UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FFCLRP - DEPARTAMENTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À
MEDICINA E BIOLOGIA

**Estudo da cinética e dos mecanismos da fototransformação de corantes
ciânicos com dois cromóforos em interação com sistemas biomiméticos sob
a ação da luz visível**

Érika Ribeiro e Silva

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências, Área: Física
aplicada à Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO - SP
2015

Érika Ribeiro e Silva

**Estudo da cinética e dos mecanismos da fototransformação de corantes
ciânicos com dois cromóforos em interação com sistemas biomiméticos sob
a ação da luz visível**

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP,
como parte das exigências para a obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Orientador: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

RIBEIRÃO PRETO - SP
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Silva, Érika Ribeiro e

Estudo da cinética e dos mecanismos da fototransformação de corantes ciânicos com dois cromóforos em interação com sistemas biomiméticos sob a ação da luz visível. Ribeirão Preto, 2015.

174 p. : il. 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Borissevitch, Iouri.

1. Corantes ciânicos. 2. Fototransformação. 3. Micelas de SDS. 4. DNA.

Nome: SILVA, Érika Ribeiro e

Título: Estudo da cinética e dos mecanismos da fototransformação de corantes
ciânicos com dois cromóforos em interação com sistemas biomiméticos sob a
ação da luz visível

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*À minha família e ao Murilo,
dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Iouri Borissevitch, por todos (e muitos) ensinamentos em toda a minha trajetória do Mestrado até o Doutorado, pela disponibilidade e dedicação em todas as etapas que levaram ao desenvolvimento desta tese.

Aos meus pais, por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim. Muito obrigada pela vida que me proporcionaram, pois tudo o que hoje sou, é graças ao amor de vocês. À minha querida e tão única irmã que desde criança me ensinou o verdadeiro sentido da amizade, cumplicidade e bondade. Mesmo que a distância física nos atrapalhe, eu sinto a presença de vocês a todo instante em meu coração.

Ao meu amor lindo Murilo, pela felicidade que sempre me traz em cada gesto, pelo amor que vejo em cada olhar e por cada momento que dividimos. Agradeço pelo seu imenso apoio, carinho, preocupação e pelos abraços reconfortantes que, em meio à correria do dia a dia, me trazem uma profunda paz.

A todos os amigos que tive a oportunidade de conhecer aqui em Ribeirão Preto, em especial: Amanda Rech, Naty Destefano, Luis Augusto Magalhães Telles (Teddynho), Aline Mello, Sarah Mazaro, Gabriela de Oliveira, Sarah Borin, Alexandre Freitas Duarte (Piu), Efren, Luizinho Reis, Mayara Fabbris. Todos vocês são muito especiais para mim e sou muito grata pela alegria e por todo o apoio que me trouxeram durante estes anos.

Aos meninos queridos que, pela convivência diária, já considero como irmãos ou simplesmente, uma “família estranha, com gente esquisita” que enchem minha vida de sorrisos. E às queridas amigas “suecas” por também compartilharem momentos inesquecíveis.

Aos atuais e aos antigos integrantes do Grupo de Fotobiofísica, em especial à Marina Berardi Barioni, Gustavo Parra e Wallance Pazin, pela convivência diária, almoços e cafezinhos.

Ao Prof. Dr. Amando Siuiti Ito, pela ajuda na disponibilização de seu laboratório para a realização dos experimentos de fluorescência estática e com resolução temporal.

À Marina Berardi Barioni, pela ajuda valiosa nos experimentos de fluorescência, pela enorme paciência e disponibilidade, não só para mim, como para todos os que precisaram. Agradeço também por sua amizade e por ouvir meus desabafos.

Ao Wallance Pazin que também colaborou nestes experimentos, sempre muito prestativo, atencioso e conselheiro.

À Lucimara Perpetua Ferreira Aggarwal, pelos ótimos conselhos profissionais e pelas discussões a respeito dos “BCDs”.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Física que de maneira direta ou indireta colaboraram também para a concretização deste trabalho.

À secretária do departamento de Física, Nilza, pelo seu excelente trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro através da minha bolsa de estudos.

À USP, pela infraestrutura fornecida.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

SILVA, É. R. **Estudo da cinética e dos mecanismos da fototransformação de corantes ciânicos com dois cromóforos em interação com sistemas biomiméticos sob a ação de luz visível**. 2015. 174 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um método de tratamento em que um composto fotossensibilizador (FS) é introduzido no organismo do paciente e, posteriormente, a região de tratamento é irradiada com luz. A combinação de oxigênio, luz e FS produz espécies que geram um efeito curativo. Os FS utilizados atualmente, embora eficazes, apresentam desvantagens. Neste trabalho, foram estudados os corantes ciânicos com dois cromóforos ou biscianinas (BCD) que apresentam características favoráveis na aplicação como FS na TFD. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos da concentração, da composição do ambiente e da própria estrutura de três BCDs, com ângulos entre os seus cromóforos de 180°, 150° e 90°, nas características das suas fototransformações em tampão e na interação com micelas de SDS e DNA. A fototransformação pode causar a perda da fotoatividade do FS e gerar fotoprodutos (FPs) que tanto podem ser tóxicos como fotoativos. Os processos de tratamento na TFD e os de fototransformação são paralelos. Isso permite utilizar o monitoramento do processo de fototransformação para determinar o grau do processo de tratamento em tempo real. Por esse motivo, também foi estudada a fototransformação dos FPs formados durante a irradiação. A análise da fototransformação foi realizada utilizando técnicas espectroscópicas de absorção óptica e de fluorescência estática. Mudanças nos espectros de absorção óptica dos corantes indicaram a formação de agregados. A agregação diminui a velocidade de fototransformação devido ao aumento da probabilidade de dissipação da energia de excitação por processos não radiativos. Não houve formação de agregados na irradiação dos FPs, pois estes possuem menor tendência de agregação em comparação com o próprio corante. Semelhanças nos espectros dos FPs dos três corantes indicaram que eles possuem a mesma estrutura do cromóforo. Na ausência do oxigênio a velocidade de fototransformação diminui. Este fato juntamente com a relação entre os tempos da fotólise e os rendimentos quânticos do estado tripleto dos BCDs sugeriram a participação do oxigênio singleto na fototransformação. Na presença de sistemas biomiméticos em altas concentrações, os corantes estão em suas

formas monoméricas. Nestas interações, os corantes também sofreram fototransformação, com velocidades diferentes daquelas em tampão, com formação de fotoprodutos. Na fototransformação dos corantes na presença de micelas de SDS, sugerimos que as moléculas dos corantes ficam mais protegidas do contato do oxigênio. Por outro lado, na interação com o DNA, as moléculas dos corantes ligadas na superfície do DNA se tornam mais suscetíveis ao ataque do oxigênio, fazendo com que a fototransformação seja mais rápida.

Palavras-chave: corantes cianicos, fototransformação, oxigênio singlete, micelas de SDS, Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

SILVA, É. R. Study of the kinetics and mechanisms of phototransformation of the interaction of cyanine dyes with two chromophores with biomimetic systems under the action of visible light. 2015. 174 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment that a photosensitizer compound (PS) is inserted into the patient's body and, subsequently, the treatment area is irradiated with light. The combination of oxygen, light and FS produce species that generate a curative effect. The FS currently used, although can be effective, have disadvantages. In this study, the cyanine dyes with two chromophores (BCD) or biscyanines that have favorable characteristics in the application as FS in PDT were studied. The aim of this study was to analyze the effects of concentration, environmental composition and the structure of three BCDs, with angles between chromophores 180, 150 and 90 degrees, in the characteristics of phototransformation of the dyes molecules in phosphate buffer and in the interaction with SDS micelles and DNA. The phototransformation can cause the loss of the FS photoactivity and generate photoproducts (PPs) that are both toxic as photoactive. The treatment processes in PDT and phototransformation are parallel. It allows the use of phototransformation monitoring process to determine the degree of realtime treatment process. For this reason, it was also studied the phototransformation of PPs formed during irradiation. The phototransformation analysis was performed using optical absorption and fluorescence spectroscopies. Changes in the optical absorption spectra of the dyes indicated the formation of aggregates. The aggregation reduces phototransformation rate due to the increased probability of dissipation of the excitation energy by non-radiative processes. There was no aggregate formation on irradiation of PPs because they have less tendency to aggregate compared with the dye. Similarities in the spectra of the three PPs indicated that they have the same structure of the chromophore. In the absence of oxygen phototransformation rate decreases. This fact together with the relationship between photolysis time and the quantum yields of the triplet state of the BCDs suggested the involvement of singlet oxygen in their phototransformation. The dyes were in their monomeric form at high SDS and DNA concentrations. In these interactions, the dyes also were phototransformed, with different rates compared with phosphate buffer, with formation

of photoproducts. In the phototransformation of dyes in the presence of SDS micelles, we suggest that the dye molecules were more protected from oxygen contact. On the other hand, in the interaction of dyes and DNA molecules, the dye molecules bound on DNA surface become more available to oxygen attack, and the phototransformation becomes faster.

Keywords: cyanine dyes, phototransformation, singlet oxygen, SDS micelles, Photodynamic Therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dependência do comprimento de onda e da profundidade da penetração da luz no tumor. Adaptado de (21).....	28
Figura 2. Diagrama de Jablonski adaptado que mostra os níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente.	30
Figura 3. Curva de energia potencial de Lennard- Jones para interação de partículas.	36
Figura 4. Curvas de energia potencial para interação de partículas.	36
Figura 5. Sobreposição de nuvens de elétrons- π durante a agregação de duas moléculas na ausência (a) e (b) na presença de íons de sal (positivos ou negativos).....	38
Figura 6. Níveis de energia e disposição dos agregados H e J.	39
Figura 7. Estrutura geral dos corantes ciânicos.	41
Figura 8. Grupos heterocíclicos terminais mais comuns nas cianinas: (a) benzoxazol, (b) benzotiazol, (c) benzoselenazol, (d) benzimidazol, (e) quinolina, (f) 3-H-indol, (g) naftoxazol, (h) naftotiazol (49).....	42
Figura 9. Efeito de ressonância entre as estruturas eletrônicas de corantes ciânicos, com a indicação da deslocalização da carga positiva.....	42
Figura 10. Estrutura geral dos BCD, indicando o heterociclo central (círculo) e o ângulo entre os cromóforos.	44
Figura 11. Ilustração dos níveis de energia: splitting causados pelo tunelamento e pela interação dipolo-dipolo.....	45
Figura 12. Diagrama de energia para dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição. (a) Agregados J ; (b) Agregados H e (c) Agregados mistos. Linhas contínuas no diagrama de energia indicam maior probabilidade de transição e linhas tracejadas, menor. À direita de E_1' e E_1'' estão representados os momentos de dipolo de cada transição. Na parte superior, o vetor E representa o vetor campo elétrico.	46
Figura 13. Reações do oxigênio singlete com as ligações duplas em moléculas biológicas. .	49
Figura 14. Ilustração de um surfactante. Adaptado de (70).	50
Figura 15. Ilustração de uma micela esférica (70).	51
Figura 16. Modelo de Stigter, com a presença das três regiões distintas.	52
Figura 17. Fórmula estrutural do SDS.....	53
Figura 18. Nucleotídeo do DNA.	53

Figura 19. Estrutura do nucleotídeo com as bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C).	54
Figura 20. Estrutura geral do BCD180.....	59
Figura 21. Estrutura geral do BCD150.....	59
Figura 22. Estrutura geral do BCD90.....	59
Figura 23. Representação do estado fundamental e do estado excitado singleto.	62
Figura 24. Diagrama de Jablonski (adaptado de (83)).	63
Figura 25. Figura ilustrativa que mostra o princípio da TCSPC. Adaptado de (83).	68
Figura 26. Espectro de absorção dos filtros com transmissões: À esquerda, filtro 1: $\lambda \geq 600\text{nm}$ e à direita, filtro 2: $\lambda \geq 410\text{nm}$	69
Figura 27. A) Espectros de absorção óptica normalizados do BCD180 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 633 nm e 597 nm em função da concentração de BCD.	73
Figura 28. Esquema ilustrativo dos níveis vibracionais dos seguintes estados: estado fundamental S_0 , primeiro estado excitado singleto S_1 e segundo estado excitado singleto S_2	74
Figura 29. A) Espectros de absorção óptica normalizados do BCD150 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 624 nm e 590 nm em função da concentração de BCD.	74
Figura 30. A) Espectros de absorção óptica normalizados em 618 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 618 nm e 576 nm em função da concentração de BCD.	75
Figura 31. A) Espectros de absorção óptica normalizados em 502 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 502 nm e 475 nm em função da concentração de BCD.	75
Figura 32. Espectros de emissão de fluorescência normalizados dos BCDs 90, 150 e 180 em tampão fosfato pH = 6,8, $\lambda_{\text{exc}} = 600\text{ nm}$, fendas de emissão e excitação: 10,0 nm.	76
Figura 33. Espectros de absorção óptica do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.	78
Figura 34. Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação ($\lambda_{\text{exc}} = 600\text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).	79
Figura 35. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 em função do tempo de irradiação de 0 a 50 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550\text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).	79

Figura 36. Espectros de absorção óptica do fotoproducto do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.	80
Figura 37. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproducto do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 em função do tempo de irradiação de 50 a 295 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).	81
Figura 38. Intensidade da emissão de fluorescência do fotoproducto do BCD180 1,8 μM em 575 nm em função do tempo de irradiação.	82
Figura 39. Espectros de absorção óptica do BCD150 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.	82
Figura 40. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação ($\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).	83
Figura 41. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproducto do BCD150 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).	84
Figura 42. Espectros de absorção óptica do fotoproducto do BCD150 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.	84
Figura 43. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproducto do BCD150 1 μM na presença de O_2 em função do tempo de irradiação de 125 a 595 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).	85
Figura 44. Espectros do BCD90 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação, primeira etapa de irradiação: A) de absorção óptica; B) de emissão de fluorescência normalizada ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).	85
Figura 45. Espectros do fotoproducto do BCD90 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação, segunda etapa de irradiação: A) de absorção óptica; B) de emissão de fluorescência normalizada ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm). ...	86
Figura 46. Espectros de absorção dos três fotoproductos.	87
Figura 47. Espectros de emissão de fluorescência dos três fotoproductos ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$, para os BCD 90 e 180 e $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, para o BCD150).	87
Figura 48. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproducto do BCD180 em tampão fosfato, pH = 6,8, $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$	88
Figura 49. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproducto do BCD150 em tampão fosfato, pH = 6,8, $\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$	88

Figura 50. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD90 em tampão fosfato, pH = 6,8, $\lambda_{exc} = 530$ nm.	89
Figura 51. Espectros de absorção óptica do BCD180 10,5 μ M em tampão, pH = 6,8, na ausência de O ₂ , em função do tempo de irradiação.	91
Figura 52. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD180 10,5 μ M em tampão, pH = 6,8, na ausência de O ₂ , em função do tempo de irradiação.	91
Figura 53. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 633$ nm do monômero do BCD180 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	93
Figura 54. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 633$ nm do monômero do BCD 180 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.	94
Figura 55. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 624$ nm do monômero do BCD150 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	95
Figura 56. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 624$ nm do monômero do BCD150 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.	95
Figura 57. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 618$ nm do monômero do BCD90 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	96
Figura 58. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 618$ nm do monômero do BCD90 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.	97
Figura 59. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD180 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	100
Figura 60. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD180 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.	100
Figura 61. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD150 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	101

Figura 62. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD150 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.	102
Figura 63. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD90 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	103
Figura 64. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD90 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.	103
Figura 65. Espectros de absorção da interação do BCD180 2,3 μ M com SDS em diferentes concentrações.....	105
Figura 66. Razões entre as absorbâncias dos picos 641 e 594 nm obtidos pela interação do BCD180 2,3 μ M com SDS em diferentes concentrações.....	106
Figura 67. Espectros de absorção da interação do BCD150 1,0 μ M com SDS em diferentes concentrações.....	106
Figura 68. Razões entre as absorbâncias dos picos 632 e 590 nm obtidos pela interação do BCD150 1,0 μ M com SDS em diferentes concentrações.....	108
Figura 69. Espectros de absorção da interação do BCD90 0,7 μ M com SDS em diferentes concentrações.....	108
Figura 70. Razões entre as absorbâncias dos picos 628 e 581 nm obtidos pela interação do BCD90 0,7 μ M com SDS em diferentes concentrações.....	109
Figura 71. Espectros de emissão de fluorescência da interação do BCD180 2,3 μ M com SDS, $\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão e excitação 10 nm.	111
Figura 72. Intensidade corrigida de fluorescência do BCD180 2,3 μ M devido à mudança do espectro de emissão do corante em função da concentração de SDS.....	111
Figura 73. Espectros de emissão de fluorescência da interação do BCD150 1,4 μ M com SDS, $\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão 5 nm e excitação 2,5 nm.....	112
Figura 74. Espectros de emissão de fluorescência da interação do BCD90 0,7 μ M com SDS, $\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão e excitação 10 nm.....	113
Figura 75. Intensidade corrigida de fluorescência do BCD90 0,7 μ M com devido à mudança do espectro de emissão do corante em função da concentração de SDS.....	113
Figura 76. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD180 na presença de SDS em diferentes concentrações, $\lambda_{exc} = 640$ nm.....	115

Figura 77. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD90 na presença de SDS em diferentes concentrações, $\lambda_{exc} = 640$ nm.....	116
Figura 78. Espectros de absorção óptica do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.....	118
Figura 79. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 641$ nm do BCD 180 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	119
Figura 80. Absorbância em 564 nm correspondente ao fotoproduto do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	119
Figura 81. A) Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio; B) Intensidade de fluorescência em 655 nm em função do tempo de irradiação.	120
Figura 82. A) Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm); B) Intensidade de fluorescência em 580 nm em função do tempo de irradiação.	121
Figura 83. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.....	121
Figura 84. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 564$ nm do fotoproduto do BCD 180 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).....	122
Figura 85. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).....	122
Figura 86. Espectros de absorção óptica do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.....	123
Figura 87. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 633$ nm do BCD150 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	123
Figura 88. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 620$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.....	124
Figura 89. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.....	124

Figura 90. Espectros de absorção óptica do fotoproducto do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.....	125
Figura 91. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 564$ nm do fotoproducto do BCD150 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).....	125
Figura 92. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproducto do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).....	126
Figura 93. Espectros de absorção óptica do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.	126
Figura 94. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 628$ nm do BCD90 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	127
Figura 95. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	128
Figura 96. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	128
Figura 97. Espectros de absorção óptica do fotoproducto do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.....	129
Figura 98. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 564$ nm do fotoproducto do BCD90 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	129
Figura 99. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproducto do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0nm e excitação 2,5 nm).....	130
Figura 100. Espectros de absorção do BCD180 1,5 μ M na presença de DNA em diferentes concentrações.....	131
Figura 101. Espectros de absorção do BCD150 0,6 μ M na presença de DNA em diferentes concentrações.....	132
Figura 102. Razões entre as absorbâncias dos picos 640 e 594 nm obtidos pela interação do BCD150 0,6 μ M com DNA em diferentes concentrações.	133

Figura 103. Espectros de absorção do BCD90 0,6 μM na presença de DNA em diferentes concentrações.....	133
Figura 104. Razões entre as absorbâncias dos picos 627 e 584 nm obtidos pela interação do BCD90 0,6 μM com DNA em diferentes concentrações.	134
Figura 105. Espectros de emissão do BCD180 na ausência e na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 620$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm.	135
Figura 106. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 0,6 μM na presença de DNA em diferentes concentrações, $\lambda_{\text{exc}} = 620$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm.	136
Figura 107. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 0,6 μM na presença de DNA em diferentes concentrações, $\lambda_{\text{exc}} = 620$ nm, fendas de emissão e excitação 10 nm.	136
Figura 108. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD180 na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 640$ nm.	137
Figura 109. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD150 na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 640$ nm.	138
Figura 110. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD90 na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 640$ nm.	138
Figura 111. Espectros de absorção óptica do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.	140
Figura 112. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 644$ nm do BCD 180 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	141
Figura 113. Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{\text{exc}} = 600$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	141
Figura 114. Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 4 a 47 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	142
Figura 115. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.	142
Figura 116. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 550$ nm do fotoproduto do BCD 180 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	143
Figura 117. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 47 a 387 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	143

Figura 118. Gráfico da intensidade de emissão de fluorescência em 655 nm em função do tempo de irradiação do BCD180 na presença de DNA, na presença de oxigênio.	144
Figura 119. Gráfico da intensidade de emissão de fluorescência em 580 nm em função do tempo de irradiação do BCD180 na presença de DNA, na presença de oxigênio.	145
Figura 120. Espectros de absorção óptica do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.	145
Figura 121. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 640$ nm do BCD150 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	146
Figura 122. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 620$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	146
Figura 123. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 0 a 50 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	147
Figura 124. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.	148
Figura 125. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD 150 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	148
Figura 126. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 50 a 535 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	149
Figura 127. Espectros de absorção óptica do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.	149
Figura 128. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 627$ nm do BCD 90 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	150
Figura 129. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	150
Figura 130. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 0 a 680 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.	151
Figura 131. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.	151

Figura 132. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 550$ nm do fotoproduto do BCD90 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).	152
Figura 133. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 680 a 1930 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm) na presença de oxigênio.	152
Figura 134. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD180 na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 640$ nm.	153
Figura 135. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 640$ nm.	154
Figura 136. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD90 na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 640$ nm.	154
Figura 137. Densidade orbital segundo o modelo de fotodecomposição com a ligação da molécula de oxigênio A) na parte mais externa e B) na parte mais interna do cromóforo. ...	171
Figura 138. Densidade orbital segundo o modelo de fotodecomposição com a ligação da molécula de oxigênio no anel central.	172
Figura 139. Espectros de absorção computacionais para o BCD180 com o oxigênio molecular ligado em 3 partes do cromóforo: cadeia lateral mais externa e mais interna e no anel central.	173

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	24
2. ASPECTOS TEÓRICOS.....	27
2.1 Terapia Fotodinâmica	28
2.1.1 Processos fotofísicos e fotoquímicos da TFD	30
2.2 Agregação de corantes	33
2.2.1 Interações responsáveis pela agregação de moléculas	33
2.2.1.1 Interação eletrostática	34
2.2.1.2 Interações de Van der Waals	34
2.2.1.3 Ligação de Hidrogênio	37
2.2.1.4 Efeito hidrofóbico.....	37
2.2.1.5 Complexo π - π	37
2.3 Fotossensibilizadores	40
2.3.1 Corantes cianícos.....	41
2.3.2 Corantes cianícos com dois cromóforos	44
2.4 Fototransformação	48
2.5 Surfactantes e micelas.....	50
2.6 Ácido desoxirribonucléico (DNA).....	53
3. OBJETIVOS	56
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
4.1 Objetos de estudo e sistemas biomiméticos.....	59
4.2 Preparação das amostras	60
4.3 Técnicas experimentais.....	60
4.3.1 Espectroscopia de absorção óptica no UV-VIS	60
4.3.2 Espectroscopia de fluorescência estática.....	62
4.3.3 Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal	65
4.3 Medidas da cinética de fototransformação do BCD e de seu fotoproducto	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	71
5.1 Estudos dos BCDs em tampão PBS.....	72
5.1.1 Absorção óptica.....	72
5.1.2 Fluorescência estática.....	76

5.1.3 Fluorescência com resolução temporal	77
5.2 Fototransformação dos BCDs em tampão	77
5.2.1 Espectros de absorção e de fluorescência e formação de fotoprodutos (na presença de oxigênio).....	77
5.2.2 Análises dos espectros dos fotoprodutos.....	86
5.2.3 Espectros de absorção e formação de fotoprodutos (na ausência de oxigênio)	90
5.2.4 Dinâmica de fototransformação	92
5.2.4.1 Análise quantitativa das curvas de decaimento	92
5.2.4.2 Curvas de decaimento dos BCDs na presença e na ausência de oxigênio	93
5.2.4.3 Curvas de decaimento dos fotoprodutos dos corantes na presença e na ausência de oxigênio	99
5.3 Estudos dos BCDs na presença de SDS.....	104
5.3.1 Absorção óptica.....	104
5.3.2 Fluorescência estática.....	110
5.3.3 Fluorescência com resolução temporal	114
5.4 Fototransformação dos BCDs na presença de micelas de SDS	117
5.4.1 Espectros de absorção e fluorescência e formação de fotoprodutos	117
5.5 Espectros de absorção óptica e de fluorescência dos BCDs na presença de DNA:.....	131
5.5.1 Absorção óptica.....	131
5.5.2 Fluorescência estática.....	135
5.5.3 Fluorescência com resolução temporal	137
5.6 Fototransformação dos BCDs na presença de DNA.....	139
5.6.1 Espectros de absorção e fluorescência e formação de fotoprodutos	139
5.6.2 Tempos de vida de fluorescência dos fotoprodutos	153
6. CONCLUSÕES	156
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
ANEXOS	171

1. INTRODUÇÃO

Em 1900, Oscar Raab verificou que o corante Acridina, na presença de luz, induzia à destruição de paramecíos. Em 1909, o seu orientador Von Tappeiner relatou que a presença de oxigênio molecular estava relacionada a tal efeito. Esta descoberta mostrou que era possível obter um resultado terapêutico a partir da combinação desses três componentes: luz visível, um composto fotoativo (fotossensibilizador, FS) e oxigênio (1).

