GUSTAVO GIMENEZ PARRA

**Interação de pontos quânticos com fotossensibilizadores orgânicos na presença
de estruturas nano-organizadas**

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

Área de Concentração:

Física aplicada à Medicina e Biologia

Orientador:

Prof. Iouri Borissevitch

Versão corrigida

Versão original disponível na FFCLRP - USP

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Parra, Gustavo Gimenez

Interação de pontos quânticos com fotossensibilizadores orgânicos na presença de estruturas nano-organizadas / Gustavo Gimenez Parra; orientador Iouri Borissevitch. Ribeirão Preto - SP, 2015.

148p.:il. ; 30 cm

Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Física aplicada à Medicina e Biologia) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2015.

1. Ponto quântico. 2. Fotossensibilizador orgânico 3. Transferência de energia. 4. Transferência de carga. 5. Sistema biomimético nano-organizado. 6. Fotoquimioterapia e Diagnóstico por fluorescência.

Nome: Parra, Gustavo Gimenez

Título: Interação de pontos quânticos com fotossensibilizadores orgânicos na presença de estruturas nano-organizadas

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.

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Hélio e Cláudia; irmã Marina pelo amor, carinho, compreensão e apoio nas escolhas certas e principalmente nas equivocadas.

A minha esposa Carla por acreditar na minha capacidade quando nem mesmo eu acreditava.

A todos que contribuíram, de alguma maneira, para a realização deste trabalho.

Gustavo

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch pela orientação, paciência e motivação para realizar esse trabalho. Aos ensinamentos que ele me proporcionou não apenas sobre Ciência mas também sobre a vida.

Agradeço, também, as pessoas que auxiliaram na realização dos experimentos e aos professores que permitiram o uso dos equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

- **Síntese do ponto quântico (CdTe)543MPA:**
 - Dr^a Lilian P. Franco, Dr^a. Simoni A. Cicillini, Dr^a. Juliana C. Biazoto e Prof. Dr. Roberto Santana, Depto. Física e Química – FCFRP-USP
- **Síntese dos pontos quânticos (CdSe/ZnS)558Cys e (CdSe/ZnS)575Cys:**
 - Prof. Dr. Vladimir A. Kuzmin, Emanuel Institute of Biophysical Chemistry, RAS-RU, Moscou, Rússia
 - Prof. Dr. Vladimir A. Oleinikov, Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS-RU, Moscou, Rússia
- **Experimentos FCS/FLIM:**
 - Marina Berardi Barioni e Wallace Moreira Pazin, Laboratório de Fotobiofísica, Depto. de Física, FFCLRP-USP
- **Cálculos teóricos de Química Quântica**
 - Prof. Dr. Sérgio E. Galembeck, Depto. de Química – FFCLRP-USP
- **Experimentos monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett**
 - Prof^a. Dr^a. Galina Borissevitch, UniSEB- Centro Universitário, Ribeirão Preto
 - Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ramos, Depto. de Química – FFCLRP-USP
- **Experimentos DLS e medidas de potencial zeta:**
 - Prof^a. Dr^a. Ana Paula Ramos, Depto. de Química – FFCLRP-USP

A minha família, Hélio, Cláudia, Marina, Carla, sempre presente em minha vida.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiofísica – DF-FFCLRP-USP

Ao DF-FFCLRP-USP pela infraestrutura, a CAPES, ao CNPq (Processo nº141162/2011-2) e a FAPESP (Processo nº 2011/20606-5) pelo apoio financeiro, fornecido na forma de bolsa, ao longo de todo o trabalho.

“...um cientista deve, acima de tudo, ser como uma criança. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independentemente daquilo ser o que ele imaginava ver ou não. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão, você só vai ver o que você espera ver. A maioria dos cientistas esquece disso.”...

**Douglas Adams em Até Mais, e Obrigado Pelos Peixes!
Coleção O Guia do Mochileiro das Galáxias - Vol. 4**

“Será isto verdade ou mera fantasia vã?”
Eurípedes, Ion (cerca de 410 a.C.)

Resumo

PARRA, G. G. **Interação de pontos quânticos com fotossensibilizadores orgânicos na presença de estruturas nano-organizadas**. 2015. 148p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O sucesso de tratamento de câncer depende do seu diagnóstico e tratamento nas etapas iniciais da doença. Isso estimula a busca de novos métodos de diagnóstico e de tratamento sensíveis e tecnicamente simples. Entre esses métodos, o diagnóstico por fluorescência (DPF) e a fotoquimioterapia (FQT) atraem uma atenção especial, sendo não invasivos, sensíveis e fácil de usar. Os fotossensibilizadores (FS) atualmente utilizados em DPF e FQT são corantes orgânicos, os quais possuem algumas desvantagens, tais como instabilidade fotoquímica e baixa seletividade. Os pontos quânticos (PQ) são candidatos promissores para substituírem os FS clássicos por serem fotoestáveis, apresentarem amplo e intenso espectro de absorção óptica e luminescência com alto rendimento quântico. Contudo a interação entre FS clássicos e os PQ pode aumentar a eficiência de ambos devido a transferência de energia entre eles. O objetivo geral deste trabalho foi estudar os processos da interação de FS orgânicos (as porfirinas PPh, TMPyP e TPPS₄) com PQs (CdTe e CdSe/ZnS), funcionalizados com diferentes grupos, em solução aquosa e na presença de modelos nano-organizados de estruturas biológicas com a finalidade de avaliar seu potencial para aplicação em Fotoquimioterapia e Diagnóstico por Fluorescência. Dedicamos especial atenção aos processos de transferência de energia e de carga entre os PQs e os FS. Os PQs interagem efetivamente com as PPh, cuja interação se manifesta pelas mudanças da intensidade e do perfil dos espectros e das curvas de decaimento da luminescência de PQ e da porfirina, do tamanho das partículas espalhadoras na solução, do potencial zeta dentre outros parâmetros espectroscópicos e físico-químicos. Dentro das soluções aquosas homogêneas, o PQ e as PPh podem formar agregados mistos (PQ&PPh&PQ) ou simples (PQ&PPh) e a interação entre eles realiza-se através de mecanismos de curto e/ou longo alcance, dependendo do grupo funcional do PQ. Entretanto, a interação eletrostática repulsiva entre o PQ e outro composto pode estimular a desagregação dos PQs induzindo o aumento na intensidade da sua luminescência e do seu tempo de vida, provocando um aumento na contribuição dos

tempos longos do decaimento da luminescência associados com a superfície do PQ. Essas relações entre o tipo de interação do PQ e da PPh podem ser extrapoladas aos sistemas que contêm PQ na presença de estruturas nano-organizadas.

Palavras-chave: 1. Ponto quântico. 2. Fotossensibilizador orgânico. 3. Transferência de energia. 4. Transferência de carga. 5. Sistema biomimético nano-organizado. 6. Fotoquimioterapia e Diagnóstico por fluorescência.

Abstract

PARRA, G. G. **Interaction of quantum dots with organic photosensitizers in the presence of nano-organized structures**. 2015. 148p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The success of cancer treatment depends on the diagnosis and treatment in the early stages of the disease. This stimulates the research for new methods of sensitive diagnosis and technically simple treatment. Among these methods, the Optical Bioimaging by fluorescence (OBI) and Photochemotherapy (PCT) attract special attention, being non-invasive, sensitive and friendly use. The photosensitizers (PS) currently used in the OBI-PCT are organic dyes, which have some drawbacks such as photochemical instability and low selectivity. Quantum Dots (QD) are promising candidates to replace the classic PS being photostable, present broad and intensive spectrum of optical absorption and luminescence and, high quantum yield. Therefore the interaction between QDPS and the classic PS can increase the efficiency of both due to energy transfer between them. The aim of this work was to study the processes of organic PS interaction (porphyrins PPh, TMPyP and TPPS₄) with QDs (CdTe and CdSe/ZnS), functionalized with different groups in aqueous solution and in the presence of nano-organized models of biological structures with order to evaluate its potential for use in Photochemotherapy and Optical Bioimaging. We devote special attention to energy transfer processes and cargo between the QDs and PS. The QDs effectively interact with PPh, whose interaction is manifested by changes in the intensity and profile of spectra and luminescence decay curves of QD and the porphyrin, the linear size of the scattering particles in the solution, the zeta potential among other spectroscopic and physical chemistry parameters. Within the homogeneous aqueous solutions, QD and PPh can form mixed aggregates (QD&PPh&QD) or simple (QD&PPh) and the interaction between them is carried out through short mechanisms and/or long range, depending on the functional group of the QD. However, the repulsive electrostatic interaction between the QD and another compound may stimulate the breakdown of QDs inducing the increase in the intensity of their luminescence and its lifetime, causing an increase in the contribution of long time decay of the

luminescence associated with the surface of QD. These relationships between the type of interaction of the QD and PPh can be extrapolated to systems containing QD in the presence of nano-organized structures.

Keywords: 1. Quantum Dots. 2. Photosensitizer. 3. Energy transfer. 4. Charge transfer. 5. Nano-organized system. 6. Photochemotherapy and Optical bioimaging.

Lista de Figuras

Figura 1. O esquema estrutural “core-shell” é o mais comum em nanocristais semicondutores. Os PQ são compostos por um núcleo revestido por uma capa (shell) de outro material semicondutor. Esse tipo de abordagem permite o aumento do rendimento quântico dos PQ.	26
Figura 2. Pontos quânticos de CdSe/ZnS emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda conforme seu tamanho varia (A). O confinamento quântico dos elétrons nesses nanocristais seria o responsável por tal comportamento. (B Previsão de mercado para dispositivos nas diferentes áreas que utilizam PQ. Adaptado de [49].	30
Figura 3. Exemplos de alguns tipos de pontos quânticos com seus respectivos tamanhos em função do comprimento de onda de emissão de luminescência (A) e pontos quânticos de tamanhos diferentes – mesmo material CdSe/ZnS – excitados por uma fonte monocromática (linha azul clara) (B). Retirado de [16].	31
Figura 4. Esquema da utilização dos PQ para entrega e tratamento seletivo de doenças. Ao ligar-se com a droga a luminescência do PQ é suprimida. A superfície funcionalizada do PQ confere a seletividade à nanopartícula, facilitando a internalização do PQ na célula. O ponto quântico é ativado através de luz, liberando a droga desejada. O ponto quântico pode ser utilizado como localizador de células doentes contribuindo para o diagnóstico e concomitantemente o tratamento da doença. Retirado de [31].	31
Figura 5. Aplicação dos PQ em medicina e biologia. Uso dos PQ no diagnóstico por luminescência para doenças como o câncer e uso como sonda luminescente em biologia celular. Pontos quânticos de tamanhos variados podem ser utilizados concomitantes para diagnosticar diferentes órgãos e organelas celulares. Retirado de [14].	32
Figura 6. Densidade de estados para sistemas com 3 dimensões (a), 2 dimensões (b), 1 dimensão (c) e quase-zero-dimensão (d). Retirado de [56].	35
Figura 7. Processo vertical de absorção de um fóton resultando na formação de um par elétron-buraco (a) e outra representação do processo apresentado em (a). Retirado de [45].	36
Figura 8. Distâncias para difusão de um supressor Q em função do tempo. A equação é dada pela distância quadrática média $\Delta x^2 = 2D\tau$, para τ o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo. Retirado de [32].	44
Figura 9. Esquema dos níveis moleculares envolvidos na transferência de energia pelo mecanismo de Förster. Retirado de [32].	48
Figura 10. Esquema da transferência de energia por interação de troca entre o estado excitado LU da molécula doadora e o estado excitado HO da molécula aceitadora. Adaptado de [32].	50
Figura 11. Tipos de interações envolvidas nos mecanismos não radiativos de transferência de energia. Adaptado de [72].	53
Figura 12. Exemplo de transferência de carga por fotoexcitação num ponto quântico. Retirado de [76].	54

Figura 13. Modelo da Cuba de Langmuir (270x170x15 mm) utilizada nos experimentos de monocamadas de Langmuir e para confecção dos filmes de Langmuir-Blodgett através da técnica de deep-coating (modelo obtido com o software sketchup®).....	58
Figura 14. Esquema da montagem experimental de um sistema típico de espectroscopia de correlação de fluorescência, que permite medidas de fluorescência com resolução temporal acoplado à microscopia confocal. O canal de excitação (linha azul-verde) e canal de detecção (linha verde) para medidas que utilizam um canal (single-channel) e para cross-correlation (linhas verde e laranja). Retirado de [90]......	60
Figura 15. Esquema de uma cuba de Langmuir. O motor de passo move a barreira fixa que comprime os lipídios espalhados na superfície da subfase aquosa. A pressão superficial em função da área média por molécula é então medida pelo sensor de pressão. Adaptada de [38]......	63
Figura 16. Exemplos de isotermas (π -A) de diferentes fosfolipídios em diferentes fases. Retirada de [91].	63
Figura 17. Estrutura química das moléculas utilizadas para funcionalizar a superfície dos pontos quânticos estudados neste trabalho.....	66
Figura 18. Estrutura básica de porfirinas.....	67
Figura 19. Estrutura das porfirinas utilizadas neste projeto.	68
Figura 20. Estruturas dos fosfolipídios utilizados nos experimentos de medida de pressão superficial estática e dinâmica. A interação estudada foi entre o ponto quântico (CdSe/ZnS)PEG e as porfirinas TPPS ₄ e TMPyP na presença de cada fosfolipídio.	70
Figura 21. (A) Absorção e emissão normalizada para dois pontos quânticos (CdSe/ZnS) de tamanhos diferentes com superfície funcionalizada com polietileno glicol (PEG), em meio aquoso: PQ535PEG (linhas pretas) e PQ570PEG (linhas vermelhas); e (B) perfil de decaimento de luminescência destes PQs em meio aquoso.	72
Figura 22. (A) Absorção normalizada (linha preta) e emissão normalizada do ponto quântico (CdTe)543MPA com superfície funcionalizada com ácido 3-Mercaptopropiônico (MPA) em meio aquoso; e (B) perfil de decaimento de luminescência deste PQ em meio aquoso.	73
Figura 23. (A) Absorção e emissão normalizada para dois pontos quânticos (CdSe/ZnS) de tamanhos diferentes com superfície funcionalizada com cisteína (Cys), em meio aquoso: PQ558Cys (linhas pretas) e PQ575Cys (linhas vermelhas); e (B) perfil de decaimento de luminescência destes PQs em meio aquoso.	73
Figura 24. (A) Absorção e emissão normalizada para os dois fotossensibilizadores usados neste trabalho, em meio aquoso: TPPS ₄ (linhas pretas) e TMPyP (linhas vermelhas); (B) espectro de absorção dos FS em meio aquoso e (C) amplificação do espectro de absorção; e (D) perfil de decaimento de fluorescência destas porfirinas em meio aquoso.	74
Figura 25. Supressão da luminescência do (CdSe/ZnS)570PEG pela TPPS ₄ em experimentos no estado estacionário e os espectros de absorção das porfirinas TMPyP (traço vermelho) e TPPS ₄ (traço preto) (A) e com resolução temporal (B). Em ambos os casos as amostras foram excitadas em $\lambda = 470$ nm.	76
Figura 26. Curva de supressão de Stern-Volmer para o par (CdSe/ZnS)570PEG+TPPS ₄ : (A) não modificada (B) modificada.....	76
Figura 27. Formação de agregados mistos tipo rede pela interação entre o ponto quântico e a porfirina.....	79

Figura 28. Espectro de espalhamento de luz ressonante do par PQ (CdSe/ZnS)570PEG na ausência e na presença da porfirina TPPS ₄ .	79
Figura 29. Dependência linear da curva de supressão de Stern-Volmer com resolução temporal do par (CdSe/ZnS)570PEG+TPPS ₄ .	80
Figura 30. Aumento da intensidade (A) e do tempo de vida (B) da fluorescência da TPPS ₄ com o aumento da concentração do (CdSe/ZnS)570PEG. Na presença de TMPyP não houve mudança significativa na intensidade nem no tempo de vida da luminescência do (CdSe/ZnS)570PEG.	81
Figura 31. Supressão da luminescência do (CdTe)543MPA pela TPPS ₄ em experimentos no estado estacionário e o espectro de absorção da porfirina TPPS ₄ (traço) (A) e com resolução temporal (B). Em ambos os casos as amostras foram excitadas em $\lambda = 470$ nm.	83
Figura 32. Curva de supressão de Stern-Volmer para o par (CdTe)543MPA+TPPS ₄ com dependência não linear para o experimento no estado estacionário (A) e com resolução temporal (C). Ajustes com a equação de Stern-Volmer modificada para os experimentos de supressão no estado estacionário (B) e com resolução temporal (D).	84
Figura 33. Espectros de espalhamento de luz ressonante do par (CdTe)543MPA+TPPS ₄ com sucessivas adições da porfirina.	86
Figura 34. Na adição do PQ (CdTe)543MPA não houve mudança significativa na intensidade da fluorescência da porfirina TPPS ₄ , indicando ausência de FRET.	86
Figura 35. Curva de supressão de Stern-Volmer para o par (CdTe)543MPA+TMPyP: (A) dependência não linear para o experimento no estado estacionário e (B) dependência linear para o experimento com resolução temporal.	87
Figura 36. Espectro de espalhamento de luz ressonante do par do PQ (CdTe)543MPA na ausência e na presença da porfirina TMPyP.	88
Figura 37. Mudança no espectro de absorção da porfirina TMPyP(A) e na intensidade de fluorescência (B) com a adição de (CdTe)543MPA com aparecimento de ponto isobéstico ($\lambda = 438$ nm) em (A).	89
Figura 38. Transferência de carga entre a TMPyP e o PQ (CdTe)543MPA em função da concentração da porfirina. A concentração do [PQ] = $1,5 \times 10^{-6}$ M.	90
Figura 39. Mudança no espectro de absorção da porfirina TMPyP com aparecimento de ponto isobéstico (A) e na intensidade de fluorescência com deslocamento da banda de emissão (C) a partir da adição de (CdTe)543MPA, $\lambda_{ex} = 436$ nm.	90
Figura 40. Mudança no espectro de excitação de fluorescência com a formação do complexo (PQ...TMPyP) em função da concentração do PQ. Os espectros foram obtidos com $\lambda_{em} = 660$ nm.	91
Figura 41. Curvas de decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP e do complexo (PQ...TMPyP) formado a partir da interação da porfirina com o ponto quântico (CdTe)543MPA. As curvas de decaimento de fluorescência representam a emissão da porfirina ($\lambda_{em} = 660$ nm) para a amostra contendo apenas TMPyP (linha preta) e para o complexo (linha vermelha). A emissão do complexo ($\lambda_{em} = 632$ nm) é representada pela linha verde.	91

