



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

O efeito de pH na estabilidade de derivados Benzoporfirínicos
de anel B em meio água/etanol

André Luiz Tessaro

Orientador: Prof. Dr. Noboru Hioka

Maringá, Junho de 2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

... E nunca considerem seu estudo como
uma obrigação, mas como uma
oportunidade invejável de aprender sobre a
influência libertadora da beleza no domínio
do espírito, para o seu prazer pessoal e para
o proveito da comunidade à qual pertencerá
o seu trabalho futuro.

(Albert Einstein)

*Dedico aos meus pais, Aldo Natal Tessaro
e Irene Ghiraldi Tessaro, pelo amor e
confiança sempre presentes em todos os
momentos de minha vida.*

*Às minhas irmãs Andréa, Ana Paula e
Adriana pelo amor e amizade.*

A Ana Maria pelo amor e apoio constantes.

Agradeço

- A Deus por ter me dado força e perseverança para a realização deste estudo.
- Ao professor Dr. Noboru Hioka, pela orientação, incentivo, confiança e amizade durante a realização deste trabalho.
- Ao professor Dr. Vagner Roberto de Souza pelo apoio e discussões sempre muito proveitosas.
- Ao professor Dr. Edgardo Alfonso Gómez Pineda pelas discussões e sugestões.
- Aos professores: Florângela, Ourides, Silvana, Rosana, Ailton, Cláudio pelo apoio e amizade.
- Ao laboratório de análises de água pelas medidas de pH realizadas.
- Em especial aos amigos Tupã, Rodrigo e Daniela pelo apoio, amizade e contribuição para este trabalho.
- Aos amigos do laboratório: Rafael, Augusto, Vagner, Fernando, Bruno, Carlos, Adriana, João Paulo, Simone e a todos os colegas do bloco 31.
- A todos os professores do programa de Pós-Graduação, pelos conhecimentos transmitidos durante o curso de Mestrado.
- Ao Claudemir pela paciência e às demais pessoas do departamento de química que de uma forma ou de outra colaboraram para este trabalho.
- A CNPq pela bolsa concedida.
- A Fundação Araucária (SETI-Pr) pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Propriedades gerais necessárias aos fármacos candidatos a uso em TFD.....	3
1.2- Características fotofísicas.....	4
1.3- Agregação e seletividade.....	5
1.4- Alguns compostos para a TFD e suas propriedades.....	6
1.5- Definição de pK_a	10
1.6- A acidez de compostos orgânicos.....	12
1.7- Os derivados de anéis B de interesse.....	14
2- OBJETIVOS	16
3- MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1- Materiais.....	17
3.2- Métodos.....	17
3.3- Equipamentos.....	21
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1- Determinação de pK_a	31
4.2- Planejamento Fatorial 2^3	40
4.3- Estudo Cinético.....	47
5- CONCLUSÕES	55
6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

RESUMO

A busca por novos medicamentos com possibilidades de uso em Terapia Fotodinâmica (TFD), uma modalidade relativamente nova no tratamento médico que emprega um composto fotossensível e luz, vem crescendo nos últimos anos em virtude desta poder ser aplicada a uma ampla gama de doenças, entre os quais o câncer.

No presente trabalho estudaram-se as propriedades de derivados benzoporfirínicos de anel B (DiesterB e B3B), candidatos potenciais para aplicação em TFD, em misturas de água/etanol. Ambos compostos, clorinas, possuem grupamentos ácido-base, dessa forma, determinaram-se seus pK_a s em diversas misturas de água/etanol. Adicionalmente verificou-se a estabilidade das espécies com diferentes graus de protonação desses possíveis fármacos, detectando a importância de algumas variáveis experimentais no processo de estabilização do composto na forma monomérica terapeuticamente foto-ativa.

Nossos estudos mostraram que o pK_a dos nitrogênios pirrólicos dos compostos DiesterB e B3B, em 40 e 60 % de água, é ao redor de 3,3 indicando que grupos periféricamente ligados à estrutura porfirínica pouco afetam esta propriedade. No composto B3B, que além dos nitrogênio pirrólicos possui um grupo carboxílico periférico, os estudos apontaram um pK_a aproximado de 5,7. Em porcentagens maiores que 60 % de água, observou-se variação da força ácida. O aumento da quantidade de água favorece a acidez dos grupos amínicos e diminui a acidez do grupo carboxílico, resultados analisados por entalpia e entropia.

O planejamento fatorial 2^3 do método quimiométrico, utilizado em três regiões independentes de pH com níveis inferior e superior de concentração, tempo e teor de água, revelou que a variável mais significativa na estabilidade da forma monomérica foto-ativa do B3B é a porcentagem de água em etanol. O aumento desta variável em $\text{pH} = 4,1$ causou uma acentuada redução no coeficiente de absorvidade molar aparente da molécula, inclusive variando com o tempo. Neste pH tem-se a presença majoritária da espécie neutra de B3B ocasionando forte processo de auto-agregação.

Estudos cinéticos revelaram que a agregação transcorre segundo um mecanismo auto-catalítico que é interpretado por um método não convencional baseado na Teoria do Caos. Propõe-se que inicialmente ter-se-ia a formação de pequenos núcleos de agregação que catalisariam uma reação posterior originando agregados maiores. Os dados obtidos com o tratamento cinético demonstram que em regiões intermediárias de pH, onde a molécula de B3B encontra-se neutra, a agregação ocorre de forma mais rápida e acentuada reforçando as indicações obtidas no tratamento estatístico.

Um resultado importante para a aplicação terapêutica foi detectar o aumento do pK_a do grupo carboxílico em conteúdos maiores de água. Apesar de nas formulações utilizar-se de pH próximo ao fisiológico, é conhecido que tecidos em rápida proliferação têm aumento micro-local da acidez. Desta forma no caso do composto B3B inserido nesta região, este efeito levaria a aumento da concentração da espécie neutra (forma agregante) prejudicando sua eficácia clínica em TFD.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy (PDT), a new medical treatment that employs a photosensitizer compound and light, has been a growing field of interest over the last ten years. Not only for cancer treatment, one of the most important PDT applications, but also for several other diseases, the researches for new PDT medications have experienced an increasing development.

The aim of the present work was to study properties of B-ring Benzoporphyrin derivatives (named DiesterB e B3B), potentially useful in PDT clinical procedures, in water and ethanol mixtures. Both compounds have acid-base sites, which allowed pK_a determinations in neutral to acid solutions. Besides it, investigations of these compounds in different degrees of protonation were performed and the influences of some experimental conditions on the stability of the photoactive species in monomeric form were analyzed.

The observed pK_a of the imine nitrogens of the DiesterB and B3B, in 40 and 60 % of water, were nearly the same (3,3), indicating that the peripheral substituents bounded to the porphyrin structure do not affect this property. For the B3B compound, we observed $pK_a = 5,7$ for the peripheral carboxylic group. B3B acid strength undergoes some changes in solvent mixtures over 60 % of water. As the water content increases, the acidity of the nitrogen is favoured, while for the carboxylic acid, a decrease was observed (higher pK_a). These results are analyzed considering its enthalpy and entropy effects. It is showed that B3B structure can be modulated by the pH.

Using a statistical methodology employing a 2^3 factorial design we evaluated the influence of some experimental parameters in the B3B stabilization at different pHs, using two levels (+ and -) of water percentage, time and B3B concentration. The main parameter is the water content, mainly at pH 4.1, where B3B is unstable. At this pH, the preponderant B3B structure is the carboxylic and nitrogen free base forms, where the charge neutralization permits the self-aggregation process in high water presence. The aggregation was monitored by UV-Vis and it is water dependent. The curves observed were analyzed by a nonconventional kinetic treatment proposing first at all one slow step where small nucleus is formed, followed by a rapid change (catalyzed) to the final aggregate.

For therapeutic application one of the most important result obtained here was to find out that the pK_a of the carboxylic group increases as water content is raised, consequently it came close to the physiological pH. In addition it is know that the acidity of many tumours is higher than normal tissues. In this case B3B in that medium would increase the concentration of the neutral form, which is the specimen that undergoes the aggregation process threatening the drug efficiency for PDT.

1- INTRODUÇÃO

Tumor, sinônimo de neoplasma, é o tecido resultante de um crescimento anormal. Células doentes, com um distúrbio genético, passam a se reproduzir mais rapidamente do que as células normais levando à formação deste tecido, podendo este ser benigno ou maligno. Quando o crescimento celular é muito acelerado, desorganizado e com tendência a se disseminar a outros órgãos (metástase), geralmente é maligno. A Figura 1 exemplifica esquematicamente este processo (Inca, 2005). Câncer é a designação genérica de qualquer tumor maligno; a palavra câncer é derivada do latim e significa caranguejo. Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Os tipos mais comuns de câncer são os de pele, mama feminina, próstata, pulmão e estômago. Entre os citados, o câncer de pele é o de maior incidência no país, porém, com exceção do câncer melanoma, é a variedade de menor letalidade (Inca, 2005).



Figura 1: Representação esquemática do processo de carcinogênese seguido de metástase (a cor azul representa células alteradas).

Com relação ao tratamento, a ação curativa do câncer pode ser realizada através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula óssea, etc, ou seja, alternativas tradicionais já consagradas. Um novo tipo de tratamento, a terapia fotodinâmica (TFD), vem ganhando terreno rapidamente num avanço promissor na cura ou melhora de vida dos pacientes com câncer, apresentando efeitos colaterais reduzidos quando comparado às técnicas convencionais (Simplício e col, 2002). Embora a maior atenção da TFD seja voltada a esta doença, existem outras enfermidades que possuem como característica comum o crescimento celular desordenado, tais como: degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenosis, infestações microbianas (bactérias, vírus, fungos, protozoários), verrugas, arteriosclerose, AIDS, etc que podem, a princípio, vir a ser tratadas com a TFD (Hendreson e Dougherty, 1992; Levy, 1995; Sternberg e Dolphin, 1996; Sternberg e col 1998). Assim nos últimos anos têm aumentado o número de pesquisas envolvendo esta nova modalidade médica.

A base da TFD é a combinação de um medicamento fotossensível e luz visível na presença de oxigênio. Após o acúmulo do fármaco que possui alta afinidade por tecidos em neoplasia, se faz a irradiação de luz através de um cateter de fibra ótica. A luz (tipicamente de 600 a 800 nm) ativa o composto que, na sua forma excitada, reage com o oxigênio originando espécies tóxicas do mesmo necrosando ou danificando convenientemente o tumor.

Algumas características essenciais para TFD são a baixa toxicidade do composto no escuro e elevada seletividade no acúmulo do fármaco junto ao tecido doente, evitando-se que a vizinhança acidentalmente iluminada sofra danos.

Dentre os produtos altamente promissores para aplicações em TFD, incluem-se porfirinas e seus derivados, tais como: purpurinas, clorinas, bacterioclorinas e fitalocianinas (Richter e col, 1990).

1.1- Propriedades gerais necessárias aos fármacos candidatos a uso em TFD

Algumas propriedades gerais que os compostos e seus formulados devem possuir estão listadas abaixo (Sternberg e col 1998):

- a) características fotofísicas favoráveis;
- b) baixa toxicidade no escuro (baixa citotoxicidade);
- c) fotossensibilidade não prolongada;
- d) formulação simples, elevada reprodutibilidade e estabilidade do formulado (tempo mínimo de 02 anos), que geralmente é mantido seco, bastando ao médico adicionar água ou soro fisiológico e agitar;
- e) propriedades farmacocinéticas favoráveis, entre outras, rápida eliminação do corpo;
- f) facilidade de manuseio sintético que permita modificações para aumentar as propriedades favoráveis;
- g) facilidade de obtenção em escala industrial a custos reduzidos, com boa reprodutibilidade;
- h) facilidade de análise total dos constituintes da formulação, inclusive com fornecimento de roteiros de validação; e

- i) alta afinidade e penetração no tecido doente em relação ao tecido saudável (seletividade).

Para que o medicamento seja comercialmente viável e eficaz em sua ação terapêutica, é necessário que este atenda a esse conjunto de propriedades favoráveis.

1.2- Características fotofísicas

Um fator importante é o comprimento de onda de foto-ativação da molécula. Na região do visível, o comprimento de onda da luz incidente é proporcional ao seu grau de penetração no tecido, isto é, quanto maior o comprimento de onda, maior o grau de penetração da luz e conseqüentemente, maior a eficiência no combate ao tecido doente (Sternberg e col 1998). Assim, os fármacos desenvolvidos para uso em TFD devem ser cromóforos que absorvam na região próximo ao infravermelho (Levy, 1995). Entretanto, acima de 800 nm ocorre a absorção da irradiação pela água, o que restringe o comprimento de onda a este limite superior.

A irradiação da luz, de forma controlada e seletiva, se dá quando o composto encontra-se acumulado no tecido doente. O fármaco no estado excitado reage com oxigênio; este de seu estado triplete é convertido ao singlete. O oxigênio singlete, uma molécula altamente reativa, geralmente é apontado como o agente responsável pela eficiência do tratamento.

Adicionalmente o composto pode sofrer um processo chamado de foto-branqueamento onde, através de uma reação paralela, modifica-se a molécula causando mudanças nas propriedades de absorção de luz. A consequência é o produto não absorver luz no comprimento de onda de aplicação, prejudicando assim a ação terapêutica (Sternberg e Dolphin, 1996).

