frac{(F_0 - F_f)}{(1/K_b([S] - CMC)^N) + 1} \quad (2)$$

onde F é a intensidade de fluorescência; F_f : emissão do FS ligado ao surfactante; F_0 : emissão do FS na ausência de surfactante; [S]: concentração de surfactante; N: o número de moléculas de surfactantes por molécula de FS e CMC: concentração micelar crítica.

3.2.5 Determinação de variações na anisotropia de fluorescência dos FS nas interações FS-surfactante

A técnica de anisotropia estática de fluorescência foi empregada neste estudo para monitorar a presença de auto-agregados, além de interações específicas entre os FS e as micelas (CAETANO, 2000). As medições da anisotropia estática (r) foram realizados em condições experimentais idênticas às utilizadas para ensaios de constante de ligação (K_b) (Item 3.2.4). A anisotropia estática é definida por:

$$r = \frac{I_{VV} - GI_{VH}}{I_{VV} + 2GI_{VH}} \quad (3) \quad \text{sendo} \quad G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}}$$

onde I_{VV} e I_{VH} são as intensidades de emissão obtidas com o polarizador de excitação orientado na posição vertical e polarizador de emissão orientado, respectivamente, nas posições vertical e horizontal. O Fator de correção G é calculado com o polarizador de excitação na posição horizontal, sendo a resultante das diferentes respostas das intensidades polarizadas vertical e horizontalmente, frente aos monocromadores do espectrofluorímetro (CAETANO, 2000; MAHATA, 2009; LAKOWICZ, 2006).

3.2.6 Estudos de supressão de fluorescência e determinação da Constante de Stern-Volmer (K_{SV})

Soluções dos FS em concentração fixa, igual a $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, em meio aquoso e em sistemas surfactantes, foram tituladas com alíquotas de solução estoque de iodeto de sódio (1×10^{-3} mol L⁻¹), para se avaliar a acessibilidade do supressor hidrossolúvel (I^-) ao fluoróforo ligado ao sistema micelar. Os pontos experimentais foram tomados no intervalo de concentração de I^- iodeto entre $2,49 \times 10^{-3}$ e $3,06 \times 10^{-1}$ mol L⁻¹ e as constantes de Stern-Volmer (K_{SV}) foram calculadas pela Equação 3 (LAKOWICZ, 2006).

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[I^-] \quad (4)$$

onde F_0 é a intensidade de fluorescência na ausência do supressor, F é a intensidade de fluorescência na presença do supressor, $[I^-]$ é a concentração de iodeto e K_{SV} é a constante de Stern-Volmer. O parâmetro K_{SV} corresponde ao coeficiente angular da reta obtida pelo gráfico dos valores experimentais de F_0/F versus $[I^-]$.

3.2.7 Determinação do rendimento quântico de Fluorescência (Φ_f) dos FS

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) dos FS foram investigados em meio homogêneo (água), e em meio micro-heterogêneo dos sistemas surfactantes. A

própria RBB ($5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) foi utilizada como corante padrão (RBB em água $\Phi_F = 0,018$; Fleming, 1976). Todos os FS foram avaliados, nos diferentes meios, a $T = 30^\circ\text{C}$ e $\text{pH} = 7,25$. Os valores foram determinados através da Equação 5.

$$\phi_F = \frac{Abs_{Pad} \cdot F_C \cdot n_{Pad}^2}{Abs_C \cdot F_{Pad} \cdot n_C^2} \cdot \phi_{Pad} \quad (5)$$

onde Abs é intensidade de absorvância; F: área do espectro de fluorescência e, n é índice de refração do meio. Os símbolos subscritos se referem ao padrão (Pad) e ao corante (C).

3.2.8 Determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) dos FS

O rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) dos FS foi determinado em meio homogêneo por um método de quantificação indireta, utilizando o ácido úrico (AU) como substrato para a reação com oxigênio singlete (GEROLA, 2012; RABELLO, 2012). Os FS foram excitados por uma fonte de luz policromática (LED), com comprimento de onda de máxima de emissão $\lambda_{m\acute{a}x} = 518 \text{ nm}$. Os cálculos foram feitos considerando a potência dos LEDs e a sobreposição espectral entre a banda de emissão da luz emitida e a banda de absorção dos FS para estimativa da quantidade de fótons absorvidos (N_{abs} , Equação 6). Na sequência, monitorou-se o decréscimo na concentração de AU pelo decaimento de sua banda de absorção eletrônica em $\lambda_{m\acute{a}x}$, extraindo-se, assim, a constante de velocidade k_1 , através de um ajuste envolvendo usualmente um decaimento monoexponencial (GEROLA, 2012; RABELLO, 2012). Conhecidos esses parâmetros, utilizou-se a Equação 7 para se obter a eficiência fotodinâmica química (γ_{Δ}) e, posteriormente, utilizando a RBB como padrão ($\Phi_F = 0,018$ em água (FLEMING, 1977) e $\Phi_{\Delta} = 0,86$ em etanol (NECKERS, 1989) usou-se a Equação 8 para determinar o $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ dos FS.

$$N_{Abs} = \frac{1}{N_a \cdot h \cdot c} \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P_{(\lambda)} \cdot I_0 (1 - 10^{-bc\epsilon}) \cdot e^{-k_{PB}t} d\lambda dt \quad (6)$$

$$\gamma_{\Delta} = \frac{k_1}{N_{abs}} \quad (7)$$

$$\phi_{\Delta} = \frac{\phi_{\Delta}^{Pad}}{\gamma_{\Delta}^{Pad}} \gamma_{\Delta} \quad (8)$$

Em meio micro heterogêneo, formado pelos sistemas coloidais, por sua vez, o rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) foi determinado pelo decaimento da intensidade de fosforescência do $^1\text{O}_2$ no infravermelho próximo (1270 nm). Os dados foram obtidos utilizando um fluorímetro NIR resolvido no tempo (Edinburgh Analytical Instruments) equipado com LASER Nd:YAG (Continuum Surelite III) $\lambda_{exc} = 532$ nm (pulso ~ 30 ns). Os tempos de vida de oxigênio singlete ($\tau^1\text{O}_2$) foram determinados pela aplicação de ajuste de decaimento exponencial de primeira ordem para a curva de decaimento fosforescente e os valores lançados na Equação 9 (PELLOSI, 2012).

$$\Phi_{\Delta C} = \frac{Abs_P \cdot I_C \tau_p}{Abs_C \cdot I_P \tau_c} \cdot \Phi_{\Delta P} \quad (9)$$

onde I é a área do espectro de emissão do oxigênio singlete; *Abs*: intensidade de absorção do corante em $\lambda_{532 \text{ nm}}$ e τ : tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em cada meio. O padrão utilizado foi o corante rosa de bengala ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2 = 0,75$ em água, pH 7) (GANDIN et al., 1983). As condições experimentais foram pH 7,25; $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$ para controle da força iônica e temperatura ambiente (~ 25 °C). Em todos os ensaios a absorbância dos corantes em 532 nm foi mantida em torno de 0,3. Os estudos foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Maurício S. Baptista, no Laboratório de Processos Induzidos e Interfaces, no Instituto de Química da USP/SP.

3.2.8 Ensaios de foto-atividade sobre microorganismos - *S. Aureus*

Experimentos com bactérias de cultura *Staphylococcus aureus* (ATCC 26923) foram realizados em caldo TSB (Tryptic soy broth). As culturas da bactéria foram estocadas em placa de Petri contendo meio TSA (trypticase soy agar), a temperatura

ambiente. O inóculo concentrado foi calibrado a 10^8 UFC mL⁻¹ (Unidades Formadoras de Colônia por mL) e posteriormente diluído à 5×10^7 UFC mL⁻¹ com solução fisiológica (adaptado de GEROLA, 2011). A solução de inóculo foi adicionada às soluções de FS tamponadas em pH fisiológico (7,25), e deixada em período de incubação durante 30 minutos antes da iluminação, numa concentração final de bactérias igual a 5×10^5 UFC mL⁻¹. O controle positivo foi preparado na mesma proporção, isto é, 50 μ L de inóculo adicionados em 950 μ L de soro fisiológico. A iluminação foi feita através de uma Biotable, construída em nosso laboratório, cuja configuração é apresentada na Figura 14; com porta amostras de 1 mL, equipada com LEDs SMD emitindo com $\lambda_{\text{máx}} = 570$ nm e 1 W de potência. O volume total da amostra (1 mL), foi dividido em duas alíquotas iguais (500 μ L) sendo uma delas iluminada e a outra estocada ao abrigo da luz para verificação de uma eventual atividade do FS no escuro.

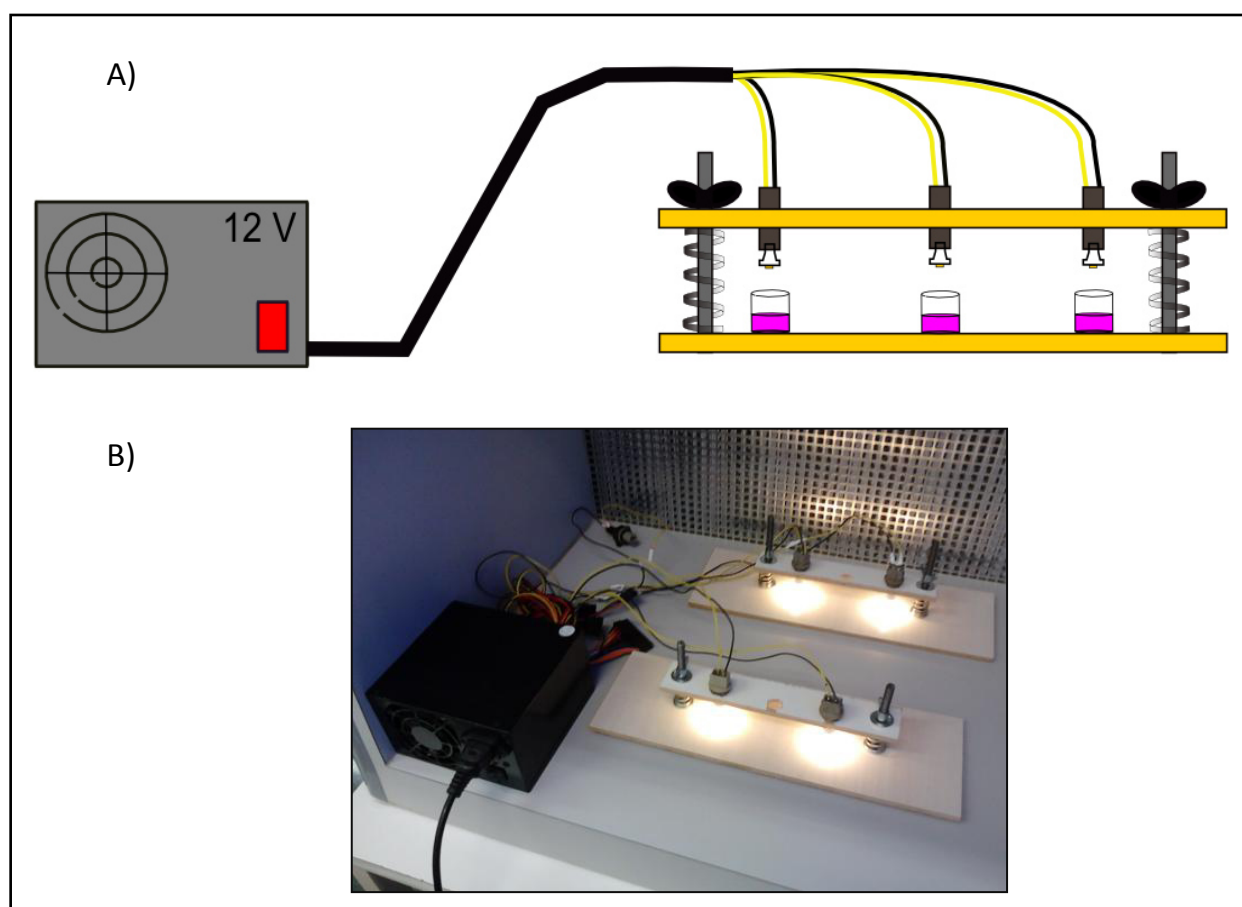


Figura 14: (A) Representação esquemática e (B) fotografia da Biotable equipada com LEDs SMD (1 W de potência, com $\lambda_{\text{máx}} = 570$ nm), porta amostras de 1 mL e com regulagem de altura da interface de iluminação.

As amostras iluminadas e não iluminadas e controle positivo foram transferidas para eppendorfs e diluídas com TSB para 2×10^3 UFC mL⁻¹. Finalmente, 20 µL deste inóculo foram transferidos para placa de Petri contendo TSA e incubados por 24h a 37°C. Em seguida, contou-se o número de UFC para estimar o efeito foto-bactericida. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Os ensaios para avaliação da atividade foto-microbicida foram realizados em três tempos de iluminação e três diferentes concentrações de FS. Os intervalos de tempo de iluminação e de concentração dos experimentos foram escolhidos de acordo com as características dos corantes nos meios avaliados (água e sistema de P-123). Os pontos experimentais das curvas de atividade foto-microbicida foram obtidos pela contagem das UFC presentes nas placas de Petri e submetidas a tratamento matemático para obtenção dos valores D_{90} e Z_{90} que representam, respectivamente, o tempo e a concentração necessários para a inativação de 90% dos microorganismos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização estrutural dos derivados ésteres da Rosa de Bengala

A descrição dos resultados obtidos das análises de RMN será feita com base na numeração oficial da IUPAC para a Rosa de Bengala, conforme ilustrado na Figura 15. Os espectros de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C obtidos a partir dos produtos de síntese são mostrados no Anexo 1.

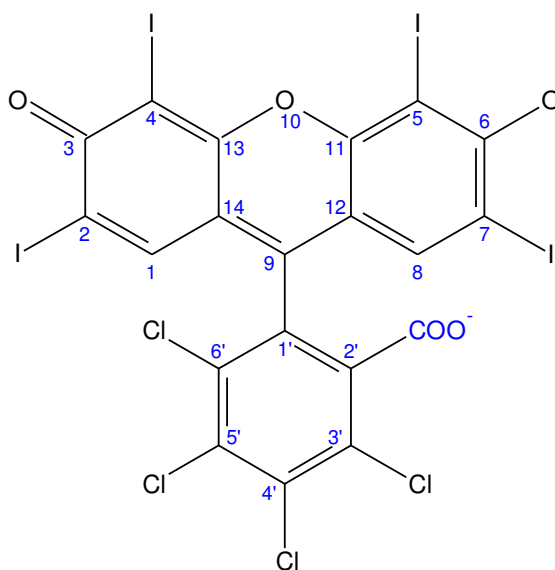


Figura 15: Numeração atômica para a Rosa de bengala B (2,4,5,7-tetraiodo-3,4',5',6'-tetrachlorofluoresceína) segundo a IUPAC.

Os sinais de RMN da Rosa de Bengala (RBB) para referenciar os sinais dos derivados ésteres são apresentados a seguir:

RBB: **RMN - ^1H** (300 MHz; DMSO- d_6): δ 7,33 (s; 2H); **RMN - ^{13}C** (75 MHz DMSO - d_6) δ 75,43; 96,55 e 110,73 (Cl); 127,69; 130,36; 132,71 e 136,93 (CCI); 143,39 e 145,18 (CH); 157,31 (COO); 162,34 (C-O); 171,67 (C=O).

4.1.1 Caracterização da RBBMET

RBBMET: RMN - ¹H (300 MHz; DMSO-d₆): δ 3,463 (s; 3H); δ 7,765 (s; 2H); **RMN - ¹³C** (75 MHz DMSO - d₆) δ 53,337 (OCH₃); 76,851; 96,034 e 114,660 (Cl); 129,059; 131,887; 133,492 e 135,346 (CCI); 137,009 e 139,676 (CH); 156,398 (COO); 163,769 (C-O); 169,594 (C=O). A reação apresentou rendimento de 82% do produto.

Analisando o espectro RMN-H¹ da RBBMET (Anexo 2) é possível observar, na região aromática, que os sinais referentes aos hidrogênios simétricos da porção xantênica (H₁ e H₈) se sobrepõem formando um singlete a δ 7,76 ppm. Essa sobreposição dos sinais é também observada na literatura (AMAT-GUERRI, 1990). Na região alifática têm-se um singlete em δ 3,46 ppm, atribuído a ressonância dos prótons do grupo metóxi.

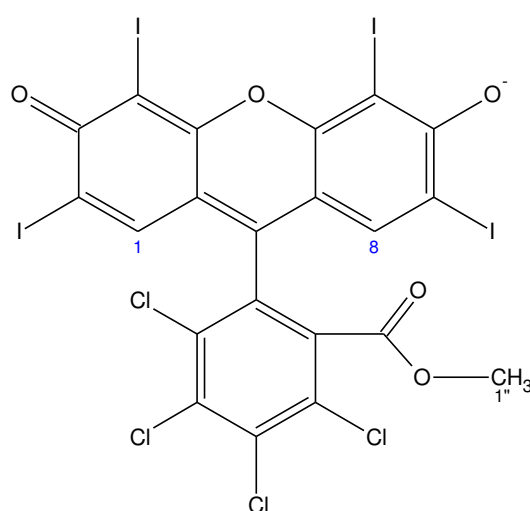


Figura 16: Estrutura molecular e numeração atômica para a RBBMET.

Tabela 2: Dados de Ressonância Magnética Nuclear em DMSO-d₆ da RBBMET.

RMN ¹ H δ	HSQC	COSY	Atribuição
3,46 (s, 3H)	53,34	-	O-CH ₃ (1'')
7,76 (s, 2H)	137,9; 137,0	-	CH (1) e CH (8)

4.1.2 Caracterização da RBBBUT

RBBBUT: **RMN - ^1H** (300 MHz; DMSO- d_6): δ 0,64 (t; 3H); δ 0,89 (m; 2H); 1,06 (m; 2H); 3,92 (t; 2H); 7,75 (s; 2H); **RMN - ^{13}C** (75 MHz DMSO - d_6): δ 13,59 (CH_3); δ 18,41; 30,71 e 66,08 (CH_2); 76,70; 96,29 e 112,43 (Cl); 118,65; 133,63; 134,69 e 135,21 (C-Cl); 136,94 e 139,60 (CH); 156,46 (C-O); 158,42 (COO); 174,12 (C=O). O rendimento da reação foi de 79% do produto.

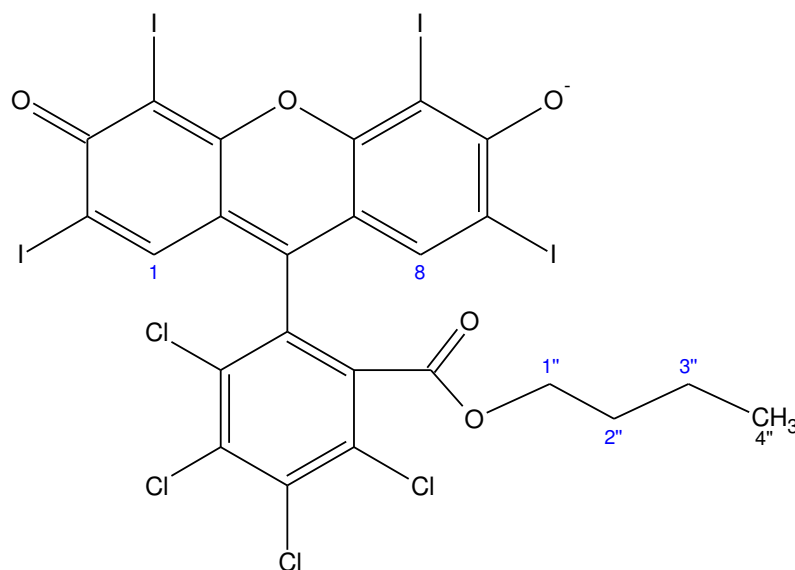


Figura 17: Estrutura molecular e numeração atômica para a RBBBUT.

O espectro RMN- H^1 da RBBBUT apresenta o sinal sobreposto dos hidrogênios simétricos da porção xantênica (1 e 8) em δ 7,75 ppm, que é praticamente o mesmo valor observado para RBBMET. Na região alifática, por sua vez, é possível observar quatro sinais: um tripleto em δ 0,64 ppm, um sexteto em δ 0,88 ppm, um sexteto em δ 1,06 e um tripleto em δ 3,92 ppm que caracteriza a ligação do metileno ao carboxilato. Os sinais de correlação HSQC que caracterizam a estrutura na região alifática da molécula são observados em δ 13,58 ppm referente ao CH_3 , δ 18,41 e 29,78 ppm identificando dois grupos CH_2 e δ 66,08 ppm caracterizando a presença do grupo O- CH_2 . O sinal de correlação para os dois grupos CH da porção xantênica é visto

em δ 137,0 ppm . A Tabela 3 reúne todos os dados referentes à análise de RMN da RBBBUT.

Tabela 3: Dados de Ressonância Magnética Nuclear em DMSO-d₆ da RBBBUT.

RMN ¹ H δ	HSQC	COSY	Atribuição
0,64 (t, 3H)	13,58	0,88	CH ₃ (4'')
0,88 (m, 2H)	18,41	1,06; 0,637	CH ₂ (3'')
1,06 (m, 2H)	29,78	1,05; 3,92	CH ₂ (2'')
3,92 (t, 2H)	66,08	1,06	O-CH ₂ (1'')
7,75 (s, 2H)	137,0	-	CH (1) e CH (8)

4.1.3 Caracterização da RBBDEC

RBBDEC: RMN - ¹H (300 MHz; DMSO-d₆): δ 0,86 (m; 5H); 1,06 (m; 4H); 1,24 (m; 10H); 3,92 (t; 2H); 7,53 (s; 2H); RMN - ¹³C (75 MHz DMSO - d₆): δ 14,03 (CH₃); 22,15; 27,66; 28,54; 28,65; 28,74; 28,91; 29,01; 31,35 e 66,17 (CH₂); 76,24; 96,97 e 111,53 (Cl); 128,78; 133,70; 134,45 e 134,99 (C-Cl); 136,372 e 139,391 (CH); 156,82 (C-O); 163,21 (COO); 171,14 (C=O). O rendimento da reação foi de 75% do produto puro.

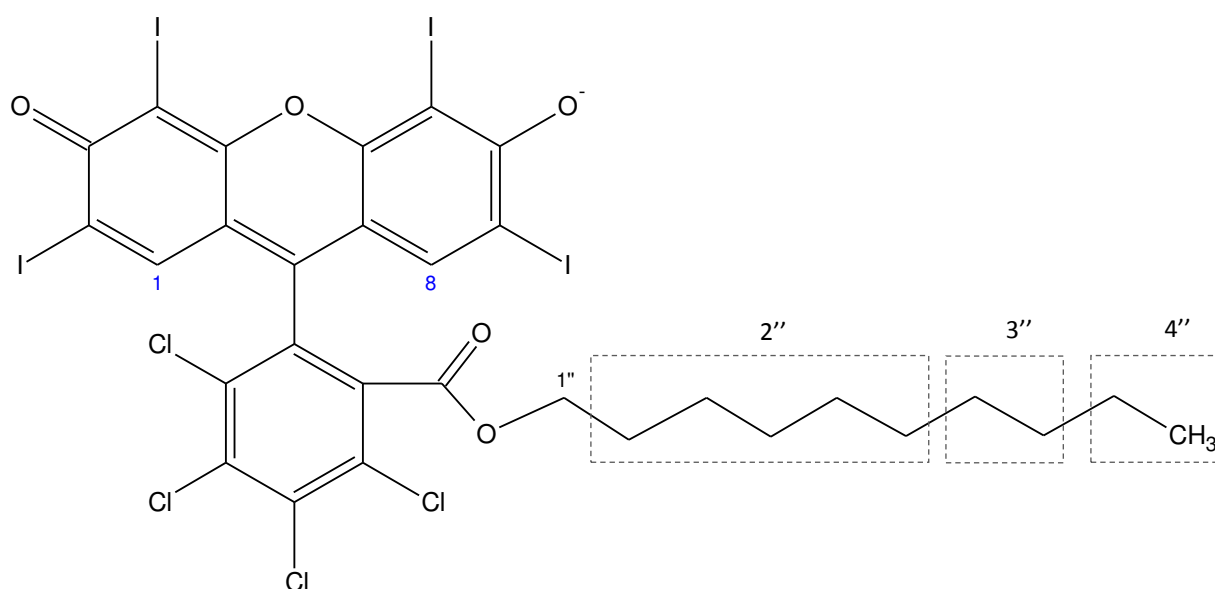


Figura 18: Estrutura molecular e numeração atômica para a RBBDEC.

O espectro RMN- ^1H obtido para RBBDEC apresenta um sinal que caracteriza os hidrogênios ligados aos carbonos C9 e C10 da cadeia alquílica em δ 0,86 ppm, um sinal para os hidrogênios dos grupos metileno ($-\text{CH}_2-$) C7 e C8 em δ 1,06 ppm e um outro sinal na região alifática, em forma de multipletto secundário em δ 1,24 ppm, referente a ressonância dos prótons dos grupos metileno C2 a C7. O sinal que caracteriza o metileno da ligação éster ($\text{O}-\text{CH}_2$) aparece como um tripleto em δ 3,92 ppm. Os hidrogênios da porção xantênica são caracterizados por um sinal sobreposto em δ 7,53 ppm, levemente deslocado em comparação com os outros ésteres, de cadeia menor (δ 7,75 ppm).

No RMN- ^{13}C os carbonos da cauda alifática são observados em campo alto, de δ 14,03 a 31,34 ppm e confirmados pela inversão de fase dos picos de CH_2 através do DEPT-135 (FREEMAN, 1997; BERGER, 2004). O sinal em δ 66,16 ppm é característico do grupo OCH_2 . Na Tabela 4 são apresentados os dados de RMN referentes à caracterização da RBBDEC.

Tabela 4: Dados de Ressonância Magnética Nuclear em DMSO- d_6 da RBBDEC.

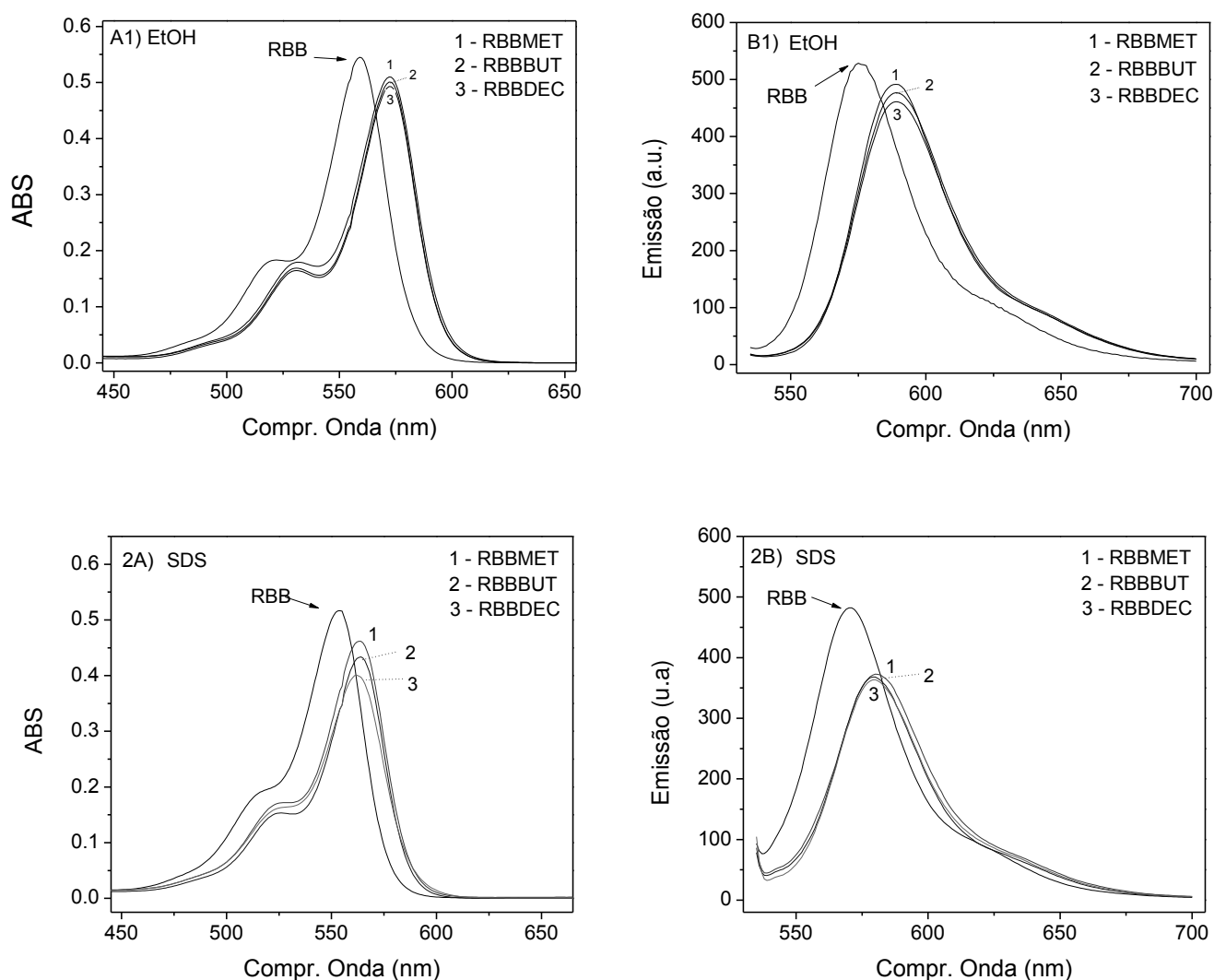
RMN ^1H δ	HSQC	COSY	Atribuição
0,86 (m, 5H)	14,03 ; 24,99	1,05	CH_2-CH_3 (4'')
1,05 (m, 4H)	28,90	0,86; 1,24	2 (CH_2) (3'')
1,24 (m, 10H)	22,13; 25,76; 28,65; 31,32	1,05; 3,92	5 (CH_2) (2'')
3,92 (t, 2H)	66,17	1,24	$\text{O}-\text{CH}_2$ (1'')
7,53 (s, 2H)	136,37	-	CH (1) e CH (8)

Os sinais de RMN de ^{13}C dos derivados ésteres apresentam pequenas variações em relação ao reagente de partida (RBB), mantendo-se, no entanto, na mesma faixa de deslocamento químico característica de cada ligação e com boa correlação com a caracterização descrita na literatura para a RBB (AMAT-GUERRI, 1990). Dessa forma,

os procedimentos de síntese para a obtenção dos derivados ésteres se mostraram reprodutíveis e apresentaram rendimentos satisfatórios.

4.2 Estudos espectroscópicos dos FS: Caracterização dos perfis de absorção eletrônica UV-Vis e de emissão de Fluorescência

A caracterização físico-química dos derivados ésteres da RBB foi feita em meio homogêneo (etanol) e em meio micro-heterogêneo formado pela solução aquosa dos surfactantes SDS, CTAB e Plurônico® P-123 (Figuras 9 e 10) em pH fisiológico (7,25) e $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para controle da força iônica. Os espectros de absorção eletrônica e de emissão de fluorescência dos FS são ilustrados na Figura 19, nas colunas A e B, respectivamente.



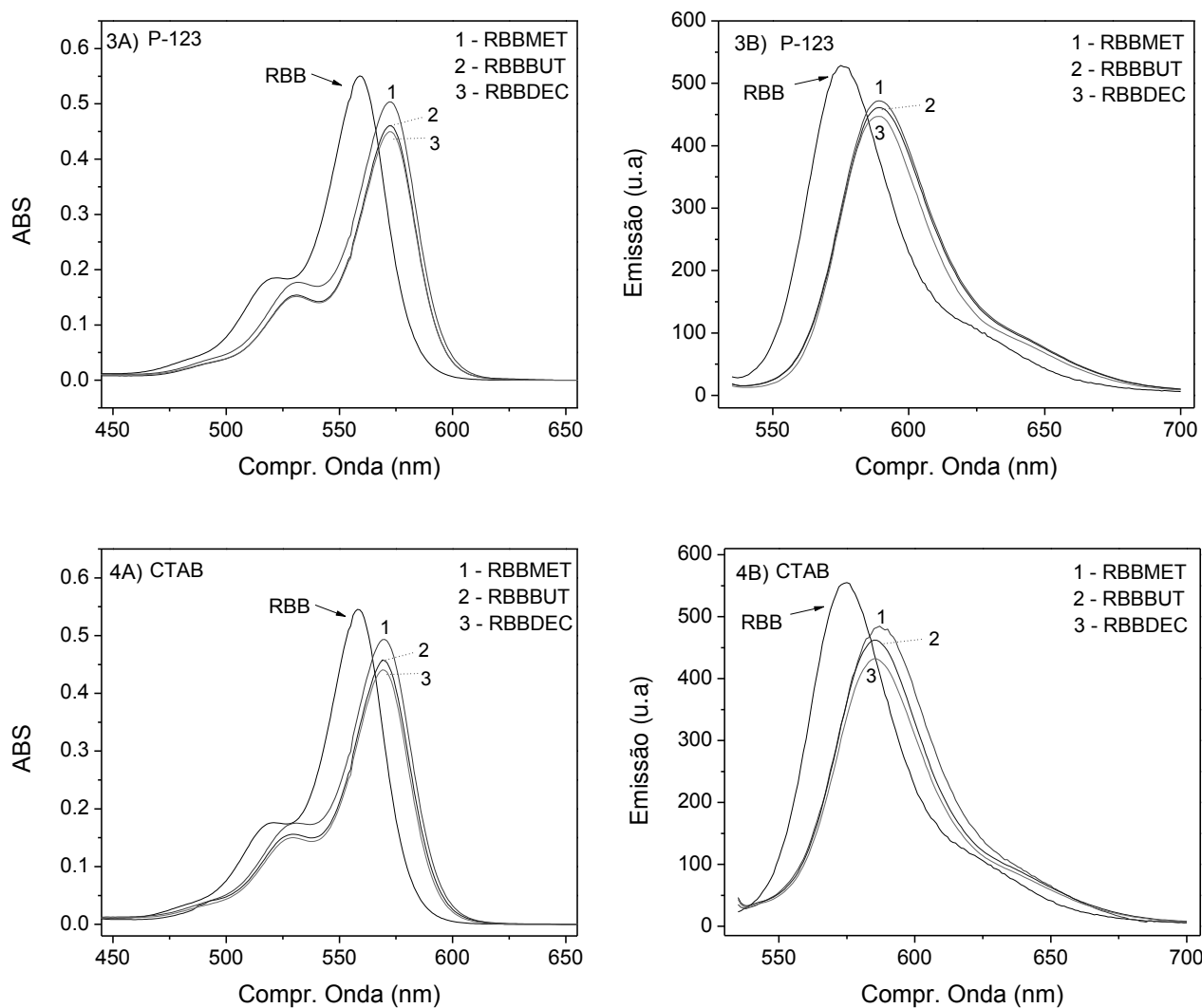


Figura 19: Espectros dos FS xantenos em (1) etanol, (2) SDS, (3) P-123 e (4) CTAB: (A) absorção ($[FS] = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e (B) emissão de fluorescência ($[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) a 30°C . **RBB** ($\lambda_{\text{exc}} = 490 \text{ nm}$); **ésteres** ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) para todos os corantes (10/10, nm/nm).

Os perfis de absorção eletrônica são similares para todos os xantenos, com um banda intensa associada a transição $S_0 - S_1$ e um ombro menor correspondente a transição $S_0 - S_2$ (FLEMING, 1977). Entretanto, os derivados ésteres apresentaram um deslocamento ($\sim 10 \text{ nm}$) para a região do vermelho o que, do ponto de vista da TFD, representa vantagens para utilização dos corantes como fotossensibilizadores, por aproximar sua absorção eletrônica ao intervalo relativo à janela foto-terapêutica (MACHADO, 2000). Esse deslocamento batocrômico é atribuído à diferença nos padrões de estabilização energética resultantes da perda de ligações de hidrogênio da

molécula, que ocorrem com a esterificação do carboxilato (MARTIN, 1975; ZHANG, 2008). O efeito das ligações de hidrogênio sobre as transições energéticas é ilustrado na Figura 20.

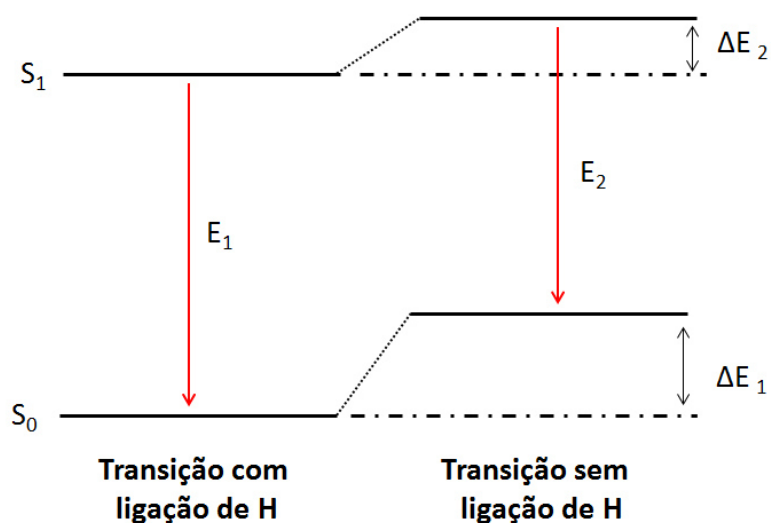


Figura 20: Diagrama de energia com efeito de estabilização dos níveis energéticos pela presença de ligações de hidrogênio para corantes xantênicos. (Adaptado de MARTIN, 1976)

Ligações de hidrogênio estabilizam mais o estado fundamental (S₀) que o primeiro estado excitado (S₁), sendo que a perda ou ausência das mesmas faz com que a diferença de energia no estado fundamental seja maior que a diferença de energia no estado excitado ($\Delta E_1 > \Delta E_2$). Com isso, a energia de transição (S₁ - S₀) na ausência das ligações de hidrogênio é menor ($E_2 > E_1$), resultando em emissões batocrômicas (deslocadas para o vermelho) (MARTIN, 1975; Idem, 1976).