Após a descoberta de Raab, diversos cientistas obtiveram sucesso ao utilizarem o princípio da ativação de um FS através da luz no tratamento de tumores de camundongos (2) e também de seres humanos (3) (4).

Foi a partir dos estudos de Dougherty e seus colaboradores, por volta de 1978, que a Terapia Fotodinâmica (TFD) passou a ser reconhecida e se tornou uma modalidade de tratamento viável e eficaz para uma grande variedade de neoplasias (5). Na TFD, o FS é inicialmente introduzido no organismo do paciente, e após certo tempo, a região a ser tratada é iluminada com luz. A luz excita o FS e os seus estados excitados produzem espécies ativas de oxigênio e radicais livres que destroem seletivamente as células-alvo, causando assim, uma ação curativa (6).

Os efeitos da TFD ficam restritos apenas à região irradiada. Além disso, diferentemente dos métodos tradicionais de tratamento, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, a TFD é considerada como um método não invasivo, praticamente não apresentando efeitos colaterais (7).

A TFD é utilizada não apenas no tratamento de câncer, mas também no tratamento de danos não oncológicos de caráter bacteriano, micoses, etc (8). É amplamente utilizada em diversas áreas, como: Odontologia (9), Medicina Veterinária (10), Dermatologia (11), Oftalmologia (12), etc.

Os FS utilizados em TFD são geralmente corantes e pigmentos orgânicos, como as porfirinas, clorinas, ftalocianinas, etc (13). Entretanto, apesar de se mostrarem eficientes, estes FS ainda apresentam algumas desvantagens, como: retenção pela pele por um longo período, causando fotossensibilidade, baixo coeficiente de absorvidade molar (ϵ) na região de 600 a 800 nm (região em que o tecido biológico é relativamente transparente), alto custo, dentre outras. Sendo assim, várias pesquisas estão sendo desenvolvidas envolvendo novos compostos, buscando uma melhoria em suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas a fim de maximizar a eficiência da TFD (14) (15).

Um dos objetos de estudo em nosso grupo de pesquisa (Laboratório de Fotobiofísica do DF-FFCLRP-USP) é a família de corantes ciânicos com dois cromóforos ou biscianinas (do inglês *bis cyanine dyes*, BCD). Estes corantes apresentam diversas vantagens para o uso em TFD, como por exemplo, alta absorção molar (com ϵ da ordem de $10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) do BCD na região de 600 a 800 nm e alta afinidade destes corantes por estruturas biológicas. A estrutura do BCD possibilita a síntese de isômeros variando as suas características espectroscópicas. Em nosso grupo, foi estudada a fotocitotoxicidade dos BCDs contra células neoplásicas. Para todos os tipos de células estudadas, foi mostrada que a fotocitotoxicidade dos BCDs é igual ou ultrapassa a fotocitotoxicidade do Photogem®, um FS já utilizado em TFD (16).

Hipótese:

Embora o BCD mostre alta fotocitotoxicidade, é preciso esclarecer também se o mesmo sofre alguma alteração sob a ação da luz (fototransformação). O estudo da fototransformação é importante devido a vários aspectos: quando o corante é fototransformado, pode haver a perda de sua fotoatividade; pode haver também a formação de fotoprodutos que podem ser tóxicos ou podem possuir fotoatividade. O tempo com que o corante se transforma sob a ação da luz pode indicar se o composto irá perder sua atividade ou, por outro lado, se a velocidade desse processo for lenta e não prejudicar o tratamento, ele passa a ser vantajoso, uma vez que serve para eliminar o FS do organismo do paciente após realizar seu papel no tratamento. Além disso, a fototransformação do FS acontece como um processo paralelo ao do tratamento por TFD. Isso torna possível utilizar a análise da formação do fotoproduto do FS como um teste para determinar o grau do processo de tratamento (17).

Neste trabalho, foi estudada a fototransformação de três isômeros dos BCDs com ângulos de 180° , 150° e 90° entre os seus cromóforos em diferentes meios. A análise da fototransformação foi realizada utilizando técnicas espectroscópicas de absorção óptica e de fluorescência estática. Inicialmente, foi estudada a fototransformação destes compostos em solução tampão e, posteriormente, com diferentes sistemas biomiméticos (micelas de SDS e DNA), possibilitando assim, verificar alterações nas velocidades das reações devido a estes sistemas. Além de estudar a fototransformação dos BCDs, foram realizados estudos da fototransformação dos seus fotoprodutos (FPs) com a finalidade de descobrir uma possível fotoatividade. Devido à importância que o oxigênio molecular desempenha na TFD, foi estudada também a fototransformação em função da presença e ausência do oxigênio molecular.

2. ASPECTOS TEÓRICOS

2.1 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD), outras vezes denominada PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*, é uma modalidade terapêutica que visa destruir tanto células neoplásicas como também bactérias (18), vírus e fungos (19). Para obter o resultado terapêutico é necessária a existência de três componentes principais: fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular.

Inicialmente, no organismo do paciente, o FS é introduzido e espera-se um período para que ele se concentre no tecido tumoral. Em seguida, a região a ser tratada é iluminada com luz que, na presença de oxigênio molecular, produz espécies reativas de oxigênio (EROs) capazes de provocar a destruição irreversível das células tumorais (20).

A luz aplicada deve ser de comprimento de onda específico, compatível com a região em que o FS possui maior absorção, geralmente na região de 600 a 800 nm. Para $\lambda < 600\text{nm}$ é possível evitar a absorção da luz por pigmentos endógenos, como por exemplo, a hemoglobina, que possui alta absorção óptica entre 400 e 600 nm, o que torna o tecido biológico pouco transparente (21). Por outro lado, a região de $\lambda > 800\text{nm}$ é evitada na TFD, pois se um FS possui bandas de absorção nesta região, o seu estado tripleto não tem energia suficiente para transferir energia ao oxigênio molecular e formar o estado excitado do oxigênio (22). Estas características tornam a faixa de 600 a 800 nm desejável para a TFD, razão pela qual ela recebe o nome de janela terapêutica. Na figura 1, é possível observar esta região na qual a penetração da luz é mais efetiva.

Figura 1. Dependência do comprimento de onda e da profundidade da penetração da luz no tumor. Adaptado de (21).

Os métodos tradicionais de tratamento de câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, induzem profunda imunodeficiência reduzindo assim a resistência do paciente. Isso ocorre devido à ausência de citotoxicidade seletiva nesses métodos (23). A TFD, pelo contrário apresenta alta seletividade, obtida pelo acúmulo preferencial do FS no tecido tumoral e a possibilidade de aplicar a irradiação luminosa num local bem definido. Segundo Brown (24), o acúmulo preferencial de FS no tecido tumoral acontece devido a fisiologia anormal dos tumores, com baixa drenagem linfática, pH reduzido, maior número de receptores para lipoproteínas de baixa densidade, etc. que podem contribuir para a seletividade dos FS. Através do uso de sistemas modernos de fibra óptica, é possível levar a focalização da luz diretamente no tecido tumoral. Além disso, o FS não apresenta toxicidade no seu estado fundamental e a luz visível não causa danos aos tecidos sadios na ausência de FS. Sendo assim, o uso da TFD se torna particularmente atrativo e, diferentemente das técnicas tradicionais, o tratamento através da TFD pode ser repetido várias vezes quando necessário, uma vez que não há efeitos tóxicos cumulativos. Um dos efeitos colaterais que pode surgir é a fotossensibilidade cutânea que pode ser controlada evitando a exposição do paciente à luz UV-visível. Entretanto, o avanço nos estudos na procura de novos FS visa minimizar tais efeitos.

O efeito antitumoral pela TFD pode ocorrer por diferentes mecanismos e isto vai depender do tipo de FS, da dose da irradiação, da concentração do oxigênio molecular no tecido e também do genótipo da célula (25) (26). A destruição do tumor pode ocorrer pela morte direta das células tumorais por necrose ou apoptose (15). Outro tipo de mecanismo está relacionado a efeitos anti-vasculares que prejudicam a vasculatura associada ao tumor, levando à morte tumoral via privação de oxigênio e nutrientes. E, por fim, a inflamação aguda e liberação de citocinas e proteínas de resposta ao estresse induzidas no tumor por TFD podem levar à ação de leucócitos que, tanto podem contribuir para a destruição do tumor, assim como podem estimular o sistema imune para reconhecer e destruir células tumorais, mesmo em localizações distantes. Todos estes mecanismos também podem influenciar um ao outro e a combinação deles é necessária para a cura de tumores em longo prazo (27).

2.1.1 Processos fotofísicos e fotoquímicos da TFD

O efeito fotodinâmico, no qual se baseia a TFD, ocorre numa sequência de reações. Na figura 2, os processos fotofísicos estão representados pelo diagrama de Jablonski. Nele, os níveis de energia eletrônicos moleculares estão representados por linhas horizontais separadas verticalmente pela diferença de energia entre eles. A cada nível eletrônico estão associados níveis vibracionais (menores) e rotacionais (não mostrados), de maneira que os estados eletrônicos (n) e vibracionais (v) da molécula estão indicados pelos índices subscritos como S_{nv} ou T_{nv} ($n = 0, 1, 2, 3, \dots$; $v = 0, 1, 2, 3, \dots$). Pela distribuição estatística de Boltzmann, à temperatura ambiente, a grande maioria das moléculas se encontra nos níveis de menor energia vibracional S_{n0} e T_{n0} . O estado caracterizado pela menor energia eletrônica possível (S_{0v}) é denominado de estado fundamental e, à temperatura ambiente, o nível mais populado desse estado é o S_{00} .

Figura 2. Diagrama de Jablonski adaptado que mostra os níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripleto estão representados por S e T, respectivamente.

O processo inicial, tanto para a TFD como para qualquer outra fotoreação, é a absorção da energia luminosa por uma molécula. Assim, a molécula do FS absorve um fóton e passa do seu estado fundamental S_0 para o estado excitado singlete S_1^* . A partir deste estado excitado, o FS pode retornar para o estado fundamental através de transições radiativas

(fluorescência) ou não-radiativas (conversão interna) entre estados de mesma multiplicidade de spin. Ou, por outro lado, a partir do estado S_1^* , o FS pode ser levado para o estado excitado tripleto T_1^* (processo chamado de cruzamento intersistemas), por inversão do spin. O FS poderá então passar por dois mecanismos que irão resultar na morte celular, os mecanismos do tipo I e tipo II.

O mecanismo do tipo I está relacionado à transferência de elétron ou próton entre o FS no estado excitado (S_1^* ou T_1^*) e as moléculas-alvo, formando radicais. Estes radicais interagem com o oxigênio para produzir produtos oxigenados (peróxidos, ânion superóxido, etc.) que irão causar a morte celular (6).

O mecanismo do tipo II está relacionado à transferência de energia do FS ao oxigênio molecular: quando a molécula do FS, em seu estado T_1^* encontra o O_2 , cujo estado fundamental é tripleto, o FS transfere sua energia para ele, formando o estado excitado singleto do oxigênio ($^1\Delta_g$ ou 1O_2) chamado oxigênio singleto. Este estado possui um tempo de vida relativamente longo, da ordem de 10^{-6} s em soluções aquosas, já que a transição para o estado fundamental é proibida pela regra do spin. O 1O_2 é um poderoso oxidante que reage com vários tipos de moléculas, como triacilgliceróis, colesterol, fosfolipídeos, aminoácidos (triptofano, histidina e metionina) e bases de ácidos nucleicos (guanina e guaninas) (15) produzindo sua transformação direta e/ou formando radicais livres que induzem uma sequência de reações em cadeia. A partir destas reações, pode haver a destruição direta da membrana celular assim como o bloqueio do processo de metabolismo celular finalizando na morte da célula por necrose ou apoptose (28) (29).

A transferência de energia do estado T_1^* do FS é mais provável do que do estado S_1^* , pois o tempo de vida do estado T_1^* do FS é, pelo menos, quatro ordens de grandeza maior que do seu estado S_1^* .

A equação abaixo representa a eficiência do mecanismo tipo II, levando em conta as reações do 1O_2 com alvos biológicos B_l e processos de supressão do estado tripleto pelo oxigênio:

$$\phi_R = \phi_T \frac{k_{q1}[O_2]}{\frac{1}{\tau_T} + \left(\sum_j k_{qj} \right) [O_2]} \frac{\sum_l k_{Rl}[B_l]}{\frac{1}{\tau_0} + \sum_l k_{Rl}[B_l] + \sum_l k_{ql}[B_l]} \quad (1)$$

em que: $[O_2]$ e $[B_l]$ são, respectivamente, as concentrações de oxigênio e dos alvos biológicos; k_{q1} é a constante bimolecular de transferência de energia do estado T_1^* para o

oxigênio molecular, formando o estado $^1\text{O}_2$; k_{qi} são as constantes bimoleculares de todos os processos da supressão do estado T_1^* pelo O_2 (por exemplo, a formação do radical superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$); k_{RI} são as constantes bimoleculares da reação do $^1\text{O}_2$ com alvos biológicos; k_{ql} são as constantes bimoleculares da supressão do $^1\text{O}_2$ com alvos biológicos sem produzir uma reação.

Os termos ϕ_T (rendimento quântico do estado T_1 do FS), τ_T (tempo de vida do estado T_1 na ausência de oxigênio molecular) e τ_0 (tempo de vida do estado $^1\text{O}_2$ na ausência de alvos biológicos) são dados pelas equações 2, 3 e 4, respectivamente:

$$\phi_T = \frac{k_{CIS1}}{k_{CI} + k_{FL} + k_{CIS1} + \sum_i k_{qi}[Q_i]} \quad (2)$$

em que: k_{CIS1} é a taxa do cruzamento intersistemas (de $S_1^* \rightarrow T_1^*$), k_{CI} é a taxa da conversão interna (de $S_1^* \rightarrow S_0$), k_{FL} é a taxa da fluorescência, k_{qi} são constantes bimoleculares da supressão do estado S_1^* por diversos supressores e $[Q_i]$ são as concentrações dos respectivos supressores.

$$\tau_T = \frac{1}{k_{CIS2} + k_{fosf} + \sum_n k_{qn}[Q_n]} \quad (3)$$

em que: k_{CIS2} é a taxa do cruzamento interssistêmico (de $T_1^* \rightarrow S_0$), k_{fosf} é a taxa da fosforescência, k_{qn} são constantes bimoleculares da supressão do estado T_1^* por diversos supressores, excluindo o O_2 , e $[Q_n]$ são as concentrações de respectivos supressores.

$$\tau_0 = \frac{1}{k_{CIS3} + k_{fosf2} + \sum_m k_{qm}[Q_m]} \quad (4)$$

em que: k_{CIS3} é a taxa do cruzamento interssistêmico ($^1\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2(T_1)$), k_{fosf2} é a taxa da fosforescência do estado $^1\text{O}_2$, k_{qm} são as constantes bimoleculares de todos os processos da supressão do estado $^1\text{O}_2$ pelos supressores Q_m , excluindo os alvos B_l , e $[Q_m]$ são as concentrações dos relativos supressores.

Pode-se notar da equação 1 que o aumento de ϕ_T , τ_T e τ_0 , aumenta a eficiência do mecanismo tipo II. Outro caminho para aumentar ϕ_R é aumentar a concentração do oxigênio

molecular dentro do organismo, colocando o paciente numa barocâmara de alta pressão (até 4 atm) com alto conteúdo de oxigênio. Outra possibilidade é aumentar as constantes k_{RI} da reação do oxigênio singlete com alvos biológicos (biomoléculas e membranas). Isto acontece quando o estado 1O_2 do oxigênio é gerado perto destes alvos, o que significa aumentar a probabilidade de encontro do alvo com o 1O_2 . Isto acontece, por exemplo, quando o FS, que fornece sua energia para o oxigênio, já esteja ligado com o alvo. Portanto, o processo fotodinâmico deve ser mais efetivo para FS que possuam maior afinidade com as estruturas que devem ser destruídas.

A maioria dos FS orgânicos, devido a sua estrutura desenvolvida de conjugação π , apresenta caráter hidrofóbico que, por um lado, é vantajoso para a TFD devido ao aumento da afinidade por estruturas biológicas, aumentando assim a probabilidade da reação entre o 1O_2 e o alvo biológico. Por outro lado, a hidrofobicidade estimula a agregação dos FS em meio aquoso, até mesmo se eles estiverem na forma iônica. A agregação diminui o tempo de vida e o rendimento quântico do estado T_1 do FS (30), diminuindo assim sua eficácia no tratamento (31).

2.2 Agregação de corantes

Muitos corantes, quando em solução, demonstram a capacidade de auto-associação. Este fenômeno é chamado de agregação, e ele afeta as características fotofísicas dos corantes. As moléculas envolvidas na formação dos agregados deixam de se comportar como espécies monoméricas, uma vez que as interações moleculares estabelecidas afetam fortemente a sua estrutura eletrônica.

2.2.1 Interações responsáveis pela agregação de moléculas

A formação de agregados baseia-se na ação das seguintes interações intermoleculares não-covalentes: interação eletrostática, interações de van der Waals, ligação de hidrogênio, efeito hidrofóbico e interação π - π (32).

2.2.1.1 Interação eletrostática

Em agregados homogêneos formados por moléculas carregadas, estas sofrem repulsão eletrostática. A energia associada a uma distribuição de moléculas carregadas é obtida a partir da força de Coulomb (força eletrostática), dada por:

$$W_C = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon_0 r} \quad (5)$$

em que Q é a carga do monômero, ϵ_0 é a permissividade elétrica do meio e r é a distância entre os monômeros.

2.2.1.2 Interações de Van der Waals

As interações de van der Waals incluem forças atrativas ou repulsivas de caráter não covalente, sendo divididas em três categorias: força entre dois dipolos permanentes (força de Keesom), força entre um dipolo permanente e um dipolo induzido (força de Debye) e força entre dois dipolos instantaneamente induzidos (força de dispersão de London).

Os dipolos de algumas moléculas dependem do meio e podem mudar substancialmente quando elas são transferidas de um meio a outro, especialmente quando as moléculas se tornam ionizadas num solvente (32).

Quando os monômeros possuem momentos de dipolos permanentes, a força entre eles depende da orientação relativa de monômeros. Para os monômeros livres a força resultante é atrativa e a energia entre eles é dada pela energia de Keesom:

$$W_K = - \frac{\mu^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 kT r^6} \quad (6)$$

em que μ é o momento de dipolo do monômero, k é a constante de Boltzmann e T é a temperatura Kelvin.

Outro tipo de força atrativa que pode surgir nos agregados é devido à interação entre dois dipolos, que cada partícula induz uma na outra. Sendo assim, temos a energia associada a esta força de dispersão de London dada por:

$$W_L = -\frac{3}{4} \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (7)$$

em que h é a constante de Planck, ν , a frequência de absorção eletrônica e α , a polarizabilidade elétrica da molécula.

Para os agregados, temos então:

- i) um tipo de interação repulsiva (eletrostática) de longo alcance (proporcional a $1/r$) e duas atrativas (proporcionais a $1/r^6$) que são mais eficientes em distâncias curtas;
- ii) um tipo de interação repulsiva (proporcional a $1/r^{12}$) que se destaca para distâncias muito curtas entre as moléculas. Esta interação ocorre devido à repulsão entre os núcleos dos átomos que compõem as moléculas.

A energia potencial da interação, sem considerar a repulsão eletrostática das moléculas, pode ser apresentada pelo potencial de Lennard-Jones, também conhecido como potencial L-J ou potencial 6-12, figura 3, dado por (33):

$$V(r) = \frac{A}{r^{12}} - \frac{B}{r^6} \quad (8)$$

Figura 3. Curva de energia potencial de Lennard- Jones para interação de partículas.

Considerando a repulsão eletrostática chegamos à curva da energia potencial de Lennard-Jones + $1/r$ (figura 4):

Figura 4. Curvas de energia potencial para interação de partículas.

Assim, para se associar e atingir o mínimo da energia potencial, as moléculas carregadas devem ultrapassar uma barreira de potencial, que existe devido à repulsão eletrostática. De modo contrário, para agregados heterogêneos formados por moléculas com cargas opostas, a atração eletrostática entre estes favorece a agregação.

2.2.1.3 Ligação de Hidrogênio

A ligação de hidrogênio denota um tipo particular de interação que ocorre entre uma molécula doadora (D) de próton, altamente polar (tal como FH, OH, NH, SH, etc.) e uma aceitadora de prótons (A), altamente eletronegativa, tal como F, O, N, etc. A ligação é da forma $D-H \cdots A$. (34).

Para ocorrer esta ligação, os monômeros devem se aproximar para que as nuvens eletrônicas dos átomos que formam essa ligação se sobreponham. Esta interação é eficiente para distâncias curtas ($\sim 2\text{\AA}$) e pode aumentar a profundidade do poço de energia, favorecendo a estabilização do agregado.

2.2.1.4 Efeito hidrofóbico

Quando moléculas hidrofóbicas ou anfifílicas, que interagem fracamente com moléculas de água, são introduzidas numa solução aquosa, elas quebram as ligações de hidrogênio entre as moléculas de água alterando a sua estrutura. Esse processo é acompanhado pelo aumento da energia livre da solução. A tendência das moléculas hidrofóbicas é a de promover a associação das regiões não polares de duas moléculas, fazendo com que o número de ligações hidrogênio quebradas diminua e, conseqüentemente, o aumento da energia livre se tornará relativamente menor. Esta é a descrição simplificada do efeito hidrofóbico. Este efeito é o principal na formação de membranas biológicas, micelas, vesículas, etc. Dependendo do tamanho e da hidrofobicidade das moléculas, essa interação pode ser considerada tanto de longo quanto de curto alcance.

2.2.1.5 Complexo π - π

A formação de agregados é um processo comum para compostos orgânicos com sistema de conjugação π . Esta estrutura, por um lado, determina a alta absorção óptica na

região espectral do visível até o infravermelho próximo destes compostos e, por outro, os tornam relativamente hidrofóbicos, o que estimula sua agregação.

As moléculas com sistemas desenvolvidos de conjugação π são capazes de formar complexos através da sobreposição de suas nuvens de elétrons π (figura 5).

Figura 5. Sobreposição de nuvens de elétrons- π durante a agregação de duas moléculas na ausência (a) e (b) na presença de íons de sal (positivos ou negativos).

Como no caso das ligações de hidrogênio, esse tipo de ligação também se torna eficiente somente em distâncias curtas. Com o aumento da concentração de sal (aumento da força iônica) a formação de complexos π - π pode ser desfavorecida devido à formação de nuvens de contra-íons ao redor da molécula.

A agregação conduz à formação de dímeros e, algumas vezes, agregados de ordem superior. Em todos os casos, a natureza molecular do corante é fortemente afetada e, assim, relacionada com os parâmetros tais como, a concentração do corante, estrutura, forças iônicas, temperatura e presença de outros compostos (35).