Dessa forma, as principais propriedades fotofísicas *in vitro* investigadas em moléculas candidatas a TFD são (Sternberg e col, 1998):

- a) Forte absorção de luz na região acima de 650 nm, onde estas apresentam maior penetração no tecido;
- b) alto rendimento quântico de estado triplete;
- c) alto rendimento quântico de geração de oxigênio singlete; e
- d) baixo rendimento de reação de foto-branqueamento do cromóforo

1.3- Agregação e seletividade

Como já mencionado anteriormente, as porfirinas e seus derivados são moléculas de grande interesse nas pesquisas envolvendo TFD. Uma característica importante destes compostos é a alta hidrofobicidade, conferindo maior facilidade de ligação a tecidos biológicos (Sternberg e col, 1998). Todavia essa propriedade confere às moléculas uma elevada tendência à auto-agregação em solução aquosa, veículo usualmente empregado em formulações devido à compatibilidade com os fluídos biológicos. Em geral, subsequente ao processo de agregação, porfirinas e seus derivados apresentam formação de precipitados, o que inviabiliza

seu uso clínico devido a forte possibilidade de perda de materiais, dor no momento da injeção, morte do paciente por obstrução de artérias (formulado intra-venoso), baixa absorção (formulado tópico), etc. Além dos inconvenientes citados o fármaco no estado agregado reduz a produção de oxigênio singlete e conseqüentemente diminui a eficiência do tratamento (Sternberg e col, 1998; Machado, 2000).

Outra questão a ser abordada é a seletividade. A maioria dos medicamentos funciona porque sua constituição e conformação permitem ligar (e possivelmente reagir) a um único sítio celular. Alguns derivados porfirínicos exibem alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LDL) do fluxo sanguíneo e tem sido fartamente documentado que tecidos em metástase possuem alta concentração de receptores deste tipo de lipoproteína (em comparação com células normais). Esta propriedade promove um maior acúmulo do fármaco no tecido doente, portanto, um ponto crucial na TFD é o balanço entre a distribuição do fármaco e o tempo de espera para o início da irradiação, de tal modo que a concentração do princípio ativo do medicamento e o seu grau de profundidade no tecido doente sejam adequados (Sternberg e Dolphin, 1996).

1.4- Alguns compostos para a TFD e suas propriedades

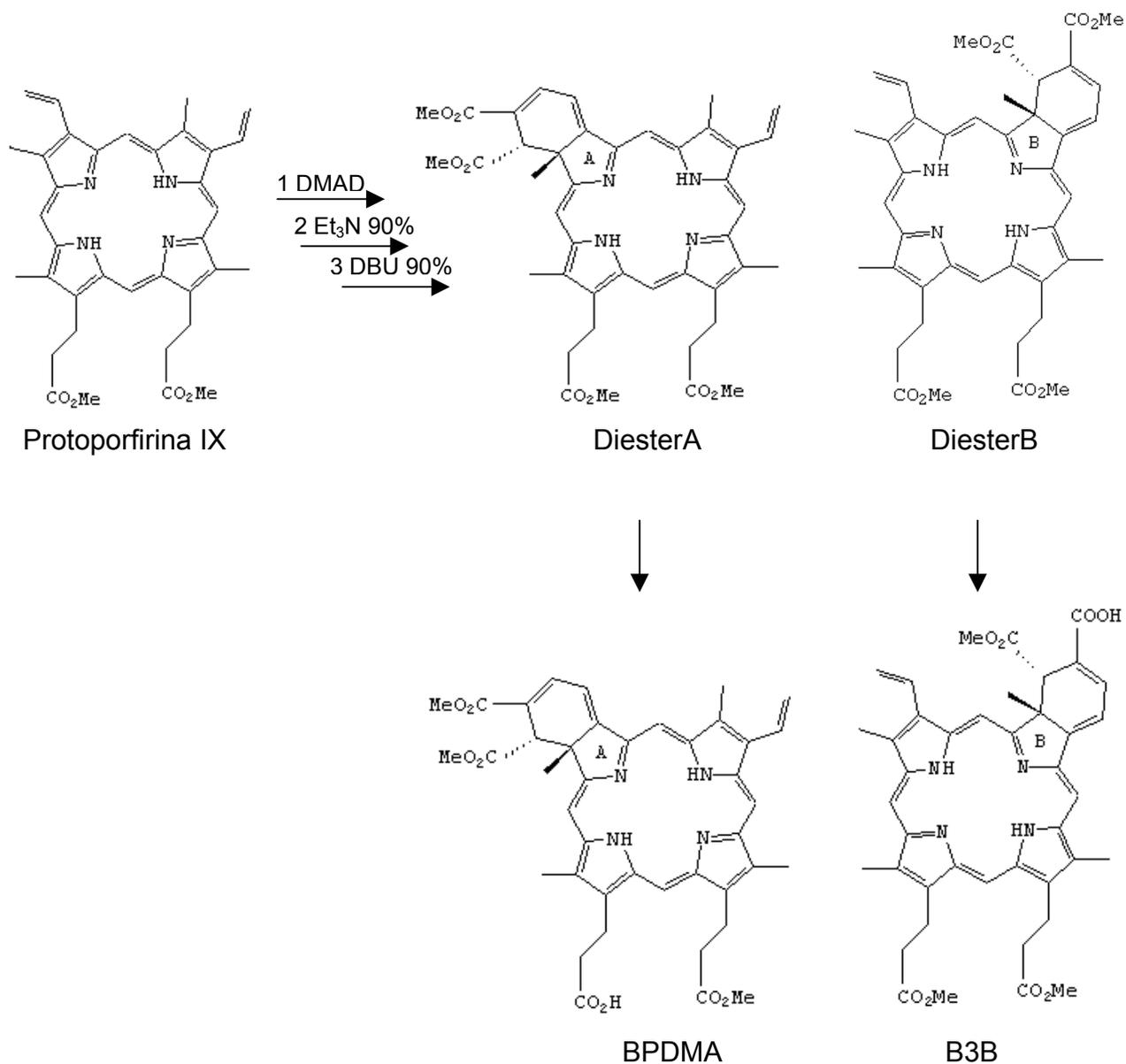
Apesar de diferentes tipos de compostos terem sido investigados para a TFD, o primeiro a ser aprovado pelas autoridades de saúde para o combate de câncer de esôfago e pulmão foi o Photofrin[®], um derivado de hematoporfirina. O terceiro e último fármaco aprovado para a TFD pela Food and Drug

Administration/EUA (ano de 2000), o Visudyne[®], é utilizado no combate a degeneração macular da retina, uma doença ocular a qual causa cegueira em pessoas idosas (Simplício e col, 2002). Adicionalmente, o princípio ativo do Visudyne[®], chamado de verteporfina ou BPDMA, tem sido testado contra várias das outras doenças já mencionadas anteriormente.

O BPDMA, um derivado benzoporfirínico monoácido tipo clorina, tem um dos anéis pirrólicos da estrutura porfirínica reduzido e, adicionalmente, a molécula possui um anel ciclohexadieno ligado a este pirrol reduzido. Durante seu processo de síntese são gerados dois isômeros ester em quantidades equimolares, com diferenças no carbono assimétrico do grupo pirrol reduzido (Sternberg e col, 1998). Dependendo da localização do anel ciclohexadieno são chamados de derivados de anel A e B, no caso respectivamente tem-se o DiesterA e o DiesterB (Esquema I). Na síntese do BPDMA apenas os compostos de anel A são usados.

Interessantemente, estudos têm demonstrado que a posição do grupo ciclohexadieno não afeta consideravelmente a eficiência desses fotossensibilizadores *in vitro* e que ambos (derivados de anel A e B) apresentam propriedades físico-químicas similares (Richter e col, 1990; Richter e col, 1991; Aveline e col, 1994; Aveline e col, 1995). Entretanto ambos os derivados podem sofrer auto-agregação em meio aquoso, com muito maior tendência a esta por parte dos isômeros de anel B. Menciona-se que embora o medicamento Visudyne[®] seja formulado eficientemente em lipossomos (sem agregação) (Chowdhary e col, 2003; Visudyne, 2004), o mesmo resultado não é obtido com os compostos de anéis B (Delmarre e col, 2001; Hioka e col, 2002). Por outro lado,

com a intensa comercialização do Visudyne[®] os derivados de anel B, co-produtos na razão 1:1, estão sendo acumulados. Diante da possibilidade concreta de uso comercial dos derivados de anel B, a investigação das propriedades desses compostos é bastante interessante.



Esquema I

Aliado a importância científica e aplicada destes derivados, uma vez que ambos apresentam elevada ação terapêutica, um ponto crucial neste trabalho é a questão do efeito do pH. Os derivados benzoporfirínicos apresentam como grupo ácido-base os nitrogênios dos anéis pirrólicos e, eventualmente grupos periféricos ligados à estrutura porfirínica. O fator pH determina a estrutura da espécie presente afetando as propriedades de absorção da luz, rendimento quântico, geração de oxigênio singlete, foto-branqueamento, facilidades na formulação, solubilização, lipofilicidade, afinidade celular, tempo de retenção, biodistribuição, etc. Vale ressaltar que, embora o pH fisiológico seja ao redor de 7,3, diversos tecidos celulares e intracelulares têm micro-localmente variações no meio. Adicionalmente a intensa atividade neo-vascular, característica comum em tecidos neoplásticos, aparentemente proporciona aumento de acidez em regiões micro-localizadas (Gerweck e Seetharaman, 1996; Tannock e Rotin, 1989). Dessa forma a influência da acidez do meio sobre os fotossensibilizadores, principalmente na região neutra a ácida, reveste-se de importância fundamental.

Recentemente nosso grupo investigou propriedades do composto DiesterB (Esquema I), quanto a aspectos termodinâmicos e cinéticos da auto-agregação em meio de pH neutro (Delmarre e col, 2001; Simplício e col, 2004A, Simplício e col, 2004B). Nesse foi observado que a adição de água em solvente orgânico induz a auto-agregação do substrato, inclusive levando ao surgimento de uma banda nova na região de 720 - 740 nm, atribuída a agregados, em detrimento à banda de monômeros em 690 nm.

1.5- Definição de pK_a

O equilíbrio químico envolvendo ácidos e bases, principalmente em meio aquoso, é de grande importância, visto que é comumente observado em sistemas biológicos desempenhando importante papel no metabolismo e na sua regulação (Lehninger e col, 1995). Para o melhor entendimento do comportamento de soluções aquosas de ácidos e bases, deve-se primeiro definir alguns conceitos fundamentais. Segundo a classificação de Bronsted-Lowry, ácidos são classificados como doadores de prótons e bases como receptores de prótons. O equilíbrio químico entre um ácido genérico (HA) e sua base conjugada (A⁻) é representado pela Equação 1:



A força de um ácido em água, isto é, o conteúdo no qual ele é dissociado, é determinado considerando esse equilíbrio. A determinação da sua constante de dissociação é realizada considerando os coeficientes de atividade das espécies ou, por aproximação, suas concentrações (Skoog e col, 1992; Atkins, 1999). Assim a constante de dissociação é ilustrada pela Equação 2.

$$K_a = \{ [\text{H}_3\text{O}^+].[\text{A}^-] \} / [\text{HA}] \quad (2)$$

O termo [H₂O] foi incorporado dentro de K_a, a constante de acidez, porque a água está presente em tal excesso que sua concentração não muda significativamente. Esta equação revela que a razão entre a concentração da

forma ácida (HA) e da forma básica (A^-) pode ser governada pela concentração de íons hidrogênio no meio. Fazendo-se o logaritmo dos dois membros da igualdade nesta equação e sabendo-se que:

$$\text{pH} = -\log [H_3O^+]$$

$$\text{pK}_a = -\log K_a$$

com o uso das equações acima pode-se reescrever a Equação 2 :

$$-\text{pH} = -\text{pK}_a + \log([HA]/[A^-]) \quad \text{ou} \quad \text{pH} = \text{pK}_a - \log([HA]/[A^-]) \quad (3)$$

Esta equação que relaciona quantitativamente o valor de pH com o valor de pK_a é conhecida como a equação de Henderson-Hasselbalch, que é simplesmente uma forma útil de redefinir a expressão para a constante de dissociação de um ácido. Assim pode-se definir o pK_a como sendo o valor de pH de uma solução na qual a concentração da espécie ácida é igual a da básica (ou seja, $([HA]/[A^-]) = 1$, portanto, $\log([HA]/[A^-]) = 0$). Note-se que, mesmo não tendo esta igualdade, é possível determinar diretamente o pK_a através da equação de Henderson-Hasselbalch desde que o pH e as concentrações das formas ácida e básica sejam conhecidos.

É importante salientar que o uso da equação de Henderson-Hasselbalch com os termos em concentração deve ser feito sabendo-se que o coeficiente de atividade de cada espécie em solução depende da força iônica do meio (Skoog e col, 1992).

1.6- A acidez de compostos orgânicos

Alguns fatores podem influenciar a força de acidez de um composto orgânico, dentre os quais, devem-se destacar os efeitos estruturais e os efeitos do meio (solvente, força iônica, temperatura, etc). A estrutura de uma molécula deve afetar sua acidez em inúmeros caminhos, tais como, efeitos de campo, efeitos de ressonância, ligações de hidrogênio, etc.

