

## **5. Materiais e Métodos**

### **5.1. Materiais**

A norfloxacin (1-etil-6-fluor-4-oxo-7-piperazin-1-il-1*H*-quinolino-3-ácido carboxílico, C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> – massa molecular 319.3 u) utilizada nos experimentos foi adquirida da empresa Sigma. Os solventes utilizados em todos os experimentos foram adquiridos da empresa Vetec em grau espectroscópico. A água utilizada nas preparações foi do tipo Milli-Q. NOR e solventes foram utilizados sem prévia purificação / tratamento.

### **5.2. Equipamentos**

As medidas de absorção ótica UV-visível foram realizadas no espectrofotômetro modelo HP 8452A, Hewlett Packard (Agilent), à temperatura ambiente. Esse espectrofotômetro opera na faixa de 180-820 nm e tem sistema de detecção por arranjo de diodos e resolução de 2 nm. Os espectros foram medidos utilizando-se um tempo de integração de 1 s. Utilizamos cubetas de quartzo com caminho ótico de 1.0 cm e capacidade de 3.0 mL.

As medidas de fluorescência foram realizadas no Sistema de Fluorescência modelo QM-1, da PTI – Photon Technology International (Figura 5.1), do Laboratório de Espectroscopia de Biomoléculas (Departamento de Física da PUC-Rio).



Figura 5.1. Fotografia do Sistema de Fluorescência QM-1 da PTI – Photon Technology International.

Medidas de tempo de vida de fluorescência foram realizadas no Sistema de Fluorescência resolvida no tempo Horiba-Jobin Ivon-IBH, que utiliza o método de contagem de fóton único (Laboratório multiusuário FLiRT, Departamento de Física da PUC-Rio). A fonte de luz usada para excitação foi um nanoLED N-16, com taxa de repetição máxima de 1 MHz, emitindo em 330 nm com uma duração de pulso nominal de 1.0 ns (Figuras 5.2 e 5.3)



Figura 5.2. Fotografia do Sistema de Fluorescência resolvida no tempo Horiba-Jobin Ivon-IBH. 1: Computador; 2: DataStation Hub (Controlador de NanoLEDs, monocromadores, polarizadores, lentes e detector de fótons TBX); 3: Fonte e controle para o detector MCP; 4: Fonte e controle para lâmpada de Xenônio ; 5: Fonte e controle para lâmpada NanoFlash.

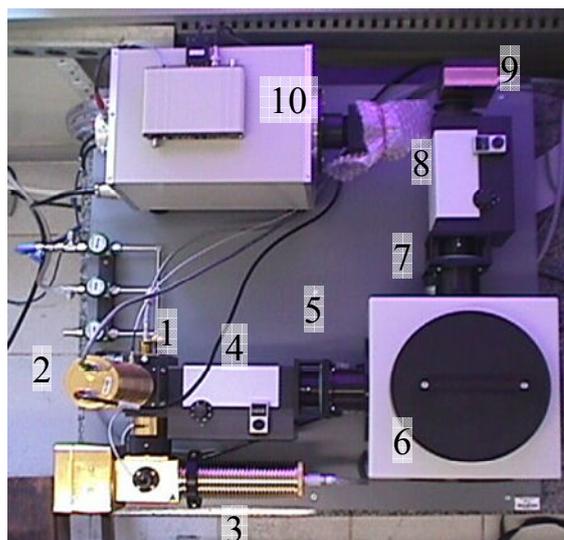


Figura 5.3. Fotografia do Sistema de Fluorescência resolvida no tempo Horiba-Jobin Ivon-IBH. 1: NanoLEDs (283nm; 330nm; 559nm), LASERs (372nm; 405nm; 430nm; 640nm); 2: Lâmpada de Xenônio; 3: Lâmpada NanoFlash de Hidrogênio; 4: Controle da abertura (slit) e monocromador de excitação; 5: Polarizador de excitação; 6: Câmara da amostra com opção de medidas em função da temperatura; 7: Polarizador de emissão; 8: Controle da abertura (slit) e monocromador da emissão; 9: Detector (Picosecond photon detection – TBX-04); 10: Detector MCP-PMT (Microchannel Plate Photomultiplier Tube).