Os comprimentos de onda de máxima absorção e os coeficientes de absorvidade molar (λ_{max} , $\epsilon_{\lambda_{\text{max}}}$) para os derivados ésteres foram determinados em etanol através da Lei de Beer (Figura 21) (RUIFROK; JOHNSTON, 2001; VALEUR, 2002), sendo: **RBBMET** (565 nm, $109 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); **RBBBUT** (564 nm, $100 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$); **RBBDEC** (564 nm, $100 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os valores para **RBB** foram obtidos da literatura: 543 nm, $109 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, em água (BATISTELA, 2011).

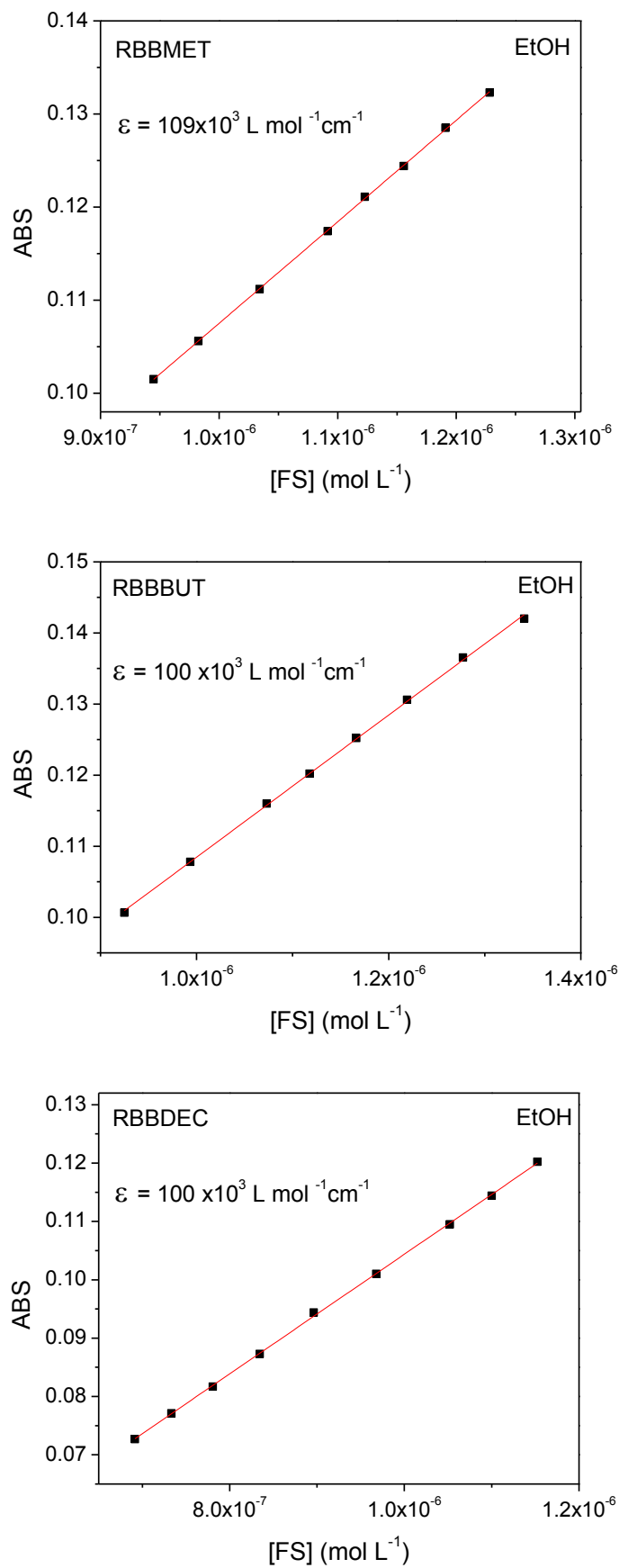
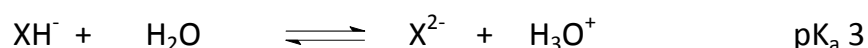
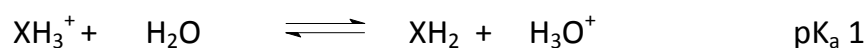


Figura 21: Gráficos de Absorbância *versus* concentração de FS, em etanol a 30°C, utilizados para determinação dos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) dos FS.

Embora os derivados ésteres mantenham o mesmo padrão da RBB, apresentando elevados valores de absorvidade molar (ϵ), os corantes pertencentes a classe dos xantenos tem sua absorção prejudicada pela formação de auto agregados (PACZKOWSKI, 1985). A literatura reporta a intensa formação de autoagregados da RBB em concentrações maiores que $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, provocando mudanças significativas tanto no espectro de absorção eletrônica como no de emissão de fluorescência (VALDES; NECKERS, 1988). Os derivados ésteres, por sua vez, são mais susceptíveis à formação de auto-agregados em função da hidrofobicidade gerada pela cauda alquílica. A RBBDEC, por exemplo, apresenta os primeiros indícios de auto-agregação em etanol a partir de concentrações maiores que $1,2 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

4.3 Determinação dos valores de pKa

Analisando a estrutura da RBB (Figura 6), percebe-se dois grupos ionizáveis fenóis no anel xantênico e um grupo carboxílico ligado ao anel benzênico. Dessa forma, os equilíbrios protolíticos podem ser sistematizados como segue:



onde XH_3^+ refere-se ao xanteno na forma catiônica, XH_2 na forma neutra, XH^- na forma monoaniônica e X^{2-} a forma dianiônica. Assim, os xantenos possuem quatro formas protolíticas (Figura 6) e, conseqüentemente 3 valores de pK_a . No entanto, o equilíbrio entre a formas neutra e catiônica se dá, em meio aquoso, em pH próximo a -2,0 (escala de Hammett). Como o presente estudo objetiva, a princípio, aplicações em pH fisiológico (7,25), essa região de elevada acidez não foi monitorada. Os demais equilíbrios protolíticos e tautoméricos foram avaliados em meio aquoso e nos sistemas micelares. A literatura também reporta que xantenos com a presença de elementos halogênios ligados diretamente no anel xantênico ou mesmo no anel benzênico, que é

o caso da RBB, tendem a ter um caráter mais ácido em comparação à fluoresceína e estão sujeitos a inversão na acidez dos grupos protolíticos em função de fenômenos oriundos dos equilíbrios tautoméricos da forma neutra (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1992; Idem, 1999; Idem, 2003).

4.3.1 Determinação dos valores de pK_a em tampão aquoso

Devido a sua alta hidrofobicidade e decorrente processo de auto-agregação em meio aquoso, os corantes RBBUT e RBBDEC não foram avaliados neste meio. Para RBB e RBBMET observa-se um aumento gradativo de intensidade em seu espectro de absorção à medida que se promove o aumento do pH da solução. As variações espectrais para esses dois corantes são mostradas na Figura 22.

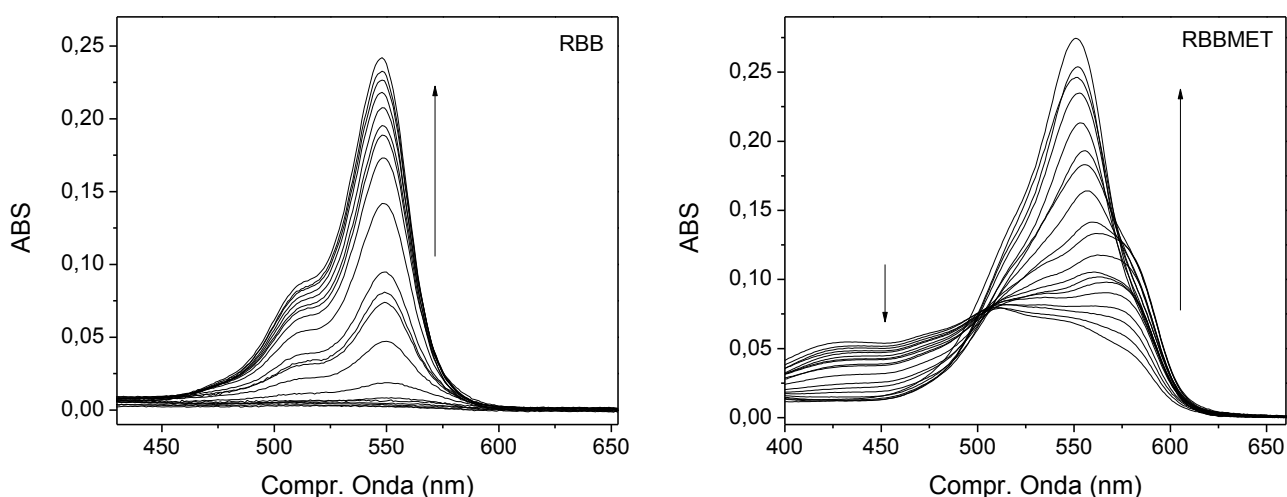


Figura 22: Espectros de absorção da RBB e RBBMET em tampão aquoso, em diversos pH (0,0-8,0), $[FS] = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$. As setas indicam a variação espectral conforme se aumenta o valor do pH da solução.

É perceptível, pela observação da Figura 22, que apesar da RBBMET perder um de seus grupos protonáveis pela esterificação do carboxilato, existe uma similaridade muito grande na variação de intensidade de absorção eletrônica, em comparação com o espectro da RBB. O perfil espectral e até mesmo o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{m\acute{a}x}$), ao término da titulação (pH~ 8), foram praticamente iguais para ambos os corantes, com apenas um pequeno deslocamento ($\Delta\lambda_{m\acute{a}x} = 3 \text{ nm}$). Tal

similaridade se deve ao fato de que as variações na intensidade de absorção eletrônica estão ligadas, principalmente, com a protonação/desprotonação do grupo fenólico no anel xantênico, que atua como grupo cromóforico dessa classe de corante. Assim, não se tem perfis espectrais idênticos para as duas espécies, porque mesmo não havendo sobreposição dos orbitais da porção xantênica com os orbitais da porção benzênica, a variação do estado de protonação do grupo carboxílico exerce influência no processo de absorção/emissão dos xantenos, resultante da transferência intramolecular fotoinduzida de elétrons entre as duas porções (UENO, 2004).

A tentativa de calcular as constantes de acidez da RBB baseando-se em um único comprimento de onda analítico (análise univariada) foi ineficiente. Utilizando-se o método das derivadas, onde o ponto de inflexão da curva de titulação é determinado pelo ponto de máximo da primeira derivada da referida curva, obtemos um único valor de pKa (3,63), conforme pode ser visto na Figura 23.

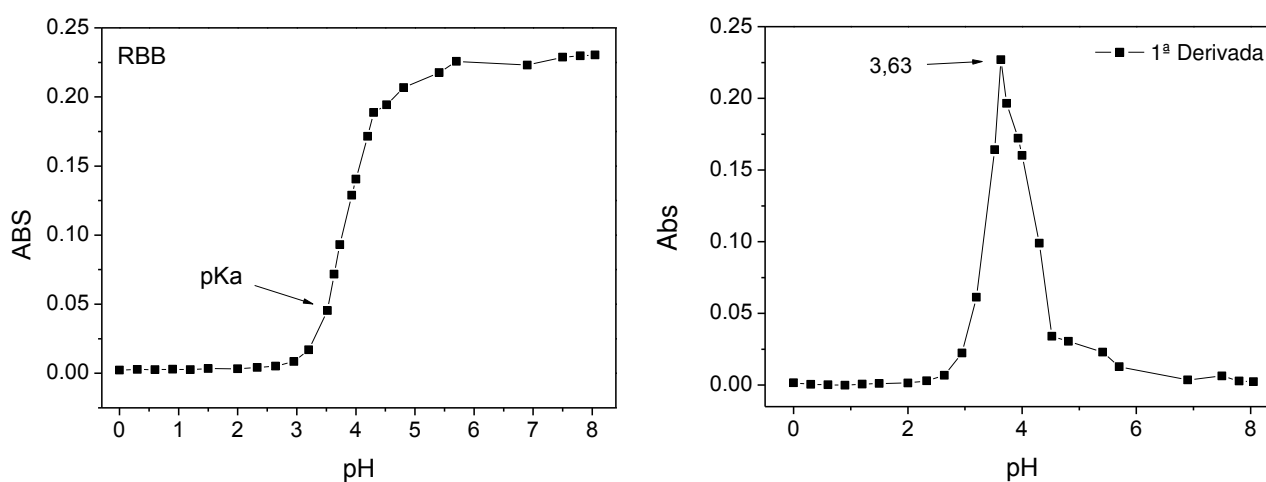


Figura 23: (A) Curva de titulação espectrofotométrica da RBB, por análise univariada. Comprimento de onda analítico $\lambda_{\text{anal}} = 550 \text{ nm}$. (B) Primeira derivada da curva de titulação.

Entretanto, a RBB possui dois equilíbrios de protonação no intervalo de pH avaliado, e, portanto, dois valores de pKa. A análise univariada não consegue constatar os dois valores de pKa por que o efeito da protonação/desprotonação do grupo carboxílico no espectro de absorção, além de ser menor, fica mascarado pelo efeito de protonação/desprotonação do grupo fenol do anel xantênico, em virtude da forte sobreposição espectral (UV-Vis) entre as duas espécies (BATISTELA, 2011). Portanto, a

determinação dos pKa pela forma tradicional univariada de análise dos dados espectrofotométricos não é adequada para este sistema, pois todos os espectros obtidos são típicos da espécie dianiônica (ZHANG, 2010) levando a interpretações errôneas sobre os valores de pKa.

Optou-se, assim, pela utilização de metodologias quimiométricas de análise multivariada (MARÇO; SCARMÍNIO, 2007), mais adequadas para sistemas complexos como é o caso da RBB. Nesta categoria de análise, são considerados todos os comprimentos de onda do intervalo espectral. A vantagem da análise multivariada consiste em considerar a contribuição de cada espécie em cada comprimento de onda, maximizando a qualidade das informações espectrais em cada pH, gerando assim, valores de pKa mais confiáveis. A partir das análises quimiométricas obtiveram-se as curvas das concentrações relativas de cada espécie protolítica de acordo com as variações de pH, como ilustrado na Figura 24.

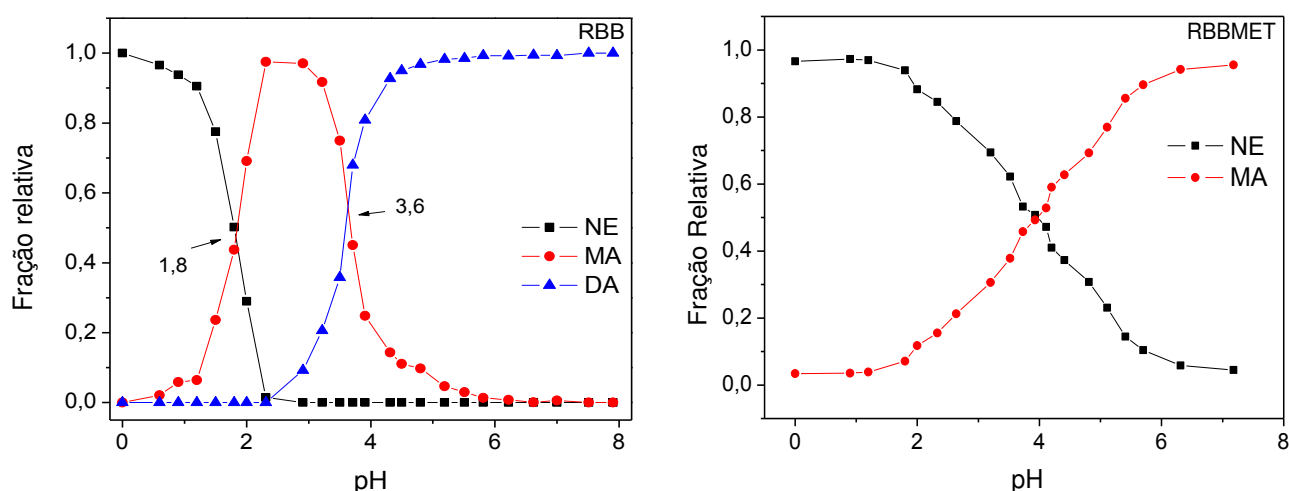


Figura 24: Curvas de concentração relativa de cada espécie protolítica em diversos pHs para RBB e RBBMET obtidas a partir da análise quimiométrica multivariada.

Os valores de pKa obtidos para os corantes em água, são apresentados na Tabela 5. O valor de pKa da RBBMET se referem ao grupo fenol do anel xantênico, uma vez que este é o único equilíbrio protolítico da molécula no intervalo de pH avaliado. Como a RBB apresenta dois grupos protolíticos, os dois valores de pKa obtidos foram atribuídos para carboxilato e fenolato, respectivamente, a partir da comparação direta

com a RBBMET, onde o valor de concordância entre os corantes foi atribuído ao pKa do grupo fenol da RBB (pK_{aOH}) e, conseqüentemente, o outro valor de pKa encontrado foi atribuído ao grupo carboxílico (pK_{aCOOH}).

Tabela 5: Valores de pKa dos derivados xantênicos obtidos por quimiometria e os valores do coeficiente de absorvidade molar das espécies protolíticas nos comprimentos de onda de máxima absorção (λ_{max}), obtidos através do método da Matriz-K (Sena, 2000).

FS	pKa	Forma protolítica	λ_{max} (nm)	ϵ ($10^3 L mol^{-1} cm^{-1}$)
RBB	pK_{aCOOH}	Neutra	---	---
		Monoaniônica	546	3,7
	pK_{aOH}	Dianiônica	549	28,2
RBBMET	pK_{aOH}	Neutra	500	7,5
		Monoaniônica	552	29,2

Os resultados para RBB são muito próximos aos descritos na literatura: $pK_{aCOOH}=1,9$ e $pK_{aOH} = 3,9$ (BATISTELA, 2011). Adicionalmente, utilizando o método da Matriz-K (Sena, 2000), pôde-se obter os espectros estimados das espécies puras para estes FS, conforme ilustrado na Figura 25. Também foi possível estimar os valores da absorvidade molar (ϵ) de cada espécie protolítica em seu comprimento de onda de máxima absorção (Tabela 5).

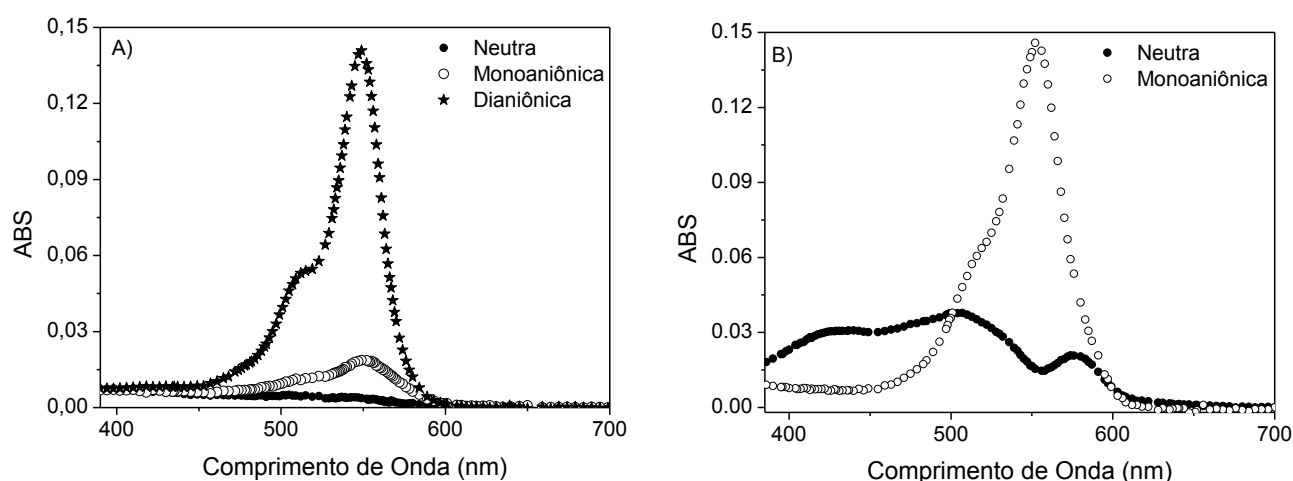
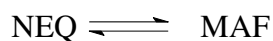


Figura 25: Espectros das espécies puras da RBB e RBBMET obtidos em água pelo método da matriz-K (SENA, 2000)

Para RBBMET, assim como para os outros derivados ésteres, os equilíbrios tautoméricos são simplificados, não havendo a possibilidade de ocorrerem às formas protolíticas NEZ, MAC e DA, que ocorrem para a RBB (Figura 6). Assim, no intervalo de pH de interesse, o equilíbrio a ser monitorado para os derivados ésteres é o seguinte:



Devido à similaridade entre os perfis espectrais das formas monoaniônicas da RBB e RBBMET pode-se inferir que a forma neutra presente seja a NEQ. Esta espécie é mais polar e favorecida em ambiente aquoso, em relação a NEL (BATISTELA, 2010).

Para a RBB o pKa do grupo carboxílico ($\text{pK}_{\text{a-COOH}}$) é mais ácido que o do grupo fenol ($\text{pK}_{\text{a-OH}}$), assim os equilíbrios podem ser resumidos da seguinte forma:

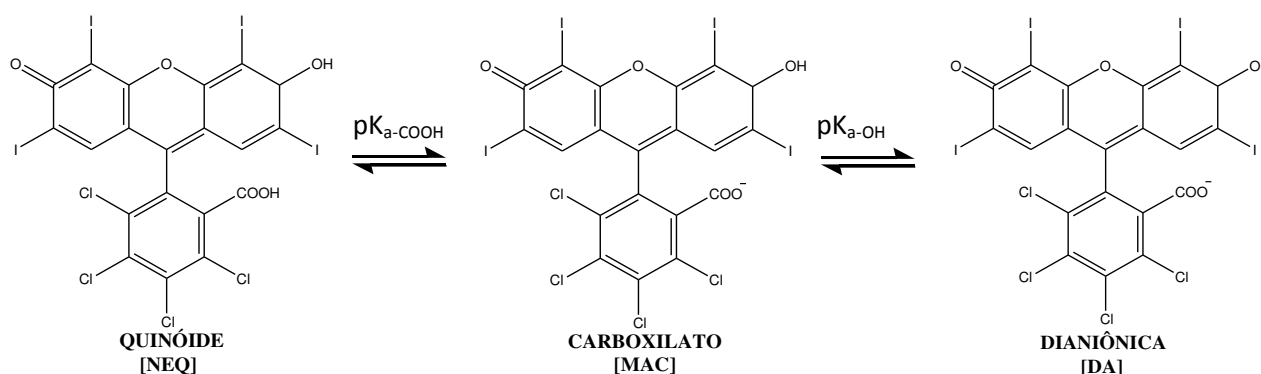


Figura 26: Equilíbrios protolíticos propostos para a RBB, no intervalo de pH avaliado (0-8).

Dessa forma, o tratamento quimiométrico mostrou-se eficaz na determinação de pKas de sistemas protolíticos complexos. Por estas vantagens, a metodologia quimiométrica foi empregada em todas as demais análises de pKas realizadas neste trabalho.

4.3.2 Determinação dos valores de pK_{a} dos FS xantênicos em meio micelar

Com a obtenção dos valores de pK_{a} dos FS em meio micro-heterogêneo e posterior cálculo do deslocamento ($\Delta\text{pK}_{\text{a}} = \text{pK}_{\text{a-mh}} - \text{pK}_{\text{a-água}}$) é possível avaliar a acessibilidade relativa dos FS à protonação, em função do potencial de superfície

micelar, possibilitando, desta forma, estimar relativamente a localização do FS no ambiente micelar (CAETANO, 1999; Idem, 2000). Por exemplo, para drogas aniônicas um valor negativo de ΔpK_a (observado principalmente em sistemas micelares catiônicos em relação a surfactantes zwitteriônicos, não iônicos e aniônicos) significa que o FS provavelmente está alocado num micro-ambiente com menor acessibilidade aos prótons, próxima à interface, estabilizado majoritariamente por interações coulombicas. Assim, é necessária um acréscimo na concentração de H^+ no meio micro-heterogêneo, para que o prótons vençam a repulsão eletrostática da camada de Stern e alcancem o FS encapsulado na micela, levando ao equilíbrio entre as espécies e resultando em um pK_a aparente (pK_{a-AP}) de menor valor. Por outro lado, um ΔpK_a positivo é indicativo que os prótons têm maior acesso relativo aos FS (CAETANO, 1999; PREVIDELLO, 2006).

A modificação estrutural realizada na RBB, pela introdução da cadeia alquílica no grupo carboxilato da porção benzênica, aumentou a hidrofobicidade dos seus derivados, conferindo-lhes maior tendência ao processo de auto-agregação em meio aquoso. É conhecido que compostos no estado agregado tem suas propriedades físico-químicas alteradas, inclusive com a diminuição da formação de oxigênio singlete (AVELINE et al, 1995). O uso de sistemas micelares surfactantes fornece um microambiente químico favorável para que corantes e outros compostos hidrofóbicos permaneçam em seu estado desagregado, após a solubilização (JACOBS, 1973; YAGUI, 2005; BAGHA, 2013;). Em virtude dessa eficiência de solubilização foi possível avaliar o pK_a de todos os derivados ésteres em meio micelar aquoso, inclusive com a avaliação do efeito de carga do grupo cabeça polar do surfactante na modulação da interação FS/micela (CAETANO, 1999).

4.3.2.1 Determinação dos valores de pK_a em micelas de SDS

O primeiro sistema micelar avaliado foi o aniônico. Por possuir um potencial eletrostático de superfície negativo, as micelas SDS apresentam repulsão no processo

de associação com os corantes xantênicos. As mudanças espectrais com a variação de pH para os FS xantênicos, avaliados na presença de micelas de SDS, são ilustradas na Figura 27.

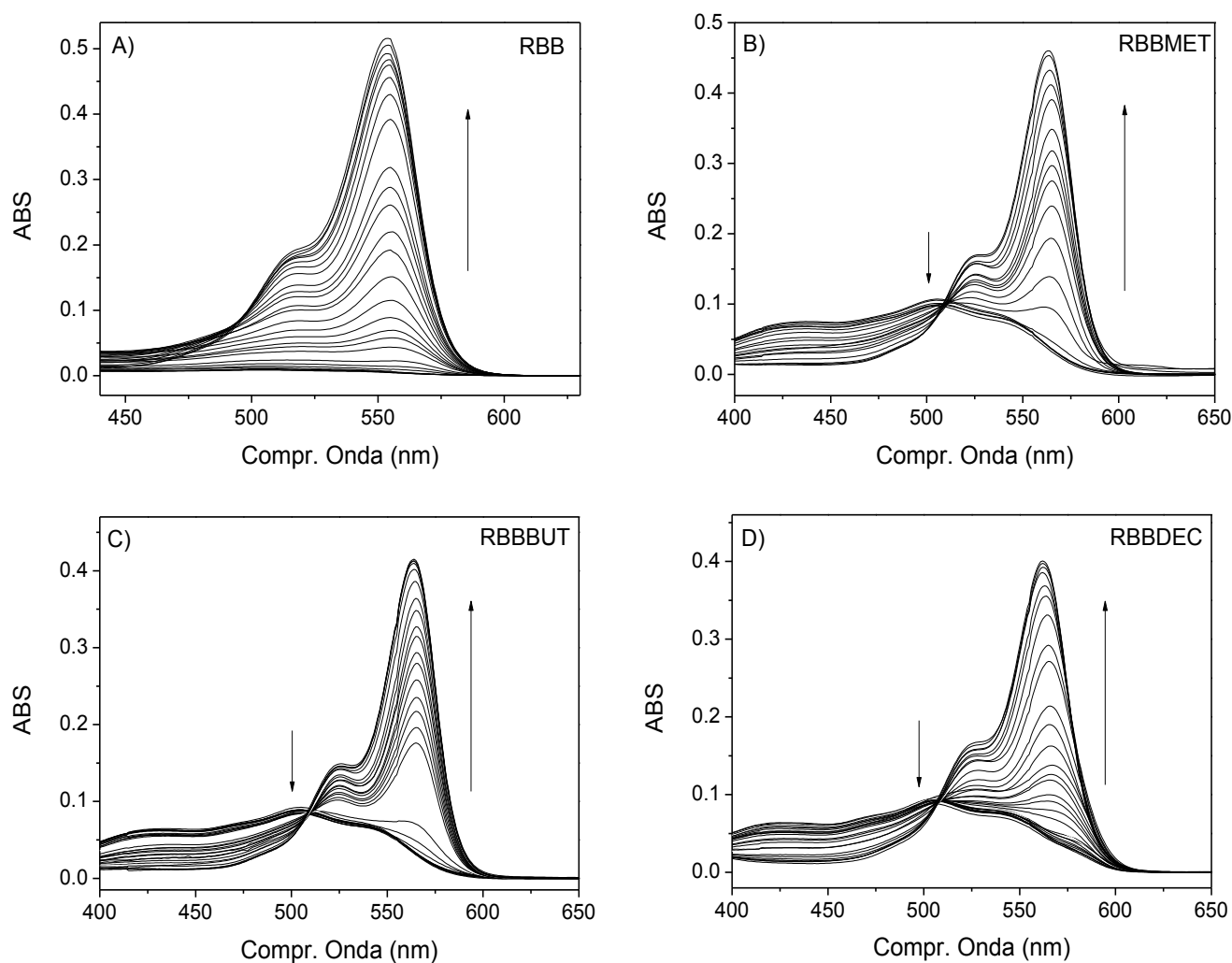


Figura 27: Espectros de absorção dos FS xantênicos em meio aquoso micelar de SDS, obtidos em diferentes pHs. $[FS]=5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[NaCl]=0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 30°C .

As curvas das frações relativas das espécies protolíticas dos FS como uma função da variação de pH em SDS foram geradas por simulação computacional usando metodologia quimiométrica, através do Software MASDA e são exemplificadas na Figura 28 (PEREIRA et al, 2014).

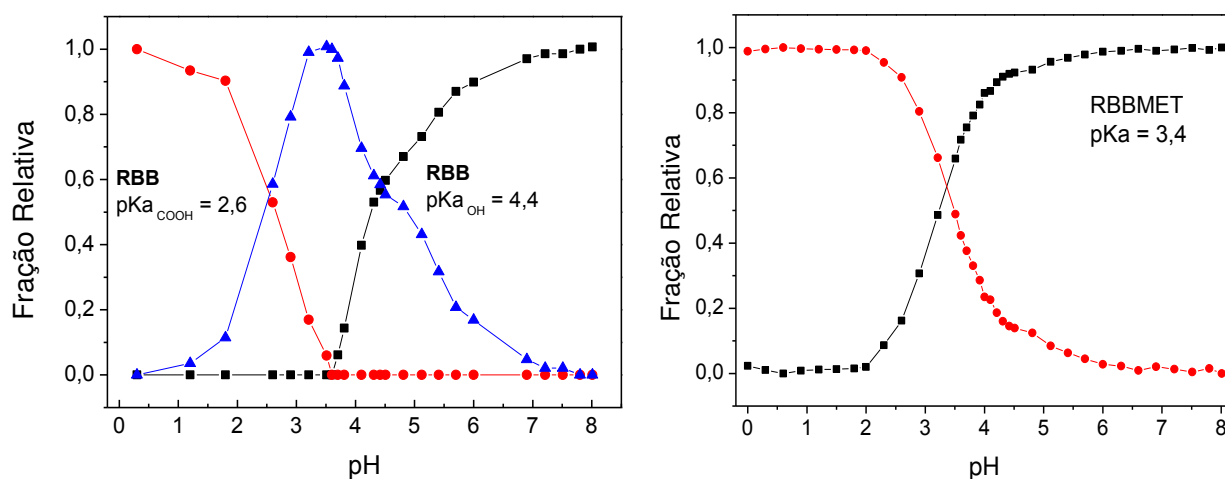


Figura 28: Curvas de pK_a para os FS xantênicos em SDS. Curvas geradas por metodologia quimiométrica através do software MASDA.

Os valores de pK_a medidos em SDS e os deslocamentos calculados a partir dos valores de referência, medidos em água, são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de pK_a dos derivados xantênicos medidos em SDS, valores de referência ($pK_{a-água}$) e valores calculados de ΔpK_a .

FS	pK_a	$pK_{a-água}$	ΔpK_a^{**}
RBB	pK_{a-COOH}	$2,6 \pm 0,1$	1,8
	pK_{a-OH}	$4,4 \pm 0,1$	3,6
RBBMET	pK_{a-COOH}	$3,4 \pm 0,1$	4,0
RBBBUT	pK_{a-COOH}	$3,4 \pm 0,1$	4,0*
RBBDEC	pK_{a-COOH}	$3,9 \pm 0,1$	4,0*

* O pK_a da RBBMET em água ($pK_a = 4,0$), foi usado como referência para RBBBUT e RBBDEC.

** ($\Delta pK_a = pK_{a-mh} - pK_{a-água}$)

A variação ou deslocamento no valor do pK_a (ΔpK_a) dos FS em sistemas micelares ocorre, exatamente, em função da presença das micelas, que formam uma microfase com características físicas diferentes (microambiente) das encontradas no seio da solução (bulk de água). No caso de micelas formadas por surfactantes iônicos, além da diferença de polaridade no interior da micela (ambiente hidrofóbico), a interface carregada formada pelos grupos cabeça polar do surfactante interfere na atividade e distribuição dos prótons H^+ . Como esses parâmetros sofrem variações na microfase, quando comparado com a fase aquosa, obtém-se um valor de pK_a aparente (pK_{a-Ap}) (FERNANDEZ; FROMHERZ, 1977). Dessa forma, no caso do aniônico SDS é esperado um aumento de pK_a ($\Delta pK_a > 0$) para compostos que interajam com a micela, alocando-se próximos à camada de Stern, pois a mesma apresenta uma concentração microlocal de H^+ maior que o valor medido analiticamente na fase aquosa (PREVIDELLO, 2006).

Embora a repulsão eletrostática, entre as formas carregadas dos corantes e os grupos cabeças carregadas dos monômeros do surfactante (DS^-), contribua para uma não associação entre essas espécies químicas, a atração corante-micela é significativa para os ésteres, em função redução de carga e das interações hidrofóbicas geradas pelas caudas alquílicas presentes nas moléculas de ambos. Como reportado na literatura (SERET; VAN De VORST, 1990), estas interações são tão intensas que compensam a repulsão, possibilitando que a incorporação dos corantes ocorra.

Deslocamentos positivos ($\Delta pK_a > 0$) puderam ser observados para a os dois equilíbrios protolíticos da RBB, confirmando a expectativa de uma alocação relativamente superficial da mesma na micela. Entretanto, para todos os derivados ésteres foram observados deslocamentos negativos ($\Delta pK_a < 0$), indicando que os mesmos estão alocados mais profundamente no interior da micela, numa região onde o acesso dos prótons H^+ é limitada pela polaridade do meio e, segundo a Distribuição de Boltzmann, pela escassez de moléculas de água para formação do íon H_3O^+ ($[H^+] = [H_0] e^{-kt}$). Assim, o pK_a fica aparentemente mais ácido pois é necessária uma maior concentração de H^+ no seio da solução para que se alcance 50% de moléculas protonadas do FS dentro da micela (Tabela 6).

Para os derivados ésteres RBBMET e RBBBUT foram obtidos deslocamentos, com valores muito próximos, indicando que a aproximação dos prótons ocorre na mesma proporção. Curiosamente, a RBBDEC, da qual se espera maior interação com a micela, apresenta, por sua vez, um menor ΔpK_a . Esse menor deslocamento (ΔpK_a) em relação aos outros derivados ésteres pode ser atribuído a uma cinética de incorporação mais lenta, que retarda a incorporação do FS em virtude do tamanho da molécula. Este atraso na incorporação da RBBDEC foi observado também em outros estudos, como se verá posteriormente.

Outro fator relevante é a similaridade de tamanho entre a cadeia éster da RBBDEC, composta de 10 carbonos ($\approx 11,34 \text{ \AA}$) e o core hidrofóbico da micela de SDS, com raio médio de $16,7 \text{ \AA}$ (CAETANO, 2002). A proximidade no tamanho das cadeias alquílicas favorece a participação da molécula deste FS como co-surfactante na formação da micela (MIANXUE, 1990). Sendo assim, mesmo sendo alcançado o equilíbrio no processo de incorporação, a molécula se aloca de tal forma que o anel xantênico esteja situado nas proximidades da camada de Stern da micela de SDS, região que, como mencionado, atrai prótons devido ao seu potencial negativo (-125 mV) (CAETANO, 2000).

4.3.2.2 *Determinação dos valores de pKa em micelas de P-123*

A avaliação dos pKas em micelas de surfactante não iônico, como as formadas a partir de unímeros do Plurônico® P-123 é extremamente relevante para o presente estudo. A estrutura molecular dos fotossensibilizadores estudados é muito parecida, possuindo a mesma porção xantênica e sendo diferenciados apenas pela quantidade de carbonos da cauda alquílica inserida no processo de esterificação. Como as micelas de P-123 não possuem carga formal (ALEXANDRIDIS, 1994; PELLOSI, 2012), pode-se avaliar, especificamente, a contribuição das forças hidrofóbicas relativas às cadeias alquílicas monitorando-se as variações de pKa observadas no sistema. Conhecer esta contribuição favorece a interpretação dos dados nos demais sistemas, onde se tem a interferência da

atração/repulsão eletrostática presente na região interfacial (grupos cabeça polar). A variação espectral associada à variação de pH da solução é mostrada na Figura 29.