Quanto ao efeito de campo, em geral grupos que retiram densidade eletrônica por esse efeito aumentam a acidez de um composto orgânico, enquanto que grupos eletrodoadores atuam no sentido oposto, ou seja, contribuem para a diminuição da acidez do composto. Quanto ao efeito de ressonância na acidez de compostos, pode-se tomar como exemplo a comparação entre duas classes de compostos similares, ácidos carboxílicos e álcoois. Um ácido carboxílico (RCOO^-) é intrinsecamente estabilizado por ressonância enquanto um álcool primário (RCH_2O^-) não tem essa capacidade. A estabilização no RCOO^- deve-se a presença de duas estruturas canônica coexistentes e a dispersão da carga negativa entre os dois átomos de oxigênio. Assim a acidez do ácido carboxílico é maior quando comparada a álcoois primários. A mais se tem que, em geral efeitos de ressonância levam a mesma direção que os de campo (March, 1985). Outra propriedade é a presença de ligações de hidrogênio. Por um lado a presença destas em um dos lados do equilíbrio provoca estabilização; entretanto este fato provoca forte ordenamento destas moléculas de solvente, contribuindo para um desfavorecimento entrópico (March, 1985).

Efeitos do Solvente

Apesar da discussão acima sobre a influência de características estruturais na acidez de compostos orgânicos, a regra real determinante é freqüentemente exercida pelo solvente (March, 1985; Sykes, 1987), e este é particularmente o caso quando se trata de água como solvente.

A água tem uma desvantagem inicial como solvente para compostos orgânicos, uma vez que esta nem sempre solubiliza a forma não ionizada do composto. Desconsiderando esta limitação, a efetividade peculiar da água como solvente geral, deve-se ao fato dela ser fortemente polarizada e, também, possuir um tamanho relativamente pequeno. Por causa disto, a água é um solvente efetivamente único, por conta de sua alta constante dielétrica e de sua habilidade íon solvatante (Sykes, 1987).

A primeira propriedade obtém efeito por causa da alta constante dielétrica do solvente abaixar a energia eletrostática de qualquer par de íons presente nele, conseqüentemente tais íons têm menos facilidade em se recombinar ficando nessa forma iônica mais confortável em solução. Neste caso o efeito é de entalpia. Por outro lado, ao estabilizar os íons (dispersando ou deslocalizando sua carga), o solvente forma um envelope de solvatação de moléculas deste em torno das espécies carregadas. Como uma das conseqüências tem-se um efeito de organização do solvente; este é um efeito desfavorável de entropia ao aumento de acidez (March, 1985).

Assim, ao analisar a força ácida de um dado composto num solvente, cabe avaliar os termos de entalpia (ΔH) e entropia ($T\Delta S$) notando-se que os dois fatores atuam em sentidos opostos.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4)$$

Para ácidos simples (exemplo os minerais e orgânicos simples), em geral o efeito de entalpia prevalece; entretanto para ácidos orgânicos que possuem estabilização estrutural intrínseca, o termo de entropia muitas vezes prevalece ao de entalpia (Sykes, 1987).

1.7- Os derivados de anéis B de interesse

Os derivados Benzoporfirínicos de anéis B foco deste trabalho são o DiesterB e o B3B (Esquema I). Ambos são bastante solúveis em solventes orgânicos puros. O DiesterB, uma clorina tetra-ester, apresenta caráter ácido-base nos nitrogênios pirrólicos sendo que em meio neutro a ácido, os nitrogênios iminas (base livre) podem sofrer protonação. No caso do B3B, adicionalmente tem-se o grupo carboxílico periférico ligado ao anel ciclohexadieno. Aponta-se que em compostos porfirínicos com grupos carboxílicos periféricos, existem controvérsias na literatura com respeito a atribuição dos pK_a s. Em alguns casos a observação de dois equilíbrios ácido-base foi atribuída à seqüência de protonação dos dois nitrogênios iminas dos anéis pirrólicos (Pottier e col, 1985). Essa proposição foi questionada principalmente por Cunderlíková e colaboradores (Cunderlíková e col, 1999) que atribuíram que o pK_a de valor inferior refere-se aos nitrogênios

enquanto que o superior corresponde ao grupo carboxílico. Acrescenta-se ainda que aparentemente as espécies terapeuticamente ativas são as formas de base livre de ambos derivados de anéis B no estado monomérico (Richter e col, 1990; Richter e col, 1991; Cunderliková e col, 1999).

2- OBJETIVOS

O presente trabalho tem por finalidade ampliar os estudos do DiesterB e, adicionalmente, investigar o composto B3B (Esquema I). Os objetivos deste estudo foram: i) estudar a estabilidade de compostos de anel B e de suas espécies em misturas de água/etanol com diferentes graus de protonação; ii) investigar o mecanismo de agregação através de estudos cinéticos em meio neutro/ácido. O sistema de solventes escolhido é a mistura água/etanol devido a sua utilização potencial em formulações.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais

Todos os solventes e reagentes utilizados eram de alto grau de pureza. A água utilizada foi destilada. Eventualmente utilizou-se de água desionizada para comparação de resultados.

3.2- Métodos

Procedimentos gerais

Os derivados benzoporfirínicos de anel B, compostos DiesterB e B3B, foram cedidos pelo Prof. David Dolphin (University of British Columbia). As soluções estoques, preparadas em DMSO, eram armazenadas no escuro e na geladeira a fim de evitar-se degradação. Antes do uso, as soluções eram descongeladas e padronizadas por espectrofotometria UV-Vis, em DMSO, utilizando um valor de coeficiente de absorvidade molar (Delmarre e col, 2001) de $\epsilon = 34000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em 692 nm para ambos os compostos.

As misturas de solventes foram preparadas em balões volumétricos (10 mL), pela adição de diferentes volumes de etanol com 0,500 mL de solução de NaCl ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) e 0,500 mL de solução tampão de McIlvaine (ácido cítrico e fosfato dibásico de sódio) para controle de força iônica e de pH, respectivamente. Adicionalmente, em situações em que se exigiam soluções com pH inferior a 2,0, utilizou-se solução de ácido clorídrico previamente padronizado. Os balões foram

completados com água. Alíquotas de 2,0 mL eram retiradas dos balões volumétricos e transferidas para as cubetas. A temperatura em que os experimentos eram executados foi de 30,0° C. Os derivados eram introduzidos via microseringa (5-15 µL do estoque) seguido de agitação. A solução final não continha mais que 0,75 % (V/V) de DMSO, [NaCl]= 0,10 mol L⁻¹ e [tampão]= 0,016 mol L⁻¹. As composições de solventes estão apresentadas em porcentagem de água em etanol (V/V).

Determinação de pK_a

Para a determinação dos valores de pK_a aparente dos grupos amino (DiesterB e B3B) e carboxílico (B3B), utilizou-se o método espectrofotométrico de absorção UV-Vis avaliando-se o perfil da absorbância em 688 (banda Q) e 430 nm (banda de Soret), ambas correspondentes a monômeros, e da banda em 672 nm referente aos nitrogênios protonados. A razão de concentrações apontada na Equação 3 pode ser escrita em termos das intensidades de absorção, resultando em:

$$\log\left(\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}\right) = \log\left\{\frac{\text{Abs}_{\text{bás}} - \text{Abs}_i}{\text{Abs}_i - \text{Abs}_{\text{ác}}}\right\} \quad (5)$$

onde: Abs_{bás} e Abs_{ác} são as intensidades de absorção das soluções nos limites básico e ácido, respectivamente; Abs_i é a intensidade de absorção das soluções em pHs intermediários. Dessa forma a Equação 3 fica:

$$\text{pH} = \text{pK}_a - \log\left\{\frac{\text{Abs}_{\text{bás}} - \text{Abs}_i}{\text{Abs}_i - \text{Abs}_{\text{ác}}}\right\} \quad (6)$$

De posse dos resultados de absorvância, utilizou-se das seguintes metodologias para calcular o valor de pK_a dos compostos estudados:

a) método das derivadas: para a determinação do ponto de inflexão em uma curva sigmoidal pode-se usar o método da primeira e segunda derivada em função do pH. No caso da primeira derivada, o pK_a é obtido pelo ponto de máximo ou mínimo da curva. Na derivada segunda, o valor é encontrado pela mudança abrupta da região positiva para negativa (ou vice-versa) passando pelo valor zero (Harris, 2001; Skoog e col, 1992).

b) gráfico de pH vs $-\log([HA]/[A^-])$: a partir do coeficiente linear da curva construída tomando-se a relação pH vs $-\log([HA]/[A^-])$ obtém-se o valor do pK_a .

c) computacional – Programa Specpk (Albert e Serjeant, 1971): essa metodologia é empregada para calcular constantes de ionização de moléculas que apresentam grupos com valores de pK_a próximos. Além dos valores de absorvâncias correspondentes a cada solução, fornecemos as absorvâncias correspondentes às espécies ácidas e básicas juntamente com sua concentração. Inicialmente, os dados espectrofotométricos são utilizados para estimar a absorvidade molar da espécie monoprotonada (intermediária). A partir desta, faz-se estimativas iniciais de pK_{a1} e pK_{a2} . De posse desses valores, o programa re-estima a absorvidade molar da espécie monoprotonada. O processo é continuado reiterativamente até que não exista diferença significativa entre os sucessivos valores de pK_{a1} e pK_{a2} .

Procedimento quimiométrico

Para o estudo da estabilidade do B3B utilizou-se o planejamento fatorial 2^3 do método quimiométrico. Três pHs diferentes foram estudados independentemente. Para cada pH (7,0, 4,1 e 2,6) trabalhou-se em dois níveis (- e +) associados a três variáveis: tempo, [B3B] e porcentagem de água, o que corresponde ao planejamento fatorial 2^3 . Utilizou-se de 5 (-) e 360 (+) minutos como tempo de análise inferior e superior, respectivamente. A concentração de B3B foi de $4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (-) e $26,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (+). O conteúdo de água em etanol foi de 40 % (-) e 60 % (+). Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Para o tratamento estatístico foi utilizado o programa Design-Expert® (Wiley, versão Release 6.0.3). Uma vez determinado o fator mais relevante, efetuou-se um estudo de superfície desta variável tomando-se mais pontos experimentais a fim de evitar-se erros causados por investigações envolvendo apenas dois níveis.

Procedimento cinético

A investigação do processo cinético de agregação do B3B foi realizada monitorando-se os comprimentos de onda junto aos picos de monômeros e agregados. Para o tratamento cinético utilizou-se o programa Kaleida Graph (versão 3.5 Demo) e a Equação 7, proveniente da Teoria do Caos, utilizada para cinéticas auto-catalíticas. Este método foi similar ao aplicado em estudos anteriores com o DiesterB em meio água/solvente orgânico na região neutra de pH (Simplício, 2003).

$$\frac{(\text{Abs}-\text{Abs}_F)}{(\text{Abs}_0-\text{Abs}_F)} = 1 / (1 + (m-1)[k_0t + (n+1)^{-1}(k_{ct})^{n+1}])^{1/(m-1)} \quad (7)$$

onde, Abs , Abs_F e Abs_0 são respectivamente as absorvâncias a cada tempo, final e inicial, m representa o tamanho do núcleo, k_c e k_0 as constantes de velocidade das etapas catalisada e não catalisada e n é um parâmetro cinético relacionado com a velocidade de crescimento do agregado.

3.3- Equipamentos

Os experimentos foram monitorados através do espectrofotômetro Cary-50 (Varian) usando cubetas de quartzo e poliestireno com 1,00 cm de caminho ótico. As medidas de pH foram realizadas em um pHmetro Meterlab pHM 240 com eletrodo de vidro acoplado a um eletrodo de referência de calomelano. Este sistema potenciométrico específico é adequado para medidas de pH em misturas de água com solventes orgânicos (Nicholson e col, 1997) (calibrados utilizando solução padrão aquosa, como usual, pH= 7,0 e 4,0).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sistema Potenciométrico

Inicialmente avaliou-se o sistema potenciométrico empregado (eletrodo de vidro acoplado a um eletrodo de calomelano) quanto a sua capacidade de resposta. Segundo Nicholson e colaboradores (Nicholson e col., 1997), as leituras de pH utilizando-se este sistema levariam 30 minutos para estabilizar. Assim, prepararam-se soluções de água/etanol utilizando solução tampão com pH igual a 4,8 (água) e, avaliou-se o tempo de estabilização da leitura de pH (Figura 2).

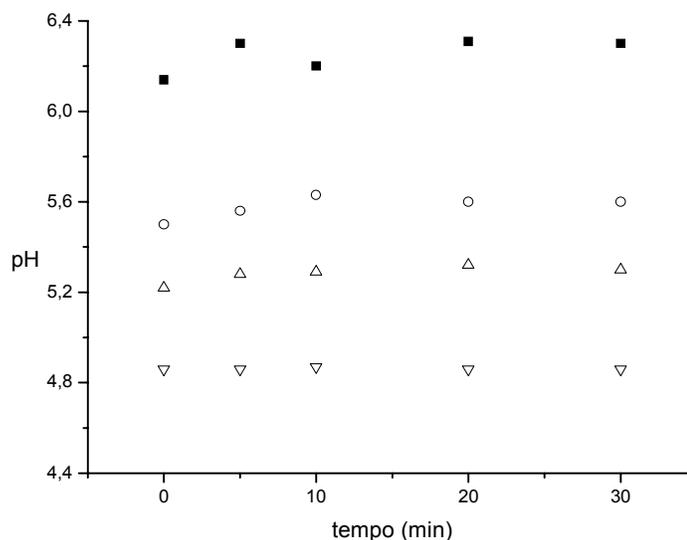


Figura 2: Medidas de pH em misturas de água/etanol em função do tempo. 20 % (■), 50 % (○), 70 % (△) e 100 % (▽).