Por volta de 1930, Scheibe e, de forma independente, Jelley descobriram que quando se aumenta a concentração do corante pseudoisocianina em água, uma banda de absorção estreita surgia deslocada para o vermelho em relação à banda do monômero. Essa banda de absorção estreita foi atribuída à absorção óptica dos agregados formados. Para formar o agregado mais simples, um dímero, a interação corante – corante deve ser forte o suficiente para superar quaisquer outras forças que favoreçam a solvatação do monômero (36). Como observado por Jelley e Scheibe, um agregado exibe características espectrais distintas das da espécie monomérica.

Os agregados podem ser de dois tipos, os agregados J e os agregados H. Os agregados J (em homenagem a Jelley) apresentam um deslocamento batocrômico (para maiores

comprimentos de onda – região do vermelho no espectro), com menor energia do que o monômero. Os agregados H apresentam um deslocamento hipsocrômico (para menores comprimentos de onda – região do azul), com maior energia em relação à do monômero (37). Estes dois tipos diferentes de agregados distinguem-se por possuírem um ângulo diferente entre os momentos de dipolo de transição e o eixo ao longo do agregado. Pela figura 6, é possível verificar que os agregados H estão dispostos face-a-face e os J, estão dispostos lado-a-lado.

Figura 6. Níveis de energia e disposição dos agregados H e J.

Segundo a teoria do éxciton de Kasha et al. (38), nos agregados J, apenas as transições para estados de baixa energia da banda do éxciton são permitidas e, como consequência, tais agregados são caracterizados por um considerável rendimento quântico de fluorescência, porém bem menor do que os relativos monômeros. Por outro lado, os agregados H são caracterizados por um rendimento quântico de fluorescência extremamente baixo (39).

Para a TFD, a formação de agregados entre as moléculas do próprio FS pode prejudicar o processo de geração de EROS. Isto ocorre, pois os agregados levam a decaimentos não radiativos por processos de conversão interna, dificultando a transferência de energia para o oxigênio molecular, diminuindo assim a produção de oxigênio singlete (31).

2.3 Fotossensibilizadores

Um FS é um composto que não é ativo em seu estado fundamental e é capaz de absorver luz na região do visível ou infravermelho próximo. Para ser aplicado na TFD, ele deve apresentar características específicas, tais como: baixa toxicidade no escuro, alta absorção molar na região de 600 a 800 nm, fotossensibilidade não prolongada, localização preferencial no tecido tumoral do que nos tecidos saudáveis, etc. Além disso, ele deve ser capaz de penetrar na célula e de se acumular em organelas estratégicas, induzindo a morte celular. A mitocôndria, por exemplo, possui papel fundamental na morte celular programada (apoptose) (29).

O primeiro FS aprovado para o uso em TFD foi o *Photofrin*®, composto por derivados de hematoporfirina. Seu uso para tratamento de câncer no esôfago foi aprovado em 1995, sendo utilizado nos Estados Unidos, Rússia, Japão, França, Canadá e Holanda (40). Com isso, surgiu a primeira geração de FS, cujos outros nomes comerciais são *Photoheme*®, *Photocarcinorin*®, *Photosan*®, *Photogem*®. Estes FS atualmente utilizados em clínicas, apesar de eficientes, apresentam certas desvantagens, como baixa absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético e baixa retenção pelos tecidos tumorais. Além disso, são compostos por misturas complexas, difíceis de serem isoladas, havendo até mesmo uma considerável variação na composição entre os lotes destes FS, o que dificulta a definição de um protocolo do seu uso (22).

Na procura de FS mais eficientes que os da primeira geração, surgem os FS da segunda geração: clorinas, bacterioclorinas, benzoporfirinas, ftalocianinas e naftalocianinas. Estes FS são quimicamente puros e apresentam uma banda de absorção intensa na região na janela terapêutica. Dentre as clorinas, a mais utilizada é o Foscan que, apesar de ser mais eficiente que o Photofrin, também desencadeia fotossensibilidade cutânea elevada (41).

A terceira geração de FS corresponde à segunda geração de FS associada a lipossomas, micelas e anticorpos conjugados. Estes sistemas visam à acumulação seletiva no tecido tumoral e representam uma área de pesquisa ativa no campo da TFD (42).

Um pré-requisito importante é que o FS possua um alto rendimento quântico e longo tempo de vida do estado tripleto, assim haverá formação de EROS suficiente para que o tratamento renda bons resultados. Quanto mais lento for o decaimento do estado tripleto, mais tempo o FS tem para agir no tecido tumoral, via mecanismos do tipo I ou II e iniciar

mecanismos bioquímicos e biofísicos que podem causar necrose (43).

Outra característica importante de um bom FS é que ele não sofra fotobranqueamento (fototransformação ou fotodestruição) exagerado durante o tratamento clínico. Esse evento é ocasionado pela reação do FS com as espécies reativas de oxigênio por ele produzidas (44). Este processo pode comprometer o efeito fotodinâmico, fazendo com que doses elevadas do FS tenham que ser administradas para compensar a sua perda. Por outro lado, o fotobranqueamento pode ser usado para diminuir o período de fotossensibilidade nos pacientes, já que diminui a retenção do FS no corpo (45).

Entre os FS, os corantes ciânicos merecem atenção especial devido às suas características promissoras: intensa absorção óptica na região desejável da TFD, alta afinidade por estruturas biológicas, alta fotoatividade e fotoestabilidade.

2.3.1 Corantes ciânicos

Os corantes ciânicos (CC) ou cianinas pertencem à família de corantes sintéticos que possuem grupos de polimetina. O primeiro CC foi descoberto em 1856 por C. H. Greville Williams. A partir daí, os CCs tiveram diversas aplicações, como: em sensibilizadores em fotografias, na captura de energia solar, em materiais de laser, sondas para sistemas biológicos, FS na TFD, etc (46) (47).

Estruturalmente, os CC são compostos por grupos metina ($-\text{CH}=\text{}$) ligados de forma alternada por ligações simples e duplas (sistema de conjugação π), como mostra a figura 7. O limite do comprimento da cadeia é controlado pelas possibilidades sintéticas e pela estabilidade química dos corantes sintetizados, que, normalmente, diminui à medida que se aumenta o comprimento da cadeia.

Figura 7. Estrutura geral dos corantes ciânicos.

Nas extremidades da cadeia de polimetina, estão ligados grupos heterocíclicos que contém átomos de nitrogênio, com uma carga positiva, tais como indol, quinolina, benzotiazol, etc. em ambas as extremidades da cadeia (figura 8) (48) (49) (50):

Figura 8. Grupos heterocíclicos terminais mais comuns nas cianinas: (a) benzoxazol, (b) benzotiazol, (c) benzoselenazol, (d) benzimidazol, (e) quinolina, (f) 3-H-indol, (g) naftoxazol, (h) naftotiazol (49).

Devido ao efeito de ressonância entre as possíveis estruturas eletrônicas da molécula, essa carga positiva está deslocalizada na estrutura de conjugação π (51) (figura 9):

Figura 9. Efeito de ressonância entre as estruturas eletrônicas de corantes cianícos, com a indicação da deslocalização da carga positiva.

As cadeias polimetinas de CC simétricos consistem em um número ímpar de átomos de carbono.

Os CCs apresentam altos coeficientes de absorção molar, desde $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (monometinocianinas) até $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (tri- e pentametinocianinas). Além disso, devido à flexibilidade da sua estrutura e, por serem carregados, os CC possuem alta afinidade por estruturas biológicas (52). A maioria dos CC é catiônica e tende a se acumular, de forma seletiva e preferencial, na mitocôndria de células neoplásicas do que em células normais (53).

A absorção na região visível do espectro é determinada pela existência do sistema de conjugação π e, portanto depende do comprimento da cadeia polimetina. Esta estrutura única permite sintetizar CC com uma gama mais ampla de absorção do que qualquer outra classe de corantes conhecida, podendo absorver desde o UV até o infravermelho. Dessa forma, é possível sintetizar cianinas com diferentes comprimentos de onda de absorção ao aumentar o comprimento da cadeia polimetina. As características espectrais e energéticas dos CC podem ser analisadas usando, como uma boa aproximação, o modelo do elétron livre numa caixa com paredes de potencial infinito. De acordo com este modelo, a energia de transição entre dois níveis de energia da molécula de CC que determina a posição de máximo da banda de absorção é definida pela equação:

$$\Delta E = \frac{h^2 (N + 1)}{8mL^2} \quad (9)$$

em que m é a massa do elétron, N é o número de ligações π da molécula, h é a constante de Planck e L , o comprimento da caixa de potencial. Sendo c a velocidade da luz no vácuo, pode-se reescrever a equação de energia na forma de comprimento de onda λ :

$$\lambda = \frac{8cmL^2}{h(N + 1)} \quad (10)$$

Pela equação 10, é possível verificar que o comprimento de onda do máximo de transição aumenta com L^2 , logo a energia de transição é inversamente proporcional ao quadrado do tamanho do cromóforo. Deste modo, aumentando o comprimento do cromóforo é possível deslocar facilmente a posição do máximo do espectro de absorção ótica do corante para comprimentos de onda maiores. Por outro lado, o aumento do comprimento da cadeia de conjugação π induz alguns efeitos indesejáveis (54):

1. aumenta a hidrofobicidade da molécula, diminuindo a sua solubilidade em água, estimulando a agregação.
2. aumenta a probabilidade de fotoisomerização da molécula. A fotoisomerização é uma das principais vias de desativação das cianinas, diminuindo os tempos de vida e rendimentos quânticos dos seus estados excitados e, conseqüentemente, sua fotoatividade.

3. aumenta a flexibilidade da estrutura da molécula aumentando a probabilidade da perda da energia de excitação por processos não radiativos de conversão interna e de cruzamento intersistemas diminuindo os tempos de vida e rendimentos quânticos dos seus estados excitados e, conseqüentemente, sua fotoatividade.
4. diminui a fotoestabilidade e estabilidade da molécula.

Os corantes cianícos com dois cromóforos reduzem essas desvantagens.

2.3.2 Corantes cianícos com dois cromóforos

As biscianinas ou corantes cianícos com dois cromóforos (*bi-chromophoric cyanine dyes* - BCD), figura 10, são uma combinação de dois monômeros de CC (duas cadeias de polimetina 3,3-dietiltiacarbocianina) separadas por um heterociclo central que varia para cada corante (representado na figura pelo círculo) e um heterociclo em cada extremidade das cadeias. Em pH fisiológico (6,8 a 7,0), os BCD possuem duas cargas positivas em sua estrutura.

Figura 10. Estrutura geral dos BCD, indicando o heterociclo central (círculo) e o ângulo entre os cromóforos.

A estrutura dos BCDs determina as suas características espectrais e energéticas, tais como, espectros de absorção óptica e de fluorescência, rendimentos quânticos, tempos de vida e energias dos estados excitados singlete e tripleto (55) (56) (57). Os BCDs apresentam características favoráveis para serem aplicados como FS na TFD, pois: possuem um alto coeficiente de absorção molar (da ordem de $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na região da janela terapêutica; sua carga positiva permite a permeação em membranas e também o acúmulo em mitocôndrias, devido ao potencial negativo da matriz mitocondrial, indicando assim sua alta afinidade por

sistemas biológicos e também por modelos como DNA, micelas, entre outros (58) (59). Entretanto, devido ao sistema de conjugação π , os BCDs apresentam certa hidrofobicidade.

Uma propriedade particular dos BCDs é a presença de duas bandas de absorção na região espectral visível devido à interação entre os dois cromóforos. Esta interação depende do ângulo entre os cromóforos, da estrutura do heterociclo central e do comprimento das cadeias de polimetina. Os espectros dos BCDs são decorrentes de dois efeitos: o tunelamento de elétrons pelo heterociclo central e a interação dipolo-dipolo entre os cromóforos (60) (61). Estes efeitos causam o *splitting* dos níveis de energia das moléculas, figura 11, resultando no aparecimento das duas bandas.

Figura 11. Ilustração dos níveis de energia: *splitting* causados pelo tunelamento e pela interação dipolo-dipolo.

Na Figura 11, o primeiro par de níveis de energia (S_1 e S_0) está relacionado a um cromóforo. O tunelamento produz a separação assimétrica deste nível (I). A interação dipolo-dipolo produz a separação (*splitting*) simétrica do nível S_1 da monocianina (II). A separação final (III) será dada pela soma dos *splitting* causados por ambos os efeitos.

A análise teórica mais detalhada da formação dos níveis da energia e dos espectros das biscianinas está apresentada em (61).

Para as cianinas, uma banda de absorção aparece devido à transição entre dois níveis de energia S_0 e S_1 ($S_0 \rightarrow S_1$). No caso dos BCDs, como há o desdobramento do nível de energia S_1 devido ao *splitting*, aparecem duas transições: $S_0 \rightarrow S_{11}$ e $S_0 \rightarrow S_{12}$, e com isso, o espectro de absorção apresentará duas bandas de absorção: uma deslocada para menores comprimentos de onda (região azul) e outra para maiores comprimentos de onda (região vermelha), em relação à banda de absorção da monocianina (60) (61). Em relação aos ângulos dos BCDs, podemos dizer que, o BCD cujo ângulo entre os cromóforos é 180° , possui

estrutura planar e forte conjugação π entre seus cromóforos e, por isso, possui um maior desdobramento devido ao tunelamento. Para o BCD de 90° , a distância entre os cromóforos é menor, o que aumenta a interação dipolo-dipolo.

As intensidades das bandas de absorção destes corantes são determinadas por fatores geométricos referentes ao ângulo entre os cromóforos. Semelhante ao caso dos dímeros, de acordo com a teoria de Kasha para a agregação, quando o ângulo entre os cromóforos é 0° (assim como no agregado H), há somente a banda de menor comprimento da onda. Quando o ângulo entre as direções dos cromóforos é igual a 180° (como num agregado J), ocorre o contrário. Isto pode ser explicado qualitativamente porque a onda eletromagnética incidente induz dipolos com o mesmo sentido nos dois cromóforos, o que aumenta a repulsão eletrostática entre estes quando o ângulo é 0° . Quando os dipolos são induzidos no corante com ângulo de 180° entre os cromóforos, o pólo positivo de um fica ao lado do pólo negativo do outro cromóforo, diminuindo a repulsão eletrostática entre estes aumentando a probabilidade de transição eletrônica da banda de menor energia. Já, para o ângulo entre os planos dos cromóforos de 90° , o efeito depende da orientação relativa entre a direção do vetor do campo elétrico da onda eletromagnética e da molécula resultando, em média, em intensidades iguais para as duas bandas (similar a um agregado misto). As posições relativas e o efeito de polarização causada pela interação com a onda eletromagnética para os diferentes ângulos de 180° , 0° e 90° entre os cromóforos estão representados, respectivamente, na figura 12, através dos arranjos dos geométricos dos agregados J (figura 12a), H (figura 12b) e misto (figura 12c). As setas dentro dos retângulos indicam a orientação dos momentos de dipolo de cada monômero, as linhas verticais contínuas e tracejadas (dos dímeros) representam a transição de maior e menor probabilidade, respectivamente.

Figura 12. Diagrama de energia para dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição. (a) Agregados J ; (b) Agregados H e (c) Agregados mistos. Linhas contínuas no diagrama de energia indicam maior probabilidade de transição e linhas tracejadas, menor. À direita de E_1' e E_1'' estão representados os momentos de dipolo de cada transição. Na parte superior, o vetor $\vec{E}$ representa o vetor campo elétrico.

Segundo (62), o ângulo entre os cromóforos pode ser calculado a partir dos dados experimentais usando a equação:

$$\cos \theta = \frac{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2} - 1}{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2} + 1} \quad (11)$$

em que λ_1 e ε_1 referem-se a uma das bandas de absorção que está deslocada para comprimentos de onda menores, e λ_2 e ε_2 , à banda deslocada para maiores comprimentos de onda.

Diferentemente das cianinas, para os BCDs, o deslocamento do seu espectro de absorção óptica para maiores comprimentos de onda não está associado com o aumento do comprimento da cadeia de conjugação π dos seus cromóforos, mas pela interação entre eles. Por isso a combinação de dois monômeros reduz o tamanho da cadeia polimetina, reduzindo assim os efeitos negativos devido à fotoisomerização e a flexibilidade da estrutura da molécula.

Vários tipos destes corantes podem ser sintetizados variando as suas cadeias laterais e os heterociclos, assim como o ângulo entre os cromóforos. Esta variabilidade possibilita sintetizar corantes com boas características para uso em fototerapias.

Um exemplo é a bis (heptametina cianina) do infravermelho próximo (*Near-infrared (NIR) bis (heptamethine cyanine* - BHmC) que contém um ligante de polimetileno flexível entre as duas subunidades da cadeia. Este tipo de biscianina possui utilidade bionalítica (ensaios enzimáticos, por exemplo) devido ao forte aumento da fluorescência após a ligação com uma proteína (63). Em outro trabalho, foi demonstrado também que a introdução de biscianinas em uma matriz polimérica que causava a rigidez da cadeia polimetínica resultava na redução da isomerização das moléculas e consequentemente, ocorria o aumento do rendimento quântico de fluorescência (64).

Recentemente em nosso grupo de pesquisa foi mostrada a sua alta fotoatividade contra diversas linhagens das células cancerígenas (16). Pelo fato de os BCDs possuírem alta afinidade pelo DNA e membrana celular (58), estes podem ser considerados alvos importantes da fotoação dos BCDs no organismo.

2.4 Fototransformação

Fototransformação, fotodegradação ou fotobranqueamento são os nomes dados à degradação de um composto devido à ação da luz. Este processo envolve a diminuição da absorção óptica e a diminuição da intensidade de fluorescência do FS (65).

Todos os FS usados em TFD costumam ser degradados ou modificados quando expostos à luz. As características do fotobranqueamento dependem da natureza dos FS e são influenciadas por vários fatores, tais como polaridade do meio, presença de outro doador/aceitador de elétron, intensidade da luz de excitação, etc (44) (66).

Dois tipos de processos de fotodegradação devem ser considerados: o primeiro tipo é a fotomodificação, na qual ocorre a perda de absorbância ou fluorescência em certos comprimentos de onda, porém o cromóforo é retido em uma forma modificada. O segundo tipo é o verdadeiro fotobranqueamento, no qual mudanças químicas são estabelecidas e resultam em pequenos fragmentos que já não apresentam absorção significativa na região do visível. A amostra torna-se essencialmente incolor (45).

Várias teorias são propostas para explicar a fotodegradação. As principais causas envolvem a formação de oxigênio singlete que reage efetivamente com ligações duplas, destruindo o sistema de conjugação π do cromóforo (figura 13).

Figura 13. Reações do oxigênio singlete com as ligações duplas em moléculas biológicas.

Além disso, vários tipos de radicais livres podem ser criados na reação do oxigênio singlete com outras moléculas, os quais também podem destruir a estrutura do cromóforo do corante. Um fluoróforo no estado excitado tripleto também é altamente reativo e pode sofrer reações irreversíveis que envolvem moléculas orgânicas intracelulares. Todas estas reações químicas dependem tanto da concentração de oxigênio singlete intracelular e da distância entre o corante e os componentes intracelulares, tais como proteínas, lipídeos, etc. (67).

As características da cinética de fototransformação são bastante complexas e são definidas por diversos fatores, tais como microambiente e estados de agregação. Estudos (68) (69) demonstraram que a cinética de fotodegradação é fortemente influenciada pela agregação dos FS. Taxas diferentes foram obtidas de acordo com os métodos de detecção. Embora a perda de fluorescência pudesse ser interpretada como a perda de espécies monoméricas, a perda de absorbância representou tanto a diminuição da agregação como a destruição de monômeros.

Para a TFD, o estudo da fototransformação do FS na interação com os sistemas biomiméticos é importante, pois interação do FS com sistemas biológicos pode alterar os mecanismos e as velocidades das fotoreações dos FS. Além disso, sob a ação de luz, em

paralelo com o seu efeito curativo, o FS pode ser fototransformado. Saber sobre este processo é importante, pois:

- 1) o FS fototransformado pode perder sua fotoatividade;
- 2) os produtos de fototransformação podem apresentar fotoatividade, e ainda, toxicidade;
- 3) os processos de fototratamento e de fototransformação são processos paralelos. Por isso, o monitoramento do processo de fototransformação, por exemplo, pela sua fluorescência diretamente no corpo do paciente, pode ajudar na avaliação do processo de tratamento em tempo real.

Sendo assim, os estudos dos mecanismos de fototransformação de um FS e os efeitos da sua interação com sistemas biomiméticos nas características desse processo são de extrema importância.

2.5 Surfactantes e micelas

Tensoativos ou surfactantes são moléculas anfifílicas caracterizadas por possuírem duas regiões estruturais: hidrofílica (cabeça polar) e hidrofóbica (cauda apolar) (figura 14). A cauda é formada geralmente por uma longa cadeia hidrocarbônica com oito ou mais átomos de carbono. Dependendo da carga da cabeça, os surfactantes podem ser classificados como aniônicos (carga negativa), catiônicos (carga positiva), zwitteriônicos (tanto cargas negativas quanto positivas) e não iônicos (não carregados).

Figura 14. Ilustração de um surfactante. Adaptado de (70).

Quando um surfactante é dissolvido em solução aquosa, a cauda hidrofóbica interage fracamente com as moléculas de água através de interações de van der Waals e a cabeça hidrofílica interage fortemente com as moléculas de água por interações dipolo-dipolo ou iônicas.

dipolo (71). Os surfactantes, ao atingirem uma determinada concentração denominada concentração micelar crítica (CMC), se associam espontaneamente, formando estruturas agregadas definidas que recebem o nome de micelas (figura 15).

Figura 15. Ilustração de uma micela esférica (70).

A força motriz para a formação de micelas é devido à redução do contato entre a cadeia hidrocarbônica e a água, reduzindo assim a energia livre do sistema (71). Nas micelas, as caudas hidrofóbicas ficam em contato umas com as outras, voltadas para o interior do agregado e as cabeças polares ficam dirigidas para o solvente, formando uma camada com o meio aquoso (72).

Diversos fatores podem afetar a atividade de um surfactante: temperatura, pH, força iônica, concentração do surfactante, presença de íons multivalentes, pureza e presença de aditivos orgânicos (72).

O processo de micelização é um fenômeno dinâmico, no qual monômeros de surfactante (n) se associam para formar micelas S_n , isto é:

que mostra que há um equilíbrio dinâmico no qual as moléculas ativas na superfície estão constantemente entrando e saindo das micelas (71).

Um dos modelos mais aceitos para explicar a forma e o comportamento de uma micela é o modelo esférico de Stigter (figura 16). Segundo este modelo, as moléculas se organizariam em forma esférica, onde todas as porções hidrofóbicas do tensoativo estariam

voltadas para o centro, formando um núcleo (núcleo micelar) e os grupos hidrofílicos ficam na superfície (72). Neste modelo, tem-se a presença de três regiões caracterizadas de acordo com a constante dielétrica (ϵ):

- a) região interna hidrofóbica, formada pela parte apolar (cadeia hidrocarbônica) da molécula do tensoativo. Essa região não contém água e é caracterizada por uma baixa constante dielétrica, $\epsilon = 2 - 4$;
- b) camada de Stern: região formada pela parte polar do tensoativo e por contra-íons, caracterizada por $\epsilon = 5 - 18$;
- c) camada de Gouy-Chapman: região localizada entre a parte polar da micela e o meio aquoso homogêneo, contendo os íons remanescentes da camada de Stern. É caracterizada por um alto gradiente de constante dielétrica (entre 18 e 81) numa distância que varia entre 10 e 100 Å, dependendo da força iônica do meio.

Figura 16. Modelo de Stigter, com a presença das três regiões distintas.

As micelas são amplamente usadas como modelos de membrana biológica, pois, semelhantemente a elas, as micelas apresentam três regiões estruturais com diferentes constantes dielétricas. Elas oferecem vantagens em estudos espectroscópicos em relação a outros modelos de membrana, pois são pequenas (da ordem de nanômetros), com tamanhos bem definidos, suas soluções são opticamente transparentes e produzem baixo espalhamento (73).

Neste trabalho, utilizamos micelas de Dodecil Sulfato de Sódio ou SDS (do inglês, *Sodium Dodecyl Sulfate*) cuja fórmula estrutural é $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4^- \text{Na}^+$ (figura 17), um tensoativo carregado negativamente. Sua CMC em soluções aquosas homogêneas é de aproximadamente 8 mM e foi mostrado que, na presença de tampão fosfato, este número pode diminuir para 2,6 mM (74) (75).