- Figura 42. Espectros de espalhamento de luz ressonante da formação do complexo (PQ...TMPyP) em função da concentração do PQ.92
- Figura 43. Imagem do complexo (PQ...TMPyP) formado a partir de $20 \times 10^{-9} \text{ M}$ de porfirina TMPyP na presença de $4,55 \times 10^{-11} \text{ M}$ do ponto quântico (CdTe)543MPA (A) e.; histograma utilizado para gerar a imagem (C) dos tempos de vida de luminescência (FLIM).93
- Figura 44. Formação do complexo (PQ...TMPyP) resultado da interação entre o ponto quântico (CdTe)543MPA e a porfirina TMPyP. O anel porfirínico interage diretamente com o grupo carboxílico do MPA que funcionaliza o PQ, resultado na transferência de carga do PQ para a PPh.94
- Figura 45. Geometrias encontradas através dos cálculos teóricos de Química Quântica considerando o efeito de solvente para a TMPyP (A) e para o complexo (PQ...TMPyP)(B). O anel porfirínico em (A) é plano, porém ao transferir carga para o grupo carboxilato do MPA (B), o anel central é distorcido provocando mudanças nos ângulos diedrais entre os quatro grupos radicais e o anel central da porfirina.95
- Figura 46. Geometrias encontradas através dos cálculos teóricos de Química Quântica considerando o efeito de solvente para a TMPyP (A) e para o complexo (PQ...TMPyP) (B).96
- Figura 47. A formação do complexo (PQ...TMPyP) é dinâmica. Formação do complexo em função do tempo para $[\text{TMPyP}] = 5,1 \times 10^{-6} \text{ M}$ e $[\text{PQ}] = 80 \times 10^{-9} \text{ M}$ (A) e as cinéticas de consumo da TMPyP com a respectiva cinética de formação do complexo (B). Da mesma forma os espectros de emissão (C) e espalhamento de luz ressonante durante a cinética de formação do complexo (PQ...TMPyP), nas mesmas condições.97
- Figura 48. Cinética de consumo da TMPyP (abs 421nm) e a respectiva cinética de formação do complexo (abs 461 nm) para $[\text{PQ}] = 8 \times 10^{-9} \text{ M}$98
- Figura 49. Decaimentos monoexponencial do estado excitado tripleto da TMPyP e do complexo (PQ...TMPyP). O tempo de vida do tripleto para a TMPyP foi $175 \mu\text{s}$ e para o complexo $53 \mu\text{s}$ (A) e espectro diferencial normalizado do estado tripleto da porfirina TMPyP e do complexo (PQ...TMPyP) (B). Máximo de absorção do estado tripleto em: $\lambda = (470 \pm 5) \text{ nm}$ para TMPyP (—■—) e $\lambda = (495 \pm 5) \text{ nm}$ para (PQ...TMPyP) (—●—).99
- Figura 50. Curvas normalizadas do decaimento do estado tripleto em $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ em função da concentração do PQ. A concentração do oxigênio no experimento (A) foi $[\text{O}_2] \sim 0,3 \text{ mM}$ (atm) e no experimento (B) $[\text{O}_2] \sim 1,5 \text{ mM}$ 100
- Figura 51. Aumento da luminescência do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys quando adicionadas alíquotas da porfirina TPPS₄ (A). Os espectros de luminescência do PQ foram obtidos excitando em $\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ (excitação do PQ apenas) e $\lambda_{\text{em}} = 558 \text{ nm}$ (emissão do PQ apenas) e (B) mudança nos perfis de decaimento de luminescência do ponto quântico ($\lambda_{\text{ex}} = 460 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 558 \text{ nm}$) quando adicionado alíquotas de TPPS₄. 102
- Figura 52. A interação entre o (CdSe/ZnS)558Cys e a TPPS₄ não altera os espectros de absorção ótica (A) e a adição de TPPS₄ diminui a intensidade de espalhamento de luz ressonante do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys (B). 103
- Figura 53. Diminuição da intensidade de espalhamento de luz ressonante (ELR) do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys quando a solução inicial foi submetida a sucessivas diluições. Hipótese de que o

(CdSe/ZnS)558Cys encontra-se na forma agregada. A intensidade da ELR foi corrigida em acordo com a diluição da solução do PQ.	104
Figura 54. Determinação do rendimento quântico de luminescência do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys em função da concentração do PQ. O aumento do rendimento quântico de luminescência indica que o ponto quântico sofre desagregação conforme a solução é diluída.	104
Figura 55. Esquema de interação entre o ponto quântico (CdSe/Zns)558Cys e a porfirina TPPS ₄ . Uma dentre as quatro cargas negativas da porfirina interage de forma atrativa com o grupo –R–NH ₃ ⁺ da cisteína, enquanto que as outras três cargas da porfirina são repelidas pela carga do grupo –R–COO ⁻ da cisteína.	105
Figura 56. Variação dos tempos médios τ_2 e τ_3 do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys na presença da TPPS ₄ (A) e (B), e ao sofrer sucessivas diluições da solução original de PQ (C) e (D).	106
Figura 57. Aumento da luminescência do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys quando adicionadas alíquotas do sal iodeto de sódio NaI (A). Os espectros de luminescência do PQ foram obtidos excitando em $\lambda_{ex} = 460$ nm (excitação do PQ apenas) e $\lambda_{em} = 558$ nm (emissão do PQ apenas) e (B) mudança nos perfis de decaimento de luminescência do ponto quântico ($\lambda_{ex} = 460$ nm e $\lambda_{em} = 558$ nm) quando adicionado alíquotas de NaI. Variação dos tempos médios τ_2 (C) e τ_3 (D) do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys na presença do sal NaI.	107
Figura 58. Constantes de interação (K_M) obtidas para a TPPS ₄ (A) e para o sal NaI (B). A constante K_M é semelhante à constante de Stern-Volmer e foi obtida segundo [124].	108
Figura 59. Espectros de absorção ótica para concentração fixa do ponto quântico com adição de BSA (A) e para concentração fixa de BSA com adição de ponto quântico (B). Não há alteração do espectro de absorção do PQ na presença da BSA.	110
Figura 60. Aumento da luminescência do ponto quântico quando (CdSe/ZnS)575Cys adicionadas alíquotas de BSA (B). Os espectros de luminescência do PQ (A) foram obtidos excitando em $\lambda_{ex} = 450$ nm (excitação do PQ apenas) e $\lambda_{em} = 575$ nm (emissão do PQ apenas). (C) Mudança nos perfis de decaimento de luminescência do ponto quântico ($\lambda_{ex} = 450$ nm e $\lambda_{em} = 575$ nm) quando adicionado alíquotas de BSA. O tempo τ_1 permaneceu constante enquanto que os tempos τ_2 e τ_3 aumentaram. Indicação de interação da BSA com a superfície do ponto quântico.	110
Figura 61. Modelo em fita da molécula de albumina do soro bovino (BSA). Os resíduos coloridos em vermelho possuem carga líquida positiva: lisina (Lys), histidina (His) e arginina (Arg); os resíduos coloridos em azul possuem carga líquida negativa: ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu); e resíduos com carga líquida nula estão coloridos em cinza. Os dois resíduos de triptofano (Trp) presentes na molécula de BSA estão indicados em verde como Trp-134 e Trp-213, respectivamente.	111
Figura 62. Estruturas dos aminoácidos da BSA que possuem carga líquida diferente de zero. Os aminoácidos ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) possuem carga líquida negativa e os aminoácidos lisina (Lys), arginina (Arg) e histidina (His) possuem carga líquida positiva.	112
Figura 63. Espectros de dicroísmo circular da albumina do soro bovino: BSA apenas (preto), na presença do ponto quântico (vermelho), da porfirina TMPyP ou TPPS ₄ (verde) e do complexo PPh&PQ (azul).	113

- Figura 64. (A) Estrutura em fita da molécula de BSA com os domínios I, II e III e seus respectivos subdomínios, retirado de [43]; e B) Modelo de preenchimento espacial da molécula de BSA com a região destacada onde se encontram os resíduos de Triptofano: Trp-134 (região mais externa) e Trp-213 (região mais interna); e C) modelo em fita da molécula de BSA..... 114
- Figura 65. Supressão estática da fluorescência do triptofano ($\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$) pela adição de PQ. (A) Supressão da fluorescência do triptofano quando adicionado alíquotas de PQ observada no experimento de estado estacionário e (B) não há mudança no perfil de decaimento no tempo de vida de fluorescência do triptofano. 115
- Figura 66. Anisotropia estática de fluorescência do sistema (A) concentração fixa de PQ $\sim 500 \text{ nM}$ e adição de alíquotas de BSA da solução estoque $[\text{BSA}] = 2,0 \text{ mM}$, e (B) concentração fixa de BSA $= 150 \mu\text{M}$ e adição de alíquotas PQ. Em ambos os experimentos o volume inicial foi de $2,0 \text{ mL}$ 116
- Figura 67. Indicação de agregação entre a BSA e o PQ em (A) aumento da intensidade de espalhamento ressonante de luz e (B) anisotropia estática de fluorescência do sistema com excitação do PQ ($\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$) e excitação do triptofano ($\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$). Os dados em preto e vermelho correspondem a concentração fixa de PQ com adição de BSA e os dados em verde e azul a concentração fixa de BSA com adição de PQ. Os valores em azul correspondem aos raios hidrodinâmicos (em nm) obtidos através da técnica de *DLS* e os valores em vermelho aos potenciais zeta (em mV). 118
- Figura 68. Isotermas π -A para as monocamadas de Langmuir de (A, B) DMPA e (C, D) DPPC em diferentes subfases: (preto)-água pura; (vermelho)-PQ; (azul)-PPh; (verde)-PPh&PQ. As respectivas porfirinas estão indicadas na legenda da figura. 120
- Figura 69. Áreas médias ocupadas por PPh, PPh&PQ ou PQ em função da pressão superficial para as monocamadas de Langmuir (A) DMPA e (B) DPPC..... 122
- Figura 70. Espectros de absorção UV-Vis dos filmes LB para: (A e B) DMPA e (C e D) DPPC. Os filmes LB foram transferidos a partir da subfase contendo PQ (preto), PPh (vermelho) e PPh&PQ (azul). Os filmes LB continham 5 camadas de deposição através da técnica de deep-coating em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ segundo o procedimento experimental em [103]. 123
- Figura 71. Imagens FLIM em modo intensidade para os filmes LB. 130
- Figura 72. Níveis de energia e funções de onda para (a) partícula em um poço de potencial infinito, e (b) partícula em um poço de potencial finito U_0 . (c) Curva de dispersão de uma partícula livre. Os pontos sobre estas curvas são os valores de energia quantizada para uma partícula dentro de uma caixa, para n tendendo ao infinito o regime clássico é atingido. Retirado de [45]. 143

Lista de Tabelas

Tabela 1 Dependência da constante de Förster em função do tipo de interação para transições permitidas na transferência de energia por interação multipolar.....	50
Tabela 2 Configurações utilizadas para obter as imagens FLIM, em que N.A. é o número de abertura da lente utilizada e λ_{ex} é o comprimento de onda de excitação da fonte.	57
Tabela 3 Características dos pontos quânticos estudados neste trabalho	72
Tabela 4 Características espectroscópicas e físico-química das porfirinas usadas nos estudos	74
Tabela 5 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação de diferentes pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh obtidos em experimentos no estado estacionário	77
Tabela 6 Tamanho linear e potencial zeta do sistema contendo o ponto quântico (CdSe/ZnS)PEG em função do tamanho do ponto quântico e da concentração de porfirina.....	78
Tabela 7 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação de diferentes pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh obtidos em experimentos com resolução temporal.....	80
Tabela 8 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação do par (CdTe)543MPA+TPPS ₄ obtidos em experimentos no estado estacionário e com resolução temporal	85
Tabela 9 Tamanho linear e potencial zeta do sistema contendo o ponto quântico (CdTe)543MPA em função da concentração de porfirina TPPS ₄	85
Tabela 10 Tamanho das partículas e potencial zeta do sistema contendo o ponto quântico (CdTe)543MPA em função da concentração de porfirina TMPyP	88
Tabela 11 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação do par (CdTe)543MPA+TMPyP obtidos em experimentos no estado estacionário e com resolução temporal	88
Tabela 12 Valor da concentração inicial e final da TMPyP e da TMPyP ligada ao PQ em função da concentração do inicial do PQ, $[PQ]_0$ e os respectivos tempos de formação (τ_1) e separação (τ_{-1}) do complexo.....	98
Tabela 13 Valores do tamanho do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys em função da sua concentração. A diminuição desses valores indica a desagregação do PQ	103
Tabela 14 Potencial zeta e raio hidrodinâmico para diferentes razões [BSA]/[PQ]	112
Tabela 15 Anisotropia estática de fluorescência do PQ em função de sua concentração. O valor de $A_{estático}$ não varia com a concentração do PQ.....	116
Tabela 16 Anisotropia estática de fluorescência da BSA em função de sua concentração. O valor de $A_{estático}$ fica constante para $[BSA] \geq 5,00 \mu M$	116

Tabela 17 Potencial zeta de superfície (ζ) dos filmes LB contendo fosfolipídios na presença de PQ, PPh e agregado misto PQ&PPh&PQ.....	125
Tabela 18 Intensidade de fluorescência das imagens FLIM para os filmes LB-DMPA e DPPC transferidos na presença de PPh e PPh&PQ.....	128

Lista de Abreviaturas e Siglas

Arg	Aminoácido arginina
Asp	Aminoácido ácido aspártico
BSA	Albumina de soro bovino
Cys	Aminoácido cisteína
DC	Dicroísmo Circular
DLS	Espalhamento dinâmico de luz, da sigla em inglês (Dynamic Light Scattering)
DMPA	1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
ELR	Espalhamento de Luz Ressonante
FQT	Fotoquimioterapia
FRET	Transferência de energia por ressonância de Förster
FS	Fotossensibilizador
Glu	Aminoácido ácido glutâmico
His	Aminoácido histidina
LB	Langmuir-Blodgett
Lys	Aminoácido lisina
MPA	Ácido mercaptopropiônico
PEG	Polietileno glicol
PPh	Porfirina
PQ	Ponto Quântico
QY	Rendimento quântico de fluorescência, da sigla em inglês (Quantum Yield)
TC	Transferência de carga
TE	Tunelamento de elétrons
TFD	Terapia Fotodinâmica
TMPyP	Porfirina meso-tetrametilpiridil
TPPS ₄	Porfirina meso-tetrasulfonatofenil
Trp	Aminoácido triptofano

Lista de Símbolos

τ_T	Tempo de vida do estado tripleto
S_0	Estado fundamental singleto
S_1	Estado excitado singleto de menor energia
T_1	Estado excitado tripleto de menor energia
3O_2	Estado fundamental tripleto do oxigênio
1O_2	Estado excitado singleto do oxigênio
I_{ELR}	Intensidade de espalhamento de luz ressonante
$A_{estático}$	Valor de anisotropia estática
ε	Coeficiente de absorção molar
λ_{Soret}	Comprimento de onda com máxima absorção da banda de Soret
τ_m	Tempo de vida médio de fluorescência/luminescência
ζ	Potencial zeta
R_h	Raio hidrodinâmico
K_{SV}	Constante de supressão de Stern-Volmer
f_a	Fração de fluoróforos acessíveis ao supressor
K_a	Constante de Stern-Volmer para a fração acessível f_a
k_q	Constante de supressão bimolecular
ϕ_{fl}	Rendimento quântico de fluorescência

Sumário

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas.....	xix
Lista de Símbolos	xx
Capítulo 1 – Introdução.....	24
1.1 Objetivos	27
1.1.1 Objetivo geral	27
1.1.2 Objetivos específicos.....	28
Capítulo 2 – Pontos Quânticos.....	29
2.1 Pontos Quânticos – Visão Geral	29
2.2 Estruturas com Dimensões Nanométricas: de Quantum Wells a Quantum Dots.....	32
2.2.1 Densidade de Estados em Estruturas de Dimensões Nanométricas.....	33
2.2.2 Elétrons, Buracos e Éxcitons.....	35
2.2.3 Confinamento Quântico Fraco	38
2.2.4 Confinamento Quântico Forte.....	40
2.3 Propriedades fotofísicas dos Pontos Quânticos.....	41
Capítulo 3 - Processos de Transferência de Energia e de Carga	43
3.1 Supressão de estados excitados	43
3.2 Processos de transferência de energia.....	46
3.2.1 Aspectos gerais de transferência de energia: radiativa e não radiativa	46
3.2.2 Transferência de energia por interação eletrostática de longo alcance.....	47
3.2.3 Transferência de energia por interação eletrostática de curto alcance	49
3.2.4 Transferência de energia por interação de troca de elétrons.....	50

3.2.5 Diferenças entre os mecanismos de longo e curto alcance	51
3.3 Processos de transferência de carga	53
Capítulo 4 – Instrumentação e Aspectos Experimentais	56
4.1 Instrumentação.....	56
4.1.1 Medidas de fluorescência com resolução temporal	58
4.1.2 Imagens por tempo de vida de fluorescência (FLIM)	59
4.1.3 Espectroscopia por correlação de fótons (Espalhamento dinâmico de luz)	61
4.1.4 Monocamadas de Langmuir	62
4.2 Aspectos experimentais	65
4.2.1 Formação das monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett	65
4.2.2 Objetos de estudo	66
4.2.2.1 Pontos Quânticos.....	66
4.2.2.2 Porfirinas	67
4.2.3 Modelos nano-organizados de estruturas biológicas	68
4.2.3.1 Albumina do Soro Bovino (BSA)	68
4.2.3.2 Fosfolipídios	69
Capítulo 5 – Resultados e Discussão.....	71
5.1 Características espectroscópicas dos pontos quânticos estudados	71
5.2 Características espectroscópicas dos fotossensibilizadores estudados	73
5.3 Interações PQ-FS: efeitos da funcionalização da superfície	75
5.3.1 PQ funcionalizados com polietileno glicol (PEG)	75
5.3.2 PQ funcionalizado com ácido mercaptopropiônico (MPA)	83
5.3.3 PQ funcionalizados com cisteína (Cys)	102
5.4 Interações PQ-FS na presença de sistemas nano-organizados - modelos de estruturas biológicas	109
5.4.1 Albumina do Soro Bovino (BSA).....	109
5.4.2 Monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett	119
5.4.2.1 Monocamadas de Langmuir.....	119
5.4.2.2 Características óticas dos filmes LB	123
5.4.2.3 Potencial superficial ζ dos filmes LB.....	124
5.4.2.4 Imagens de FLIM dos filmes LB	127

Capítulo 6 – Conclusões	132
Referências	134
APÊNDICE A – Fundamentos da Mecânica Quântica	142
A.1 Partícula em uma Caixa – 1D	142
A.2 Partícula em uma Caixa – 3D	145
A.3 Elétron em um Potencial Coulombiano	146
A.4 Átomo de Hidrogênio	147

Capítulo 1 – Introdução

O sucesso de tratamento de câncer depende do seu diagnóstico nas etapas iniciais de aparecimento do tumor. Um dos métodos de diagnóstico, não invasivo, sensível e tecnicamente simples, permite detectar e acompanhar o processo de tratamento em tempo real é o diagnóstico por fluorescência (DPF) [1,2]. A eficiência desse método é maior quando o composto fotoativo (fluoróforo, FL) usado possui alta afinidade seletiva com o tecido tumoral, alto rendimento quântico de fluorescência sob ação da luz UV-Visível, alta fotoestabilidade e não tóxico no escuro.

