

## 6. Resultados e Discussões

### 6.1. Absorção UV-visível da norfloxacin

Começamos o nosso estudo das propriedades fotofísicas da norfloxacin em 16 diferentes solventes pela espectroscopia de absorção ótica. Os solventes, numerados de 1 a 16 (Tabela 6.1), estão classificados de acordo com a classificação de Parker (Reichardt, 2003) como próticos (1 a 5), apróticos dipolares (6 a 12) e apróticos apolares (13 a 16). A Tabela 6.1 apresenta algumas das propriedades dos solventes: índice de refração ( $n$ ), constante dielétrica ( $\epsilon$ ), polarizabilidade de orientação ( $\Delta f$ ) e os valores da escala  $E_T^N(30)$  para solventes (Reichardt, 2003; Valeur, 2005).

Tabela 6.1 – Propriedades características dos solventes: índice de refração ( $n$ ), constante dielétrica ( $\epsilon$ ), polarizabilidade de orientação ( $\Delta f$ ) e os valores de  $E_T^N(30)$  (Reichardt, 2003; Lange, 1979).

	Solvente	$n$	$\epsilon$	$\Delta f$	$E_T^N(30)$
1	Tampão fosfato pH 7.4	1.333	80.1	0.320	1
2	Tampão citrato fosfato pH 4.0	1.333	80.1	0.320	1
3	Metanol	1.328	32.7	0.309	0.762
4	Etanol	1.361	24.5	0.289	0.654
5	n-octanol	1.429	10.34	0.226	0.537
6	Acetonitrila	1.344	37.5	0.305	0.46
7	Acetona	1.359	20.7	0.284	0.355
8	DMF	1.431	36.7	0.274	0.386
9	DMSO	1.478	46.7	0.263	0.444
10	Diclorometano	1.424	8.93	0.217	0.309
11	THF	1.407	7.58	0.210	0.207
12	Acetato de Etila	1.372	6.02	0.200	0.228
13	Éter dietílico	1.352	4.33	0.167	0.117
14	Hexano	1.381	1.89	-0.0022	0.009
15	Tolueno	1.497	2.38	0.0132	0.099
16	Clorofórmio	1.446	4.81	0.148	0.259

Os espectros de absorção ótica da norfloxacina ( $10 \mu\text{M}$ ) nos diferentes solventes são mostrados na Figura 6.1. Em todos os espectros há uma banda principal de absorção, cuja posição mostra pequenas variações devido ao efeito dos solventes, pequeno solvatocromismo, entre 272 e 287 nm. Há também duas bandas parcialmente sobrepostas, cujas posições também dependem do solvente. Em tampão fosfato pH 7.4 apresenta picos em 323 e 334 nm (Figura 6.1 A).

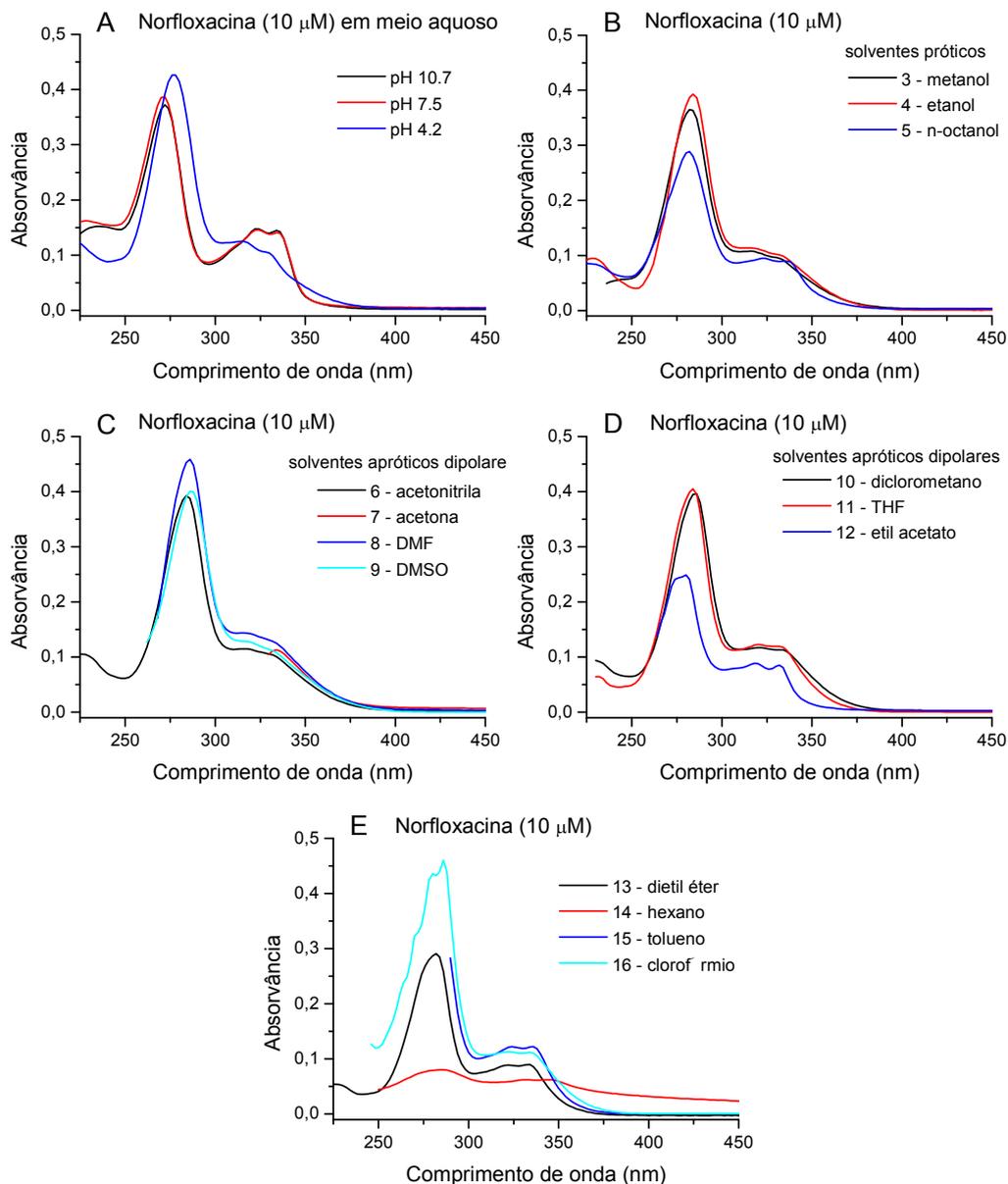


Figura 6.1. Espectros de absorção de norfloxacina  $10\mu\text{M}$  nos solventes (A) Tampões pH 10.7; 7.5 e 4.2; (B) Metanol, etanol e n-octanol; (C) Acetonitrila, acetona, DMF e DMSO; (D) Diclorometano, THF e etilacetato; (E) Éter dietílico, hexano, tolueno e clorofórmio.

Em (A) temos os espectros de norfloxacina em solução aquosa com três diferentes valores de pH. Observa-se que em meio básico (pH 10.7) e neutro (pH 7.5) os espectros são quase iguais. Em (B) temos os espectros nos outros solventes próticos: metanol, etanol e n-octanol. Observa-se que em metanol e etanol os espectros de absorção são muito semelhantes.

Em (C) e (D) observam-se os espectros de norfloxacina nos solventes apróticos dipolares: acetonitrila, acetona, DMF, DMSO, diclorometano, THF e etilacetato. Medidas de absorvância abaixo de 265 nm e 330 nm não podem ser realizadas em DMSO e acetona, respectivamente, por causa da grande absorção desses solventes nessas regiões do espectro (“cut-off points”, Reichardt, 2003).

Observa-se que a intensidade de absorção da NOR em acetato de etila é bem mais baixa do que nos outros solventes. Após refazer as medidas para o acetato de etila, notamos que NOR não é solubilizada completamente nesse solvente (a intensidade diminui com o tempo e aparece uma linha de base típica de espalhamento). Finalmente, em (E) temos os espectros de norfloxacina em solventes apróticos apolares: éter dietílico, hexano e tolueno (aromático), e no solvente polar clorofórmio. Tolueno não pode ser utilizado para medidas abaixo de 285 nm. É interessante notar que em clorofórmio a banda principal de absorção ( $\pi$ - $\pi^*$ ), em torno de 284 nm, apresentando estrutura vibracional mais resolvida.

Em geral, observa-se que o solvatocromismo não é pronunciado e os espectros em solventes próticos e apróticos não apresentam grandes diferenças. Para testar a validade da Lei de Beer-Lambert, todas as amostras em concentrações 40  $\mu$ M foram diluídas quatro vezes para novas medidas de absorvância. A relação de proporcionalidade entre absorvância e concentração foi observada em quase todos os solventes. As exceções foram acetato de etila, como já descrito, e hexano, mostrando que a solubilidade de NOR nesses solventes, é mais baixa do que concentrações da ordem de  $10^{-5}$  M. Em hexano, logo de início, as bandas aparecem muito deformadas e os coeficientes de absorção molar são muito baixos.

A Tabela 6.2 mostra os comprimentos de onda dos três picos e os respectivos coeficientes de absorção molar.