Figura 17. Fórmula estrutural do SDS.

2.6 Ácido desoxirribonucléico (DNA)

O ácido desoxirribonucléico (DNA) em cada célula funciona como um banco de dados e a informação nele armazenada permite que cada constituinte celular seja sintetizado, organizado e regulado (76).

A molécula de DNA consiste em duas cadeias de nucleotídeos dispostas em hélice em torno de um eixo. As moléculas de DNA são formadas por constituintes menores que se ligam entre si. Estes constituintes são compostos por: uma base nitrogenada, um açúcar desoxirribose (composto por 5 carbonos) e um fosfato (figura 18).

Figura 18. Nucleotídeo do DNA.

O que diferencia cada constituinte são as bases nitrogenadas, que são: guanina (G), citosina (C), adenina (A) e timina (T) (figura 19).

Figura 19. Estrutura do nucleotídeo com as bases nitrogenadas: adenina (A), guanina (G), timina (T) e citosina (C).

Os constituintes formam uma fita de DNA através de ligações fosfodiésteres entre os fosfatos. As bases de cada cadeia situam-se dentro da hélice dupla, em planos paralelos entre si e perpendiculares ao eixo da hélice. Em cada plano ou cadeia, a base de uma cadeia forma par com a base da cadeia complementar. Na dupla hélice, as bases unem-se através de ligações de hidrogênio, principais responsáveis pela estabilidade da hélice. Estas ligações formam os pares de bases A-T e G-C. As bases (hidrofóbicas) situam-se dentro da hélice, e os resíduos de desoxirribose (hidrofílicos) e de ácido fosfórico (ionizado e hidrofílico) localizam-se na periferia. Ao lado das ligações de hidrogênio que representam o elemento principal de união entre os dois filamentos polinucleotídicos da dupla hélice, a interação hidrofóbica das bases pareadas contribui para manter a estabilidade da hélice de DNA (77).

Os grupos fosfóricos, carregados negativamente, permitem ao DNA combinar-se com moléculas carregadas positivamente e, por isto, moléculas de FS com carga positiva podem ser ligadas em sua superfície, devido à atração eletrostática entre suas cargas. Além disso, o FS pode intercalar-se no interior da estrutura da hélice, entre os planos formados pelos pares de bases, devido ao efeito hidrofóbico entre o interior do DNA e o sistema de conjugação π do FS (78) (79) (80).

Quando compostos fotoativos se ligam na molécula de DNA, após serem irradiados, podem produzir espécies radicalares ou espécies ativas de oxigênio que irão interagir com as bases podendo destruir o DNA; estes compostos também podem transferir sua energia diretamente para a molécula de DNA.

A interação com estruturas biológicas pode afetar as características espectrais e as probabilidades relativas dos processos de perda de energia da excitação dos FS. Além disso, podem acontecer reações diretas entre as moléculas do DNA e moléculas de FS excitadas. Todos esses fenômenos podem afetar o mecanismo e a cinética da fototransformação do FS.

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de fototransformações provocadas pela luz visível em corantes ciânicos com dois cromóforos, diferenciados pelos ângulos entre seus cromóforos (180° , 150° e 90°) em soluções homogêneas de tampão fosfato e na presença de sistemas biomiméticos: micelas, formadas de dodecil sulfato de sódio (SDS) e DNA. Foi planejado estudar:

- os efeitos da agregação dos corantes sobre seu processo de fototransformação;
- os efeitos do oxigênio molecular sobre esse processo;
- a modificação das características de fototransformação dos corantes na presença de sistemas biomiméticos;
- as características dos fotoprodutos e a cinética de sua fototransformação em função da sua própria concentração, da presença do oxigênio e dos sistemas biomiméticos.

O alvo principal desse estudo foi sugerir os mecanismos possíveis da fototransformação destes corantes com a finalidade de aplicação na Terapia Fotodinâmica (TFD).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Objetos de estudo e sistemas biomiméticos

Como objetos de estudo, foram escolhidos três BCDs com ângulos entre os cromóforos de 180° (BCD180), 150° (BCD150) e 90° (BCD90). Os BCDs foram sintetizados pelo Prof. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciência da Ucrânia, e suas estruturas encontram-se nas figuras 20, 21 e 22.

Figura 20. Estrutura geral do BCD180.

Figura 21. Estrutura geral do BCD150.

Figura 22. Estrutura geral do BCD90.

Os meios utilizados neste estudo e sistemas biomiméticos foram:

- i) solução tampão fosfato (do inglês *phosphate buffered saline* ou *PBS*);
- ii) SDS, surfactante carregado negativamente (da *Sigma-Aldrich*);

iii) DNA de timo de bezerro (da *Worthington Biochemical Co (USA)*).

Os estudos foram realizados em função das estruturas dos corantes, de suas concentrações, dos meios utilizados, e também da presença e ausência de oxigênio molecular.

4.2 Preparação das amostras

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e as soluções foram preparadas em água purificada com sistema “Milli-Q”.

As soluções estoque de BCDs foram preparadas em etanol absoluto 99,9% e os experimentos foram feitos em tampão PBS, em pH 6,8. O tampão PBS consiste de 5,0 mM de NaH_2PO_4 e 2,5 mM de Na_2HPO_4 dissolvidos em água “Milli-Q”. Para todas as medidas, a solução estoque de BCD em etanol foi acrescentada à solução tampão, sem ultrapassar o limite de 5% de etanol em relação ao tampão. Neste pH, os BCDs apresentam uma carga positiva +2.

As concentrações dos BCDs foram determinadas espectroscopicamente usando os seus coeficientes de absorção molar em tampão, determinados a partir dos picos das bandas principais dos espectros de absorção dos corantes (81), sendo eles: $\epsilon_{633\text{nm}} = 1,33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BCD180), $\epsilon_{624\text{nm}} = 1,35 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BCD150) e $\epsilon_{618\text{nm}} = 0,88 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (BCD90).

As soluções estoque de SDS foram preparadas em tampão PBS no dia do experimento. As soluções estoque de DNA foram preparadas em tampão PBS um dia antes do experimento, na proporção 1:1 e mantidas a 4°C. A concentração de DNA foi obtida através do coeficiente de absorção molar $\epsilon_{260\text{nm}} = 1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, determinado em pares de bases (82).

4.3 Técnicas experimentais

4.3.1 Espectroscopia de absorção óptica no UV-VIS

A energia do fóton absorvido é caracterizada experimentalmente pela posição do máximo da banda de absorção em função da frequência ($\nu_{\text{máx}}$) ou do comprimento de onda ($\lambda_{\text{máx}}$) da luz. O espectro de absorção de um composto depende de sua estrutura molecular e é caracterizado pela diferença de energia entre os níveis de transição do estado fundamental e do estado excitado. Esta dependência de absorção de energia (E) da luz pode ser dada em função do comprimento de onda (λ) da luz incidente, por:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (13)$$

em que h é a constante de Planck, ν é a frequência e c é a velocidade da luz.

A banda de absorção é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar ($\varepsilon(\lambda)$), que depende do comprimento de onda λ . O $\varepsilon(\lambda)$ é uma característica intrínseca de cada composto e está relacionado com sua estrutura eletrônica e a interação com ambiente. Quando uma luz de intensidade I_0 passa através de uma amostra de concentração molar C , através de um caminho óptico de espessura l , a intensidade I da luz transmitida obedece à lei de Beer-Lambert :

$$I = I_0 10^{-\varepsilon Cl} \quad (14)$$

Através dessa equação 14, podemos escrever:

$$A(\lambda) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon(\lambda)Cl \quad (15)$$

em que $A(\lambda)$ é chamada de absorbância.

Observando a mudança da $A(\lambda)$ no tempo podemos concluir sobre mudança da concentração C do composto na amostra e analisar a dinâmica desse processo.

Quando na amostra ocorre a mistura de compostos diferentes, a absorbância total é simplesmente a soma algébrica das absorbâncias dos componentes da solução:

$$A(\lambda) = \sum_{i=1}^n A_i = \sum_{i=1}^n \varepsilon(\lambda)_i C_i l \quad (16)$$

Assim, variando as concentrações das componentes e analisando $A(\lambda)$ em função do λ , podemos separar os espectros dos compostos na mistura.

O $\varepsilon(\lambda)$ é sensível à interação da molécula com o ambiente. Assim, pela espectroscopia de absorção óptica, podemos estudar os efeitos da interação das moléculas entre si e com o ambiente.

Neste trabalho utilizamos a técnica de espectroscopia de absorção para a análise dos espectros dos BCDs em tampão e na interação com SDS e DNA. Também foi utilizada para o estudo da cinética de fototransformação dos BCDs nestas diferentes estruturas, em cubeta de quartzo de 1 cm de espessura. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro *Beckman Coulter™ DU®640*.

4.2.2 Espectroscopia de fluorescência estática

Esta seção é baseada na referência (83).

Quando uma molécula no estado fundamental singleto S_{00} absorve energia, um elétron é promovido desse estado para um estado excitado também singleto S_{1v} . Neste caso, no estado excitado, o elétron no orbital excitado continua emparelhado (spin oposto) com o segundo elétron no orbital do estado fundamental (figura 23).

Figura 23. Representação do estado fundamental e do estado excitado singleto.

Pode ainda ocorrer, com alta probabilidade, uma relaxação por um processo não radiativo de relaxação vibracional do nível S_{1v} para o nível vibracional mais baixo desse estado S_{10} . Consequentemente, o retorno ao estado fundamental é permitido e ocorre rapidamente com a emissão de um fóton (luz). Este processo é chamado de fluorescência, quando envolve transições do tipo $S_{10} \rightarrow S_{0v}$.

Como mostra o diagrama de Jablonski, figura 24, competindo com a emissão, existem vários outros processos que contribuem para o estado excitado perder energia.

Figura 24. Diagrama de Jablonski (adaptado de (83)).

Os processos que competem com a fluorescência são: conversão interna (ou interconverção) e cruzamento intersistema. Ambos os processos ocorrem de forma isoenergética entre os estados vibracionais dos estados inicial e final. A energia desses estados vibracionais se dissipa pelo processo não radiativo de relaxação vibracional. Este processo apresenta tempos característicos extremamente rápidos da ordem de picossegundos a femtossegundos. Além disso, pode ocorrer supressão do estado S₁₀ por vários mecanismos.

A conversão interna (CI) ocorre entre estados eletrônicos de mesmo spin, $S_n \rightarrow S_m$ ou $T_n \rightarrow T_m$ ($n > m$) e geralmente ocorre dentro de 10^{-12} s ou menos. O cruzamento intersistemas (CIS) é um processo que ocorre entre estados de spin diferente $S_n \rightarrow T_m$. Como a transição do estado excitado tripleto para o fundamental é proibida, as taxas de transição $T_m \rightarrow S_0$ são várias ordens de magnitude menor que as de $S_1 \rightarrow S_0$.

A razão entre as probabilidades dos processos não radiativos e da fluorescência depende da estrutura da molécula e das características do ambiente. Assim medindo a fluorescência podemos obter a informação sobre a interação das moléculas entre si e com o ambiente. Um fator importante é a eficiência de uma amostra emitir fluorescência, denominado rendimento quântico da fluorescência (ϕ_{fl}). O ϕ_{fl} é definido como a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos pelo material. Uma vez considerados os processos que competem com a fluorescência, podemos definir a fração que representa a desexcitação através da fluorescência como:

$$\phi_{fl} = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{CI} + k_{CIS}} \quad (17)$$

em que k_{fl} , k_{CIS} , k_{CI} são, respectivamente, as taxas características dos processos de fluorescência, cruzamento intersistema e conversão interna.

Por outro lado, podemos ainda ter a relação:

$$\phi_{fl} = \frac{I_{fl}}{I_{abs}} \quad (18)$$

em que I_{fl} é a intensidade total da fluorescência, que pode ser calculada como a integral do espectro de fluorescência e I_{abs} é a intensidade de luz absorvida pela amostra no comprimento de onda de bombeio.

O ϕ_{fl} também pode ser expresso através dos tempos de vida de fluorescência que se relacionam com as constantes características dos processos de fluorescência, cruzamento intersistema, conversão interna e supressão de vários tipos da seguinte maneira:

$$\tau_r = \frac{1}{k_r} \text{ e } \tau_F = \frac{1}{k_{fl} + k_{ic} + k_{is} + \sum_i k_{si}[Q]_i} \quad (19)$$

em que τ_{fl} , τ_r são, respectivamente, os tempos de vida experimental da fluorescência e o tempo de vida radiativo do estado S_1 , que pode ser obtido através do espectro de absorção do composto, experimentalmente:

$$\frac{1}{\tau_r} \approx 10^4 \epsilon_{\max} \quad (20)$$

Logo, o rendimento quântico é dado por:

$$\phi_F = \frac{\tau_{fl}}{\tau_r} \quad (21)$$

As medidas de fluorescência baseiam-se no registro de fótons emitidos pela amostra. A espectroscopia de fluorescência é muito sensível, já que os aparelhos modernos permitem detectar fótons únicos emitidos por amostra.

A espectroscopia de fluorescência estática utiliza um aparelho chamado espectrofluorímetro. Este aparelho possui uma fonte de luz contínua que produz um amplo espectro de energia. O feixe produzido pela fonte atinge o monocromador de excitação que

transmite luz seletivamente em um estreito intervalo centrado em um comprimento de onda específico. A luz transmitida passa através de fendas ajustáveis que controlam a magnitude e a resolução, limitando a luz transmitida. A luz filtrada passa no centro da amostra originando a emissão das moléculas da amostra. A luz emitida pela amostra entra no monocromador de emissão, posicionado a um ângulo de 90° do caminho da luz de excitação para eliminar o sinal de luz incidente e diminuir a intensidade de luz espalhada. A luz emitida é então transmitida em um comprimento de onda específico e sai através de fendas ajustáveis, entrando, finalmente, no tubo fotomultiplicador no qual o sinal é amplificado e é criada uma voltagem proporcional à intensidade emitida.

Neste trabalho, as medidas de fluorescência estática foram realizadas em um espectrofluorímetro *Hitachi F-7000*, com uma lâmpada de xenônio de 150 W, como fonte de luz. Foram realizadas medidas dos espectros de emissão de fluorescência dos corantes e de seus fotoprodutos em solução tampão e na presença de SDS e DNA.

4.2.3 Espectroscopia de fluorescência com resolução temporal

Considere a excitação de um fluoróforo com um pulso de luz infinitamente curto, resultando em uma população inicial (N_0) de fluoróforos no estado excitado. A relaxação do estado excitado S_{10} será governada por um decaimento que leva em consideração todos os processos descritos previamente na seção anterior e nos permite escrever a taxa de decaimento do estado singleto como a soma de todos estes processos:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_r + k_{CI} + k_{CIS})N(t) \quad (22)$$

em que $N(t)$ é o número de moléculas excitadas em um tempo t seguinte a excitação; k_r é a constante radiativa e as não-radiativas (k_{CI} e k_{CIS}) são as constantes de perda de energia por fluorescência, conversão interna e por cruzamento intersistêmico, do estado S_1 para o estado T_1 .

Considerando que a soma de todas estas taxas é a taxa do decaimento do estado S_{10} , podemos reescrever esta equação como:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\frac{N(t)}{\tau_{S_1}} \quad (23)$$

em que $N(t)$ é o numero de partículas excitadas em um dado instante de tempo t após a excitação (absorção) e τ_{S_1} é o tempo de vida do estado S_{10} .

Sendo $N(t) = N_0$ em $t = 0$, a integração da equação 23 nos dá:

$$N(t) = N_0 e^{-t/\tau} \quad (24)$$

em que $\tau = (k_r + k_{IC} + k_{CIS})^{-1}$ é o tempo de vida do estado excitado. Como nos experimentos de fluorescência, é obtida a intensidade de fluorescência e não o número de partículas excitadas, a intensidade de fluorescência $I(t)$, que é proporcional à população no estado excitado [$I(t) = g N(t)$], pode ser escrita como:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (25)$$

em que I_0 corresponde à intensidade no instante diretamente depois da excitação da amostra $t = 0$. Para decaimentos de intensidade que apresentam mais de uma componente, os ajustes são feitos por multi-exponenciais:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-t/\tau_i} \quad (26)$$

em que A_i representam as amplitudes das componentes para $t = 0$ (chamadas de fatores pré-exponenciais e representam a fração de moléculas em cada uma das conformações em $t = 0$), τ_i são os tempos de decaimento e n é a quantidade de tempos de decaimento.

O tempo τ_{S_1} pode ser medido, por exemplo, através do decaimento da intensidade de fluorescência da amostra em função do tempo e, portanto, é comum chamar τ_{S_1} de tempo de vida da fluorescência (τ_{fl}). O tempo de vida de fluorescência de uma substância geralmente representa um valor médio do tempo que a molécula permanece no estado excitado antes de retornar para o estado fundamental. A emissão de fluorescência é um processo aleatório e poucas moléculas emitem seus fótons precisamente em $t = \tau_{fl}$.

O tempo de vida de fluorescência pode ser medido através de técnicas resolvidas no tempo.

Medidas do tempo de vida podem revelar a taxa de transferência de energia e a taxa de reações no estado excitado, assim como revelar detalhes sobre as interações das moléculas com sua vizinhança. Como os tempos de vida de fluorescência se encontram na faixa de nanossegundos torna-se necessário o uso de dispositivos de alta velocidade e detectores adequados. Existem três métodos amplamente usados para medir tempos de vida: o método de pulsos, o método estroboscópico e o método harmônico ou de modulação de fases.

Neste trabalho, os experimentos de fluorescência com resolução temporal foram realizados empregando um sistema baseado no método de correlação temporal de fótons únicos (*Time-correlated single photon counting* - TCSPC). Neste método, a amostra é excitada com um pulso de luz extremamente curto e é medido o intervalo de tempo transcorrido entre a absorção do pulso e a emissão de um fóton por fluorescência da amostra. O tempo é medido entre o pulso de excitação e o fóton observado, sendo armazenado num histograma. O eixo x representa o intervalo de tempo e o eixo y, o número de fótons detectados neste intervalo de tempo (figura 25). Para o TCSPC as condições são ajustadas de modo que, tipicamente, a taxa de detecção é de um fóton por 100 pulsos de excitação do laser.

O experimento começa com o pulso de excitação que excita as amostras. Cada pulso é opticamente monitorado por uma fotomultiplicadora para produzir um sinal inicial que passa através de um discriminador de fração constante (do inglês *Constant Fraction Discriminator*, CFD) que mede com precisão o tempo de chegada do pulso. Este sinal é passado para um conversor de tempo-amplitude (*Time-to-Amplitude Converter* (TAC)) que gera uma rampa de tensão. Um segundo canal detecta o pulso do único fóton detectado. O tempo de chegada do sinal é determinado com exatidão utilizando o CFD, que envia um sinal para parar a rampa de tensão. O TAC contém agora uma voltagem proporcional ao tempo de atraso (Δt) entre os sinais de excitação e de emissão. Um analisador multicanal (*multi-channel analyser*, MCA) converte esse valor de tensão em um canal de tempo usando um conversor analógico-digital (*analog-to-digital converter*, ADC). Repetindo este processo várias vezes, um histograma de contagens *versus* canais de tempo é construído. O experimento transcorre até atingir um pico de 10000 contagens no canal do pico. Sob essas condições, o histograma dos tempos de chegada dos fótons representa o decaimento da intensidade da amostra.

Figura 25. Figura ilustrativa que mostra o princípio da TCSPC. Adaptado de (83).

As medidas de fluorescência com resolução temporal foram realizadas em um equipamento de microscopia de fluorescência com resolução temporal *MicroTime 200* (*PicoQuant*), do Laboratório de Fotobiofísica da FFCLRP – USP.

Os experimentos foram realizados utilizando uma objetiva *Olympus UPlanSApo* de imersão em água com aumento de 60 vezes e abertura numérica de 1,2. Um volume de cerca de 50 μL da solução é colocado sobre uma lamínula de vidro, sendo as medidas feitas 20 μm acima da superfície da lamínula. Para os corantes, as amostras foram excitadas com um laser de 640 nm, com frequência de 40 MHz e potência de excitação de até 50 μW na objetiva. O dicroico utilizado foi o z638rdc e a posição do tubo de lentes foi fixada em 27,0 mm, focando o feixe de emissão no *pinhole* de 50 μm . Para a emissão, foi utilizado um filtro passa banda HQ690/70M. Para os fotoprodutos, o laser de excitação utilizado foi de 530 nm, com frequência de 40 MHz e potência de excitação de até 50 μW na objetiva. O dicroico utilizado foi o z532rdc e a posição do tubo de lentes foi fixada em 28,0 mm, focando o feixe de emissão no *pinhole* de 50 μm . Para a emissão, foi utilizado um filtro passa alta HQ550LP. A detecção foi feita por um detector MPD SPAD com área sensível de 50 μm^2 . Antes de iniciar as medidas, o sistema é realinhado para maximizar a coleta do feixe de emissão através do seu alinhamento no *pinhole* e na área do detector.

4.3 Medidas da cinética de fototransformação do BCD e de seu fotoproduto

Para o estudo da cinética de fototransformação dos BCDs, as amostras, em cubetas de quartzo de 1 cm, foram irradiadas com uma lâmpada de xenônio XBO 75W/2 OFR FS1 – OSRAM acoplada a um filtro com um espectro de transmissão $\lambda \geq 600$ nm. A cubeta com cada amostra era posicionada cerca de 12 cm da fonte de irradiação. Para evitar efeitos de aquecimento da amostra, outra cubeta de quartzo de espessura 1 cm preenchida com água foi posicionada entre a fonte de irradiação e a amostra. Para homogeneizar a amostra durante o experimento, ela foi mantida em constante agitação através de um agitador magnético. Para a irradiação dos fotoprodutos (FPs), foi utilizado um filtro com um espectro de transmissão $\lambda \geq 410$ nm. Abaixo, segue a figura 26, representando as transmissões dos dois filtros, com um exemplo para o BCD180.

Figura 26. Espectro de absorção dos filtros com transmissões: À esquerda, filtro 1: $\lambda \geq 600$ nm e à direita, filtro 2: $\lambda \geq 410$ nm.

A cinética de fotodecomposição foi monitorada através dos espectros de absorção e dos espectros de emissão de fluorescência das amostras em função do tempo da irradiação. Os intervalos de tempo de cada irradiação variaram de acordo com a velocidade de decaimento da banda de absorção. Para a emissão de fluorescência, o comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) utilizado para as bandas principais dos corantes foi de 600 nm. No caso da interação com sistemas biomiméticos, que deslocavam os espectros de absorção para maiores comprimentos de onda, foi utilizado $\lambda_{exc} = 620$ nm. Para a análise da emissão de fluorescência do fotoproduto foi utilizado $\lambda_{exc} = 550$ nm. Em todos os experimentos que envolviam a

irradiação das amostras, as aberturas das fendas de emissão e excitação do espectrofluorímetro foram de 5 e 2,5 nm, respectivamente. Estas aberturas evitavam a influência da lâmpada do espectrofluorímetro na fototransformação das amostras.

Para verificar o efeito do oxigênio molecular, foram preparadas amostras na ausência de oxigênio, obtidas através da inserção de nitrogênio comprimido por aproximadamente 15 minutos, em constante agitação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo, estão apresentados os resultados divididos em seis partes principais: i) estudos dos BCDs em solução tampão; ii) fototransformação dos BCDs em tampão; iii) estudos da interação dos BCDs com SDS; iv) fototransformação dos BCDs na presença de micelas de SDS; v) estudos da interação dos BCDs com DNA e vi) fototransformação dos BCDs na presença de DNA.

5.1 Estudos dos BCDs em tampão PBS

5.1.1 Absorção óptica

A fim de compreender o comportamento dos três BCDs de diferentes estruturas, foram analisados os espectros de absorção óptica em função das concentrações dos corantes em soluções preparadas com tampão PBS.