O tratamento do câncer através da fotoquimioterapia (FQT) [3] baseia-se na introdução no organismo do paciente de um composto fotoativo (fotossensibilizador, FS), que deve possuir alta absorção óptica na região espectral com $600\text{ nm} < \lambda < 800\text{ nm}$ (“janela terapêutica”) [4,5] e produzir sob ação dessa luz espécies ativas que induzem a morte celular, possuir afinidade seletiva com o tecido tumoral, ser fotoestável e não tóxico no escuro.

Além de diagnóstico e tratamento de câncer os métodos DPF e FQT são aplicados com sucesso no tratamento de outras doenças, tais como psoríase [6], leishmaniose [7] e tratamentos odontológicos [8].

O desenvolvimento desses métodos estimula a busca por novos FL de FS não tóxicos e biocompatíveis que, ao serem excitados na região espectral do UV-Visível emitam fluorescência intensa e específica e/ou produzem espécies reativas.

Os FS e FL, empregados atualmente FQT e DPF, são em sua maioria, compostos orgânicos. Apesar das vantagens do uso desses compostos, existem algumas inconveniências. Utilizados como FL tais compostos ao serem excitados podem produzir espécies reativas, por exemplo, radicais livres, induzindo várias consequências indesejáveis, como a clivagem da molécula de DNA [3], modificação da estrutura de proteínas [9,10], ou sofrem fotodegradação diminuindo o rendimento quântico de fluorescência. Este último efeito é importante também para seu uso como FS, pois devido a sua fotodegradação eles perdem sua fotoatividade ou podem produzir fotoprodutos tóxicos. Outra desvantagem, os FS orgânicos atualmente empregados possuem baixa absorção óptica na janela terapêutica. Além disso, os FS orgânicos possuem uma tendência de se agregar em meios aquosos [11,12], diminuindo a eficiência dos FS nas

aplicações em FQT e DPF devido à diminuição dos rendimentos quântico e tempos de vida dos seus estados excitados. Para minimizar o efeito de agregação costuma-se utilizar baixas concentrações de FS tendo por acarretar a diminuição drástica da absorção do sistema. Logo, vê-se a necessidade de buscar alternativas para que mesmo em baixas concentrações os FS e FL possam ter atividade elevada.

Uma maneira viável de resolver esse problema é a transferência da energia de excitação de uma molécula doadora de energia (D) para molécula de FS ou de FL, cujo resultado final seria o aumento na intensidade de fluorescência para o caso do FL ou a formação de espécies reativas pelo FS.

Os Pontos Quânticos (PQ), ou Quantum Dots (QD) na sigla em inglês (Figura 1), nanocristais semicondutores, são caracterizados por amplo e intenso espectro de absorção óptica, fluorescência (ou luminescência) com alto rendimento quântico ($0,4 \leq \phi_{fl} \leq 0,8$) e espectro bem estreito ($FWHM < 40 \text{ nm}$) com a posição do máximo bem definido [13], e fotoestabilidade. Por esses motivos os PQ são considerados candidatos promissores a serem utilizados como FL – marcadores de estruturas celulares, imagens *in vivo* e diagnóstico por fluorescência [14–16] – ou como doadores para os atuais FS utilizados em FQT [17–19]. Estudos recentes mostraram que os pontos quânticos podem transferir sua energia de excitação para outras moléculas [18–26]. Além da transferência de energia é possível o processo de transferência de carga entre PQ e FS [20,27,28], estimulando a fotodecomposição tanto dos PQ quanto dos FS através da formação de radicais livres. Tudo isso estimula tanto os estudos de próprios PQs, como os estudos da interação entre PQ e FL/FS orgânicos em meios biológicos ou modelos.

Analisando a Figura 1, pode-se fazer um paralelo entre átomos e PQ. No limite do confinamento quântico forte (explicado posteriormente na Seção 2.3.4), o espectro de absorção óptica do PQ, assim como suas propriedades eletrônicas, é determinado pelo número de átomos (através do tamanho do PQ). Paralelamente, um átomo possui espectro discreto, dependente de seu número atômico.

Figura 1. O esquema estrutural "core-shell" é o mais comum em nanocristais semicondutores. Os PQ são compostos por um núcleo revestido por uma capa (shell) de outro material semicondutor. Esse tipo de abordagem permite o aumento do rendimento quântico dos PQ.

Os PQ são compostos inorgânicos que contém elementos (cádmio, selênio, telúrio, chumbo, gálio etc.) cuja citotoxicidade pode ser significativa mesmo em baixas concentrações. Tanto os PQ que apresentam apenas o núcleo (CdSe, CdTe, etc.) quanto os que possuem o núcleo envolvido por uma "concha" (CdSe/ZnS, por exemplo) podem liberar esses metais tóxicos na forma de íons (Cd^{2+} e Se^{2-}) quando expostos a oxidações promovidas pelo ambiente [29,30].

A funcionalização da superfície do PQ por alguns grupos funcionais reduz o contato do núcleo e da concha de PQ com o ambiente, diminuindo a degradação do PQ e sua citotoxicidade. Além de diminuir a toxicidade do PQ a escolha de grupos funcionais biocompatíveis aumenta a afinidade do PQ com tecidos e células. Mais do que isso, o uso de grupos funcionais específicos, como, por exemplo, aptâmeros, pode aumentar sua afinidade com os locais desejáveis do organismo, aumentando sua localização e transporte seletivos ("*drug delivery*") [31].

Seguindo a teoria, a eficiência do processo de transferência de energia depende da distância entre doador e aceitador de energia [32]. Na interação com estruturas nano-organizadas a distância entre o doador e o aceitador, devido a ligação com essas estruturas, pode ser diferente daquela em solução homogênea, e essa ligação vai influenciar a eficiência do processo de transferência de energia ou de carga. Tudo isso torna importante o estudo mais profundo dos efeitos de estruturas nano-organizadas na interação entre PQ e FS (ou FL).

Quando introduzido num organismo, os compostos fotoativos estarão inseridos num ambiente que contém estruturas nano-organizadas. Dentre essas, as membranas celulares e proteínas atraem um interesse especial, pois:

- A maioria dos processos, que incluem as células, está mediada pela membrana celular.
- As proteínas, especialmente as albuminas, participam nos processos de transporte dentro de organismo, possuem alta afinidade com compostos estranhos ao organismo;

Devido à complexidade da estrutura das membranas naturais como passo inicial do estudo da interação da membrana com compostos estranhos e seu efeito nos processos entre eles, geralmente são usados modelos simplificados de membrana. Entre esses modelos, encontram-se micelas [33,34], vesículas [35,36] e monocamadas de Langmuir formadas de fosfolípidos [37,38].

Para estudo da interação com proteínas geralmente são utilizadas soluções aquosas homogêneas para as albuminas [39–43].

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é estudar os processos da interação de fotossensibilizadores orgânicos— as porfirinas meso-tetrasulfonatofenil (TPPS₄) e meso-tetrametilpiridil (TMPyP), amplamente estudados no grupo de Fotobiofísica do Depto. de Física da FFCLRP-USP – com pontos quânticos (CdTe e CdSe/ZnS), funcionalizados com diferentes grupos, em solução aquosa e na presença de modelos nano-organizados de estruturas biológicas com a finalidade de avaliar seu potencial para aplicação em Fotoquimioterapia e Diagnóstico por Fluorescência. A atenção principal será dedicada para os processos de transferência de energia e de carga entre os pontos quânticos e os fotossensibilizadores orgânicos.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar os efeitos da interação entre PQ e FS nas características dos pontos quânticos
 - PQ com superfície funcionalizada por
 - Ácido mercaptopropiônico (MPA)
 - Polietileno glicol (PEG)
 - Cisteína (Cys)
- Estudar os efeitos da interação entre PQ e FS nas características dos fotossensibilizadores orgânicos
 - Carga: negativa (TPPS₄) e positiva (TMPyP)
- Estudar os efeitos da interação entre PQ e FS mediadas pelas estruturas biológicas nano-organizadas
 - Albumina do Soro Bovino (BSA)
 - Monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett formados de fosfolípidios:
 - 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato (DMPA) de caráter aniônico
 - 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) de caráter zwitteriônico
 - Os fosfolípidios acima citados foram escolhidos porque os PCs são componentes importantes das células de mamíferos, e o DMPA devido à sua utilidade para a deposição de filmes Langmuir-Blodgett (LB) [44].

Capítulo 2 – Pontos Quânticos

Os pontos quânticos (PQ) são as nanopartículas de semicondutores. Os PQ possuem características ópticas únicas: absorvendo a energia luminosa em ampla região espectral de ultravioleta até infravermelho próximo, eles emitem a fluorescência em uma banda espectral estreita, cuja posição do máximo depende tanto do tamanho do nanocristal como do tipo de semicondutor empregado. As propriedades fotofísicas singulares dos pontos quânticos são originadas a partir do confinamento quântico do par elétron-buraco. Neste capítulo, apresentaremos de forma geral os pontos quânticos. Abordaremos, os conceitos fundamentais da Mecânica Quântica envolvidos nas propriedades fotofísicas singulares dos pontos quânticos, e como essas propriedades únicas impactam em áreas diversas como as ciências da vida, meio-ambiente e energia. Este capítulo foi escrito utilizando como base, principalmente, dois livros texto Ref. [45] e Ref. [46].

2.1 Pontos Quânticos – Visão Geral

No início dos anos 1980 PQ com propriedades óticas singulares foram descritas, independentemente, por Aleksey Ekimov (ex-URSS), Louis Brus (EUA) e Arnim Henglein (Alemanha) [47,48]. Ekimov descreveu o comportamento de tais nanocristais em uma matriz vítrea enquanto que Brus e Henglein descreveram nanopartículas sintetizadas em uma suspensão coloidal aquosa. O uso dessas nanopartículas tem impactado áreas como energia, meio-ambiente, e optoeletrônica. Em 2008 o montante gerado por produtos que possuíam em sua composição pontos quânticos foi de 28,6 milhões de dólares e estimava-se que em 2013 essa quantia atingiria 721 milhões de dólares, impulsionado principalmente pelo setor de optoeletrônicos [49]. Hoje em dia já existem testes comerciais para marcação de organelas celulares, lâmpadas, TVs com tecnologia ultra-HD (ultra-High Definition) e inúmeros dispositivos que empregam pontos quânticos. Porém, o preço da fabricação (US\$3.000 a \$10.000 por grama), as condições de síntese

(temperaturas altas) e o rendimento dessa síntese são as principais barreiras para a popularização do uso desses nanocristais. Especialistas do setor de energia solar estimam que o preço deve diminuir entre 100 e 1000 vezes para que o setor possa beneficiar-se dos PQ na fabricação de painéis fotovoltaicos [49].

Figura 2. Pontos quânticos de CdSe/ZnS emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda conforme seu tamanho varia (A). O confinamento quântico dos elétrons nesses nanocristais seria o responsável por tal comportamento. (B) Previsão de mercado para dispositivos nas diferentes áreas que utilizam PQ. Adaptado de [49].

Os PQ possuem características ópticas únicas: absorvendo intensivamente a energia luminosa (coeficiente de absorção molar $\epsilon \sim 10^6\text{-}10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) em região espectral de ultravioleta até infravermelho próximo, eles emitem a fluorescência em uma banda espectral estreita (Full Width at Half Maximum, FWHM < 40nm), cuja posição do máximo depende tanto do tamanho do nanocristal como do tipo de semiconductor utilizado (ZnS, CdS, CdSe, CdSe/ZnS, CdTe ou InAs, por exemplo) [13]. O rendimento quântico da fluorescência (ϕ_{fl}) de PQ pode ultrapassar 0,8 [50], competindo com os fluoróforos orgânicos mais eficientes, tais como fluoresceína, rodamina, etc. Isso permite empregá-los como sondas fluorescentes em concentrações extremamente baixas. Além disso, os PQ possuem alta fotoestabilidade, o que permite utilizá-los por um longo período de tempo sem perda de sua eficiência. O amplo espectro de absorção óptica dos PQ é uma boa oportunidade para utilizar as fontes de iluminação com espectros de emissão diferentes e o seu alto rendimento quântico de fluorescência é vantajoso para a transferência da energia de excitação para outro fluoróforo.

Figura 3. Exemplos de alguns tipos de pontos quânticos com seus respectivos tamanhos em função do comprimento de onda de emissão de luminescência (A) e pontos quânticos de tamanhos diferentes – mesmo material CdSe/ZnS – excitados por uma fonte monocromática (linha azul clara) (B). Retirado de [16].

Por outro lado, os PQ são formados de elementos inorgânicos (cádmio, selênio, telúrio, chumbo, gálio etc.) cuja citotoxicidade pode ser significativa mesmo em baixas concentrações. Tanto os PQ que apresentam apenas o núcleo (CdSe ou CdTe, por exemplo) quanto os que possuem o núcleo cobertos com uma "concha" (CdSe/ZnS, por exemplo) podem liberar esses metais tóxicos na forma de íons (Cd^{2+} e Se^{2-}) quando expostos a oxidações promovidas pelo ambiente [29,30,51]. Contudo, caso haja um encapsulamento do PQ por um sistema biocompatível, a degradação do PQ e, consequentemente, sua citotoxicidade podem ser minimizadas. Além de diminuir a toxicidade do PQ essa incorporação gera sua compatibilidade com tecidos e células. Uso de compostos específicos, aptâmeros, por exemplo, para funcionalizar os PQ pode aumentar sua afinidade com os locais escolhidos do organismo, possibilitando seu transporte seletivo ou "*drug delivery*" [31].

Figura 4. Esquema da utilização dos PQ para entrega e tratamento seletivo de doenças. Ao ligar-se com a droga a luminescência do PQ é suprimida. A superfície funcionalizada do PQ confere a seletividade à nanopartícula, facilitando a internalização do PQ na célula. O ponto quântico é ativado através de luz, liberando a droga desejada. O ponto quântico pode ser utilizado como localizador de células doentes contribuindo para o diagnóstico e concomitantemente o tratamento da doença. Retirado de [31].

Todas essas propriedades tornam os PQ sondas fluorescentes quase ideais, o que estimula a sua aplicação para o estudo tanto para estruturas celulares quanto para biomoléculas [16,52–54].

O uso de diferentes grupos funcionais como PEG (polietilenoglicol), MPA (ácido mercaptopropiônico), cisteína, anticorpo, etc. ou deestabilizantes empregados na síntese como TOPO (Trioctylphosphine Oxid, na sigla em inglês), TGA (Thioglycolic Acid, na sigla em inglês) altera o tamanho do ponto quântico embora sem deslocar o máximo da emissão, mas pode diminuir seu rendimento quântico. Caso as funcionalizações sejam levadas em consideração, o diâmetro hidrodinâmico do PQ pode atingir até 60 nm [55]. Assim a inclusão de grupos funcionais aumenta a distância entre a região do PQ onde se localiza a energia de excitação e outras moléculas que diminui a probabilidade da transferência de energia ou do elétron do PQ para essa molécula.

Figura 5. Aplicação dos PQ em medicina e biologia. Uso dos PQ no diagnóstico por luminescência para doenças como o câncer e uso como sonda luminescente em biologia celular. Pontos quânticos de tamanhos variados podem ser utilizados concomitantes para diagnosticar diferentes órgãos e organelas celulares. Retirado de [14].

2.2 Estruturas com Dimensões Nanométricas: de Quantum Wells a Quantum Dots

Ao diminuir uma dimensão do *bulk* essa dimensão pode se tornar da mesma ordem de grandeza ou menor do que comprimento de onda de Broglie dos elétrons (λ_e), buracos (λ_h) ou raio de Bohr do éxciton (a_B), mas ainda maior do que estrutura do *bulk* (a_L). Em tal estrutura de escala reduzida, as excitações elementares – que discutiremos a seguir – poderão ser descritas

segundo a Mecânica Quântica, implicando na quantização do movimento na direção do eixo de confinamento e num movimento contínuo nas demais direções.

Nessa situação o elétron, o buraco ou o éxciton estão em confinamento quântico, semelhante ao descrito nas seções anteriores para uma partícula em uma caixa ou o átomo de hidrogênio.

2.2.1 Densidade de Estados em Estruturas de Dimensões Nanométricas

Nesta seção, iremos discutir quantitativamente a densidade de estados (DOS) em função da dimensão da estrutura avaliada. Compreender a densidade de estados é importante para entender as propriedades espectroscópicas e óticas de estruturas nanométricas, em especial os pontos quânticos.

A condição de contorno para um cristal unidimensional é dada por $k = 2\pi n/L$, sendo n o número de átomos desse cristal e L o comprimento do cristal. Aqui cabe um paralelo com o problema de uma partícula em uma caixa, no qual $k = \pi n/a$. No caso do cristal unidimensional a fase da função de onda tem que ser a mesma para as duas extremidades do cristal, já para a partícula em uma caixa a probabilidade de encontrar essa partícula nos limites da caixa tem de ser zero.

Para um cristal unidimensional, isto significa que n (o número de átomos do cristal) é dado por $kL/2\pi$. Com dimensionalidade arbitrária (D), esta equação diz:

$$n = k_D \left(\frac{L}{2\pi} \right)^D \quad (2.1)$$

O número de estados por intervalo de energia (dn/dE) pode ser escrito como:

$$\frac{dn}{dE} = \frac{dn}{dk} \frac{dk}{dE} \quad (2.2)$$

Derivando a equação 2.1 em relação a k_D e combinando com a equação 2.2, tem-se

$$\frac{dn}{dE} = \left(\frac{L}{2\pi} \right)^D \frac{dk_D}{dE} \quad (2.3)$$

Assumindo o modelo de partículas livres, a relação entre o número de onda k e a energia E é dada por (A.11), logo

$$E = \hbar^2 k^2 / 2m \Rightarrow \frac{dk}{dE} = \frac{m}{\hbar^2 k} \quad (2.4)$$

Portanto, normalizando pelo volume, tem-se

$$DOS(E) = \frac{1}{L^D} \left(\frac{L}{2\pi} \right)^D \frac{m}{\hbar^2 k} \frac{dk_D}{dk} \quad (2.5)$$

sendo D o índice da dimensão do sistema na qual a densidade de estados eletrônicos é calculada.

Portanto, partindo da equação 2.5 pode-se estabelecer a densidade eletrônica de estados para os quatro casos: 3D, 2D, 1D e 0D.

Bulk: estrutura tridimensional (3D), esfera de raio k, onde não há restrição para a mobilidade de elétrons, buracos e éxcitons.

$$DOS_3(E)dE = \frac{1}{4\pi^4} \left(\frac{2m}{\hbar^2} \right)^{\frac{3}{2}} (E - E_g)^{\frac{1}{2}} dE \quad (2.6)$$

para $E = E_g + \hbar^2 k^2 / 2m$ e $E_g \equiv$ Energia da Banda Gap

Quantum Well: estrutura bidimensional (2D), círculo de raio k, restrição de mobilidade em uma dimensão

$$DOS_2(E)dE = \frac{1}{\pi} \frac{m}{\hbar^2} dE \quad (2.7)$$

Quantum Wire: estrutura unidimensional (1D), linha de comprimento k, restrição de mobilidade em duas dimensões

$$DOS_1(E)dE = \frac{1}{2\sqrt{2\pi}} \frac{\hbar}{m^{1/2}} (E - E_g)^{-1/2} dE \quad (2.8)$$

Quantum Dot: caso adimensional (0D), a densidade de estados é descrita como uma série de funções δ . Neste caso existe restrição da mobilidade de elétrons, buracos e éxcitons em todas as três direções. Caracteriza-se por um estado quase-adimensional no qual ocorre o confinamento quântico de elétrons, buracos e éxcitons.