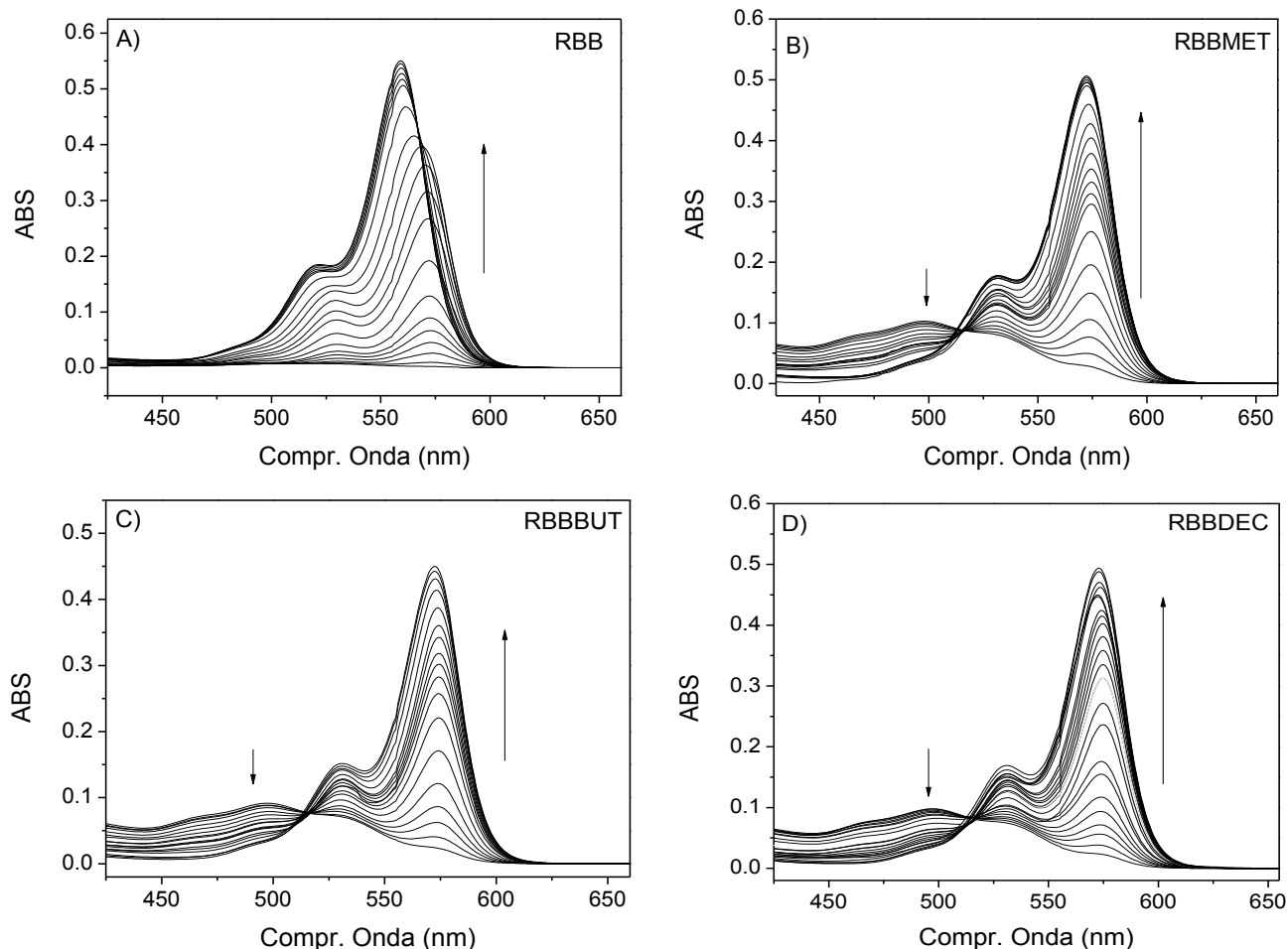


Figura 29: Espectros de absorção dos FS em diferentes pHs, obtidos em sistema P-123.

Exemplos das curvas das frações relativas das espécies protolíticas como uma função da variação de pH, obtidas em P-123, são apresentadas na Figura 30.

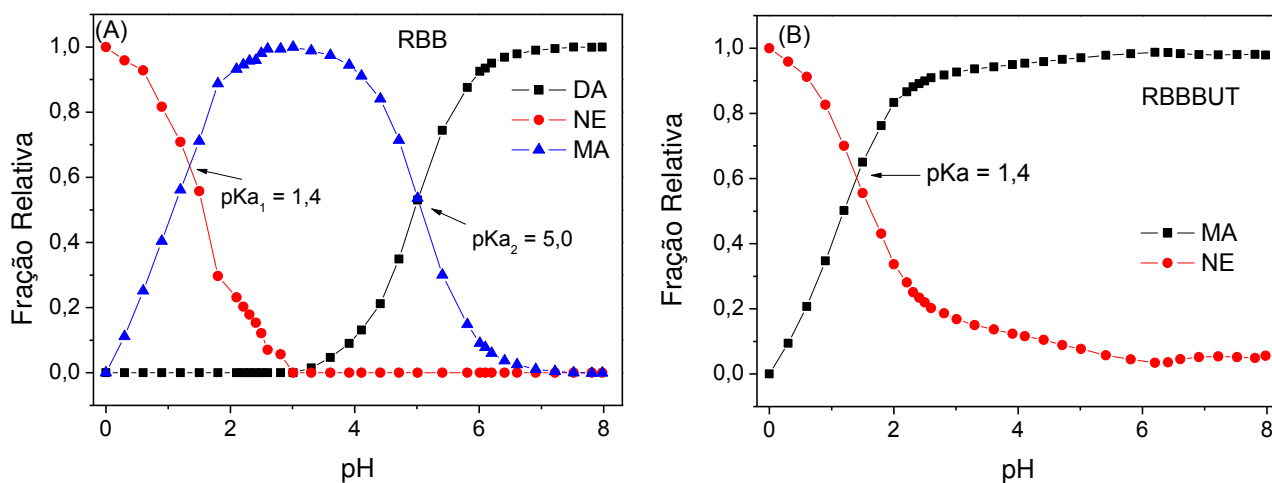


Figura 30: Curvas de pK_a , obtidas pelo software MASDA, para os FS xantênicos em P-123. (A)RBB e (B) RBBBUT. (DA: dianiônica; NE: neutra e MA: monoaniônica)

Os valores de pKa da RBB e seus derivados em surfactante polimérico P-123 são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de pK_a dos derivados xantênicos medidos em P-123, valores de referência (pK_{a-água}) e valores calculados de ΔpK_a.

FS	pK _a	pK _{a-água}	ΔpK _a **	
RBB	pK _{a-COOH}	5,0 ± 0,1	1,8	+3,2
	pK _{a-OH}	1,4 ± 0,1	3,6	-2,3
RBBMET	pK _{a-COOH}	1,3 ± 0,1	4,0	-2,7
RBBBUT	pK _{a-COOH}	1,4 ± 0,1	4,0*	-2,6
RBBDEC	pK _{a-COOH}	1,9 ± 0,1	4,0*	-2,1

* O pKa da RBBMET em água (pKa = 4,0), foi usado como referência para RBBBUT e RBBDEC.

** (ΔpK_a = pK_{a-mh} - pK_{a-água})

Todos os corantes avaliados apresentaram deslocamento batocrômico ($\Delta\lambda_{\text{máx}} = 12\text{-}21$ nm), dos comprimentos de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx}}$), em relação aos espectros obtidos em água. Observa-se, no entanto, que ao longo da titulação espectrofotométrica o $\lambda_{\text{máx}}$ para RBB se desloca paulatinamente para o azul (hipsocrômico) à medida que se promove a alcalinização do meio, com variação de 13 nm no intervalo de pH avaliado. Mesmo assim, o $\lambda_{\text{máx}}$ verificado ao término da titulação (559 nm) não se iguala ao obtido em água (547 nm). Esse comportamento distinto observado para a RBB (Figura 29 A), com deslocamento hipsocrômico à medida que se tem o aumento de pH, esta relacionado com seus complexos equilíbrios protolíticos e tautoméricos, que se tornam mais simples nos derivados pela

esterificação do carboxilato, como discutido adiante. Em meio não iônico de surfactante P-123, mais uma vez notam-se semelhanças entre os valores de ΔpK_a para RBBMET e RBBBUT e uma pequena variação no valor obtido para RBBDEC, indicando maior exposição do sítio protolítico aos prótons em solução (meio aquoso).

4.3.2.3 Determinação dos valores de pK_a em micelas de CTAB

Estudos demonstraram a interação entre corantes xantênicos e CTAB e outras micelas catiônicas (BILSKI, 1994; BHOWMIK, 2005; MCHEDLOV-PETROSSYAN et al., 1999) com verificação do surgimento de um valor de pK_a aparente (SONG, 2000). Essa forte interação é gerada pela atração eletrostática entre as formas aniônicas dos corantes e os grupos cabeças catiônicas do surfactante. A variação dos espectros de absorvância em função do aumento de pH estão ilustrados na Figura 31.

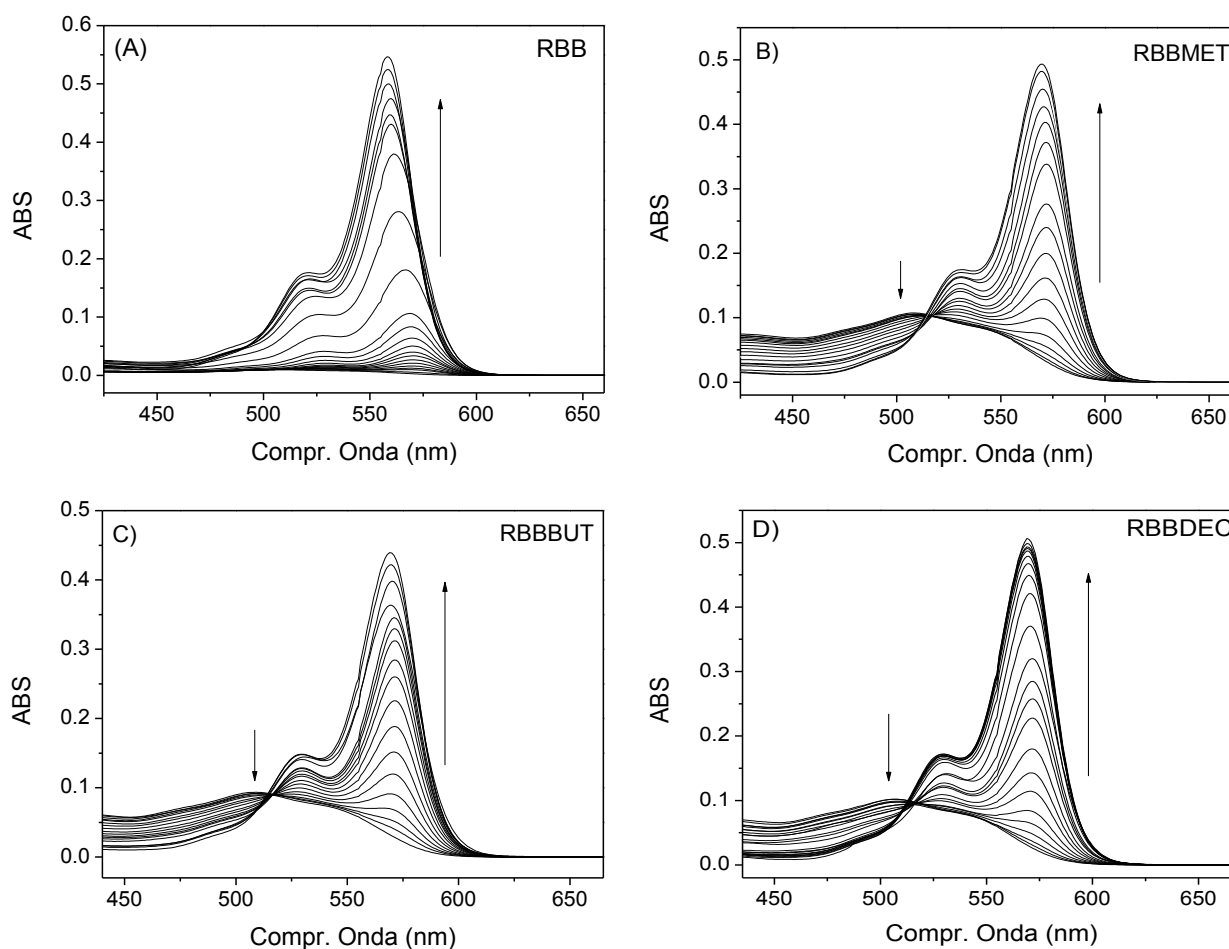


Figura 31: Absorção UV-Vis dos FS (5×10^{-3} mol L⁻¹) em diferentes pH (0,0 – 8,0), obtidos em sistema CTAB.

Na figura 32 são apresentados exemplos das curvas das frações relativas das espécies em função da variação de pH, obtidas em CTAB.

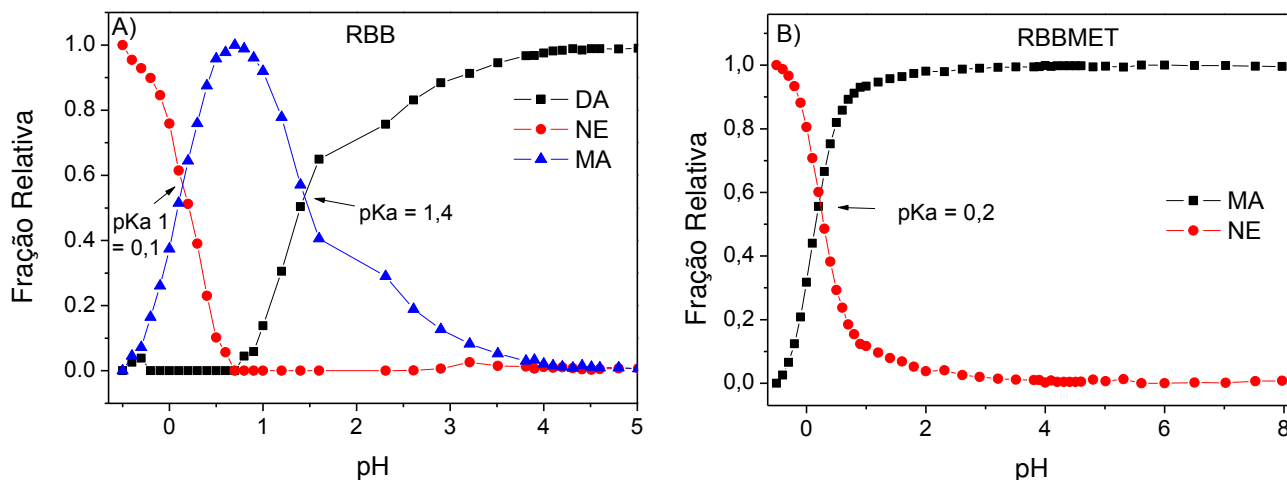


Figura 32: Curvas de pK_a , obtidas pelo software MASDA, para os FS xantênicos em CTAB.

A aproximação e incorporação dos FS nas micelas, que ocorrem naturalmente em virtude das cargas opostas das espécies são ainda favorecidas pelas forças hidrofóbicas, que atuam na cadeia alquílica dos derivados éster. Como pode ser observado na Tabela 8, houve uma diminuição significativa no valor de pK_{aOH} para todos os FS avaliados.

Tabela 8: Valores de pK_a e ΔpK_a dos derivados xantênicos em CTAB.

FS	pK_a	$pK_{a-água}$	ΔpK_a^{**}	
RBB	pK_{a-COOH}	$1,4 \pm 0,1$	1,8	-0,4
	pK_{a-OH}	$0,1 \pm 0,1$	3,6	-3,5
RBBMET	pK_{a-COOH}	$0,2 \pm 0,1$	4,0	-3,8
RBBBUT	pK_{a-COOH}	$0,2 \pm 0,1$	4,0*	-3,8
RBBDEC	pK_{a-COOH}	$0,2 \pm 0,1$	4,0*	-3,8

* O pK_a da RBBMET em água ($pK_a = 4,0$), foi usado como referência para RBBBUT e RBBDEC.

** ($\Delta pK_a = pK_{a-mh} - pK_{a-água}$)

Os elevados deslocamentos nos valores de pK_a (ΔpK_a) demonstram a influência significativa do potencial da superfície micelar sobre os valores de pK_a aparentes. É válido destacar que o valor de ΔpK_a para RBB (dianiônica) é equivalente a seus derivados, pois mesmo sem os efeitos atrativos (forças hidrofóbicas) geradas pela cauda alquílica, sua dupla carga negativa modula a interação com a micela catiônica. Assim, uma alocação mais profunda da RBB na micela explica-se pela formação de agregados pré-micelares que resultam no encapsulamento do corante concomitantemente à formação da micela (BILSKI, 1994). Como os FS ficam alocados no interior das micelas, a própria camada de Stern serve de barreira para a aproximação dos prótons H^+ fazendo que o equilíbrio protolítico seja fortemente deslocado pra baixo (até -3,8 unidades de pH), para os FS localizados além da região interfacial grupo cabeça polar/região parafínica. Para os derivados ésteres, os ΔpK_a são praticamente os mesmos, confirmando a tendência de localização similar do anel xantênico (aniônico) nas proximidades da camada de Stern (região interfacial), independente do tamanho da cadeia alquílica. Assim, neste meio observou-se valores praticamente iguais para o pK_a de todos os FS, indicando um posicionamento similar destes compostos dentro da micela, exceto para o grupo carboxilato da RBB que se mostrou um pouco mais exposto à aproximação do prótons ($\Delta pK_a = 0,4$). Na comparação entre a variação dos valores de pK_a dos FS nos sistemas surfactantes avaliados, os resultados de ΔpK_a obtidos em CTAB (catiônico) foram em torno de seis vezes maiores que em SDS (aniônico) e uma vez e meia (1,5x) maiores que em sistema não-iônico P-123, indicando uma influência simultânea de forças hidrofóbicas e eletrostáticas.

Dessa forma, conforme já discutido para os demais sistemas avaliados, o equilíbrio de protonação fica fortemente deslocado em função da localização dos FS na região parafínica (núcleo) da micela, onde as formas aniônicas (básicas) são mais estáveis e onde existe uma menor disponibilidade de prótons em função da própria escassez de moléculas de água (PREVIDELLO, 2006).

Em todos os sistemas, a ausência de pontos isobésticos para RBB pode ser atribuída à sobreposição espectral das espécies puras e à proximidade entre os dois pK_a .

A estimativa da contribuição individual de cada espécie para a intensidade total do espectro foi obtida através do método da matriz K (SENA, 2000). Adicionalmente, processos consecutivos de equilíbrio, através de um mecanismo multi-etapas (TESSARO, 2011), envolvendo as formas tautoméricas, também contribuem para a complexidade do sistema.

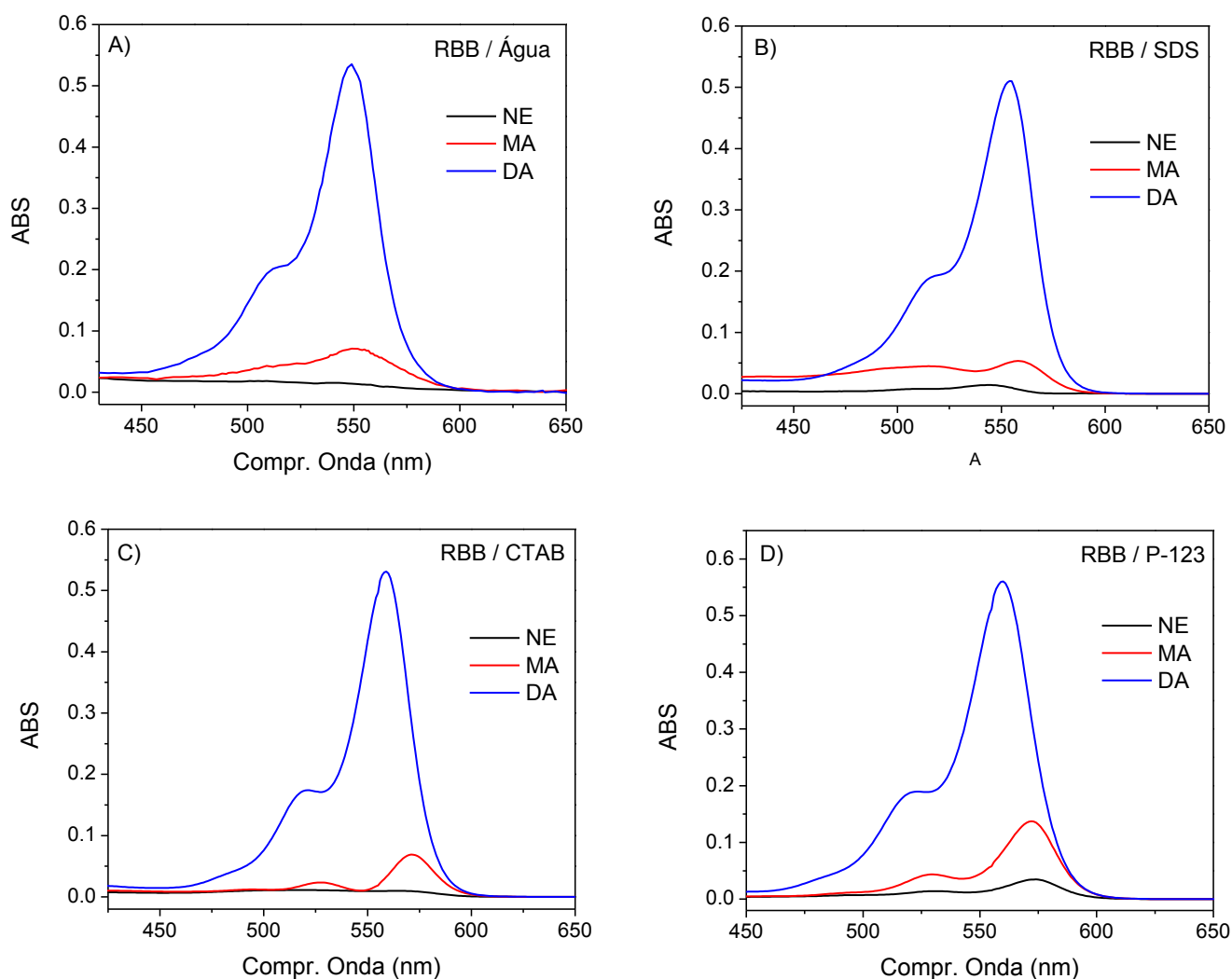


Figura 33: Estimativa dos espectros das espécies puras da RBB, obtidos pelo método da Matriz K (SENA, 2000)

4.3.2.4 Inversão na acidez relativa dos grupos protolíticos da RBB

Conhecidamente o grupo carboxílico ($pK_a \approx 4,7 - 5,0$) é mais ácido que o grupo fenol ($pK_a = 9,99$) (CRC Handbook, 2003). No entanto, esses valores que geralmente são

tabelados para moléculas que apresentam o grupo funcional isolado, sofrem variações em moléculas complexas.

A RBB, por exemplo, possui em sua estrutura tanto um grupo fenol, situado no anel xantênico, como um grupo carboxílico ligado ao anel benzênico. Em meio aquoso, como já visto, o grupo carboxílico é mais ácido ($pK_a = 1,8$) do que o grupo fenol ($pK_a = 3,6$) (Tabela 9). Entretanto, a análise dos dados obtidos nos ensaios de pK_a levaram a hipótese de uma possível inversão na acidez relativa dos grupos, quando o composto é solubilizado em sistemas micro-heterogêneos .

Como os derivados ésteres possuem um único equilíbrio protolítico, a atribuição dos valores de pK_a da RBB, em cada um dos sistemas micro-heterogêneos avaliados, foi feito por comparação com o pK_a da RBBMET, que dentre os derivados é aquele com estrutura molecular mais próxima à da RBB. Observando os valores expressos na Tabela 9, nota-se que um dos valores obtidos para os equilíbrios protolíticos da RBB ($pK_a 1$ ou $pK_a 2$) tem melhor correlação quando comparados ao pK_a de referência (RBBMET). Para facilitar a análise, os valores atribuídos ao pK_a do grupo fenol aparecem na Tabela 9 com os campos sombreados.

Tabela 9: Comparação dos valores de pK_a da RBB ($pK_a 1$ e $pK_a 2$) com o valor de referência (RBBMET), em diferentes meios, para a atribuição dos grupos protolíticos.

	RBBMET (pK_{a-OH})	RBB ($pK_a 1$)	RBB ($pK_a 2$)
Água	4,0	1,8 (pK_{a-COOH})	3,6 (pK_{a-OH})
SDS	3,4	2,6 (pK_{a-COOH})	4,2 (pK_{a-OH})
P-123	1,3	1,4 (pK_{a-OH})	5,0 (pK_{a-COOH})
CTAB	0,2	0,1 (pK_{a-OH})	1,4 (pK_{a-COOH})

Dessa forma, em água e em sistema aniônico SDS o valor do pK_a 1 foi atribuído ao grupo carboxílico pois nestes meios este equilíbrio protolítico ocorre em um valor de pH menor que do grupo fenol, ao qual foi atribuído o pK_a 2. Porém, nos sistemas não-iônico P-123 e catiônico CTAB ocorre uma inversão nesta ordem, sendo que o pK_a 1 passa a ser atribuído ao equilíbrio do grupo fenol.

Alguns trabalhos encontrados na literatura são dedicados à interpretação e explicação deste fenômeno que é característico da classe dos corantes xantenos, que sofrem forte influência do solvente sobre os seus respectivos valores de pK_a (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1992 i; Idem, 1992 ii, Idem, 1994).

A inversão de pK_a entre os grupos protolíticos é um fenômeno que ocorre com maior probabilidade nos xantenos substituídos com átomos halogênicos nas posições 2,4,5,7, como é o caso da RBB e seus derivados (ver Figura 7). Como os halogênios exercem um forte efeito retirador de densidade eletrônica no anel xantênico, o hidrogênio do grupo fenol é mais facilmente ionizável. Entretanto, a correta interpretação destas mudanças não é possível sem o completo entendimento dos equilíbrios tautoméricos presentes nas moléculas dos xantenos (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1992 i).

Na Figura 34, são esquematizados os equilíbrios protolíticos e tautoméricos propostos para a RBB, que facilitarão o entendimento do processo de inversão dos equilíbrios protolíticos.

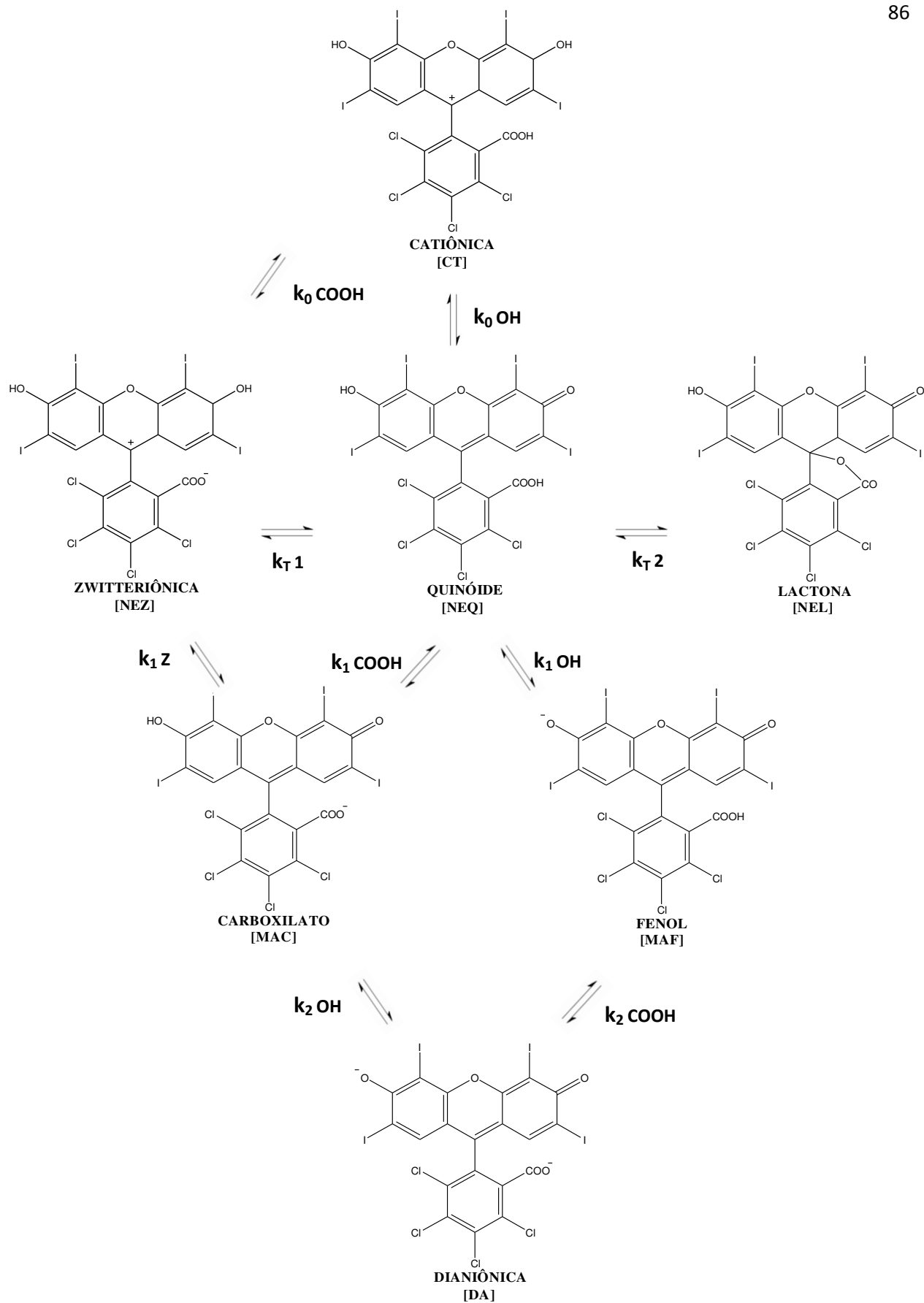
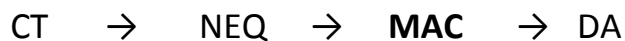


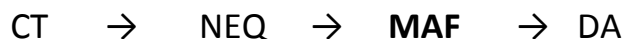
Figura 34: Estruturas protolíticas e tautoméricas propostas para a Rosa de Bengala. **NE** (neutra), **MA** (monoaniônica) e **DA** (dianionica) (MCHEDLOV-PETROSSYAN e KLESCHVNIKOVA, 1994).

Quando se trata de um meio polar como, por exemplo, a água; a medida que se promove a alcalinização do meio a molécula sofre mudanças estruturais de acordo com os seguintes estágios:



com isso a primeira desprotonação (pK_a 1) ocorre no grupo carboxílico e a segunda desprotonação (pK_a 2) ocorre no grupo fenol.

Porém, quando se trata de ambientes de menor polaridade, como o microambiente do core micelar, à medida que se aumenta o pH do meio, os estágios das transformações moleculares seguem outra rota, ocorrendo na seguinte ordem:



dessa forma ocorre a inversão; com a primeira desprotonação (pK_a 1) ocorrendo no grupo fenol e a segunda desprotonação (pK_a 2) ocorre no grupo carboxílico (MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1994).

Estes resultados, portanto, indicam que a RBB esteja alocada em regiões próximas a superfície da micela de SDS, isto é, na região da interface grupo cabeça polar/meio aquoso; ao passo que nos sistemas de P-123 e CTAB ela atinge microdomínios além desta interface, chegando à região parafínica. Estes estudos, no entanto, serão complementados com a avaliação das interações FS-membrana (constantes de ligação (K_b)), assim como com as constantes de supressão de Stern-volmer (K_{SV}), discutidas adiante.

4.4 Determinação do Coeficiente de Partição(K_p) no sistema 1-octanol/água

A partição dos FS xantenos foi avaliada num sistema formado por dois solventes imiscíveis (água/1-octanol), permitindo analisar de uma forma simples o caráter hidrofóbico relativo de cada corante. Os resultados, em termos de coeficiente de partição (K_p) e Log de K_p , são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10: Valores de coeficiente de partição (K_p) dos xantenos em 1-octanol/água (1:1, v/v); sendo: Fase aquosa pH 7,25 em tampão Mcllvaine, $[\text{Na}_2\text{HPO}_4] = [\text{ácido cítrico}] = 7,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$. $[\text{FS}] = 3,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

FS*	RBB	RBBMET	RBBBUT	RBBDEC
K_p	4,18	13,82	25,95	94,44
$\text{Log } K_p$	0,62	1,14	1,41	1,98

Dentre os FS avaliados observa-se um aumento nos valores de K_p (RBB < RBBMET < RBBBUT < RBBDEC, Tabela 10). De acordo com a literatura, fotossensibilizadores com valor de $\text{Log } K_p < 0$ são classificados como de caráter hidrofílico, enquanto aqueles com $K_p > 1,5$ são considerados de caráter hidrofóbico. Compostos com $\text{log } K_p$ entre 0 e 1,5 são classificados como anfifílicos (GIDDENS, 2003; SMITH, 2012). A inserção de um ligante, formando o éster, causa a neutralização de uma das cargas negativas presentes, a do carboxilato, tornando a molécula menos polar. Além disso, a cadeia carbônica alquílica contribui para o aumento da hidrofobicidade. A partir deste pressuposto, RBBMET e RBBBUT são classificadas como compostos anfifílicos e RBBDEC como hidrofóbica. Assim, o aumento no valor de K_p entre os derivados da RBB está associado a maior quantidade de carbonos na cadeia alquílica da função éster (Figuras 16, 17 e 18). Entretanto, mesmo a RBB na forma original apresenta o valor de $\text{Log } K_p$ maior que zero, evidenciando que a molécula não tem comportamento absolutamente hidrofílico, sendo classificada como anfifílica. Também é importante observar, que RBBBUT tem um valor de $\text{log } K_p$ (1,4) muito próximo ao limite (1,5) para ser considerada uma molécula hidrofóbica.

4.5 Avaliação da interação com os sistemas micelares

O estudo da interação dos FS com moléculas de surfactantes é de grande interesse no desenvolvimento de novas formulações para o uso em TFD e IFDMO, tanto em termos de solubilização e propriedades fotofísicas, quanto para a obtenção de um sistema transportador com características otimizadas. Embora o interesse primário do presente estudo esteja voltado para a avaliação das propriedades físico-químicas e fotofísicas dos corantes, a utilização clínica dos mesmos como FS figura como plano de fundo, por isso todos os ensaios foram realizados em pH fisiológico (7,25), sendo que as formas protolíticas dos FS são conhecidas nestas condições. Com isso, é possível estimar as interações FS-micela e outros equilíbrios verificados para corantes xantênicos em sistemas micelares com condições similares aos dos sistemas biológicos.

O monitoramento das interações, com o aumento gradual da concentração de surfactante a partir de um valor inicial igual a zero, permite a obtenção da isoterma de associação FS-micela, a qual será analisada a fim de se estimar o parâmetro termodinâmico da ligação (K_b), bem como o valor de CMC e N via Equação 2.

4.5.1 Determinação da constante de ligação (K_b) com os sistemas micelares

O parâmetro de ligação dos FS com os sistemas micelares foi avaliado monitorando-se a variação da intensidade de emissão de fluorescência dos corantes à medida em que era realizada a titulação com solução padronizada de surfactante (CAETANO, 1999). O primeiro sistema micelar avaliado foi do surfactante aniônico SDS. As variações na intensidade do espectro de emissão, bem como as isotermas de ligação obtidas para esse sistema são mostradas nas Figura 35 e 36.