É também interessante notar que a cauda que se estende de 340 a 385 nm nos solventes orgânicos é semelhante à que ocorre em pH 4.2, enquanto que em pH 7.5 a absorvância vai a zero muito mais rapidamente para  $\lambda > 340$  nm. Em pH

4.2 o grupo carboxílico está protonado, podendo formar uma ligação de hidrogênio intramolecular com o grupo 4-oxo da fluorquinolona (ver Fig. 1.1). Essa ligação intramolecular deve aumentar o caráter de transferência de carga intramolecular não somente no estado fundamental (cauda de absorção em maiores comprimentos de onda), mas também no estado excitado singlete (Cuquerella et al., 2006). A cauda pronunciada que ocorre em solventes orgânicos estaria então associada à carboxila protonada e à presença de ligação de hidrogênio intramolecular, já que nesses solventes o grupo carboxílico não está dissociado.

Tabela 6.2 – Propriedades de absorção UV-vis de norfloxacin em diferentes solventes: comprimentos de onda de máxima absorção,  $\lambda$ , em nm; e seus respectivos coeficientes de absorção molar calculados,  $\epsilon$  em ( $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Referentes à Figura 6.1).

Solvente	$\lambda_1$	$\epsilon_1$	$\lambda_2$	$\epsilon_2$	$\lambda_3$	$\epsilon_3$
0- Tampão pH 10.7	272	3.72	323	1.48	334	1.45
1- Tampão pH 7.5	272	3.87	323	1.46	334	1.41
2- Tampão pH 4.0	277	4.26	314	1.25	328	1.05
3- Metanol	283	3.65	316	1.08	332	0.96
4- Etanol	284	3.93	316	1.14	332	1.01
5- n-octanol	282	2.89	323	0.95	336	0.09
6- Acetonitrila	284	3.93	316	1.15	332	1.04
7- Acetona	-	-	-	-	332	1.13
8- DMF	286	4.59	314	1.44	332	1.28
9- DMSO	287	3.99	316	1.29	332	1.11
10- Diclorometano	285	3.96	320	1.17	333	1.13
11- THF	284	4.05	320	1.22	332	1.20
12- Acetato de etila*	280	2.49	318	0.89	332	0.86
13- Éter dietílico	282	2.91	322	0.89	333	0.90
14- Hexano*	284	0.08	332	0.62	346	0.62
15- Tolueno			324	1.22	336	1.22
16- Clorofórmio	286	4.60	322	1.13	334	1.12

\* NOR aglomera. Absorção diminui com o tempo.

## 6.2. Fluorescência da norfloxacin

As intensidades de fluorescência da norfloxacin (espectros de emissão) nos diferentes solventes utilizados são mostradas na Figura 6.2 (para melhor visualização, foram agrupados levando-se em conta os rendimentos quânticos e

não as classes de solventes). Os espectros foram normalizados à mesma absorvância no comprimento de onda de excitação ( $A_{330} = 0.1$ ). Observou-se que os espectros de NOR em acetato de etila e hexano variam no tempo (espectros de absorção se alargam e fluorescência diminui). Isso é atribuído a um processo de agregação, devido a baixa solubilidade nesses solventes. Por este motivo, esses espectros apresentam-se tracejados na Figura 6.2. Podemos observar que, ao contrário da absorção, a fluorescência da norfloxacinina é fortemente afetada pelo solvente, tanto no deslocamento do pico de emissão como nas variações da intensidade de fluorescência (rendimento quântico).

Na Tabela 6.3 encontram-se os parâmetros de fluorescência de NOR obtidos em nossas experiências. Os rendimentos quânticos relativos foram encontrados através das áreas sob os espectros, normalizada à área em pH 4.2. Os rendimentos quânticos absolutos foram encontrados considerando  $\phi = 0.12$  para NOR em pH 4.2 (Bilski et al., 1996).

O maior rendimento quântico de NOR ( $\phi = 0.12$ ) ocorre em pH 4.2 onde NOR tem o grupo amina e o grupo carboxílico protonados. O segundo maior,  $\phi = 0.10$ , ocorre para o tampão pH 7.5 onde se tem somente o grupo amina protonado. É importante ter em mente que em solução aquosa em pH alto (11 - 12), com grupo amina desprotonado, a NOR não é fluorescente (Cuquerella et al., 2006; Luiz, 2009). O pequeno rendimento quântico medido em pH 10.7 (Figura 6.2 B) está de acordo com a porcentagem de amina protonada encontrada nesse pH (~1% em pH duas unidades acima do pK). Assim, percebemos que há uma relação entre os estados de protonação dos grupos funcionais de NOR e o rendimento quântico de emissão.

(a) Com o grupo amina da piperazina desprotonado ( $\text{pH} \gg \text{pK} \sim 8.6$ ), estando livre o par solitário de elétrons do  $\text{N4}'$  da molécula, a NOR não apresenta fluorescência, ou apresenta rendimento quântico baixíssimo (< 0.1%).

(b) Com o grupo amina da piperazina protonado ( $\text{pH} \ll \text{pK} \sim 8.6$ ), o rendimento quântico da NOR é ~10 a 12% e o comprimento de onda de emissão depende do estado de protonação da carboxila ( $\text{pK} \sim 6.2$ ). Quando esse grupo está protonado (neutro, pH 4.2), a emissão se dá em ~440 nm. Quando está desprotonado (aniônico, pH 7.5), há um deslocamento hipsocrômico para ~406 nm.

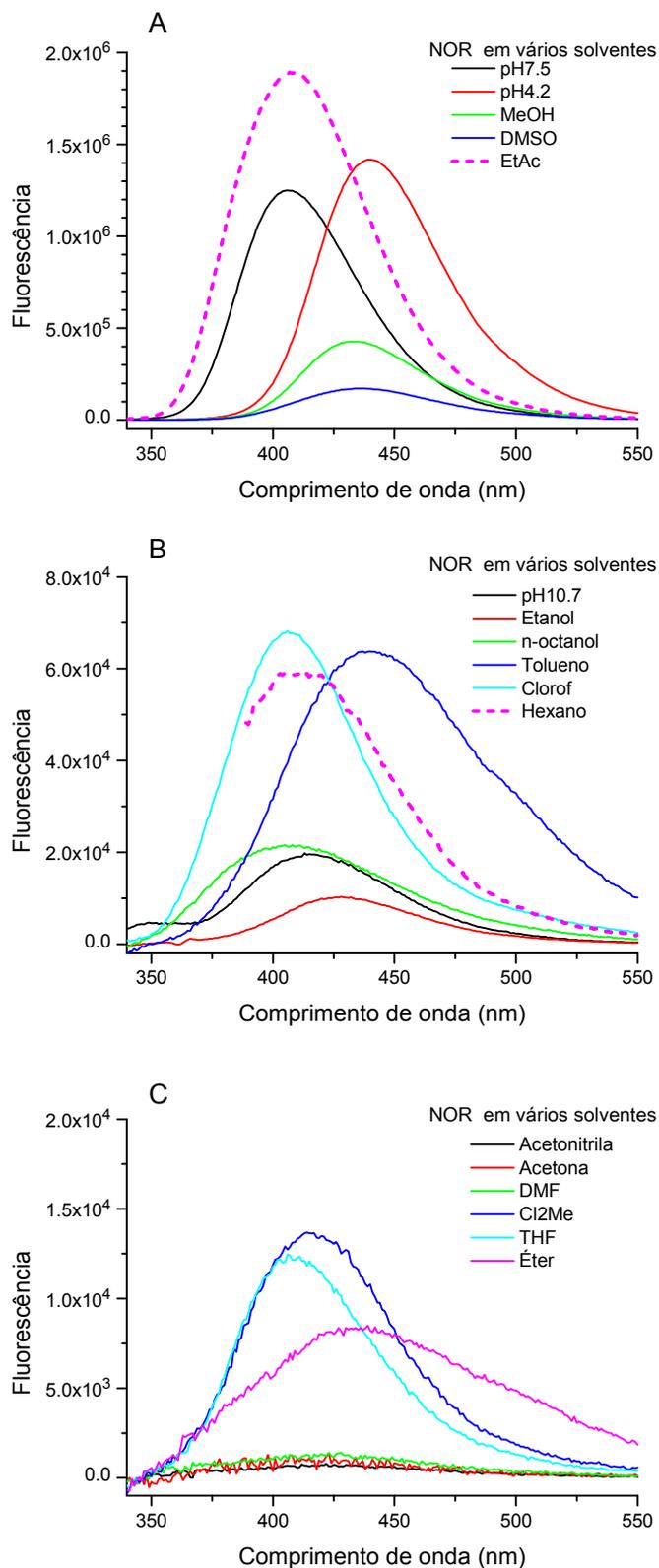


Figura 6.2. Espectros de emissão de Norfloxacin 10  $\mu$ M em diferentes solventes. Excitação em 330 nm; os espectros foram corrigidos para mesma absorvância em 330 nm.

De acordo com essas observações, é razoável esperar que a NOR tenha rendimentos quânticos baixos em solventes orgânicos, em que o grupo amina se apresenta neutro. O grupo amina neutro deve facilitar a transferência de elétrons da piperazina para o heterociclo da NOR, no estado excitado, de onde o decaimento para o estado fundamental se daria mais por conversão interna, diminuindo o tempo de vida do estado excitado.

De fato, os rendimentos quânticos de NOR tem seus maiores valores em tampões pH 4.2 e pH 7.5, caindo consideravelmente nos demais solventes (Tabela 6.3), com exceção de acetato de etila. A posição dos picos de emissão nos solventes orgânicos também varia de 405 nm até 440 nm, conforme Tabela 6.3.