As quatro relações para a densidade de estados estão resumidas na Figura 6. A forma da dependência da densidade de estados de energia depende da dimensionalidade do sistema. Cada dimensão tem uma densidade de estados que depende de maneira diferente em relação a k, porém, no caso da energia há uma dependência em k^2 :

$$E(\mathbf{k}) = E_n + \frac{\hbar^2 (k_x^2 + k_y^2)}{2m_{e,h}} \quad (2.9)$$

Figura 6. Densidade de estados para sistemas com 3 dimensões (a), 2 dimensões (b), 1 dimensão (c) e quase-zero-dimensão (d). Retiradode [56].

2.2.2 Elétrons, Buracos e Éxcitons

Ao descrevermos excitações em cristais devemos descrever as excitações elementares, nas quais estão incluídas as dos elétrons (e) na banda de condução (banda ocupada de maior energia) e dos buracos (h) na banda de valência (banda desocupada de menor energia). Elétrons na banda de condução de um cristal podem ser descritos como partículas carregadas de carga $-e$, spin $1/2$, massa m_e^* e quase-momento $\hbar k$. Os parâmetros de um elétron que são mantidos tanto no vácuo quanto em um cristal são a carga e o spin. Por isso, quando tratamos elétrons na banda de condução utiliza-se a aproximação para o problema de muitos-corpos, o qual trata de interações entre um número grande de núcleos positivos e elétrons negativos, substituindo as muitas interações entre as partículas por um número reduzido de interações entre quase-partículas. Uma vez que os elétrons na banda de condução são a excitação elementar primária, os buracos na banda de valência são a excitação elementar secundária em um cristal. Um buraco é uma quase-partícula relativa a um *ensemble* de elétrons na banda de valência na qual

um elétron foi removido para a banda de condução, por exemplo. Essa excitação é caracterizada por uma carga positiva $+e$, spin $\frac{1}{2}$, massa efetiva m_h^* geralmente maior que m_e^* e um quase-momento próprio.

O estado fundamental do sistema não contém elétrons na banda de condução nem buracos na banda de valência. O primeiro estado excitado (criação de um par elétron-buraco) é o estado com um elétron na banda de condução e um buraco na banda de valência, e essa transição pode ser induzida pela absorção de fótons.

Figura 7. Processo vertical de absorção de um fóton resultando na formação de um par elétron-buraco (a) e outra resenatção do processo apresentado em (a). Retirado de [45].

Aplicando a conservação de energia e de momento, tem-se

$$\hbar\omega = E_g + E_{kin,e} + E_{kin,h} \quad (2.10)$$

$$\hbar\mathbf{k} = \hbar\mathbf{k}_e + \hbar\mathbf{k}_h \quad (2.11)$$

dos quais $\hbar\omega$ é a energia do fotón, E_g a energia da banda proibida (Gap), $E_{kin,e}$ e $E_{kin,h}$ são as energias cinéticas do elétron e do buraco na camada de condução e valência, respectivamente. Já $\hbar\mathbf{k}$ é o momento do fóton, elétron e do buraco, respectivamente. A energia do Gap corresponde à energia mínima para criação de um par $e-h$ e é dada pela diferença entre o máximo da energia da banda de valência ($E_{kin,h}$) e o mínimo da banda de condução ($E_{kin,e}$): $E_g = E_{kin,e} - E_{kin,h}$.

Sendo o momento do fóton muito pequeno e, portanto, desprezível podemos considerar apenas as transições verticais, como ilustrado na Figura 7a. Esse processo também pode ser representado como na Figura 7b. O processo reverso, ou seja, a aniquilação do par $e-h$ e a criação de um fóton também é possível ocasionando o processo de luminescência. Vale lembrar que a conservação do momento resulta na regra de seleção ótica, ou seja, caso o momento

não seja conservado não há formação do fóton e consequentemente não existe processo de luminescência.

Similarmente ao Apêndice A, seção A.4, podemos tratar a interação $e-e$ e $h-h$ como na equação A.21, adicionando um termo correspondente à interação Coulombiana ao par $e-h$. Essa quase-partícula formada a partir do par $e-h$ recebe o nome de éxciton e é semelhante ao estado fundamental do átomo de hidrogênio (núcleo e elétron). Logo, o Hamiltoniano desse sistema pode ser escrito como

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m_e^*} \nabla_e^2 - \frac{\hbar^2}{2m_h^*} \nabla_h^2 - \frac{e^2}{\epsilon |\mathbf{r}_e - \mathbf{r}_h|} \quad (2.12)$$

A equação 2.12 leva em consideração a constante dielétrica do cristal $\epsilon \neq 1$, e as massas do elétron e do buraco. Consequentemente, um éxciton também é caracterizado por um raio de Bohr e pela energia de Rydberg

$$a_B^* = \frac{\epsilon \hbar^2}{\mu e^2} = \epsilon \frac{m_0}{\mu} \cdot 0,592 \text{ \AA} \quad (2.13)$$

para $1/\mu = 1/m_e^* + 1/m_h^*$ a massa reduzida do par elétron-buraco.

$$R_y^* = \frac{e^2}{2\epsilon a_B} = \frac{\mu e^4}{2\epsilon^2 \hbar^2} = \frac{\mu}{m_0} \frac{1}{\epsilon^2} \cdot 13,6 \text{ eV} \quad (2.14)$$

Os valores obtidos na equações 2.13 e 2.14 diferem dos obtidos para o átomo de hidrogênio por dois motivos: 1) a massa reduzida do par elétron-buraco é menor do que a massa do elétron m_0 ; 2) a constante dielétrica do cristal é muito maior que a constante dielétrica do vácuo. Valores de a_B e R_y para semicondutores usuais são respectivamente 10-100 Å e 1-100 meV.

Os éxcitons podem ser classificados em éxciton de Wannier-Mott e de Frenkel, dependendo das propriedades do material.

O éxciton de Wannier-Mott [57] é característico de semicondutores com Gap de energia pequeno e constante dielétrica grande. Esse tipo de éxciton é gerado devido a blindagem do campo elétrico de elétrons e dos buracos pelas cargas de polarização do material, consequentemente reduzindo a interação eletrostática entre essas partículas. O éxciton de Wannier-Mott possui raio maior que o espaçamento da rede cristalina. Esse resultado incorpora o potencial da rede na massa efetiva do par elétron-buraco. Por causa disso, a massa efetiva do par elétron-

buraco torna-se menor e somando-se a blindagem causada pela interação eletrostática, a energia de ligação entre o elétron e o buraco neste éxciton é da ordem 0,01 eV, muito menor que a energia encontrada para um átomo de hidrogênio.

Entretanto, o éxciton de Frenkel [58] é frequentemente associado a materiais com constante dielétrica pequena e com interações eletrostáticas fortes entre o elétron e o buraco, fazendo com que a energia de ligação elétron-buraco seja da ordem 0,1 a 1 eV. Este tipo de éxciton é formado, principalmente, em moléculas orgânicas e cristais contendo essas moléculas aromáticas – porfirinas, antraceno, e fulerenos, por exemplo – e também é conhecido como éxciton molecular.

Como dito anteriormente, o momento de um fóton pode ser desprezado, e dessa forma a criação do éxciton pode ser descrita com energias discretas tal qual,

$$E_n = E_g - \frac{R_y^*}{n^2} \quad (2.15)$$

Éxcitons podem ser descritos como um gás de bósons com distribuição de energia segundo a estatística de Bose-Einstein. Para uma dada temperatura T , a concentração de éxcitons n_{exc} , elétrons e buracos livres $n = n_e = n_h$ é dada pela equação de Saha

$$n_{exc} = n^2 \left(\frac{2\pi\hbar^2}{kT} \frac{m_e^* + m_h^*}{m_e^* m_h^*} \right)^{3/2} e^{R_y^*/kT} \quad (2.16)$$

Para $kT \gg R_y^*$ a maioria dos éxcitons estarão na forma ionizada e as propriedades eletrônicas do cristal são determinadas pelos elétrons e buracos livres. Para $kT \leq R_y^*$ uma parcela significativa dos pares $e-h$ existem no estado fundamental.

2.2.3 Confinamento Quântico Fraco

Os estudos de confinamento quântico em nanocristais semicondutores são realizados para nanocristais com tamanho menor ou igual a 10 nm de diâmetro. Para tamanhos maiores que 10 nm, não são observados efeitos quânticos. Isso porque para $\epsilon \geq 10$ e $\mu \sim 0,01-0,01m_0$, o raio do éxciton é da ordem de $a_B^* \sim 1 - 10 \text{ nm}$ e a sua energia de ligação varia entre $0,1-10^{-3} \text{ eV}$, como observado através das equações 2.13 e 2.14.

Daí notamos a importância da introdução do conceito de massa efetiva (m_e^* e m_h^*) para tratar o problema quanticamente em nanocristais. Nesse caso, consideramos os nanocristais como receptáculos de elétrons e buracos dos quais m_e^* e m_h^* são as mesmas em um cristal ideal (rede cristalina infinita) de igual estequiometria, ou seja, a massa efetiva é isotrópica.

O confinamento quântico fraco [13] ocorre quando o raio (a), do ponto quântico é pequeno o suficiente porém permanece algumas vezes maior que o raio de Bohr do éxciton (a_B). Neste caso, há a quantização do movimento do centro de massa do éxciton. O centro de massa do éxciton pode ser descrito como uma partícula com centro de massa sem carga e massa total $M = m_e^* + m_h^*$. Neste caso, podemos ignorar a atração Coulombiana, porque a energia cinética de localização é muito maior. A energia cinética de um éxciton é obtida a partir de sua lei de dispersão, dada pela equação 2.9, em um cristal. Substituindo $m_{e,h}$ por M na equação 2.9 e substituindo a energia cinética de um éxciton livre pela solução obtida para uma partícula em uma caixa esférica (equação 2.14), temos

$$E_{nml} = E_g - \frac{R_y^*}{n^2} + \frac{\hbar^2 \chi_{ml}^2}{2Ma^2} \quad (2.17)$$

A equação 2.17 representa a energia de um éxciton para o caso do confinamento quântico fraco.

Os estados internos do éxciton são descritos pelo número quântico principal n na equação 2.17. Neste caso n representa a interação Coulombiana entre o elétron e o buraco do éxciton. Os outros números quânticos m e l representam os estados externos do éxciton, os quais estão conectados com o movimento do centro de massa na presença de uma barreira externa.

Logo, o estado de menor energia do éxciton é dado por $n = 1$, $m = 1$ e $l = 0$. Assim, a equação 2.17 fica

$$E_{1s1s} = E_g - R_y^* + \frac{\pi^2 \hbar^2}{2Ma^2} = E_g - R_y^* \left[1 - \frac{\mu_{e,h}}{M} \left(\frac{\pi a_B}{a} \right)^2 \right] \quad (2.18)$$

Ao último membro da equação 2.18 pode-se atribuir o deslocamento para o azul conforme o tamanho do ponto quântico diminui. No caso do confinamento quântico fraco $a \gg a_B$, e portanto menor é o deslocamento quando comparado a R_y^* [59].

Como já dissemos anteriormente, o momento de um fóton pode ser desprezado, logo, a absorção de um fóton gerará apenas éxcitons com estado $l = 0$ e $\Delta m = \pm 1$. Como consequência disso podemos reescrever a equação 2.17 para $\chi_{m0} = \pi m$ [59]:

$$E_{nm} = E_g - \frac{R_y^*}{n^2} + \frac{\pi^2 \hbar^2}{2Ma^2} m^2 \quad (2.19)$$

A equação 2.19 indica que a diferença de energia entre os estados subsequentes de um ponto quântico decresce conforme m aumenta.

2.2.4 Confinamento Quântico Forte

O caso do confinamento quântico forte [13] possui a condição $a \ll a_B$, no qual o raio (a) do ponto quântico é muito menor do que o raio de Bohr do éxciton. Isso significa que o confinamento tanto do elétron quanto do buraco não tem estados ligados que correspondem a um éxciton que possa ser abordado similarmente ao problema do átomo de hidrogênio (núcleo positivo = buraco e elétron negativo), ou seja, a energia cinética de ponto zero é muito maior que R_y^* . Portanto, no limite de $a \ll a_B$ o movimento dos elétrons e dos buracos podem ser tratados como o movimento de partículas livres ignorando a interação Coulombiana $e-h$. Aqui cabe uma ressalva de que a energia provinda da interação Coulombiana não é zero, ela foi apenas ignorada. No final desta seção daremos a resposta para essa questão.

Tomando os limites impostos no parágrafo anterior, a energia cinética para uma partícula livre, elétron e buraco, é dada pela equação 2.17 com $R_y^*/n^2 = 0$:

$$E_{nl}^e = E_g + \frac{\hbar^2 \chi_{nl}^2}{2m_e a^2} \quad (2.20) \Rightarrow \text{elétron}$$

$$E_{nl}^h = \frac{\hbar^2 \chi_{nl}^2}{2m_h a^2} \quad (2.21) \Rightarrow \text{buraco}$$

A conservação de momento e energia resulta nas regras de seleção as quais permitem apenas transições óticas para elétrons e buracos com o mesmo número quântico principal e secundário (n e l). Levando-se em consideração as regras de seleção, o espectro de absorção ótica dos pontos quânticos reduz a um conjunto discreto de bandas, com picos em:

$$E_{nl} = E_g + \left(\frac{\hbar^2}{2\mu a^2} \right) \chi_{nl}^2 \quad (2.22)$$

Por essa razão os pontos quânticos, também, são chamados de “átomos artificiais” por apresentarem espectro discreto de absorção controlado pelo número de átomos no PQ (tamanho do PQ) da mesma forma que o espectro de absorção dos átomos é controlado pelo tamanho do núcleo (número atômico).

Como dito anteriormente, a interação Coulombiana entre um elétron e um buraco não é nula em um ponto quântico. Pode-se, então, reescrever o Hamiltoniano considerando todas as interações presentes PQ:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2m_e^*}\nabla_e^2 - \frac{\hbar^2}{2m_h^*}\nabla_h^2 - \frac{e^2}{\epsilon|\mathbf{r}_e - \mathbf{r}_h|} + U(r) \quad (2.23)$$

O terceiro termo da equação 2.23 é a contribuição da interação Coulombiana entre o elétron e o buraco e o quarto termo é o potencial de confinamento. Utilizando o potencial de confinamento não é necessário a normalização pela massa, como ocorrido na equação A.21.

A solução da equação 2.23 para o par $e-h$ no estado fundamental ($n = 1$ e $l = 0$) é dada por:

$$E_{1s1s} = E_g + \frac{\pi^2\hbar^2}{2\mu a^2} - 1,786 \frac{e^2}{\epsilon a} \quad (2.24)$$

O terceiro termo da equação 2.24 é a contribuição da interação Coulombiana $e-h$. Ao compararmos esse termo com a equação 2.14 e lembrando que no limite $a \ll a_B$ prevalece o confinamento quântico forte, é facilmente notado que a interação Coulombiana não é nula nos pontos quânticos. Além disso, essa contribuição Coulombiana é maior no caso dos pontos quânticos do que para o *bulk*, *quantum well* ou *quantum wire* nos quais a contribuição Coulombiana é zero.

Vimos, portanto, que os PQ apresentam propriedades (ópticas e eletrônicas) únicas, e estas são dependentes do seu tamanho (a). Essa dependência em relação ao tamanho resulta do confinamento quântico (tridimensional) forte alterando o gap ótico desses nanocristais semicondutores.

2.3 Propriedades fotofísicas dos Pontos Quânticos

As propriedades fotofísicas singulares dos PQ são originadas a partir do confinamento quântico do par elétron-buraco (éxciton) e do controle dimensional dos estados eletrônicos em semicondutores. O confinamento quântico surge quando a dimensão do objeto é da ordem do raio de Bohr do semiconductor cujo valor é próximo de dezenas de Angstroms, de 56 Å para os na-

nocristais de CdSe, por exemplo. Assim como no problema da "partícula em uma caixa" da Mecânica Quântica, o confinamento quântico desse éxciton gera estados eletrônicos discretos cuja dependência da energia com o tamanho da partícula se dá com o inverso do raio ao quadrado. Isto é, quanto menor o tamanho do nanocristal maior será a diferença entre os níveis de energia, deslocando o espectro de emissão para menores comprimentos de onda. Consequentemente, o aumento de tamanho do PQ permite deslocar seu espectro de emissão para a região do IV próximo [13,16].

O decaimento de luminescência dos pontos quânticos possui um perfil multiexponencial, que é atribuído, segundo a literatura [13,60–63], ao decaimento não radiativo para níveis fundamentais dos estados excitados formados pela aniquilação de pares elétron-buraco. A existência de defeitos na superfície ou de cristalinidade pode criar níveis de energia mais profundos que podem atrair o elétron e/ou o buraco. A estes níveis criados a partir de defeitos na superfície são atribuídos os tempos de vida de luminescência longos, já os tempos curtos são atribuídos aos níveis de energia dos pares elétron-buraco criados no interior do ponto quântico [64–66].

Capítulo 3 - Processos de Transferência de Energia e de Carga

Os processos de transferência de energia e de carga estão presentes nas mais variadas situações cotidianas. Por exemplo, na fotossíntese as clorofilas agem como antenas captando a luz solar, transmitindo sucessivamente essa energia para outros fluoróforos até chegar ao centro de reação fotossintética. Na indústria de dispositivos fotovoltaicos e optoeletrônicos a absorção de luz por elementos químicos como as terras raras ou materiais semicondutores, os processos de transferência de energia e de carga também são importantes. Neste caso ao absorver um fóton, os componentes desses dispositivos convertem energia luminosa em energia elétrica, no caso das células fotovoltaicas, ou vice-versa, no caso, por exemplo, de televisores com ultra-HD. Muitas vezes esses processos têm sua eficiência aumentada através do uso concomitante de fotossensibilizadores.

Por trás dos processos de transferência de energia e de carga estão os mecanismos de supressão dos estados excitados. A ocorrência da supressão depende do mecanismo da interação entre as partículas envolvidas, que por sua vez depende suas propriedades químicas.

Neste capítulo abordaremos os aspectos gerais envolvidos nos processos de transferência de energia e de carga que governarão as interações entre os pontos quânticos e os fotossensibilizadores, tema central deste trabalho.

3.1 Supressão de estados excitados

Qualquer processo que provoca a diminuição da concentração de moléculas de estado excitado pode ser considerado como supressão. A supressão é resultado de diversos processos como transferência de energia ou de carga, rearranjo molecular, aumento da probabilidade de dissipação da energia por processo não radiativo estimulada por formação de complexo doador-aceitador, efeito de átomo pesado ou por efeitos paramagnéticos, etc.

Pode-se mencionar a supressão estática e supressão dinâmica. A supressão estática se

dá pela formação do complexo F—Q em seu estado fundamental. No caso da supressão dinâmica, supressor e suprimido interagem durante o tempo de vida do estado excitado do suprimido e por esta interação o suprimido retorna ao estado fundamental mais rápido [32].