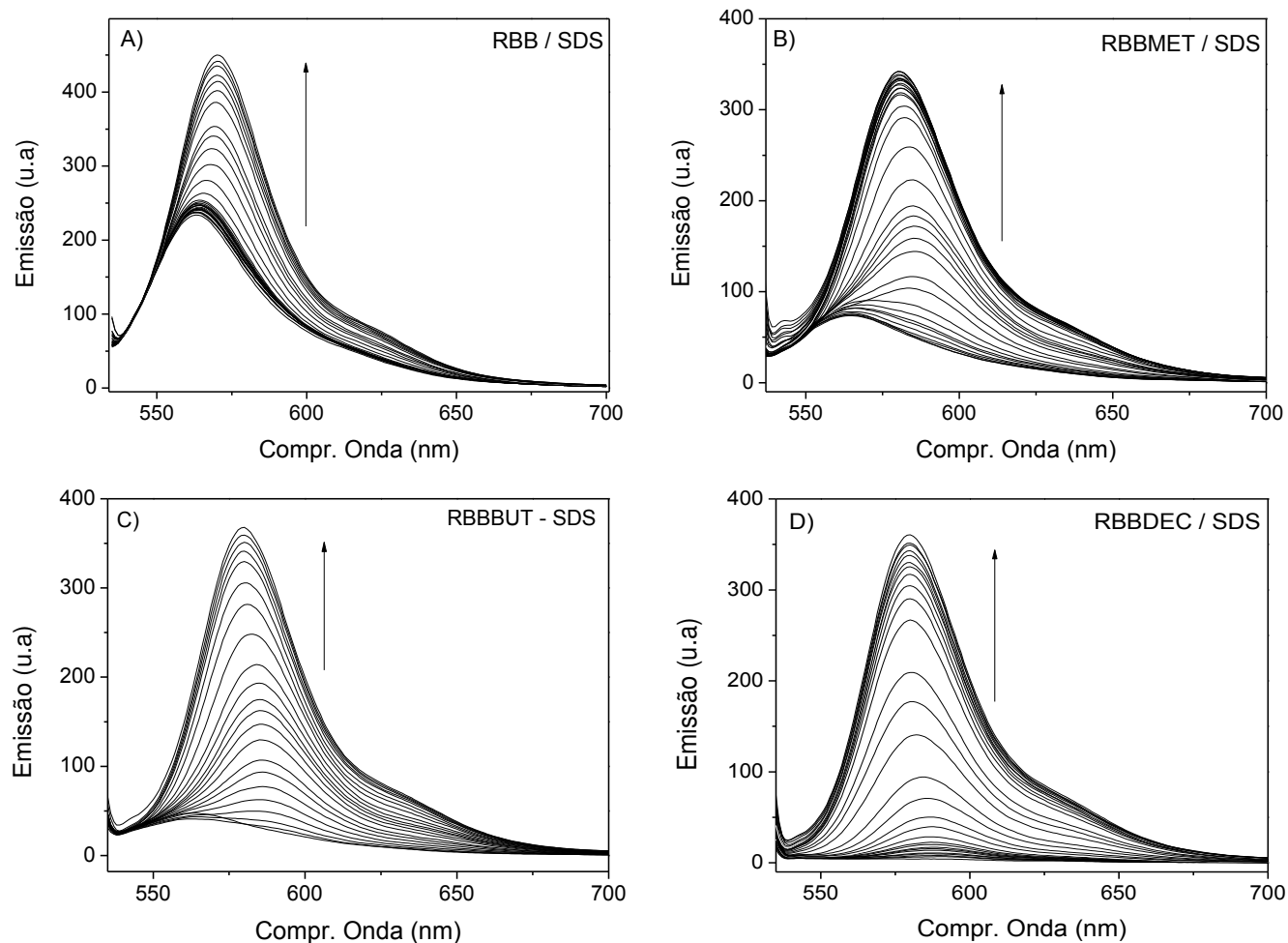


Figura 35: Variação na emissão de fluorescência dos FS como uma função da concentração de SDS em água. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. **RBB** ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); **Derivados** ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm); pH = 7,25 [NaCl] = $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

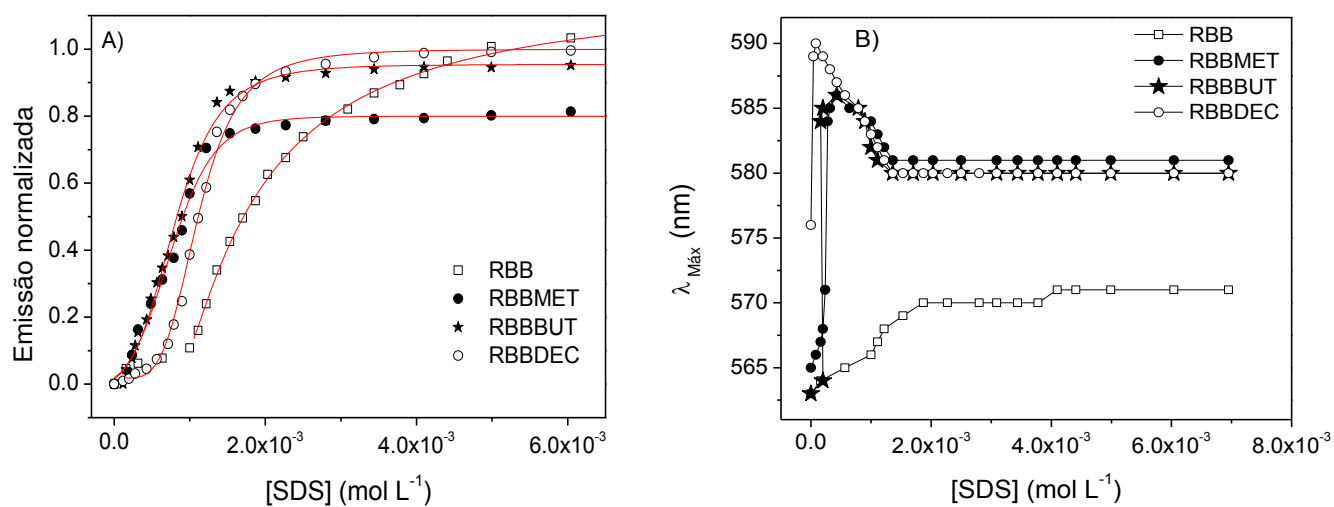


Figura 36: (A) Isothermas de ligação dos FS em SDS, com seus respectivos ajustes teóricos. (B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão como uma função da concentração de surfactante.

Observando a Figura 35 percebe-se que, à medida que se adiciona surfactante, ocorre um aumento na intensidade de emissão de todos os FS. Esse aumento ocorre simultaneamente com variações do comprimento de onda de máxima emissão ($\Delta\lambda_{\text{máx}}$) até concentrações próximas a $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 36 B). Essa variação foi observada para todos os FS avaliados ($\Delta\lambda_{\text{máx}} \sim 7 - 17 \text{ nm}$). O deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ é reportado na literatura para outros xantenos em ambiente micelar e, também, solventes orgânicos (CHANG, 2008; CHAKRABORTY, 2011; PELLOSI, 2012). Em ambos os casos, o $\Delta\lambda_{\text{máx}}$ e concomitante aumento da intensidade de emissão observado no sistema foi associado à mudança de ambiente do FS, que migra da água para meios orgânicos com polaridade reduzida. As interações soluto-solvente, tais como as ligações de hidrogênio, são fortes em meios próticos e estabilizam principalmente o estado fundamental do corante (SONG, 2000; BHOWMIK, 2005). Ao passar para o ambiente orgânico essas interações são perdidas, levando à diminuição da lacuna energética entre os níveis. Este efeito se reflete no espectro de absorção e, conseqüentemente, no espectro de emissão através de deslocamentos para o vermelho (PELLOSI, 2012; KIBBLEWHITE, 1989). Além da desagregação promovida pelo surfactante, o aumento da emissão de fluorescência é resultado da diminuição dos processos colisionais, que normalmente são favorecidos em ambiente aquoso, onde as próprias moléculas de água atuam como supressores de fluorescência (VALENZENO, 1987; OSHIMA, 2006).

Na Figura 36A nota-se também que a isoterma de ligação da RBB é menos angulada do que a de seus derivados, não apresentando uma saturação completa no intervalo de concentração de surfactante avaliado. Isso deve à repulsão gerada entre a superfície aniônica da micela e a dupla carga negativa presente na molécula do FS. Os derivados, por sua vez, têm a interação modulada pela hidrofobicidade, onde a intensidade de emissão de fluorescência alcança saturação em concentrações próximas a $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo estabilizada até o final da titulação espectrofotométrica. Com isso é possível verificar a influência da cauda alquílica na interação dos FS com a micela. Os parâmetros da ligação FS-micela, obtidos através da Equação 2, para o sistema SDS são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Constantes de ligação (K_b), parâmetros N e CMC, obtidos pela Equação 2 para os corantes xantênicos ($5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em micelas de SDS a $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

SDS	N	CMC ($10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$)	K_b (10^3 L mol^{-1})
RBB	1,0 ($\pm 0,1$)	10,1 ($\pm 0,1$)	1,0 ($\pm 0,2$)
RBBMET	1,0 ($\pm 0,1$)	7,3 ($\pm 0,2$)	7,3($\pm 0,5$)
RBBBUT	1,2 ($\pm 0,1$)	7,9 ($\pm 0,1$)	29,7 ($\pm 0,9$)
RBBDEC	1,3 ($\pm 0,1$)	7,9 ($\pm 0,3$)	42,5 ($\pm 1,5$)

O parâmetro N (Equação 2) por volta de um é relativo a um processo simples de interação FS/micela (CAETANO, 1999). Os valores obtidos apontam para a incorporação de uma molécula por micela para os primeiros três FS da série, com uma pequena variação no caso da RBBDEC. O valor de CMC do SDS na interação com RBB é próximo ao valor da literatura ($1,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; PELLOSI, 2012), mas sofrem uma diminuição em torno de 30% para os derivados ésteres. Isso é indicativo que a presença dos corantes interfere no processo de formação das micelas. De forma geral, entende-se que a força de repulsão gerada entre as cargas negativas do surfactante e dos FS são compensadas pelas interações hidrofóbicas geradas pelas cadeias alquílicas presentes nas moléculas de ambos. É importante resaltar que devido à sua natureza, essas interações são também dependentes do pH, pois alterações do mesmo influenciam o estado de carga do FS.

No caso do surfactante polimérico P-123 (não-iônico), tem-se uma variação abrupta da intensidade de emissão, logo nas primeiras adições da titulação, e posterior estabilização, como ilustrado na Figura 37. A saturação/estabilização das intensidades de emissão de fluorescência, bem como o deslocamento batocrômico dos $\lambda_{\text{máx}}$ ($\Delta\lambda_{\text{máx}} \sim 13 - 24 \text{ nm}$) foram alcançados em concentrações muito baixas do surfactante polimérico como pode ser observado da Figura 38.

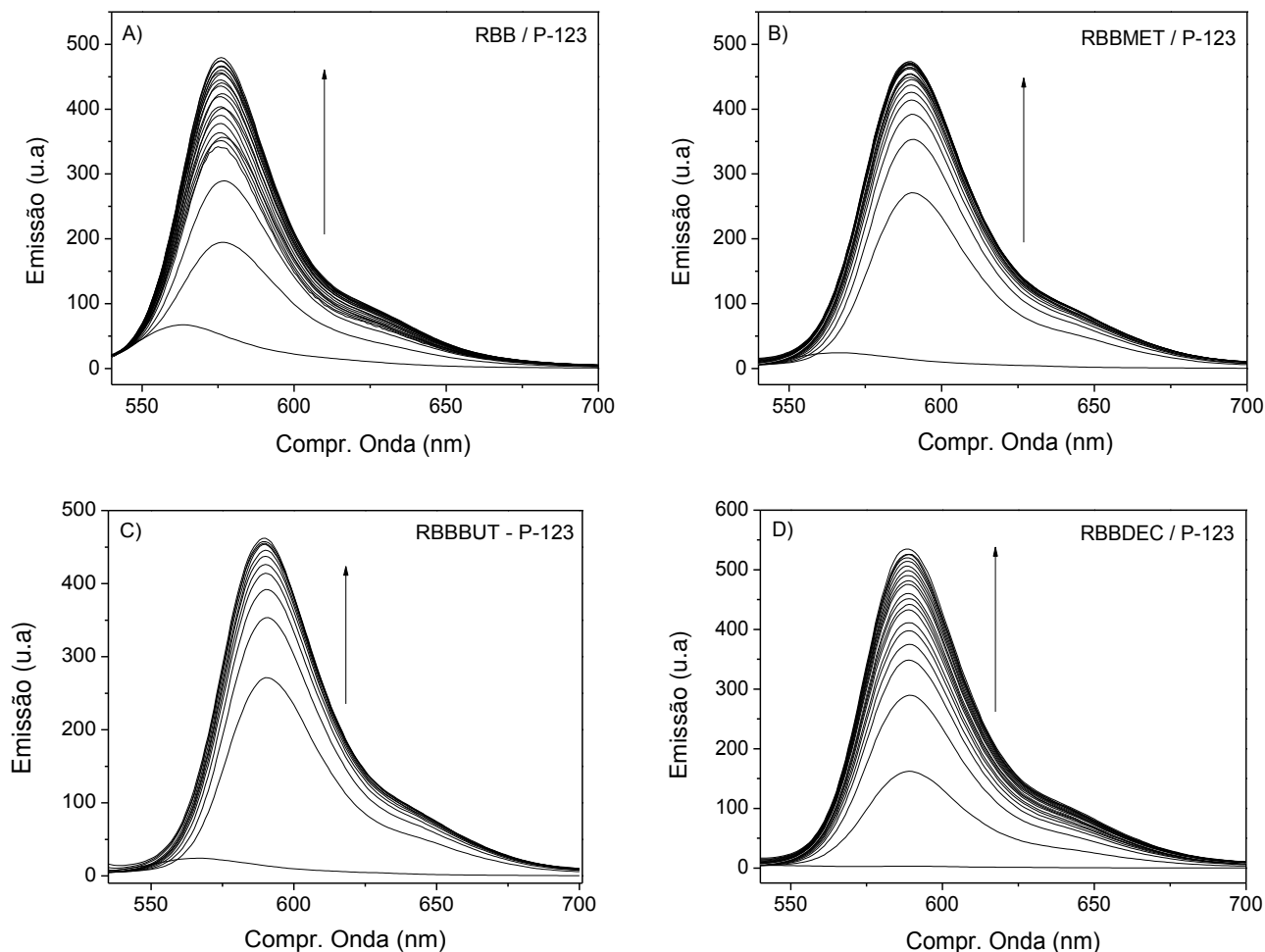


Figura 37: Variação na emissão de fluorescência dos FS como uma função da concentração de P-123 em água. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. **RBB** ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); **Derivados** ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm); pH = 7,25 $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

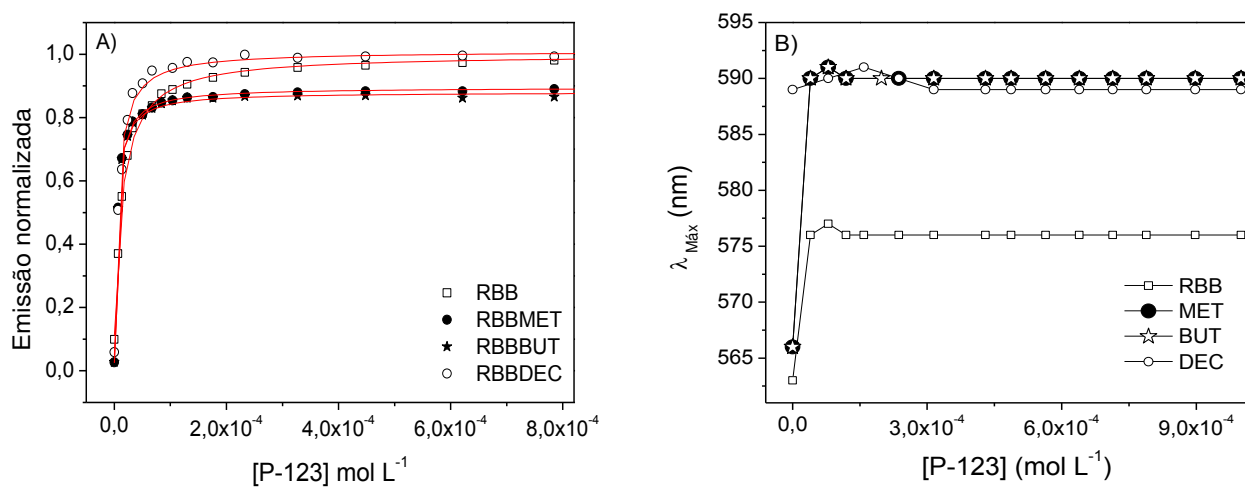


Figura 38: (A) Isothermas de ligação dos FS em P-123, com seus respectivos ajustes teóricos. (B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão como uma função da concentração de surfactante.

Ocorre uma forte interação entre os FS e as micelas de P-123, que é evidenciada pela saturação relativamente rápida na intensidade de emissão (Figura 38 A), com a concentração de surfactante utilizada na titulação. Interações significativamente mais fortes dos FS em P-123 do que em SDS já eram esperadas visto que em meio não-iônico não existe influência da repulsão que os corantes sofrem na interação com SDS. Os valores obtidos pelo ajuste teórico dos dados experimentais são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12: Valores de constantes de ligação (K_b), parâmetros N e CMC obtidos através de titulação fluorimétrica dos corantes xantênicos ($5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) com micelas de P-123 a $30,0^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

P-123	N	CMC ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	K_b (10^4 L mol^{-1})
RBB	1,00 ($\pm 0,01$)	7,3 ($\pm 0,5$)	5,0 ($\pm 0,1$)
RBBMET	1,00 ($\pm 0,01$)	7,3 ($\pm 0,2$)	9,1 ($\pm 0,1$)
RBBBUT	1,06 ($\pm 0,10$)	7,3 ($\pm 0,1$)	10,1 ($\pm 0,5$)
RBBDEC	1,00 ($\pm 0,01$)	2,1 ($\pm 0,3$)	14,5 ($\pm 0,7$)

O parâmetro N foi igual a um para todos os FS indicando associação unitária entre micela/molécula de FS. Um decréscimo em torno de 20% no valor teórico da CMC ($9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; ALEXANDRIDIS, 1994) para os três primeiros FS da série, indicam uma pequena influência da presença destes FS no processo inicial de formação das micelas (autoassociação). No entanto, esse valor fica quase 77 % menor no caso da RBBDEC, mostrando que a presença deste corante favorece o processo de micelização do copolímero P-123 nas condições empregadas neste ensaio.

Porém, a interação entre a RBBDEC e micelas de P-123 mostrou-se um processo complexo. Nos ensaios prévios, realizados com obtenção imediatamente após a adição de P-123 (t_0), o valor da constante de ligação (K_b) obtida para este sistema era de apenas $5,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$. Esse dado foi contraditório à tendência observada nos resultados apresentados na Tabela 12 e com a hipótese da interação FS/micela ser modulada pelo tamanho da cauda alquílica, visto que a micela de P-123 é não iônica.

Fez-se então, o acompanhamento da cinética de reação, conforme ilustrado na Figura 39.

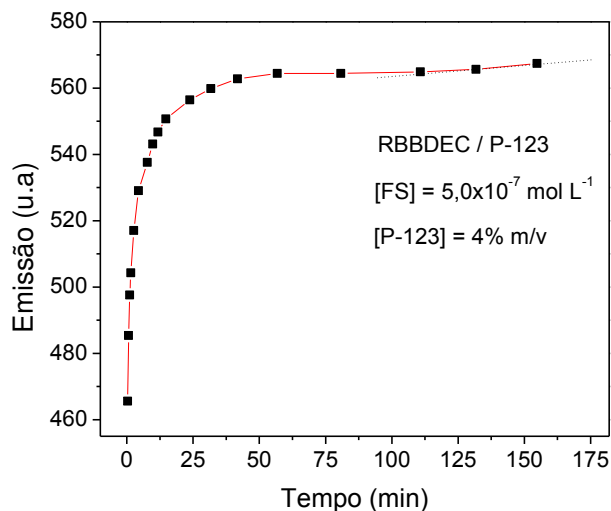


Figura 39: Cinética de incorporação da RBBDEC em micelas de P-123. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, em micelas de $[P-123] = 4\% \text{ m/v}$ a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

Aparentemente tem-se um equilíbrio em torno de 60 minutos de reação, entretanto é possível notar (Figura 39) uma inclinação nos pontos a partir de 100 minutos, indicando uma tendência de aumento. Com isso, realizou-se um novo experimento para se avaliar a interferência desta cinética de desagregação/incorporação do FS. O tratamento dos dados obtidos neste teste forneceu um ajuste com a elevação do valor do K_b para $8,2 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$, após 2,5 horas, a partir da adição de surfactante. Com a confirmação da hipótese da existência de cinética de incorporação e sua influência no sistema RBBDEC/P-123, outro ensaio completo foi realizado com aquisição dos espectros 17 horas depois da adição do copolímero surfactante, no qual se obteve o valor apresentado na tabela 12 ($14,5 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1}$). Para efeito de comparação, na Figura 40 são apresentadas as isotermas de ligação obtidas no tempo igual a zero e no tempo de equilíbrio.

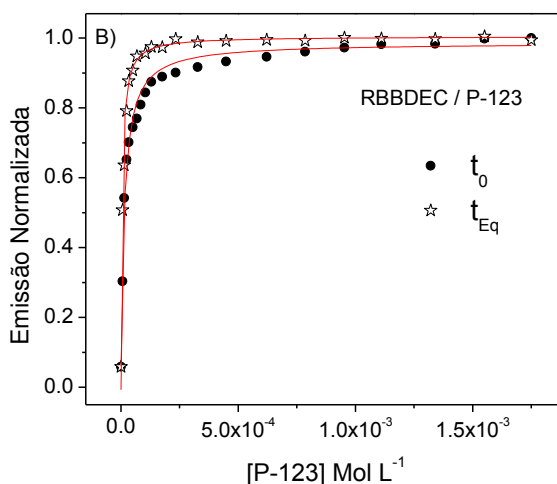


Figura 40: Comparação entre as isotermas de ligação e ajustes teóricos da RBBDEC em P-123, obtidas nos tempos t_0 e t_{Eq} . $[RBBDEC] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm).

Na Figura 40 percebe-se que na isoterma obtida no tempo zero (t_0) a intensidade de emissão continua aumentando durante toda a titulação, indicando que não ocorre a saturação da ligação do FS às micelas (CAETANO, 1999). Observando a isoterma obtida além do t_{Eq} (Figura 36 B), o que se vê é que a saturação ocorre numa concentração muito baixa de P-123 ($2,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Assim, baixas concentrações de P-123 são suficientes para a solubilização da RBBDEC, entretanto este processo é mais lento do que o verificado para os derivados ésteres de cauda mais curta.

Esta cinética de ligação pode ser atribuída ao tempo de equilíbrio do FS no micro ambiente micelar, em virtude do impedimento causado pelas cadeias PEO na interface hidrofílica da micela polimérica. Por causa da longa cadeia alquílica (10 C) a incorporação do FS no core hidrofóbico fica retardada ou restrita pelo emaranhado de cadeias PEO, que possuem alto grau de solvatação por moléculas de água (RIESS, 2003). Esse acompanhamento cinético não foi realizado para os demais corantes, pois não ocorreram indícios experimentais que sugerissem a realização dos mesmos.

Para o sistema composto por micelas do surfactante catiônico CTAB, a emissão de fluorescência dos FS também sofreu significativo aumento de intensidade, assim como deslocamento batocrômico dos $\lambda_{m\acute{a}x}$ ($\Delta\lambda_{m\acute{a}x} \sim 12 - 23 \text{ nm}$), como pode ser verificado nas Figuras 41 e 42.

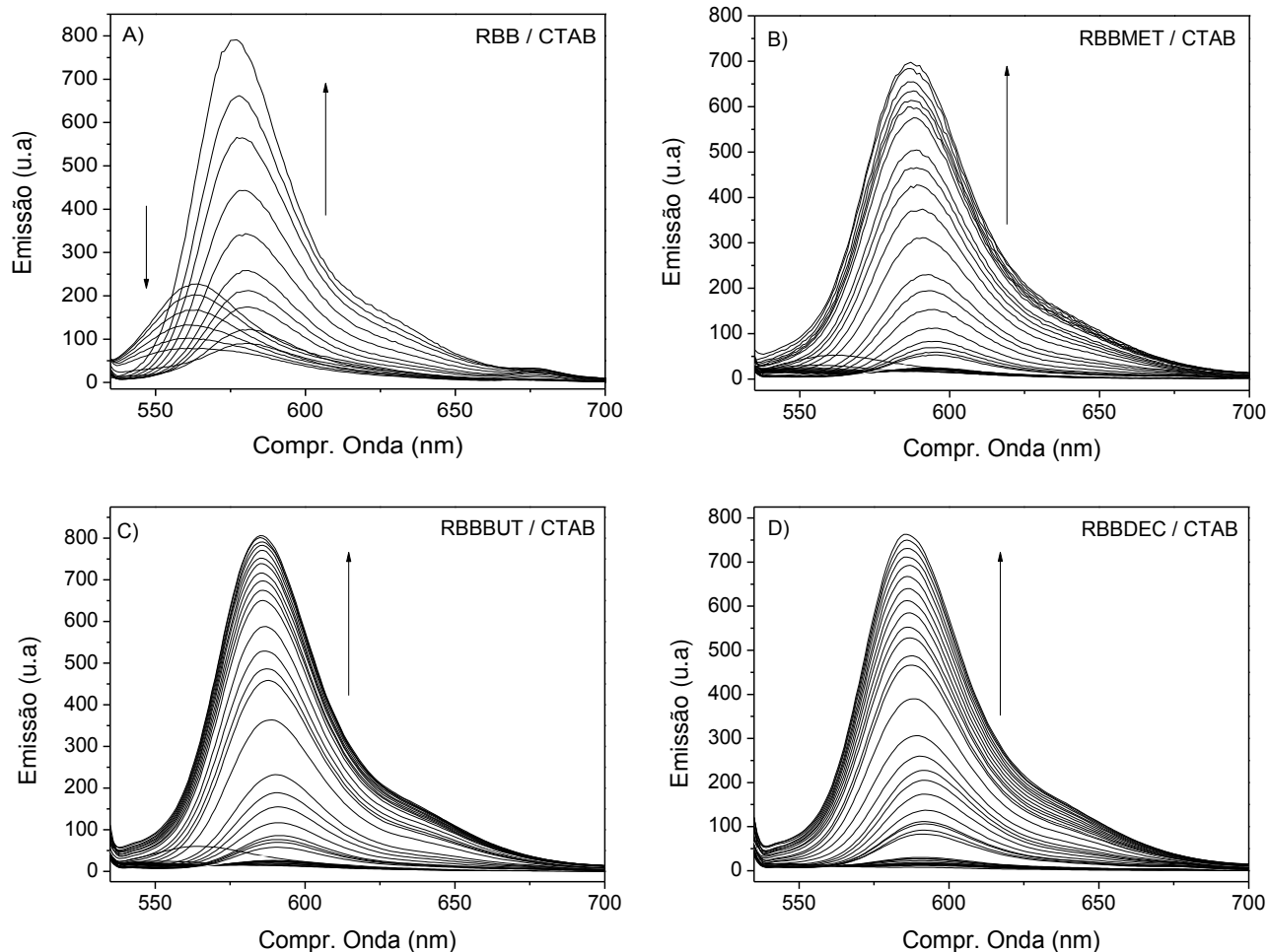


Figura 41: Variação na emissão de fluorescência dos FS como uma função da concentração de CTAB em água. $[FS] = 5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. **RBB** ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); **Derivados** ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$). Fenda do monocromador (exc/emis) (10/10, nm/nm); pH = 7,25 $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

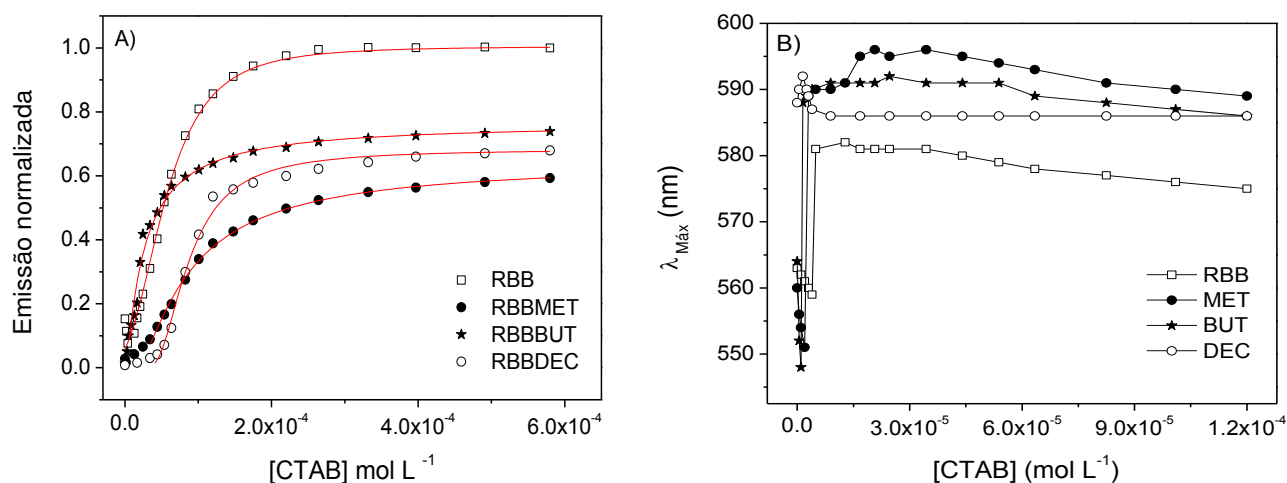


Figura 42: (A) Isothermas de ligação dos FS com CTAB, com seus respectivos ajustes teóricos. (B) Variação do comprimento de onda de máxima emissão como uma função da concentração de surfactante.

Os valores de K_b dos FS xantenos em CTAB, apresentados na Tabela 13, aumentaram em uma ordem de grandeza em relação ao sistema surfactante P-123 (Tabela 12) e duas ordens de grandeza em relação ao sistema surfactante SDS (Tabela 11). A atração eletrostática gerada pelas cargas opostas FS/micela, somada as interações hidrofóbicas, bem como a formação de espécies do tipo $[X^{n-}(S^+)^n]$ (X representa o corante xanteno e S os monômeros de surfactante), classificadas como agregados pré-micelares (CAETANO; TABAK, 2000), elevam consideravelmente a ligação entre os corantes e a micela catiônica (PELLOSI, 2012; BILSKI, 1997). Portanto, a associação FS/micela ocorre em duas etapas. A primeira, onde existe equivalência estequiométrica entre o FS e monômeros do surfactante e os fortes efeitos eletrostáticos modulam a interação, resultando na formação dos agregados pré-micelares (tendo o FS está auto-agregado) e a segunda, onde o acréscimo na concentração de surfactante leva a formação de micelas que encapsulam as moléculas de FS auto-agregadas, dispersando-as na forma de monômeros.

A etapa inicial geralmente é marcada pela diminuição na intensidade de emissão dos FS em razão da auto-supressão característica de espécies auto-agregadas (BILSKI, 1994; CHEN, 1998; CAETANO, 2000). Esse decréscimo foi verificado para a ligação de todos os FS avaliados com surfactante CTAB, entretanto foi explícito para RBB, como pode ser visto na Figura 43.

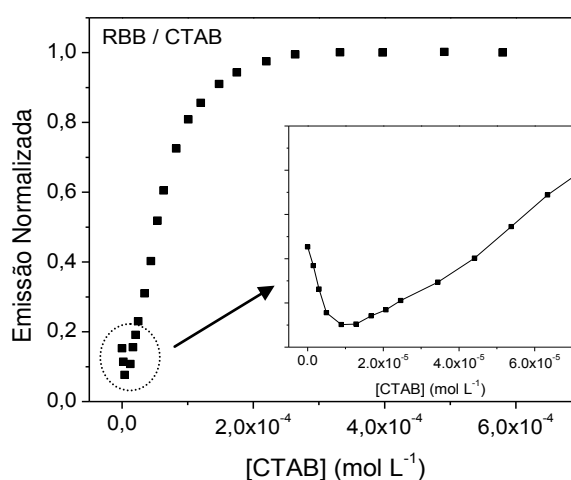


Figura 43: Isoterma de ligação obtida pela variação espectral da RBB como uma função da concentração de CTAB em água. ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$; $\lambda_{emis} = 575 \text{ nm}$). No detalhe, ampliação do intervalo de concentração de CTAB (região pré-micelar) onde ocorre a formação de agregados FS/CTAB.

Por isso o ajuste teórico das isotermas de ligação (Equação 2) para a obtenção das constantes de ligação (K_b) e dos parâmetros N e CMC foram feitos a partir dos pontos de mínima intensidade de fluorescência para o sistema do surfactante CTAB. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Constantes de ligação (K_b), parâmetros N e CMC, obtidos pela equação 2 para os corantes xantênicos ($5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em micelas de CTAB a $30,0 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 7,25$ e $[\text{NaCl}] = 0,10 \text{ mol L}^{-1}$.

CTAB	N	CMC ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)	K_b (10^5 L mol^{-1})
RBB	1,46 ($\pm 0,01$)	1,1 ($\pm 0,9$)	12,8 ($\pm 0,4$)
RBBMET	1,61 ($\pm 0,01$)	1,1 ($\pm 0,9$)	27,2 ($\pm 0,6$)
RBBBUT	1,64 ($\pm 0,08$)	2,9 ($\pm 0,9$)	36,4 ($\pm 0,2$)
RBBDEC	1,67 ($\pm 0,02$)	2,9 ($\pm 0,9$)	58,0 ($\pm 0,9$)

Para os derivados ésteres, está diminuição foi bem pequena, sendo observada somente para a primeira adição de surfactante. Porém, nas adições imediatamente subsequentes, houve pouca variação na intensidade de emissão resultando no perfil sigmoidal (Figura 42 A) não observado no início da titulação com P-123. Embora não seja possível verificar claramente a presença de agregados pré-micelares pela análise dos espectros de emissão dos derivados ésteres obtidos no sistema CTAB, a técnica de espalhamento de luz ressonante (RLS), utilizada concomitantemente, fornece indícios da formação dos mesmos no início da titulação. Elevados valores no sinal de RLS são causados pela ressonância entre o momento dipolar de transição das unidades cromóforicas que compõe o agregado gerando uma interferência construtiva na onda eletromagnética da luz emitida (PASTERNAK, 1993; COLLINGS, 1999).

Adicionalmente, o efeito das mudanças no micro-ambiente sobre o FS pode ser avaliada através de anisotropia de fluorescência. Estudos realizados com surfactantes e sondas fluorescentes demonstram que está técnica pode ser utilizada como ferramenta para mensurar o grau de interação entre o corante e os monômeros do

surfactante, pois quantifica a liberdade rotacional do FS nas interações complexas que ocorrem na transição entre a etapa pré-micelar e a etapa seguinte, onde se tem a micela formada (MAHATA, 2009; CAETANO, 2000). Os dados de anisotropia de fluorescência e RLS da RBBBUT em sistema CTAB são apresentados, como exemplo, na Figura 44.

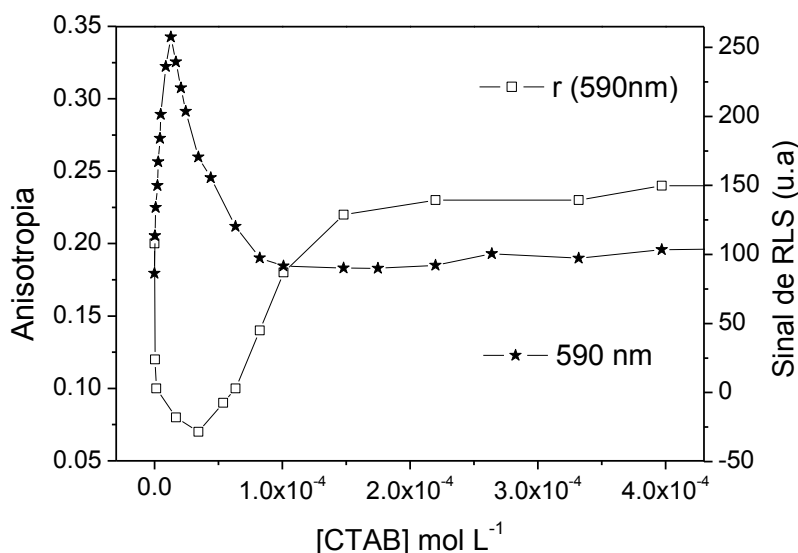


Figura 44: (— □ —) variação da anisotropia de fluorescência com excitação contínua em 520 nm, monitorado em 590 nm e (— ★ —) variação do sinal de RLS obtido em modo síncrono, $\Delta\lambda = 0$ ($\lambda_{exc} = \lambda_{emis}$) para RBBBUT em função da concentração de CTAB. T=30°C, pH =7,25.

Monitorando simultaneamente o sinal de RLS e a anisotropia de fluorescência (Figura 44), observou-se que em baixas concentrações de surfactante (região pré-micelar) são encontrados o menor valor de anisotropia e o máximo valor no sinal de RLS. Usualmente, uma diminuição de anisotropia está associada a um maior grau de mobilidade do fluoróforo, livre em solução ou associado ao surfactante na forma de agregados durante o processo de emissão de fluorescência. Assim, a aparente liberdade rotacional dos corantes, enquanto estão na forma de pré-agregados, parece contraditória, mas pode ser elucidada levando em conta a diminuição nos tempos de vida fluorescência que ocorre em função da agregação. Estudos realizados com corantes xantenos mostram que, em alguns casos, o tempo de vida de fluorescência pode ser menor que o tempo de resolução do equipamento (SERET, 1987), causando

um erro experimental na medida de anisotropia que sugere, erroneamente, que as moléculas tenham liberdade rotacional, como foi o comportamento observado (BILSKI, 1991).

Todos os corantes avaliados apresentam o mesmo comportamento anisotrópico da RBBUT, utilizada como exemplo na Figura 44; com valores de r diminuindo até $[CTAB] \approx 3,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Isso indica a ocorrência de processos similares na região pré-micelar para todos os FS. Este tipo de interação, gerada pela presença de cargas opostas e consequente formação de agregados do tipo $[X^n(S^+)^n]$ com as moléculas do FS, tem sido observada em vários estudos e causa a diminuição da fluorescência pelo favorecimento dos processos colisionais que levam à auto-supressão (BILSKI, 1991; BILSKI, 1997; MCHEDLOV-PETROSSYAN, 1999; BATISTELA, 2011)

Adições subseqüentes de CTAB levaram a ocorrência de alguns processos simultâneos: 1) diminuição do sinal RLS, pois o aumento na concentração de surfactante induz o processo de desagregação e resolubilização do corante na micela; 2) aumento na emissão de fluorescência, juntamente com deslocamento batocrômico dos $\lambda_{\text{máx}}$, indicando alocação em um ambiente apolar e 3) aumento da anisotropia de fluorescência e estabilização da mesma a partir da CMC do surfactante. A estabilização da anisotropia com valores de $r \approx 0,23$ são próximos aos descritos na literatura para sondas em sistemas micelares (RUIZ, 2000). Todos esses eventos são indicativos da incorporação dos corantes na micela. Efeitos similares nesta região pré-micelar foram detectados para vários surfactantes iônicos com outras classes de corantes (CAETANO, 2000; JUNQUEIRA, 2002; BILSKI, 1991; BILSKI, 1997). Para CTAB a CMC é $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (PELLOSI, 2012), assim, os complexos FS-surfactante formados na região pré-micelar atuam como microdomínios de nucleação para a formação de micelas (HIOKA et al, 1989). Dessa forma, em baixas concentrações de CTAB, os xantenos éster sintetizados se comportam como a RBB e outros xantenos, tendo a ligação caracterizada por uma interação bifásica, com queda na emissão de fluorescência no intervalo de concentração de surfactante $< 2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Outros corantes xantenos, desprovidos de cadeia éster apresentam esse comportamento em concentrações mais altas (10^{-4}

mol L⁻¹; PELLOSI, 2012), por não apresentarem a contribuição hidrofóbica adicional dos derivados ésteres da RBB. Foi em função destas interações específicas na região pré-micelar, que se optou em calcular os parâmetros da ligação FS-micela (K_b , CMC e N) em CTAB (Tabela 13), utilizando os pontos experimentais a partir dos mínimos de fluorescência (CAETANO, 2000; DEUMIÉ, 1995).