Os resultados ilustrados na Figura 2 indicam uma variação de pH muito pequena com o tempo, principalmente em misturas onde o conteúdo de água é superior a 50 %. Assim, ao longo deste trabalho, optou-se por aguardar a estabilização da leitura de pH por cerca de 5 minutos. É importante ressaltar que,

para efeito de comparação, algumas medidas de pH em meio etanólico foram realizadas com o eletrodo convencional de pH (eletrodo combinado de vidro). Verificou-se que com este eletrodo a flutuação na leitura era razoavelmente grande e o tempo de estabilização era superior a 10 minutos, apesar de ao final, convergir para o valor de pH correto.

Adicionalmente, analisou-se a capacidade de resposta do sistema eletrodo de vidro com calomelano em diversas misturas de água/etanol. Utilizando-se de solução tampão com pH igual a 4,8 (em água pura), prepararam-se soluções com diferentes proporções dos solventes e determinaram-se seus pHs (Figura 3).

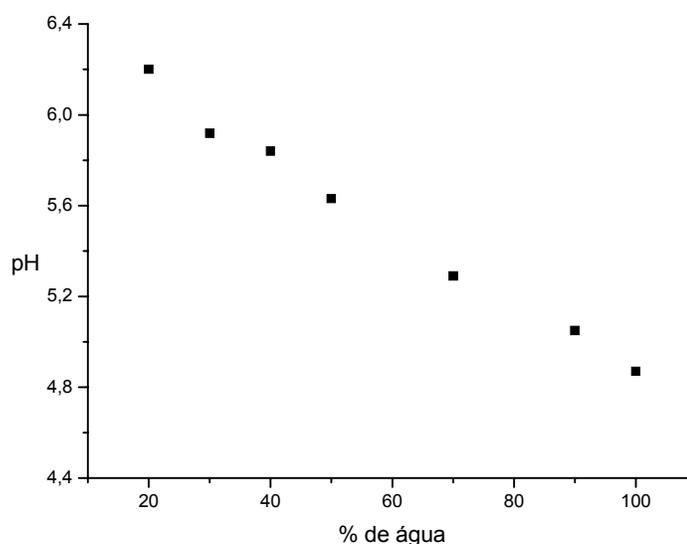


Figura 3: Medidas de pH em função do conteúdo de água em misturas de água/etanol.

Analisando-se a Figura 3, observa-se a convergência das leituras de pH, à medida que aumenta-se o conteúdo de água na mistura, para o valor esperado em

100 % de água, isto é 4,8. Esta coerência entre valor de convergência e o esperado, sugere que as medidas com o sistema potenciométrico utilizado são confiáveis. Paralelamente a este experimento, determinou-se o pH dessas soluções através do método da ABNT 10891 (medidas de pH em álcool etílico) usando-se equipamentos do Laboratório de Análises de Águas e Alimentos do DQI/UEM; os dois sistemas resultaram em valores idênticos evidenciando a eficácia do sistema ora empregado neste trabalho.

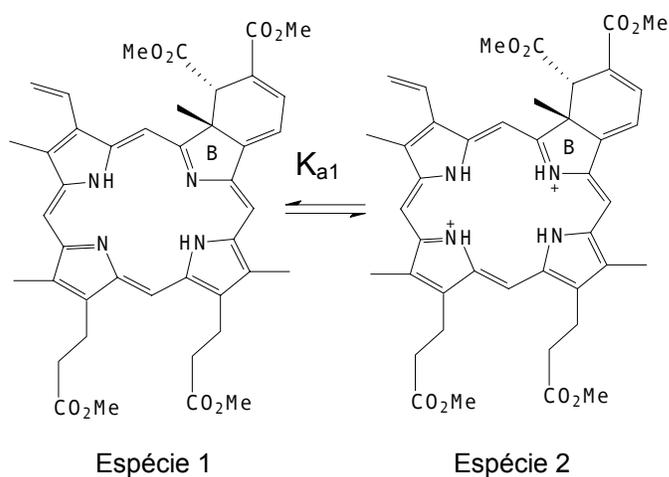
Geral

Em solvente orgânico puro, os compostos DiesterB e B3B estão na forma monomérica, apresentando duas bandas principais no espectro eletrônico sendo uma na região de 690 nm (banda Q) e outra em 430 nm (banda de Soret).

Em nosso trabalho, os resultados espectrofotométricos revelaram que ambos os compostos em etanol aquoso mantêm-se estáveis na forma monomérica até aproximadamente 40 % de água (ocorreu somente um ligeiro deslocamento do pico de monômeros para 688 nm). Em soluções com teor maior de água em etanol e sob certas condições experimentais principalmente relacionadas ao pH, verificou-se acentuada diminuição na intensidade dos seus picos indicando que a forma monomérica destes é instável levando a formação de agregados. Eventualmente além do decréscimo dos picos em 688 e 430 nm, tem-se o surgimento de uma nova banda na região de 720-740 nm, atribuída a outras formas de agregados. Diante deste quadro, iremos abordar primeiramente generalidades resultantes dos dados experimentais relativos à questão do pH do meio.

Como já citado, o composto DiesterB, é um tetra-ester onde somente os nitrogênios dos anéis pirrólicos (grupos aminos) são grupos ácido-base. Nossos resultados mostraram que apenas uma transição ácido-base foi observada experimentalmente em meio ácido a neutro e, neste caso, propõe-se a presença de duas espécies majoritárias do composto dependentes da acidez do meio. Em meio básico/neutro a entidade presente é a espécie 1, forma sem carga, representada no esquema II (Delmarre e col, 2001; Simplício e col, 2004B). Em 60 % de água/etanol o espectro de absorção inicial do DiesterB (Figura 4, espectro a) apresenta as duas bandas principais, em 688 nm (banda Q) e em 430 nm (banda de Soret), indicando que a espécie 1 encontra-se no estado monomérico. Entretanto, ambos os picos de monômero diminuem com o tempo, indicando a instabilidade do mesmo em decorrência da agregação (Delmarre e col, 2001; Hioka e col, 2002; Simplício e col, 2004A; Simplício e col, 2004B). Este processo deve-se a presença de interações atrativas, dos sistemas π das unidades de porfirinas (forças de dispersão de London (London e Physik, 1930)), aliada a ausência de cargas da espécie 1. A formação do agregado é lenta, originando dímeros, trímeros e outros (Hioka e col, 2002; Simplício e col, 2004A). Este fenômeno se reflete de duas formas distintas. Em determinadas condições experimentais observa-se a diminuição dos picos de monômeros e, simultaneamente, o surgimento de um novo pico na região de 720-740 nm (Figura 4, espectro b) atribuído a espécie 1 no estado agregado (tempo infinito) (Delmarre e col, 2001; Hioka e col, 2002; Simplício e col, 2004A; Simplício e col, 2004B). Entretanto em outras condições do meio observa-se apenas a diminuição dos

picos de monômeros, ou seja, novamente agregação, no entanto sem a formação de pico adicional. O modelo do Exciton Molecular explica esses dois tipos diferentes de agregados, isto é, um não apresentando banda específica e outro com pico. A base do modelo do Exciton é na interação ressonante criada durante a interação dos estados excitados dos componentes das moléculas constituintes do agregado (Kasha, 1963; Cooper, 1970). Quanto à banda de Soret, em todos os casos além da sua diminuição, ocorre simultaneamente alargamento e deslocamento de seu comprimento de onda de máximo para a região de 475 nm. A espécie 1 é a estrutura predominante de DiesterB até ao redor de pH 3,6.



Esquema II

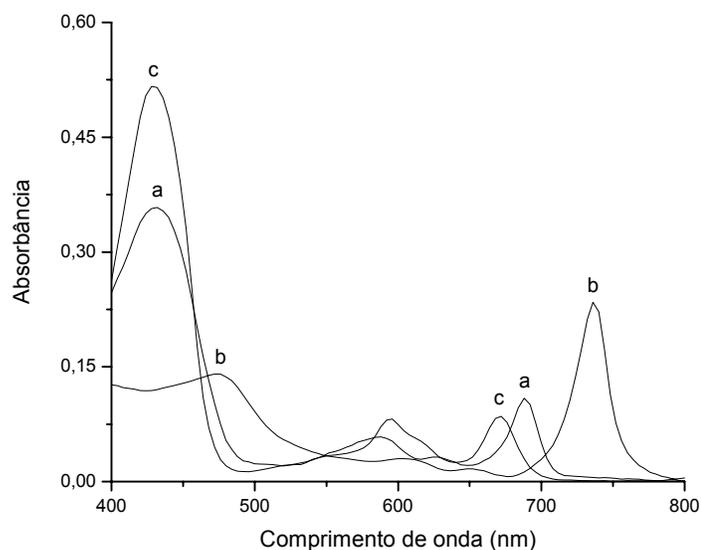


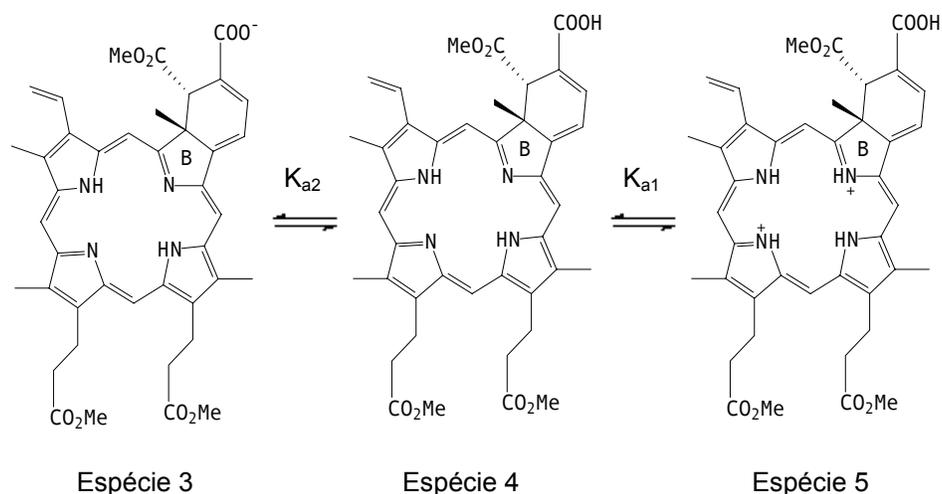
Figura 4: Espectros do DiesterB a 60 % de água/etanol, $c = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (a) pH= 4,1 no tempo zero; (b) pH= 4,1 no tempo infinito; (c) pH= 1,52 (independente do tempo).

Em pH abaixo de 3,0 os nitrogênios pirrólicos são protonados (espécie 2, Esquema II). Esse grupo faz parte da unidade cromofórica causando imediata (abrupta) mudança no espectro de absorção (Figura 4, espectro c) de maneira similar ao que ocorre com porfirinas tais como TPPS_{2a} (*meso*-tetrafenilporfirina dissulfonada), *m*-THPP (*meso*-tetra(3-hidroxifenil)porfirina) e a clorina *m*-THPC (*meso*-tetra(3-hidroxifenil)clorina) (Cunderlíková e col, 2001; Cunderlíková e col, 1999). Da mesma forma ao que ocorre com porfirinas, consideramos a protonação simultânea dos dois nitrogênios iminas. Entretanto esse fenômeno ainda não está esclarecido. Segundo Desroches e colaboradores (Desroches e col, 2003) no caso de clorinas, têm-se apenas a transição envolvendo um hidrogênio (ao redor de pH 3), entretanto os autores não discutem a respeito da segunda protonação, mesmo

tendo realizado experimentos em meio bastante ácido ($\text{pH} \sim 1$). No presente trabalho, mesmo atingindo-se meios intensamente ácidos ($[\text{HCl}] = 1 \text{ mol.L}^{-1}$), observou-se somente um equilíbrio ácido-base; este fato sustenta a protonação “simultânea”, ou seja, os dois nitrogênios devem possuir pK_a s muito próximos entre si. Por outro lado apontamos que o nitrogênio situado em posição oposta ao grupo benzo (espécie 1, Esquema II) deve possuir densidade eletrônica maior que o outro nitrogênio, devido a este último sofrer influência de efeito eletroretirador decorrente do anel ciclohexadieno substituído; porém este efeito deve ser pequeno.

Em relação a mudança espectral, o pico de Soret tem seu comprimento de onda de máximo restabelecido (430 nm) com intensidade de absorção maior que a inicial e o pico em 688 nm é deslocado para 672 nm (Figura 4, espectro c). Não ocorre mudança espectral com o tempo indicando que esta espécie não sofre agregação. A presença de cargas (positivas) atenua as interações hidrofóbicas e, simultaneamente, mantém uma força de repulsão eletrostática entre as unidades de porfirina (espécie 2) desfavorecendo a agregação (Cunderlíková e col, 1999; Cunderlíková e col, 2001; Cunderlíková e col, 2004).

Diferentemente do DiesterB, o composto B3B apresenta em sua estrutura, além dos nitrogênios pirrólicos, um grupo carboxílico periférico, assim pode exibir maior número de diferentes estados de ionização em solução, como propostos no Esquema III e cujas justificativas são apresentadas na seqüência.



Esquema III

Em meio alcalino e neutro o composto B3B apresenta espectro idêntico ao do DiesterB e do próprio B3B em solvente orgânico puro (ou com baixos teores de água), ou seja, está presente no estado monomérico. O monitoramento espectral da solução de B3B em meio alcalino com o tempo mostrou que este praticamente não sofre variação, indicando estabilidade, i.e., ausência de agregação neste meio. Neste caso o composto deve encontrar-se com o substituinte periférico na forma de carboxilato (espécie 3, Esquema III) de forma que a carga (negativa) deve minimizar a agregação de maneira similar ao citado com o DiesterB em pH abaixo de 3 onde as cargas positivas (no nitrogênio) dificultam a agregação.