A supressão de fluorescência tem sido utilizada em diversos estudos tais como: estrutura de sistemas complexos, em particular sistemas biológicos; detecção de uma variedade de analitos tais como, oxigênio, NO, e íons de metais pesados, etc. Por exemplo, a utilização da supressão de fluorescência dos pontos quânticos para a detecção de íons de Cr(III) e Cr(IV) [67]. Outro exemplo é a transferência de elétrons fotoinduzida (Photoinduced Electron Transfer, PET, na sigla em inglês) a qual é amplamente utilizada no desenvolvimento de sensores fluorescentes [68].

A cinética de um processo de supressão da fluorescência pode ser descrita segundo os esquemas abaixo:

O ponto principal para qualquer processo de supressão é a distância entre F e Q. A ocorrência da distância necessária entre F e Q é determinada pela constante de difusão bimolecular $k_q^{\text{difusão}}$, a qual determina o sentido da reação na primeira parte da reação ($[F] + [Q] \rightleftharpoons [F - Q]$).

Figura 8. Distâncias para difusão de um supressor Q em função do tempo. A equação é dada pela distância quadrática média $\Delta x^2 = 2D\tau$, para τ o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo. Retirado de [32].

Os resultados de supressão, em geral, são apresentados em gráficos de I_0/I ou τ_0/τ em função de $[Q]$ (gráficos de Stern-Volmer, SV) que é válido tanto para supressão estática como

dinâmica. A linearidade em um gráfico de SV pode indicar uma única população de fluoróforos (com processo de supressão único), todos igualmente acessíveis ao supressor:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV1}[Q] \quad (3.3)$$

onde I_0 e I são, respectivamente, a intensidade de fluorescência na ausência e presença do supressor Q e K_{SV} é uma constante chamada a de Stern-Volmer.

A natureza da constante de Stern-Volmer, para processo de supressão estático ou dinâmico é diferente.

Para supressão estática K_{SV} é igual a constante de equilíbrio de formação do complexo $[F-Q]$ entre o fluoróforo em concentração $[F]$ no estado fundamental e o supressor em concentração $[Q]$

$$K_{SV} = K_{eq} = [F-Q]/[F][Q] \quad (3.4)$$

A supressão dinâmica de fluorescência é descrita em termos da equação de Stern-Volmer de forma [32]:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV2}[Q] \quad (3.5)$$

em que τ_0 e τ são, respectivamente, o tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor e na presença deste.

Desse modo, as supressões estática e dinâmica poderiam ser distinguidas por sua dependência com a temperatura e viscosidade, ou preferencialmente pelas medidas de tempo de vida. A supressão estática não diminui o tempo de vida do fluoróforo, pois nestes experimentos somente é observada a fluorescência de moléculas que não formaram complexos com o supressor e, portanto, não apresentam mudanças em seus valores de tempos de vida ($\tau_0/\tau = 1 \Rightarrow \tau_0 = \tau$). Por outro lado, para a supressão dinâmica tem-se $I_0/I = \tau_0/\tau$.

Da equação 3.1, frequentemente se obtém o valor da constante de supressão bimolecular efetiva (k_q) a partir da relação $K_{SV} = k_q\tau_0$, em que K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer obtida através das equações 3.3 ou 3.5 e τ_0 o tempo de vida do fluoróforo na ausência de supressor. O valor da constante de supressão bimolecular efetiva pode refletir a eficiência da supressão, e até o mecanismo de supressão. Por exemplo, se em experimentos "Steady-State" $k_q^{Steady-State} > k_q^{temporal}$, especialmente quando $k_q^{Steady-State} > k_q^{difusão}$ ($\approx 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ em solução aquosa) significa que existe pelo menos um processo não dinâmico.

Caso haja uma combinação de processos de supressão – no mínimo dois processos paralelos – o gráfico de Stern-Volmer desvia do eixo x, apresentando um comportamento quadrático: $Y = C + BX + AX^2$; então a equação 3.3 fica:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV1}[Q])(1 + K_{SV2}[Q]) = 1 + (K_{SV1} + K_{SV2})[Q] + (K_{SV1}K_{SV2})[Q]^2 \quad (3.6)$$

Outro caso bastante comum é a existência de duas populações de fluoróforos na amostra, e uma delas não está acessível ao supressor, então o gráfico de Stern-Volmer, também, desvia da linearidade em relação ao eixo x. Neste caso a equação 3.3 recebe o nome de Stern-Volmer modificada [32]:

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{f_a K_a [Q]} \quad (3.7)$$

sendo f_a a fração de fluoróforos acessíveis ao supressor e K_a constante de SV para essa fração.

Outro fator que pode provocar a supressão é a atenuação da luz incidente pelo fluoróforo ou por outra espécie absorvedora, chamado de efeito de filtro interno [69]. O efeito de filtro interno se dá pela absorção ou espalhamento da luz de excitação e da fluorescência emitida, apresentando a falsa impressão da existência de supressão estática ou dinâmica. Pode-se evitar o efeito de filtro interno tomando valor de absorbância da amostra inferior a 0,3 no comprimento de onda de excitação e da emissão.

3.2 Processos de transferência de energia

3.2.1 Aspectos gerais de transferência de energia: radiativa e não radiativa

A transferência de energia entre duas moléculas, sendo uma delas em seu estado eletrônico excitado, para outra molécula pode ocorrer por processos: radiativo ou não radiativo.

O processo radiativo inclui a emissão de um fóton pelo doador (D) e sua absorção pelo aceitador (A) ou a reabsorção desse fóton pela molécula doadora. O processo radiativo ocorre em duas etapas:

- Etapas I: $D^* \rightarrow D + h\nu$
- Etapas II: $h\nu + A \rightarrow A^*$ ou $h\nu + D \rightarrow D^*$

O processo radiativo é observado quando a distância média entre D e A (ou D) é maior que o comprimento de onda de excitação. Essa transferência não requer qualquer interação entre D e A, contudo depende da sobreposição dos espectros de emissão de D e absorção de A, além da concentração de D e A. A transferência de energia nesse processo resulta na diminuição da intensidade de fluorescência do doador na região espectral sobreposta. Tal diminuição acarreta na distorção do espectro de emissão de fluorescência do doador e recebe o nome de efeito de filtro interno [69].

Por outro lado, o processo não radiativo ocorre em distâncias menores que o comprimento de onda de excitação, sem a emissão de um fóton. Neste caso a transferência de energia ocorre através de interações eletromagnéticas – de curto ou longo alcance – particularmente interações dipolo-dipolo (mecanismo de Förster, efeito “antena”) ou troca de elétrons entre D e A (mecanismo de Dexter). A eficiência da transferência de energia pelo processo não radioativo depende da distância do par D—A.

3.2.2 Transferência de energia por interação eletrostática de longo alcance

A transferência de energia por interação eletrostática de longo alcance também é conhecida como transferência de energia por ressonância de Förster (Förster Resonance Energy Transfer, FRET da sigla em inglês). Foi Theodor Förster quem primeiro descreveu a transferência de energia e sua importância para a fotossíntese. Desde então, o mecanismo de Förster tem sido aplicado nas mais diversas áreas, desde materiais, biologia, biofísica até em medicina, para melhorar a eficácia de tratamentos, como a Terapia Fotodinâmica.

Anteriormente, dissemos que a diminuição da intensidade de fluorescência caracteriza um processo de supressão. No processo de transferência de energia por FRET também há diminuição da intensidade. A Figura 9 representa o esquema dos orbitais moleculares envolvidos no mecanismo de Förster. A essência do esquema é a transição de elétrons em D e em A, simultaneamente:

Após absorver um fóton, um dos elétrons do doador passa para o orbital desocupado de menor energia LUMO (Low Unoccupied Molecular Orbital, da sigla em inglês). Quando ocorre a transferência de energia por Förster ($D^* \rightarrow A$), o elétron de D retorna para o estado fundamental (HOMO) e, simultaneamente, um elétron de A passa para um orbital mais baixo no estado excitado (LUMO, $A \rightarrow A^*$). Caso a molécula A^* seja fluorescente ela emitirá um fóton, caso não, a energia de A^* será dissipada na forma de calor ou acontece uma reação com outros reagentes.

Figura 9. Esquema dos níveis moleculares envolvidos na transferência de energia pelo mecanismo de Förster. Retirado de [32].

O mecanismo de Förster para transferência de energia [32,70,71] ocorre via interação eletrostática entre os momentos de dipolo de transição da molécula doadora e da molécula aceitadora de energia, e não requer contato direto. Por isso ele é de longo alcance com distâncias típicas entre $20 \text{ \AA} \leq R_0 \leq 200 \text{ \AA}$ [32,72].

A taxa de transferência de energia entre D e A em função da distância r para o mecanismo de Förster, pode ser expressa como:

$$k_{\text{Förster}}(r) = \frac{\kappa^2 \Phi_D}{r^6 \tau_{flD}} \left(\frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.8)$$

em que n é o índice de refração do solvente, N é o número de Avogadro, Φ_D e τ_{flD} são o rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência do doador, λ é o comprimento de onda, $\varepsilon_A(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador de energia, e $F_D(\lambda)$ é a distribuição espectral normalizada de fluorescência do doador, tal que $\int F_D(\lambda) d\lambda = 1$, κ é o fator de orientação relativa dos dipolos do doador e do aceitador e κ^2 é igual a $2/3$ para uma distribuição aleatória, e R_0 é o chamado raio de Förster, R_0 , é uma distância no qual há 50% de eficiência de transferência de energia entre D e A. Ela pode ser calculada pela equação:

$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (3.9)$$

A eficiência quântica da transferência de energia de Förster, $\Phi_{Förster}$, é

$$\Phi_{Förster} = \frac{k_{Förster}}{k_{fl} + k_{Förster}} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (3.10)$$

Ou pode ser calculada experimentalmente através dos valores das intensidades de fluorescência ou tempo de vida de fluorescência:

$$\Phi_{Förster} = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \text{ ou } \Phi_{Förster} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (3.11)$$

Outra característica interessante da transferência de energia pela interação dipolo-dipolo é a relação de proporcionalidade entre a taxa de transferência de Förster (equação 3.8) e a taxa de decaimento radiativo do doador ($k_{rad} = 1/\tau_{flD}$), ou seja, $k_{Förster}(r) = k_{rad} = 1/\tau_{flD}$. Essa relação de proporcionalidade é garantida pelo termo Φ_D/τ_{flD} . Para o par D—A separado pela distância de Förster R_0 , a taxa de transferência será a mesma qualquer que seja o tempo de decaimento τ_{flD} .

Como no caso da supressão de Stern-Volmer modificada (equação 3.7), eficiência quântica da transferência de energia de Förster (equação 3.11) pode ser reescrita considerando a fração de aceitador ligada ($\Phi'_{Förster}$) ou que tem contato com o doador (f_a), e neste caso considera-se apenas as moléculas que sofreram supressão. Isto é, transferiram a energia do estado excitado (D^*) para as moléculas aceitadoras:

$$\Phi_{Förster} = 1 - \frac{I_{DA} - I_D(1 - f_a)}{I_D f_a} = \left(1 - \frac{I_{DA}}{I_D}\right) \frac{1}{f_a} \Rightarrow \Phi'_{Förster} = \Phi_0 \frac{1}{f_a} \quad (3.12)$$

Para $f_a = 2$ temos $\Phi' = \Phi_0/2$, para $f_a = 0,5$ temos $\Phi' = 2\Phi_0$.

3.2.3 Transferência de energia por interação eletrostática de curto alcance

Além da interação dipolar, interação multipolar de ordem maior (quadrupolo elétrico) também resulta em transferência de energia. Neste caso, a transferência de energia acontece num alcance mais curto que o apresentado no mecanismo de Förster.

Resumindo, pode-se concluir que no caso de interações eletrostáticas tem-se:

Tabela 1 Dependência da constante de Förster em função do tipo de interação para transições permitidas na transferência de energia por interação multipolar.

Tipo de interação	Dependência $k_{Förster}$	Alcance (Å)
Dipolo elétrico – dipolo elétrico	$k_{Förster}(r) = (1/\tau_D)(R_0/r)^6$	$r \geq 20$
Dipolo elétrico – quadrupolo elétrico	$k_{Förster}(r) = (1/\tau_D)(R_0/r)^8$	$r \leq 8$
Quadrupolo elétrico – quadrupolo elétrico	$k_{Förster}(r) = (1/\tau_D)(R_0/r)^{10}$	$r \leq 2$

3.2.4 Transferência de energia por interação de troca de elétrons

Na transferência de energia por interação de troca de elétrons o doador no estado excitado possui um elétron no orbital desocupado de menor energia ou LUMO. Este elétron é transferido a orbital LUMO do um aceitador, o qual transfere um elétron de volta ao orbital HOMO do doador. A Figura 10 resume a transferência de energia por interação de troca do elétron.

Figura 10. Esquema da transferência de energia por interação de troca entre o estado excitado LU da molécula doadora e o estado excitado HO da molécula aceitadora. Adaptado de [32].

O processo de transferência de energia descrito acima também recebe o nome de mecanismo de Dexter, apresentado pela primeira vez por D.L. Dexter em 1953 [73]. O mecanismo de Dexter também transfere a energia de uma molécula doadora para outra molécula aceitadora e também depende da sobreposição espectral das moléculas. Entretanto, esse mecanismo não envolve interação entre os dipolos elétricos da molécula doadora e aceitadora.

Além da sobreposição entre o espectro de emissão de fluorescência de D e o espectro de absorção de A, a transferência de energia envolvendo o mecanismo de Dexter requer a sobreposição entre as nuvens eletrônicas de A e D. Isso significa que o D* e A devem estar em contato direto. Nesse caso a distância que promove a transferência de energia pode ser comparada ao diâmetro de colisão.

A taxa de transferência de energia para o mecanismo de Dexter é dada por:

$$k_{Dexter} = \frac{2\pi}{\hbar} K \exp\left(\frac{-2R_{DA}}{L}\right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) d\lambda = \frac{2\pi}{\hbar} K \exp\left(\frac{-2R_{DA}}{L}\right) \quad (3.13)$$

onde, R_{DA} é a distância entre D e A, e L é o raio de van der Waals efetivo do cromóforo, e, $\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda = \int_0^\infty \varepsilon_A(\lambda) d\lambda = 1$, é a integral de sobreposição dos espectros normalizados da emissão do doador D e de absorção do aceitador A. A constante K pode ser determinada – através de cálculos teóricos de Química Quântica – pela interação entre os orbitais envolvidos no processo de transferência de energia. A dependência exponencial do mecanismo de Dexter provém do fato que densidade eletrônica decai exponencialmente com a distância entre o elétron e o núcleo. Por isso a eficiência de transferência da energia pelo mecanismo de Dexter, k_{Dexter} , é independente da intensidade da emissão de D e a probabilidade de absorção de A. Pelo fato da constante K (equação 3.13) não estar relacionada a nenhum parâmetro espectroscópico, experimentalmente, torna-se difícil a caracterização da transferência de energia por mecanismo de Dexter.

Como dito acima, no mecanismo de Dexter a transferência de energia não envolve a interação entre os dipolos elétricos das moléculas, conseqüentemente não depende da magnitude dos dipolos do doador e do aceitador. Por não depender da magnitude dos dipolos, o processo de transferência de energia por interação de troca de elétrons não depende da força do oscilador da transição eletrônica, explicando o fato de $\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda = \int_0^\infty \varepsilon_A(\lambda) d\lambda = 1$.

3.2.5 Diferenças entre os mecanismos de longo e curto alcance

Cabe aqui recordarmos que o processo de transferência de energia não radiativo é um processo que no final o doador não emite fóton. A diferença principal entre os mecanismos de curto e longo alcance está no processo envolvido na transferência de energia: o mecanismo de curto alcance exige contato molecular, ou seja, é um processo de supressão limitado pela difusão; agora, o mecanismo de longo alcance é devido as interações dipolo-dipolo entre D^* e A. As distâncias que caracterizam cada mecanismo permite obter diferentes informações sobre as interações moleculares em cada fenômeno.

A diferença entre os mecanismos de Förster e Dexter podem ser resumidas das seguintes maneiras:

1. Diferente do mecanismo de Förster, o mecanismo de Dexter é um efeito puramente quântico e não possui análogo no eletromagnetismo clássico.
2. A natureza do mecanismo de Förster é a interação dipolo-dipolo e por isso ele é de longo alcance com distâncias entre $20 \text{ \AA} \leq R_0 \leq 200 \text{ \AA}$. A eficiência de transferência de energia nesse mecanismo é maior quanto maior a intensidade da emissão de doador e a absorção de aceitador. Por isso esse mecanismo é predominante para processos com transições permitidas tipo $S_1^*(D) \rightarrow S_0(D)$ para $S_0(A) \rightarrow S_1^*(A)$.
3. No mecanismo de Dexter a distribuição espectral de recobrimento é normalizada pelo coeficiente de absorção molar da molécula aceitadora, essa distribuição não depende da magnitude de ϵ_A , logo, k_{Dexter} é independente da intensidade da emissão de D e a probabilidade de absorção de A. Por isso, diferente de Förster no mecanismo de Dexter predomina as transições proibidas tipo $T_1^*(D) \rightarrow S_0(D)$ para $S_0(A) \rightarrow T_1^*(A)$.
4. O mecanismo de Dexter exige a sobreposição das funções de ondas de D e A de modo que cada elétron envolvido na troca possa ocupar o orbital molecular do outro, prevalecendo para distâncias curtas do par D—A. Por isso, a taxa de transferência de energia de Dexter (k_{Dexter}) diminui acentuadamente (comportamento exponencial), enquanto a distância (L) entre D e A aumenta. A distância de curto alcance (R_{DA}) possui valores entre $10 \text{ \AA} \leq R_{DA} \leq 15 \text{ \AA}$.

A Figura 11 a seguir apresenta um resumo dos tipos de interações envolvidos na transferência de energia não radiativo.

Figura 11. Tipos de interações envolvidas nos mecanismos não radiativos de transferência de energia. Adaptado de [72].

3.3 Processos de transferência de carga

A transferência de carga é um fenômeno importante para compreender a interação entre nanopartículas (metálica ou semicondutora) e moléculas orgânicas ou mesmo apenas entre moléculas orgânicas, já que a interação entre elas pode resultar na formação de complexos do tipo ($D^{\delta+} \cdots A^{\delta-}$). A formação desse complexo se dá no equilíbrio, assim

O complexo formado na transferência de carga (TC) é um complexo metaestável, dependendo das condições de equilíbrio da reação. A natureza da ligação entre a molécula doadora de elétrons D e a molécula aceitadora de elétrons A é fraca e não pode ser considerada ligação covalente. Outra característica importante é a conservação do spin $\Delta S = 0$, uma vez que a troca de elétrons entre D e A é uma transição eletrônica permitida.

A energia do estado de transferência de carga (E_{TC}) é dada por

$$E_{TC} = I_d - E_R - C - \alpha \left[\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{4n^2 + 2} \right] \quad (3.15)$$

em que I_D é o potencial de ionização da molécula doadora; E_R a afinidade eletrônica da molécula aceitadora; C a energia Coulombiana de estabilização do complexo; α é uma constante obtida experimentalmente; ϵ e n são respectivamente a constante dielétrica e o índice de refração do meio [74]. É importante apontar aqui a influência do solvente/meio em processos em que há transferência de carga. Fica claro, ao analisarmos a equação 3.15 que meios polares, etanol, por exemplo ($\epsilon \approx 25$ e $n \approx 1,36$), estabilizam a transferência de cargas.