Percebe-se que o modelo teórico utilizado, representado pela Equação 2 (CAETANO, 2000), fornece bons ajustes para os dados obtidos nas titulações (coeficientes de correlação $\sim 0,998$). A RBB, dianiônica, apresenta interação relativamente menor com micelas de SDS e ligação relativamente significativa com micelas de CTAB. Nestes casos prevalecem as forças eletrostáticas geradas pelos grupos cabeças polares carregadas das moléculas de surfactante. Entretanto, com a esterificação do grupo carboxílico, a interação dos xantenos com as micelas é modulada também (até 5x), pelo tamanho da cadeia alquílica da porção éster. Comparando-se os parâmetros de ligação dos FS nos três sistemas avaliados percebe-se claramente a influência das forças eletrostáticas nos sistemas surfactantes aniônico SDS e catiônico CTAB, e um valor mediano em P-123 (micela não-ionica). No entanto, quando se compara os parâmetros dos quatro FS interagindo com o mesmo sistema, fica evidente, em todos os meios avaliados, uma tendência de aumento no valor de K_b (até 100x) de acordo com aumento da hidrofobicidade dos derivados.

Na realização dos ajustes da isoterma de ligação, para todos os sistemas micelares avaliados, procurou-se manter o valor N igual a um (1) (ver Equação 2), assumindo que a razão corante/micela se mantenha próxima de um equilíbrio unitário (CAETANO, 2000). Para P-123, essa metodologia se mostrou ótima, enquanto que, especificamente para surfactantes catiônicos, a tentativa de fixar o valor de N=1 resultava na diminuição do coeficiente de correlação no ajuste. A tentativa de impor o valor verdadeiro de CMC dos surfactantes também não favorece o ajuste, pois a interação bifásica FS-surfactante confere alta complexidade ao sistema, ocasionando o surgimento de valores de CMC aparente. Os melhores ajustes foram obtidos com valores de N oscilando nas proximidades de 1 e o parâmetro CMC livre e ajustável,

dentro de uma ordem de grandeza coerente com a CMC verdadeira (CAETANO, 2000). Valores de N um pouco maiores para a interação RBBDEC, do que para os outros corantes, no caso dos surfactantes iônicos SDS e CTAB sugerem o aumento da complexidade das interações, moduladas pela cauda alquílica.

Outros autores tem observado o decréscimo no valor de CMC verdadeira em ensaios envolvendo corantes com carga elétrica contrária a do surfactante (JUNQUEIRA, 2002). A diminuição no valor de CMC em duas ordens de grandeza confirma uma forte interação entre os corantes e as unidades de CTAB, formando pares iônicos que favorecem a formação da micela em concentrações de surfactante mais baixas que a verificada na ausência do corante (CAETANO, 2000).

Em SDS pode-se observar o abaixamento da CMC somente para os derivados ésteres (~30 %). Obviamente, a natureza da interação não é do tipo eletrostática, pois ambos, corante e surfactante são aniônicos, o que favorece a repulsão. No entanto, a presença da cadeia alquílica na porção éster dos corantes promove interações hidrofóbicas (van der Waals) com a cauda do surfactante, contribuindo para a diminuição da CMC. A literatura reporta diminuições nos valores de CMC do SDS ligando-se com corantes fenotiazínicos (CAETANO, 2000). Os valores de CMC, obtidos pela Equação 2, para o sistema de P-123, foram muito próximos ao da literatura. Isso indica pouca interferência dos corantes no processo de formação de micelas de surfactante não-iônico (PELLOSI, 2012), provavelmente devido a maior extensão da cadeia dos unímeros de copolímero em relação aos monômeros de surfactantes iônicos .

A literatura ainda relata que corantes xantenos desprovidos de cadeia alquílica, invariavelmente, apresentam interações em diferentes níveis com cada classe de surfactante, como por exemplo interações de menor magnitude com surfactantes aniônicos, devido a efeitos de repulsão FS-SDS (mesmo estado de carga); interações mais significativas com surfactante catiônico (estados de carga contrários) e intermediária com surfactantes poliméricos não iônicos, confirmando os resultados obtidos (PELLOSI, 2012). Adicionalmente, tem-se que apesar da natureza aniônica do

surfactante SDS, as forças hidrofóbicas geradas pela cauda alquílica inserida na modificação da RBB torna mais efetiva a interação dos derivados ésteres com este tipo de micela.

Em relação à variação espectral nos perfis de emissão, não foi possível quantificar o deslocamento nos máximos de emissão ($\Delta\lambda_{\text{máx}}$) da RBBDEC em nenhum dos sistemas surfactantes, pois em virtude da baixa solubilidade deste corante em água pura, sua emissão é praticamente nula e dessa forma não foi possível a aquisição do valor inicial. No entanto, em todos os meios, é possível verificar o deslocamento batocrômico ao longo da titulação (Figuras 36B, 38B e 42B). Ou seja, em elevadas concentrações dos surfactantes, o $\lambda_{\text{máx}}$ observado para esse FS foi praticamente o mesmo verificado para os outros ésteres. Isso é indicativo de que em altas razões micela/corante todos os derivados ésteres estejam particionados para um micro-ambiente com características de polaridade similar.

Quando os corantes são expostos a ambientes de menor polaridade, a energia necessária para promoção da molécula ao estado excitado torna-se menor, resultando em emissões deslocadas para o vermelho. (PELLOSI, 2012, LAKOWICZ, 2006). Estudos mostram a mesma tendência observada no processo de interação dos corantes xantênicos tanto em micelas quanto em solvente orgânico (CHANG, 2008; CHAKRABORTY, 2011). Em ambos os casos, o deslocamento pode ser associado à diminuição das interações solvente-soluto, tais como ligações de hidrogênio (SONG, 2000; BHOWMIK, 2005; KIBBLEWHITE, 1989). Além disso, as ligações de hidrogênio favorecem processos colisionais entre o corante e moléculas de água, levando a supressão de fluorescência por conversão interna. Assim, tanto o deslocamento do $\lambda_{\text{máx}}$ como o aumento na intensidade de emissão estão relacionados com a mudança de micro-ambiente químico (MARTIN, 1975), indicando a associação do FS à micela.

4.6 Determinação das constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV})

Embora os parâmetros de ligação (K_b , CMC e N) forneçam importantes informações sobre a interação primária entre o FS e as micelas de surfactante, eles não são suficientes para se avaliar a localização relativa dos mesmos nestes sistemas. Emprega-se, então, estudos baseados na variação da intensidade de emissão de fluorescência dos FS para se estimar a localização relativa dos FS no núcleo hidrofóbico das micelas (CHATELIER, 1984; FERNANDES, 2002). O princípio da técnica é a utilização de uma espécie supressora da energia do estado excitado na desativação dos FS. O grau de acessibilidade do íon iodeto, espécie supressora de caráter hidrofílico, às moléculas dos FS resulta em um maior ou menor decaimento na intensidade de emissão dos mesmos, sendo a razão F_0/F utilizada para a quantificação através da Equação 4 (LAKOWICZ, 2006). A supressão da energia do estado excitado ocorre por colisões entre o íon iodeto e as moléculas dos xantenos (supressão dinâmica), resultando no decréscimo da emissão de fluorescência dos mesmos (Figura 2) (BLATT, 1985; FERNANDES, 2002). A determinação da constante de supressão de Stern-Volmer (Equação 3) para RBB, RBBMET e RBBBUT foi realizada primeiramente em meio aquoso (tampão pH=7,25) para análise comparativa com os sistemas micelares. Devido à auto-agregação gerada por sua elevada hidrofobicidade, RBBDEC não apresenta emissão de fluorescência em água, não sendo possível avaliar a constante de Stern-Volmer neste meio.

Na Figura 45 são apresentados os decaimentos na intensidade de emissão dos FS em água e os ajustes dos pontos experimentais utilizada para a determinação dos valores de K_{SV} em meio aquoso.

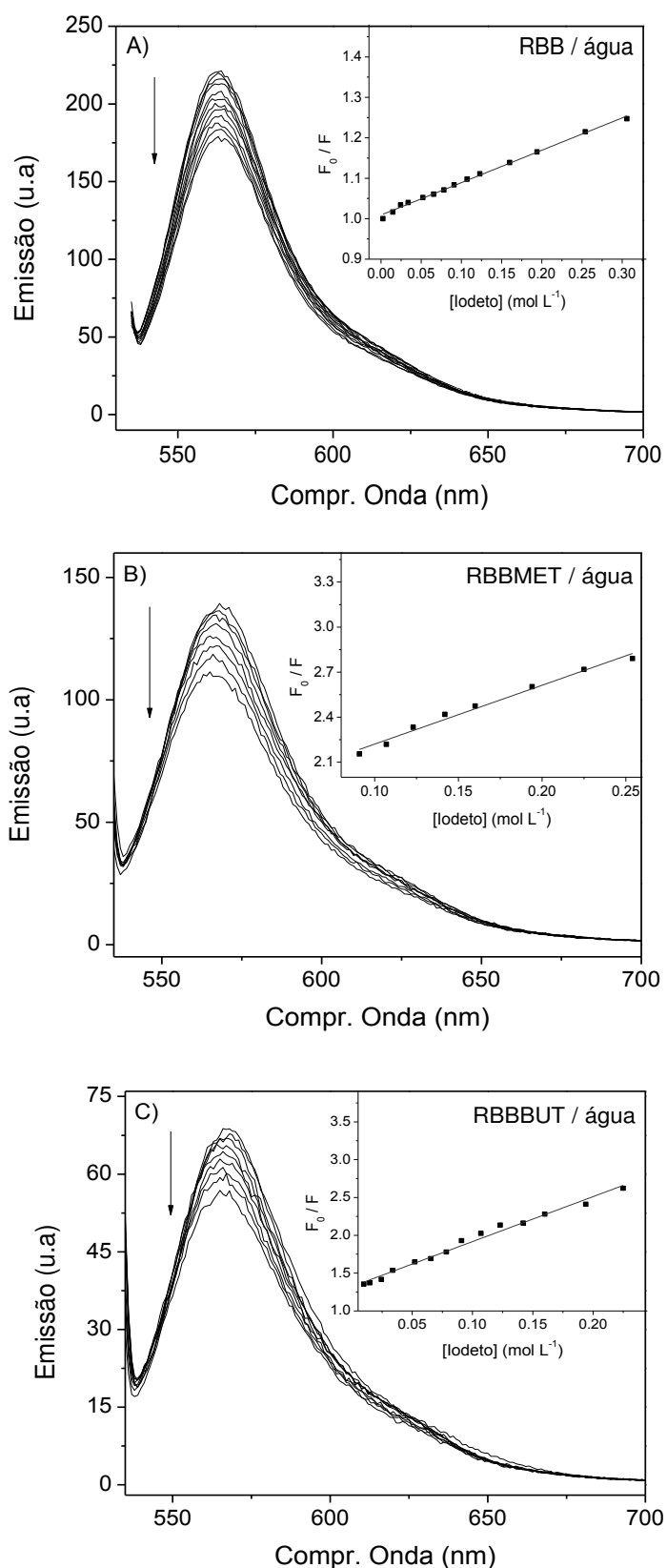


Figura 45: Emissão de fluorescência dos FS em água, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET e (C) RBBBUT. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $T=30^\circ\text{C}$, **RBB** ($\lambda_{exc}= 490 \text{ nm}$); **ésteres** ($\lambda_{exc}= 520 \text{ nm}$).

Nas Figuras 46, 47 e 48 são apresentados os decaimentos na intensidade de emissão dos FS e os ajustes dos pontos experimentais utilizados para a determinação dos valores de K_{SV} nos sistemas surfactantes SDS, P-123 e CTAB, respectivamente.

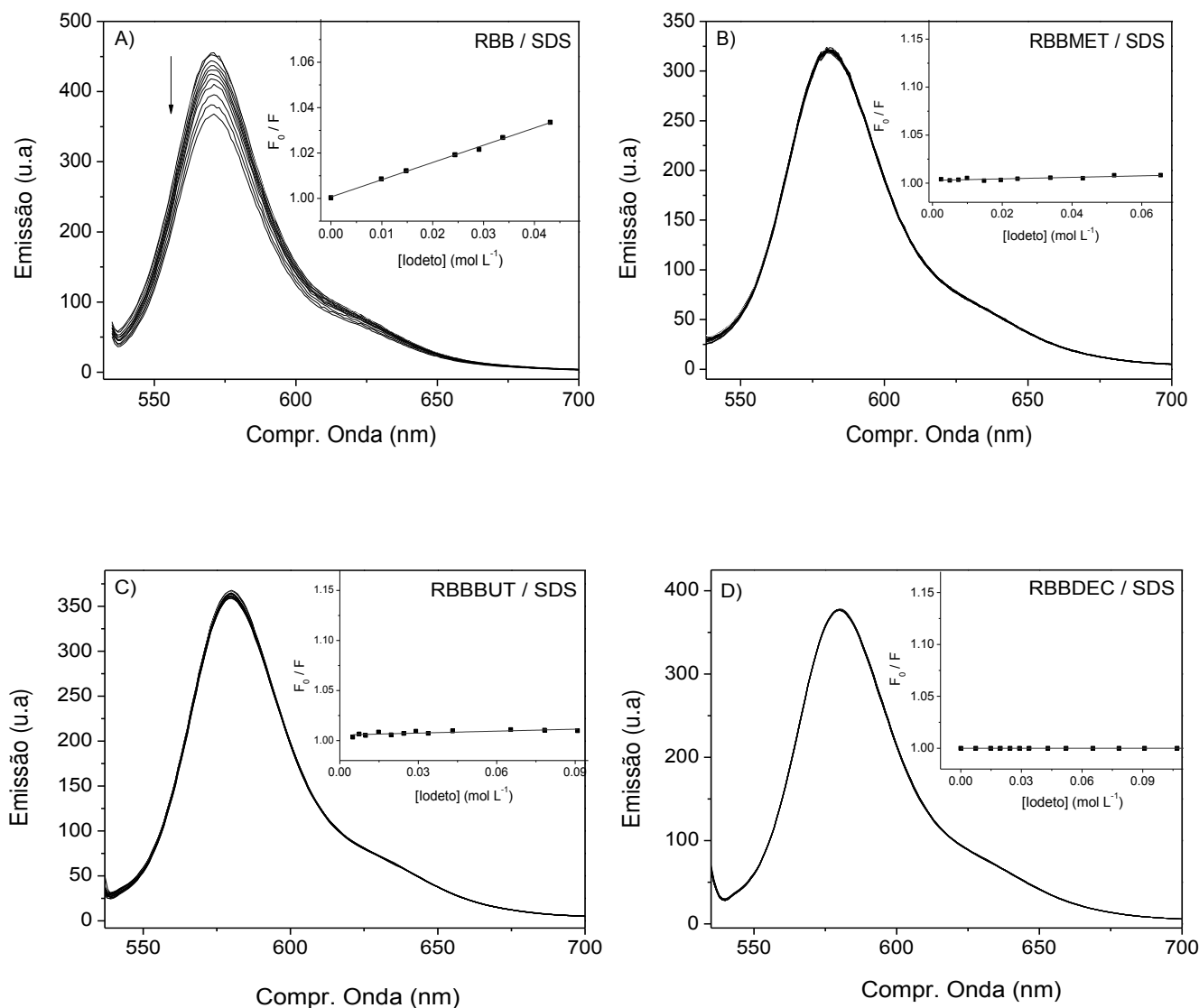


Figura 46: Emissão de fluorescência dos FS em SDS, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET, (C) RBBBUT, (D) RBBDEC. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $T=30^\circ\text{C}$, **RBB** ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); **ésteres** ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$).

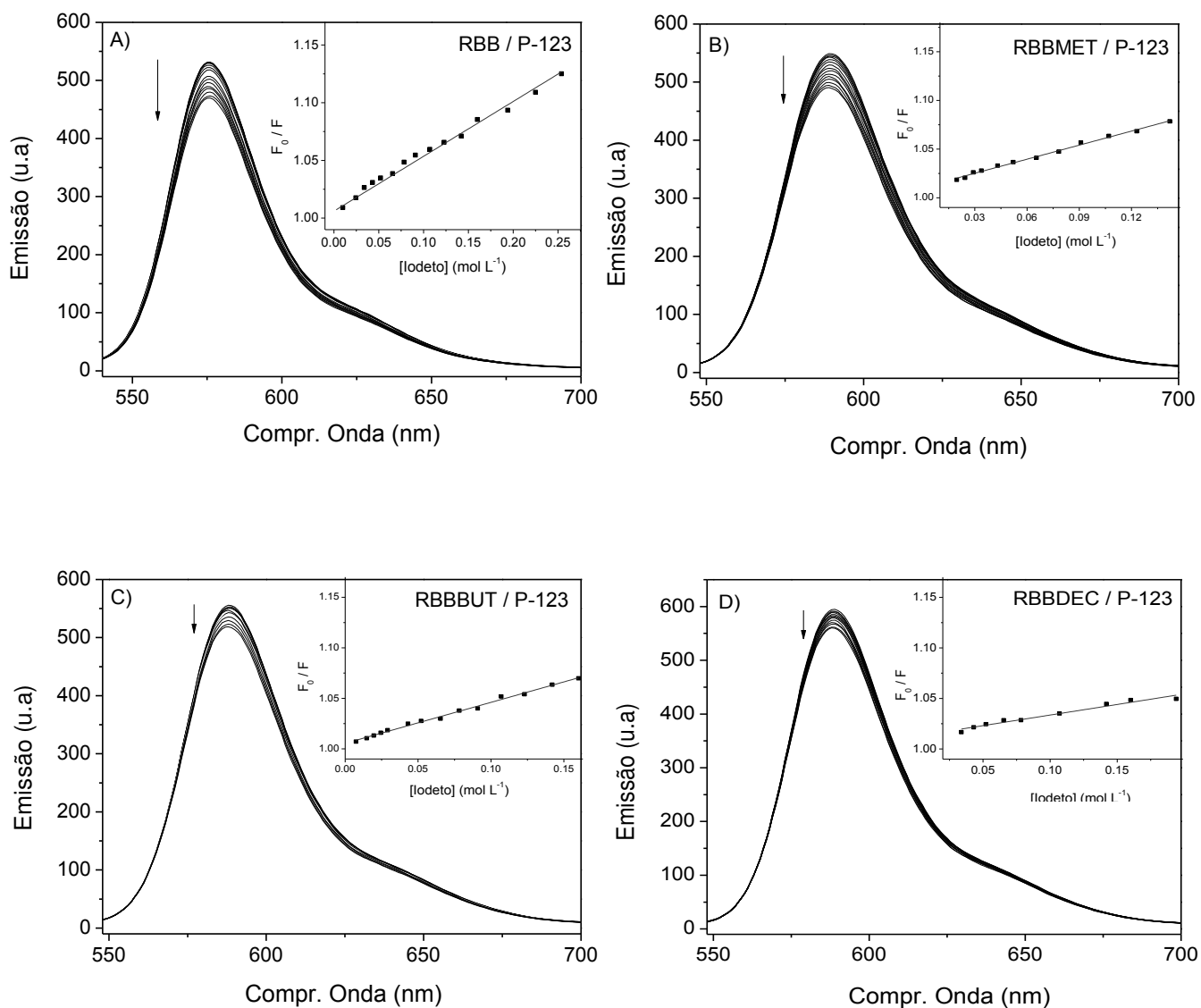


Figura 47: Emissão de fluorescência dos FS em P-123, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET, (C) RBBBUT, (D) RBBDEC. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, $[NaCl] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $T=30^\circ\text{C}$, **RBB** ($\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$); **ésteres** ($\lambda_{exc} = 520 \text{ nm}$).

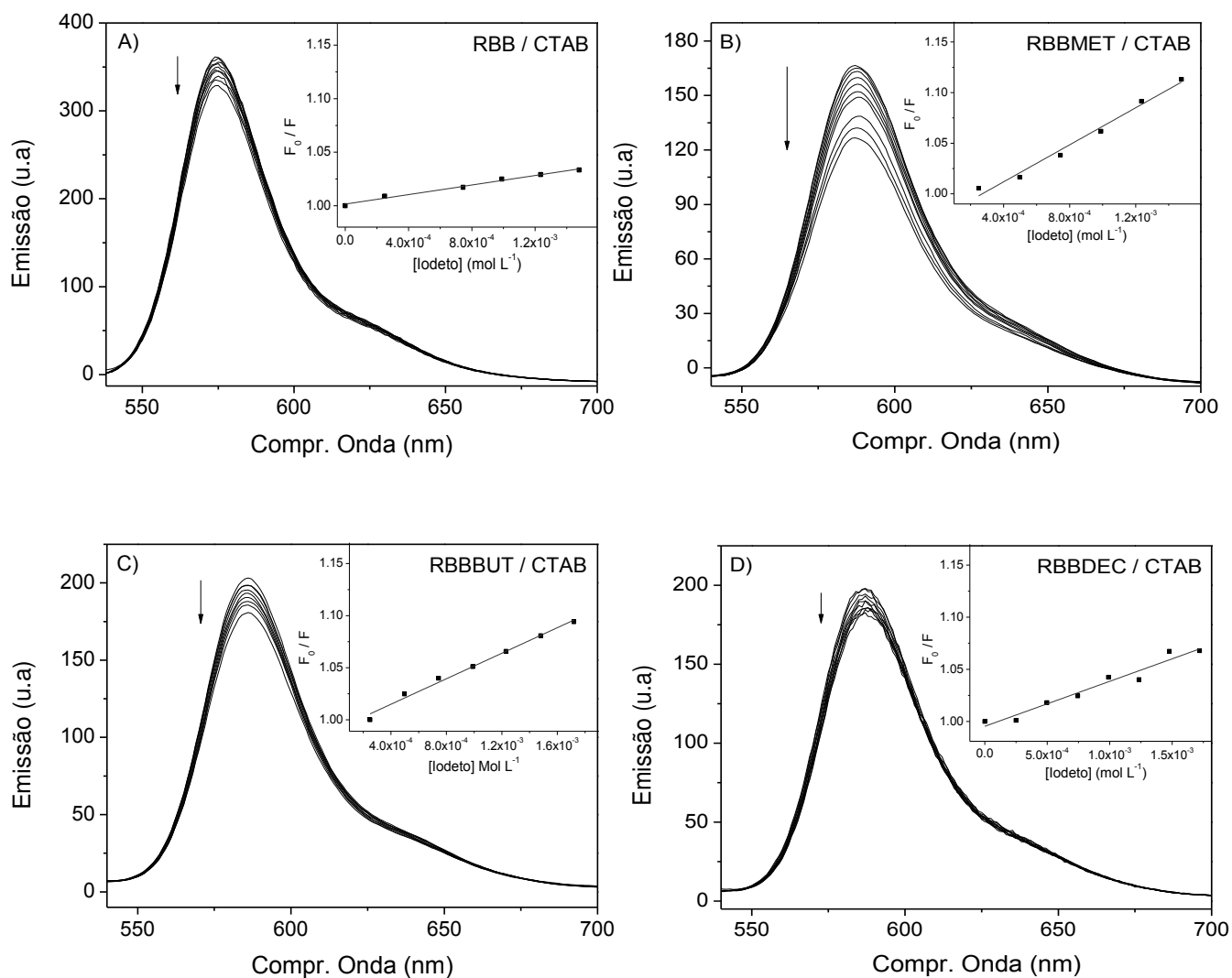


Figura 48: Emissão de fluorescência dos FS em CTAB, após sucessivas adições de supressor iodeto. (A) RBB, (B) RBBMET, (C) RBBBUT, (D) RBBDEC. Nos insertes estão os gráficos com os ajustes experimentais utilizados para determinação das constantes de Stern-Volmer. pH = 7,25, [NaCl] = 0,1 mol L⁻¹, T=30°C, **RBB** (λ_{exc} = 490 nm); **ésteres** (λ_{exc} = 520 nm).

Conforme pode ser observado nas Figuras 46, 47 e 48, existe uma dependência linear entre a supressão de fluorescência verificado para todos os FS/sistemas micelares avaliados e a concentração de iodeto, caracterizando um processo de supressão dinâmica, onde predomina a desativação por colisões entre as moléculas (SVIRBELY, 1954; CHATELIER, 1984; BLATT 1985; PELLOSI, 2012). Na figura 49 são apresentados os gráficos de Ster-Volmer dos FS em cada meio para a análise comparativa. Os valores de K_{SV} são apresentados na Tabela 14.

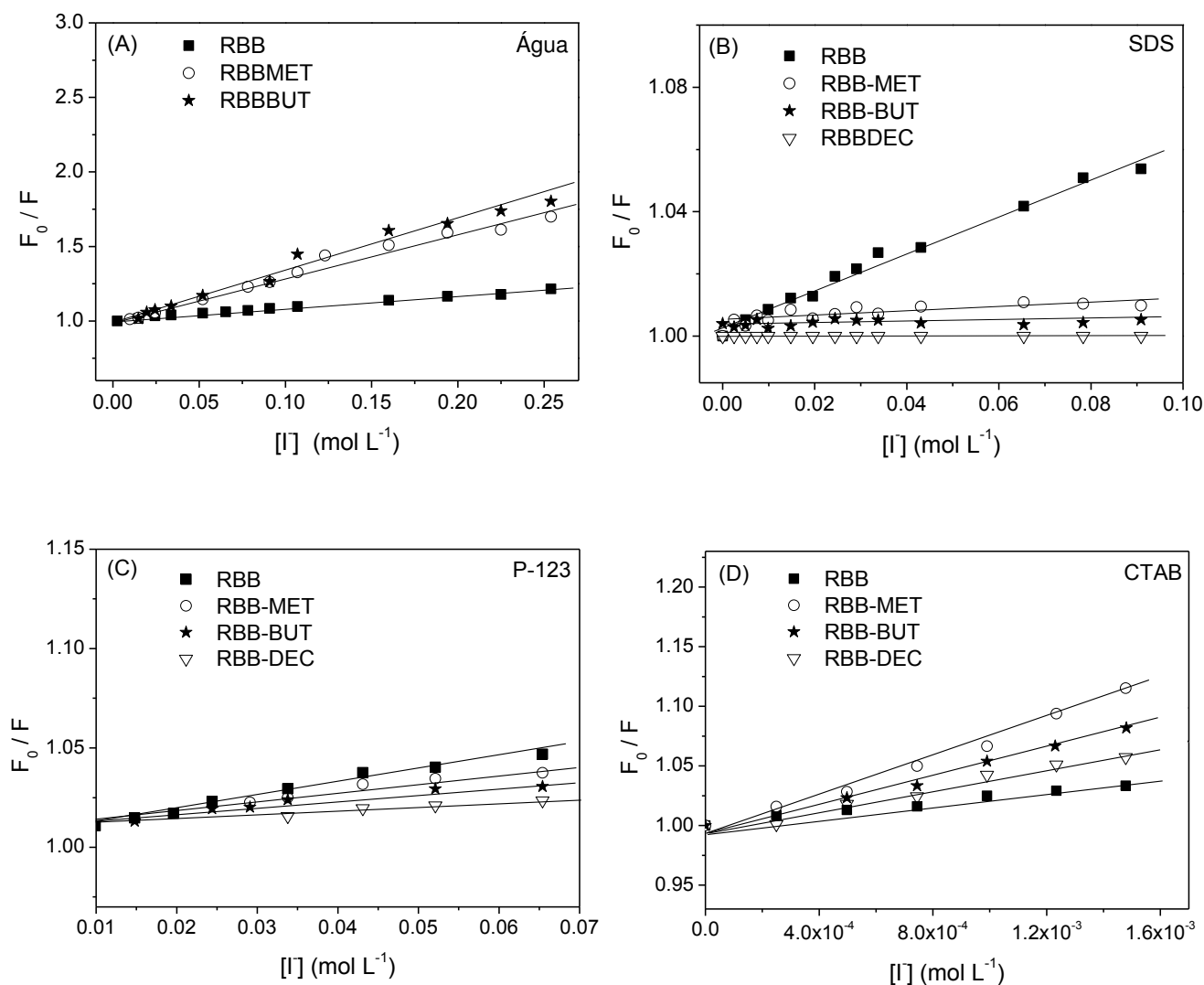


Figura 49: Gráficos de Stern-Volmer dos xantenos, obtidos através dos estudos de supressão de fluorescência. $[corantes] = 5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, pH 7,25, $[NaCl] = 0,1$ Mol L⁻¹, 30,0 °C em: (A) água; (B) SDS; (C) P-123 and (D) CTAB.

Observando a Tabela 14, percebe-se que a constante de Stern-Volmer (K_{SV}) da RBB (dianiônica), em meio aquoso, é até 5x menor que a K_{SV} dos derivados ésteres. A dupla carga negativa da RBB aumenta o grau de repulsão eletrostática entre a molécula desse FS e os íons iodeto que interagem no mesmo meio, dificultando o processo de supressão. A diferença entre os valores de K_{SV} obtidos para RBBMET e RBBBUT podem estar associados à formação de pequenos agregados (dímeros ou trimeros) durante a execução do experimento, contribuindo, assim, com uma parcela de auto-supressão no valor total de K_{SV} (SVIRBELY, 1953; ARBELOA, 1989, LAKOWICZ, 2006).

Tabela 14: Valores de constante de Stern-Volmer (K_{SV}) calculadas através da Equação 3, para estimativa da supressão de fluorescência dos xantenos pelo iodeto.

FS	K_{SV} (L mol ⁻¹)			
	Água*	SDS	P-123	CTAB
RBB	0,80 (± 0,01)	0,76 (± 0,04)	0,48 (± 0,01)	22,2 (± 1,4)
RBBMET	3,92 (± 0,20)	0,08 (± 0,01)	0,39 (± 0,02)	94,2(± 5,7)
RBBBUT	5,81 (± 0,15)	0,06 (± 0,02)	0,33 (± 0,01)	59,2 (± 2,8)
RBBDEC	- - -	0,00 (± 0,01)	0,23 (± 0,01)	40,5 (± 2,3)

* Tampão McIlvaine, pH 7,25.

[FS] = $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, pH 7,25 e [NaCl] = 0,1 mol L⁻¹ a 30,0 °C. [SDS] = $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [P-123] = $1,7 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [CTAB] = $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

O valor de K_{SV} obtido para RBB em SDS (0,76) é muito similar ao encontrado para o corante em água (0,80). Considerando a incerteza experimental, podemos atribuir o mesmo K_{SV} para ambos os sistemas, indicando que as moléculas deste corante permanecem preferencialmente na fase aquosa, com apenas uma fração particionada para dentro das micelas aniônicas. Isso é corroborado pelos baixos valores de constante de ligação (K_b) observados para este FS (Figura 36A e Tabela 11). No sistema SDS, os valores de K_{SV} obtidos para RBBMET e RBBBUT foram muito próximos e indicam pouco acesso do iodeto ao sítio cromofórico dos FS. A superfície da micela de SDS tem elevado potencial de cargas negativas, repelindo as moléculas de supressor, também aniônico. Uma vez particionada para dentro da micela, a molécula do FS fica protegida pela barreira formada pelos grupos cabeças aniônicas do surfactante.

No caso da RBBDEC, o valor de K_{SV} encontrado foi igual a zero, o que demonstra total proteção do sítio cromofórico do corante à aproximação do iodeto. Levando em consideração o tamanho da cadeia alquílica deste éster (10 C) e admitindo a hipótese do corante participar da formação da micela como co-surfactante, então o anel xantênico (região cromofórica do corante), estaria situado nas imediações da camada de Stern (superfície formada pelos grupos cabeças polares do surfactante), que no

caso do aniônico SDS tende a repelir a presença do iodeto, devido ao seu potencial negativo de superfície (BENITO, 1997).

A grande variação entre os resultados obtidos em surfactante aniônico SDS e catiônico CTAB, está claramente relacionada à repulsão / atração eletrostática que os FS sofrem em relação à camada de Stern das respectivas micelas. Os íons iodeto, mesmo sendo utilizado uma concentração 10 vezes menor, são atraídos pela camada de Stern da micela de CTAB, localizando-se muito próximos do corante encapsulado, o que facilita o processo de supressão. Embora a literatura aponte que a supressão de fluorescência nos xantenos seja devido a um processo de supressão dinâmico, os elevados valores de K_{SV} em CTAB podem ter sido causados pela ocorrência, concomitante, de supressão estática (SVIRBELY, 1954). É interessante notar que em CTAB, o menor valor de K_{SV} foi encontrado para RBB. Esse dado parece ser contraditório com as discussões feitas até aqui, pois se espera que, por ser dianiônico, esse FS estivesse alocado junto à camada de Stern, como já foi observado com outros corantes aniônicos (MANIASSO, 2001; GAIDAMAUSKAS, 2010), facilitando o contato com o iodeto. Porém, a hipótese da formação de agregados pré-micelares de RBB e monômeros de CTA^+ apresentada por Bilski (BILSKI, 1997), admite a possibilidade de alocação do corante em regiões da micela onde fica protegido do ataque do supressor.

No caso do surfactante polimérico P-123, onde não se tem a influência de forças eletrostáticas, a ordem nos valores de supressão foi a seguinte: RBB > RBBMET > RBBBUT > RBBDEC. Isso confirma os dados de K_p e K_b (Tabelas 10 e 12), mostrando que o aumento da cadeia alquílica, influencia na partição do corante para o núcleo hidrofóbico da micela. Entretanto, como se trata de um sistema micelar formado por copolímeros complexos e extensivamente hidratados, a acessibilidade dos íons iodeto no microambiente PEO torna-se possível. Mesmo assim, o corante que sofre maior supressão no sistema P-123, RBB (0,48), apresenta uma K_{SV} 40% menor que o valor obtido em água (0,80) indicando que a alocação dos corantes em regiões mais hidrofóbicas da micela polimérica é possível, apesar de sua complexidade estrutural (KNOW, 1995).

Os valores de K_{SV} , para os derivados ésteres, seguem sempre a mesma tendência para todos os surfactantes avaliados, sendo: RBBMET > RBBBUT > RBBDEC. Portanto, quanto maior a cadeia alquílica inserida na RBB, menos acessível o corante se torna para os íons iodeto, demonstrando que o tamanho da cadeia alquílica é fator primordial na modulação da alocação do corante no ambiente intra-micelar. Valores de K_{SV} relativamente maiores para RBBMET, em todos os surfactantes, indicam que este corante não se aloca profundamente na micela, ficando próxima da superfície interna da mesma; região onde está sujeito a supressão pelo iodeto e, até mesmo, por moléculas de água (SVIRBELY, 1954; SCHULZ, 1991).

Os resultados obtidos nos ensaios de K_{SV} apontam para uma interação significativa dos derivados ésteres com os modelos de membrana (micelas iônicas). As micelas poliméricas do Plurônico® P-123, por sua vez, apresentaram grande potencial para utilização como sistema transportador dos FS. Entretanto, essas interações serão realmente significativas, somente se houver a manutenção das propriedades fotofísicas que tornam a classe dos corantes xantenos potencialmente útil à TFD. Essas propriedades serão discutidas a seguir.

4.7 Determinação das propriedades fotofísicas dos fotossensibilizadores

Dentre as propriedades fotofísicas dos corantes, quando estes são candidatos a fármacos fotossensibilizadores para aplicação em TFD, o rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) e o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta^1O_2}$) são fundamentais. Por esses parâmetros pode-se e avaliar a ação fotodinâmica e, assim, fazer previsões sobre a viabilidade da utilização do corante como fármaco.

4.7.1 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)

A desativação de estados excitados por fluorescência é um processo competitivo a geração de oxigênio singlete. Assim baixos rendimentos quânticos de fluorescência, em geral, favorecem altos rendimentos quânticos de oxigênio singlete. O Φ_f pode ser obtido através da Equação 5, utilizando os máximos de absorção e emissão ($\lambda_{m\acute{a}x}$) dos respectivos espectros. Entretanto, com a disponibilidade do uso de ferramentas de integração matemática (Origin 8), optou-se por usar toda a área delimitada pelo espectro de emissão para se efetuar o cálculo. Na Figura 50 são apresentados, os espectros de absorção e de emissão da RBBMET, exemplificando todos os FS avaliados.

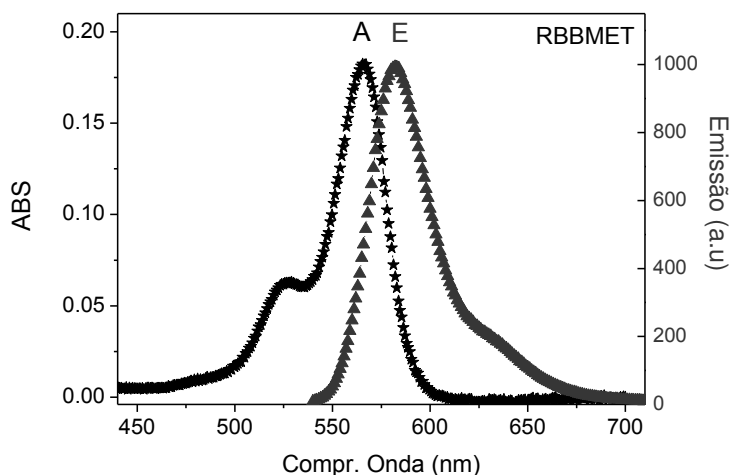


Figura 50: Sobreposição dos espectros de (A) absorção eletrônica e (E) emissão de fluorescência para o corante RBBMET.