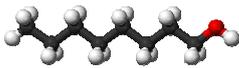
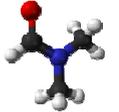
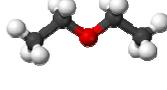
Para as medidas de fluorescência foram utilizadas cubetas de quartzo de seção transversal  $10 \times 10$  mm e  $10 \times 4$  mm, com capacidade volumétrica de 3 mL e de 1.5 mL, respectivamente.

As medições de pH foram feitas usando o medidor de pH Cole-Parmer Chemcadet 5986-25 com um eletrodo combinado semimicro Ag/AgCl.

### 5.3. Métodos

Foram preparadas soluções estoque de 1 mM de NOR em etanol espectroscópico (0.788 kg/L). Essas soluções foram mantidas cobertas com papel alumínio para evitar fotodegradação. NOR foi diluída, a partir da solução estoque, nos solventes da Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Solventes utilizados no trabalho (estruturas retiradas da Wikipédia).

0.	Tampão universal, pH 10.7		
1.	Tampão fosfato, 10 mM, pH 7.4 ou 7.5		
2.	Tampão citrato-fosfato pH 4.0 ou 4.2		
3.	Metanol (MeOH)	$\text{CH}_3\text{OH}$	
4.	Etanol (EtOH)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	
5.	n-Octanol (OcOH)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$	
6.	Acetonitrila (MeCN);	$\text{CH}_3\text{CN}$	
7.	Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ )	$\text{CH}_3(\text{CO})\text{CH}_3$	
8.	Dimetilformamida (DMF)	$(\text{CH}_3)_2\text{NC}(\text{O})\text{H}$	
9.	Dimetilsulfóxido (DMSO)	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$	
10.	Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	
11.	Tetraidrofurano (THF)	$(\text{CH}_2)_4\text{O}$	
12.	Acetato de etila (EtAc)	$\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$	
13.	Éter dietílico (Éter)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_3$	
14.	Hexano (Hex)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	
15.	Tolueno (Tol)	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	
16.	Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ )	$\text{CHCl}_3$	

O procedimento de diluição de NOR, a partir da solução estoque, para a realização das medidas espectroscópicas foi o seguinte: em uma cubeta de quartzo de 3.0 mL eram adicionados 2.25 mL do solvente em estudo, em seguida era realizada a medição do branco para a absorvância. Em uma cubeta de quartzo de 1.5 mL eram adicionados 60  $\mu\text{L}$  da solução estoque de NOR 1 mM em etanol. O etanol era evaporado por fluxo de nitrogênio e 1.5 mL do solvente em estudo eram adicionados. Dessa forma, ficamos com uma concentração de NOR de 40  $\mu\text{M}$  para as medidas de absorvância.

Após a realização das medidas dos espectros de absorção, diluímos a solução de NOR 40  $\mu\text{M}$  para 10  $\mu\text{M}$ , para verificar se a relação de Beer-Lambert era satisfeita e para as medições dos espectros de fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Com NOR 10  $\mu\text{M}$ , primeiro era realizada a medição dos espectros de fluorescência estacionária (excitação em 330 nm); e em seguida, com as informações obtidas pela fluorescência estacionária, mediam-se as curvas de decaimento da fluorescência (com excitação em 330 nm) no espectrofluorímetro resolvido no tempo. As medidas dos espectros de fluorescência estacionária foram realizadas com constante homogeneização da solução por intermédio de agitação magnética, para evitar a possível fotodegradação. No entanto, não foi detectada qualquer fotodegradação ao longo dos experimentos.

Realizamos também experimentos em solventes binários. Utilizamos NOR 10  $\mu\text{M}$  em misturas de solventes: tampão pH 7.4 / etanol, tampão pH 4.0 / etanol, tampão pH 7.4 / DMSO e tampão pH 4.0 / DMSO. Foram medidas as variações nos espectros de absorção e de fluorescência estacionária à medida que o percentual de um solvente era aumentado em relação ao outro. Para as medidas, utilizávamos soluções de NOR 10  $\mu\text{M}$  nos dois solventes em questão, que eram misturadas em diferentes proporções. Assim, mantinha-se constante a concentração de NOR.

Os espectros de todos os experimentos foram colocados em gráfico, trabalhados e analisados usando o programa Microcal Origin. Para a obtenção dos tempos de vida de fluorescência foi utilizado o programa de análise de decaimento de fluorescência fornecido pela HORIBA Jobin Yvon IBH.