Nos solventes não-próticos acetonitrila, acetona e DMF, NOR apresenta valores baixíssimos de  $\phi$ , inferiores a 0.001 (< 0.1%). Nos demais solventes, também apresenta valores muito baixos, sendo os maiores encontrados em metanol, 0.035 e em DMSO, 0.016.

Tabela 6.3 – Parâmetros de fluorescência de norfloxacin em diferentes solventes. Pico de absorção de menor energia,  $\lambda_3$ ; pico de emissão,  $\lambda_{em}$ ; desvio de Stokes,  $\Delta\nu$ , calculado a partir de  $\lambda_3$  e  $\lambda_{em}$ ; rendimento quântico de fluorescência,  $\phi$ , calculado a partir da integral da curva de fluorescência (referente ao rendimento quântico de NOR,  $\phi=0.12$  em pH 4.0, Bilsky et al., 1996).

Solvente	$\lambda_{abs}$ (nm)	$\lambda_{em}$ (nm)	$\Delta\nu$ ( $10^3\text{cm}^{-1}$ )	$(\phi_{rel})$ área	$\phi$
0- pH 10.7	334	414	5.79	0.017	0.002
1- pH 7.4	334	406	5.31	0.821	0.098
2- pH 4.0	328	440	7.76	1.000	0.120
3- Metanol	332	432	6.97	0.291	0.035
4- Etanol	332	426	6.65	0.008	0.001
5- n-octanol	336	405	5.07	0.022	0.003
6- Acetonitrila	330	420	6.49	0.001	<< 0.001
7- Acetona	330	420	6.49	0.001	<< 0.001
8- DMF	332	420	6.31	0.001	<< 0.001
9- DMSO	332	435	7.13	0.131	0.016
10- Diclorometano	333	415	5.93	0.012	0.001
11- THF	332	407	5.55	0.010	0.001
12- Acetato de etila	332	407	5.55	1.385	0.166
13- Éter dietílico	333	434	6.99	0.011	0.001
14- Hexano	342	412	4.97	0.045	0.005
15- Tolueno	336	439	6.98	0.069	0.008
16- Clorofórmio	344	406	4.44	0.054	0.006

Como notado anteriormente, o fato de a amina distal (N4') da piperazina estar desprotonada implica em rendimentos quânticos muito baixos. Conclui-se que o par de elétrons de N4', estando disponível, permite um processo de desativação do estado excitado singlete por transferência intramolecular de elétrons (do N1' para o núcleo da fluorquinolona). Esse caminho de desativação não é possível se o par de elétrons estiver bloqueado por alguma ligação (Cuquerella et al., 2006). A carga elétrica positiva de N4' protonado dificultaria a transferência de elétrons de N1' para o núcleo da FQ ou para o oxigênio da cetona. Conclui-se que N4' protonado ou a indisponibilidade do par de elétrons de N1' é condição essencial para haver fluorescência da NOR.

Observou-se que nos solventes orgânicos o rendimento quântico da fluorescência de NOR é bem menor do que em tampão pH 4.2 e 7.5. Em solventes orgânicos o N4' da piperazina está desprotonado. O rendimento quântico dependeria da facilidade de interação do par solitário de elétrons com moléculas do solvente: quanto mais forte a interação, maior seria o rendimento quântico. Isso não está completamente de acordo com o observado para a comparação etanol e DMSO, sugerindo que pode haver alguma interação específica de DMSO com o grupo piperazinil.

A taxa de conversão interna, em geral, cresce se a diferença de geometria entre diferentes estados eletrônicos fica pequena, fazendo decrescer o rendimento quântico. Park et al. (2002) sugeriram que isso poderia explicar o baixo rendimento quântico de NOR em solventes orgânicos. Se, nos solventes de baixa polaridade, a taxa de conversão interna de  $S_1$  para  $S_0$  é muito rápida, por causa da semelhança entre as geometrias de  $S_0$  e  $S_1$ , a emissão fluorescente não poderia competir com a CI. Isso diminuiria muito o tempo de vida. De fato, como veremos adiante, há o aparecimento de tempos de vida bem curtos em quase todos os solventes orgânicos.

Outra explicação para mais alto rendimento quântico em solventes polares poderia estar associada à inversão dos estados  $n-\pi^*$  e  $\pi-\pi^*$  induzida por polaridade (Valeur, 2005), já que a emissão a partir de estados  $\pi-\pi^*$  costuma ter rendimentos quânticos bem maiores (ver seção 4.6). Em solventes não polares o decaimento se daria a partir de um estado  $n-\pi^*$ , com rendimento quântico bem menor.

Nossos dados de absorção sugerem que a molécula de NOR no estado fundamental é pouco afetada pelo microambiente criado pelas moléculas dos solventes. Os solventes, no entanto, influenciam drasticamente as propriedades de fluorescência. Com o grupo amina protonado (tampões pH 4.2 e 7.5) tem-se rendimento quântico de fluorescência relativamente alto. Com o grupo amina desprotonado, em pH alto e nos demais solventes, o rendimento quântico torna-se muito baixo, provavelmente devido à transferência de elétrons da piperazina para o anel quinolônico, levando a processos de desexcitação preponderantemente não-radiativos.

Seguindo com o desenvolvimento de nossos experimentos, na próxima seção analisaremos os tempos de vida de fluorescência das espécies de NOR presentes nos diversos solventes.

### **6.3. Tempos de vida da norfloxacin**

Obtivemos as curvas de decaimento da fluorescência de NOR no tempo mostradas na Figura 6.4. Para os solventes em que o rendimento quântico da NOR se apresentou pequeno, a fluorescência da NOR ficava da mesma ordem de grandeza que impurezas encontradas em alguns desses solventes. Então, como controle, foram tomados dados de decaimento em solvente puro com o mesmo intervalo de aquisição utilizado no decaimento de NOR correspondente.

Os dados foram ajustados de modo que  $0.8 < \chi^2 < 1.2$  (Lakowicz, 2006), iniciando-se pelo modelo monoexponencial, na região de tempos em que era possível omitir o perfil do LED (prompt). Os tempos de vida encontrados ( $\tau$ ) estão apresentados na Tabela 6.4.

Observando-se os decaimentos da Figura 6.3, verifica-se que, em alguns solventes, há contribuição de tempos de vida bem pequenos (menores do que a largura do pulso do LED): etanol (4), n-octanol (5), DMF (8), THF (11), éter dietílico (13) e tolueno (15). Utilizou-se então o algoritmo de deconvolução das curvas de decaimento incluindo o prompt. Os dados foram ajustados com exponencial simples, dupla ou tripla. Nos casos em que só se conseguiu bom ajuste com exponencial tripla, observou-se que o tempo mais longo devia-se a

impurezas do solvente e sua contribuição percentual era sempre menor do que 10%. Essa contribuição foi, então, omitida e os dois outros tempos são apresentados na Tabela 6.4 ( $\tau_0$  e  $\tau_1$ ), junto com suas contribuições fracionárias. Em três casos, etanol, THF e clorofórmio, o modelo de distribuição em torno de um dos tempos de vida deu melhor resultado.

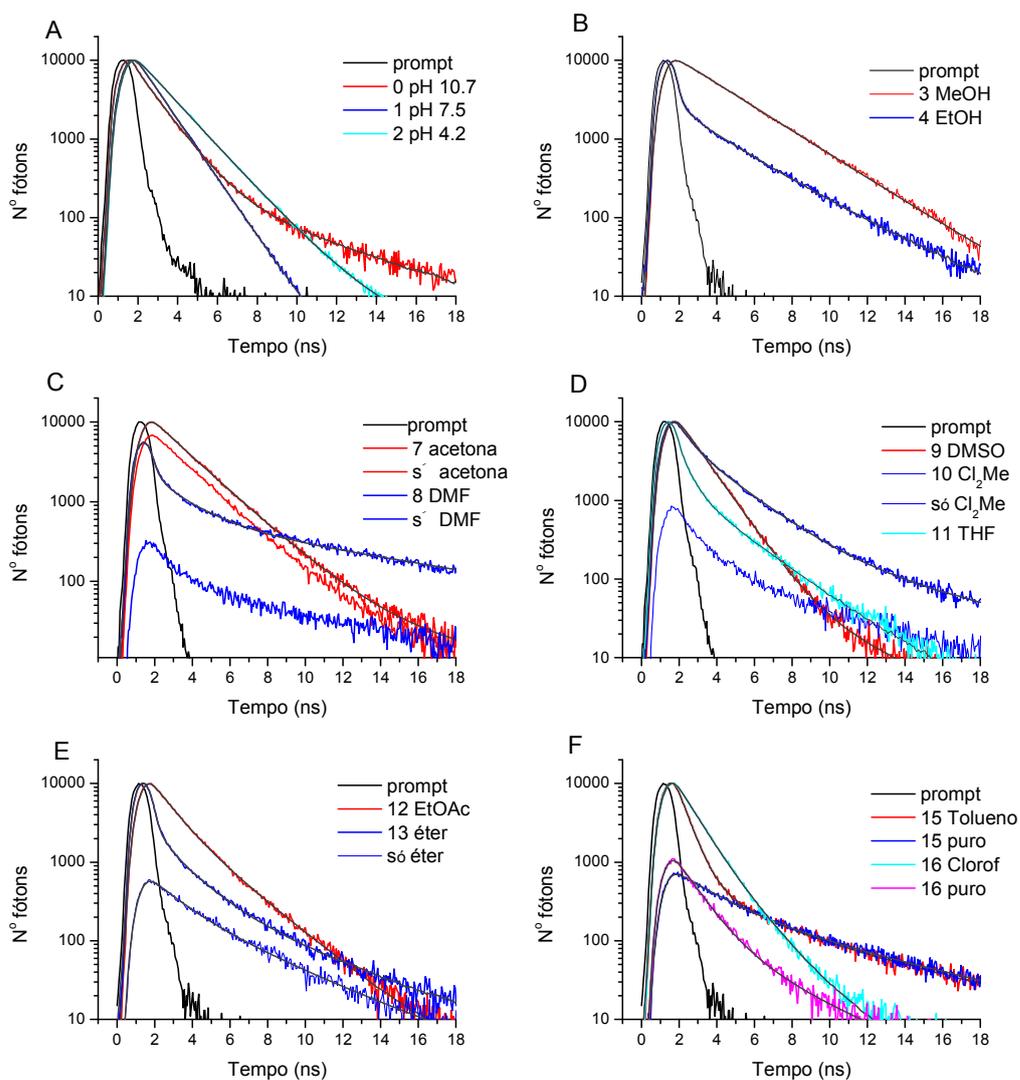


Figura 6.3. Decaimento da fluorescência de norfloxacina nos diversos solventes utilizados, conforme legenda em cada figura de A a F.