Depois de gravados os espectros de absorção e emissão, foram determinados o $\lambda_{m\acute{a}x}$ de absorção e a área abaixo da curva de emissão, cujos valores foram aplicados na Equação 5. Os resultados de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) obtidos em meio homogêneo (água), assim como nos sistemas micro-heterogêneos (sistemas FS/micela), são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Valores de rendimento quântico de Fluorescência (Φ_F) dos FS em meio homogêneo (água). [corantes] = $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. [SDS] = $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [P-123] = $1,7 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [CTAB] = $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, pH=7,25, [NaCl] = $0,1$ mol L⁻¹, T = 30°C.

	Φ_F			
	Água	SDS	P-123	CTAB
RBB	0,02	0,02	0,07	0,14
RBBMET	0,01	0,02	0,08	0,11
RBBBUT	*	0,02	0,10	0,09
RBBDEC	*	0,01	0,10	0,09

* Não avaliado em virtude da auto-agregação destes corantes em meio aquoso.

Os valores de rendimento quântico de fluorescência obtidos são compatíveis com os valores encontrados para outros corantes xantenos na literatura (SONG, 2000; ZHANG, 2008; ZHANG, 2010; PELLOSI, 2012). O rendimento quântico de fluorescência cai drasticamente em relação à fluoresceína (0,92), pois a RBB e seus derivados ésteres são substituídos com átomos de Iodo diretamente no anel xantênico. A presença de átomos pesados favorece o processo de cruzamento intersistema, que leva os FS ao estado triplete e resulta, como consequência direta, no aumento do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (ZHANG, 2008). Isso representa um fator extremamente favorável para a utilização desses corantes como fotossensibilizadores em TFD e IFDMO.

Os valores obtidos de Φ_F para os corantes, medidos no mesmo meio, são similares entre si, evidenciando que a adição da cauda alquílica não modificou a região cromofórica da molécula, preservando inalteradas suas propriedades fotofísicas. A variação dos resultados de um meio em comparação com outro demonstra que o ambiente químico exerce influencia sobre a fluorescência dos FS. Uma menor polaridade do meio favorece a desagregação dos corantes, aumentando sua emissão de fluorescência (ZHANG, 2008), como pode ser observado para os derivados ésteres em

micelas de P-123, assim como para RBB que, como já visto (Item 4.5), está alocada numa região mais interna da micela de CTAB que os demais corantes.

4.7.2 Determinação do rendimento quântico de formação de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1O_2$)

Considerando que a ação fotodinâmica ocorre principalmente via oxigênio singlete, obter o valor de seu rendimento quântico (Φ_{Δ}) torna-se indispensável para avaliar atividade fotodinâmica do corante. Em meio homogêneo, a geração de oxigênio singlete foi quantificada pela técnica da oxidação fotoinduzida do ácido úrico, iluminando com LED (GEROLA, 2012; RABELLO, 2012). Na Figura 51 são mostradas, além da banda de absorção eletrônica UV-Vis do ácido úrico (AU), a sobreposição espectral entre a banda de emissão do LED e a banda de absorção do FS.

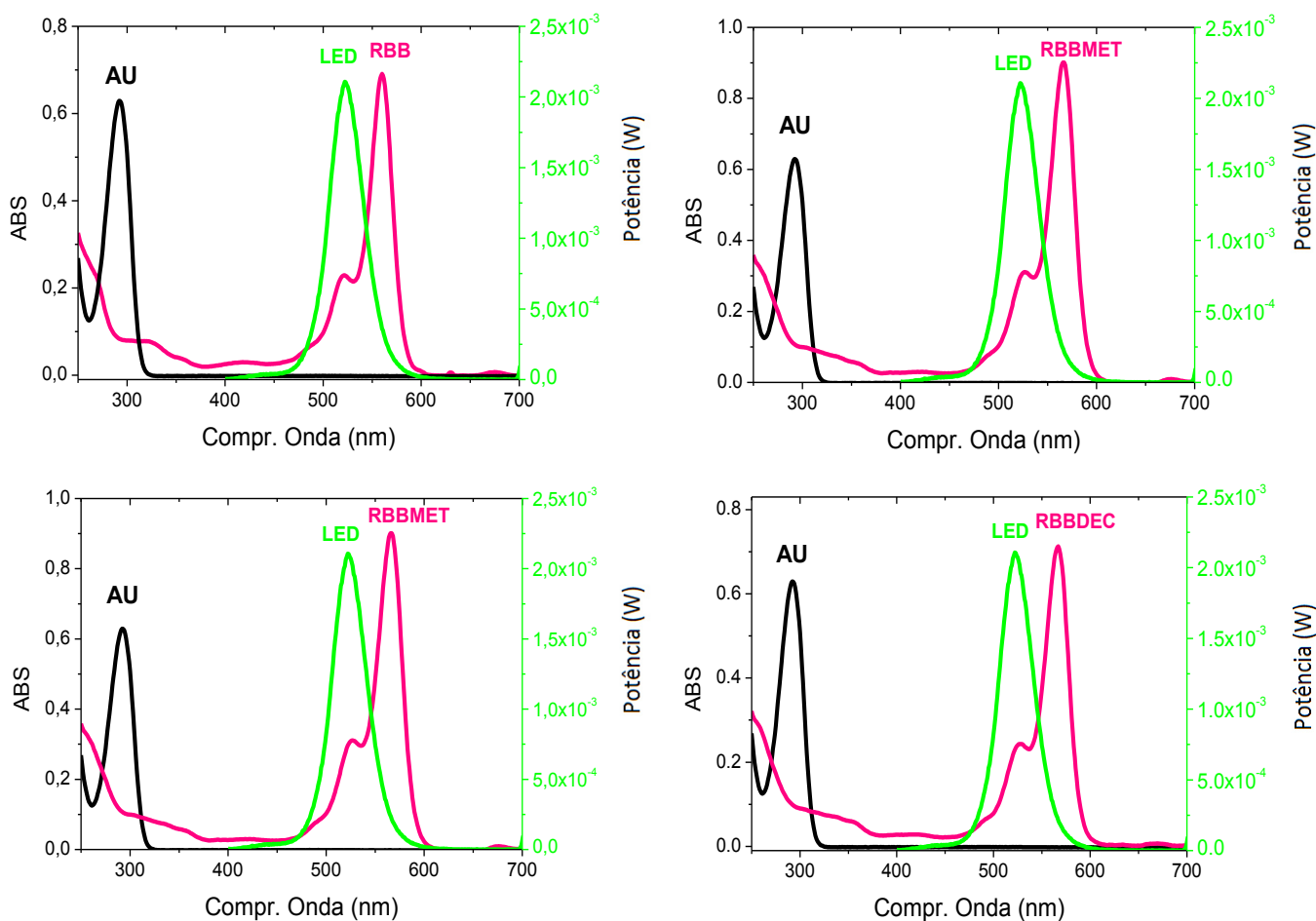
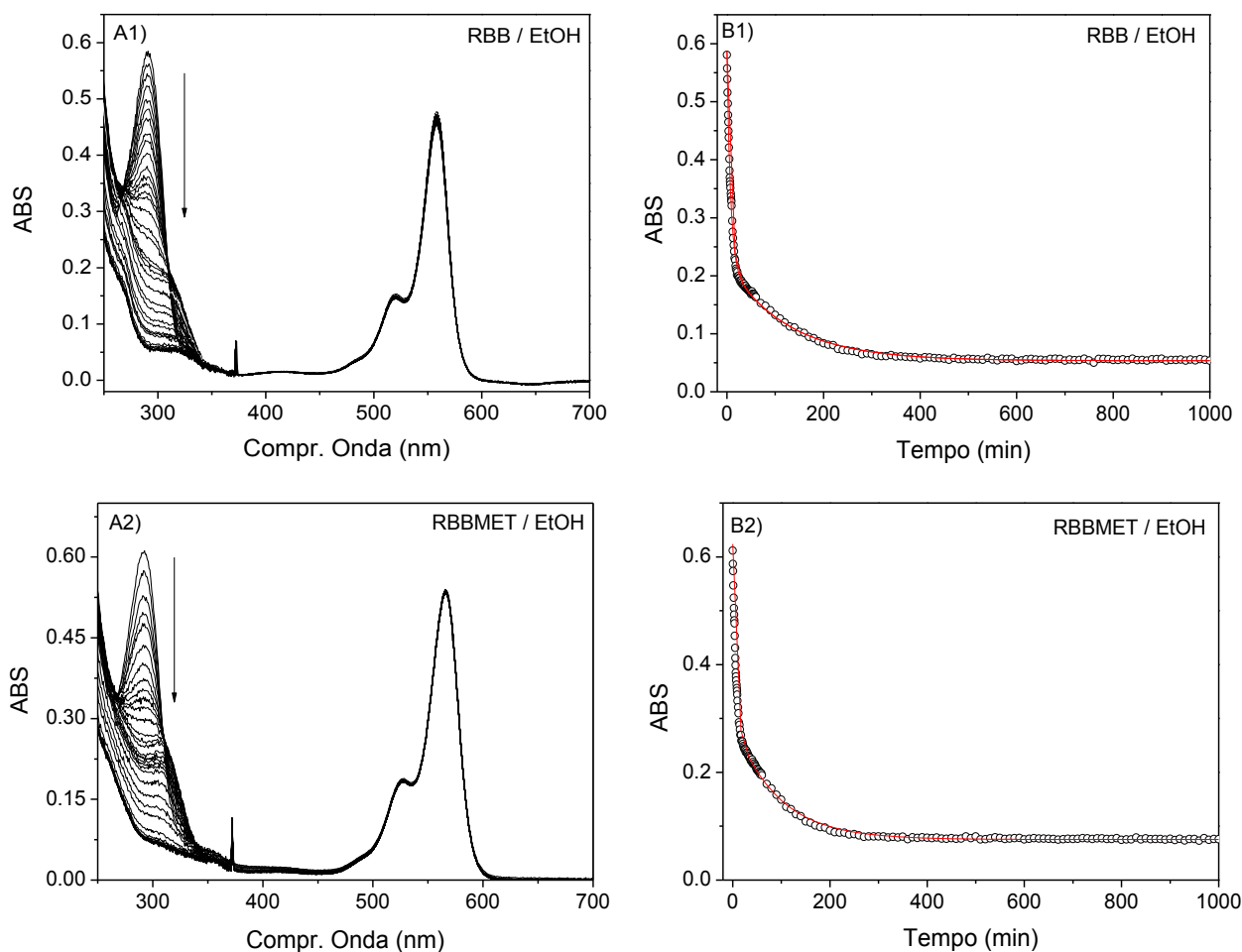


Figura 51: Sobreposição dos espectros de intensidade de emissão do LED ($\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$), absorção eletrônica UV-Vis do ácido úrico (AU) ($\lambda_{\text{máx}} = 292 \text{ nm}$) e dos FS em etanol.

O ácido úrico (AU) possui características antioxidantes (Ames et al., 1981), sendo um excelente sequestrante de oxigênio singlete, por isso vem sendo usado como sonda para a determinação do $\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$ (FISCHER, 1988; GEROLA, 2012; RABELLO, 2012).

Observa-se na Figura 51 que todos os FS apresentam sobreposição de suas bandas de absorção UV-Vis com a banda de emissão do LED. Isso garante que o FS absorve uma parcela dos fótons emitidos pelo LED, sendo o número de fótons absorvidos calculado pela Equação 6. É importante observar que o ácido úrico não absorve na região de emissão do LED, sendo que apenas o FS absorve luz neste intervalo do espectro eletromagnético. Assim a diminuição da banda de absorção eletrônica do AU é decorrente de sua degradação pela oxidação fotoinduzida do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) gerado pelo FS ao ser iluminado. Na Figura 52 pode-se observar as bandas de absorção dos corantes, o decaimento da banda de absorção do AU na coluna A; e a curva obtida na cinética de degradação do mesmo na presença de cada FS em etanol na coluna B.



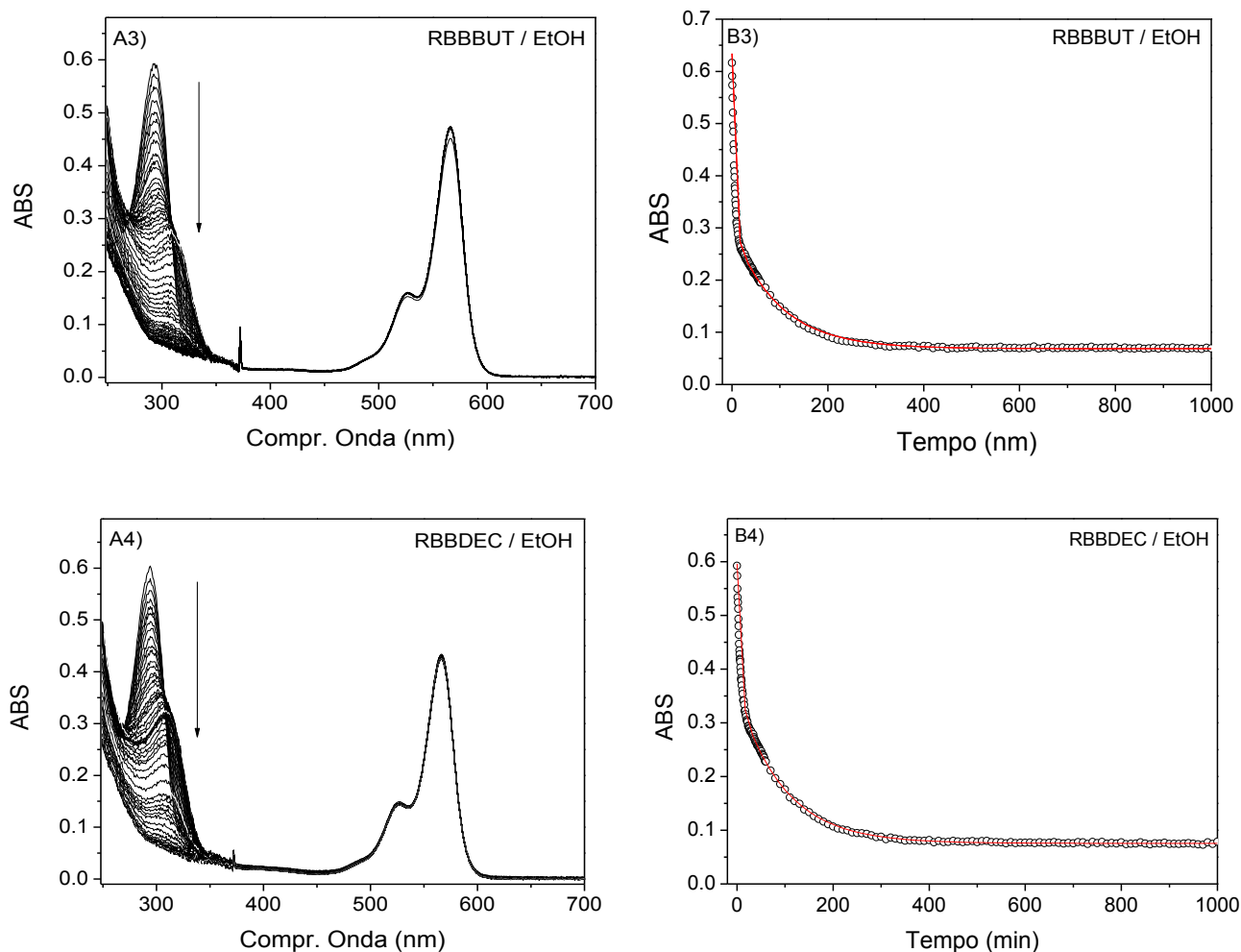


Figura 52: (A) Variação nos espectros de absorção eletrônica UV-Vis do ácido úrico (AU) ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença dos FS xantenos em etanol, com a irradiação contínua de luz verde (LED com $\lambda_{\text{máx}} = 518 \text{ nm}$). (B) Cinética de degradação do ácido úrico em 293 nm . [FS] = $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $T = 30^\circ\text{C}$. Os índices 1, 2, 3 e 4 referem-se aos FS RBB, RBBMET, RBBBUT e RBBDEC, respectivamente.

Para todos os FS observa-se uma diminuição acentuada da banda referente à absorção do AU (293 nm), indicando que o mesmo está sendo degradado. Porém, não se observa diminuição da banda referente à absorção dos corantes ($\sim 570 \text{ nm}$), o que evidencia que em etanol esses FS não sofrem fotobranqueamento. Portanto para o cálculo do número de fótons absorvidos (Equação 6) a parte da integral que considera o fotobranqueamento será igual a 1. Assim, pôde-se calcular o número de fótons absorvidos (N_{Abs}) utilizando-se os espectros de absorção eletrônica UV-Vis e o de emissão do LED. As constantes cinéticas (k_1) foram obtidas através do ajuste

matemático teórico biexponencial do decaimento da concentração de AU ($\lambda_{\text{máx}} = 293$ nm). Os experimentos foram realizados em três diferentes concentrações de FS, com os respectivos valores apresentados na Tabela 16.

Tabela 16: Número de fótons absorvidos pelos FS com iluminação LED ($\lambda_{\text{máx}} = 218$ nm) e constantes de velocidade (k_1) determinadas nos experimentos de oxidação fotoinduzida do AU.

FS	Experimento	[FS] (10^{-6} mol L $^{-1}$)	N_{Abs} (10^{-8})	k_1 (10^{-3})
RBB	1	1,3	1,1	1,2
	2	3,7	2,1	2,3
	3	6,2	3,6	5,2
RBBMET	1	1,8	1,1	1,1
	2	5,2	2,3	2,8
	3	8,6	3,9	5,8
RBBBUT	1	1,6	0,8	1,2
	2	4,7	2,4	3,5
	3	7,7	3,3	5,4
RBBDEC	1	1,4	0,8	1,3
	2	4,1	2,1	3,0
	3	6,8	3,1	4,5

A eficiência fotodinâmica química (γ_{Δ}) é obtida pela razão k_1/N_{Abs} (Equação 7), sendo que efetivamente, foi utilizado o coeficiente angular da reta obtida pelo ajuste dos pontos calculados a partir dos resultados experimentais obtidos em diferentes concentrações dos FS, conforme mostrado na Figura 53.

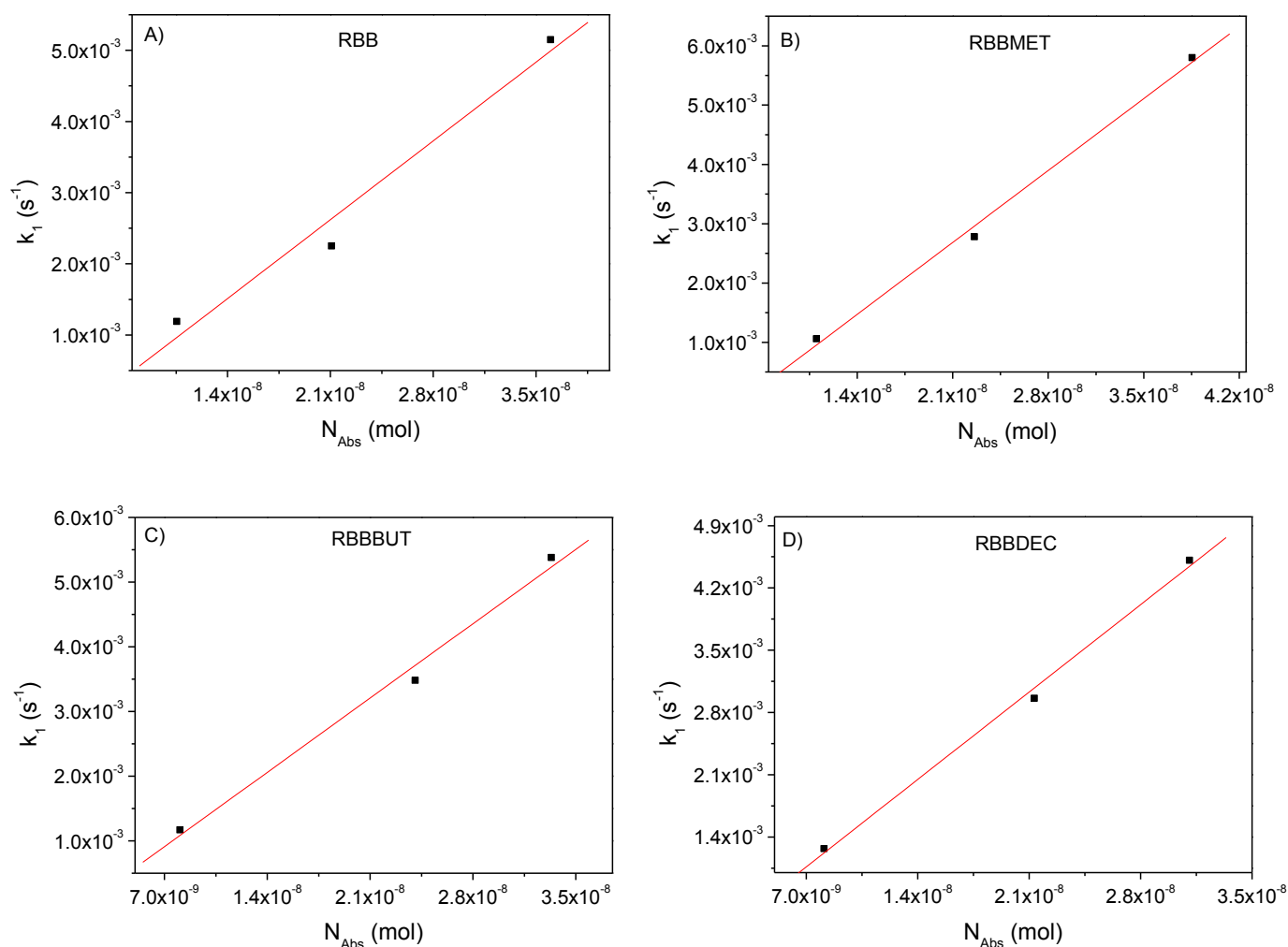


Figura 53: Gráficos da constante de decaimento da concentração de ácido úrico pela oxidação fotoinduzida via 1O_2 (k_1) versus número de fótons absorvidos pelos FS em diferentes concentrações.

Os valores da eficiência fotodinâmica química (γ_Δ) dos FS são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Valores de eficiência fotodinâmica química (γ_Δ) obtidos através da Equação 7 para os FS xantenos em etanol.

FS	γ_Δ (10^4)
RBB	1,58
RBBMET	1,73
RBBBUT	1,64
RBBDEC	1,40

Com os valores de eficiência fotodinâmica química (γ_{Δ}) utilizou-se a Equação 8 para calcular os valores de rendimento quântico de oxigênio singlete em etanol (Tabela 18) usando a RBB como padrão (FLEMING, 1977).

Em meio micro heterogêneo formado por micelas de surfactante, o uso da metodologia que emprega o AU como sonda fica prejudicada em função de dificuldades experimentais que ocasionam desvios significativos nos resultados. Por isso os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) foi determinado pela Equação 9, que utiliza a área do espectro de emissão e o tempo de vida (τ) de fosforescência do $^1\text{O}_2$ gerado pelo FS. O cálculo foi feito com a utilização da própria RBB como padrão. Na figura 54 é mostrado, como exemplo, o espectro de emissão e o decaimento de fosforescência do $^1\text{O}_2$ gerado pela RBBDEC em micelas de P-123.

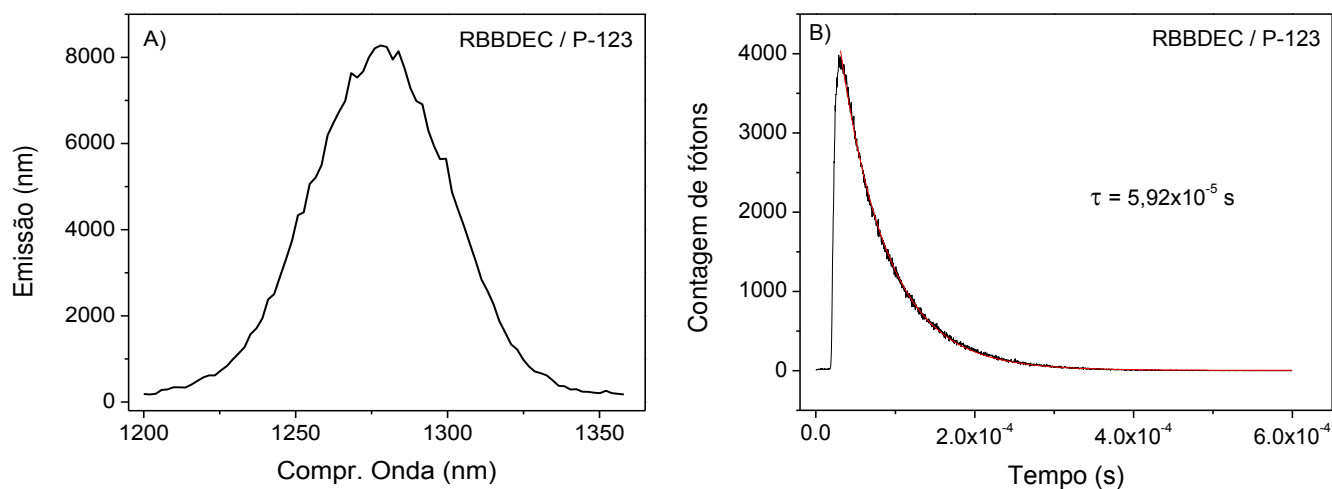


Figura 54: Parâmetros utilizados para cálculo do rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) (Equação 9): (A) Espectro de Emissão de fosforescência do $^1\text{O}_2$ e (B) ajuste exponencial de primeira ordem para a curva de decaimento de fosforescência do $^1\text{O}_2$ gerado pela RBBDEC em meio micro-heterogêneo formado por micelas de P-123.

Os valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singlete obtidos em meio homogêneo (etanol) e nos meios micro-heterogêneos formados pelos sistemas surfactantes são apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Valores de rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) dos FS em meio homogêneo (etanol) e micro-heterogêneo (surfactantes). [corantes] = $5,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. [SDS] = $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [P-123] = $1,7 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹; [CTAB] = $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, pH=7,25, [NaCl] = 0,1 mol L⁻¹, T = 30°C.

	$\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$			
	Etanol	SDS	P-123	CTAB
RBB	0,86	0,71	0,81	0,65
RBBMET	0,83	0,93	0,68	0,78
RBBBUT	0,89	0,94	0,71	0,80
RBBDEC	0,88	0,83	0,68	0,76

Os resultados de rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) complementam valores de rendimento quântico fluorescência (Φ_F) obtidos (Tabela 15), para todos os FS em todos os meios avaliados. Isso demonstra que a inserção de cauda alquílica na molécula de RBB aumenta a sua interação com as micelas, mas não interfere drasticamente na geração de oxigênio singlete. Os valores obtidos em meio micro-heterogêneo, em geral, tiveram ligeira diminuição em relação aos valores verificados em meio homogêneo (etanol). Tais resultados demonstram que o encapsulamento dos FS no microambiente micelar, a princípio, não compromete a atuação dos corantes como FS em TFD e IFDMO. Os resultados conclusivos serão obtidos com testes da ação fotodinâmica dos FS contra micro-organismos.

4.8 Determinação dos parâmetros de atividade foto-microbicida dos FS contra bactérias *S. aureus*.

Depois de finalizados os estudos físico-químicos e fotofísicos dos fotossensibilizadores, iniciou-se a avaliação da atividade dos mesmos na inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO). O micro-organismo escolhido para os

ensaios foi a bactéria gram positiva *Staphilococcus aureus* (*S. aureus*). Os parâmetros investigados foram a influência da concentração dos FS xantenos encapsulados em micelas poliméricas de P-123, do tempo de iluminação e da concentração de surfactante P-123 sobre a inativação das bactérias.

A etapa inicial consistiu na escolha da fonte de iluminação. O reator foi montado com lâmpadas equipadas com LEDs do tipo SMD (Surface Mounted Diode), que tem o diodo montado sobre uma superfície. O fator primordial que motivou a escolha de um LED com tecnologia SMD ao invés de um LED convencional foi a sobreposição espectral dos comprimentos de onda de emissão do LED e absorção eletrônica dos FS (Figura 55), uma vez que nenhum dos LEDs convencionais disponíveis no mercado nacional apresentava uma sobreposição satisfatória.

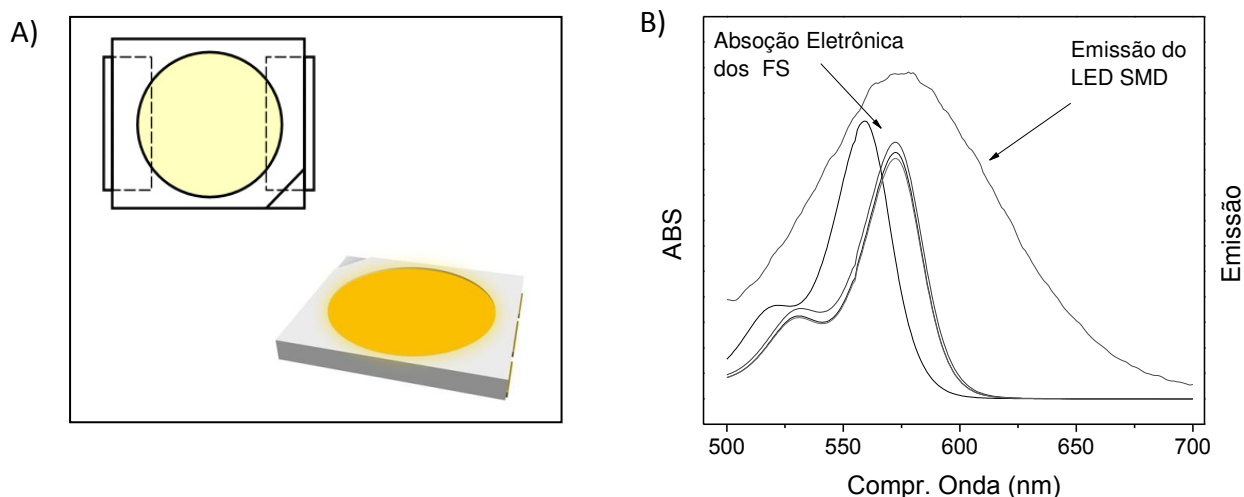


Figura 55: (A) representação esquemática e em perspectiva do layout típico de um LED SMD. (B) Sobreposição dos espectros de absorção eletrônica UV-Vis dos FS em P-123 e do espectro de emissão do LED SMD (intensidades não escaladas).

A tecnologia SMD apresentou outras vantagens significativas, como por exemplo, a maior potencia de fluxo luminoso; 1 W contra 5×10^{-3} W dos LEDs convencionais. Além disso, soquetes e lâmpadas com dispositivos SMD são amplamente disponíveis no mercado, pois são originalmente comercializados para atender a indústria automobilística.

Os parâmetros D_{90} e Z_{90} representam, respectivamente, o tempo e a concentração necessários para a inativação de 90% dos microorganismos. Esses parâmetros são obtidos pela linearização matemática (logarítmica) das curvas exponenciais de decaimento da viabilidade das bactérias, medidas em unidades formadoras de colônias por mL (UFC mL⁻¹). Os experimentos para obtenção dos valores D_{90} e Z_{90} são realizados de forma individualizada, obviamente com concentrações fixas para obtenção do D_{90} , e tempo fixo para a obtenção do Z_{90} .

Em todos os experimentos foi reservado uma amostra de controle para cada FS, a qual não foi submetida a iluminação, para avaliar a toxicidade dos mesmos sem foto-excitação induzida. Os resultados demonstram que nenhum dos FS causou a inativação das bactérias nestas condições, mesmo nas concentrações mais elevadas. Esse é um dado relevante, pois a atoxicidade no escuro é uma característica favorável e desejável para um FS candidato a fármaco para a utilização em TFD *in vivo*. (LAMBRECHTS, 2005).

4.8.1 *Efeito do tempo de iluminação dos FS xantenos encapsulados no copolímero P-123 sobre a inativação fotodinâmica de microorganismos*

Numa primeira etapa foram estudados os efeitos do tempo de iluminação dos FS sobre a inativação da bactéria *S. aureus*. Para tanto, os corantes foram formulados, em concentração fixa (definida em testes preliminares), no sistema micro-heterogêneo do copolímero Plurônico® P-123, numa concentração de 2% m/v. As amostras foram iluminadas em diferentes tempos e os dados experimentais submetidos a tratamento matemático para a obtenção do valor D_{90} . Na Figura 56 são apresentados os resultados obtidos nesta etapa.

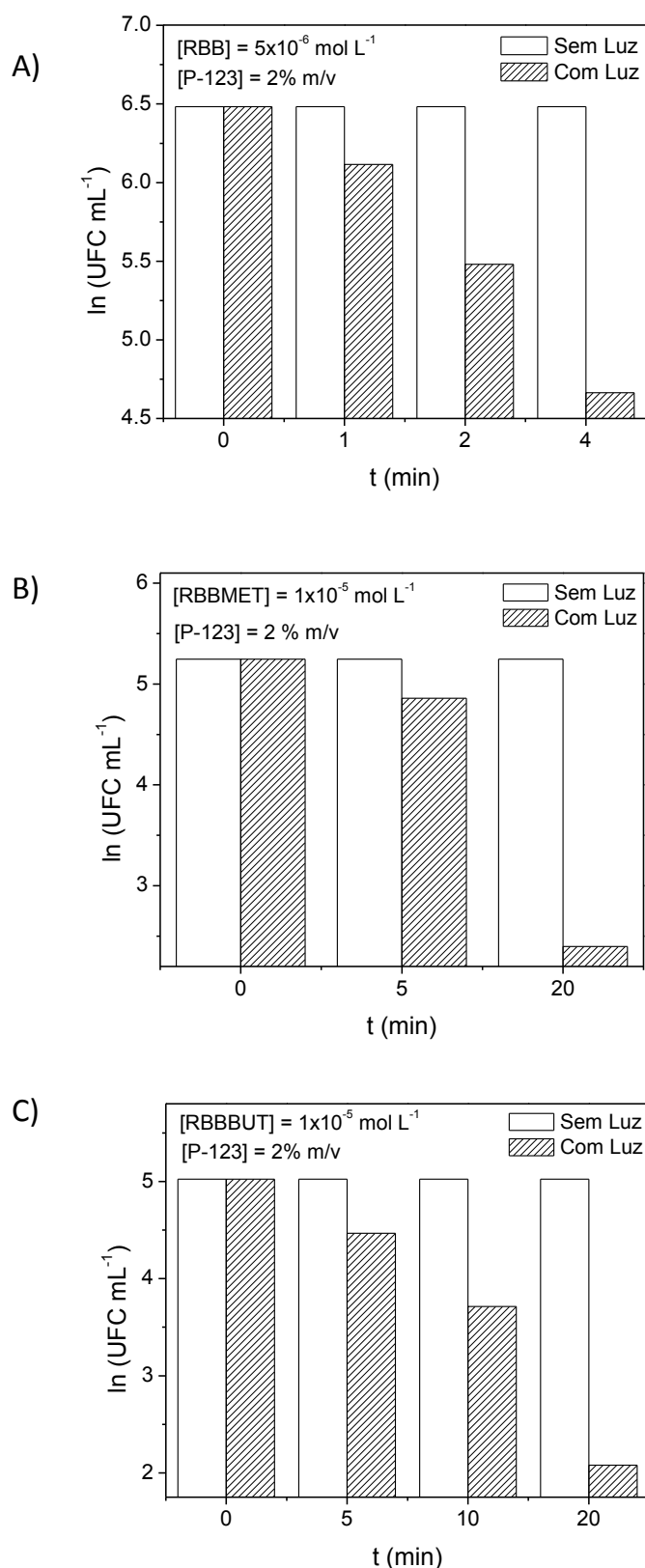


Figura 56: Gráficos comparativos da inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) dos FS xantenos como uma função do tempo de iluminação. Culturas de bactéria *S. aureus*, [RBB] = $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, [RBBMET] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹, [RBBBUT] = $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e [P-123] = 2% m/v.

As curvas experimentais linearizadas apresentam boa correlação entre os pontos, como ser observada na Figura 57.

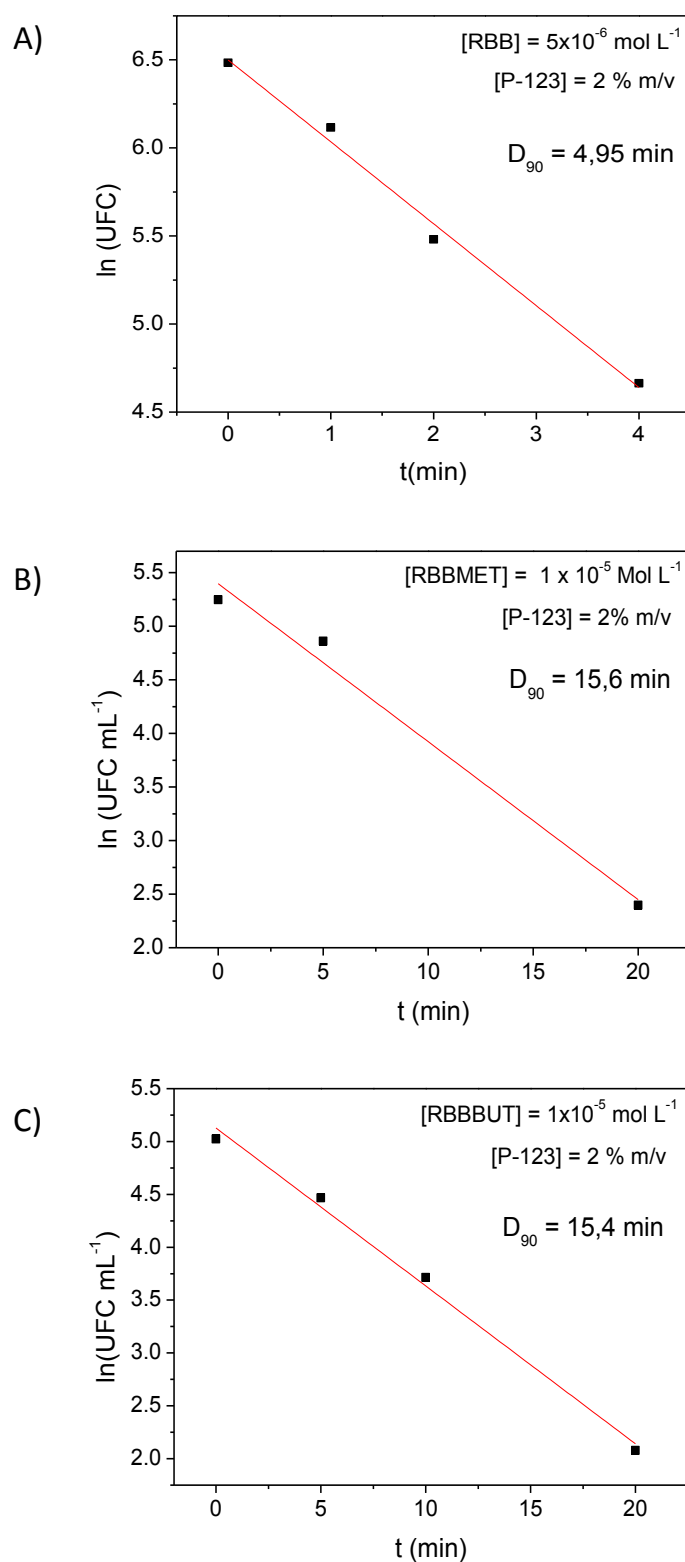


Figura 57: Ajustes teóricos para os pontos experimentais, utilizados para o cálculo do valor D_{90} da foto-atividade dos FS contra culturas de bactéria *S. aureus*.