Os espectros normalizados de absorção óptica do BCD180 em solução tampão se encontram na figura 27 A. O corante apresenta uma banda principal em seu espectro, com pico centrado em 633 nm e um ombro em 597 nm. Na figura 27 B, temos a razão entre as absorbâncias nestes comprimentos de onda (A_{633}/A_{597}) em função da concentração de BCD. Observa-se que o aumento da concentração do corante provoca um aumento relativo da absorção em 597 nm em comparação com a absorção em 633 nm.

Figura 27. A) Espectros de absorção óptica normalizados do BCD180 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorvâncias nos comprimentos de onda de 633 nm e 597 nm em função da concentração de BCD.

O pico em 633 nm está associado com a transição entre o primeiro estado vibracional S_{00} do nível fundamental S_0 e o primeiro nível vibracional S_{10} do primeiro estado excitado singleto S_1 do corante (figura 28). O aumento da absorvância para menores comprimentos de onda indica a formação de agregados H (deslocamento do espectro para o azul), como visto na seção 2.2. Entretanto, em concentrações baixas, o ombro em 597 nm continua presente mostrando que, além da absorção dos agregados, essa absorção pode ser de outra natureza. Associamos essa absorção com a transição entre o nível S_{00} e o segundo nível vibracional S_{11} do estado excitado, que aparece muito próxima da absorção do agregado.

Figura 28. Esquema ilustrativo dos níveis vibracionais dos seguintes estados: estado fundamental S_0 , primeiro estado excitado singlete S_1 e segundo estado excitado singlete S_2 .

Na figura 29 A, seguem os espectros normalizados do BCD150 em tampão PBS e, na figura 29 B, a razão entre as absorbâncias dos picos 624 e 590 nm em função da concentração.

Figura 29. A) Espectros de absorção óptica normalizados do BCD150 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 624 nm e 590 nm em função da concentração de BCD.

O BCD150 apresenta uma banda principal em seu espectro com um pico centrado em 624 nm e um ombro em 590 nm. Há ainda outro pico, de menor absorbância em 505 nm e um ombro em 475 nm.

Semelhante ao BCD180, o pico em 624 nm do BCD150 está associado com a transição entre o estado S_{00} e o nível vibracional S_{10} (figura 28) e o ombro em 590 nm, com a transição entre os níveis S_{00} e S_{11} . O aparecimento de outra banda, de absorção mais baixa, em

505 nm, está relacionado à transição entre o estado S_{00} e o primeiro nível vibracional S_{20} do segundo estado excitado singleto S_2 do corante. O ombro em 475 nm está relacionado à transição entre o estado S_{00} e o segundo nível vibracional S_{21} do estado S_2 . Além disso, a figura 29 B, que mostra a razão entre os picos 624 e 590 nm, indica que há um aumento relativo da banda em 590 nm, mostrando também a formação de agregados H em altas concentrações do corante.

O BCD90 apresenta duas bandas principais de absorbância: uma delas possui um pico em 502 nm, com um ombro em 475 nm e a outra possui um pico em 618 nm, com um ombro em 576 nm. Nas figuras 30 A e 31 A, seguem os espectros de absorção normalizados, respectivamente em, 618 nm e em 502 nm. Ao lado (figuras 30 B e 31 B), seguem as razões entre os picos: A_{618}/A_{576} e A_{502}/A_{475} .

Figura 30. A) Espectros de absorção óptica normalizados em 618 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 618 nm e 576 nm em função da concentração de BCD.

Figura 31. A) Espectros de absorção óptica normalizados em 502 nm do BCD90 em tampão fosfato pH = 6,8 em diferentes concentrações; B) Gráfico da razão entre as absorbâncias nos comprimentos de onda de 502 nm e 475 nm em função da concentração de BCD.

mesma probabilidade de ocorrência. Sendo assim, surgem duas bandas de absorção de mesma intensidade. O pico em 618 nm está associado com a transição entre os níveis S_{00} e S_{10} . Já o ombro em 576 nm, está associado com a transição entre o nível S_{00} e S_{11} . O pico em 502 nm está relacionado à transição entre os níveis S_{00} e S_{20} e o ombro em 475 nm está relacionado à transição entre os níveis S_{00} e S_{21} de S_2 .

A razão entre as absorbâncias dos picos das duas bandas (figuras 30 B e 31 B) mostra um aumento relativo do ombro em 576 nm e do ombro em 475 nm, mostrando também a formação de agregados H em altas concentrações do corante.

5.1.2 Fluorescência estática

Na figura 32, encontram-se os espectros normalizados de emissão de fluorescência estática dos três BCDs em solução tampão PBS. Os espectros apresentam o mesmo perfil, com diferenças nos comprimentos de onda do valor máximo da intensidade de emissão de fluorescência, sendo 633 nm para o BCD90, 640 nm para o BCD150 e 650 nm para o BCD180, todos acompanhados com um ombro na região de 700 até 760 nm.

Figura 32. Espectros de emissão de fluorescência normalizados dos BCDs 90, 150 e 180 em tampão fosfato pH = 6,8, $\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão e excitação: 10,0 nm.

Estes resultados mostram que a emissão de fluorescência de todos os três corantes está associada com as transições $S_{10} \rightarrow S_{00}$ e $S_{10} \rightarrow S_{01}$.

5.1.3 Fluorescência com resolução temporal

Como os tempos de vida do estado S_1 dos corantes em solução tampão são menores que o tempo característico da duração do pulso de excitação do laser do equipamento, não foi possível determiná-los experimentalmente. Segundo a equação 20, $1/\tau_r = \epsilon_{\text{máx}} 10^4 \text{ s}^{-1}$, o tempo radiativo da dissipação da energia do estado S_1 dos corantes deve ser aproximadamente $\tau_r \approx 1/(10^5 \times 10^4) = 10^{-9} \text{ s}$. Isso significa que o tempo de vida do estado S_1 é determinado pelos processos não radiativos de conversão interna e de cruzamento intersistema. Isso pode ocorrer devido à flexibilidade da estrutura das moléculas desses corantes.

5.2 Fototransformação dos BCDs em tampão

5.2.1 Espectros de absorção e de fluorescência e formação de fotoprodutos (na presença de oxigênio)

Nesta seção, vamos mostrar as mudanças nos perfis espectrais, tanto da absorção como da fluorescência, dos BCDs, através da irradiação das amostras com luz visível.

Quando as amostras são irradiadas na região da absorção da banda principal dos corantes (primeira etapa da irradiação), as mudanças dos espectros de absorção se manifestam como uma diminuição da intensidade das bandas principais de absorção e o crescimento de uma nova banda de absorção numa região próxima de 550 nm. Tais mudanças indicam a transformação dos corantes estimulada pela luz - fototransformação ou fotólise - acompanhada pela formação de um fotoproduto (FP). A irradiação na região de absorção do FP (segunda etapa da irradiação) induz a diminuição da intensidade de sua banda de absorção.

A fluorescência foi monitorada levando em conta dois comprimentos de onda de excitação: um deles, sendo $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, para monitorar a fluorescência da banda principal e o outro, sendo $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, para a fluorescência do FP. As aberturas das fendas de emissão e excitação do equipamento foram de 5 e 2,5 nm, respectivamente, para evitar que a lâmpada do espectrofluorímetro também contribuísse para a fototransformação das amostras.

Na figura 33, seguem os espectros de absorção para a primeira etapa de irradiação do BCD180 (1,8 μM) em tampão em função do tempo de irradiação.

Figura 33. Espectros de absorção óptica do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.

Pela figura 33, observamos a fotólise do corante, caracterizada pela diminuição da banda principal centrada em 633 nm, indicada pela seta. Para $t = 115$ minutos, não há mais absorção em 633 nm. Durante a irradiação, foi observado o crescimento de outra banda de absorção, por volta de 554 nm, correspondente ao FP.

A figura 34 mostra os espectros da emissão de fluorescência do BCD180 em função do tempo de irradiação (no início, para $t = 0$, sem irradiar a amostra).

Figura 34. Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação ($\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

Observa-se que esta banda também diminui conforme se aumenta o tempo de irradiação. Em $t = 115$ minutos, já não é possível observar esta banda, indicando que o composto já sofreu total fotólise. Neste caso, os valores baixos da intensidade de fluorescência surgem por causa das aberturas das fendas de emissão e excitação do equipamento.

A figura 35 mostra os espectros de emissão de fluorescência do FP ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$).

Figura 35. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 1,8 μM na presença de O_2 em função do tempo de irradiação de 0 a 50 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

Para $t = 0$, o valor inicial da emissão de fluorescência do FP não é zero, provavelmente porque a amostra pode ter sido iluminada pela luz ambiente ou pela lâmpada do espectrofluorímetro. Verificamos que a intensidade da emissão em 575 nm aumenta com a irradiação até atingir um valor máximo (em $t = 50$ minutos) que é três vezes maior que em $t = 0$. Logo, observamos por esta técnica, que o FP está sendo formado, complementando os resultados obtidos pela técnica de absorção óptica. O fato de a banda principal não apresentar mais absorção em $t = 115$ min e o FP atingir seu valor máximo em 50 minutos indica que ocorrem dois mecanismos simultâneos de fototransformação que serão analisados na seção 5.2.4.1 (análise quantitativa das curvas de decaimento da fotólise).

Após o término da irradiação da banda principal (ou seja, até ela se aproximar de uma absorbância nula), trocamos o filtro acoplado ao irradiador, dando início à segunda etapa de irradiação, agora irradiando a banda do FP. As figuras 36 e 37 mostram os resultados desta outra etapa:

Figura 36. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD180 $1,8 \mu\text{M}$ na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.

Figura 37. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 $1,8 \mu\text{M}$ na presença de O_2 em função do tempo de irradiação de 50 a 295 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, fendas de emissão $5,0 \text{ nm}$ e excitação $2,5 \text{ nm}$).

Pelos espectros de absorção da banda referente ao FP (figura 36), observa-se que este também é transformado sob a ação da luz visível, porém de maneira mais lenta. Embora tenha sido observado pela figura 35 que o máximo da formação do FP (intensidade máxima) ocorre em 50 minutos, optamos por considerar, nas curvas de absorção, apenas o tempo a partir de 115 minutos, uma vez que em 50 minutos ainda havia a contribuição da banda principal do corante. Através dos espectros de emissão de fluorescência (figura 37), verifica-se também que, após a troca do filtro, a intensidade da fluorescência do FP também diminui para quase metade do seu valor inicial durante o tempo de irradiação considerado.

A figura 38 mostra a intensidade do pico de fluorescência (575 nm) em função do tempo de irradiação ao longo de todo o experimento, mostrando o crescimento inicial do FP e, posteriormente, a queda na emissão de fluorescência, caracterizando a fotólise.

Figura 38. Intensidade da emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 $1,8 \mu\text{M}$ em 575 nm em função do tempo de irradiação.

Abaixo, seguem os espectros de absorção óptica (figura 39) e de fluorescência (figuras 40 e 41) da irradiação do BCD150 ($1 \mu\text{M}$).

Figura 39. Espectros de absorção óptica do BCD150 $1 \mu\text{M}$ na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.

Assim como o BCD180, é possível observar pelos espectros de absorção e de emissão de fluorescência a fotólise do corante. Para o BCD150, temos a diminuição da banda principal centrada em 624 nm . Para $t = 125 \text{ minutos}$, a banda em 624 nm não apresenta mais absorção.

Também foi observado o crescimento de outra banda de absorção, no mesmo comprimento de onda que surgiu para o BCD180, por volta de 554 nm, correspondente ao FP.

Na figura 40, referente à emissão de fluorescência do BCD150, verifica-se que o pico em 640 nm diminui conforme se irradia a amostra. Para $t = 125$ minutos, o corante não emite mais fluorescência.

Figura 40. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação ($\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

Na figura 41, referente à emissão de fluorescência do FP (com $\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$) em 575 nm, também é possível observar que a intensidade em 575 nm aumenta com a irradiação até atingir um valor máximo para $t = 100$ minutos. Neste tempo, o FP atinge o seu valor máximo de fluorescência, sendo possível verificar que para 125 minutos, a intensidade não varia mais.

Figura 41. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD150 $1\mu\text{M}$ na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação ($\lambda_{\text{exc}} = 550\text{ nm}$, fendas de emissão $5,0\text{ nm}$ e excitação $2,5\text{ nm}$).

Nas figuras 42 e 43, seguem os resultados da segunda etapa de irradiação do BCD150, após a troca do filtro do irradiador.

Figura 42. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD150 $1\mu\text{M}$ na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação.

Figura 43. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD150 1 μM na presença de O_2 em função do tempo de irradiação de 125 a 595 minutos ($\lambda_{\text{exc}} = 550 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

De acordo com esses resultados, com a troca de filtro, a banda de absorção em 554 nm, referente ao FP, assim como a banda de emissão de fluorescência em 575 nm, também diminuem com o tempo de irradiação.

O BCD90 apresenta o mesmo comportamento que os outros corantes. Neste caso, optamos por apresentar apenas alguns resultados para a concentração 1 μM . Na figura 44 A, temos os espectros de absorção e na figura 44 B, os de emissão de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$) para a primeira etapa de irradiação.

Figura 44. Espectros do BCD90 1 μM na presença de O_2 , em função do tempo de irradiação, primeira etapa de irradiação: A) de absorção óptica; B) de emissão de fluorescência normalizada ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

Da mesma maneira, o BCD90 sofre fotólise, como pode ser visto na figura 44 A, pela queda de absorção em 618 nm e em 502 nm. Simultaneamente à diminuição da banda principal, ocorre o crescimento de uma banda em 554 nm (FP). Este FP foi monitorado pela sua emissão de fluorescência (figura 44 B), sendo possível observar o aumento de sua intensidade de fluorescência atingindo o seu valor máximo em 118 minutos.

Nas figuras 45 A e 45 B, seguem os espectros de absorção e de emissão após a troca do filtro (segunda etapa), respectivamente.

Figura 45. Espectros do fotoproduto do BCD90 1 μ M na presença de O₂, em função do tempo de irradiação, segunda etapa de irradiação: A) de absorção óptica; B) de emissão de fluorescência normalizada ($\lambda_{exc} = 530$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

O FP do BCD90 também sofre fotólise, como pode ser visto tanto pela queda na absorção em 554 nm com o aumento do tempo de irradiação, assim como na queda da intensidade de fluorescência em 575 nm.

5.2.2 Análises dos espectros dos fotoprodutos

Comparando os espectros de absorção (figura 46) e de emissão da fluorescência (figura 47) dos FPs, observamos que, para todos os três corantes, eles apresentam o mesmo perfil espectral, o que indica que a fototransformação de todos os BCDs finaliza na formação de FPs com a mesma estrutura de cromóforo.

Figura 46. Espectros de absorção dos três fotoprodutos.

Figura 47. Espectros de emissão de fluorescência dos três fotoprodutos ($\lambda_{exc} = 530 \text{ nm}$, para os BCD 90 e 180 e $\lambda_{exc} = 550 \text{ nm}$, para o BCD150).

Abaixo, temos os decaimentos da intensidade de fluorescência dos FP obtidos pela técnica de fluorescência com resolução temporal.

Figura 48. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD180 em tampão fosfato, $pH = 6,8$, $\lambda_{exc} = 530$ nm.

Figura 49. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD150 em tampão fosfato, $pH = 6,8$, $\lambda_{exc} = 530$ nm.

Figura 50. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD90 em tampão fosfato, $pH = 6,8$, $\lambda_{exc} = 530 \text{ nm}$.

Os ajustes das curvas de decaimento mostraram caráter tri-exponencial e os valores dos tempos de vida de fluorescência se encontram na tabela 1.

Tabela 1. Valores médios obtidos pelo ajuste tri-exponencial do decaimento da intensidade de fluorescência dos FPs dos três corantes (tempo de vida τ_i e fator pré-exponencial normalizado A_i).

FP do BCD	$\tau_1(\text{ns})$	A_1	$\tau_2(\text{ns})$	A_2	$\tau_3(\text{ns})$	A_3
180	$2,2 \pm 0,2$	$0,12 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,01$	$0,076 \pm 0,05$	$0,162 \pm 0,006$
150	$2,1 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,01$	$0,57 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0,03$	$0,62 \pm 0,01$
90	$1,3 \pm 0,5$	$0,07 \pm 0,03$	$0,42 \pm 0,01$	$0,42 \pm 0,02$	$0,12 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,02$

Os valores de τ_3 são próximos do tempo característico do pulso do laser de excitação e, provavelmente, estão associados com o decaimento da intensidade da luz espalhada. Os tempos τ_1 e τ_2 provavelmente estão associados com a fluorescência de duas formas isoméricas dos FP, cuja contribuição deve depender da estrutura do corante.

As mudanças espectrais, tanto do corante quanto do seu FP, podem ser explicadas da seguinte maneira: a igualdade dos espectros de absorção e de fluorescência dos FPs dos três corantes mostra que as estruturas de seus cromóforos são semelhantes. Os espectros de absorção dos FPs se localizam entre as bandas de absorção das transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$ dos corantes BCD150 e BCD90 onde, segundo a teoria deve se localizar a banda de absorção de

um cromóforo isolado. Por outro lado, os espectros dos BCDs são definidos pelos espectros de dois cromóforos que interagem entre si como dois dipolos (interação dipolo-dipolo) e pelo tunelamento de elétron através do heterociclo central da molécula (61). A irradiação, de alguma maneira, impede a interação entre os cromóforos fazendo com que o espectro de absorção se torne igual ao daquele de um cromóforo isolado. Pode-se imaginar que a irradiação provoca mudança na estrutura do heterociclo central diminuindo a probabilidade de tunelamento entre os cromóforos. Entretanto, nesse caso a interação dipolo-dipolo continua. Essa interação é diferente para os três corantes, pois depende da distância entre os cromóforos que diminui conforme diminui o ângulo entre eles. Por isso, os espectros dos FPs deveriam ser diferentes. O mais adequado é imaginar que, na primeira etapa, ocorre a destruição do sistema de conjugação π , inicialmente de um cromóforo, que desloca o espectro de absorção para o do segundo cromóforo já sem interação com o primeiro. Posteriormente, a irradiação do FP produz a destruição do sistema de conjugação π do segundo cromóforo, observada pela diminuição da absorção óptica em 554 nm e diminuição da intensidade de fluorescência em 575 nm. O aumento do tempo de vida do estado S_1 do FP em comparação com os BCDs está, provavelmente, associado com a diminuição da flexibilidade do cromóforo (fluoróforo) devido à mudança da estrutura da molécula.

5.2.3 Espectros de absorção e formação de fotoprodutos (na ausência de oxigênio)

Para verificar o papel do oxigênio molecular no processo de fotólise, foi retirado o oxigênio (através da inserção de nitrogênio comprimido) das cubetas em que se encontravam as amostras e, em seguida, foi iniciada a irradiação.

O efeito observado para os três corantes foi o mesmo ao observado na presença do oxigênio; somente o tempo característico de fototransformação na ausência de oxigênio foi mais longo. Isso mostra um papel importante do oxigênio no processo da fototransformação dos BCDs.

Na figura 51, mostramos como exemplo os espectros de absorção da irradiação do BCD180 (10,5 μM) e do seu FP (figura 52) na ausência de oxigênio.

Figura 51. Espectros de absorção óptica do BCD180 10,5 μM em tampão, $\text{pH} = 6,8$, na ausência de O_2 , em função do tempo de irradiação.

Figura 52. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD180 10,5 μM em tampão, $\text{pH} = 6,8$, na ausência de O_2 , em função do tempo de irradiação.

Na seção 5.2.4 será apresentada a análise mais detalhada da dinâmica do processo de fototransformação dos BCDs tanto na presença quanto na ausência do oxigênio.

5.2.4 Dinâmica de fototransformação

5.2.4.1 Análise quantitativa das curvas de decaimento

Com a finalidade de verificar o efeito da concentração de BCD na dinâmica dos processos, foram estudadas amostras em diferentes concentrações, tanto na presença como na ausência de oxigênio. A análise de curvas de decaimento para todos os casos de fotodecomposição dos corantes mostrou caráter monoexponencial, seguindo a equação:

$$A = A_0 e^{-t/\tau} \quad (27)$$

em que A é a absorbância da solução em função do tempo, A_0 é a absorbância inicial, t é o tempo de irradiação e τ é o tempo característico de decaimento da absorção.

Sabendo-se que a absorbância está relacionada com a concentração do composto C , com o coeficiente de absorção molar ε e com o caminho óptico l , por $A = \varepsilon Cl$, substituindo a mesma por $[BCD]$ na equação que descreve as curvas, teremos:

$$\varepsilon[BCD]l = \varepsilon[BCD_0]l e^{-t/\tau} \quad (28)$$

Assim, obtemos a equação (29) escrita em função da concentração do corante:

$$[BCD] = [BCD_0] e^{-t/\tau} \quad (29)$$

Derivando-se a equação (29) em relação ao tempo, obtemos:

$$V = \frac{d[BCD]}{dt} = -\frac{[BCD_0]}{\tau} e^{-t/\tau} \quad (30)$$

em que V é a velocidade de fototransformação. A velocidade inicial da fotólise (com $t = 0$) é dada por:

$$V_0 = -\frac{[BCD_0]}{\tau} \quad (31)$$

Assim a velocidade inicial de fototransformação depende da concentração inicial do corante. Entretanto, a razão entre a velocidade inicial de fototransformação do corante em relação à concentração inicial do mesmo corresponde uma taxa que não depende da concentração inicial:

$$\frac{V_0}{[BCD_0]} = \frac{1}{\tau} = k \quad (32)$$

em que τ e k são, respectivamente, o tempo característico e a taxa característica de velocidade da fotólise para dadas condições experimentais (intensidade e espectro da irradiação, temperatura, etc.).

5.2.4.2 Curvas de decaimento dos BCDs na presença e na ausência de oxigênio

Nas figuras 53 e 54, temos as curvas de decaimento da absorbância normalizada no pico de 633 nm do BCD180 em função do tempo de irradiação para diferentes concentrações na presença e na ausência de oxigênio, respectivamente.

Figura 53. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 633$ nm do monômero do BCD180 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Figura 54. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 633 \text{ nm}$ do monômero do BCD 180 em tampão, $\text{pH} = 6,8$, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Na tabela 2, são apresentados os tempos característicos da velocidade da fotólise do BCD180 para diferentes concentrações, na presença e na ausência de oxigênio.

Tabela 2. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise (τ) em minutos do BCD180 em tampão (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

τ (minutos) do BCD180 em tampão		
[BCD180] (μM)	Presença de O_2	Ausência de O_2
0,8	$5,1 \pm 0,3$	-
1,0	$7,2 \pm 0,8$	-
1,5	$9,6 \pm 0,4$	37 ± 2
2,0	17 ± 1	-
3,0	$20,0 \pm 0,6$	74 ± 3
4,5	40 ± 1	87 ± 3
7,5	51 ± 2	173 ± 7
10,0	57 ± 2	269 ± 3

Resultados semelhantes foram obtidos para o BCD150 e o BCD90. Para o BCD150, temos na figura 55, as curvas de decaimento na presença de oxigênio e na figura 56, na ausência.

Figura 55. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 624$ nm do monômero do BCD150 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Figura 56. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 624$ nm do monômero do BCD150 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Na tabela 3, encontram-se os tempos da fotólise do BCD150.

Tabela 3. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise (τ) em minutos do BCD150 em tampão (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

τ (minutos) do BCD150 em tampão		
[BCD150] (μM)	Presença de O_2	Ausência de O_2
1,5	$23,9 \pm 0,4$	-
3,0	$30,1 \pm 2,2$	196 ± 20
4,4	$34,3 \pm 2,0$	290 ± 37
7,4	$56,8 \pm 1,1$	360 ± 14
10,0	108 ± 7	399 ± 38

Nas figuras 57 e 58 seguem os resultados para o BCD90.

Figura 57. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 618 \text{ nm}$ do monômero do BCD90 em tampão, $\text{pH} = 6,8$, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Figura 58. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 618 \text{ nm}$ do monômero do BCD90 em tampão, $\text{pH} = 6,8$, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Tabela 4. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise (τ) em minutos do BCD90 em tampão (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

τ (minutos) do BCD90 em tampão		
[BCD90] (μM)	Presença de O_2	Ausência de O_2
1,0	$12,3 \pm 0,8$	149 ± 15
1,5	$41,9 \pm 1,9$	-
2,5	104 ± 27	222 ± 7
7,5	169 ± 22	299 ± 42

Os valores de τ para todos os três corantes aumentam com o aumento da concentração do corante. Estes valores mostram a influência da agregação no processo de fotodecomposição. Os agregados não sofrem fotólise; por outro lado, eles servem de fontes adicionais de monômeros, alterando o processo em si.