Tabela 6.4 – Tempos de vida de NOR nos diferentes solventes.

Solvente	$\lambda_{em}$	$(\phi_{rel})$ área	$\tau$ (ns) sem prompt	$\tau_o$ (ns)	$f_o$ (%)	$\tau_1$ (ns)	$f_1$ (%)	$\Delta\tau/\tau$
0- pH 10.7	414	0.017	1.20	0.05	30	1.2	63	
1- pH 7.5	406	0.821	1.19			1.2	94	
2- pH 4.2	440	1.000	1.61			1.6	95	
3- Metanol	432	0.291	2.86			2.9	100	
4- Etanol	426	0.008	3.18	0.05	65	2.9	35	0.37*
5- n-octanol	405	0.022						
6- Acetonitrila	420	0.001				-	-	
7- Acetona	420	0.001				-	-	
8- DMF	420	0.001				-	-	
9- DMSO	435	0.131	1.24	-	-	1.2	98	
10- Diclorometano	415	0.012		0.55	27	2.2	65	
11- THF	407	0.010	1.86	0.22	63	1.9	37	0.52**
12- Acetato de etila	407	1.385		1.0	46	2.2	54	
13- Éter dietílico	434	0.011		0.12	74	1.5	26	
14- Hexano	412	0.045						
15- Tolueno	439	0.069		0.50	90	2.2	10	
16- Clorofórmio	406	0.054				1.41	100	0.41*

\*distribuição em  $\tau_1$ ; \*\*distribuição em  $\tau_o$ . Os tempos  $\tau_o$  dos solventes 0 e 4 foram fixados em 0.05 ns, no ajuste.

Os tempos de vida de NOR, de 1.2 e 1.6 ns em solução aquosa pH 7.5 e 4.2, respectivamente, estão de acordo com os anteriormente encontrados por Luiz (2009). O valor encontrado em pH 4.2 (1.6 ns) também foi igual ao obtido por Bilski e colaboradores (1996). Já em pH 10.7, onde o rendimento quântico é muito baixo, nota-se contribuição de dois tempos de vida: 1.2 ns, correspondente à pequena porcentagem de espécie zwitteriônica ainda presente nesse pH, e um tempo muito curto, menor do que a resolução temporal do LED.

Conclui-se que NOR catiônica, com os dois grupos funcionais protonados, amina N4' e carboxila, tem um tempo de vida de 1.6 ns, um pouco maior que a NOR zwitteriônica, com  $\tau$  de 1.2 ns. Já a desprotonação da amina N4' suprime a fluorescência da NOR, provavelmente pela diminuição do tempo de vida.

Nos solventes n-octanol, acetonitrila, acetona, DMF e hexano, a NOR não teve seu tempo de vida medido, devido ao baixíssimo rendimento quântico.

Nos álcoois metanol e etanol, foi medido um tempo de vida de 2.9 ns, maior do que em meio aquoso. O decaimento em metanol foi ajustado com este único tempo de vida, mas em etanol dois tempos foram necessários: 2.9 ns e um tempo bem pequeno, menor que a resolução do LED.

Em DMSO, NOR apresentou um único tempo de vida de 1.2 ns e, em clorofórmio, o decaimento foi ajustado com uma distribuição de tempos de vida em torno de 1.41 ns, e  $\Delta\tau/\tau$  igual a 0.41. Em acetato de etila o decaimento foi ajustado com tempos de vida de 1.0 e 2.2 ns. Este foi o único solvente em que NOR apresentou rendimento quântico maior do que em meio aquoso, apesar de a fluorescência estacionária decair rapidamente com o tempo, provavelmente por causa de agregação (baixa solubilidade).

Nos demais solventes, NOR apresentou dois tempos de vida. Em diclorometano, THF, éter dietílico e tolueno houve um tempo curto ( $0.12 \text{ ns} < \tau_0 < 0.55 \text{ ns}$ ) e um maior variando de 1.5 a 2.2 ns, conforme a Tabela 6.4.

#### 6.4.

#### **Relação do deslocamento de Stokes com a polarizabilidade de orientação dos solventes (Lippert-Mataga)**

Efeitos de solventes sobre as propriedades fotofísicas de cromóforos/fluoróforos são devidos a interações destes com o microambiente da solução via interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, transferência de carga, reorientação dos momentos de dipolo dos solventes devido à excitação dos fluoróforos. Efeitos gerais e específicos de solvente são usados para descrever as propriedades relacionadas ao solvatocromismo. Devemos lembrar que, além dos efeitos de solvente, a origem intrínseca do deslocamento de Stokes é a relaxação estrutural do esqueleto molecular no estado excitado (Lakowicz, 2006; Valeur, 2005; Han et al, 2008).

A análise mais simples para efeitos gerais de solvente é feita através da equação de Lippert-Mataga, onde se assume que o mesmo estado excitado está envolvido na absorção e na emissão, e as diferenças nas energias do estado

fundamental e do estado excitado são devidas apenas à polarizabilidade de orientação do solvente (seção 4.4):

$$\Delta\nu = \frac{2\Delta f}{4\pi\epsilon_0 hca^3} (\mu_e - \mu_g)^2 + const.$$

$$\Delta f = \frac{\epsilon - 1}{2\epsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1}$$

onde os parâmetros da equação estão definidos na seção 4.4, lembrando que  $\Delta\nu$  é o deslocamento de Stokes,  $a$  é o raio da cavidade do solvente na qual reside o fluoróforo (raio de Onsager),  $\Delta f$  é a polarizabilidade de orientação e  $\mu_e$  e  $\mu_g$  são os momentos de dipolo do estado excitado e fundamental, respectivamente (Lakowicz, 2006).

O gráfico de Lippert-Mataga do deslocamento de Stokes da NOR em função da polarizabilidade de orientação do solvente é mostrado na Figura 6.4. Observa-se correlação com  $r^2 = 0.72$ , mesmo eliminando-se os solventes que mais se afastaram da reta (0, 1, 5, 13 e 15). Isto nos levou a buscar outro modelo de análise que levasse em conta alguns efeitos específicos de solvente.

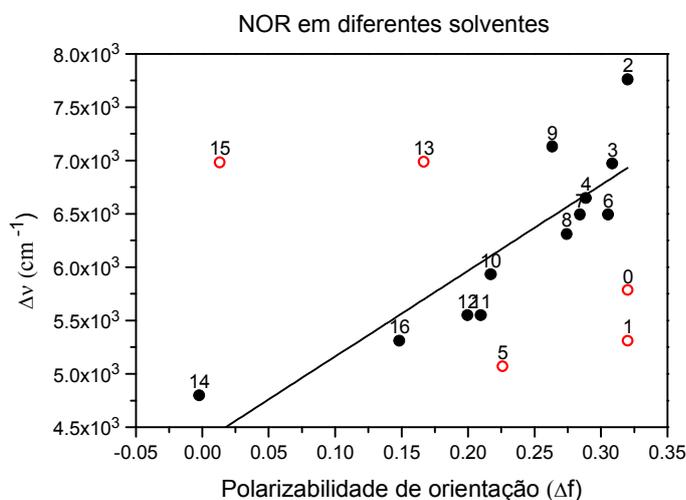


Figura 6.4. Correlação de Lippert-Mataga de NOR: desvio de Stokes de NOR vs. polarizabilidade de orientação dos diferentes solventes. Os números referem-se aos solventes da tabela 6.1.

A equação de Lippert-Mataga depende somente do valor absoluto do momento de dipolo de transferência de carga, e não do ângulo entre os dipolos. Uma variação linear não é sempre observada porque somente as interações dipolo-dipolo são levadas em conta e a polarizabilidade do soluto é desconsiderada. Por

isso, tentamos a outra abordagem desenvolvida por MacRae incluindo a polarizabilidade do soluto (Seção 4.4), onde  $\Delta f$  é substituída por

$$\Delta g = \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} - \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} .$$

Utilizando  $\Delta g$ , repetimos o gráfico de Lippert, mas não houve um melhor  $r^2$  em relação ao resultado apresentado na Figura 6.4.