Mudando para pH 4,1, o carboxilato é convertido para carboxílico com perda da carga (espécie 4, Esquema III). Assim propõe-se que o pK_a de valor superior deve corresponder ao grupo carboxílico. Inicialmente o espectro de absorção é idêntico ao da espécie 3 porque esses grupamentos (carboxilato e carboxílico) não fazem parte da unidade cromofórica da molécula, isto é, não existe conjugação ressonante entre esses e o restante da estrutura (Cunderlíková

e col, 2001; Cunderlíková e col, 2004). Porém nessas condições o B3B apresenta comportamento similar ao exibido pela espécie 1 do DiesterB, ou seja, em condições iniciais o composto apresenta-se na forma monomérica e, com o tempo, observa-se a formação lenta de agregados. De maneira similar ao DiesterB, além da diminuição gradativa dos picos referentes ao monômero, verificou-se que o processo de agregação do B3B leva em alguns casos excepcionais a formação de um pico adicional de agregados, dependente das condições experimentais do meio.

Já em meio ácido (pH=2,6) o B3B, por similaridade ao proposto para o DiesterB, deve estar duplamente protonado (espécie 5, Esquema III). A protonação simultânea dos nitrogênios pirrólicos, causa mudança espectral imediata, com deslocamento do pico de 688 nm para 672 nm de maneira idêntica ao que ocorre com o DiesterB. Não observou-se variações espectrais com o tempo. Na forma estrutural proposta, como citado anteriormente, a presença de cargas deve manter o composto no estado monomérico (Cunderlíková e col, 1999; Cunderlíková e col, 2001; Cunderlíková e col, 2004). É importante ressaltar que as espécies 2 e 5 (do DiesterB e do B3B, respectivamente) são muito similares, sendo ambas protonadas nos grupos amino, com diferenças apenas no grupo periférico (grupo metil-éster para a espécie 2 e carboxílico para a espécie 5).

4.1- Determinação de pKa

pKa do DiesterB

O pK_a do composto DiesterB foi determinado em 40 e 60 % de água/etanol, avaliando-se o perfil de absorvância no tempo inicial de mistura em função do pH (tempo de 2 minutos após a adição do substrato, Figura 5). Como pode ser visto a intensidade da absorvância em 672 nm é elevada em regiões de baixo pH, entretanto diminui gradativamente com o aumento do mesmo, sendo este perfil inverso ao observado em 688 nm.

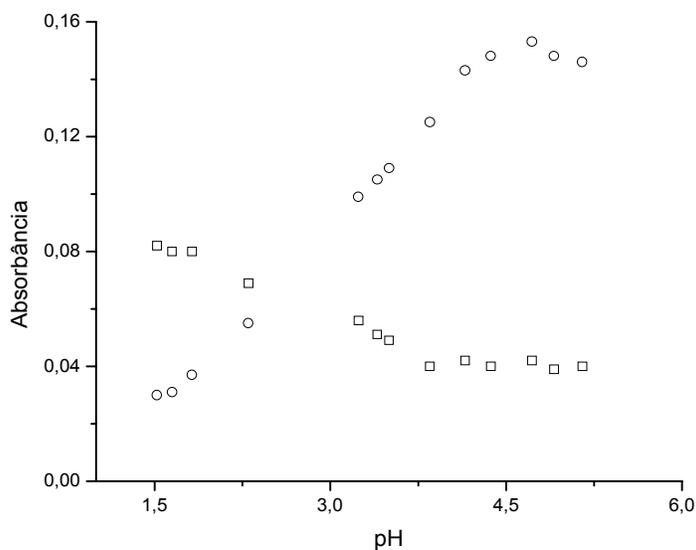


Figura 5: Perfil de absorvância do DiesterB vs pH. $c = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 40 % de água/etanol, absorvâncias coletadas 2 minutos após a adição do substrato. $T = 30,0^\circ \text{ C}$. 672 nm (\square) e 688 nm (\circ).

Através dos dados da Figura 5 e das funções da primeira e segunda derivada obtiveram-se os valores de pK_{a1} do grupo amino do DiesterB (Figura 6).

Neste caso a primeira derivada apresenta ponto de mínimo ao redor de 3,3 e a segunda derivada passa da região negativa para a positiva ao redor do mesmo valor de pH. Entretanto como é visualizado a determinação é prejudicada pelo número pequeno de pontos experimentais na região próxima a inflexão da curva da Figura 5 (Previdello e col, 2005).

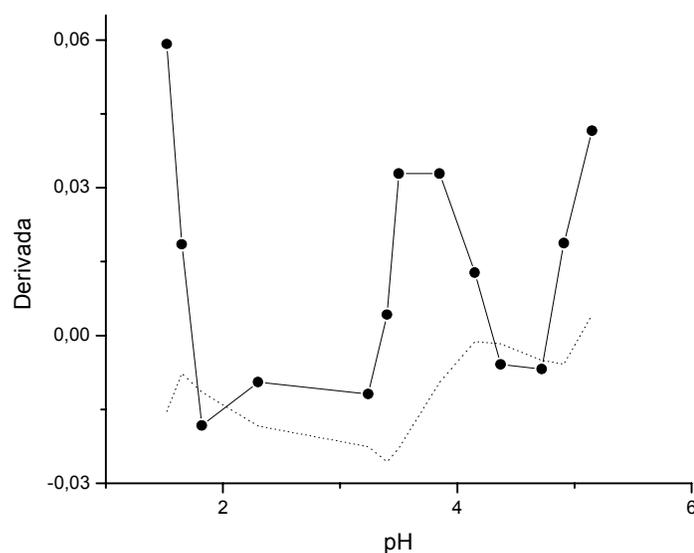


Figura 6: Avaliação de pK_a do DiesterB com dados em 672 nm em 40 % de água/etanol: primeira derivada (linha tracejada) e segunda derivada (linha sólida). $c = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 30,0^\circ \text{ C}$.

Diante da insegurança causada pelo cálculo anterior a mesma determinação foi realizada a partir do gráfico de pH *versus* $-\log ([\text{ácida}]/[\text{básica}])$, Figura 7. Como pode ser visualizada, a determinação do pK_{a1} por este método foi muito mais satisfatória que pelo método da derivada. Quando nas regiões próximas aos limites ácido e básico a quantidade de pontos experimentais é

significativa, normalmente este tratamento analítico resulta em valores mais confiáveis. Diferentemente, quando a quantidade de pontos é maior na região de inflexão (Figura 5), o tratamento via derivadas é melhor (Previdello e col, 2005). Esta determinação, realizada com dados de absorvância obtidos em 430, 672 e 688 nm, resultou em valores idênticos de pK_a .

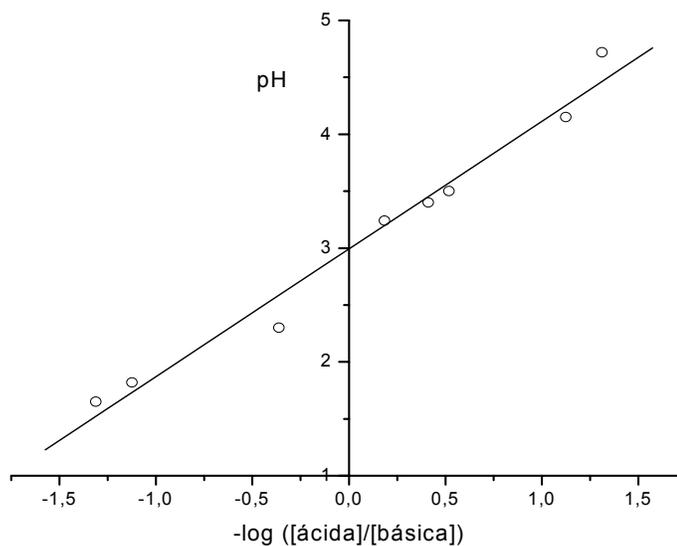


Figura 7: Variações de pH em função do logaritmo da relação de concentrações entre as formas ácidas e básicas para o DiesterB obtidas a partir dos dados em 688 nm. $c = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 30,0^\circ \text{ C}$.

Os valores calculados pelos dois métodos (derivada e gráfico) a partir dos dados nos três comprimentos de onda se mostraram muito próximos entre si. Os valores de pK_{a1} determinados para 40 e 60 % de água/etanol foram respectivamente, 3,3 e 3,2 indicando que no intervalo estudado o teor de água em etanol não exerce influência no pK_a . Note-se que o valor de pK_{a1} do DiesterB

(grupo amino) é um resultado bastante confiável, haja visto que ocorre mudança imediata no espectro causada pela protonação ou desprotonação do nitrogênio.

pKa do B3B

Os pK_as do composto B3B foram determinados em diversas composições de água/etanol, avaliando-se o perfil de absorbância no tempo infinito em função do pH (Figura 8). Como pode ser visto a intensidade da absorbância em 430 nm é elevada em regiões de alto e baixo pH, entretanto é reduzida na região intermediária, como discutido anteriormente. Para efetuar os cálculos de pK_a, com os dados exemplificados para 60 % de água apresentados na Figura 8, utilizaram-se os métodos da derivada, gráfico (pH vs -log ([ácida]/[básica])) e computacional.

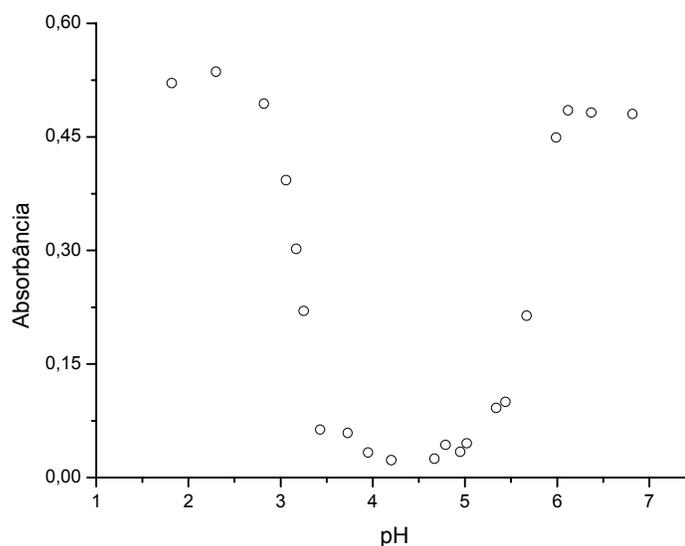


Figura 8: Perfil da absorbância em 430 nm do B3B vs pH. $c = 4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em 60 % água/etanol; absorbâncias coletadas após o sistema atingir o equilíbrio químico. $T = 30,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Através das funções da primeira e segunda derivada obtiveram-se os valores de pK_{a1} e pK_{a2} do grupo amino e carboxílico, respectivamente (Figura 9).

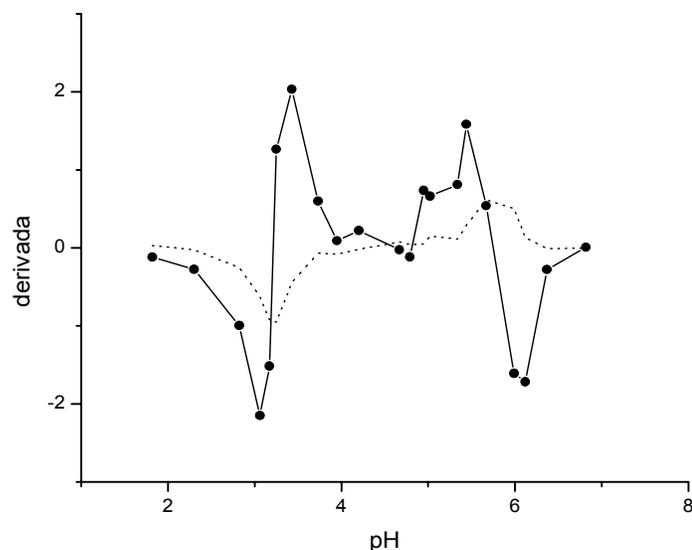


Figura 9: Avaliação de pK_a do B3B em 60 % de água/etanol com dados em 430 nm: primeira derivada (linha tracejada) e segunda derivada (linha sólida). $c = 4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. $T = 30,0^\circ \text{ C}$.

Os resultados do método gráfico, o mesmo utilizado no cálculo de pK_a para o DiesterB (não ilustrado), foram iguais aos obtidos pelo método da derivada. Adicionalmente calculou-se os valores de pK_a do B3B através do método computacional (programa SpecpK) uma vez que a proximidade entre o pK_{a1} e o pK_{a2} poderia ocasionar erros. Esse tratamento pode ser aplicado, quando a molécula apresenta dois grupos ionizantes que possuem valores de pK_a muito próximos. Os resultados encontrados por este método confirmaram os valores obtidos pelos demais demonstrando que não existem sobreposições nos cálculos

de pK_a s. Na tabela 1 mostra-se os dados de pK_a calculados para o B3B nas proporções de solvente estudadas.

Tabela 1: Valores de pK_a para o B3B em diversas composições de água/etanol. T= 30,0° C, $c= 4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, [NaCl]= 0,1 mol L⁻¹ e [tampão]= 0,016 mol L⁻¹.