Devido à diferença na estrutura eletrônica entre o complexo formado e as moléculas participantes, as características do complexo, tais como espectros de absorção e de fluorescência, tempos de vida e rendimentos quânticos dos estados excitado, são diferentes daquelas das moléculas participantes e podem ser usadas para detectar e analisar a formação do complexo. Frequentemente as mudanças nos espectros eletrônicos ocorrem na região do UV-Visível. Essa mudança no espectro de absorção reflete na alteração da cor do complexo TC formado.

Os processos de transferência de carga podem ocorrer no estado fundamental ou no estado excitado [75] de D e A. Um meio muito eficaz de iniciar um processo de transferência de carga é excitar o sistema com um fóton (Figura 12).

Figura 12. Exemplo de transferência de carga por fotoexcitação num ponto quântico. Retirado de [76].

A utilização do processo TC impulsionou o surgimento de uma nova fronteira em ciências: a eletrônica molecular ou “moletrônica”; cujo princípio é o uso concomitante de metais ou semicondutores com moléculas orgânicas na construção de unidades básicas de circuitos de computação [76]. Por exemplo, a interação entre nanopartículas de ouro, prata ou semicondutor (os pontos quânticos) com moléculas de porfirinas ou ftalocianinas [77].

Um ponto crucial para ocorrer a transferência de carga é a distância entre a molécula doadora e a aceitadora. Essa distância exerce influência em fatores:

- a) Sobreposição das nuvens eletrônicas: dependência exponencial da distância de separação (d_{DA}). Ocorre a transferência do elétron entre as moléculas D e A. Essa transferência provém da sobreposição entre os orbitais moleculares dos estados $(D^{\delta+} \dots A^{\delta-})$. Essas interações entre orbitais é possível porque os elétrons podem mover-se entre as moléculas em distâncias curtas como as já mencionadas acima.
- b) Redução ou oxidação ativada termicamente. Esse mecanismo não é fotoativado.

Assim, a distância em um processo de transferência de carga não pode ser da ordem de algumas dezenas de Angstroms como nos processos de transferência de energia. Tipicamente, em soluções homogêneas, as distâncias nos processos de transferência de carga são da ordem de $\sim 1.0 \text{ \AA}$ para cadeias carbônicas saturadas a $\sim 5.0 \text{ \AA}$ para cadeias carbônicas insaturadas.

Capítulo 4 – Instrumentação e Aspectos Experimentais

Apresentaremos aqui os equipamentos utilizados durante a execução do trabalho bem como os aspectos experimentais empregados para a realização dos experimentos.

4.1 Instrumentação

Os equipamentos necessários para a realização do trabalho aqui apresentado estão disponíveis nos Departamentos de Física e de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Não descreveremos todas as técnicas experimentais utilizadas neste trabalho devido a seu amplo conhecimento. Limitaremos a citar teses ou dissertações defendidas por membros deste Grupo de Fotobiofísica para maiores detalhes técnicos/teóricos para as técnicas experimentais já consolidadas neste grupo. As técnicas experimentais que iremos descrever mais detalhadamente, serão técnicas que não fazem parte da rotina do Grupo de Fotobiofísica do DF-FFCLRP-USP.

A seguir, apresentaremos as técnicas experimentais e os respectivos equipamentos utilizados durante o trabalho:

- Espectroscopia de absorção ótica [78]
 - Espectrofotômetro *Beckman Coulter DU640*
- Espectroscopia de fluorescência estática [32,79]
 - Espectrofluorímetro *Hitachi F-7000*
- Espalhamento ressonante de luz (ERL) [80–83]
 - Espectrofluorímetro *Hitachi F-7000*
- Medidas de fluorescência com resolução temporal
 - O sistema utilizado neste trabalho baseia-se no método *TCSPC*. A fonte de excitação é um laser de titânio-safira *Tsunami 3950 Spectra Physics*, bombeado por

um laser de estado sólido *Millenia Spectra Physics*. Os pulsos apresentam largura temporal de 5 ps e foram aplicados a uma taxa de repetição de 8 MHz. O comprimento de onda de excitação λ_{ex} foi gerado por um cristal gerador de terceiro harmônico *BBO (GWN-23PL Spectra Physics)*, λ_{ex} variou de acordo com as características da amostra a ser estudada. A resposta do equipamento foi de 100 ps.

- Imagens por tempo de vida de fluorescência (*FLIM*)
 - As imagens de FLIM foram adquiridas utilizando o sistema *PicoQuant MicroTime 200*, acompanhado de um microscópio ótico invertido *Olympus IX 71*, que permite medidas de fluorescência com resolução temporal acoplado à microscopia confocal das seguintes configurações:

Tabela 2 Configurações utilizadas para obter as imagens FLIM, em que N.A. é o número de abertura da lente utilizada e λ_{ex} é o comprimento de onda de excitação da fonte.

Objetiva	N.A.	λ_{ex} (nm)	Dicroico	Filtro passa alta
1) Ar, MPLANFL N 100x	0,90	470	490dcxr	BLP01-488R
			AHF/Chroma	AHF/Chroma
2) Água, UPLANSAPO 60XW	1,20	470	490dcxr	BLP01-488R
			AHF/Chroma	AHF/Chroma
3) Água, UPLANSAPO 60XW	1,20	440	z440bcm	HQ460LP
			AHF/Chroma	AHF/Chroma

- Espectroscopia por correlação de fótons (Espalhamento dinâmico de luz) e medidas de potencial zeta [84,85]
 - Sistema *MALVERN ZETASIZER 3000HSA* equipado com um laser de HeNe com excitação em 633 nm e potência de 10 mW. Potencial zeta medido através da mobilidade eletroforética na solução. Para nossos experimentos escolhemos o algoritmo *Contin* ou *NNLS*, presentes no software do equipamento.
- Medidas de Anisotropia estática[86]
 - Espectrofluorímetro *Hitachi F-7000*
- Técnica de Fotólise por pulso de laser ou *Flash-fotólise* [78]
 - O estado tripleto foi produzido pela irradiação da amostra com pulsos de 3 ns, 20 mJ de segundo harmônico (532 nm) de um laser de Nd:YAG, presente no

sistema de *Flash*-fotólise do Lab. de Fotobiofísica do DF-FFCLRP-USP. O espectro de absorção do estado tripleto foi monitorado na região espectral $300 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$ e a cinética de decaimento em $\lambda = 495 \text{ nm}$.

- Monocamada de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett
 - Neste trabalho foi utilizada a Cuba de Langmuir 216 cm^2 (Insight, Brasil)

Figura 13. Modelo da Cuba de Langmuir (270x170x15 mm) utilizada nos experimentos de monocamadas de Langmuir e para confecção dos filmes de Langmuir-Blodgett através da técnica de deep-coating (modelo obtido com o software sketchup®).

4.1.1 Medidas de fluorescência com resolução temporal

A técnica de contagem de fótons “únicos” correlacionados no tempo (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC da sigla em inglês) é a principal técnica para determinar tempos de vida de fluorescência. Na técnica de TCSPC, mede-se o tempo entre a excitação da amostra pelo pulso do laser e a chegada ao detector do fóton emitido pela mesma. Essa técnica exige uma “referência de início” do sinal, oriundo da eletrônica e acionado a partir do pulso do laser, e de uma “referência de fim” do sinal, oriundo da detecção do fóton “único” pelo detector (por exemplo, Single Photon Avalanche Diodes ou SPADs, fotomultiplicadoras ou PMT). A medida deste atraso é repetida inúmeras vezes até atingir a estatística desejada. A contagem desse atraso é apresentada na forma de um histograma das contagens em função do tempo de emissão após o pulso de excitação [87].

As curvas individuais de decaimento foram analisadas no software Origin 9.0 da Origin-Lab, e o ajuste do decaimento foi analisado pela inspeção das curvas de peso residual e por parâmetros estatísticos como o chi-quadrado.

4.1.2 Imagens por tempo de vida de fluorescência (FLIM)

As imagens por tempo de vida de fluorescência utilizam a diferença dos tempos de vida dos estados excitados dos fluoróforos como contraste em imagens. Essas imagens podem ser formadas por dois diferentes métodos: domínio de tempo ou domínio de frequência. Neste trabalho utilizaremos apenas o domínio de tempo.

No domínio de tempo, imagens de FLIM são possíveis combinando a técnica de TCSPC (já descrita na Seção 4.1.2 Medidas de fluorescência com resolução temporal) e técnicas de varredura (*scanning* em inglês).

Para um decaimento monoexponencial do tipo $\alpha \exp(-t/\tau)$, com tempo de vida τ muito maior que a largura a meia altura do pulso, o sinal correspondente de fluorescência em duas janelas de tempo, t_1 e t_2 , com intervalo Δt entre elas, será proporcional a [72],

$$I_1 = \int_{t_1}^{t_1+\Delta t} \alpha e^{(-t/\tau)} dt \quad (4.1)$$

$$I_2 = \int_{t_2}^{t_2+\Delta t} \alpha e^{(-t/\tau)} dt \quad (4.2)$$

em que I_1 e I_2 são as intensidades de fluorescência para a dada janela de tempo. O tempo de vida correspondente a cada pixel pode ser calculado a partir da expressão abaixo

$$\tau = \frac{t_2 - t_1}{\ln(I_1/I_2)} \quad (4.3)$$

A partir da equação 4.3, portanto, são necessários dois parâmetros para determinar o tempo de vida em cada pixel. Entretanto, para perfis de decaimento de fluorescência mais complexos (multiexponencial), como no caso dos pontos quânticos [88], a equação 4.3 fornece apenas o tempo médio [72]. Os fótons são atribuídos a cada pixel, para o qual é feito o armazenamento dos tempos absolutos de chegada dos fótons, como na técnica TCSPC e, adicionalmente,

sinais de linha e marcadores de *frame* também são registrados, desta forma, os fótons são endereçados para o respectivo pixel [87].

As imagens de FLIM são produzidas através da varredura unidimensional pela objetiva. A emissão de fluorescência é captada pela mesma objetiva e transmitida pelo espelho dicroico, passando através de um conjunto de lentes que focaliza o feixe em um *pinhole* (50 μm) e seleciona o plano da imagem. A luz originada fora do foco deste *pinhole* é rejeitada. Após isso, o feixe é direcionado por um conjunto de espelhos até o detector SPAD (Single Photon Avalanche Diode, da sigla em inglês) passando através de um filtro, eliminando a luz provinda do comprimento de onda de excitação. Os dados são adquiridos, processados e analisados pelo software SymPhoTime 5.2.4 [89].

Figura 14. Esquema da montagem experimental de um sistema típico de espectroscopia de correlação de fluorescência, que permite medidas de fluorescência com resolução temporal acoplado à microscopia confocal. O canal de excitação (linha azul-verde) e canal de detecção (linha verde) para medidas que utilizam um canal (single-channel) e para cross-correlation (linhas verde e laranja). Retirado de [90].

4.1.3 Espectroscopia por correlação de fótons (Espalhamento dinâmico de luz)

A técnica de espalhamento dinâmico de luz (EDL), do inglês *dynamic light scattering* (DLS), também conhecida como espectroscopia por correlação de fótons, mede o tamanho de partículas analisando-se flutuações da intensidade de luz espalhada em função do tempo. As partículas em solução movimentam-se aleatoriamente como consequência dos choques com as moléculas do fluido (movimento browniano) e podem ser caracterizadas por um “coeficiente de difusão” (D_i), quanto menor a partícula maior a sua velocidade de difusão no meio. O coeficiente de difusão translacional está relacionado com o raio hidrodinâmico da partícula (R_h) pela equação de Stokes-Einstein [80]:

$$D_i = \frac{kT}{6\pi R_h \eta_{vis}} \quad (4.4)$$

onde η_{vis} é a viscosidade do meio e T a temperatura em Kelvin.

Partículas menores causarão flutuações na intensidade de luz espalhada em espaços de tempos menores do que as partículas maiores. Desta forma, monitorando a intensidade da luz espalhada em função do tempo, podemos quantificar a difusão da partícula-espalhadora a partir de uma posição num instante t e correlacionar com a sua posição após Δt [80].

Sendo I é a intensidade da luz que chega ao detector, T é o tempo de medição. O movimento de partículas é um processo estocástico e por isso, para obter a função de correlação como média representativa, o tempo de medição T precisa ser maior que o tempo de flutuação e a função de correlação precisa ir para zero quando T aumenta [80].

$$I = \lim_{T \rightarrow 0} \frac{1}{T} \int_0^T I(t) dt \quad (4.5)$$

$$T \rightarrow \infty; \quad \langle I(T) \rangle \rightarrow 0 \quad (4.6)$$

A análise da curva de correlação obtida, podemos determinar o tempo de decaimento da partícula (τ_i). O coeficiente de difusão (D_i) pode ser obtido a partir de τ_i e do vetor de espalhamento ($\vec{q}$):

$$D_i = \left(\frac{1}{\tau_i} \right) q^{-2} \quad (4.7)$$

O vetor de espalhamento é definido como:

$$q = \left| \frac{\vec{r}}{r} \right| = \frac{4\pi \sin(\theta/2)}{\lambda} = \frac{4\pi \sin(90^\circ/2)}{633 \times 10^{-9}} = 1,4 \cdot 10^7 \text{ m}^{-1} \quad (4.8)$$

A partir do coeficiente de difusão (eq. 4.7) e igualando-se a equação de Stokes-Einstein (4.4) pode-se determinar o raio hidrodinâmico da partícula (R_h).

$$\frac{kT}{6\pi R_h \eta_{vis}} = \left(\frac{1}{\tau_i} \right) q^{-2} \rightarrow R_h = \frac{kT q^2}{6\pi \eta_{vis}} \quad (4.9)$$

Substituindo os valores $k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$, η_{vis} da água a $25^\circ \text{C} = 8,9 \cdot 10^{-4} \text{ Pa} \cdot \text{s}$, $T = (273 + 25) \text{ K}$ e $q^2 = 1,97 \cdot 10^{14} \text{ m}^{-2}$ na equação 4.9 obtemos:

$$R_h = 4,8 \cdot 10^{-5} \cdot \tau_i \quad (4.10)$$

Para obter o coeficiente de difusão a função de correlação precisa ser analisada. Existem diferentes algoritmos para análise das curvas de correlação [80].

4.1.4 Monocamadas de Langmuir

As monocamadas de Langmuir de lipídios podem ser usadas na mimetização de membranas celulares [37], o que permite estudar as interações entre compostos no nível molecular. A monocamada lipídica pode ser entendida como metade de uma membrana celular, e a subfase aquosa como a região intra ou extracelular.

Para formar uma monocamada de Langmuir, uma pequena quantidade de fosfolipídio é dissolvida num solvente volátil e espalhada sobre a superfície da subfase aquosa em uma cuba. A balança (ou cuba) de Langmuir permite controlar a densidade de moléculas na interface através do controle da área por molécula, ou seja, pelo posicionamento das barreiras. Desta forma, as propriedades da monocamada são controladas, por isto, a monocamada é um modelo de membrana muito útil [91].

Figura 15. Esquema de uma cuba de Langmuir. O motor de passo move a barreira fixa que comprime os lipídios espalhados na superfície da subfase aquosa. A pressão superficial em função da área média por molécula é então medida pelo sensor de pressão. Adaptada de [38].

Depois a área da superfície da subfase começa a ser diminuída através de uma barreira móvel. A tensão superficial da água na presença do lipídio (γ) diminui conforme a superfície é comprimida pela barreira, tendo como consequência uma pressão de superfície (π) definida pela equação:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad (4.11)$$

em que γ_0 é a tensão superficial da água pura. A variação de pressão em função da área ocupada por molécula de lipídio (a temperatura constante) produz a isoterma de pressão (π -A) que descreve o processo de formação de monocamada.

Figura 16. Exemplos de isotermas (π -A) de diferentes fosfolipídios em diferentes fases. Retirada de [91].

Na Figura 16 estão indicadas regiões distintas que representam as possíveis fases que uma monocamada pode adquirir. Abaixo segue a denominação e descrição de cada fase [91]:

1. Fase gasosa (G): as moléculas estão muito distantes umas das outras, não há interação entre elas e a orientação das caudas hidrofóbicas no espaço é aleatória (podem até estar “deitadas” na superfície). A pressão superficial nesta fase é aproximadamente zero;
2. Fase líquida-expandida (LE): quando as moléculas se aproximam, de tal modo que uma pode ter interações mais forte com sua vizinha mais próxima, e as caudas ainda orientadas aleatoriamente possuem menor inclinação em relação à vertical;
3. Transição de fase líquida expandida/líquida condensada (LE/LC): coexistência das fases LE e LC;
4. Fase líquida condensada (LC): as moléculas estão mais próximas;
5. Fase condensada (C) ou sólida (S): o empacotamento das moléculas é tal que todas as caudas estão orientadas verticalmente. Uma maior compressão da monocamada provoca o colapso;
6. Colapso da monocamada: desorganização da estrutura monomolecular, podendo formar bicamadas e multicamadas.

Quando se transferem as monocamadas da interface líquida para suportes sólidos, obtêm-se os filmes Langmuir-Blodgett (LB). Para isso, atravessa-se o suporte sólido perpendicularmente à interface ar-água. Em cada imersão ou emersão na subfase aquosa uma camada é transferida [92]. Assim, filmes podem ser construídos com o número de camadas controlado, tendo então um elevado grau de orientação molecular. Para tanto, é necessário que a monocamada adquira um grau de compactação razoável, usualmente utilizam-se pressões entre 20 mN.m^{-1} e 40 mN.m^{-1} [92].

Os filmes LB podem ser caracterizados através de uma quantidade maior de técnicas espectroscópicas e ópticas quando comparados com as monocamadas de Langmuir. A morfologia dos filmes pode ser obtida por técnicas microscópicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), ou imagens por tempo de vida de fluorescência (FLIM). Os filmes podem ser usados em dispositivos optoeletrônicos, bem como aplicados como sensores de diversas espécies [93,94].

4.2 Aspectos experimentais

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente ($T = 23\text{ }^{\circ}\text{C}$) e as amostras foram preparadas em tampão fosfato (pH 7,3; 7,5 mM) utilizando água Milli-Q.

4.2.1 Formação das monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett

As isotermas de pressão superficial (π -A) foram monitoradas com o auxílio da cuba de Langmuir citada acima. Uma solução estoque de lipídios (1.0 mmol.L^{-1}) preparada em clorofórmio/metanol (3:1 v/v) foi utilizada para espalhar 30 μL desta na superfície de 130 mL de água com qualidade Milli-Q®, ou na subfase aquosa contendo 1 mL de porfirina, ou 1 mL de PQ, ou 1 mL da mistura porfirina/PQ em soluções estoque 100:1 em volume. A compressão foi iniciada após 5 min da injeção da solução de lipídio para garantir a total evaporação do solvente. A velocidade de compressão da barreira foi mantida constante em $0,42\text{ mm.s}^{-1}$.