Os valores D_{90} calculados são apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Valores de tempo de iluminação necessários para inativação de 90% das unidades formadoras de colônias (D_{90}). Culturas de bactéria *S. aureus* incubadas na presença de FS xantenos formulados em P-123, 2% m/v ($3,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$).

	[FS] ($10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$)*	D_{90} (min)
RBB	5,0	5,0
RBBMET	10,0	15,6
RBBBUT	10,0	15,4
RBBDEC	10,0	---

* Concentração de FS utilizado em cada experimento.

É conhecido que bactérias em pH fisiológico apresentam um potencial de superfície negativo, favorecendo a aproximação/ligação de moléculas positivas (DEMIDOVA, 2004; NAZZAL, 2011). Dessa forma, esperava-se que forças de repulsão, maiores para a RBB (dianiônica), prejudicassem sua atividade microbicida de forma mais acentuada do que para os seus derivados (monoaniônicos). Entretanto o corante RBB, surpreendentemente, apresentou no mínimo um valor D_{90} três vezes mais eficiente que seus derivados ésteres, mesmo numa concentração duas vezes menor que eles. Estudos baseados em microscopia eletrônica (WILSON, 2001) demonstram que a presença de contra-íons junto à superfície negativa das bactérias resulta na formação de outra camada interfacial com potencial elétrico positivo, favorecendo a presença de moléculas aniônicas como a da RBB. Outro fator significativo nesse processo é a presença de proteínas poliacatiônicas que fazem parte da parede das bactérias, atuando como âncoras para a ligação de FS aniônicos (DAI, 2009). Essas duas hipóteses são ilustradas na Figura 58.

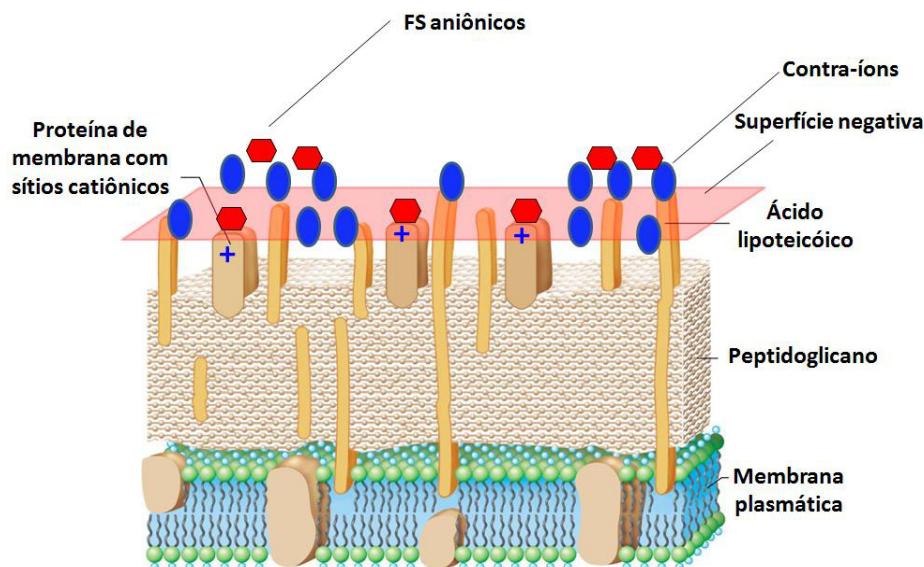


Figura 58: Representação esquemática da aproximação/ligação de FS aniônicos à parede celular de bactérias Gram positivas. Proteínas de membrana catiônicas e uma camada de contra-íons (cátions) formam sítios de ligação para os FS aniônicos. (DAI, 2009; NAZZAL, 2011).

Adicionalmente, a literatura ainda reporta uma extensa hidratação da membrana celular das bactérias em meio aquoso (BEVERIDGE, 1991; WILSON, 2001). Assim, a partição e alocação de moléculas relativamente mais hidrofílicas como a RBB nestes interstícios aquosos é favorecida em detrimento de moléculas mais hidrofóbicas, como é o caso dos derivados ésteres.

4.8.2 Efeito da concentração dos FS xantenos encapsulados no copolímero P-123 sobre a inativação fotodinâmica de microorganismos

Definidos os valores de tempo de iluminação (D_{90}), a próxima etapa consistiu na determinação do parâmetro Z_{90} , relativo à concentração necessária para a inativação de 90% das UFC de bactérias em um determinado tempo fixo de iluminação. Culturas da mesma cepa da bactéria *S. aureus* empregadas no experimento anterior, foram também utilizadas para se avaliar os efeitos da variação da concentração dos FS sobre sua atividade bactericida. Os formulados foram preparados com variadas concentrações de FS em solução do copolímero Plurônico® P-123 2% m/v e iluminados no tempo fixo de 5 minutos para a RBB e 15 minutos para os derivados ésteres. Esses tempos de iluminação foram definidos tendo em mãos os

resultados obtidos para os valores D_{90} de cada FS. Na Figura 59 é ilustrada a inativação fotodinâmica das bactérias em função da concentração dos FS.

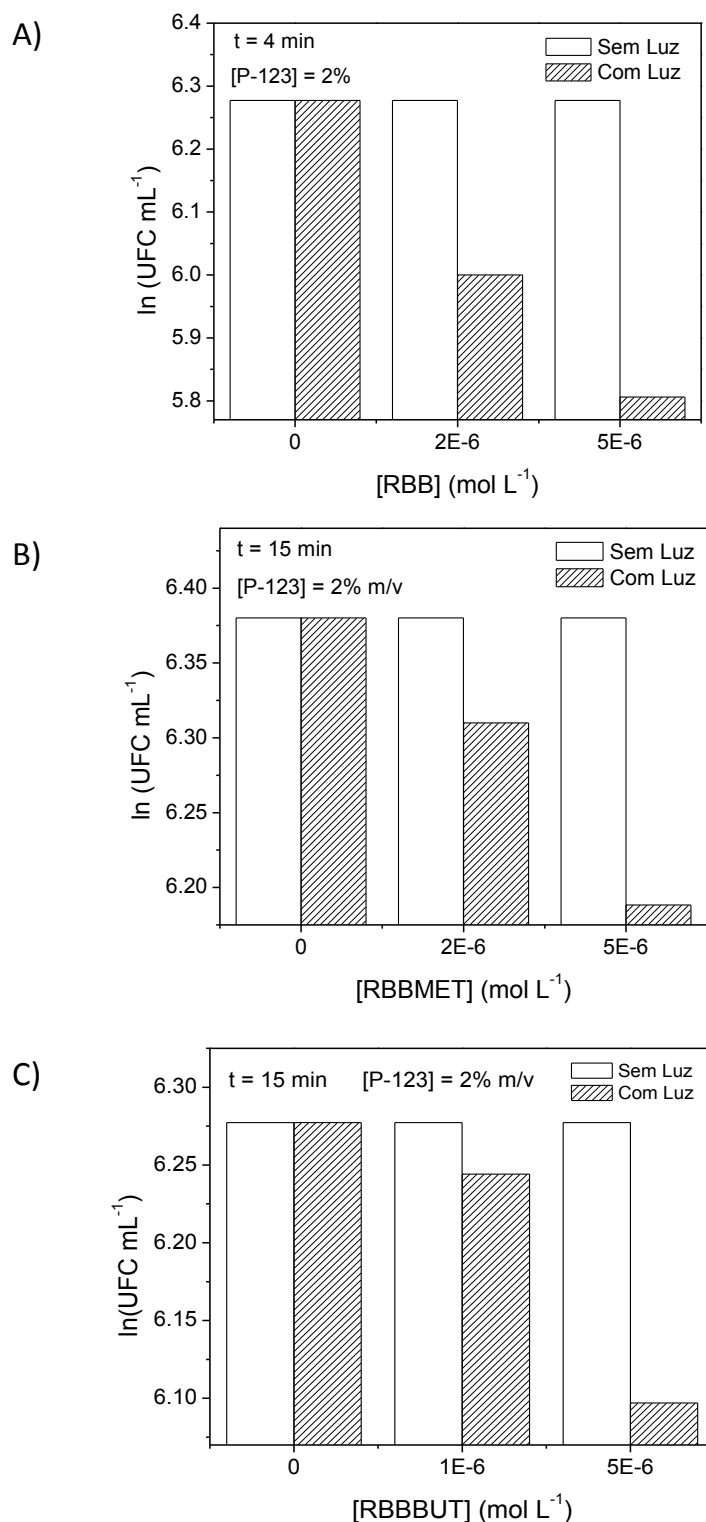


Figura 59: Gráficos comparativos da inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função da concentração dos FS xantenos. Culturas de bactéria *S. aureus*. Tempo de iluminação igual a 4 minutos para RBB e 15 minutos para os derivados ésteres. [P-123] = 2% m/v.

A correlação entre os pontos experimentais (Figura 60) foi bastante satisfatória, indicando uma clara dependência entre a eficiência de inativação e a concentração de FS.

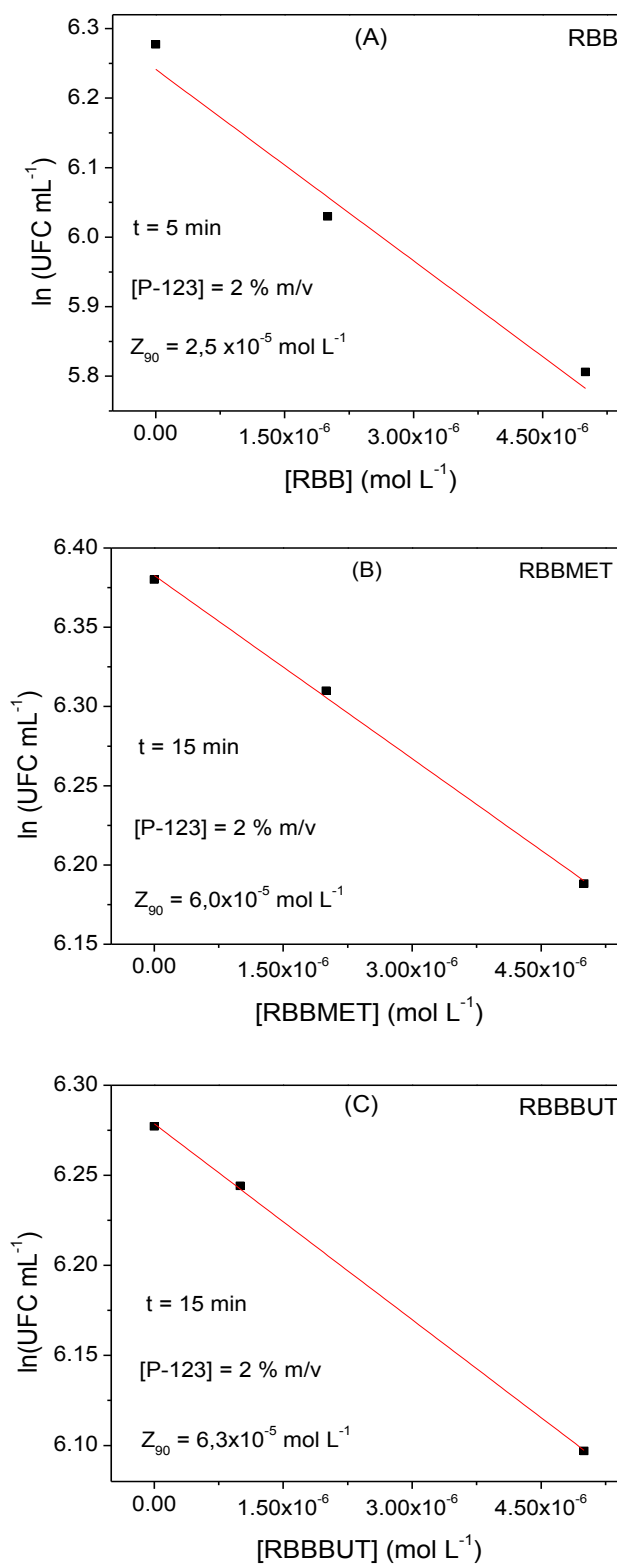


Figura 60: Ajustes teóricos para os pontos experimentais, utilizados para o cálculo do valor Z_{90} da foto-atividade dos FS contra culturas de bactéria *S. aureus*.

Os valores de Z_{90} obtidos são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20: Valores de concentração de FS necessários para inativação de 90% das unidades formadoras de colônias (Z_{90}). Culturas de bactéria *S. aureus* expostas a formulados de FS xantenos em P-123, 2% m/v.

	Tempo (min)*	Z_{90} (10^{-5} mol L ⁻¹)
RBB	4,0	2,5
RBBMET	15,0	6,3
RBBBUT	15,0	6,0
RBBDEC	15,0	---

* Tempo de iluminação utilizado em cada experimento

Assim como ocorreu nos experimentos de obtenção do valor D_{90} , RBBDEC não apresentou nenhum tipo de tendência que sugira atividade fotodinâmica, mesmo que os espectros de absorção eletrônica dos formulados apresentassem o perfil característico do FS desagregado. Esse resultado inesperado levou a uma investigação particular quanto à atividade foto-microbicida da RBBDEC, a ser apresentada e discutida no próximo item (4.7.3). RBBMET e RBBBUT, por sua vez, apresentaram resultados muito próximos entre si e RBB, mais uma vez, apresentou melhor atividade entre os FS investigados, tendo o valor Z_{90} com eficiência duas vezes e meia (2,5 x) maior que seus derivados, mesmo em um tempo de exposição à luz três vezes menor. Interações específicas entre corantes iônicos e a parede celular das bactérias explicam tais resultados, conforme já discutido anteriormente.

4.8.3 Eficiência foto-microbicida do FS RBBDEC e efeito da concentração do copolímero Plurônico® P-123 sobre atividade dos FS xantenos na inativação fotodinâmica de microorganismos

Como já mencionado, os resultados demonstrando a ineficiência foto-microbicida do corante RBBDEC causou estranhamento, pois suas propriedades fotofísicas tal como o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Tabela 18) são equivalentes aos demais derivados ésteres. Um criterioso retrospecto de todas as propriedades físico-químicas da RBBDEC, bem como das características da micela polimérica de P-123 ajudou na formulação da hipótese que, mais tarde, se confirmaria como um modelo confiável para explicar tais resultados. O valor de coeficiente de partição (K_p) (Tabela 10) demonstra que esse corante possui caráter altamente hidrofóbico. Micelas de P-123, por sua vez, possuem uma arquitetura que fazem do núcleo um compartimento completamente segregado do ambiente aquoso, sendo um ambiente ideal para a alocação de moléculas hidrofóbicas (KABANOV, 2002).

De fato, muitos trabalhos apontam para o núcleo da micela polimérica como uma espécie de reservatório, para onde se particionam, preferencialmente, quaisquer moléculas de caráter hidrofóbico (ALEXANDRIDIS, 1997, YANG, 2000; KABANOV, 2002; BATRAKOVA, 2008). Esses pressupostos são confirmados pelos valores de constante de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}) (Tabela 14), mostrando que as moléculas de RBBDEC estão profundamente alocadas no núcleo hidrofóbico da micela polimérica. Juntando a esses fatores, o curto tempo de vida do oxigênio singlete neste sistema (~ 60 μ s), o mais provável é que as moléculas do FS RBBDEC estejam sendo excitadas e gerando oxigênio singlete normalmente, porém em uma região onde o mesmo não consiga se difundir, sendo desativado antes de alcançar a parede da bactéria. Se o 1O_2 gerado tem sua energia suprimida antes do contato com o micro-organismo, então a atividade fotodinâmica fica reduzida ou pode, até mesmo, não ocorrer.

Para investigar a hipótese de que a concentração de P-123 é um fator significativo na inativação fotodinâmica de microorganismos com drogas de elevada hidrofobicidade, foi preparado um formulado de RBBDEC numa concentração de P-123 de 1% m/v, isto é, a metade da utilizada para os demais corantes. O resultado desse ensaio é apresentado na Figura 61.

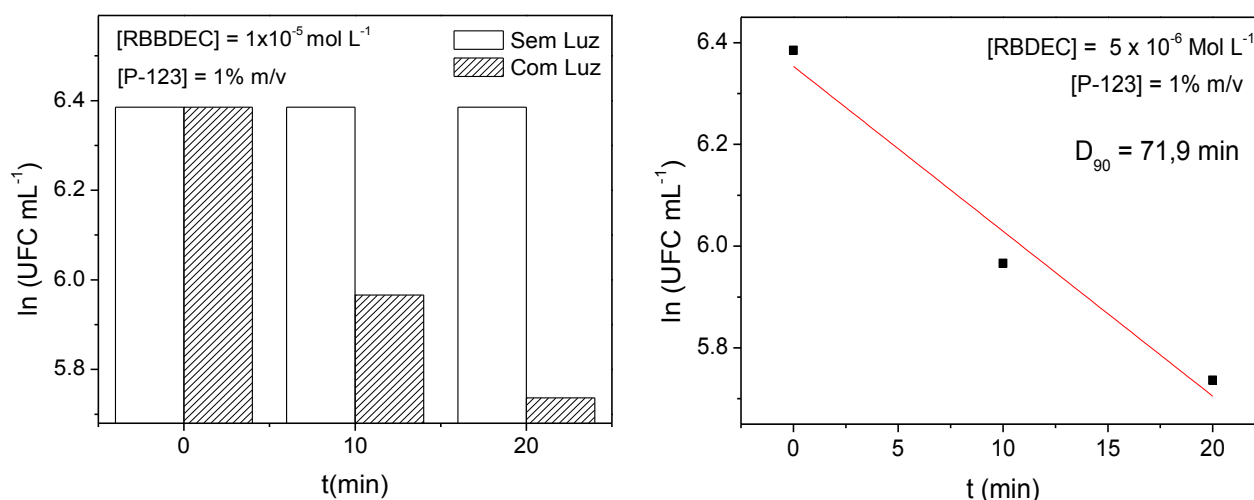


Figura 61: Inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função do tempo de iluminação da RBBDEC e ajuste teórico dos pontos experimentais. Culturas de bactéria *S. aureus*. Tempo de iluminação igual a 15 e [P-123] = 1% m/v.

Conforme pode se observar na Figura 61, houve boa correlação dos pontos experimentais tornando possível o cálculo do valor D_{90} nessas condições, o que não foi possível na concentração de P-123 igual a 2%. Embora o valor obtido ($D_{90} = 72$ min) aponte para uma eficiência 5 vezes menor que os demais FS, pôde-se confirmar a influência da concentração do copolímero P-123 sobre a atividade microbiana do FS.

Dessa forma, um novo experimento foi realizado procurando encontrar uma concentração ideal para a formulação da RBBDEC em P-123. Os resultados são apresentados na Figura 62.

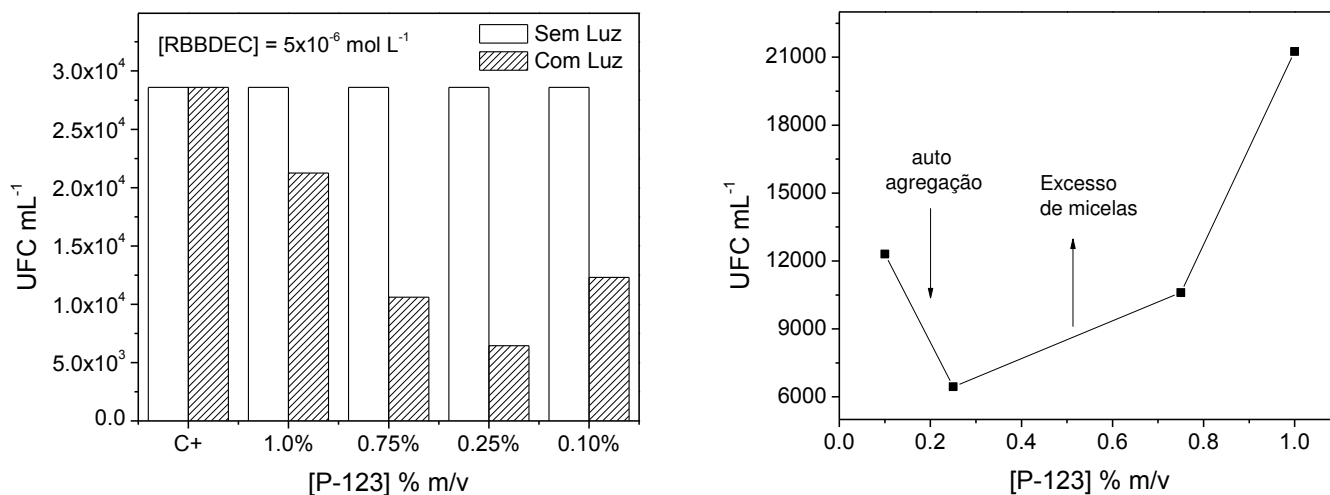


Figura 62: Gráficos da inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função da concentração do surfactante polimérico P-123, para o FS RBBDEC. [RBBDEC] = 5×10^{-6} e tempo de iluminação igual a 15 min.

Nota-se claramente a queda na viabilidade das bactérias como consequência da diminuição da concentração de P-123 até o valor limite de 0,25 %. No próximo ponto experimental avaliado, isto é, utilizando a concentração igual a 0,10%, o crescimento das colônias volta a se tornar viável, com um valor de inativação comparável ao formulado em 0,75%. Embora não se possa afirmar que o valor limite seja exatamente 0,25%, o fato é que a diminuição da concentração do surfactante torna mais efetiva a interação do FS com as bactérias, até o limite em que as micelas não conseguem mais estabilizar as moléculas do corante, tornando-as susceptíveis à auto-agregação.

A determinação da relação de proporcionalidade entre as unidades micelares formadas e as unidades de FS presentes na solução (proporção droga/micela), trouxe importantes esclarecimentos quando influência da concentração de P-123 na fotoatividade da RBBDEC. Na Tabela 21 são apresentadas as proporções droga/micela para as condições experimentais avaliadas.

Tabela 21: Proporções FS-micela para uma concentração de RBBDEC fixa e igual a $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em diferentes concentrações do copolímero Plurônico P-123.

[P-123] % m/v	[Micela] $\times 10^{14}$ (uni/mL)	[FS] $\times 10^{14}$ (uni/mL)	Razão Micela/FS	Razão FS/micela
2,00	98,2	30	3,27	0,31
1,00	49,0	30	1,63	0,62
0,75	36,6	30	1,22	0,82
0,25	12,0	30	0,40	2,50
0,10	4,6	30	0,15	6,46

De acordo com os dados da Tabela 21, na concentração de P-123 utilizada inicialmente (2 % m/v) o sistema é composto por, no mínimo, três micelas para cada molécula do FS. Como RBBDEC, naturalmente, tem afinidade pela micela polimérica, a entrega para o micro-organismo fica prejudica, tornando-se praticamente impossível. A medida que o excesso de micelas é reduzido (concentrações de 1% e 0,75%) a viabilidade das bactérias diminui significativamente até o limite de [P-123]= 0,25% (Figura 62), onde a proporção já está invertida, agora com o excesso de FS em relação ao número de micelas no meio(2,5:1; FS/micela). Aumentando ainda mais o excesso de FS (6,5:1) pela redução da concentração de surfactante para 0,1%, verifica-se que atividade do corante diminui, provavelmente em consequência da autoagregação, uma vez que o ambiente micelar não consegue estabilizar tantas unidades do FS no estado monomerizado.

Adicionalmente, a literatura também reporta que, em temperatura ambiente, a concentração de copolímero exerce uma influência direta na estrutura e viscosidade das micelas formadas (ALEXANDRIDIS, 1994). Dessa forma, em concentrações mais baixas de copolímero, a difusão do ¹O₂ fica facilitada tornando mais efetivo a ação fotodinâmica, o que também corrobora os resultados obtidos.

Com esses resultados em mãos, foram realizados novos experimentos na concentração de P-123 fixa em 0,25% m/v, cujos resultados podem ser observados nas Figuras 63 e 64.

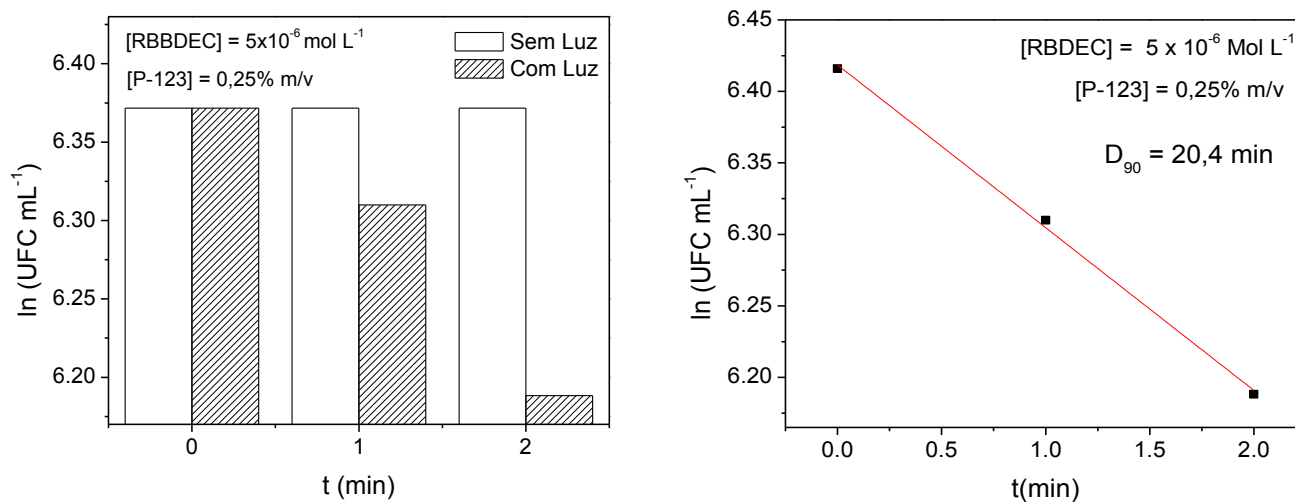


Figura 63: Inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função do tempo de iluminação da RBBDEC e ajuste teórico dos pontos experimentais. Culturas de bactéria *S. aureus*. [RBBDEC] = 5x10⁻⁶ mol L⁻¹ e [P-123] = 0,25 % m/v.

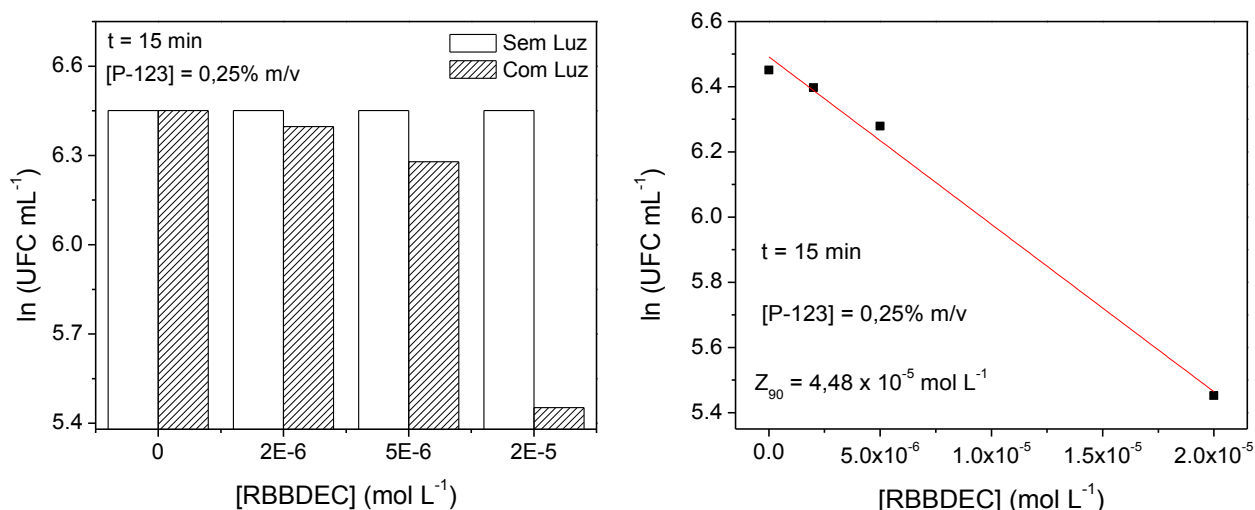


Figura 64: Inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO) como uma função da concentração de FS e ajuste teórico dos pontos experimentais. Culturas de bactéria *S. aureus*, Tempo de luz = 15 min e [P-123] = 0,25 % m/v.

Os resultados obtidos para RBBDEC em concentração de P-123 fixa em 0,25% m/v foram os seguintes: $D_{90} = 20,4$ min ($[RBBDEC] = 5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹) e $Z_{90} = 5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ ($t_{Luz} = 15$ min).

Dessa forma a concentração de P-123 fixa em 0,25% m/v mostrou-se ótima para o caso da RBBDEC, por consistir numa razão droga-micela favorável para a entrega do corante para a parede celular do micro-organismo. Em concentrações maiores o FS permanece alocado no ambiente micelar dificultando sua interação com os microorganismos. Já em concentrações menores surgem efeitos de auto-agregação do FS.

Como as condições experimentais, relativas à concentração de P-123 foram diferentes dos ensaios realizados com os demais corantes, não é conveniente fazer a comparação direta entre os valores D_{90} e Z_{90} obtidos para RBBDEC com os resultados obtidos os mesmos. No entanto, os valores apresentados na Tabela 22 são satisfatórios e demonstram que a razão droga/micela é um fator de extrema relevância na inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO), quando a afinidade do FS pelo núcleo hidrofóbico (PPO) é acentuada.

Adicionalmente, as evidências experimentais de que a concentração de P-123 exerce um papel fundamental na mediação das interações FS/micro-organismo, abre campo para investigações mais profundas que levem a obtenção de formulados com características cada vez mais otimizadas, tanto do ponto de vista de eficiência clínica, quanto em relação aos custos de produção.

5 Conclusões

A síntese dos corantes RBBMET, RBBBUT e RBBDEC; derivados ésteres do xantênico Rosa de Bengala B (RBB), foi realizada através de um processo relativamente simples e reproduzível, apresentando alto rendimento.

Os corantes sofrem significativa influência espectral relacionada aos seus equilíbrios protolíticos e tautoméricos, mas os estudos de pK_a demonstram que em pH fisiológico (7,25) RBB se apresenta na forma dianiônica e seus derivados na forma monoaniônica, formas em que o seu potencial fotodinâmica é maximizado. O corante RBB apresentou um complexo sistema protolítico e tautomérico, que exigiu a utilização de metodologia quimiométrica de análise multivariada para a correta atribuição dos valores de pK_a . A inversão de pK_a dos grupos carboxílico e fenol da molécula da RBB nos sistemas surfactantes P-123 e CTAB está relacionada com as características hidrofóbicas no micro-ambiente intra-micelar.

A penetração e posicionamento dos derivados xantenos dentro das micelas, dependem da hidrofobicidade gerada pela cadeia alquílica da porção éster em cada corante. A ligação às micelas seguiu a ordem hidrofóbica dos corantes e são dependentes da interação eletrostática no caso dos surfactantes iônicos. No sistema catiônico CTAB observou-se a formação de agregados pré-micelares, com aumento do valor de K_b em uma ordem de grandeza em relação ao sistema P-123 (não- iônico) e duas ordens de grandeza em relação ao CTAB (catiônico). Embora, claramente, se perceba a influência do potencial de superfície das micelas na interação entre os corantes, os valores de constante de ligação (K_b) confirmam os resultados obtidos nos estudos de coeficientes de partição (K_p). Verifica-se então, que as interações eletrostáticas alteram a magnitude de K_b , mas não a sequência estabelecida pelo número de unidades de metileno presentes na cadeia alquílica éster.

Os dados de K_{SV} confirmam o posicionamento dos corantes no interior da micela, demonstrando, inclusive, os efeitos gerados pela atração/repulsão da camada de Stern das micelas iônicas sobre os corantes. Os deslocamentos nos valores de pK_a

também apontam para a mudança de ambiente químico dos corantes na interação com os sistemas surfactantes.

Em ambiente micelar todos os corantes apresentaram deslocamentos batocrômicos nos comprimentos de onda de máxima absorção, o que representa uma vantagem em relação às questões relativas à janela foto-terapêutica e a penetração da luz nos tecidos.

A avaliação das características fotofísicas dos FS mostrou que a modificação estrutural, obtida pela inserção da cadeia alquílica éster, não prejudicou as propriedades específicas da RBB; com pequeno rendimento quântico de fluorescência e elevado rendimento quântico de formação de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta}^1\text{O}_2$) para todos os derivados, independentemente do sistema surfactante avaliado.

Todos os corantes apresentaram efetiva atividade na inativação da bactéria *S. aureus*, com correlação diretamente proporcional ao tempo de exposição à luz e a concentração de FS. Entretanto, a ação fotodinâmica da RBBDEC é fortemente modulada pela razão droga/micela, com os melhores resultados obtidos numa proporção em torno de 2,5 moléculas de FS para cada micela formada.

Dessa forma, conclui-se que, salvaguardadas as particularidades de cada um, todos os corantes avaliados neste estudo se qualificam para serem utilizados como FS na formulação de fármacos a serem aplicados em terapia fotodinâmica (TFD), bem como na inativação fotodinâmica de microorganismos (IFDMO).

REFERÊNCIAS

ALEXANDRIDIS, P.; J.F. HOLZWARH, T.A. HATTON. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association, *Macromolecules*, **1994**, 27, 2414–2425.

ALEXANDRIDIS, P. Poly (ethyleneoxide) / poly (propyleneoxide) blockcopolymer Surfactants. *Colloid & Interface Science*, **1997**, 02, 478-489.

ALLISON, R. R.; DOWNIE, G. H.; CUENCA, R.; HU, X. H.; CHILDS, C.; SIBATA, C. H. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2004**, 27-42.

AMAT-GUERRI, F.; LÓPEZ-GONZÁLEZ, M. M. C. Synthesis and Spectroscopic Properties of New Rose Bengal and Eosin Y Derivatives. *Dyes and Pigments*, **1990**, 12, 249-212.

ANTHONI, U. Structure of Red e Orange Fluorescein. *Structural Chemistry*, **1995**, 6(3), 161.

ARBELOA, F.; RUIZ, P. et al. Fluorescence self-quenching of the molecular forms of rhodamine b in aqueous and ethanolic solutions. *Journal of Luminescence*, **1989**, 44, 105-112.

AVELINE, Beatrice M. The effects of aggregation, protein binding and cellular incorporation on the photophysical properties of benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPDMA). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, **1995**, 30, 161-169.

AYDIN, B. M.; M. ACAR; M. ARIK; Y. ONGANER. The fluorescence resonance energy transfer between dye compounds in micellar media. *Dyes and Pigments*, **2009**, 81, 156–160.

BAGHA, Ali R. T. Solubilization of Hydrophobic Dyes in Surfactant Solutions. *Materials*, **2013**, 6, 580-608.

BAKSHI, M. S.; SACHAR, S. Influence of temperature on the mixed micelles of Pluronic F127 and P103 with dimethylene-bis-(dodecyldimethylammonium bromide). *Journal of Colloid and Interface Science*, **2006**, 296, 309–315.

BATISTELA, V. R.; D. S. PELLOSI; F. D. SOUZA; W. F. COSTA; S. M. O. SANTIN; V.R. SOUZA; H.P.M. OLIVEIRA; I.S. SCARMÍNIO; N. HIOKA. pKa determinations of xanthene derivates in aqueous solutions by multivariateanalysis applied to UV–Vis spectrophotometric data. *Spectrochim. Acta, Part A*, **2011**, 79, 889–897.

BATISTELA, V. R.; J. C. CEDRAN; H. P. M. OLIVEIRA; I. S. SCARMÍNIO; L. T. UENO; A. E. H. MACHADO; N. HIOKA. Protolytic fluorescein species evaluated using chemometry and DFT studies. *Dyes and Pigments*, **2010**, 86, 15–24.

BATRAKOVA, E. V. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release*, **2008**, 130, 98–106.

BENITO, I. Spectrophotometric and conductimetric determination of the critical micellar concentration of SDS and CTAB micellar systems modified by alcohols and salts. *Colloids and Surfaces A*, **1997**, 125, 221–224.