% de água	pK_{a1}	pK_{a2}
40	3,4	-
60	3,3	5,7
65	2,4	6,0
70	1,9	6,3

A partir dos valores de pK_{a1} e pK_{a2} obtidos para o B3B, recalculou-se a concentração normalizada das espécies 3, 4 e 5 para cada pH em cada porcentagem de água/etanol (exemplificado a 60 % de água/etanol na Figura 10), utilizando-se a Equação 8 (Albert e Serjeant, 1971). Esse procedimento permite visualizar mais facilmente a questão de sobreposição que afetaria os cálculos dos pK_a s.

$$c_3 = K_1 K_2 / D \quad c_4 = K_1 [H^+] / D \quad c_5 = [H^+]^2 / D, \text{ onde } D = [H^+]^2 + K_1 [H^+] + K_1 K_2 \quad (8)$$

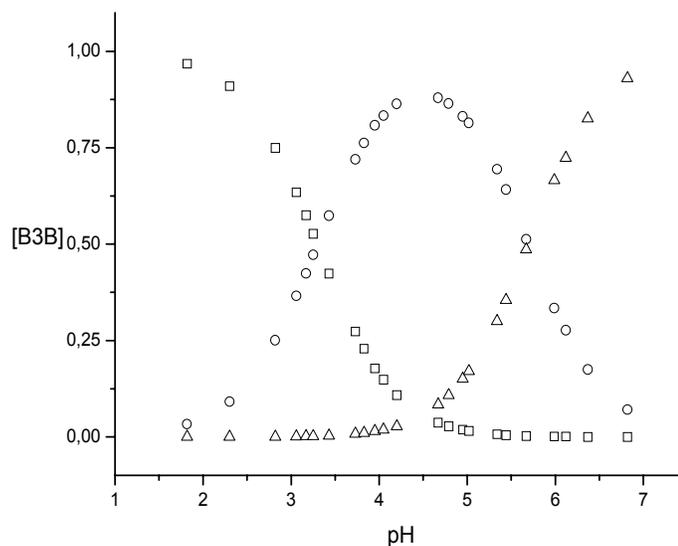


Figura 10: Concentração normalizada do B3B em 60 % de água/etanol para a espécie 3 (Δ), 4 (\circ) e 5 (\square). Estimada para $pK_{a1} = 3,3$ e $pK_{a2} = 5,7$.

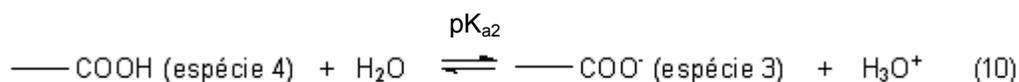
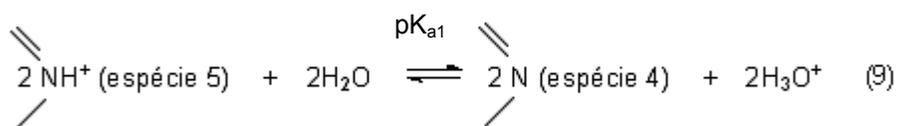
Como ilustrado na Figura 10, nos pHs correspondentes ao pK_{a1} e ao pK_{a2} as concentrações respectivas das espécies 3 e 5 são nulas, ou seja, não há interferência nas determinações confirmando-se que cálculos independentes de pK_a podem ser realizados.

Um ponto importante a ser lembrado é que o pK_{a1} (grupo amino) é obtido diretamente pela mudança espectral que ocorre imediatamente após adição do composto no meio, enquanto que o pK_{a2} (grupo carboxílico) foi determinado após as amostras atingirem o equilíbrio (medida indireta). A favor da confiabilidade dos resultados obtidos para o pK_{a2} tem-se que medidas realizadas no tempo infinito ou 5 minutos após a adição do substrato (60 % de água) resultaram em valores de pK_{a2} muito próximos entre si. Este resultado mostra que, neste caso, a presença de agregados não afeta as determinações. Outro ponto favorável é que as

análises efetuadas em 672 e 688 nm resultaram em valores de pK_a s idênticos aos obtidos em 430 nm.

Os resultados ilustrados na tabela 1 revelaram uma igualdade nos valores de pK_{a1} determinados para o composto B3B com aqueles do DiesterB, em 40 e 60 % de água. Este resultado confirma que no caso do B3B o pK_{a1} corresponde a protonação dos nitrogênios pirrólicos (grupos amino) enquanto que, por exclusão, o pK_{a2} é relativo ao grupo carboxílico. Este dado, ao menos neste composto, elimina possíveis controvérsias existentes na literatura quanto a atribuição dos pK_a s (Cunderlíková e col, 1999). Adicionalmente nota-se que a troca dos grupos periféricos, carboxílico/carboxilato (B3B) ou metil-ester (DiesterB), não influencia o pK_a dos nitrogênios.

Analisando os valores de pK_a do B3B em porcentagens superiores a 60 % de água (Tabela 1) observa-se efeitos contrários para o pK_{a1} e pK_{a2} , isto é, um aumento no conteúdo de água na mistura, leva a aumento da acidez do grupo amino e, ao mesmo tempo, decréscimo da acidez do grupo carboxílico. Abaixo são representadas as equações de dissociação ácida do B3B de forma esquematizada para os grupos de interesse:



Como já citado, os pK_a de ácidos orgânicos devem ser associados a parâmetros experimentais (meio, temperatura, etc.) e estruturais da molécula

afetando a entalpia e a entropia do sistema. Lembra-se que a acidez geralmente leva a formação de íons no meio e, no caso com o alto teor de água no solvente, tem-se uma maior estabilização destes íons por solvatação e pela alta constante dielétrica influenciando, principalmente, na entalpia; desse modo, ao aumentar-se o teor de água, a acidez do composto ficaria maior (pK_a menor) (Hendrickson e col,1970). Em oposição, na solvatação de um íon, moléculas de água são fortemente induzidas a polarização, ficando a água com forte ordenamento; neste caso tem-se redução da entropia do solvente, aumentando positivamente a função energia livre de Gibbs correspondente ao processo de dissociação ácida (ou seja, o ácido torna-se mais fraco em água) (March, 1985). Assim provavelmente os dois fatores agem em sentidos opostos, sendo que para ácidos orgânicos que possuem estabilização estrutural intrínseca, o termo $T\Delta S$ normalmente prevalece ao de entalpia (Sykes, 1987).

No caso do B3B, as moléculas de solvente, por ligações de hidrogênio, estarão mais ordenadas ao redor do grupo carboxilato do que do carboxílico (Equação 10). Conseqüentemente acontecerá perda de liberdade por parte do solvente no primeiro, com diminuição da entropia, fator desfavorável à acidez, ou seja, considera-se uma contribuição mais marcante do efeito de entropia comparado à entalpia. Apesar de não acreditarmos que este efeito seja o único responsável pelo aumento do pK_{a2} , este deve prevalecer. Quanto ao pK_{a1} (referente a acidez do grupo amino), observa-se que ao aumentar-se o teor de água aumenta-se a acidez, como é normal em ácidos onde prevalece o efeito de entalpia. Por outro lado, avaliando-se o equilíbrio em termos de entropia, ter-se-ia

que a molécula protonada, duplamente carregada, seria mais solvatada pela água. Assim a entropia do sistema, à medida que aumenta-se o teor de água, seria desfavorável a essa espécie e, conseqüentemente, a acidez seria maior.

4.2- Planejamento Fatorial 2³

A princípio para estudar isoladamente cada estrutura e analisar a magnitude dos efeitos experimentais em cada espécie de B3B de maneira otimizada, o planejamento fatorial 2³ foi empregado separadamente em cada pH através da determinação em dois níveis (+ e -). Neste estudo os conteúdos de água em etanol foram restritos a 40 % (-) e 60 % (+) de água, as concentrações de composto de $4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (-) e $26,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (+) e o tempo de análise de 5 min (-) e 360 min (+). Dentro dos pHs escolhidos (pH= 7,0, 4,1 e 2,6) as concentrações das espécies 3, 4 e 5 foram calculadas a 60 % de água a partir dos dados de pK_a (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração estimada de B3B em 40 e 60 % de água/etanol em valores selecionados de pH.

pH	espécie 3 (%)	espécie 4 (%)	espécie 5 (%)
7,0	95,2	4,8	0
4,1	2,1	84,6	13,3
2,6	0	16,6	83,4

Os valores calculados de concentração das espécies de B3B a 60 %, conforme tabela acima, podem ser considerados iguais aos de 40 % uma vez que

os valores de pK_{a1} são muito similares e não se espera grandes diferenças no pK_{a2} com estes teores de água (Tabela 1).

Tomando-se as espécies 3 e 4 como as principais formas ativas para o B3B, ambas no estado monomérico, o coeficiente de absorvidade molar aparente ($\epsilon_{688} = \text{absorbância}/[\text{B3B}]_{\text{total}}$) foi utilizado como resposta para avaliar o impacto de um fator experimental sobre a estabilidade do monômero quando elevamos um dado nível do fator de (-) para (+).

A estratégia mostrada na Tabela 3 em cada pH para o planejamento fatorial 2^3 foi à combinação de todos os níveis de acordo com a matriz de planejamento. Nesta tabela estão incluídas também as respostas obtidas (média dos resultados de ϵ_{688} aparente). A partir destes dados calculou-se a intensidade dos fatores para cada parâmetro investigado, incluindo as interações de segunda e terceira ordem (Tabela 4).

Tabela 3: Matriz de planejamento e resultados experimentais para o planejamento fatorial 2^3 do B3B em diferentes pHs. Fatores: tempo (t), concentração do B3B (c) e porcentagem de água (%).

Número Exp.	Variável			pH= 7,0	pH= 4,1	pH= 2,6
	t	c	%	ϵ_{688} ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	ϵ_{688} ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	ϵ_{688} ($\text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
1	-	-	-	36600	33800	14800
2	+	-	-	36600	33000	14200
3	-	+	-	32800	31400	15400
4	+	+	-	35000	33900	15900
5	-	-	+	34200	27300	9700
6	+	-	+	34300	7800	9200
7	-	+	+	29500	11400	10100
8	+	+	+	33900	3600	8500

Tabela 4: Intensidade dos efeitos e grupos de interações no B3B.

	pH= 7,0		pH= 4,1		pH= 2,6	
ε (médio)	34100	± 185	22800	± 215	12200	± 85
t	1675	± 370	-6400	± 430	-550	± 170
c	-2625	± 370	-5400	± 430	500	± 170
%	-2275	± 370	-20500	± 430	-5700	± 170
t x c	1625	± 370	3750	± 430	0	± 170
t x %	575	± 370	-7250	± 430	-500	± 170
c x %	75	± 370	-4650	± 430	-650	± 170
t x c x %	525	± 370	2100	± 430	-550	± 170

Em pH 7,0, onde a espécie 3 prepondera (Tabela 2), a variável tempo apresenta um pequeno efeito positivo, indicando que a agregação desta espécie não ocorre facilmente; pode-se observar que a interação de segunda ordem (txc) apresenta a mesma magnitude (aumento médio aproximado de $1650 \pm 370 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Todas as outras interações de segunda e terceira ordem foram insignificantes. Os principais impactos estimados nesse pH são a concentração de B3B e a porcentagem de água no solvente. De $4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para $26,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ o efeito médio do ε diminui $2625 \pm 370 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, enquanto que de 40 para 60 % de água a diminuição média é $2275 \pm 370 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ambos os efeitos são negativos, indicando que ao passar do nível (-) para (+) há uma diminuição da absorvidade aparente sugerindo que um aumento na concentração do B3B e na porcentagem de água leva a espécie 3 a uma pequena agregação mesmo com a carga no grupo carboxilato. Entretanto deve-se apontar que neste pH existe aproximadamente 5 % da espécie 4 (tabela 2) tendo esta molécula tendência à agregação. De qualquer forma, nessas condições de pH o ε médio aparente do

monômero é $34100 \pm 185 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, mostrando (apesar da pequena agregação) que o fármaco está majoritariamente estabilizado na forma monomérica.

Os resultados obtidos (Tabela 4) para o planejamento fatorial em pH= 4,1 mostram que os três fatores (t, c e %) são altamente significantes e, variando do nível (-) para o nível (+) a diminuição no coeficiente de absorvidade molar aparente é acentuada. Nesta condição de pH apenas o grupo carboxilato está protonado, assumindo a forma carboxílica, estrutura indicada como espécie 4 apresentada no Esquema III (forma neutra dominante, tabela 2). Relembrando que a diminuição no ϵ_{688} está associada com a agregação do B3B, as condições estabelecidas no nível (+) estão induzindo a agregação do composto. As influências dos três fatores no processo podem ser interpretadas como o discutido anteriormente, ou seja, neste caso com a anulação da carga, a molécula no estado monomérico torna-se instável em água e agrega mais com o tempo e concentrações maiores de B3B. O principal efeito encontrado neste pH foi a variável porcentagem de água ($-20500 \pm 430 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Tabela 4). Além disso, as interações secundárias obtidas com a % de água, sugerem efeitos cooperativos e apontam para as mesmas explicações.

Em pH 2,6, onde a estrutura majoritária é a espécie 5 (Tabela 2), novamente a variável mais significativa foi à porcentagem de água (diminuição média no valor da absorvidade molar aparente de $5700 \pm 170 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), como apontado em pH 7,0 e 4,1. Para todos os outros fatores, incluindo suas interações de segunda e terceira ordem, a intensidade dos efeitos calculados não foi significativa (apesar dos valores serem maiores que o erro padrão).

Provavelmente a molécula carregada com duas cargas positivas nos nitrogênios internos estabiliza a unidade monomérica do B3B, prevenindo a agregação, mesmo estando presente em solução 17 % da espécie 4 misturada com a espécie 5 (tabela 2).