Os filmes LB foram preparados para estudar as propriedades fotofísicas das monocamadas de fosfolipídio na presença de porfirina ou PQ. Para este fim, as monocamadas de Langmuir formadas na superfície da cuba foram transferidas para um suporte de quartzo $20\times 10\text{ mm}$ ou de Si (100) através da técnica LB [20,23]. Filmes LB do tipo Z (deep-coating) foram formados por imersão do suporte na subfase antes dos fosfolipídios serem esparramados na cuba. Cinco camadas mistas de PQ, PPh, PPh-PQ:lipídicas foram depositadas por meio de uma sequência de movimento ascendente vertical da placa a $0,038\text{ mm.s}^{-1}$. A pressão de superfície foi mantida constante em 30 mN.m^{-1} durante a transferência.

Os filmes LB foram caracterizados através do espectrofotômetro Beckmann DU640. Os suportes foram posicionados com sua face perpendicular à luz de análise e as imagens de FLIM foram obtidas segundo a configuração 1 apresentada na Tabela 2 neste capítulo.

4.2.2 Objetos de estudo

4.2.2.1 Pontos Quânticos

Os pontos quânticos, todos solúveis em água (Figura 17), escolhidos para serem objetos de estudo neste trabalho foram três:

1. (CdTe)MPA, funcionalizado com grupo ácido mercaptopropiônico (Mercaptopropionic Acid, ou MPA, na sigla em inglês), sintetizado no laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Roberto Santana da Silva da FCFRP-USP
2. (CdSe/ZnS)PEG, funcionalizado com o grupo polietileno glicol (PEG), adquirido da empresa Invitrogen™
3. (CdSe/ZnS)Cys, funcionalizado com aminoácido cisteína (Cys), sintetizado no Instituto de Química Bio-orgânica da Academia de Ciência da Rússia (Moscou, Rússia)

As propriedades características dos PQ são apresentadas na Tabela 3 em Resultados e Discussão.

Figura 17. Estrutura química das moléculas utilizadas para funcionalizar a superfície dos pontos quânticos estudados neste trabalho.

4.2.2.2 Porfirinas

A base da estrutura das porfirinas (Figura 18) é o anel porfirínico.

Figura 18. Estrutura básica de porfirinas.

Contendo quatro anéis pirróis (A a D) ligados por pontes metálicas (5,10,15,20). Esse tipo de estrutura permite alterações da estrutura da molécula através da introdução de íons metálicos no centro do anel e ligação de diversos substituintes periféricos sem comprometer a estabilidade do anel central, possibilitando obter moléculas com características desejadas. Por exemplo, a ligação com anel central dos grupos colaterais carregados positivamente aumenta sua afinidade com as moléculas do DNA[95,96] ou grupos colaterais hidrofóbicos aumentam a afinidade da molécula com parte hidrofóbica da membrana celular [97] ou de locais hidrofóbicos de proteínas [83].

Devido à sua alta fotoestabilidade, estabilidade química, intensa absorção na região espectral visível e no infravermelho próximo e longo tempo de vida do estado tripleto as porfirinas se tornaram os principais compostos usados no diagnóstico por fluorescência e no tratamento do câncer por TFD [1,2,98]. Todavia, uma desvantagem das porfirinas como fluoróforos é o seu rendimento quântico da fluorescência ser relativamente baixo e depender fracamente do ambiente e da sua ligação com sistemas nano-organizados, tais como moléculas de DNA, membranas, proteínas etc. Mais do que isso, as porfirinas possuem uma tendência de se agregar em meios aquosos, o que diminui drasticamente o rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência e do estado tripleto, diminuindo assim sua eficiência como FL e FS [12,95,96]. A agregação é influenciada pela estrutura de porfirina e sua concentração, pelas características físico-químicas do ambiente e pela interação da porfirina com outras moléculas, com DNA e proteínas, em particular [12,95,96].

Dentre as inúmeras porfirinas sintetizadas até agora, destacam-se a TMPyP e TPPS₄ (Figura 19).

Figura 19. Estrutura das porfirinas utilizadas neste projeto.

São compostos já estudados pelo Laboratório de Fotobiofísica do DF-FFCLRP-USP [83,95,96,99–101]. Além disso, elas já foram testadas clinicamente como FS, mostrando resultados promissores [102]. Por esses motivos foram escolhidos como objetos de estudo neste projeto. Ambas as porfirinas foram adquiridas através da empresa *Porphyrin Products Inc.*

4.2.3 Modelos nano-organizados de estruturas biológicas

4.2.3.1 Albumina do Soro Bovino (BSA)

A albumina é um dos componentes do sangue de natureza proteica, que desempenha uma série de funções biológicas relevantes, incluindo a regulação da pressão osmótica sanguínea e o transporte de compostos endógenos e exógenos no organismo. Devido a esses papéis as albuminas possuem vários sítios para ligar diversos tipos de compostos químicos. Tanto a estrutura quanto as propriedades físico-químicas da albumina estão bem estudadas [40]. A BSA (Bovine Serum Albumin, na sigla em inglês) é empregada como proteína modelo em sistemas biomiméticos. É a proteína mais abundante no sangue bovino (concentração típica de 50 mg/mL) e possui uma estrutura muito similar à estrutura da HSA (Human Serum Albumin, ou HSA, na sigla em inglês), apresentando uma percentagem de sequências idênticas de aminoácidos de 76%. A BSA é uma cadeia polipeptídica simples de 583 resíduos de aminoácidos e três domínios, sendo seu peso molecular igual a 66,5 g/mol. O ponto isoelétrico (PI) da BSA está em torno de 4,70 – 5,60. O PI de uma molécula indica o pH no qual ela se encontra com a mesma quantidade

de carga positiva e negativa. A BSA é carregada negativamente no pH 7,0 e sofre mudanças conformacionais no intervalo $4,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$.

A ligação de moléculas pequenas na albumina pode mudar sua atividade. Mudanças no ambiente (aumento ou diminuição do pH local, força iônica, temperatura) ou fatores físicos externos (campos elétrico ou magnético, ativação pela luz) podem diminuir a estabilidade do complexo e induzir a transição de moléculas ligadas ao estado livre. Esse fenômeno pode ser usado para criar drogas de efeito direto pela formação de seus complexos quimicamente ou fisicamente ligados com polímeros biocompatíveis, tanto naturais como sintéticos.

A proteína escolhida foi a albumina do soro bovino (BSA) a qual foi adquirida da empresa *Sigma-Aldrich*®.

4.2.3.2 Fosfolipídios

Um sistema que é amplamente utilizado como modelo da membrana biológica é a monocamada de Langmuir de lipídios. As monocamadas de Langmuir de lipídios podem ser usadas na mimetização de membranas celulares [37], o que permite estudar as interações entre compostos, fotossensibilizadores por exemplo, no nível molecular [103]. A monocamada lipídica pode ser entendida como metade de uma membrana celular, e a subfase aquosa como a região intra ou extracelular.

Quando se transferem as monocamadas da interface líquida para suportes sólidos, obtêm-se os filmes Langmuir-Blodgett (LB). Para isso, atravessa-se o suporte sólido perpendicularmente à interface ar-água. Em cada imersão ou emersão na subfase aquosa uma camada é transferida [92]. Assim, filmes podem ser construídos com o número de camadas controlado, tendo então um elevado grau de orientação molecular.

Os fosfolipídios escolhidos foram (Figura 20): 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato (DMPA) um fosfolipídio de caráter aniônico e o 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) de caráter zwitteriônico. Os lipídios foram adquiridos da empresa Avanti® Polar Lipids Inc. Tomou-se o cuidado em realizar os experimentos em temperatura na qual os lipídios estivessem em sua fase gel, ou seja, abaixo da temperatura de transição. As temperaturas de transição de fase dos fosfolipídios estudados são respectivamente, $T_m = 50^\circ\text{C}$ e $T_m = 41^\circ\text{C}$.

Figura 20. Estruturas dos fosfolípidios utilizados nos experimentos de medida de pressão superficial estática e dinâmica. A interação estudada foi entre o ponto quântico (CdSe/ZnS)PEG e as porfirinas TPPS₄ e TMPyP na presença de cada fosfolípido.

Capítulo 5 – Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentaremos os resultados e a discussão para o conjunto de objetivos específicos propostos na Seção 1.1.2 Objetivos específicos. As seções foram organizadas seguindo a ordem: estudos das interações PQ-FS; e depois como essas interações, PQ-FS, eram alteradas na presença de sistemas nano-organizados – modelos de estruturas biológicas.

5.1 Características espectroscópicas dos pontos quânticos estudados

A seguir, apresentaremos as características espectroscópicas e algumas características físico-químicas dos PQs utilizados neste trabalho.

Os PQ escolhidos exibem um espectro de absorção largo, com máximos do primeiro pico excitônico de absorção centrados em 480-560 nm. Os máximos de emissão variam entre 530-580 nm. Todas as características encontradas em nossos PQs estão de acordo com as propriedades eletrônicas singulares dos PQs [13]. Para determinar propriedades como o diâmetro empírico ($D_{empírico}$), constante de absorção molar (ε), energia de transição correspondente ao primeiro pico excitônico de absorção (ΔE), usamos as equações do artigo Ref. [104]:

$$\begin{aligned} CdTe \left\{ \begin{aligned} D &= (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - (194,84) \\ \varepsilon &= 10043(D)^{2,12} \\ \varepsilon &= 3450\Delta E(D)^{2,4} \Rightarrow \Delta E = \varepsilon/[3450(D)^{2,4}] \end{aligned} \right. \\ CdSe \left\{ \begin{aligned} D &= (1,6122 \times 10^{-9})\lambda^4 - (2,6575 \times 10^{-6})\lambda^3 + (1,6242)\lambda^2 - (0,4277)\lambda + (41,57) \\ \varepsilon &= 5857(D)^{2,65} \\ \varepsilon &= 1600\Delta E(D)^3 \Rightarrow \Delta E = \varepsilon/[1600(D)^3] \end{aligned} \right. \end{aligned}$$

Como se pode observar (Figura 21B, Figura 22B e Figura 23B), os perfis de decaimento de luminescência dos PQ são multiexponenciais. Porém, ajustamos cada decaimento por uma curva biexponencial, obtendo ajustes com boa concordância, isto é, $R^2 \cong 0,999$. Essa abordagem será utilizada ao longo de todo o trabalho, como veremos no capítulo seguinte. O tempo de vida médio (τ_m) foi calculado seguindo a expressão:

$$\tau_m = \frac{\tau_1^2 \times A_1 + \tau_2^2 \times A_2}{\tau_1 \times A_1 + \tau_2 \times A_2} \quad (5.1)$$

em que A_1 e A_2 são fatores pré-exponenciais dos respectivos tempos τ_1 e τ_2 .

A Tabela 3, abaixo, resume as principais características espectroscópicas dos PQs estudados. Ela contém informações, como grupo funcional usado para funcionalizar a superfície, diâmetro empírico ($D_{empírico}$), comprimento de onda de máxima emissão da luminescência (λ_{em}), tempo de vida médio de luminescência (τ_m), potencial zeta (ζ), etc.

Tabela 3 Características dos pontos quânticos estudados neste trabalho

PQ	Func.	$D_{empírico}$ (nm)	ϵ ($M^{-1}.cm^{-1}$)	1^o Pico abs. (nm)	ΔE (eV)	λ_{em} (nm)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_m (ns)	ζ (mV)
<i>CdTe</i>	MPA	2,0	$4,41 \times 10^4$	489	2,42	543	$0,6 \pm 0,1$	$9,9 \pm 0,1$	$9,1 \pm 0,1$	$-30,8 \pm 2,2$
<i>CdSe/ZnS</i>	PEG	2,5	$6,99 \times 10^4$	519	2,80	535	$1,2 \pm 0,1$	35 ± 1	37 ± 2	Neutra ou
<i>CdSe/ZnS</i>	PEG	3,1	$1,16 \times 10^5$	552	2,43	570	$3,6 \pm 0,1$	26 ± 1	24 ± 2	descarregada
<i>CdSe/ZnS</i>	Cys	2,6	$7,08 \times 10^4$	520	2,52	558	$1,0 \pm 0,1$	$4,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	$-36,1 \pm 0,9$
<i>CdSe/ZnS</i>	Cys	3,1	$1,27 \times 10^5$	555	2,42	575	$0,4 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,01$	$-42,2 \pm 1,3$

Figura 21. (A) Absorção e emissão normalizada para dois pontos quânticos (CdSe/ZnS) de tamanhos diferentes com superfície funcionalizada com polietileno glicol (PEG), em meio aquoso: PQ535PEG (linhas pretas) e PQ570PEG (linhas vermelhas); e (B) perfil de decaimento de luminescência destes PQs em meio aquoso.

Figura 22. (A) Absorção normalizada (linha preta) e emissão normalizada do ponto quântico (CdTe)543MPA com superfície funcionalizada com ácido 3-Mercaptopropiônico (MPA) em meio aquoso; e (B) perfil de decaimento de luminescência deste PQ em meio aquoso.

Figura 23. (A) Absorção e emissão normalizada para dois pontos quânticos (CdSe/ZnS) de tamanhos diferentes com superfície funcionalizada com cisteína (Cys), em meio aquoso: PQ558Cys (linhas pretas) e PQ575Cys (linhas vermelhas); e (B) perfil de decaimento de luminescência destes PQs em meio aquoso.

5.2 Características espectroscópicas dos fotossensibilizadores estudados

O espectros de absorção das porfirinas TPPS₄ e TMPyP apresentam máximos da banda de Soret em 413 nm e 421 nm, respectivamente (Figura 24B), característica das formas não protonadas dessas porfirinas [101,105,106]. Portanto, em tampão fosfato (T = 23 °C; pH 7,3; 7,5.10⁻³ mol.L⁻¹) a porfirina TPPS₄ possui carga líquida -4 e a TMPyP carga líquida +4.

Figura 24. (A) Absorção e emissão normalizada para os dois fotossensibilizadores usados neste trabalho, em meio aquoso: TPPS₄ (linhas pretas) e TMPyP (linhas vermelhas); (B) espectro de absorção dos FS em meio aquoso e (C) amplificação do espectro de absorção; e (D) perfil de decaimento de fluorescência destas porfirinas em meio aquoso.

A Tabela 4 resume as características das porfirinas usadas neste trabalho.

Tabela 4 Características espectroscópicas e físico-química das porfirinas usadas nos estudos

FS	ϵ (M ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{Soret} (nm)	λ_{em} (nm)	τ_1 (ns)	τ_2 (ns)	τ_m (ns)	Carga líquida	ζ (mV)
TPPS ₄	1,3x10 ⁴ ;	413	650	9,3 ±	—	—	-4	-37,6 ±
	$\lambda = 515$ nm			0,1				6,3
TMPyP	1,5x10 ⁴ ;	421	660	1,7 ±	5,4 ±	4,7 ±	+4	-23,3 ±
	$\lambda = 518$ nm			0,1	0,1	0,2		7,9

5.3 Interações PQ-FS: efeitos da funcionalização da superfície

Na seção anterior, apresentamos as características espectroscópicas e físico-químicas dos PQs e dos FS escolhidos como objetos de estudo deste trabalho. Conhecidas tais características, iniciamos os estudos de interação. Veremos que apesar dos grupos funcionais serem diferentes, eles preservam algumas características que conferem propriedades semelhantes ao interagirem com os FS estudados neste trabalho.

5.3.1 PQ funcionalizados com polietileno glicol (PEG)

Nesta seção estudamos os aspectos da interação entre o ponto quântico (CdSe/ZnS)PEG – ver Tabela 3 – e os FS (catiônico, TMPyP, e aniônico, TPPS₄). Para cada par PQ-FS foram estudados os efeitos dos FS nas características da luminescência das soluções PQ-FS no estado estacionário e com resolução temporal. Um exemplo dos resultados obtidos para os quatro pares é mostrado na Figura 25. Tanto nos experimentos de estado estacionário quanto nos experimentos com resolução temporal, os pares foram excitados em $\lambda = 470$ nm, evitando a excitação da porfirina já que neste comprimento de onda a absorbância da PPh foi menor que 0,01, evitando-se a reabsorção da luminescência do PQ pela PPh (efeito de filtro interno).

A excitação do PQ em 470 nm induz uma intensa luminescência entre 530 e 620 nm (curva preta, Figura 25A) bem como um perfil multiexponencial do decaimento de luminescência (curva preta, Figura 25B). Adicionando sucessivas alíquotas de porfirinas (TMPyP ou TPPS₄) induz-se a diminuição tanto da intensidade quanto do tempo de decaimento de luminescência.

Figura 25. Supressão da luminescência do (CdSe/ZnS)570PEG pela TPPS₄ em experimentos no estado estacionário e os espectros de absorção das porfirinas TMPyP (traço vermelho) e TPPS₄ (traço preto) (A) e com resolução temporal (B). Em ambos os casos as amostras foram excitadas em $\lambda = 470$ nm.

Para obter as características dinâmicas da interação os dados obtidos foram tratados seguindo a teoria de Stern-Volmer descrita na Seção 3.1 Supressão de estados excitados. Além de analisar a supressão de duas componentes temporais das curvas de decaimento da luminescência, foram analisadas as mudanças nos tempos médios de decaimento calculados segundo a equação 5.1.

Em todos os pares estudados foi observada dependência quadrática da curva de supressão de Stern-Volmer no estado estacionário $(I_0/I) - 1 = AX + BX^2$ (Figura 26A).

Figura 26. Curva de supressão de Stern-Volmer para o par (CdSe/ZnS)570PEG+TPPS₄: (A) não modificada (B) modificada.

Esse efeito quadrático não pode ser atribuído à absorção da luz de excitação ou a reabsorção da luminescência do PQ pela PPh (efeito de filtro interno). Por outro lado, tal efeito

poderia ser associado à participação de dois mecanismos de supressão: estático e dinâmico [32]. Entretanto, o tratamento desses dados está em concordância com a dependência linear de Stern-Volmer modificada (Seção 3.1 Supressão de estados excitados):

$$\frac{I_0}{(I_0 - I)} = \frac{1}{f_a} + \frac{1}{(f_a K_a [Q])}$$

no qual f_a é a fração acessível de PQ ao supressor Q e K_a é a constante de Stern-Volmer de supressão da fração acessível. O ajuste mostrou dependência linear com fatores $f_a > 1$ (Tabela 5).

Tabela 5 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação de diferentes pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh obtidos em experimentos no estado estacionário

Par	f_a	$K_{SV} (M^{-1})$	$\tau_m (s)$	$k_q (M^{-1}s^{-1})$
(CdSe/ZnS)535PEG+TMPyP	1,2	$2,2 \times 10^5$	37×10^{-9}	$5,9 \times 10^{12}$
(CdSe/ZnS)535PEG+TPPS ₄	1,3	$4,0 \times 10^5$	37×10^{-9}	$1,1 \times 10^{13}$
(CdSe/ZnS)570PEG+TMPyP	1,1	$2,6 \times 10^6$	24×10^{-9}	$1,1 \times 10^{14}$
(CdSe/ZnS)570PEG+TPPS ₄	1,4	$8,2 \times 10^6$	24×10^{-9}	$3,4 \times 10^{14}$

Tal fato nós interpretamos como a formação de agregados mistos entre a molécula de porfirina e alguns pontos quânticos, em concordância Ref. [21,107,108]. Dentro desse agregado a porfirina pode suprimir a luminescência de vários pontos quânticos. O PQ interage com a porfirina, provavelmente, através do grupo que funcionaliza sua superfície. Existe a possibilidade de a porfirina intercalar entre esses grupos funcionais, ou seja, ligando-se diretamente à superfície do PQ, mas essa hipótese é pouco provável já que isto acarretaria numa mudança dramática tanto no espectro de absorção ótica quanto no espectro de luminescência do PQ, ambos provocados pelo processo de transferência de carga.