BERGER, Stefan; BRAUN, Siegmund. 200 and more NMR experiments: a practical course. *Wiley-Vch Weinheim*, **2004**.

BEVERIDGE, T. J.; GRAHAM, L. L. Surface layers of bacteria. *Microbiol. Rev.*, **1991**, 55(4), 684.

BHOWMIK, B. B.; GANGULY, P. Photophysics of xanthene dyes in surfactant solution, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2005**, 61, 1997–2003.

BILSKI, P. J. Photoprocesses of eosine and rose bengal ion pairs with cationic surfactant in non-polar solvents: application in photosensitization studies, *Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **1994**, 79, 121–130.

BILSKI, P.; DABESTANI, R.; CHIGNELL, C. F. Influence of cationic surfactant on the photoprocesses of eosin and rose bengal in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **1991**, 95, 5784–5791.

BILSKI, P.; HOLT, R. N.; CHIGNELL, C. F. A Premicellar aggregates of Rose Bengal with cationic and zwitterionic surfactants. *J. Photochem. Photobio.*, **1997**, 110, 67–74.

BLATT, Edward. Depth-dependent fluorescent quenching in micelles and membranes. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1985**, 822, 43–62.

BLOKHINA, S. V. Partition coefficients and thermodynamics of transfer of novel drug-like spiro-derivatives in model biological solutions. *J. Chem. Thermodynamics*, **2013**, 61, 11–17.

BOHORQUEZ, Maria. A Study of the Temperature-Dependent Micellization of Pluronic F127. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1999**, 216, 34–40.

CAETANO, W.; TABAK, M. Interaction of chlorpromazine and trifluoperazine with ionic micelles: electronic absorption spectroscopy studies. *Spectrochim. Acta, Part A*, **1999**, 55, 2513–2528.

CAETANO, W.; TABAK, M. Interaction of Chlorpromazine and Trifluoperazine with Anionic Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) Micelles: Electronic Absorption and Fluorescence Studies. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2000**, 225, 69–81.

CAETANO, W.; GELAMO, E. L.; TABAK, M. Chlorpromazine and Sodium Dodecyl Sulfate Mixed Micelles Investigated by Small Angle X-Ray Scattering. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2002**, 248, 149–157.

CAETANO, W.; HADDAD, P. S.; ITRI, R.; SEVERINO, D., et al . Photo-induced destruction of Giant Vesicles in Methylene Blue Solutions. *Langmuir*, **2007**, 23, 1307-1314.

CHAKRABARTY, A. P.; MALLICK, A. Chattopadhyay, Effect of Surfactant Chain Length on the Binding Interaction of a Biological Photosensitizer with Cationic Micelles, *J. Phys. Chem. B* , **2008**, 112, 3684–3692.

CHAKRABORTY, M.; PANDA, A. K. Spectral behaviour of eosin Y in different solvents and aqueous surfactant media, *Spectrochim. Acta, Part A*, **2011**, 81, 458–465.

CHANG, C. C.; YANG, Y. T.; YANG, J. C.; WU, H. D.; TSAI, T. Absorption and emission spectral shifts of rose Bengal associated with DMPC vesicles. *Dyes and Pigments*, **2008**, 79, 170–175.

CHATELIER, R. C. Fluorescence quenching in lipid micelles and bilayers: evaluation of bimolecular rate constants. *Chemistry and Physics of Lipids*, **1984**, 36, 131 – 136.

CHEN, Yaohong; URANO, T. Effect of aggregates on the photochemical behavior of Rose Bengal peroxy benzoate initiator in PMMA film. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1998**, 02, 2233–2237.

COLLINGS, P. J.; GIBBS, E. J.; STARR, T. E.; VAFEK, O.; PASTERNAK, R. F. Resonance Light Scattering and Its Application in Determining the Size, Shape, and Aggregation Number for Supramolecular Assemblies of Chromophores. *J. Phys. Chem. B*, **1999**, 103, 8474–8481.

CRC Handbook of Physics and Chemistry. David R. Lide (ed.). 85^a ed., *CRC Press*, New York, **2005**.

DAI, T.; HUANG, Ying-Ying. Photodynamic therapy for localized infections - State of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2009**, 6, 170-188.

DANOV, K. D. Micelle–monomer equilibria in solutions of ionic surfactants and in ionic-nonionic mixtures: A generalized phase separation model. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2014**, 206, 17-45.

DeROSA M.; CRUTCHLEY, R. J.; SOLDANI, C. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, **2002**, 233, 351-371.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, **2004**, 17, 245-254.

DEUMIÉ, M.; LORENTE, P.; MORIZON, D. Quantitative binding and aggregation of R123 and R6G rhodamines at the surface of DPPG and DPPS phospholipid vesicles. *J. Photochem. Photobiol. A*, **1995**, 89, 239-245.

DI, Li. Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design*, **2009**, 15, 2184-2194.

DING, H.; SUMER, B.D.; KESSINGER, C. W., et al. Nanoscopic Micelle Delivery Improves the Photophysical Properties and Efficacy of Photodynamic Therapy of Protoporphyrin IX. *J. Control. Release*, **2011**, 151, 271–277.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. Photodynamic therapy for cancer. *Nature*, **2003**, 3, 380-387.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J. Photodynamic Therapy. *J. Nat. Cancer Inst.*, **1998**, 90, 889-905.

ETER, N.; VOGEL, A. Short-term reaction of choroidal neovascularization and choriocapillaris to photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *European Journal of Ophthalmology*, **2003**, 13, 687-692.

FENDLER, J.H., *Membrane Mimetic Chemistry*, Wiley-Interscience, New York, **1982**.

FERNANDES, M. X.; TORRE, J. G. Joint determination by Brownian dynamics and fluorescence quenching of the in-depth location profile of biomolecules in membranes. *Analytical Biochemistry*, **2002**, 307, 1-12.

FERNANDEZ, Marta S.; FROMHERZ, Peter. Lipoid pH Indicators as Probes of Electrical Potential and Polarity in Micelles. *Journal of Physical Chemistry*, **1977**, 18, 81.

FISCHER, S. M. Reactive oxygen in the tumor promotion stage of skin carcinogenesis. *Lipids*, **1988**, 23(6), 592-593

FLEMING, G. R.; KNIGHT, A. W. E., MORRIS, J. M.; ROBINSON, G. W. Picosecond fluorescence studies of xanthene dyes. *J. Am. Chem. Soc.*, **1977**, 99, 4306–4311.

FOOTE, C.S.; CLENNAN, E. L., *Properties and Reactions of Singlet Dioxygen*, in: *Active Oxygen in Chemistry*. Chapman & Haal, London, **1995**.

FREEMAN. *A handbook of nuclear magnetic resonance*, Longman Scientific & Technical, **1997**.

FUJIMOTO, K.; N. YOSHII, e S. OKAZAK. Free energy profiles for penetration of methane and water molecules into spherical sodium dodecyl sulfate micelles obtained using the thermodynamic integration method combined with molecular dynamics calculations. *J. Chem. Phys.*, **2012**, 136, 014511.

GABRIELLI, D.; Belisle, E.; Severino, D.; Kowaltowski, A.; Baptista, M., Binding, Aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochem. Photobiol.*, **2004**, 79, 227-232.

GAIDAMAUSKAS, Ernestas. Effect of Micellar and Reverse Micellar Interface on Solute Location: 2,6-Pyridinedicarboxylate in CTAB Micelles and CTAB and AOT Reverse Micelles. *Langmuir*, **2010**, 26(16), 13153–13161.

GANDIN, E.; Lion, Y.; VAN De VORST, A. Quantum yield of singlet oxygen production by xanthenes derivatives. *Photochem. Photobiol.*, **1983**, 37(3), 1271.

GARG, A.D; BOSE, M; AHMED, M. I.; BONASS, W. A.; WOOD, S. R. In Vitro Studies on Erythrosine-Based Photodynamic Therapy of Malignant and Pre-Malignant Oral Epithelial Cells. *PLOS ONE*, **2012**, 7(4), e34475.

GEIGER, P.G.; KORYTOWSKI, W.; GIROTTI, A.W. Photodynamically generated 3-beta-hydroxy-5 alpha-cholest-6-ene-5-hydroperoxide: toxic reactivity in membranes and susceptibility to enzymatic detoxification. *Photochem. and Photobiol.*, **1995**, 62(3).

GEROLA, A.P.; SANTANA, A.; FRANÇA, P.B.; TSUBONE, T. M.; OLIVEIRA, H. P. M. de, W. CAETANO; KIMURA, E.; HIOKA, N. Effects of Metal and the Phetyl Chain on Chlorophyll Derivatives: Physicochemical Evaluation for Photodynamic Inactivation of Microorganisms. *Photochem. Photobiol.*, **2011**, 87, 884-894.

GEROLA, A. P.; SEMENSATO, J. et al. Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: New calculation methodology considering the influence of photobleaching. *Photochem. Photobiol.*, **2012**, 232, 14-21.

GEROLA, A. P.; TSUBONE, T. M.; SANTANA, A. M.; OLIVEIRA, H. P. M.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems. *J. Phys. Chem. B*, **2011**, 115 (22), 7364-7373.

GIDDENS, R. M. e WAINWRIGHT Mark, Phenothiazinium photosensitisers: choices insynthesis and application. *Dyes and Pigments*, **2003**, 57, 245-257.

GOEL, Teena. Effect of sphere to rod transition on the probe microenvironment in sodium dodecyl sulphate micelles: A time resolved fluorescence anisotropy study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2010**, 209, 41-48.

GOTO, Eiki; SHIMAZAKI, Jun. Low-concentration Homogenized Castor Oil Eye Drops for Noninflamed Obstructive Meibomian Gland Dysfunction. *Ophthalmology*, **2002**, 109, 11.

HAAS, Heinrich; CAETANO, W.; BORISSEVITCH, Galina P.; TABAK, M. et al.; Interaction of dipyrindamole with phospholipid monolayers at the air-water interface: Surface pressure and grazing incidence X-ray diffraction studies. *Chemical Physics Letters*, **2001**, 335, 510-516.

HENDERSON, B.; DOUGHERTY, T. J. How does Photodynamic Therapy Works. *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55 (1), 145-157.

HIOKA, N.; POLITI, M. J.; CHAIMOVICH, H. Kinetic demonstration of premicellar aggregation. The alkaline hydrolysis of n-hexadecyl-4-cyanopyridinium bromide. *Tetrahedron Lett.*, **1989**, 30, 1051-1054.

JACOBS, P. T.; ANACKER, E. W. The Role of Polar Head Structure in Dye Solubilization by Cationic Surfactants. *Journal Colloid and Interface Science*, **1973**, 43, 1, 105-112.

JACOBS, P. T.; ANACKER, E. W. The Effect of Hydroxyl Functionality in the Polar on Surfactant Aggregation Number and Dye Solubilization Efficiency. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1976**, 56, 255-261.

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. *Phys. Chem.*, **2002**, 4, 2320–2328.

KABANOV, A. V.; BATRAKOVA, E. V.; ALAKHOV, V. Y. Pluronic (R) block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *Journal of Controlled Release*, **2002**, 82 (2-3), 189-212.

KABANOV, A. V.; ZHU, J. Pluronic Block Copolymers for Drug and Gene Delivery, in: *Polymeric Drug Delivery Systems*, Taylor & Francis, Boca Raton, **2005**.

KANG, S. W.; PARK, C. Y. The Correlation Between Fluorescein Angiographic and Optical Coherence Tomographic Features in Clinically Significant Diabetic Macular Edema. *Am. J. Ophthalmol.*, **2004**, 137, 313–322.

KEDAR, U.; PHUTANE, P. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **2010**, 6, 714–729.

KIBBLEWHITE, J.; DRUMMOND, G. G.; GRIESER, F.; THISTLETHWAITE, P. J. Lipoidal eosin and fluorescein derivatives as probes of the electrostatic characteristics of self-assembled surfactant/water interfaces. *J. Phys. Chem.*, **1989**, 93, 7464–7473.

KLYACHKO, Natalia L. Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*. **2003**, 8, 179–186.

KNOW, G. S. Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles. *Pharmaceutical Research.*, **1995**, 12(2).

KNOW, G. L. *Polymeric Drug Delivery Systems*, Taylor & Francis Group: Boca Raton, **2005**.

KORYTOWSKI, Witold. Photoperoxidation of cholesterol in homogeneous solution, isolated membranes, and cells: comparison of the 5 α - and 6 β -hydroperoxides as indicators of singlet oxygen intermediacy. *Photochemistry and Photobiology*, **1992**, 56 (1), 1-8.

LAKOWICZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*: Spring, 3^a Ed., **2006**.

LAMBRECHTS, S. A. G.; ALDERS, M. C. G. Mechanistic Study of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* by a Cationic Porphyrin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **2005**, 49(5), 2026-2034.

LOH, W. Block copolymer micelles, in: *Encyclopedia of Colloid and Surface Science*, New York, **2002**.

LYON, Juliana P. Photodynamic therapy for pathogenic fungi. *Mycoses*, **2010**, 54, e265–e271.

MACDONALD, I. J; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins Phthalocyanines*. **2001**, 5, 105-129.

MACHADO A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, **2000**, 23(2).

MAHATA, A. Photophysics and Rotational Dynamics of a β -Carboline Analogue in Nonionic Micelles: Effect of Variation of Length of the Headgroup and the Tail of the Surfactant. *J. Phys. Chem. B*, **2009**, 113, 7517–7526.

MAIA, H. S. Número, tipo e topografia dos pontos de vazamento em pacientes com coriorretinopatia serosa central. *Arq. Bras. Oftalmol.*, **2005**; 68(3), 317-320.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. *J. Antimicrobiol. Chemother.*, **1998**, 42 (1), 13-28.

MALIK, Zvi. Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1992**, 14(3), 262-266.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. *Química Nova*, **2001**, 24(1), 87-93.

MARÇO, P. H.; SCARMÍNIO, I. S. Q-mode curve resolution of UV–vis spectra for structural transformation studies of anthocyanins in acidic solutions. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 583, 138-146.

MARKUSZEWSKI, R; DIEHL, H. The infrared spectra and structures of the three solid forms of fluorescein and related compounds. *Talanta*, **1980**, 27, 937-946.

MARTIN, Monique. Hydrogen bond effects on radiationless electronic transitions in xanthene dyes. *Chemical Physics Letters*. **1975**, 35(1).

MARTIN, Monique. Intermolecular hydrogen bonding and temperature effects on internal conversion in xanthene dyes. *Chemical Physics Letters*. **1976**, 35(2).

MCHEDLOV-PETROSSYAN, N. O.; MAYORGA, R. S. Extraordinary character of the solvent influence on protolytic equilibria – inversion of the fluorescein ionization-constants in H₂O-DMSO mixtures. *J. Chem. Soc. Faraday Trans*, **1992**, 88(20), 3025-32.

MCHEDLOV-PETROSSYAN, N. O.; KLESHCHEVNIKOVA, V. N. Influence of the cetyltrimethylammonium chloride micellar pseudophase on the protolytic equilibria of oxyxanthene dyes at high bulk phase ionic-strength. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **1994**, 90(4), 629.

MCHEDLOV-PETROSSYAN N.O; TYCHINA, O. N.; BEREZHNYAYA, T. A.; ALEKSEEVA, V. I.; SAVINA, L. P. Ionization and tautomerism of oxyxanthenedyes in aqueous butanol. *Dyes and Pigments*, **1999**, 43, 33–46.

MCHEDLOV-PETROSSYAN, N. O.; KUKHTIK, V. I.; BEZUGLIYZ, V. D. Dissociation, tautomerism and electroreduction of xanthene and sulfonephthalei dyes in N,N-dimethylformamide and other solvents. *J. Phys. Org. Chem*. **2003**, 16, 380-397.

MCHEDLOV-PETROSSYAN, N. O.; KUKHITK, V. I.; EGOROVA, S. I. Protolytic equilibria of fluorescein halo derivatives in aqueous-organic systems. *Russ. J. Gen. Chem.*, **2007**, 76, 1607-1617.

MIANXUE, W. U. Synthesis of cellular inorganic materials by foaming sol-gels. *Journal of Non-Crystalline Solids*, **1990**, 121, 407-412.

MIURA, T.; URANO, Y.; TANAKA, K.; NAGANO, T.; OHKUBO, K.; FUKUZUMI, S. Rational design principle for modulating fluorescence properties of fluorescein-based probes by photoinduced electron transfer. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 8666–8671.

NAZZAL, S.; CHEN C. Nanotechnology in Antimicrobial Photodynamic Inactivation. *Journal of Food and Drug Analysis*, **2011**, 19, No. 4,

NECKERS, D.C. Rose Bengal Review. *J. Photochem. Photobiol. A*, **1989**, 47, 1-29.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology B - Biology*, **1997**, 39.

OSHIMA, J.; YOSHIHARA, Toshitada, et al. Water-induced fluorescence quenching of mono- and dicyanoanilines. *Chemical Physics Letters*, **2006**, 423, 306-311.

PASTERNAK, R. F.; BUSTAMANTE, C.; COLLINGS, P. J.; GIANNETTO, A.; GIBBS, E. J. Porphyrin assemblies on DNA as studied by a resonance light-scattering technique, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 5393–5399.

PELLOSI, D. S.; ESTEVÃO, B. M. et al. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles. *Photochem. Photobiol.*, **2012**, 247, 8-15.

PEREIRA, P. C. S.; FREITAS, C. F.; CHAVES, C. S.; ESTEVÃO, B. M., PELLOSI, D. S.; TESSARO, A. L.; BATISTELA, V. R.; SCARMÍNIO, I. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N. A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de pK_a. *Química Nova*, **2014**, 37(8), 1417-1425.

PERUSSI, J. R. Photodynamic inactivation of microorganisms, *Química Nova*, **2007**, 30, 988-994.

PLAETZER, K.; KIESSLICH, T.; VERWANGER, T.; KRAMMER, B. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Med. Laser Appl.*, **2003**, 18, 7-19.

POOLE, S. K. Separation methods for estimating octanol–water partition coefficients. *Journal of Chromatography B*, **2003**, 797, 3–19.

PREVIDELLO, B. A.; CARVALHO, F. R.; TESSARO, A. L.; SOUZA, V. R.; HIOKA, N., O pK_a de indicadores ácido-base e os efeitos de sistemas coloidais, *Química Nova*, **2006**, 29, 600-606.

RABELLO, B. R.; GEROLA, A. P., et al. Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation. *Photochem. Photobiol.* **2012**, 238, 53-62

RIESS, G. Micellization of block copolymers, *Prog. Polym. Sci.*, **2003**, 28, 1107–1170.

RIJCKEN, C. J. F.; SOGA, O.; HENNINK, W. E.; NOSTRUM, C. F. Triggered destabilization of polymeric micelles and vesicles by CHANGing core polarity: a new tool for drug delivery. *J. Control. Release.*, **2007**, 120, 131-148.

RIM, Suzy. Relationship of octanol / buffer and octanol / water partition coefficients to transcellular diffusion across brain microvessel endothelial cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, **1986**, 32, 79-84.

RIORDAN, Katie O. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2005**, 2, 247-262.

ROBERTS, D. J.; CAIRDUFF, F. Photodynamic Therapy of Primary Skin Cancer: A Review. *Br. J. Plast. Surg.*, **1995**, 48, 360-370.

RUIFROK, A. C.; JOHNSTON, D. A. Quantification of histological staining by color deconvolution. *Anal. Quant. Cytol. Histol.*, **2001**, 23, 291-299.

RUIZ C. C. Fluorescence Anisotropy of Probes Solubilized in Micelles of Tetradecyltrimethylammonium Bromide: Effect of Ethylene Glycol Added. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2000**, 221,262–267.

SAIMOILOV, D. V.; MCHEDLOV-PETROSSYAN; MARTYNOVA, N. O.; EL'TSOV, V. P. Protolytic equilibria of fluorescein nitro derivatives. *Russian J. Gen. Chem.*, **2000**, 70(8), 1343-57.

SCHAFER, M.; SCHMITZ, C.; FACIUS, R.; HORNECK, G.; MILOW, B. Systematic Study of Parameters Influencing the Action of Rose Bengal with Visible Light on Bacterial Cells: Comparison Between the Biological Effect and Singlet-Oxygen Production. *Photochemistry and Photobiology*, **2000**, 71(5), 514–523.

SCHULZ, P. C. Steric fitting of the spherical micelle size. *Colloid Polym. Sci.*, **1991**, 269, 612-619.

SCRIMIN, Paolo. Model membranes: developments in functional micelles and vesicles. *Current Opinion in Chemical Biology*, **1999**, 3, 730–735.

SENA, M. M.; SCARMÍNIO I. S.; COLLINS K. E.; COLLINS C. H. Speciation of aqueous chromium(VI) solutions with the aid of Q-mode factor analysis followed by oblique projection. *Talanta*, **2000**, 53, 453-461.

SERET. A.; GANDIN, E. Flash photolysis of eosin in aqueous micellar dispersions. *Chemical Physics Letters.*, **1987**, 135, 427-431.

SERET, A.; VAN De VORST, A. Solubility properties of Eosin Y and Rose Bengal triplet state in sodium dodecyl sulfate micellar solutions. *J. Phys. Chem.*, **1990**, 94, 5293-5299.

SHRESTHA, A; HAMBLIN, M. R, KISHEN, A. Characterization of a conjugate between Rose Bengal and chitosan for targeted antibiofilm and tissue stabilization effects as a potential treatment of infected dentin. *Antimicrob Agents Chemother.*, **2012**, 56(9), 4876-84.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos: Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos, *Química Nova*, **2002**, 25, 801–807.

SJÖBACK , R.; NYGREN, J.; KUBISTA, M. Absorption and fluorescent properties of fluorescein. *Spectrochim. Acta A*, **1995**, 51, 7-21.

SMITH D., Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Design, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2012**.

SONG A., J.; ZHANG, M.; ZHANG, T.; SHEN, J. T. Spectral properties and structure of fluorescein and its alkyl derivatives in micelles, *Colloids and Surfaces*, **2000**, 167, 253–262.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; C. BRÜCKNER. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151–4202.

STYLISS, S. S.; KAYE, A. H. Photodynamic therapy of a cerebral glioma – a review part I. *J. Clin. Neurosci.*, **2006**, 13, 615–625.

SUCHETTI, C. A.; DURANTINI, E. N. Monomerization and photodynamic activity of Zn(II) tetraalkyltetrapyrroline derivatives in AOT reverse micelles. *Dyes and Pigments*, **2007**, 74, 630–635.

SUN, C. Z. et al. Characterization of the Doxorubicin-Pluronic F-68 Conjugate Micelles and Their Effect on Doxorubicin Resistant Human Erythroleukemic Cancer Cells. *Nanomedic. Nanotechnol.* **2011**, 2:5

SVIRBELY, W. J.; SHARPLESS, N. E. The Quenching of the Fluorescence of the Eosin Ion. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 1404–1409.

TESSARO, A. L.; BATISTELA, V. R.; et al. Stability of benzoporphyrin photosensitizers in water/ethanol mixtures: pKa determination and self-aggregation processes. *J. Phys. Org. Chem.*, **2011**, 24, 155–161.

TSAI, T.; YANG, Y. T.; WANG, T. H.; CHIEN, H. F.; CHEN, C. T. Improved Photodynamic Inactivation of Gram-Positive Bacteria Using Hematoporphyrin Encapsulated in Liposomes and Micelles. *Lasers Surg. Med.*, **2009**, 41, 316–322.

UENO, T.; URANO, Y. Rational Principles for Modulating Fluorescence Properties of Fluorescein. *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 14079–85.

USKOKOVIC, Vuk. Reverse micelles: Inert nano-reactors or physico-chemically active guides of the capped reactions. *Advances in Colloid and Interface Science*, **2007**, 133, 23–34.

VALDES-AGUILERA, O.; NECKERS, D. C. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc. Chem. Res.*, **1989**, 22, 171–177.

VALENZENO, D. P. Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochemistry and Photobiology*, **1987**, 46(1), 147–160.

VALEUR, B. *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, WILEY-VCH, **2002**.

WACHTER, E; DEES, H. J. Topical Rose Bengal: Pre-Clinical Evaluation of Pharmacokinetics and Safety. *Lasers in Surgery and Medicine*, **2003**, 32, 101–110.

WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **1998**, 42, 13–28.

WATERBEEMD, H. Physico-chemical Approaches to Drug Absorption, in: Drug Bioavailability Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. Ed.: H. Waterbeemd, H. Lennernas, P. Artursson, WILEY, Weinheim, **2004**.

WILKINSON, F. W.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **1993**, 22, 113–262.

WILKINSON, Francis. Quantum Yields for the Photosensitized Formation of the Lowest Electronically Excited Singlet State of Molecular Oxygen in Solution. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **1995**, 22.

WILSON, D.; RONCADA, M. J. Valor do corante vital Rosa Bengala como auxiliar no Diagnóstico de xerose conjuntival em provas de triagem. *Rev. Saúde pública*, **1985**, 19, 321-335

WILSON, W. W.; WADE, Mary M. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods*, **2001**, 43, 153–164.

WOOD, Simon. Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**, 57, 680–684.

YAGUI, Carlota O. R.; PESSOA-Jr, A. Micellar solubilization of drugs. *Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **2005**, 8(2), 147-163.

YAMAGUCHI, K.; TAMURA, A. Z.; MAEDA, M. Disodium Fluorescein Octahydrate. *Acta Cryst.*, **1997**, C53, 284-285.

YANG, Lin; ALEXANDRIDIS, Paschalis. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. *Colloid & Interface Science*, **2000**, 5, 132-143.

YOKOHAMA, M. Polymeric Micelles for the Targeting of Hydrophobic Drugs, in: Polymeric Drug Delivery Systems, Ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, **2005**.

ZHANG, X. Development of amphiphilic diblock copolymers as micellar carriers of taxol. *Inter. Journal of Pharmaceutics*, **1996**, 132, 195-206.

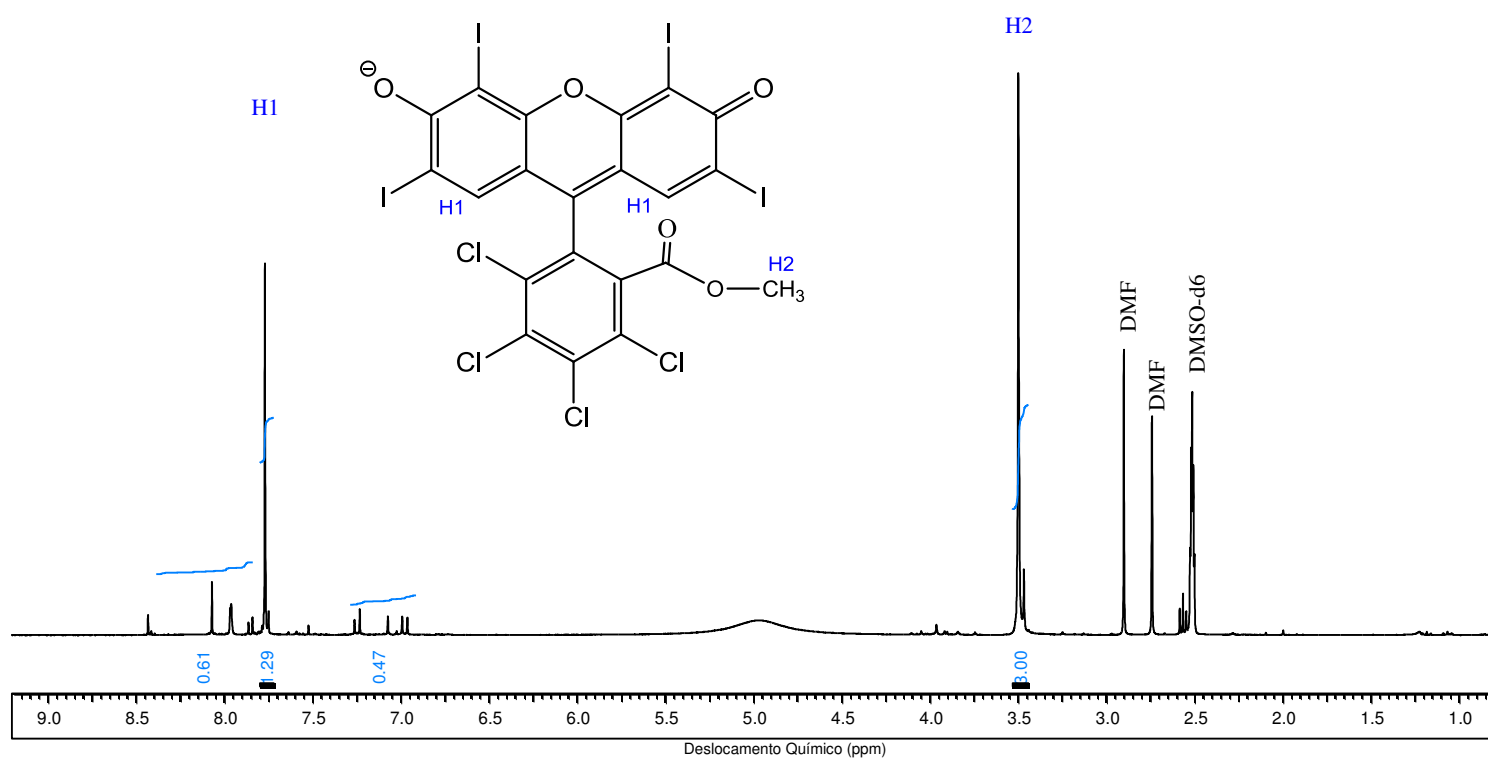
ZHANG, X. I.; ZHANG, L. Liu. Photophysics of Halogenated Fluoresceins: Involvement of Both Intramolecular Electron Transfer and Heavy Atom Effect in the Deactivation of Excited States. *Photochem. Photobiol.*, **2010**, 86, 492–498.

ZHANG, X. F.; LIU, Q.; WANG, H. B.; FU, Z.; ZHANG, F. S. Photophysical behavior of lipophilic xanthene dyes without the involvement of photoinduced electron transfer mechanism. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, **2008**, 200, 307-313.

ZHU, T. C.; FINLAY, J. C. Prostate PDT dosimetry. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **2006**, 3, 234-246.

ANEXOS

ANEXO 1

Figura 65: Espectro de RMN ^1H da RBBMET

ANEXO 2

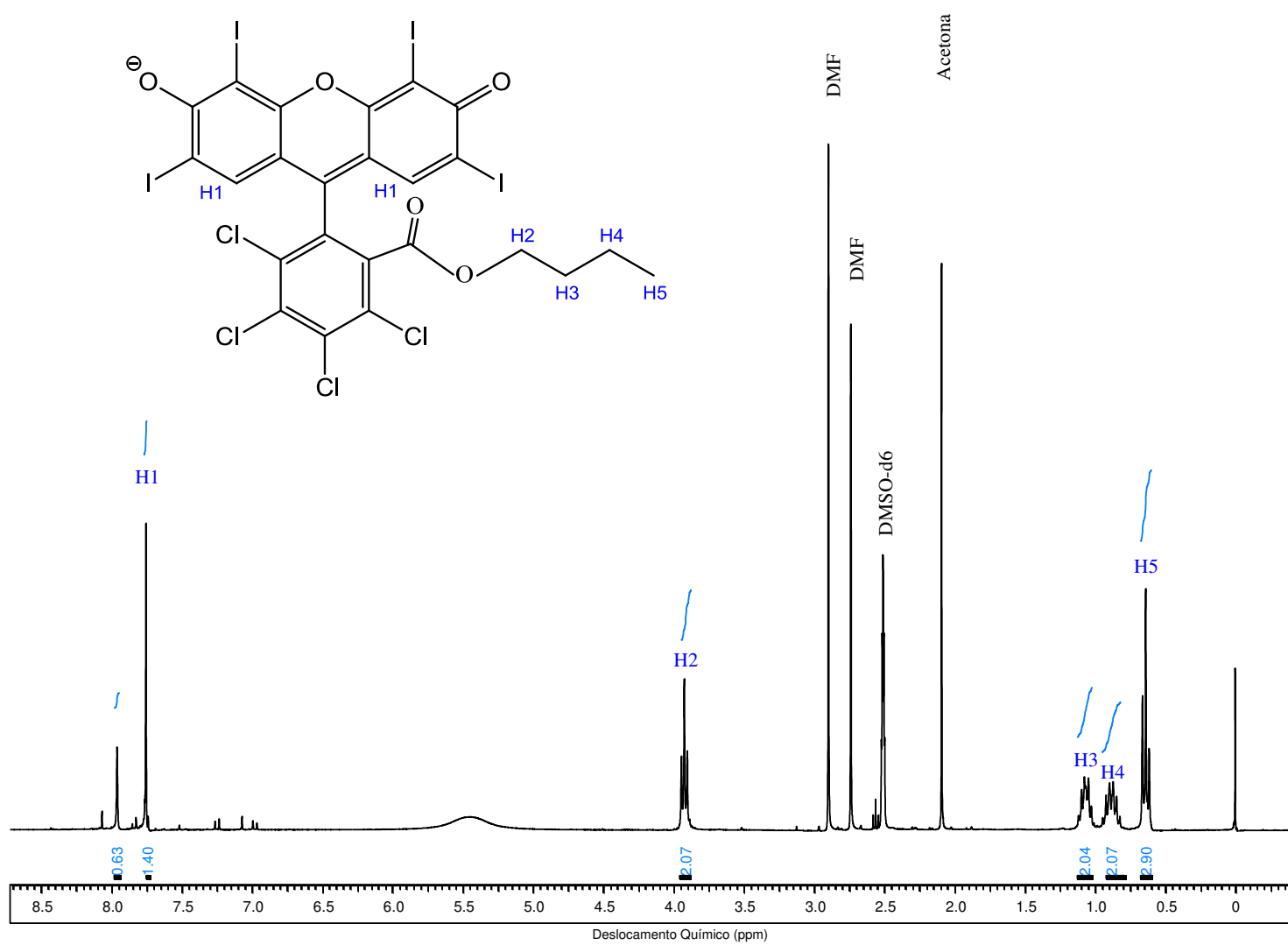


Figura 66: Espectro de RMN ¹H da RBBBUT.

ANEXO 3

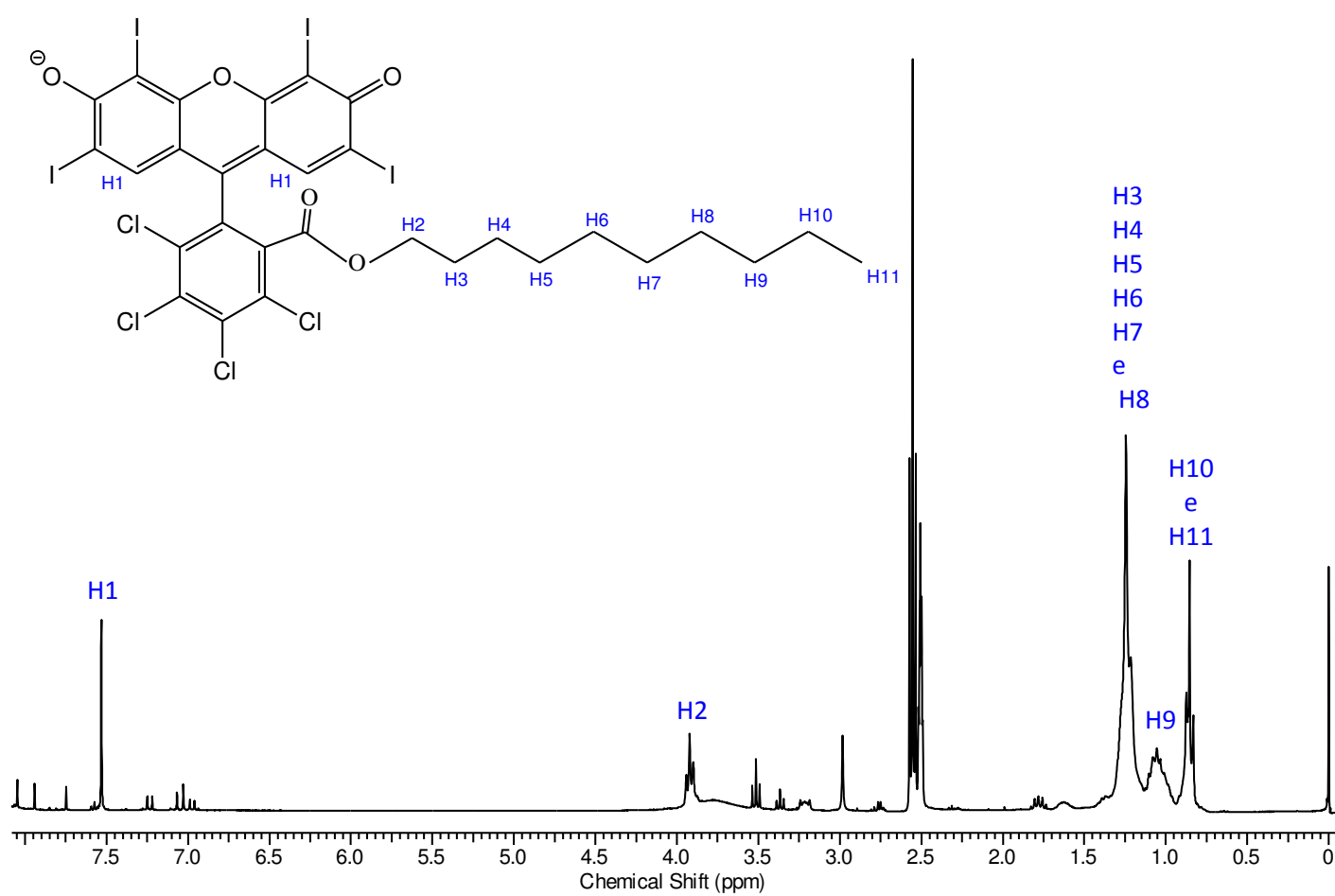


Figura 67: Espectro de RMN ^1H da RBBDEC.