O efeito da agregação na velocidade de fotodecomposição pode ser explicado pelo seguinte esquema:

e para o FP:

De acordo com as tabelas 2, 3 e 4, os tempos dos experimentos realizados na ausência de oxigênio são todos maiores que os tempos na presença do mesmo. O efeito do oxigênio provavelmente está associado com a formação do oxigênio singleto que quebra as ligações duplas dos cromóforos dos BCDs, destruindo o seu sistema de conjugação π . O cálculo teórico, realizado pelo Dr. Fabio Antônio Schaberle em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio Emanuel Galembeck, mostrou que a ligação do oxigênio molecular com um cromóforo, destruindo uma das ligações duplas, transforma o espectro do BCD num espectro de um monômero isolado, ao passo que sua ligação com o heterociclo central da molécula não possui tal efeito (ANEXO A).

O oxigênio singleto é formado pela transferência da energia da molécula do corante em seu estado tripleto para a molécula do oxigênio. Nesse caso a velocidade de fotodecomposição deve depender do rendimento quântico do estado tripleto (ϕ_T) do corante.

Na tabela 5, seguem dados comparativos dos valores dos tempos característicos de fotodecomposição dos três corantes nas mesmas concentrações e os valores de ϕ_T determinado em iso-propanol (84) .

Tabela 5. Valores dos tempos característicos da fotólise (τ) em minutos nas mesmas concentrações, na presença de oxigênio molecular, e rendimentos quânticos do estado tripleto (ϕ_T) dos três corantes em tampão.

τ (minutos) dos BCDs em tampão (na presença de O₂)			
Concentrações (μM)	BCD180	BCD150	BCD90
1,5	9,6 $\pm$ 0,4	23,9 $\pm$ 0,4	41,9 $\pm$ 1,9
7,5	51 $\pm$ 2	56,8 $\pm$ 1,1	169 $\pm$ 22
ϕ_T	0,22 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,02

Pode se observar que, quanto maior o ϕ_T , maior é a velocidade de fotodecomposição do corante (ou seja, menores são os tempos τ).

Para complementar estes resultados, o ideal seria realizar um experimento que confirmasse a formação de oxigênio singleto pela sua fosforescência como foi feito no caso do Acridina Laranja (85); porém, nesta etapa não foi possível, devido à manutenção do equipamento.

5.2.4.3 Curvas de decaimento dos fotoprodutos dos corantes na presença e na ausência de oxigênio

Nesta seção, apresentamos as curvas de decaimento e tempos característicos da fotólise para a irradiação da banda referente ao FP. Para o FP, as curvas de decaimento foram também normalizadas. Além disso, foram considerados $t = 0$ a partir da troca do filtro, para efeito de comparação das diferentes concentrações.

Abaixo, seguem os decaimentos do FP do BCD180, na presença (figura 59) e na ausência (figura 60) de oxigênio.

Figura 59. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD180 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Figura 60. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD180 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Tabela 6. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise (τ) do fotoproduto do BCD180 em tampão (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

τ (minutos) do FP do BCD180 em tampão		
[BCD180] (μM)	Presença de O_2	Ausência de O_2
3,0	121 ± 8	304 ± 28
7,5	123 ± 3	330 ± 41
10,0	122 ± 5	284 ± 53

Pela tabela 6, observa-se que para o FP do BCD180, os tempos característicos da fotólise são os mesmos. Isto indica que, para a fototransformação do FP, não há dependência com a concentração.

Os tempos relacionados aos FPs do BCD180 na ausência de oxigênio também apresentam os mesmos valores (considerando os desvios). Além disso, estes são maiores que os tempos na presença de oxigênio, indicando novamente o papel do oxigênio molecular.

Os tempos de fototransformação dos FPs de BCD150 e BCD90 são semelhantes aos do BCD180 tanto na presença como na ausência do oxigênio (figuras 61 a 64, tabelas 7 e 8).

Figura 61. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554 \text{ nm}$ do fotoproduto do BCD150 em tampão, $\text{pH} = 6,8$, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Figura 62. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554 \text{ nm}$ do fotoproduto do BCD150 em tampão, $\text{pH} = 6,8$, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Tabela 7. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise (τ) do fotoproduto do BCD150 em tampão (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

τ (minutos) do FP do BCD150 em tampão		
[BCD150] (μM)	Presença de O_2	Ausência de O_2
1,5	213 ± 29	$60,5 \pm 5,6$
3,0	77 ± 10	159 ± 33
4,4	103 ± 29	163 ± 13
7,4	144 ± 11	239 ± 24
10,0	236 ± 27	205 ± 23

Figura 63. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD90 em tampão, pH = 6,8, na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Figura 64. Decaimento da absorbância normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD90 em tampão, pH = 6,8, na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Tabela 8. Valores das concentrações iniciais e dos tempos característicos da fotólise (τ) do fotoproduto do BCD90 em tampão (na presença e na ausência de oxigênio molecular).

τ (minutos) do FP do BCD90 em tampão		
[BCD90] (μ M)	Presença de O_2	Ausência de O_2
1,0	264 ± 200	290 ± 40

2,5	139 ± 37	475 ± 267
7,5	120 ± 14	475 ± 110

A ausência do efeito da concentração está associada provavelmente com a diminuição da probabilidade de agregação do FP em comparação com o próprio corante. A destruição do sistema de conjugação π de um cromóforo diminui a hidrofobicidade da molécula. Por isso, o FP possui menor tendência de se agregar e, assim, o efeito da sua concentração no tempo de fototransformação é menor do que para a molécula original.

Conforme anteriormente, o aumento da velocidade de fototransformação dos BCDs na presença de O_2 está associado à formação de oxigênio singleto. Essa suposição pode explicar o maior tempo de fototransformação do FP em comparação com o corante original. Sabe-se que o rendimento quântico do estado tripleto de corantes cianicos com um cromóforo é extremamente baixo devido a sua fotoisomerização (processo que é de baixa probabilidade para as biscianinas (84)). Por isso, a formação de oxigênio singleto para o FP deve ser muito menor e, conseqüentemente, o tempo da sua fototransformação deve ser maior.

5.3 Estudos dos BCDs na presença de SDS

5.3.1 Absorção óptica

Abaixo, encontram-se os espectros de absorção óptica do BCD180 em função da concentração de SDS (figura 65).

Figura 65. Espectros de absorção da interação do BCD180 2,3 μM com SDS em diferentes concentrações.

Inicialmente, temos o espectro característico do BCD180 em tampão, sem SDS, com o máximo de absorção em 633 nm. Com o acréscimo de SDS em pequenas concentrações, observa-se o deslocamento deste pico para 641 nm e, por outro lado, o pico relacionado aos agregados (597 nm) desloca-se para 594 nm. Analisando as absorbâncias respectivas de cada pico (figura 66), notamos que a razão de absorbâncias A_{641}/A_{594} diminui na concentração 0,2 mM, e logo aumenta com o acréscimo de SDS; em uma determinada concentração, ela atinge um grau de saturação (por volta de 5 e 6 mM de SDS) e tende a permanecer constante para altas concentrações do surfactante. Sabe-se que a CMC do SDS para soluções aquosas é 8,3 mM e este valor tende a diminuir na presença de tampão. Além disso, o BCD também pode alterar este valor. Dessa forma, a CMC do sistema BCD-micela é por volta de 5 mM. Podemos dizer que o SDS em baixas concentrações estimula a agregação do corante, provavelmente na forma de agregados mistos “corante+surfactante”; com o aumento de concentração de SDS o corante começa se desagregar até atingir um grau de saturação no qual finalmente ocorre a formação de monômeros de corante ligados a micelas.

Figura 66. Razões entre as absorvâncias dos picos 641 e 594 nm obtidos pela interação do BCD180 2,3 μM com SDS em diferentes concentrações.

Na figura 67, seguem os espectros de absorção do BCD150 com o acréscimo de SDS.

Figura 67. Espectros de absorção da interação do BCD150 1,0 μM com SDS em diferentes concentrações.

Observamos um processo semelhante ao que já foi visto com o BCD180: ocorre deslocamento da banda principal para maiores comprimentos de onda; porém, neste caso,

houve pouca mudança no deslocamento do pico em 590 nm, apenas para as últimas concentrações de SDS 5,0 e 10,0 mM nas quais os picos deslocaram muito pouco para 587 nm. Além disso, a banda em 505 nm que sem SDS apresentava pouca intensidade, agora com o surfactante mostra um valor maior de absorção. Isso significa que a ligação com as micelas diminui o ângulo entre os cromóforos do corante ou desloca o equilíbrio entre os isômeros para outra forma isomérica. Na parte teórica, foi visto que o ângulo entre os cromóforos pode ser calculado a partir dos dados experimentais por:

$$\cos \theta = \frac{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2} - 1}{\frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2} + 1}$$

em que λ_1 , ε_1 , λ_2 e ε_2 referem-se às duas bandas de absorção.

Para o BCD150 na presença de SDS, temos os máximos das bandas de absorção em 512 nm e 632 nm. Assim:

$$\cos \theta = \frac{\frac{\lambda_{512} \varepsilon_{512}}{\lambda_{632} \varepsilon_{632}} - 1}{\frac{\lambda_{512} \varepsilon_{512}}{\lambda_{632} \varepsilon_{632}} + 1} \quad (33)$$

Sendo ε proporcional à absorbância A , pela Lei de Lambert-Beer, utilizando os valores das absorbâncias de cada pico, obtivemos:

$$\cos \theta = -0,64, \quad \text{com } \theta = 130^\circ$$

Tal resultado mostra que a interação com o surfactante de fato diminui o ângulo entre os cromóforos de 150° para 130° .

Observando a figura 68, também podemos dizer que a adição de baixas concentrações de SDS induz à agregação do corante que, logo se desagrega, quando o SDS é adicionado. Por volta de 5 mM, a razão permanece a mesma até 20 mM.

Figura 68. Razões entre as absorvâncias dos picos 632 e 590 nm obtidos pela interação do BCD150 1,0 μM com SDS em diferentes concentrações.

Na figura 69, temos os espectros de absorção do BCD90 na presença de SDS.

Figura 69. Espectros de absorção da interação do BCD90 0,7 μM com SDS em diferentes concentrações.

Para o BCD90, com o acréscimo de SDS em pequenas concentrações, observa-se o deslocamento do pico em 618 nm para 628 nm, assim como o ombro em 574 nm se desloca

para 581 nm. O mesmo efeito ocorre para a outra banda, com deslocamento do pico em 502 nm e do ombro em 475 nm, ambos para maiores comprimentos de onda.

Para o BCD90 na presença de SDS, temos os máximos das bandas de absorção em 511 nm e 628 nm. Assim:

$$\cos \theta = \frac{\frac{\lambda_{511}\epsilon_{511}}{\lambda_{628}\epsilon_{628}} - 1}{\frac{\lambda_{511}\epsilon_{511}}{\lambda_{628}\epsilon_{628}} + 1} \quad (34)$$

$$\cos \theta = -0,05, \quad \text{com } \theta = 93^\circ$$

Neste caso do BCD90, a interação com SDS praticamente não altera o ângulo entre os cromóforos.

Ao analisar as absorbâncias respectivas de cada pico (figura 70), notamos que a razão de absorbâncias A_{628}/A_{581} diminui para 0,2 mM, indicando a agregação do corante. Com o acréscimo de SDS, esta razão aumenta, indicando o processo de desagregação; assim como os outros corantes, por volta de 5 a 6 mM de SDS, a razão permanece constante e tal efeito se mantém para altas concentrações do surfactante, indicando a formação da forma monomérica ligada às micelas de SDS.

Figura 70. Razões entre as absorbâncias dos picos 628 e 581 nm obtidos pela interação do BCD90 0,7 μ M com SDS em diferentes concentrações.

Analisando as dependências apresentadas nas figuras 66, 68 e 70, podemos constatar que nas concentrações de SDS nas quais se observa tanto o máximo de agregação dos

corantes (0,2 mM) assim como sua desagregação completa (≈ 5 mM) são independentes da estrutura do corante.

5.3.2 Fluorescência estática

Na figura 71, encontram-se os espectros de emissão do BCD180 a 2,3 μM em tampão e também na presença de SDS e, na figura 72, os gráficos da intensidade de fluorescência em função da concentração de SDS. Para obter os gráficos da intensidade de fluorescência em função da concentração de SDS, os espectros de emissão de fluorescência foram corrigidos levando em conta as mudanças de absorção do BCD com a mudança de concentração do SDS. Para isto, utilizamos a seguinte expressão:

$$I_{\text{corrig}} = I_{\text{fluo}} \frac{Abs_{[SDS]=0}}{Abs_{[SDS]}} \quad (35)$$

em que I_{corrig} corresponde à intensidade de fluorescência corrigida, I_{fluo} representa a intensidade de fluorescência experimental, $Abs_{[SDS]=0}$ representa o valor da absorbância no comprimento de onda de excitação (600 nm) sem a adição de SDS e $Abs_{[SDS]}$ representa o valor da absorbância neste mesmo comprimento de onda, com o valor respectivo da concentração de SDS (ao invés de ser utilizada a intensidade de fluorescência, optamos por usar o valor da integral sobre as curvas do espectro de emissão).

Figura 71. Espectros de emissão de fluorescência da interação do BCD180 $2,3 \mu\text{M}$ com SDS, $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, fendas de emissão e excitação 10 nm.

Figura 72. Intensidade corrigida de fluorescência do BCD180 $2,3 \mu\text{M}$ devido à mudança do espectro de emissão do corante em função da concentração de SDS.

O acréscimo de baixa concentração de SDS provoca alterações no perfil do espectro, deslocando o pico de intensidade para comprimentos de onda maiores, com redução na intensidade de fluorescência; com o aumento da concentração de SDS, há um aumento na

intensidade que se satura para a concentração por volta de 5 e 6 mM de SDS (a mesma encontrada na análise dos espectros de absorção), indicando a partir daí, a forma monomérica ligada às micelas de SDS. Verifica-se através destes espectros que a forma monomérica ligada às micelas de SDS apresenta uma intensidade de fluorescência que chega a ser vinte vezes maior do que o corante na ausência de SDS.

Mesmos efeitos foram observados para o BCD150 (neste caso, o experimento foi feito apenas para 0 e 20 mM de SDS, figura 73) e para o BCD 90 (figuras 74 e 75).

Figura 73. Espectros de emissão de fluorescência da interação do BCD150 $1,4 \mu\text{M}$ com SDS, $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, fendas de emissão 5 nm e excitação $2,5 \text{ nm}$.

Figura 74. Espectros de emissão de fluorescência da interação do BCD90 0,7 μM com SDS, $\lambda_{\text{exc}} = 600 \text{ nm}$, fendas de emissão e excitação 10 nm.

Figura 75. Intensidade corrigida de fluorescência do BCD90 0,7 μM com devido à mudança do espectro de emissão do corante em função da concentração de SDS.

Através dos valores dos rendimentos quânticos de fluorescência em água (81) dos BCDs, é possível calcular o rendimento quântico na presença de SDS através da expressão:

$$\varphi_{fl\text{ SDS}} = \varphi_{fl\text{ água}} \frac{I_{SDS}}{I_{\text{água}}} \quad (36)$$

em que $\phi_{fl\ SDS}$ e $\phi_{fl\ água}$ correspondem aos rendimentos quânticos na presença de SDS e na presença de água, respectivamente, e I_{SDS} e $I_{água}$ são as integrais sob as curvas de intensidade de fluorescência em SDS e em água.

Tabela 9. Valores das integrais sob as curvas das intensidades de fluorescência para os três corantes em água e na presença de 20 mM de SDS, rendimentos quânticos em água e na presença de SDS (calculados).

	$I_{água}$	$I_{SDS\ 20\ mM}$	$\phi_{fl\ água}$	$\phi_{fl\ SDS}$
BCD180	3290	44550	0,018	0,24
BCD150	26	814	0,010	0,31
BCD90	394	11309	0,002	0,06

A partir de todos esses resultados, podemos concluir que a interação com as micelas aumenta drasticamente o rendimento quântico da fluorescência dos BCDs, provavelmente devido a maior rigidez do ambiente micelar (sistema corante-micelas) em comparação ao corante em solução em tampão.

5.3.3 Fluorescência com resolução temporal

As curvas de decaimento da fluorescência para BCD180 em concentração 2,3 μM em função da concentração de SDS estão mostradas na Figura 76.

Pelos ajustes dos decaimentos, nota-se que há duas componentes de tempo até determinada concentração (0,6 μM). Com o acréscimo de concentrações de SDS (0,2 mM a 0,6 mM) há um aumento nos fatores pré-exponenciais A_2 de contribuição da componente de tempo mais curto. A partir de 1 mM, há apenas uma componente temporal. Estes tempos aumentam até um valor de aproximadamente 0,40 ns e não se alteram mais até 20 mM.

Figura 76. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD180 na presença de SDS em diferentes concentrações, $\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$.

Os tempos característicos de decaimento estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Tempos de vida e fatores pré-exponenciais normalizados da cinética de decaimento da fluorescência do BCD180 $2,3 \mu\text{M}$ em função da concentração de SDS.

BCD180 + [SDS] (mM)	$\tau_1(\text{ns})$	A_1	$\tau_2(\text{ns})$	A_2
0,2	$1,07 \pm 0,09$	$0,14 \pm 0,02$	$0,232 \pm 0,005$	$0,98 \pm 0,02$
0,6	$1,30 \pm 0,5$	$0,06 \pm 0,02$	$0,275 \pm 0,007$	$1,07 \pm 0,02$
1	-	-	$0,303 \pm 0,003$	$1,150 \pm 0,007$
2	-	-	$0,322 \pm 0,002$	$1,095 \pm 0,003$
3	-	-	$0,364 \pm 0,002$	$1,099 \pm 0,004$
4,5	-	-	$0,395 \pm 0,002$	$1,116 \pm 0,004$
5	-	-	$0,403 \pm 0,003$	$1,118 \pm 0,004$
6	-	-	$0,410 \pm 0,003$	$1,122 \pm 0,005$
8	-	-	$0,414 \pm 0,003$	$1,129 \pm 0,005$
12	-	-	$0,417 \pm 0,003$	$1,127 \pm 0,005$
20	-	-	$0,421 \pm 0,003$	$1,130 \pm 0,005$

Tais resultados podem ser explicados da seguinte maneira:

- i) o acréscimo de baixas concentrações de SDS estimula a agregação do corante. Sabe-se que os agregados induzem à redução dos rendimentos quânticos da fluorescência. Por isso na presença de baixas concentrações de SDS observamos diminuição da intensidade da fluorescência;
- ii) entretanto, é possível haver formação de agregados pré-micelares de SDS, nas quais as moléculas de corantes são separadas, sem formar o agregado. As moléculas de corantes nesses agregados pré-micelares são caracterizadas por um tempo de vida da fluorescência mais longo;
- iii) para concentrações mais altas, a partir de 4,5 mM, o corante se liga ao SDS estimulando a formação de micelas e mantém o mesmo valor de tempo (0,4 ns) até 20 mM.

Estas observações justificam o fato de o corante se ligar fortemente ao SDS e, a partir da CMC, formar uma espécie mais estável (corante ligado à micela), cujo tempo é maior e não se altera mais. Isto ocorre, pois esta espécie é mais rígida do que o corante apenas em tampão, assim como foi visto para a fluorescência estática.

Na figura 77, temos os decaimentos da fluorescência do BCD90 na presença de SDS.

Figura 77. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD90 na presença de SDS em diferentes concentrações, $\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$.

Tabela 11. Tempos de vida e fatores pré-exponenciais normalizados da cinética de decaimento da fluorescência do BCD90 em função da concentração de SDS.

BCD90 + [SDS] (mM)	τ_1 (ns)	A_1	τ_2 (ns)	A_2
0,2	$0,95 \pm 0,02$	$0,174 \pm 0,006$	$0,181 \pm 0,002$	$1,19 \pm 0,01$
2	$1,0 \pm 0,4$	$0,05 \pm 0,02$	$0,235 \pm 0,007$	$0,90 \pm 0,02$
3	-	-	$0,262 \pm 0,001$	$0,977 \pm 0,003$
4	-	-	$0,304 \pm 0,001$	$1,018 \pm 0,003$
5	-	-	$0,298 \pm 0,001$	$1,05 \pm 0,003$
7	-	-	$0,305 \pm 0,001$	$0,995 \pm 0,002$
10	-	-	$0,36 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,3$

Para o BCD90, ocorrem efeitos semelhantes aos observados para o BCD180: a adição de 0,2 mM de SDS estimula a agregação do corante, reduzindo a intensidade da fluorescência e paralelamente, ocorre a formação agregados pré-micelares com moléculas de corante não agregadas que possuem tempo de vida da fluorescência maior. Para concentrações mais altas, o decaimento é monoexponencial. Para 10 mM de SDS, o tempo de 0,36 ns apresenta um erro maior devido às baixas contagens, como pode ser visto pela figura 77 (que não foi normalizada).

Tanto para o BCD90 quanto para o BCD180, a existência de uma única componente temporal para 20 mM de SDS indica que a interação do corante com as micelas está relacionada a uma única forma isomérica do BCD.

5.4 Fototransformação dos BCDs na presença de micelas de SDS

5.4.1 Espectros de absorção e fluorescência e formação de fotoprodutos

Assim como foi feito em tampão, para cada corante, obtivemos os espectros de absorção e de emissão de fluorescência para as duas etapas de irradiação: da banda principal e

do FP formado. Para estes experimentos, foi utilizada a concentração de 20 mM de SDS a fim de garantir a formação das micelas.

Na figura 78 a seguir, seguem os espectros de absorção do BCD180 na presença de micelas (SDS 20 mM) em função do tempo de irradiação. Nesta seção, estão apresentados os resultados dos experimentos realizados na presença de oxigênio.

Figura 78. Espectros de absorção óptica do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

O corante ligado às micelas sofre fotólise, como indica a queda da absorbância em 641 nm e há o surgimento da banda relacionada ao FP que, neste caso, está centrada em 564 nm. Neste experimento e em todos os outros de concentração mais alta de corante houve a formação de um ponto isobéstico entre a banda principal e a banda do FP. Isto indica a participação de apenas duas espécies no processo de fototransformação. Sabendo que, para 20 mM, o corante se encontra na forma monomérica ligada às micelas, podemos concluir que as duas espécies envolvidas são: única forma isomérica dos monômeros ligados às micelas e um único FP. Este resultado confirma a conclusão obtida da análise das curvas de decaimento da fluorescência: a interação com as micelas desloca o equilíbrio entre as formas isoméricas do corante priorizando uma única forma isomérica.

A curva de decaimento da absorção óptica durante a fotólise tem caráter monoexponencial (figura 79).

Figura 79. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 641$ nm do BCD 180 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Na figura abaixo, é possível verificar o crescimento do FP em função do tempo de irradiação.

Figura 80. Absorbância em 564 nm correspondente ao fotoproduto do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Pela figura acima, é possível verificar que o FP que apresenta seu máximo de absorção por volta de 660 minutos.

Na figura 81 A, encontram-se os espectros de emissão de fluorescência, com $\lambda_{exc} = 600$ nm, para o mesmo experimento, em função do tempo de irradiação. Na figura 81 B, consta a intensidade no pico de emissão em 655 nm.

Figura 81. A) Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 600 \text{ nm}$, fendas de emissão $5,0 \text{ nm}$ e excitação $2,5 \text{ nm}$), na presença de oxigênio; B) Intensidade de fluorescência em 655 nm em função do tempo de irradiação.

Pelos espectros de emissão de fluorescência, também foi observada a diminuição da intensidade de fluorescência da banda de emissão em 655 nm , com o aumento do tempo de irradiação. Simultaneamente ao processo de queda da banda principal ocorre o crescimento da banda referente ao FP. Tal efeito pode ser visto na figura 82 A, na qual a banda de emissão do FP tem seu máximo por volta de 575 nm e se desloca, aumentando sua intensidade, com o aumento do tempo de irradiação para 580 nm . Na figura 82 B, é possível ver, assim como foi visto pelos espectros de absorção, que o FP atinge valor máximo de fluorescência em 660 minutos .