Outro tipo de efeito específico de solvente está sendo preponderante na NOR, que possui dois grupos que sofrem equilíbrio de protonação, o grupo amina distal da piperazina e o grupo carboxílico. Estas características nos levaram a testar outra abordagem, pois de acordo com Musa e Eriksson (2009), Park et al. (2002) e Cuquerella et al. (2006) temos em NOR uma transferência intramolecular de cargas no estado excitado. Quando o estado emissivo é um estado de transferência de carga, que não é atingível por excitação direta, as abordagens utilizadas anteriormente não são as mais adequadas porque a energia do estado de transferência de carga não é conhecida. A teoria de Weller para exciplexes é então mais utilizada e somente leva em consideração a variação da frequência de emissão da fluorescência, e não o deslocamento de Stokes (Seção 4.4).

$$\nu_{em} = -\frac{2\Delta f'}{hca^3}(\mu_e)^2 + const.$$

$$\Delta f' = \frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{4n^2 + 2}$$

Então, calculamos  $\Delta f'$  para os diferentes solventes e montamos o gráfico  $\nu_{em} \times \Delta f'$ , como mostrado na Figura 6.5, mas os resultados pioraram muito, não apresentando possibilidade de correlação, mesmo dividindo os solventes em próticos e apróticos.

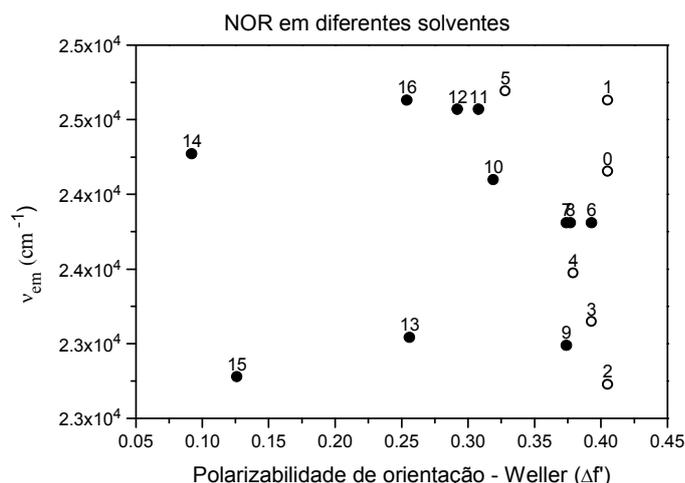


Figura 6.5. Gráfico de Lippert-Mataga de NOR: frequência de emissão de NOR vs. polarizabilidade de orientação corrigida pela teoria de Weller dos diferentes solventes. Os números referem-se aos solventes da tabela 6.1. (●) solventes apróticos. (○) solventes próticos.

Isso sugere que os efeitos específicos de solvente sobre a fluorescência de NOR não ocorrem preponderantemente pela via de mecanismos de transferência de carga mediada pelo microambiente do solvente.

## 6.5.

### Relação do deslocamento de Stokes com escalas empíricas de solventes

#### 6.5.1.

##### Escala empírica $E_T^N$ (30)

Como visto anteriormente, a equação de Lippert-Mataga assume que o deslocamento de Stokes depende somente da polarizabilidade de orientação dos solventes, o que não foi observado para a NOR, indicando que também ocorrem outros efeitos de solvente. Na abordagem de Weller que utiliza a frequência de emissão e não o deslocamento de Stokes, a correlação piorou. Seguindo nossa pesquisa nessa linha de raciocínio, passamos ao uso da escala empírica de polaridade de solvente  $E_T^N$  (30) (Seção 4.3), baseada na energia de transição de maior comprimento de onda do espectro de absorção da sonda pyridinium-N-phenoxide betain 2 (não fluorescente). Os valores de  $E_T^N$  (30) dos solventes utilizados estão na Tabela 6.1 (Reichardt, 2003; Valeur, 2005).

Deve ser dada atenção ao efeito adicional de ligação de hidrogênio em solventes próticos, como alcoóis. É frequentemente observado que correlações de propriedades dependentes de solventes (especialmente posições e intensidades de bandas de absorção e emissão) com a escala  $E_T^N$  (30) fornecem duas linhas distintas, uma para solventes apróticos e outra para solventes próticos. É importante salientar que há muitos parâmetros relacionados ao conceito de polaridade, e que a validade de escalas empíricas de polaridade baseadas em um único parâmetro é questionável (Valeur, 2005).

Com esta precaução em mente, os deslocamentos de Stokes foram relacionados aos valores  $E_T^N$  (30), conforme mostrados na Figura 6.6.

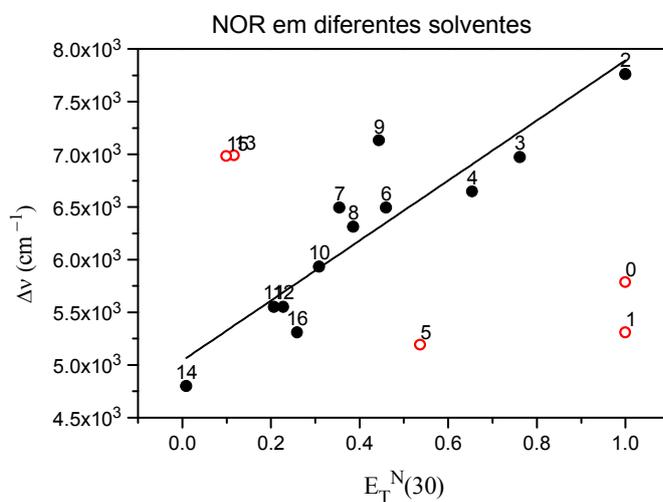


Figura 6.6. Desvio de Stokes de NOR nos diferentes solventes vs. valores de  $E_T^N$  (30) do solvente. Os números referem-se aos solventes da Tabela 6.1.

Como vemos no gráfico houve uma melhor correlação ( $r^2 = 0.81$ ), retirando-se os solventes 0, 1, 5, 13 e 15 (símbolos vazados). Neste caso encontramos uma linearização muito melhor do que as dos gráficos de Lippert-Mataga apresentados na seção anterior.

Para os tampões de pH 10.7 e 7.5 houve um severo desvio. A causa desses desvios pode estar associada à desprotonação do grupo carboxílico.

Em suma, os resultados sugerem que os estados de protonação do grupo amina da piperazina e do grupo carboxílico de NOR determinam prioritariamente as propriedades de fluorescência de NOR e que efeitos gerais dos solventes são descritos mais adequadamente através da escala empírica  $E_T(30)$ .

### 6.5.2. Escalas empíricas de Catalán e Kamlet-Taft

Utilizamos o desvio de Stokes e a frequência de emissão de NOR para uma abordagem com múltiplos parâmetros (polaridade/polarizabilidade, acidez e basicidade) nas escalas de solventes de Catalán e de Kamlet-Taft (Seção 4.3). As regressões multilíneas mostraram coeficientes com erros muito elevados, deixando claro que tais escalas não podem ser aplicadas à molécula de NOR. Os coeficientes encontrados para o desvio de Stokes são mostrados como exemplo.

Catalán ( $r^2 = 0.14$ )	Kamlet-Taft ( $r^2 = 0.20$ )
$y_0 = 4.2 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^3$	$XYZ_0 = 5.2 \times 10^3 \pm 0.6 \times 10^3$
$a_{SA} = 1.6 \times 10^2 \pm 7.6 \times 10^2$	$a_\alpha = -0.42 \times 10^2 \pm 5.3 \times 10^2$
$b_{SB} = 0.25 \times 10^2 \pm 9.0 \times 10^2$	$b_\beta = 0.5 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$
$c_{SPP} = 2.3 \times 10^3 \pm 2.1 \times 10^3$	$s_{\pi^*} = 1.2 \times 10^3 \pm 0.8 \times 10^3$

### 6.6. Fluorescência de Norfloxacin em solventes binários

A transferência de carga intramolecular no estado excitado de NOR, proposto por Park et al. (2002), associando uma grande mudança no momento de dipolo no processo de excitação, é fortemente dependente do solvente. O meio aquoso pode acelerar essa transferência de carga no estado excitado, mas isso vai depender fortemente do pH, visto que essa influência não é característica da água como solvente, mas da concentração de  $H^+$ . Dando prosseguimento ao nosso estudo, usamos misturas de solventes com o intuito de determinar que efeitos específicos estão ocorrendo.

Utilizamos inicialmente a mistura de dois solventes próticos com diferentes constantes dielétricas, água e etanol. Em seguida, estudamos a mistura água-DMSO, aprótico. Como a fluorescência de NOR é fortemente dependente de pH, utilizamos como meio aquoso dois tampões: tampão fosfato pH 7.4 e tampão citrato-fosfato pH 4.0.

### 6.6.1. Norfloxacin em misturas etanol-tampão

Começamos com soluções de NOR 10  $\mu\text{M}$  em etanol e nos tampões de pH 4.0 e 7.4. As diferentes proporções de etanol foram obtidas misturando-se frações adequadas das soluções em etanol e em um dos tampões. Os espectros de absorção (Figura 6.7) e de fluorescência (Figura 6.8) foram medidos após cada mistura.