Adicionalmente, a porcentagem de variação foi calculada para os fatores e efeitos cooperativos para dar uma idéia geral da magnitude relativa de cada parâmetro individual. Os efeitos médios do ε nos níveis (-) e (+) foram calculados pela $\Sigma(\varepsilon-/4)$ e $\Sigma(\varepsilon+/4)$ para cada parâmetro no pH correspondente. A porcentagem de variação foi obtida comparando esses valores calculados com os valores médios dos ε (apresentado na Tabela 4, primeira linha), esses resultados estão ilustrados na Figura 11.

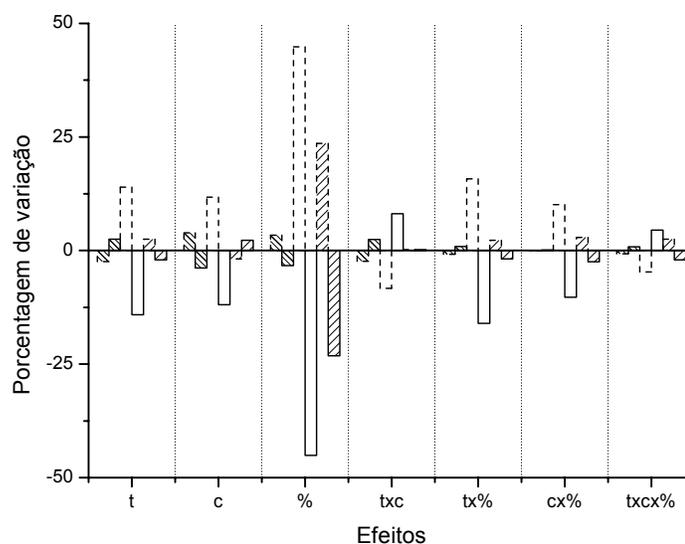


Figura 11: Variações vs efeitos na estabilidade do B3B: em pH= 7,0 (▨), pH= 4,1 (□), e pH= 2,6 (▩). Linhas tracejadas e sólidas correspondem respectivamente aos níveis experimentais inferior e superior.

Percebe-se que as condições experimentais afetam a estabilidade da espécie 4, a qual é muito mais acentuada do que para as espécies 3 (pH= 7,0) e 5 (pH= 2,6). Porém o marcante efeito causado pela porcentagem de água não aparece somente na espécie 4 (pH= 4,1), mas também nos experimentos realizados em pH= 2,6, onde se tem a predominância da espécie 5; este resultado somente pode ser visualizado através da metodologia aplicada na Figura 11.

Uma vez que os resultados do planejamento fatorial 2^3 apontaram que o efeito principal que rege a estabilização do B3B é o conteúdo de água em etanol, expandiu-se o intervalo de proporções das misturas de água/etanol.

A variação do coeficiente de absorvidade molar aparente do B3B, em cada pH, em função da porcentagem de água na mistura é mostrada na Figura 12. Para a realização deste estudo optou-se por utilizar as variáveis tempo e [B3B] nos seus níveis superiores, isto é, [B3B]= $26,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e t= 360 min.

Em meio alcalino/neutro o coeficiente de absorvidade molar aparente do B3B foi de 34000 L mol⁻¹ cm⁻¹ em baixa porcentagem de água (30 %), com pequena queda para 32000 L mol⁻¹ cm⁻¹ em 65 % de água em etanol. Pode-se afirmar que nesta região de pH, onde a espécie 3 é predominante, o aumento no conteúdo de água na mistura quase não afeta a estabilidade dos monômeros de B3B.

Em pH intermediário o ϵ aparente do B3B é fortemente influenciado pelo conteúdo de água na mistura (Figura 12), passando de 34000 L mol⁻¹ cm⁻¹ em 30 % de água a 1900 L mol⁻¹ cm⁻¹ em 65 % de água. Nessa região de pH verificou-se que o composto está praticamente todo na forma agregada. A ocorrência deste

fato é atribuída a espécie 4 (neutra), a qual é grandemente desestabilizada pela presença de água no meio.

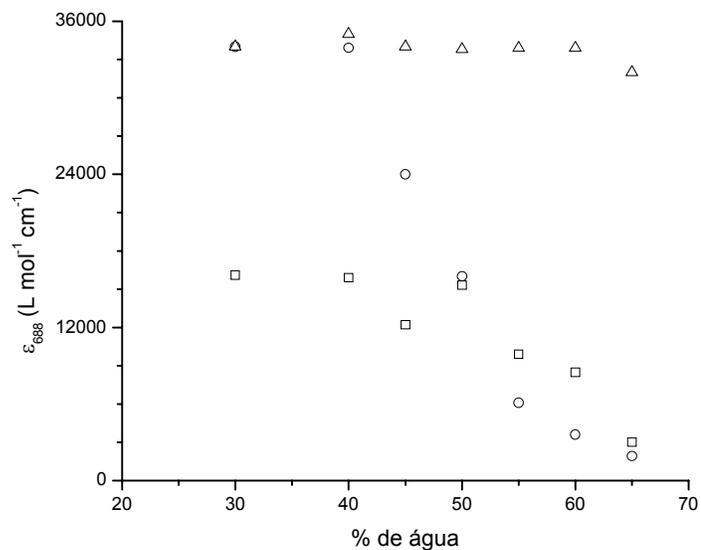


Figura 12: Variação do coeficiente de absorvidade molar aparente do B3B em função da porcentagem de água em: pH= 7,0 (Δ), pH= 4,1 (○) e pH= 2,6 (□) . Tempo de análise= 360 min. $c = 26,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Em meio ácido e baixas porcentagens de água o coeficiente de absorvidade molar aparente do B3B é $16100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e diminui para $3000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ em altas porcentagens de água. Nota-se que, mesmo com a presença de cargas (espécie 5), a estabilidade da forma monomérica do B3B é afetada pelo aumento no conteúdo de água pois observa-se gradativa queda de ϵ aparente (mesmo em 60 % onde os pK_{a} s pouco mudam). Acima de 60 % tem-se, como efeito adicional, a diminuição de pK_{a1} (e o aumento do pK_{a2}) Tabela 1, aumentando no pH= 2,6 a quantidade da espécie neutra 4 o que fatalmente levaria a maior agregação.

4.3- Estudo Cinético

No caso do B3B em 40 % de água em etanol o fármaco mostrou-se extremamente estável, não se observando variação espectral com o tempo, independentemente do pH (chegou-se a monitorar por 40 dias). Entretanto com o B3B em misturas a 60, 65 e 70 % de água/etanol e pHs em regiões determinadas observou-se a agregação gradativa com o tempo. Uma visão geral do comportamento em função do pH, nas misturas estudadas, pode ser observada na Tabela 5.

Tabela 5: Comportamento agregacional do B3B em função do pH. M refere-se aos picos de monômero (430 e 688 nm) e A ao pico de agregado (720-740 nm). As setas indicam as variações de intensidade dos mesmos com o tempo. $c = 4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampão}] = 0,016 \text{ mol L}^{-1}$, $T = 30,0^\circ \text{ C}$.

% de água	Região de pH	Reflexo
60	1,8 – 3,4	M
	3,4 – 5,7	M ↓
	5,7 – 6,8	M
65	1,8 – 2,3	M
	2,3 – 3,6	M ↓
	3,6 – 5,1	M ↓ e A ↑
	5,1 – 5,9	M ↓
	5,9 – 6,9	M
70	1,8 – 2,3	M
	2,3 – 2,8	M ↓
	2,8 – 5,8	M ↓ e A ↑
	5,8 – 6,0	M ↓
	6,0 – 6,8	M

Os dados ilustrados na Tabela 5 indicam que de maneira geral, o comportamento agregacional do B3B é similar nas três porcentagens de água estudadas. Nos casos em 60 % de água/etanol, em que se observa variação espectral com o tempo, tem-se apenas a diminuição dos picos de monômeros sem a presença de pico adicional (ao menos na concentração de B3B empregada neste experimento). Neste caso forma-se um tipo de agregado não cromóforo na região de análise como citado previamente. Em situações similares, em 65 e 70 %

de água/etanol, além da queda dos picos de monômero com o tempo, observa-se, simultaneamente, o surgimento do novo pico na região de 720-740 nm atribuído aos agregados diferenciados (Delmarre e col, 2001; Hioka e col, 2002; Simplício e col, 2004A; Simplício e col, 2004B).

A Figura 13 mostra como exemplo a variação espectral do B3B com o tempo na mistura a 70 % de água em pH= 3,0.

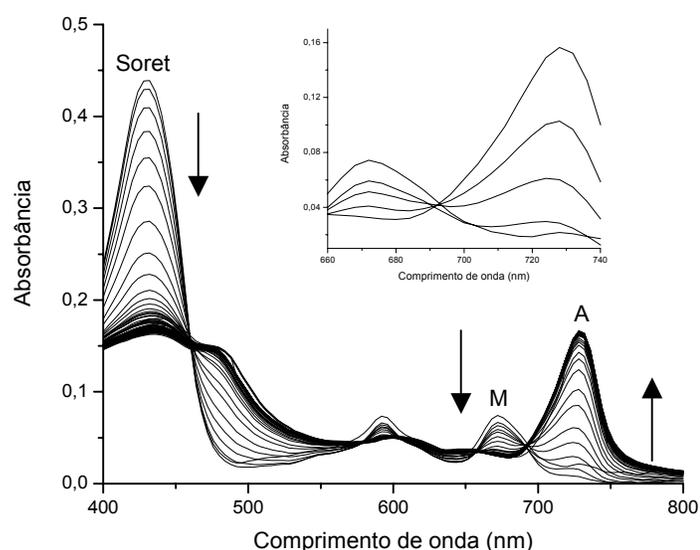


Figura 13: Variação espectral do B3B em 70 % de água/etanol. $c = 4,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ em pH= 3,0. T= 30,0° C. As setas mostram a tendência dos picos de monômero e agregado. A inserção é a ampliação tomando-se os espectros em intervalos de 36 seg.

Uma avaliação detalhada, observada na inserção da figura acima, mostrou a ausência de ponto isobéstico, o que significa um mecanismo complexo, implicando na existência de um equilíbrio de múltiplas etapas (Simplício e col, 2004A; Espenson, 1981; Dixon e Steullet, 1998). Para efetivar-se a escolha do

comprimento de onda para análise cinética avaliou-se a absorbância em função do tempo (Figura 14) junto aos picos de monômeros (430 e 672 nm) e agregados (720-740 nm).

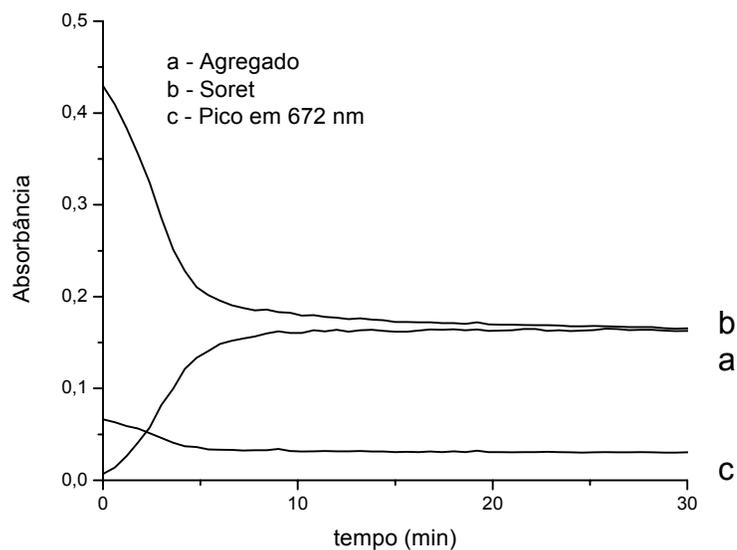
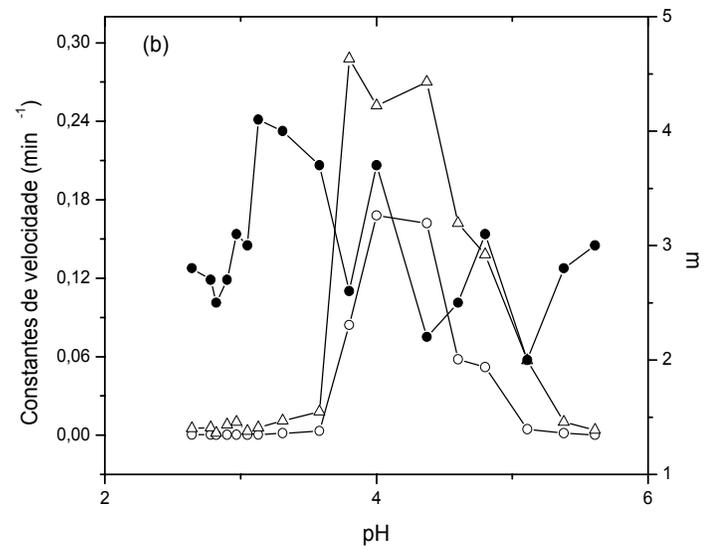
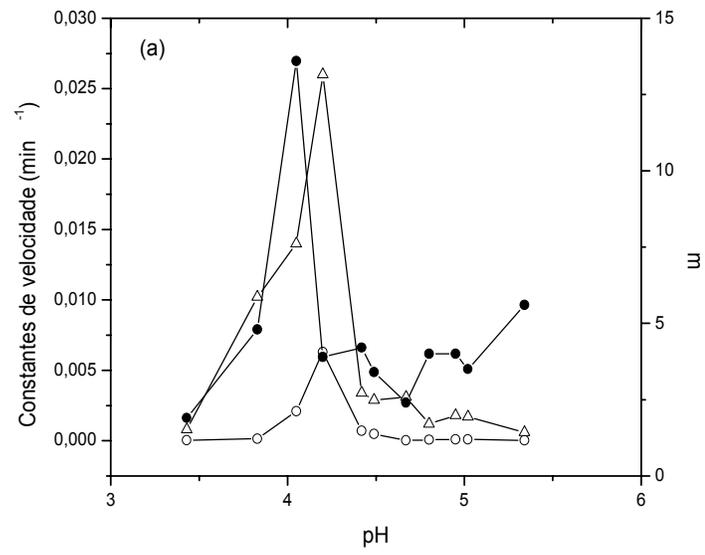


Figura 14: Absorbância em função do tempo em 70 % de água/etanol, $c = 4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 3,0$. $T = 30,0^\circ \text{ C}$.