Figura 82. A) Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm); B) Intensidade de fluorescência em 580 nm em função do tempo de irradiação.

Após a etapa de irradiação da banda principal, trocamos o filtro para irradiar o FP gerado e, assim, obtivemos os seguintes espectros de absorção em função do tempo de irradiação (figura 83).

Figura 83. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.

Abaixo, segue o decaimento do pico em 564 nm, indicando um comportamento monoexponencial.

Figura 84. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 564$ nm do fotoproduto do BCD 180 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Na figura 85, seguem os espectros de emissão de fluorescência, com $\lambda_{exc} = 550$ nm. Através dela, verificamos a diminuição de intensidade de fluorescência da banda do FP a partir de 720 minutos.

Figura 85. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

Os efeitos obtidos para os BCD150 e BCD90 foram semelhantes aos obtidos para o BCD180.

Na figura 86, seguem os espectros de absorção em função do tempo de irradiação do BCD150 na presença de micelas. Também é visível a formação do ponto isobéstico na fototransformação do BCD150.

Figura 86. Espectros de absorção óptica do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

Na figura 87, segue o decaimento monoexponencial da absorbância da banda principal em 633 nm.

Figura 87. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 633$ nm do BCD150 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Na figura 88, seguem os espectros de emissão de fluorescência, com $\lambda_{exc} = 620$ nm. Através dela, verificamos a diminuição de intensidade de fluorescência da banda principal ao longo do tempo de irradiação até a diminuição completa da banda de emissão em 620 nm.

Figura 88. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 620$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Na figura 89, temos os espectros de emissão de fluorescência, com $\lambda_{exc} = 550$ nm, indicando a formação do FP do BCD150.

Figura 89. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

A seguir, seguem os resultados da irradiação da banda relacionada ao FP do BCD150 na presença de micelas. Na figura 90, estão representados os espectros de absorção em função do tempo de irradiação.

Figura 90. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.

Na figura 91, observa-se o decaimento monoexponencial da banda de absorção em 564 nm.

Figura 91. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 564$ nm do fotoproduto do BCD150 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Na figura 92 encontram-se os espectros de emissão de fluorescência da banda relacionada ao FP do BCD150 na presença de micelas.

Figura 92. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD150 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm).

Na figura 93, temos os espectros de absorção do BCD90 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação.

Figura 93. Espectros de absorção óptica do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.

O BCD90 ligado às micelas sofre fototransformação, sendo esta a mais lenta de todos os outros corantes. Também foi observada a formação de um ponto isobéstico durante a fotólise, indicando a forma monomérica do corante e um FP único. A figura 94 mostra o decaimento monoexponencial do pico em 628 nm.

Figura 94. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 628$ nm do BCD90 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Nas figuras 95 e 96, seguem os espectros de emissão de fluorescência com $\lambda_{\text{exc}} = 600$ nm e $\lambda_{\text{exc}} = 550$ nm, respectivamente.

Figura 95. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Figura 96. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

As figuras 97 e 98 mostram a etapa da irradiação após a troca de filtro, indicando a fotólise do FP.

Figura 97. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação.

Figura 98. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 564$ nm do fotoproduto do BCD90 na presença de micelas de SDS em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Na figura 99, seguem os espectros de emissão de fluorescência com $\lambda_{\text{exc}} = 550$ nm até a irradiação por 6000 minutos.

Figura 99. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD90 na presença de SDS, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0nm e excitação 2,5 nm).

Os tempos característicos de fototransformação dos corantes e de seus respectivos FPs na interação micelas de SDS, na presença de oxigênio, estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12. Valores dos tempos característicos da fotólise (τ) dos três corantes e dos FPs na presença de micelas de SDS (experimento na presença de oxigênio molecular).

BCD + SDS 20mM	$\tau_{\text{banda principal}}$ (min)	τ_{FP} (min)
180	239 ± 8	433 ± 48
150	224 ± 7	968 ± 397
90	2288 ± 123	1560 ± 800

O tempo do FP do BCD90 na presença de SDS provavelmente seria maior. Entretanto, o longo tempo de irradiação e o fato de existir influência ainda da banda principal, podem ter contribuído para este valor de tempo. Pelos espectros de emissão de fluorescência do FP (figura 99), é possível verificar que as mudanças na intensidade de fluorescência são bem baixas ao longo do tempo de irradiação.

Os três corantes formam o mesmo FP, com máximo de absorvância por volta de 564 nm e emissão em 575 nm, no início (para $t = 0$ min) e 580 nm, para o final da irradiação.

5.5 Espectros de absorção óptica e de fluorescência dos BCDs na presença de DNA:

5.5.1 Absorção óptica

Na figura 100, estão apresentados os espectros de absorção do BCD180 1,5 μM em solução com o acréscimo de DNA em diferentes concentrações. O pico de 258 nm (não mostrado) é característico do DNA, e a partir dele é possível calcular a concentração de DNA nas amostras, com o valor do seu coeficiente de absorção molar $\epsilon_{258\text{ nm}} = 1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O DNA causa mudanças complexas no espectro do corante, caracterizando a interação entre os dois. Inicialmente a adição do DNA induz o aparecimento de um pico em 691 nm que diminui quando a concentração do DNA aumenta a favor do pico em 644 nm. Seguindo o estudo realizado por F.A. Schaberle et al., o primeiro pico está associado com a absorção de agregados J do corante, formados na superfície da molécula de DNA; já o segundo pico está associado com a absorção do monômero de BCD ligado ao DNA, que se torna dominante quando a concentração do DNA aumenta. Para 100 μM , o pico em 691 nm praticamente desaparece, mostrando desagregação do corante. Entretanto, pode observar o aparecimento de um novo pico em 510 nm, que mostra a diminuição do ângulo entre os cromóforos. O cálculo de acordo com a equação 11 nos leva ao valor de 158° .

Figura 100. Espectros de absorção do BCD180 1,5 μM na presença de DNA em diferentes concentrações.

Os espectros de absorção óptica do BCD150 0,6 μM com acréscimo de DNA se encontram na figura 101. O pico característico do corante em 624 nm sofre um deslocamento para 640 nm. Quanto ao aspecto das bandas, para 0,5 μM de DNA, há um alargamento da banda comparada à banda do corante apenas em tampão, mas com o acréscimo de DNA, a banda tende a ficar mais estreita. O ombro relacionado à forma agregada do corante, em 596 nm, sofre um aumento na absorção para 0,5 μM de DNA, indicando a formação de agregados H em baixas concentrações do mesmo. À medida que se acrescenta DNA, a diferença de absorbância entre os picos aumenta, indicando que o corante tende a se desagregar com o acréscimo de DNA. Podemos dizer que existem, pelo menos, três espécies em equilíbrio: monômeros de BCD 150 livres, quando o DNA ainda não foi adicionado; agregados H de BCD 150 ligados ao DNA e, por fim, monômeros de BCD 150 ligados ao DNA. O pico menor em 505 nm também se desloca para comprimentos de onda maiores e tem sua absorbância aumentada, indicando a mudança de ângulo entre os cromóforos, porém de maneira inferior ao que foi observado com as micelas de SDS. O ângulo calculado através da equação 11 tem valor 140° .

Figura 101. Espectros de absorção do BCD150 0,6 μM na presença de DNA em diferentes concentrações.

Na figura 102, segue um gráfico da razão entre os picos de monômero e de agregado, a partir de 0,5 μM de DNA. Nele é possível verificar que a razão inicialmente cai e depois aumenta com a concentração de DNA, o que mostra que o DNA em baixas concentrações

estimula a agregação e em altas concentrações, ocorre a desagregação do BCD150. Diferentemente do BCD180, para o BCD150 não observamos a formação de agregados tipo J.

Figura 102. Razões entre as absorbâncias dos picos 640 e 594 nm obtidos pela interação do BCD150 0,6 μM com DNA em diferentes concentrações.

Na figura 103, seguem os espectros de absorção do BCD90 na presença de DNA.

Figura 103. Espectros de absorção do BCD90 0,6 μM na presença de DNA em diferentes concentrações.

Efeitos semelhantes foram observados para o BCD90 (figura 104): a razão das absorvâncias dos picos do monômero e dos agregados H inicialmente diminui indicando a agregação do corante e depois aumenta, mostrando que ocorre desagregação do BCD90 para maiores concentrações de DNA. Nesse caso a formação de agregados J também não foi observada.

Figura 104. Razões entre as absorvâncias dos picos 627 e 584 nm obtidos pela interação do BCD90 0,6 μM com DNA em diferentes concentrações.

O cálculo experimental do ângulo entre os cromóforos na presença de DNA para o BCD90 foi de 99°. Provavelmente, o DNA causa um estiramento da estrutura do corante, aumentando o ângulo entre os cromóforos. Este aumento pode ser verificado pelos próprios espectros de absorção (figura 103): sem DNA, as bandas de absorção em 618 nm e 502 nm possuem mesmas intensidades; para DNA 300 μM, verifica-se que a banda em 627 nm possui maior absorvância em relação à outra em 512 nm.

Verificamos que os ângulos entre os cromóforos para os três corantes na sua ligação com DNA se alteram: diminuindo, para o BCD180, de 180° para 160° e para o BCD150, de 150° para 140°, e aumentando, para o BCD90, de 90° para aproximadamente 100°. Assim,

podemos concluir que na ligação com o DNA, a estrutura do corante tenta se ajustar com a estrutura de hélice do DNA.

5.5.2 Fluorescência estática

Na figura 105, seguem os espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na ausência e na presença de DNA. Observa-se que o acréscimo de DNA em alta concentração aumenta a intensidade de fluorescência e desloca o pico de 646 nm para 655 nm.

Figura 105. Espectros de emissão do BCD180 na ausência e na presença de DNA, $\lambda_{exc} = 620$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm.

A seguir, na figura 106, seguem os espectros de emissão de fluorescência do BCD150 na presença de DNA. Com o acréscimo de DNA, a intensidade da fluorescência aumenta.

Figura 106. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 0,6 μM na presença de DNA em diferentes concentrações, $\lambda_{\text{exc}} = 620 \text{ nm}$, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm.

Na figura 107, seguem os espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de DNA. O efeito é semelhante ao observado para os outros dois BCDs.

Figura 107. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 0,6 μM na presença de DNA em diferentes concentrações, $\lambda_{\text{exc}} = 620 \text{ nm}$, fendas de emissão e excitação 10 nm.

A tabela 13 mostra os valores dos rendimentos quânticos de fluorescência na presença de DNA, obtidos pelo cálculo usando a equação (36). Observa-se que a adição de DNA aumenta consideravelmente os valores dos rendimentos quânticos de fluorescência.

Tabela 13. Valores dos rendimentos quânticos de fluorescência dos BCDs em água e na presença de DNA.

	$\phi_{fl\text{ água}}$	$\phi_{fl\text{ DNA}}$
BCD180	0,018	0,66
BCD150	0,010	0,70
BCD90	0,002	0,18

5.5.3 Fluorescência com resolução temporal

As curvas de decaimento da intensidade da fluorescência e dos monômeros de BCDs ligados com o DNA (figuras 108, 109 e 110) possuem caráter biexponencial, como pode ser visto pelos ajustes.

Figura 108. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD180 na presença de DNA, $\lambda_{exc} = 640\text{ nm}$.

Figura 109. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD150 na presença de DNA, $\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$.

Figura 110. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do BCD90 na presença de DNA, $\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$.

Tabela 14. Valores médios obtidos pelo ajuste biexponencial do decaimento da intensidade de fluorescência dos três corantes na presença de DNA (tempo de vida τ_i e fator pré-exponencial normalizado A_i).

BCD + DNA	$\tau_1(\text{ns})$	A_1	$\tau_2(\text{ns})$	A_2
180	$1,47 \pm 0,03$	$0,36 \pm 0,01$	$0,350 \pm 0,008$	$0,60 \pm 0,01$
150	$1,36 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,01$	$0,319 \pm 0,008$	$0,66 \pm 0,01$
90	$1,72 \pm 0,05$	$0,38 \pm 0,02$	$0,42 \pm 0,01$	$0,64 \pm 0,02$

Pela tabela 14, verificamos que os tempos de vida de fluorescência dos três corantes na presença de DNA são próximos. Com estes valores, é possível obter os tempos de vida dos corantes em tampão (não obtidos experimentalmente), através da equação:

$$\tau_{\text{tampão}} = \frac{\varphi_{fl\text{tampão}}}{\varphi_{fl\text{DNA}}} \tau_{\text{DNA}} \quad (37)$$

Foram feitos os cálculos para τ_1 e τ_2 :

Tabela 15. Valores dos tempos de vida de fluorescência dos três corantes na presença de DNA e tempos de vida calculados em tampão (tempo de vida τ_i e fator pré-exponencial normalizado A_i)

	$\tau_{1\text{DNA}}(\text{ns})$	$\tau_{1\text{tampão}}(\text{ns})$ (calculado)	$\tau_{2\text{DNA}}(\text{ns})$	$\tau_{2\text{tampão}}(\text{ns})$ (calculado)
BCD180	1,47	0,04	0,35	0,0095
BCD150	1,36	0,019	0,32	0,0046
BCD90	1,72	0,019	0,42	0,0047

Pelos valores dos tempos de vida calculados da tabela, verificamos que os tempos de vida dos corantes em tampão são muito menores que os tempos de vida na presença de DNA.

5.6 Fototransformação dos BCDs na presença de DNA

5.6.1 Espectros de absorção e fluorescência e formação de fotoprodutos

Para evitar o efeito de agregação dos corantes os experimentos de fotólise foram realizados na presença de DNA em concentração 200 μM na qual somente os monômeros de corantes ligados com DNA estão presentes na solução.

Na figura 111, seguem os espectros de absorção do BCD180 na presença de DNA 200 μM em função do tempo de irradiação da banda principal, na presença de oxigênio.

Figura 111. Espectros de absorção óptica do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

Observamos que o BCD180 na presença de DNA 200 μM também sofre fotólise, com o aparecimento de um ponto isobéstico em 578 nm, indicando a presença de apenas duas espécies no processo: monômeros com única forma isomérica e FP único. Ocorre a diminuição da banda em 644 nm e o aumento da banda por volta de 550 nm (FP).

Figura 112. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 644$ nm do BCD 180 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Na figura 113, seguem os espectros de emissão de fluorescência para o mesmo experimento, indicando a diminuição da intensidade de emissão ao longo do tempo de irradiação.

Figura 113. Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Figura 114. Espectros de emissão de fluorescência do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 4 a 47 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Ao excitar a amostra em 550 nm, é possível observar a emissão do FP. Conforme se aumenta o tempo de irradiação, a intensidade da emissão do FP se torna mais intensa, até atingir um máximo em 300 u.a., para $t = 47$ minutos.

Na figura 115, encontram-se os resultados da irradiação do BCD180 na presença de DNA a partir da troca de filtro (FPs).

Figura 115. Espectros de absorção óptica do fotoproducto do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

Figura 116. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 550$ nm do fotoproduto do BCD 180 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Pela figura 116, também se observa um decaimento monoexponencial para os FP do BCD180 na presença de DNA.

Na figura 117, os espectros de emissão de fluorescência do FP do BCD180 com DNA, para $\lambda_{exc} = 550$ nm, mostram que o FP sofre fotólise, com redução na intensidade de fluorescência.

Figura 117. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD180 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 47 a 387 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

O gráfico da figura 118 relaciona as intensidades de fluorescência na banda relacionada à banda principal (655 nm) do BCD180 ligado ao DNA em função do tempo de irradiação ao longo de todo o experimento com ambos os filtros. Observa-se a diminuição na intensidade de fluorescência conforme se aumenta o tempo de irradiação e, após a troca do filtro, a intensidade permanece próxima de zero, indicando a fotodegradação do corante.

Figura 118. Gráfico da intensidade de emissão de fluorescência em 655 nm em função do tempo de irradiação do BCD180 na presença de DNA, na presença de oxigênio.

O gráfico da figura 119 relaciona as intensidades de fluorescência na banda relacionada ao FP (580 nm) do BCD180 na presença de DNA em função do tempo de irradiação. Observa-se o aumento na banda do FP conforme se aumenta o tempo de irradiação e, em seguida, ao realizar a troca do filtro, observamos uma queda na intensidade de fluorescência, indicando a fotodegradação do FP.

Figura 119. Gráfico da intensidade de emissão de fluorescência em 580 nm em função do tempo de irradiação do BCD180 na presença de DNA, na presença de oxigênio.

Efeitos semelhantes foram observados no fotólise dos outros corantes, BCD150 e BCD90. Nas próximas figuras, seguem os resultados da irradiação com luz visível do BCD150 na presença de DNA, através da absorção (figuras 120 e 121) e emissão de fluorescência (figuras 122 e 123).

Figura 120. Espectros de absorção óptica do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

Figura 121. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 640$ nm do BCD150 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Figura 122. Espectros de emissão de fluorescência do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 620$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Figura 123. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 0 a 50 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Pelas figuras anteriores, também se verifica a fototransformação do BCD150 na presença de DNA, através das diminuições das bandas de absorção e de emissão de fluorescência, e a formação de um FP, através do crescimento de uma banda de absorção em 554 nm e aumento da intensidade de fluorescência para a excitação da mesma (figura 123).

As figuras abaixo (figuras 124 a 126) mostram os experimentos do BCD150 realizados após a troca do filtro.

Figura 124. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

Figura 125. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 554$ nm do fotoproduto do BCD 150 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Figura 126. Espectros de emissão de fluorescência do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 50 a 535 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

O FP do BCD150 na presença de DNA também sofre fotólise, observada pela queda na absorbância em 554 nm e diminuição da intensidade de fluorescência em 585 nm.

Nas figuras 127 a 130, seguem os resultados do BCD90 na presença de DNA.

Figura 127. Espectros de absorção óptica do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

Figura 128. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 627$ nm do BCD 90 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Figura 129. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação ($\lambda_{exc} = 600$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Figura 130. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 0 a 680 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm), na presença de oxigênio.

Nas figuras 131 a 133, temos os resultados de irradiação após a troca do filtro do BCD90 na presença de DNA.

Figura 131. Espectros de absorção óptica do fotoproduto do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação, na presença de oxigênio.

Figura 132. Decaimento da absorbância normalizada em $\lambda = 550$ nm do fotoproduto do BCD90 na presença de DNA em função do tempo de irradiação (na presença de oxigênio).

Figura 133. Espectros de emissão de fluorescência do BCD90 na presença de DNA, em função do tempo de irradiação de 680 a 1930 minutos ($\lambda_{exc} = 550$ nm, fendas de emissão 5,0 nm e excitação 2,5 nm) na presença de oxigênio.

Através destes resultados podemos dizer que todos os corantes na presença de DNA sofrem fotólise, com o aparecimento de um FP.

Na tabela abaixo, encontram-se os valores dos tempos característicos da fotólise dos três corantes e de seus FPs. O BCD90 possui tempos muito maiores que os outros dois corantes, assim como foi visto também nos experimentos na presença de SDS. Os tempos

característicos da fotólise nos experimentos com DNA foram relativamente curtos comparados com tampão e micelas de SDS, indicando que a fotólise com DNA é um processo rápido.

Tabela 16. Comparação dos tempos característicos da fotólise dos três corantes na presença de DNA (na presença de oxigênio)

BCD + DNA 200 μ M	$\tau_{\text{banda principal}}$ (min)	τ_{FP} (min)
180	$9,1 \pm 0,5$	147 ± 31
150	12 ± 1	215 ± 56
90	140 ± 11	590 ± 42

5.6.2 Tempos de vida de fluorescência dos fotoprodutos

Nas figuras 134 a 136, seguem os decaimentos das intensidades de fluorescência dos três FPs dos corantes na presença de DNA.

Figura 134. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD180 na presença de DNA, $\lambda_{\text{exc}} = 640 \text{ nm}$.

Figura 135. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD150 na presença de DNA, $\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$.

Figura 136. Decaimento da intensidade de fluorescência normalizada do fotoproduto do BCD90 na presença de DNA, $\lambda_{exc} = 640 \text{ nm}$.

Tabela 17. Valores médios obtidos pelo ajuste biexponencial do decaimento da intensidade de fluorescência dos fotoprodutos dos três corantes na presença de DNA (tempo de vida τ_i e fator pré-exponencial normalizado A_i).

FP	BCD	+	$\tau_1(\text{ns})$	A_1	$\tau_2(\text{ns})$	A_2
DNA						
180			$2,30 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,01$	$0,82 \pm 0,02$	$0,417 \pm 0,008$
150			$2,48 \pm 0,01$	$0,737 \pm 0,007$	$0,93 \pm 0,01$	$0,395 \pm 0,006$
90			$2,50 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,01$	$0,72 \pm 0,01$	$0,65 \pm 0,01$

Semelhantemente aos BCDs, os FPs apresentam tempos de vida de fluorescência próximos.

Comparando os tempos de fotólise da forma monomérica dos corantes em tampão (concentrações baixas de corante) e na presença de SDS e DNA podemos ver que a interação com DNA não produz uma mudança significativa no tempo característico de fotodecomposição dos corantes, enquanto que sua interação com SDS aumenta de forma considerável os tempos de fotodecomposição (tabela 18). Considerando o mecanismo de fototransformação na interação com SDS e DNA o mesmo que em tampão (destruição da estrutura do cromóforo pelo ataque de oxigênio singlete, formado pela transferência da energia do estado tripleto do corante) podemos explicar essa diferença de seguinte maneira: a ligação das moléculas dos corantes na superfície do DNA (58) não produz obstáculos para o contato entre o oxigênio e molécula do corante. Entretanto, sua ligação com SDS diminui a probabilidade desse contato, provavelmente devido a uma localização distinta entre as moléculas do corante e o oxigênio na estrutura da micela de SDS.

Tabela 18. Tempos característicos da fotólise dos BCDs em relação aos meios utilizados: tampão PBS, micelas de SDS e DNA.

Tempos característicos da fotólise dos três BCDs (minutos)			
BCD	Tampão	SDS	DNA
180	$9,6 \pm 0,4$	239 ± 8	$9,1 \pm 0,5$
150	$23,9 \pm 0,4$	224 ± 7	12 ± 1
90	$41,9 \pm 1,9$	2288 ± 123	140 ± 11

6. CONCLUSÕES

Diante os resultados apresentados, podemos fazer uma comparação entre os experimentos envolvendo os três BCDs realizados em solução tampão e experimentos da interação destes corantes com os sistemas biomiméticos estudados: micelas de SDS e DNA.

1. BCDs em solução tampão:

- Os BCDs possuem espectros de absorção óptica compostos de duas bandas de absorção acompanhadas com ombros. A estrutura das bandas é devido às transições $S_{00} \rightarrow S_{10}$, $S_{00} \rightarrow S_{11}$, $S_{00} \rightarrow S_{20}$ e $S_{00} \rightarrow S_{21}$ entre o primeiro nível vibracional do estado fundamental (S_{00}) da molécula e do primeiro e segundo estados vibracionais do primeiro (S_{10} , S_{11}) e segundo (S_{20} , S_{21}) estados excitados singlete dela. A probabilidade dessas transições depende do ângulo entre os cromóforos da molécula.

- Os espectros de fluorescência dos corantes estão associados com a transição entre o nível vibracional S_{11} e os níveis vibracionais S_{00} e S_{01} do estado fundamental.

- O aumento da concentração dos corantes induz o crescimento da absorção na posição próxima da absorção de ombros. Essa absorção está associada à formação de agregados do tipo H dos corantes.

- A irradiação dos corantes com luz visível mostrou que todos eles sofrem fototransformação, caracterizada pelas mudanças nos espectros de absorção e de emissão de fluorescência (diminuição das bandas ao longo do tempo de irradiação). Paralelamente a este efeito, ocorreu a formação de um fotoproduto (FP), devido ao aparecimento de uma nova banda de absorção e crescimento da intensidade de fluorescência no monitoramento desta banda. A irradiação na região da absorção da banda de FP induz à sua redução indicando a fototransformação do FP.