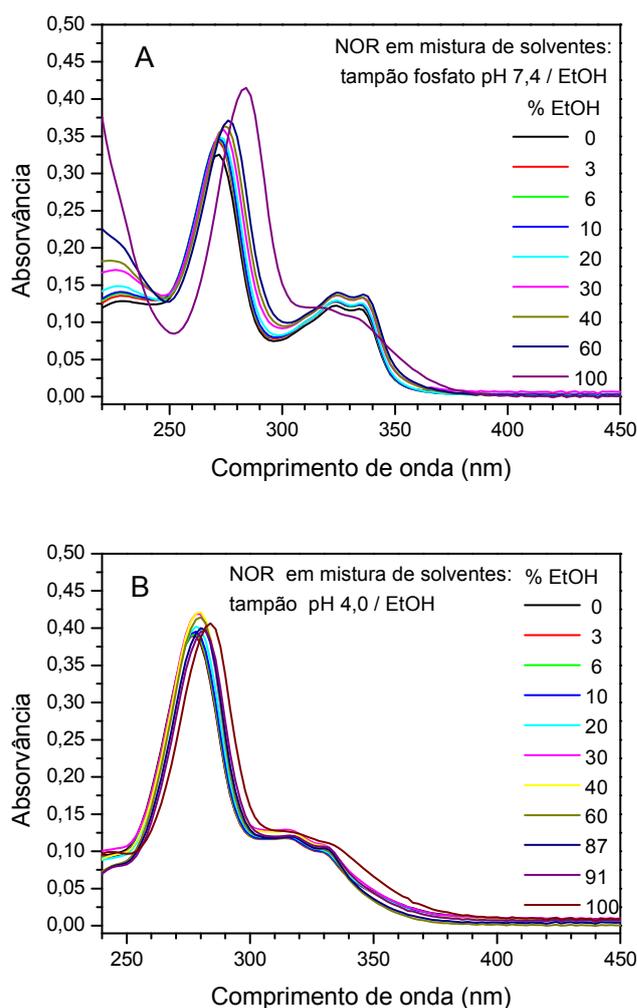


Figura 6.7. Variação dos espectros de absorção de norfloxacin 10  $\mu\text{M}$  em misturas de tampão e etanol. (A) tampão fosfato pH 7.4; (B) tampão citrato-fosfato pH 4.0. A porcentagem de etanol correspondente a cada espectro aparece na legenda.

As variações nos espectros de absorção apresentam pouca dependência com o aumento da concentração de etanol, principalmente em pH 4.0, pois o espectro em pH 4.0 já é bastante parecido com o espectro em etanol. Em pH 7.4, o pico de 272 nm tem deslocamento para o vermelho com o aumento da proporção de

etanol, até o valor de 284 nm, correspondente a etanol puro. Em pH 7.4, proporções de etanol entre 60 e 100% apresentaram espalhamento de luz muito grande, distorcendo os espectros de absorção. Por este motivo esses espectros não foram apresentados.

As variações nos espectros de fluorescência são muito mais significativas, especialmente no que diz respeito ao rendimento quântico (Figura 6.8). Indicam que a interação do estado excitado de NOR com os solventes é fator determinante dos efeitos específicos procurados.

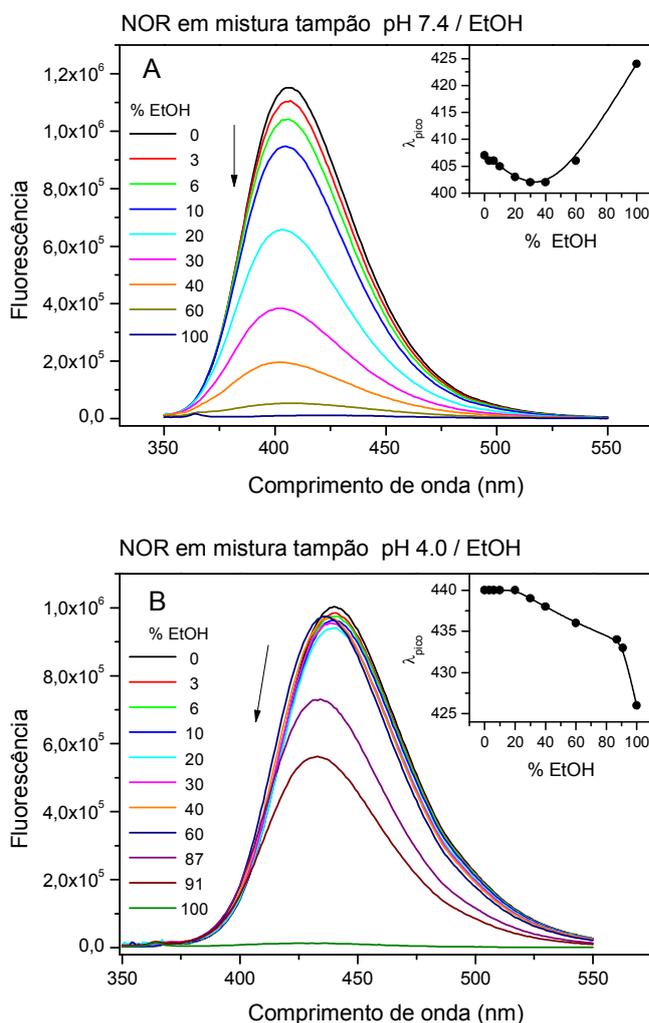


Figura 6.8. Variação dos espectros de fluorescência de norfloxacin 10 $\mu$ M em misturas de tampão e etanol. (A) tampão pH 7.4; (B) tampão pH 4.0. As inserções mostram as variações dos comprimentos de onda do pico de fluorescência com a porcentagem de etanol.

As variações de fluorescência em pH 7.4 e pH 4.0 são bem diferentes. Vemos na Figura 6.8 A que NOR em pH 7.4 tem sua fluorescência reduzida quase à metade com apenas 20% de etanol na mistura. Com o aumento da proporção de etanol, até 40%, há um leve deslocamento para o azul. A partir dessa proporção o comprimento de onda do pico volta a se deslocar para o vermelho, até o valor de 426 nm, em etanol puro (inserção na Fig. 6.8 A). Em pH 4.0, a redução de cerca de 50% na fluorescência só se dá com 91% de etanol (Figura 6.8 B) e o deslocamento de pico em 440 nm para 426 nm também é mais pronunciado em proporções altas de etanol (inserção na Figura 6.8 B).

A Figura 6.9 apresenta a variação da intensidade de fluorescência de NOR em função da proporção de tampão na mistura tampão-etanol, nos dois valores de pH. Observa-se, em pH 4.0, o brusco aumento de fluorescência em concentrações de tampão relativamente pequenas, da ordem de 10%.

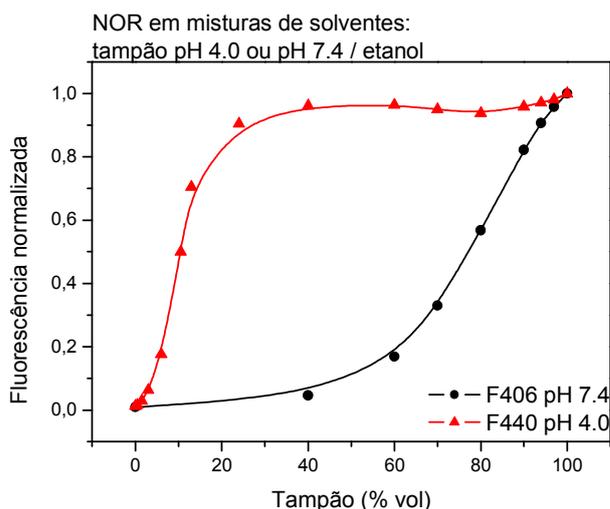


Figura 6.9. Dependência da intensidade de fluorescência de norfloxacin (10  $\mu$ M) em função do volume de tampão pH 4.0 (em 440 nm) e pH 7.4 (em 406 nm) nas misturas com etanol.

Lembrando que o grupo amina N4' da piperazina tem papel fundamental no rendimento quântico de fluorescência de NOR, podemos interpretar que em etanol puro esse grupo está desprotonado, implicando em baixo rendimento quântico, e que o aumento brusco da fluorescência de NOR com o aumento da fração de tampão em pH 4.0 é devido à protonação desse grupo. Como o pico de fluorescência desloca-se em direção a 440 nm, característico da carboxila protonada, sugere-se que já em baixas porcentagens de tampão pH 4.0 os dois

grupos sejam protonados. Por outro lado, com tampão pH 7.4, somente uma grande fração de tampão seria capaz de protonar a amina N4', enquanto que o grupo carboxílico se apresenta desprotonado.

Em pH 7.4 temos reduções significativas na intensidade da fluorescência de NOR com o acréscimo de pequenas alíquotas de etanol (1 a 10%) se comparadas com as reduções em pH 4.0. Essas quantidades de álcool são pequenas demais para afetar o índice de refração ou a constante dielétrica do solvente, caracterizando dessa forma um efeito específico de solvente (Lakowicz, 2006). Isso nos leva a pensar que o álcool pode alterar mais facilmente o microambiente que envolve as moléculas de NOR em pH 7.4 do que em pH 4.0.

### **6.6.2. Norfloxacin em misturas DMSO-tampão**

Repetimos para as misturas de tampão com DMSO o mesmo procedimento já descrito para as misturas etanol / tampão. Dessa forma, agora temos um solvente prótico com um aprótico. Soluções de NOR 10  $\mu$ M em tampão pH 4.0 ou em tampão pH 7.4 foram misturadas à solução em DMSO em diferentes proporções, de modo a manter a concentração de NOR sempre constante.

Fizemos também os experimentos de NOR em misturas de DMSO / tampão com amostras preparadas com antecedência nos diferentes percentuais. Estas novas soluções foram preparadas em diferentes tubos de ensaio, submetidos a ultrassom por um minuto, embrulhados em papel laminado e deixados por 24 h no refrigerador. Os valores de pH foram um pouco diferentes: 4.2 e 7.5. Obtivemos os espectros de absorção e fluorescência estacionária. Os resultados foram semelhantes. Com essas novas amostras encontramos também as curvas de decaimento de fluorescência para análise dos tempos de vida.