Como ilustrado na figura, a variação da absorbância em qualquer um dos comprimentos de onda mostra uma fase com uma etapa lenta de reação inicial, seguida de uma outra rápida. Esse perfil cinético é idêntico ao exibido pelo DiesterB em regiões intermediárias de pH e foi anteriormente estudado em diversas misturas aquosas de solvente orgânico pelo grupo (Simplício e col, 2004A; Simplício e col, 2004B). O formato sigmoidal das curvas é típico de reações auto-catalíticas, sendo a fase lenta de reação normalmente chamada de “lag” e a rápida de “log”. A partir da Teoria do Caos e do procedimento adotado por Pasternack (Pasternack e col, 1998) nosso grupo de pesquisa tem proposto a

seguinte seqüência de eventos para a formação do agregado final (Simplício e col, 2004A; Simplício e col, 2004B): inicialmente ter-se-ia um passo lento de formação de pequenos núcleos, ou germes de agregação, que serviriam de base de sustentação para a formação rápida (catalisada) de agregados maiores. Para obter-se os parâmetros cinéticos usou-se a Equação 7 e a técnica de ajuste de curvas. Não se fixaram os valores de absorbância inicial e final na rotina de cálculo.

A partir de dados similares aos da Figura 14 calculou-se os parâmetros k_0 , k_c , m e n obtidos nos comprimentos de onda correspondentes a monômeros (430 e 688 nm) e agregados (720-740 nm) em diversas regiões de pH. Os valores de constantes de velocidade mostraram-se próximos entre si, principalmente os valores de k_c (ou seja, são razoavelmente independentes do comprimento de onda monitorado), porém os parâmetros n e m foram inconstantes. A não confiabilidade do parâmetro cinético n é claramente exibida por Pasternack (Pasternack e col, 1998) e em nosso trabalho não foi levado em consideração. Quanto ao parâmetro m apresentado por Pasternack como sendo apenas relacionado ao tamanho do núcleo, nosso grupo sugere que este termo, além do tamanho, reflete a quantidade de núcleos formados (Simplício e col, 2004A; Simplício e col, 2004B). Os resultados calculados nas três porcentagens em diversos pHs estão apresentados na Figura 15.



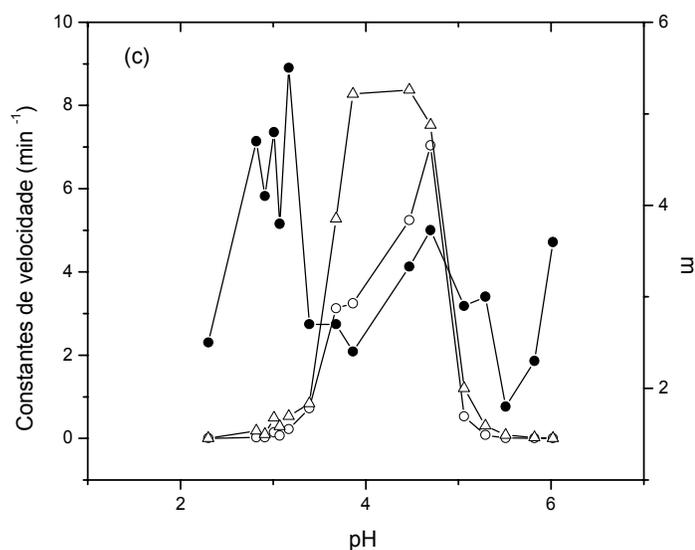


Figura 15: Parâmetros cinéticos em água/etanol a vários pHs. (a) 60 % de água; (b) 65 % e (c) 70 %. k_0 (○), k_c (△) e m (●). $c = 4,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $[\text{tampão}] = 0,016 \text{ mol L}^{-1}$, $T = 30,0^\circ \text{ C}$.

Através da Figura 15, nota-se que, em todas as misturas estudadas, o perfil das curvas é o mesmo, ou seja, em regiões intermediárias de pH os valores de k_0 e k_c são elevados, enquanto que nas regiões extremas de pH os valores são baixos. Nos dados ilustrados na tabela 2, onde se recalculou as concentrações do B3B a partir dos valores de pK_a , nota-se que em regiões altas e baixas de pH tem-se pouca quantidade da espécie 4 (forma agregante). Entretanto nas regiões intermediárias encontra-se a maior quantidade desta, aproximadamente 85 %. A predominância da espécie 4 favorece a formação de agregados e, no pré-equilíbrio, favorecer-se-ia uma maior quantidade de núcleos de agregação; assim a maior quantidade de catalisador iria, conseqüentemente, causar um aumento

das constantes de velocidade em conformidade ao que foi obtido. Nota-se também que o aumento do conteúdo de água em etanol (comparação interna das figuras 15a, 15b e 15c) causa uma elevação nos valores de constantes de velocidade. Este fato pode ser atribuído a maior instabilidade do monômero do B3B em elevadas porcentagens de água como já amplamente discutido. O termo m , reflexo do tamanho (e segunda nossa proposta da quantidade) de núcleos, apresenta certas irregularidades de forma que não se pode inferir claramente a seu respeito.

5- CONCLUSÕES

Através dos valores de pK_a dos nitrogênios pirrólicos determinados para o DiesterB e B3B em 40 e 60 % de água pode-se constatar que a presença de grupos periféricos ao anel porfirínico pouco afeta esta propriedade. Adicionalmente, através da comparação entre o DiesterB e o B3B, pode-se comprovar que o pK_{a1} corresponde ao equilíbrio ácido-base dos nitrogênios pirrólicos enquanto que o pK_{a2} corresponde ao do grupo carboxílico. Os valores de pK_a determinados para o composto B3B mostraram que o aumento na porcentagem de água favorece a acidez do grupo nitrogênio do anel pirrólico e, simultaneamente, reduz a acidez do grupo carboxílico.

Para as três regiões de pH estudadas o conteúdo de água em etanol apresentou o efeito mais acentuado na instabilidade do monômero de B3B, especialmente em pH 4,1, onde tem-se o composto com carga neutralizada. Os resultados apontam que mesmo em meio neutro e ácido (extremos usados neste trabalho), onde as estruturas predominantes da molécula apresentam cargas, há a possibilidade de agregação nas condições experimentais em que todas as variáveis testadas estão em níveis mais elevados. A forma terapeuticamente fototativa de base livre pode ser obtida controlando-se o pH, sendo ressaltado ainda que esta variável modula a carga do composto, o que deve ser usado para contornar o processo de agregação.

Os resultados cinéticos demonstram que em regiões intermediárias de pH, onde a molécula de B3B encontra-se na forma neutra, a agregação ocorre de

forma mais rápida e acentuada reforçando as indicações obtidas no tratamento estatístico.

Em termos de aplicação médica, um resultado bastante significativo foi detectar o aumento do pK_a do grupo carboxílico do B3B em altos teores de água, solvente este usualmente empregado na terapêutica devido a compatibilidade com os fluídos biológicos. Neste caso tem-se uma aproximação deste pK_a ao pH fisiológico causando aumento na concentração do B3B na forma carboxílico (espécie neutra) que é a forma mais passível de sofrer agregação, diminuindo assim a eficiência em TFD. Vale lembrar que como apontado na introdução, o pH de tecidos tumorais apresenta-se mais baixo que o de tecidos sadios, tornando este problema ainda mais preocupante.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albert, A.; Serjeant, E. P.; The Determination of Ionization Constants. A Laboratory Manual. 2th ed., Chapman and Hall Ltd, London, 1971, p 53.

Atkins, P.W.; Físico-Química. 6th ed., traduzido por Horácio Macedo, LTC Editora S.A., Rio de Janeiro, 1999.

Aveline, B.M.; Hasan, T.; Redmond, R.W.; Photochem. Photobiol. 59 (1994) 328.

Aveline, B.M.; Hasan, T.; Redmond, R.W.; J. Photochem. Photobiol. B. 30 (1995) 161.

Chowdhary, R.K.; Sharif, I.; Dolphin, D.; J. Pharm. Pharmaceut. Sci. 6(1) (2003) 13.

Cooper, W.; Chemical Physics Letters 7(1) (1970) 73.

Cunderlíková, B.; Gangeskar, L.; Moan, J.; Photochemistry and Photobiology 53 1999 81.

Cunderlíková, B.; Bjorkulnd, E.V.; Pettersen, E.O.; Moan, J.; Photochemistry and Photobiology 74 (2) 2001 246.

Cunderlíková, B.; Kaalhus, O.; Cunderlík, R.; Mateásik, A.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Photochemistry and Photobiology 79 (3) 2004 242.

Delmarre, D.; Hioka, N.; Boch, R.; Sternberg, E.; Dolphin, D.; Can. J. Chem. 79 (2001) 1068.

Dixon, D. W.; Steullet, V. J.; Inorg. Biochem. 68, 1998, 25.

Espenson, J. H.; Chemical Kinetics and Reactions Mechanism. McGraw-Hill: New York, 1981; p. 117.

Gerweck, L.E.; Seetharaman, K.; Cancer Res. 56 (1996) 1194

Harris, D.C.; Análise Química Quantitativa. 5th ed., traduzido por Carlos A. S. Riehl e Alcides W. S. Guarino, LTC Editora, Brasil, 2001, p. 237.

- Hendreson, B.W.; Dougherty, T. J.; Photochem. Photobiol. 55 (1992)145.
- Hendrickson, J.B.; Cram, D.J.; Hammond, G.S.; Organic Chemistry, 3th ed., McGraw-Hill Inc., Japan, 1970.
- Hioka, N.; Chowdhary, R.K.; Chansarkar, N.; Delmarre, D.; Sternberg, E.; Dolphin, D.; Can. J. Chem. 80 (2002) 1321.
- Inca disponível em: www.inca.gov.br, acessado em 03/06/2005.
- Kasha, M.; Radiation Research 20 (1963) 55.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox, M.M.; Princípios de Bioquímica. Análise Química Quantitativa. 2th-ed., traduzido por Arnaldo A. Simões e Wilson R. N. Lodi, Sarvier Editora, Brasil, 1995, p. 237.
- Levy, J.G.; Tibtech. 13 (1995) 14.
- London, F.; Physik, Z.; Chem. B11 (1930) 222.
- Machado, A.E.H.; Química Nova 23 (2000) 237.
- March, J.; Advanced Organic Chemistry. Reactions, Mechanisms, and Structure. 3th ed., John Wiley & Sons, USA, 1985, p 234 – 236.
- Nicholson, P.S.; Sarkar, P.; Wang, G.; J. Am. Ceram. Soc. 80(4) (1997) 965.
- Pasternack, R.F.; Gibbs, E.J.; Collings, P.J.; de Paula, J.C.; Turzo, L.C.; Terracina, A.; J. Am. Soc. 1998, 120, 5873.
- Pottier, R.; LaPlante, J.P.; Chow, Y.F.A.; Can. J. Chem. 63 (1985) 1463
- Previdello, B.A.F.; Carvalho, F.R.; Tessaro, A.L.; Souza, V.R.; Hioka, N.; Química Nova, submetido em 1 de fevereiro de 2005.
- Richter, A.M.; Waterfield, E.; Jain, A.K.; Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Levy, J.G.; Photochem. Photobiol. 52 (1990) 495.

Richter, A.M.; Waterfield, E.; Jain, A.K.; Allison, B.; Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Levy, J.G.; Br. J. Cancer 63 (1991) 87.

Simplicio, F.I.; Maionchi, F.; Hioka, N.; Química Nova 25(5) (2002) 801.

Simplício, F.I.; Auto-Agregação de uma Benzoporfirina em Misturas de Água e Solvente Orgânico, Dissertação de mestrado apresentada ao departamento de química da UEM, fevereiro de 2003.

Simplicio, F.I.; Soares, R.R.S.; Maionchi, F.; Santin Filho, O.; Hioka, N.; J. Phys. Chem. A 108 (2004) 9384.(A)

Simplicio, F.I.; Maionchi, F.; Santin Filho, O.; Hioka, N.; J. Phys. Org. Chem. 17 (2004) 325.(B).

Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Fundamentals of Analytical Chemistry. 6th ed., Saunders College Pub., Fort Worth, 1992.

Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Curr. Med. Chem. 3 (1996) 239.

Sternberg, E.D.; Dolphin, D.; Brükner, C.; Tetrahedron 54 (1998) 4151.

Sykes, P.; A guidebook to mechanism in organic chemistry. 6th ed., Longman Scientific & Technical, Singapore, 1987, p 56 – 59.

Tannock, L.F.; Rotin, D.; Cancer Res. 49 (1989) 4373.

Visudyne disponível em: www.visudyne.com, acessado em 10/04/2004.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)