- As curvas de decaimento da absorbância pela irradiação, tanto dos corantes quanto dos FPs, mostraram caráter monoexponencial e a partir delas foi possível obter o tempo da fotólise para cada corante, em diferentes concentrações.

- Os tempos característicos de fotólise aumentaram com o aumento da concentração, mostrando que: i) s agregados não sofrem fototransformação, provavelmente, devido uma dissipação rápida da energia de excitação pelos processos não radiativos; ii) os agregados ficam em equilíbrio dinâmico com a forma monomérica do corante, que sofre fototransformação. Devido esse equilíbrio, novas moléculas são liberadas dos agregados e são fotolisadas. Com isso, foi proposto um mecanismo da fototransformação envolvendo o fenômeno de agregação.

- Para os FPs, por outro lado, não houve influência da concentração de seu corante inicial. Este efeito se deve à diminuição da probabilidade de agregação do FP em comparação com o próprio corante.

- Na ausência de oxigênio o processo de fototransformação tem tempos mais longos do que os na presença de oxigênio, indicando que esta molécula exerce um papel na fototransformação dos corantes. Provavelmente, o corante em seu estado excitado tripleto transfere energia ao oxigênio molecular, formando oxigênio singlete que é capaz de destruir ligações duplas e destruir o sistema de conjugação π do cromóforo dos BCDs. Essa consideração está em acordo com a observação que a velocidade de fototransformação aumenta quando aumenta o rendimento quântico da formação do tripleto de corante. Apesar de não ter sido realizado um experimento que confirmasse a formação do oxigênio singlete, tais resultados assim como o estudo teórico realizado pelo Dr. Fabio Antônio Schaberle em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio Emanuel Galembeck, são fortes indícios que os BCDs sofrem fototransformação devido ao ataque de oxigênio singlete no sistema de conjugação π dos seus cromóforos.

- Pela comparação dos espectros de absorção e de fluorescência dos FPs formados de três corantes, verificamos que eles apresentam cromóforos com mesma estrutura. Ainda, os espectros de absorção dos FPs se localizam entre as bandas de absorção das transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S_2$ dos corantes que, segundo a teoria deveria se localizar a banda de absorção de um cromóforo isolado. Devido à semelhança dos espectros dos FPs, concluímos que, na primeira etapa, ocorre a destruição do sistema de conjugação π , inicialmente de um cromóforo, que desloca o espectro de absorção para o do segundo cromóforo já sem interação com o primeiro. Posteriormente, a irradiação do FP leva à destruição do sistema de conjugação π do segundo cromóforo.

- Como a destruição do sistema de conjugação π de um cromóforo diminui a hidrofobicidade da molécula, isto pode explicar a menor tendência de agregação do FP em relação ao corante e, assim, o efeito da sua concentração no tempo de fototransformação é menor. Outro fato que confirma esta suposição é que o rendimento quântico do tripleto dos corantes com um cromóforo é baixo devido à fotoisomerização; sendo assim, para os FPs, a formação de oxigênio singlete também deve ser menor.

2. Interação dos BCDs com SDS:

- Com o acréscimo de SDS, foi possível verificar alterações nos perfis espectrais dos três corantes: para baixas concentrações do surfactante, ocorre a agregação das moléculas de BCD, na forma de agregados mistos compostos pelo corante e SDS; com o acréscimo de SDS, ocorre a desagregação do corante, até que há apenas a forma monomérica dos corantes ligada às micelas.

- A mudança do ambiente em que o corante se encontra pode estimular a mudança do ângulo entre seus cromóforos, como foi observado para BCD150, cujo ângulo diminuiu de 150° para 130° na interação com as micelas de SDS.

- Os rendimentos quânticos de fluorescência dos BCDs na interação com as micelas aumentam 13 vezes em relação à solução tampão para o BCD180 e até 30 vezes para o BCD150 e BCD90. Isto mostra a influência do ambiente micelar que torna o sistema mais rígido do que em tampão PBS.

- Pelos experimentos de fluorescência temporal, os valores dos tempos de vida de fluorescência para baixas concentrações de SDS sugeriram a formação de agregados pré-micelares de SDS contendo moléculas isoladas de BCD, ao passo que essas moléculas de corantes apresentam um tempo de vida mais longo; para concentrações mais altas, o corante se liga ao SDS estimulando a formação de micelas. Além disso, a existência de uma única componente temporal na curva de decaimento da fluorescência do corante ligado às micelas formadas indica que a interação do corante com as micelas está relacionada a uma única forma isomérica do BCD.

- A irradiação das amostras de BCDs em suas interações com micelas de SDS também provocaram fotólise do corante. A formação de pontos isobésticos para todos os três corantes indicou a formação de apenas duas espécies na fototransformação: única forma isomérica dos monômeros ligados às micelas e um único FP. Todos os decaimentos da absorbância em função do tempo de irradiação dos corantes e dos FPs apresentaram caráter monoexponencial. Os tempos característicos de fotólise dos corantes na presença de micelas foram muito maiores do que em solução tampão. Isto significa que as moléculas de corantes são protegidas na presença de micelas do ataque do oxigênio. Uma suposição é que a maior parte das moléculas dos corantes se liga na superfície das micelas e o oxigênio, sendo hidrofóbico, dá preferência pela região hidrofóbica das micelas ao invés do corante. Mesmo assim, pode ocorrer a inserção de moléculas do corante nas micelas e o oxigênio singlete contribui para a sua fototransformação. Como o BCD180 possui estrutura planar, ele possivelmente penetra

mais na micela do que o BCD90, sendo mais suscetível ao ataque de oxigênio. Isto pode explicar os tempos longos da fotólise para o BCD90.

3. Interação dos BCDs com DNA:

- A adição de concentrações baixas de DNA ao BCD180 mostrou, pelos espectros de absorção, a formação de agregados J que ficam ligados à superfície do DNA. Com o aumento da concentração de DNA, ocorre a desagregação das moléculas de BCD180, verificada pelos espectros de absorção óptica. Em altas concentrações de DNA, ocorre a formação de moléculas de BCD ligadas ao DNA. Para os BCD150 e BCD90 também se verificou a formação de agregados em baixas concentrações de DNA, porém, agregados do tipo H. Com o aumento da concentração de DNA, houve a desagregação dos corantes. Os cálculos dos ângulos na interação com DNA mostram a mudança dos ângulos entre os cromóforos de corante, que indicam uma reordenação estrutural dos corantes baseada na estrutura do próprio DNA. Os espectros de emissão de fluorescência dos corantes na presença de DNA confirmaram os resultados obtidos pela espectroscopia de absorção óptica, mostrando um aumento na intensidade de fluorescência para uma concentração alta de DNA. Os cálculos dos rendimentos quânticos de fluorescência mostraram aumento de aproximadamente 40 vezes na presença de DNA em comparação ao rendimento quântico em tampão, para o BCD180; aumento de 70 vezes para o BCD150 e 90 vezes para o BCD90. Isso indica uma maior rigidez das estruturas dos corantes quando ligados ao DNA. Este resultado está em acordo com aumento do tempo de vida da fluorescência dos corantes na interação com o DNA.

- A irradiação com luz visível das amostras dos corantes na presença de DNA demonstrou a fototransformação dos mesmos, com formação de um FP único, devido ao aparecimento de ponto isosbético. O FP também sofre fotólise. A partir dos ajustes monoexponenciais das absorbâncias dos picos em função do tempo de irradiação, obtivemos os tempos característicos da fotólise, sendo estes próximos aos tempos obtidos em tampão, exceto para o BCD90. Os tempos de vida de fluorescência dos FPs apresentaram valores próximos aos tempos de vida em tampão, o que indica que, para os FPs, não há mudança na rigidez da estrutura do corante na interação com o DNA.

Na comparação dos tempos característicos da fotólise dos três meios estudados (tampão PBS, micelas de SDS e DNA), podemos dizer que as moléculas dos BCDs se tornam menos propensas ao ataque de oxigênio singlete nas estruturas micelares. Na presença de DNA, provavelmente, as moléculas do corante se ligam à superfície dele, por interações eletrostáticas entre os grupos fosfato do DNA e às cargas positivas dos BCDs, fazendo com

que a estrutura dos cromóforos se torne disponível ao ataque do oxigênio, contribuindo para a sua fototransformação.

Conclusão particular:

A formação de uma nova banda de fluorescência do fotoproducto dos BCDs durante a sua fotólise dá a possibilidade de usá-lo para avaliar o processo do fototratamento de forma não invasiva em tempo real.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 105–129, 2001.
2. HAMBLIN, M. R.; HUANG, Y. Y. Handbook of Photomedicine, 1st edition: CRC Press, p.38, 2013.
3. LIPSON, R. L.; BALDES, E. J. The Photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivate. **Archives Dermatologie**, v.82, p.508-16, 1960.
4. LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; GRAY, M. J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Cancer**, v. 20, n. 2, p. 2255–2257, 1967.
5. BAGNATO, V. S. Novas técnicas ópticas para as áreas da saúde. 1ª Edição. São Paulo: Editora Livraria da Física, p. 26, 2008.
6. DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K.; Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v.3, p.380-387, 2003.
7. FREITAS, I., BARONZIO, G.F. Tumor hypoxia, reoxygenation and oxygenation strategies: possible role in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 11, n. 1, p. 3-30, 1991.
8. ALMEIDA, L. M. et al. Cell Survival and Altered Gene Expression Following Photodynamic Inactivation of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 992-1000, 2012.
9. MANTAREVA, V. et al. Advance photodynamic inactivation of dental pathogenic microorganisms with water-soluble and cationic phthalocyanines. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Ed: Méndez-Vilas, v. 1, n. 3, p. 650-661, 2011.

10. NASRY, S. A. et al. The Effect of Photodynamic Therapy on Microbial Reduction in Diabetic Rats with Induced Periodontitis. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 8, n. 10, p. 5049-5058, 2012.

11. HONGCHARU, W. et al. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 115, n. 2, p. 183-192, 2000.

12. GELISKEN, F. et al. Retinal pigment epithelial tear after photodynamic therapy for choroidal neovascularization. **American journal of ophthalmology**, v. 131, n. 4, p. 518-520, 2001.

13. ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy, **Materials**, v. 6, p. 817-840, 2013.

14. DETTY, M. R., GIBSON, S. L., WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3897-3915, 2004.

15. NYMAN, E. S., HYNINEN, P. H., Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v.73, p.1-28, 2004.

16. MURAKAMI, L.S. et al. Photocytotoxicity of a cyanine dye with two chromophores toward melanoma and normal cells, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1850, n. 6, p. 1150–1157, 2015.

17. REIS, E. R. et al. Photodynamic activity of protoporphyrin IX in Harderian glands of Wistar rats: Monitoring by gland fluorescence. **Journal of Luminescence**, v. 137, p. 32-36, 2013.

18. SPERANDIO, F. F.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 108-120, 2013.

19. MARMUR, E. S.; SCHMULTS, C. D.; GOLDBERG, D. J. A review of laser and photodynamic therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer. **Dermatologic Surgery**, v. 30, n. s2, p. 264-271, 2004.

20. ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. Hawkins; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.
21. STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, n. 17, p. 4151-4202, 1998.
22. CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.
23. RUBIN, P.. Manual de clínica oncológica: aspectos multidisciplinares. Manual de clínica oncológica: aspectos multidisciplinares, 4ª Edição, São Paulo: Ed. Sarvier, 1977.
24. BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The lancet oncology**, v. 5, n. 8, p. 497-508, 2004.
25. ALMEIDA, R. D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1704, n. 2, p. 59-86, 2004.
26. WYLD, L.; REED, M. W. R.; BROWN, N. J. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. **British journal of cancer**, v. 84, n. 10, p. 1384-1886, 2001.
27. CASTANO, Ana P.; DEMIDOVA, Tatiana N.; HAMBLIN, Michael R. Mechanisms in photodynamic therapy: part three—photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 2, p. 91-106, 2005.
28. BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 19-33, 1995.
29. OLEINICK, N. L.; MORRIS, R. L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1, n. 1, p. 1-21, 2002.
30. GONÇALVES, P. J. et al. Excited-state dynamics of meso-tetrakis (sulfonatophenyl) porphyrin J-aggregates. **Optical Materials**, v. 34, n. 4, p. 741-747, 2012.

31. RONCHI, L. M. et al. Influência da agregação e do fotobranqueamento na atividade fotodinâmica de protoporfirina de magnésio. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, v. 2, p. 5, 2007.
32. ISRAELACHVILI, J.N. Intermolecular and surface forces: revised third edition. Academic press, 2011.
33. ATKINS, P.; DE PAULA, J. Physical chemistry for the life sciences. Second edition. Oxford University Press, 2011.
34. DAUNE, M. Molecular biophysics: structures in motion. Oxford: Oxford University Press, 1999.
35. GOFTAR, M. K.; MORADI, K.; KOR, N. M. Spectroscopic studies on aggregation phenomena of dyes. **European Journal of Experimental Biology**, v. 4, n. 2, p. 72-81, 2014.
36. SAUER, M.; HOFKENS, J.; ENDERLEIN, J. Basic principles of fluorescence spectroscopy. **Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging: From Single Molecules to Ensembles**, p. 1-30, 2011.
37. EISFELD, A.; BRIGGS, J. S. The J-and H-bands of organic dye aggregates. **Chemical Physics**, v. 324, n. 2, p. 376-384, 2006.
38. KASHA, M.; RAWLS, H. R.; ASHRAF EL-BAYOUMI, M. The exciton model in molecular spectroscopy. **Pure and Applied Chemistry**, v. 11, n. 3-4, p. 371-392, 1965.
39. HIRANO, Y. et al. Origin of formation of blue-shifted aggregates including H-aggregates in mixed Langmuir–Blodgett films of merocyanine dye investigated by polarized visible and infrared spectroscopy. **Vibrational spectroscopy**, v. 43, n. 1, p. 86-96, 2007.
40. SPIKES, J. D. Photodynamic Action: From Paramecium to Photochemotherapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 65, n. S1, p. 142S-147S, 1997.
41. O’CONNOR, A.E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009.

42. DING, H. et al. Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 3, p. 276-280, 2011.

43. OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

44. YU, C. et al. Investigation of photobleaching of hypocrellin B in non-polar organic solvent and in liposome suspension. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 68, n. 2, p. 73-78, 2002.

45. BONNETT, R. et al. Photobleaching of 5, 10, 15, 20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 53, n. 1, p. 136-143, 1999.

46. SHINDY, H. A. Synthesis of different classes of six membered heterocyclic cyanine dyes. **Revue roumaine de chimie**, v. 59, n. 2, p. 117-123, 2014.

47. MISHRA, A. et al. Cyanines during the 1990s: a review. **Chemical Reviews**, v. 100, n. 6, p. 1973-2011, 2000.

48. LEVITUS, M.; RANJIT, S. Cyanine dyes in biophysical research: the photophysics of polymethine fluorescent dyes in biomolecular environments. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 44, n. 01, p. 123-151, 2011.

49. TORRES, É. F. S. *Fotoquímica e caracterização espectroscópica de novos corantes cianínicos*, 2010. Dissertação (Mestrado em Análises Laboratoriais) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2010.

50. LEWIS, E. Spectroscopic Studies of Cyanine Dyes and Serum Albumins for Bioanalytical Applications, 2015. Tese (Doutorado em Química) – Georgia State University, Georgia, 2015.

51. KIM, J. Bioanalytical Applications of Intramolecular H-Complexes of Near Infrared Bis (Heptamethine Cyanine) Dyes, 2008. Dissertação (Mestrado em Química) – Georgia State University, Georgia, 2008.

52. MUJUMDAR, R. B. et al. Cyanine dye labeling reagents: sulfoindocyanine succinimidyl esters. **Bioconjugate chemistry**, v. 4, n. 2, p. 105-111, 1993.

53. DELAEY, E. et al. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 55, n. 1, p. 27-36, 2000.
54. WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 25, n. 5, p. 351-359, 1996.
55. BORISSEVITCH, I. E.; KUZ'MIN, V. A.; MIKHAILENKO, F. A.; DYADIYSHA, G. G. Triplet states of bis-cyanine dyes. **Doklady Akademii Nauk SSSR**, v. 228, p.448-451, 1976.
56. KUZMIN, V. A. et al. Effect of splitting the triplet levels of biscyanine dyes. **Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR**, v. 229, n.1-3, p. 616-619,1976.
57. BAKER, T. A.; GELLEN, G. I. A hybrid ab initio/free electron computational model for conjugated dye molecules: Simple cyanines and oxonols. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 943-953, 2000.
58. SCHABERLE, F. A.; KUZ'MIN, V.A.; BORISSEVITCH, I. E. Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA. Effect of ionic strength. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1621, n.2, p. 183-191, 2003.
59. KULBACKA, J. et al. Cyanines as efficient photosensitizers in photodynamic reaction: photophysical properties and in vitro photodynamic activity. **Biochemistry (Moscow)**, v. 76, n. 4, p. 473-479, 2011.
60. BORISEVICH, Y. E. Influence of resonance interaction on absorption spectra of dyes with two chromophores. **Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR**, v. 241, n. 6, p. 1359-1362, 1978.
61. SCHABERLE, F. A.; GALEMBECK, S. E.; BORISSEVITCH, I. E. Computational study of steric and spectroscopic characteristics of bi-chromophoric cyanine dyes: Comparison with experimental data, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.72, n.4, p. 863–867, 2009.
62. KIPRIANOV, A.I.; DYADYUSHA, G.G. Synthesis and characterization of cyanine dyes with two chromophores, **Ukrainskii Khimicheskii Zhurnal**, v.35, p. 608-617, 1969.
63. KIM, J. S. et al. A study of intramolecular H-complexes of novel bis (heptamethine cyanine) dyes. **Talanta**, v. 67, n. 5, p. 947-954, 2005.

64. IBRAYEV, N. K. et al. Investigation of conformational and electron properties of biscyanine dyes. **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 427, n. 1, p. 139/[451]-147/[459], 2005.

65. MENEZES, P. F. C. et al. Dark cytotoxicity of the photoproducts of the photosensitizer photogem after photobleaching induced by a Laser. **Laser Physics**, v. 15, n. 3, p. 435-42, 2005.

66. BERNAS, T. et al. Minimizing photobleaching during confocal microscopy of fluorescent probes bound to chromatin: role of anoxia and photon flux. **Journal of microscopy**, v. 215, n. 3, p. 281-296, 2004.

67. PAWLEY, J. B. Handbook of biological confocal microscopy. 3rd edition: Springer, p. 690-699, 2006.

68. BEZDETNAYA, L. et al. Spectroscopic and Biological Testing of Photobleaching of Porphyrins in Solutions. **Photochemistry and photobiology**, v. 64, n. 2, p. 382-386, 1996.

69. BELITCHENKO, I. et al. Characterization of Photodegradation of Meta-tetra (Hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC) in Solution: Biological Consequences in Human Tumor Cells. **Photochemistry and photobiology**, v. 67, n. 5, p. 584-590, 1998.

70. HOLMBERG, Krister et al. **Surfactants and polymers in aqueous solution**. 2nd edition: John Wiley & Sons, 2002.

71. TADROS, T. F. **Applied surfactants: principles and applications**. John Wiley & Sons, 2005.

72. NEUGEBAUER, J. A Guide to the Properties and Uses of Detergents in Biology and Biochemistry, San Diego: Calbiochem Brand Biochemicals, Division of Hoechst Celanese Corporations, 1987.

73. CHAUDHURI, A.; HALDAR, S.; CHATTOPADHYAY, A. Organization and dynamics in micellar structural transition monitored by pyrene fluorescence. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 390, n. 3, p. 728-732, 2009.

74. BRITO, R. M; VAZ, W. L. C. Determination of the critical micelle concentration of surfactants using the fluorescent probe N-phenyl-1-naphthylamine. **Analytical biochemistry**, v. 152, n. 2, p. 250-255, 1986.
75. CHATTOPADHYAY, A.; LONDON, E. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. **Analytical biochemistry**, v. 139, n. 2, p. 408-412, 1984.
76. DAUNE, M. **Molecular biophysics: structures in motion**. Oxford: Oxford University Press, 1999.
77. JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
78. NASIM, A.; BRYCHCY, T. Genetic effects of acridine compounds, **Mutation Research**, v.65, p.261-288, 1979.
79. LYLES, M.B.; CAMERON, I.L.; RAWLS, H.R. Structural basis for the binding affinity of xanthenes with the DNA intercalators Acridine orange. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, p.4650-4660, 2001.
80. BENVIN, A. L. et al. Fluorescent DNA nanotags: Supramolecular fluorescent labels based on intercalating dye arrays assembled on nanostructured DNA templates. **Journal of the American Chemical Society**, v.129, n.7, p. 2025-2034, 2007.
81. SCHABERLE, F. A. Efeitos do meio e da interação com DNA e Micelas nas características espectrais dos corantes ciânicos com dois cromóforos, 2007. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2007.
82. PASTERNAK, R. F. et al. Porphyrin assemblies on dna as studied by resonance light scattering technique. **Journal of American Chemical Society**, Pennsylvania, v.15, p. 5393–5399, 1993.
83. LAKOWICZ, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third Edition, Springer Science & Business Media, 2006.
84. BORISSEVITCH, I. E. Photonics of Carbocyanin Dye Molecules with two chromophores, 1980. Tese (Doutorado em Física Matemática, Institute Of Chemical Physics Russian Academy Of Science – Moscou, 1980.

85. SILVA, É. R. Estudo da cinética e dos mecanismos de fototransformação do corante Acridina Laranja na sua interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2010.

ANEXOS

ANEXO A- Modelo Teórico de Fototransformação do BCD (81)

Quando os BCD são irradiados ocorre o desaparecimento das bandas principais e o surgimento de uma banda com energia maior. Este processo indica que ocorre a quebra de um dos cromóforos do BCD, fazendo com que some a interação entre os cromóforos do corante e a molécula de BCD passe a absorver com apenas um cromóforo. A hipótese mais comum para este processo é a de que a quebra do cromóforo ocorra pelo ataque às ligações duplas dos BCD pelo oxigênio singleto formado pela própria molécula. Seguindo esta linha de raciocínio foram feitas simulações computacionais da molécula do BCD180 com a molécula de oxigênio ligada à cadeia de conjugação π do cromóforo e ao anel central do corante, e simulado seu espectro de absorção ótica com a análise de orbitais (figuras 137 e 138).

Figura 137. Densidade orbital segundo o modelo de fotodecomposição com a ligação da molécula de oxigênio A) na parte mais externa e B) na parte mais interna do cromóforo.

Na figura 137 são mostradas as funções de onda eletrônicas nas transições para diferentes posições de ligação do oxigênio. Na figura 137-A o oxigênio está ligado na porção mais externa da cadeia lateral de conjugação π , enquanto na figura 137-B na porção mais interna próxima ao anel central. Em ambas a transição eletrônica correspondente é a de apenas um cromóforo como se pode ver pela função de onda, mostrando que o cromóforo onde o oxigênio singlete se liga, segundo o modelo, perde a conjugação π e consequentemente perde o papel de cromóforo.

Figura 138. Densidade orbital segundo o modelo de fotodecomposição com a ligação da molécula de oxigênio no anel central.

Na figura 138, o oxigênio foi ligado no anel central do corante. Com esta ligação ocorre uma mudança brusca na geometria do BCD180, fazendo com que este deixe de ser plano e passe a ter uma angulação do anel central. Esta mudança da geometria causa uma proximidade dos dois cromóforos que causa o aparecimento de duas bandas e transição eletrônicas, com energias menores em relação a banda mais intensa do BCD 180. Os espectros de absorção ótica destas transições são mostrados na figura 139.

Figura 139. Espectros de absorção computacionais para o BCD180 com o oxigênio molecular ligado em 3 partes do cromóforo: cadeia lateral mais externa e mais interna e no anel central.

Através da comparação dos espectros do cálculo computacional com os experimentais, pode-se inferir que o oxigênio singlete se liga nas cadeias de conjugação π laterais e não no anel central. Finalmente podemos concluir que o oxigênio singlete destrói o cromóforo de BCD tirando a *splitting* dos níveis da energia dos corantes e somente um cromóforo é responsável pela formação do espectro do corante.