Os espectros de absorção e fluorescência, medidos para cada mistura, encontram-se nas Figuras 6.10 e 6.11.

As variações nos espectros de absorção de NOR em misturas DMSO / tampão, em pH 4.0, foram semelhantes às das misturas etanol / tampão. No entanto, em pH 7.5, elas foram bem mais gradativas. O pico em 272 nm, em pH 7.5, (ou 277 nm, em pH 4.2) sofre deslocamento para o vermelho, até 286 nm, em DMSO puro. As duas bandas parcialmente sobrepostas tornam-se mais alargadas com o aumento da proporção de DMSO. As variações nos espectros de

fluorescência também foram muito mais significativas, indicando o envolvimento das interações dos solventes com o estado excitado emissivo de NOR como fator determinante dos efeitos específicos de solventes.

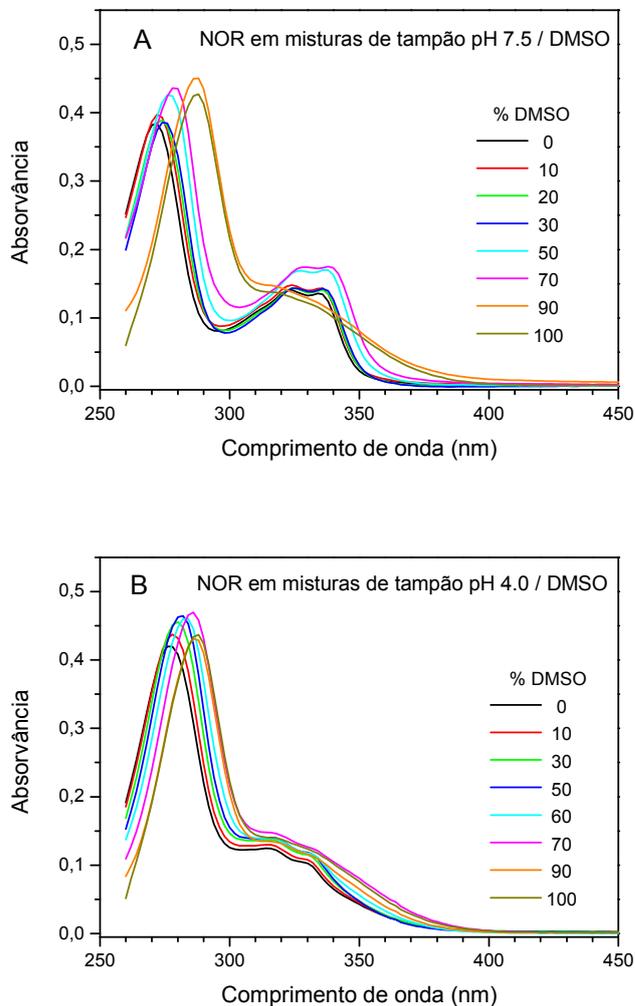


Figura 6.10. Variação dos espectros de absorção de norfloxacina 10  $\mu$ M em misturas de solventes tampão / DMSO. (A) tampão fosfato pH 7.5; (B) citrato-fosfato pH 4.2.

Os espectros de fluorescência (Figura 6.11) foram medidos imediatamente após as medidas de absorção. Conforme se observa, há forte diminuição da fluorescência com o aumento da concentração de DMSO. NOR, em pH 4.2, tem sua fluorescência suprimida por DMSO a uma taxa menor do que em pH 7.5.

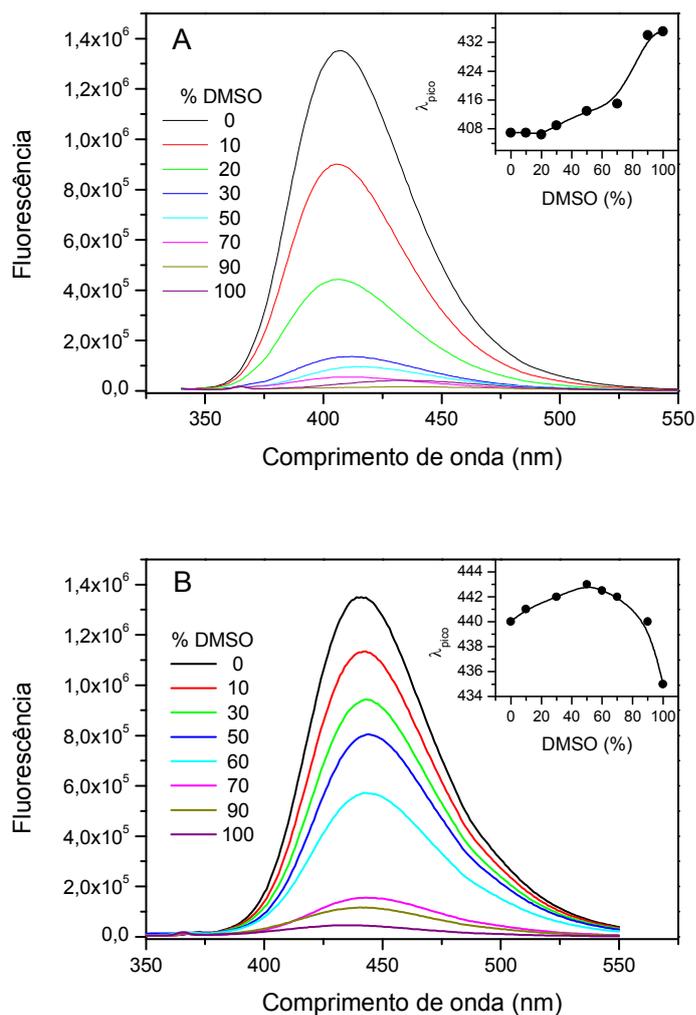


Figura 6.11. Variação dos espectros de fluorescência de norfloxacin 10  $\mu$ M em misturas de solventes tampão / DMSO. (A) fosfato pH 7.5; (B) citrato-fosfato pH 4.2.

As inserções na Figura 6.11 mostram a variação do pico de fluorescência com a porcentagem de DMSO. Ambas mostram, em baixas proporções de DMSO, um leve deslocamento para o vermelho em relação ao tampão puro. Com o aumento da concentração de DMSO, o pico se desloca mais abruptamente em direção à posição em DMSO puro (435 nm).

Comparando com os resultados de misturas tampão/etanol em pH 4.0, percebe-se que DMSO em baixas concentrações suprime mais efetivamente a emissão de fluorescência de NOR. Isso pode estar associado a uma interação específica de DMSO com NOR.

A Figura 6.12 mostra as curvas da intensidade de fluorescência de NOR em função da proporção de tampão, para misturas de cada um dos dois tampões com

DMSO. Nessa figura são comparados resultados obtidos com dois procedimentos descritos na legenda. Vemos que o tempo decorrido é importante para a total uniformização da mistura, notada a olho pela turbidez. Apesar de algumas diferenças relativas a isso, nota-se que o comportamento quanto à fluorescência permanece o mesmo. A intensidade de fluorescência apresentou comportamento semelhante ao da titulação com etanol. No entanto, observa-se queda mais abrupta de intensidade em concentrações até cerca de 10 a 20% de DMSO.

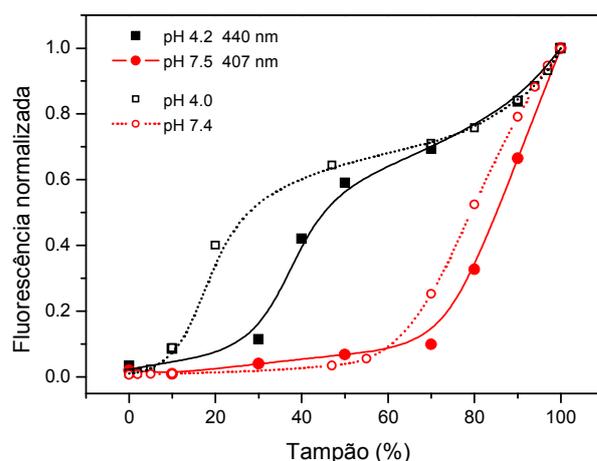


Figura 6.12. Intensidade de fluorescência de norfloxacina ( $10 \mu\text{M}$ ) em função do volume de tampão nas misturas com DMSO. Os símbolos cheios referem-se às amostras preparadas com antecedência e deixadas equilibrando até o dia seguinte. Os símbolos vazados referem-se às amostras medidas imediatamente após a mistura dos solventes. A intensidade de fluorescência foi tomada em 440 nm, para pH 4.2 ou 4.0 e em 407nm, para pH 7.5 ou 7.4.

Durante a realização dos experimentos descritos acima, fizemos a medição dos decaimentos de fluorescência de NOR nos diversos percentuais de tampão. Tomamos o cuidado de medir o espectro de decaimento do solvente DMSO puro, sem NOR, e compará-lo ao de NOR em DMSO (Figura 6.13).

Observa-se que o tempo longo corresponde à emissão do solvente (impurezas, apesar de termos usado DMSO de grau espectroscópico). Os dois decaimentos da Figura 6.13 mostram isso, pois apresentam a mesma inclinação em tempos mais longos, mostrando contribuições oriundas da mesma espécie. O decaimento da impureza foi bi-exponencial. Enquanto o tempo longo, obtido após o ajuste das curvas ( $\tau_1=5.7 \text{ ns}$ , na Tabela 6.5), pode ser atribuído somente à impureza e desprezado nos ajustes do decaimento de NOR, o tempo mais curto é

semelhante ao de NOR e pode ter alguma contribuição especialmente nas amostras de rendimento quântico pequeno.

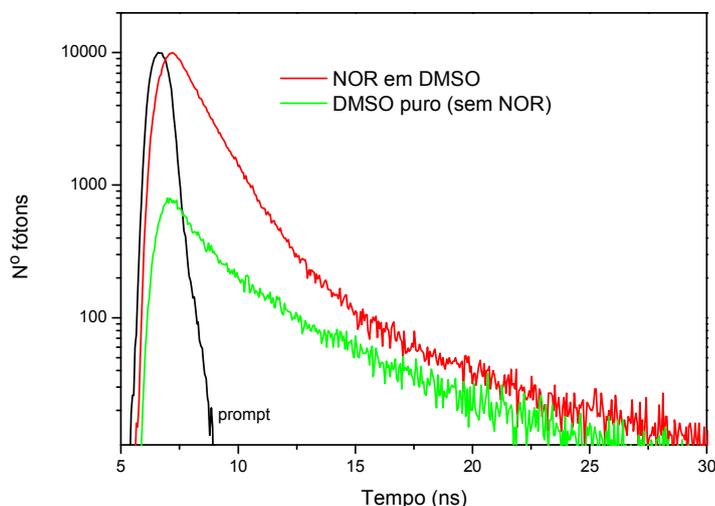


Figura 6.13. Comparação dos espectros de decaimento dos tempos de vida da fluorescência de norfloxacin 10 $\mu$ M em DMSO (0% de tampão pH 4.2) e de DMSO puro (sem norfloxacin) em 440nm.

A Figura 6.14 mostra os decaimentos de fluorescência de NOR nas diferentes razões de DMSO/tampão pH 7.5. A análise dos tempos de vida aparece na Tabela 6.5. É importante notar que quando o rendimento quântico é pequeno (frações de DMSO maiores do que ~30%, ver Fig. 6.11 A) a contribuição do tempo  $\tau_2$  da impureza é grande. Nessas frações observa-se a contribuição de um tempo de vida curto  $\tau_0$ , menor do que a resolução do LED (observar forma do decaimento em tempos curtos), que foi fixado em 0.1 ns na simulação. O aparecimento desse tempo curto nas misturas sugere que a diminuição do rendimento quântico está associada à criação de novos caminhos de desexcitação de NOR. Já o tempo  $\tau_1$  varia pouco, mas sua contribuição relativa depende muito da fração de DMSO.

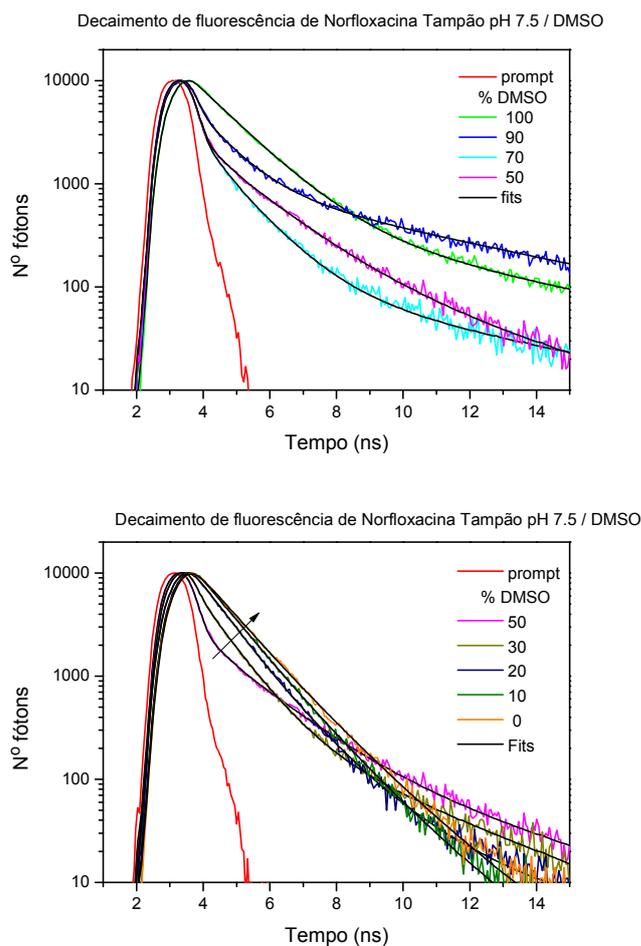


Figura 6.14. Decaimento dos tempos de vida da fluorescência de norfloxacin 10 $\mu$ M em função do volume do tampão pH 7.5 na titulação com DMSO.

Tabela 6.5 – Tempos de vida de NOR nos diferentes percentuais de mistura de solventes DMSO / tampão fosfato pH 7.5. 0 – 20%, distribuição de tempos de vida em torno de  $\tau_1$  ( $\Delta t_m/t_m=0.4$ ); 30 – 100%, modelo de exponencial tripla com  $\tau_0$  fixo (0.1 ns) e  $\tau_2$  correspondente a impureza. Emissão em 407 nm, exceto para 90 e 100% DMSO (440 e 434 nm, respectivamente).

% DMSO	$\tau_0$ (ns)	$f_0$ (%)	$\tau_1$ (ns)	$f_1$ (%)	$\tau_2$ (ns)	$f_2$ (%)
0			1.16	100		
10			1.06	100		
20			0.95	98		
30	0.1	37	0.93	54	3.3	9
50	0.1	63	1.6	30	4.6	7
70	0.1	67	1.13	28	6.3	5
90	0.1	37	1.04	33	6.4	30
100	0.1	10	1.31	75	6.6	15

A Figura 6.15 mostra os decaimentos de fluorescência de NOR nas diferentes razões de DMSO / tampão pH 4.2. O tempo de vida da espécie de maior contribuição, observado nos decaimentos através da inclinação da reta, varia em função do percentual de tampão na mistura. A análise das curvas de decaimento nos diversos percentuais de mistura forneceu os tempos de vida apresentados na Tabela 6.6.

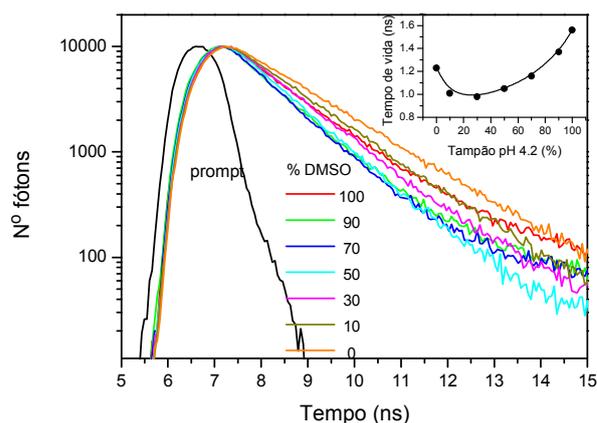


Figura 6.15. Decaimento da fluorescência de norfloxacina em misturas tampão pH 4.2 / DMSO, em diferentes proporções. Excitação em 330 nm, emissão em 440 nm. A inserção mostra variação dos tempos de vida, obtidos dos ajustes das curvas de decaimento, em função do percentual de tampão.

Tabela 6.6 – Tempos de vida de NOR obtidos dos ajustes do decaimento de fluorescência nos diferentes percentuais de mistura DMSO / Tampão pH 4.2. Emissão 440 nm. Ajustes biexponenciais, exceto para tampão puro, para o qual foi usada distribuição de tempos de vida com  $\Delta\tau/\tau_m=0.3$ .

% DMSO	$\tau_1$ (ns)	$f_1$ (%)	$\tau_2$ (ns)	$f_2$ (%)
0	<b>1.56</b>	<b>100</b>		
10	<b>1.37</b>	<b>98</b>	5.7	2
30	<b>1.20</b>	<b>97</b>	5.7	3
50	<b>1.06</b>	<b>98</b>	5.7	2
70	<b>0.98</b>	<b>92</b>	6.4	8
90	<b>1.01</b>	<b>91</b>	5.5	9
100	<b>1.23</b>	<b>91</b>	6.0	9

Nota-se a presença de dois tempos de vida, sendo o mais longo devido à impureza. O tempo associado à NOR (maior contribuição) varia de acordo com a

curva apresentada na inserção da Figura 6.15, apresentando um comportamento bifásico: uma redução até um valor mínimo de aproximadamente 1.0 ns, para 30% de tampão pH 4.2 na mistura, seguida de um aumento até 1.6 ns, quando a porcentagem de tampão cresce de 30 até 100%. Um comportamento bifásico também foi apresentado por Park et al. (2002) em misturas de água-acetonitrila e água-metanol, sem controle de pH.

Nossos experimentos mostraram que, mais do que a absorção UV-vis ou o deslocamento de Stokes, a intensidade de fluorescência é a propriedade fotofísica a apresentar maiores variações quando a vizinhança da molécula de NOR é modificada. A partir dos resultados em misturas de solventes, observa-se que em pH fisiológico, bem mais do que em pH ácido, a fluorescência de NOR é muito sensível a pequenas variações nas vizinhanças da molécula (Figs. 6.9 e 6.12) e portanto pode constituir uma importante sonda de modificações estruturais. Essa sensibilidade justamente em condições fisiológicas, por estar associada a mudanças moleculares, pode ser fundamental para a função específica bactericida.