As medidas do espalhamento dinâmico de luz também mostraram o aumento do tamanho das partículas no sistema PQ+PPh com o aumento da concentração da porfirina (Tabela 6). Nesse caso, se esperaria a formação de partículas com dimensões lineares maiores do que somente de PQ ou de PPh. Tal suposição foi confirmada através dos resultados de espalhamento dinâmico de luz. O tamanho linear das partículas presentes nas soluções PQ-PPh aumentou dramaticamente. Mais especificamente, para o par (CdSe/ZnS)570PEG+TPPS₄ o tamanho foi de $(8,5 \pm 0,7)$ nm, característico deste PQ, até (600 ± 200) nm, enquanto a concentração da TPPS₄

aumentava (Tabela 6). Supondo que o agregado é composto por uma única molécula de porfirina cercado por vários PQs, o aumento da concentração de PPh não deve aumentar o tamanho do agregado, mas apenas aumentar sua quantidade. Assim, o efeito observado pode significar que estes agregados primários contendo uma molécula de PPh e vários PQs, devem interagir, produzindo agregados mistos maiores compostos por várias moléculas de PPh e PQ (Figura 27). O tamanho desses agregados deve aumentar conforme o aumento de agregados primários.

Tabela 6 Tamanho linear e potencial zeta do sistema contendo o ponto quântico (CdSe/ZnS)PEG em função do tamanho do ponto quântico e da concentração de porfirina

Par	[Porfirina] (μM)	Tamanho (nm)	ζ (mV)
<i>(CdSe/ZnS)535PEG+TMPyP</i>	0,0	$5,9 \pm 0,4$	$-2,7 \pm 1,0$
	2,0	370 ± 170	$-10,4 \pm 8,3$
	6,0	440 ± 220	$-3,5 \pm 3,2$
	10,0	410 ± 200	$-1,9 \pm 3,1$
<i>(CdSe/ZnS)535PEG+TPPS₄</i>	0,0	—	$-2,7 \pm 1,0$
	0,5	—	$-17,2 \pm 11,2$
	1,0	—	$-13,7 \pm 2,9$
	2,0	—	$-27,2 \pm 7,9$
	4,0	—	$-30,8 \pm 6,1$
	5,0	—	$-32,7 \pm 1,9$
<i>(CdSe/ZnS)570PEG+TMPyP</i>	0,0	$8,5 \pm 0,7$	$2,3 \pm 0,1$
	0,5	23 ± 6	—
	1,0	150 ± 70	$-11,4 \pm 5,1$
	2,0	310 ± 140	$-4,4 \pm 2,8$
	4,0	780 ± 360	$-1,4 \pm 3,5$
	6,0	880 ± 400	—
<i>(CdSe/ZnS)570PEG+TPPS₄</i>	0	$8,5 \pm 0,7$	$+1,8 \pm 0,8$
	0,5	18 ± 2	$-15,2 \pm 14,2$
	1,0	40 ± 10	$-25,8 \pm 5,5$
	2,0	600 ± 200	$-29,6 \pm 4,1$
	5,0	500 ± 200	$-30,1 \pm 6,1$

Figura 27. Formação de agregados mistos tipo rede pela interação entre o ponto quântico e a porfirina.

Essa suposição está em concordância com os resultados de medidas do espalhamento ressonante de luz os quais mostraram o aumento da intensidade do espalhamento em toda a região de absorção ótica do PQ quando a porfirina é adicionada à solução (Figura 28).

Figura 28. Espectro de espalhamento de luz ressonante do par PQ (CdSe/ZnS)570PEG na ausência e na presença da porfirina TPPS₄.

Ao mesmo tempo, a ausência da banda característica de espalhamento na região da banda de Soret da TPPS₄ (380-440 nm) e o vale nesta região, o qual surge devido à reabsorção de luz espalhada pela TPPS₄, mostra que não há contato entre as moléculas da TPPS₄ nos agregados mistos, provavelmente devido à separação causada pelas partículas de nanocristais PQ.

Em todos os pares estudados foi observada dependência linear da curva de supressão de Stern-Volmer para os experimentos com resolução temporal (Figura 29).

Figura 29. Dependência linear da curva de supressão de Stern-Volmer com resolução temporal do par (CdSe/ZnS)570PEG+TPPS₄.

Os valores das constantes bimoleculares de supressão também foram maiores que o limite difusional ($k_q \cong 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), Tabela 7. Entretanto, os valores de k_q obtidos em experimentos com resolução temporal foram menores em relação aos obtidos nos experimentos de estado estacionário, mostrando que existem no mínimo dois mecanismos de supressão diferentes.

Tabela 7 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação de diferentes pares (CdSe/ZnS)PEG+PPH obtidos em experimentos com resolução temporal

Par	f_a	$K_{SV} (\text{M}^{-1})$	$\tau (\times 10^{-9} \text{ s})$	$k_q (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$
(CdSe/ZnS)535PEG+TMPyP	τ_1	$(4,8 \pm 0,4) \times 10^5$	$1,2 \pm 0,1$	$(4,0 \pm 0,1) \times 10^{14}$
	τ_2	$(8,1 \pm 0,2) \times 10^4$	35 ± 1	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^{12}$
	τ_m	$(8,4 \pm 0,3) \times 10^4$	37 ± 1	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^{12}$
(CdSe/ZnS)535PEG+TPPS ₄	τ_1	$(8,5 \pm 0,5) \times 10^4$	$1,2 \pm 0,2$	$(7,1 \pm 0,1) \times 10^{13}$
	τ_2	$(3,6 \pm 0,1) \times 10^4$	35 ± 1	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{12}$
	τ_m	$(3,5 \pm 0,1) \times 10^4$	37 ± 1	$(9,5 \pm 0,1) \times 10^{11}$
(CdSe/ZnS)570PEG+TMPyP	τ_1	$(2,8 \pm 0,7) \times 10^6$	$3,6 \pm 0,1$	$(7,8 \pm 0,2) \times 10^{14}$
	τ_2	$(4,4 \pm 0,2) \times 10^5$	26 ± 1	$(1,7 \pm 0,1) \times 10^{13}$
	τ_m	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^5$	24 ± 2	$(1,8 \pm 0,1) \times 10^{13}$
(CdSe/ZnS)570PEG+TPPS ₄	τ_1	$(4,7 \pm 0,1) \times 10^5$	$3,6 \pm 0,1$	$(1,3 \pm 0,1) \times 10^{14}$
	τ_2	$(5,8 \pm 0,3) \times 10^5$	26 ± 1	$(2,2 \pm 0,2) \times 10^{13}$
	τ_m	$(6,9 \pm 0,2) \times 10^5$	24 ± 2	$(2,9 \pm 0,1) \times 10^{13}$

A existência de vários mecanismos de supressão durante a interação de PQs com supressores já foi relatada em uma série de estudos, os quais mencionaram transferência de

carga (TC)[109], transferência de energia por ressonância de Förster (FRET)[23,110,111], tunelamento de elétrons (TE) [112], e transferência de energia não-FRET[113]. O tempo característico dos mecanismos de TC e TE é da ordem de centenas de femtossegundos a unidades de picossegundos [109,113]. Em nossos experimentos com resolução temporal, a resolução foi da ordem de 100 ps. Portanto, em nosso caso, os mecanismos de CT e ET podem contribuir para a supressão da luminescência do PQ no estado estacionário, a qual se manifesta apenas na redução da intensidade da luminescência. Assim, podemos associar os resultados de supressão, tanto estacionária quanto com resolução temporal, com a ocorrência de vários mecanismos de supressão: “curto” alcance, como o TC e TE, e de “longo” alcance, como vários tipos de transferência de energia.

Na supressão do par (CdSe/ZnS)570PEG+TPPS₄ foi observado o aumento da intensidade da fluorescência de TPPS₄ com o aumento da concentração de PQ (Figura 30A) acompanhado de um ligeiro aumento do tempo de vida da fluorescência de TPPS₄ (Figura 30B), confirmando que há transferência de energia do PQ para a PPh. Na presença da TMPyP não houve mudança significativa na intensidade nem no tempo de vida da luminescência do (CdSe/ZnS)570PEG (Figura 30C e D). Os dados de ζ (Tabela 6) mostram que não há mudança de ζ da solução contendo apenas PQ ou na presença de TMPyP, significando ausência de interação eletrostática entre eles.

Figura 30. Aumento da intensidade (A) e do tempo de vida (B) da fluorescência da TPPS₄ com o aumento da concentração do (CdSe/ZnS)570PEG. Na presença de TMPyP não houve mudança significativa na intensidade nem no tempo de vida da luminescência do (CdSe/ZnS)570PEG.

Outros resultados que confirmam o mecanismo de transferência de energia de longo alcance são os valores das constantes de supressão bimolecular (Tabela 7) – obtidas a partir de τ_1 , τ_2 e τ_m – serem muito maior que k_q difusional. A sobreposição espectral do espectro de

emissão de luminescência do PQ e do espectro de absorção da TPPS₄ (Figura 25A) também evidenciam a transferência de energia via FRET do PQ para a TPPS₄. No caso da TMPyP, apesar de existir sobreposição espectral, os valores de ζ da Tabela 6 mostram que não há interação eletrostática entre eles.

Os cálculos da distância entre o doador de energia e o aceitador, segundo a teoria de Förster (Seção 3.2.2 Transferência de energia por interação eletrostática de longo alcance), para os pares foram:

- (CdSe/ZnS)535PEG+TMPyP $\rightarrow 4,5 \text{ nm} \leq r \leq 5,1 \text{ nm}$,
- (CdSe/ZnS)535PEG+ TPPS₄ $\rightarrow 4,4 \text{ nm} \leq r \leq 4,6 \text{ nm}$,
- (CdSe/ZnS)570PEG+TMPyP $\rightarrow 4,5 \text{ nm} \leq r \leq 4,8 \text{ nm}$,
- (CdSe/ZnS)570PEG+TPPS₄ $\rightarrow 3,9 \text{ nm} \leq r \leq 5,1 \text{ nm}$

Todos os valores são próximos ao raio hidrodinâmico dos respectivos PQ. Este resultado demonstra que a supressão da luminescência do PQ pela PPh ocorre dentro do agregado formado entre as moléculas de PQ e PPh. Esta observação está de acordo com a suposição de que os agregados mistos PQ&PPh são formados em concentrações elevadas de PPh, possibilitando que uma molécula PPh possa suprimir vários PQ no estado excitado.

Concluimos, portanto, que a supressão do PQ (CdSe/ZnS)PEG em seu estado excitado pelas porfirinas TMPyP e TPPS₄, ocorre quando o agregado misto PQ&PPh&PQ é formado em elevadas concentrações de PPh. Dentro do agregado misto uma única molécula de porfirina pode suprimir vários pontos quânticos ($f_a > 1$). A supressão surge a partir de dois tipos de mecanismos: de curto alcance, como TC e TE, e de longo alcance (transferência de energia ressonante).

5.3.2 PQ funcionalizado com ácido mercaptopropiônico (MPA)

Nesta seção estudamos os aspectos da interação entre o ponto quântico (CdTe)MPA – ver Tabela 3 – e as porfirinas catiônica (TMPyP) e aniônica (TPPS₄). Para cada par PQ-FS foram estudados os efeitos dos FS nas características da luminescência das soluções PQ-FS no estado estacionário e com resolução temporal. Tanto nos experimentos de estado estacionário quanto nos experimentos com resolução temporal, os pares (CdTe)MPA+TMPyP e (CdTe)MPA+TPPS₄ foram excitados em $\lambda = 470$ nm, evitando a excitação da porfirina já que neste comprimento de onda a absorvância da PPh foi menor que 0,01, evitando-se a reabsorção da luminescência do PQ pela PPh (efeito de filtro interno).

As características da luminescência das soluções contendo os pares (CdTe)543MPA+TPPS₄ e (CdTe)543MPA+TMPyP, obedeceram as mesmas características encontradas na seção anterior para os pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh. A excitação do PQ em 470 nm induz intensa luminescência entre 500 e 600 nm (curva preta, Figura 31A) bem como um perfil multiexponencial do decaimento de luminescência (curva preta, Figura 31B). Adicionando sucessivas alíquotas das porfirinas induz-se a diminuição tanto da intensidade quanto do tempo de decaimento de luminescência.

Figura 31. Supressão da luminescência do (CdTe)543MPA pela TPPS₄ em experimentos no estado estacionário e o espectro de absorção da porfirina TPPS₄ (traço) (A) e com resolução temporal (B). Em ambos os casos as amostras foram excitadas em $\lambda = 470$ nm.

Para o par (CdTe)543MPA+TPPS₄, foram observadas dependências não lineares de Stern-Volmer (Figura 32A e C), tanto para o experimento no estado estacionário quanto para o

experimento com resolução temporal. As curvas de supressão foram ajustadas segundo a equação de Stern-Volmer modificada (Figura 32B e D).

Figura 32. Curva de supressão de Stern-Volmer para o par (CdTe)543MPA+TPPS₄ com dependência não linear para o experimento no estado estacionário (A) e com resolução temporal (C). Ajustes com a equação de Stern-Volmer modificada para os experimentos de supressão no estado estacionário (B) e com resolução temporal (D).

Neste caso, os ajustes com Stern-Volmer modificada resultaram em $f_a < 1$, mostrando menor acessibilidade do PQ para o supressor (TPPS₄). Entretanto, as constantes bimoleculares (k_q) da supressão (Tabela 8) são, em todos os casos, maiores que as constantes de processos limitados por difusão em solução aquosa $k_{q \text{ difusão}} \approx 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Isso mostra que:

1. A supressão acontece devido a formação de um agregado PQ&PPh com a acessibilidade menor que 1.
2. O agregado misto (PQ&PPh&PQ), observado na Seção 5.3.1 PQ funcionalizados com polietileno glicol (PEG), não é formado na interação entre o ponto quântico (CdTe)543MPA e a porfirina TPPS₄.

Tabela 8 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação do par (CdTe)543MPA+TPPS₄ obtidos em experimentos no estado estacionário e com resolução temporal

Experimento		f_a	$K_{SV} (M^{-1})$	$\tau (x10^{-9} s)$	$k_q (M^{-1}s^{-1})$
<i>Estado estacionário</i>		0,7	$(1,5 \pm 0,1) \times 10^7$	$9,1 \pm 0,1$	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{15}$
<i>Resolução temporal</i>	τ_1	0,3	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^7$	$0,6 \pm 0,1$	$(2,0 \pm 0,1) \times 10^{16}$
	τ_2	0,3	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^6$	$9,9 \pm 0,1$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{14}$
	τ_m	0,4	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^6$	$9,1 \pm 0,1$	$(1,2 \pm 0,1) \times 10^{14}$

A diminuição do fator f_a em comparação com os pares (CdSe/ZnS)PEG é, provavelmente, devido à repulsão eletrostática entre os grupos negativos do ponto quântico (CdTe)543MPA e os da TPPS₄, diminuindo a área de contato entre eles. A Tabela 9 mostra a invariância no valor de ζ , considerando os erros experimentais, conforme alíquotas de TPPS₄ são adicionadas na solução com (CdTe)543MPA, mostrando instabilidade do agregado (CdTe)543MPA&TPPS₄. Essa repulsão impediria a formação dos agregados mistos PQ&PPh&PQ.

Paralelamente, não houve aumento do tamanho linear das partículas na solução (CdTe)543MPA+TPPS₄, levando-se em conta os erros experimentais (Tabela 9). Este resultado é a confirmação de que a interação entre o (CdTe)543MPA e a TPPS₄ não forma agregados mistos PQ&PPh&PQ, mas sim agregados do tipo PQ&PPh.

Tabela 9 Tamanho linear e potencial zeta do sistema contendo o ponto quântico (CdTe)543MPA em função da concentração de porfirina TPPS₄

Par	[Porfirina] (μM)	Tamanho (nm)	ζ (mV)
(CdTe)543MPA+TPPS ₄	0	32 ± 23	$-26,0 \pm 1,6$
	0,04	43 ± 32	$-26,7 \pm 1,1$
	0,15	32 ± 24	$-29,5 \pm 0,4$
	0,30	31 ± 23	$-28,0 \pm 1,3$
	0,40	31 ± 23	$-29,3 \pm 0,8$
	0,70	29 ± 21	$-28,9 \pm 1,0$
	1,00	34 ± 27	$-30,0 \pm 0,9$
	1,50	52 ± 38	$-30,2 \pm 0,6$

Esta suposição é suportada com os resultados de medidas do espalhamento ressonante de luz, os quais mostraram que não existe aumento da intensidade do espalhamento em toda a região de absorção ótica do PQ quando a porfirina é adicionada na solução (Figura 33).

Figura 33. Espectros de espalhamento de luz ressonante do par (CdTe)543MPA+TPPS₄ com sucessivas adições da porfirina.

Na supressão do par (CdTe)543MPA+TPPS₄ não foi observado aumento da intensidade da fluorescência de TPPS₄ com o aumento da concentração de PQ (Figura 34), confirmando que não há transferência de energia do PQ para a PPh, apesar de existir sobreposição espectral (Figura 31A). Os cálculos da distância entre o doador de energia e o aceitador, supondo que a supressão observada na Figura 31 seja devido ao mecanismo de Förster (Seção 3.2.2 Transferência de energia por interação eletrostática de longo alcance), para o par (CdTe)543MPA+TPPS₄ foi de $3,5 \text{ nm} \leq r \leq 5,9 \text{ nm}$, cujo valor é próximo aos tamanhos das partículas, considerando o erro experimental, observados na Tabela 9. Entretanto, a transferência de energia não foi observada. Este resultado demonstra que a supressão da luminescência do PQ pela TPPS₄ ocorre por outro mecanismo.

Figura 34. Na adição do PQ (CdTe)543MPA não houve mudança significativa na intensidade da fluorescência da porfirina TPPS₄, indicando ausência de FRET.

Em outras palavras, o mecanismo de supressão que prevalece aqui é o mecanismo de curto alcance, já mencionado na Seção anterior. Os resultados que indicam a prevalência do mecanismo de curto alcance é o valor de $f_a < 1$, inexistência de agregados mistos PQ&PPh&PQ e a ausência do aumento da intensidade de fluorescência da PPh na Figura 34.

Contudo, a interação entre o ponto quântico (CdTe)543MPA e a porfirina TMPyP, carregada positivamente, apresentou características distintas as da TPPS₄.

As características da dependência de Stern-Volmer do par (CdTe)543+TMPyP foram as mesmas encontradas para os pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh, ou seja, dependência quadrática para o experimento no estado estacionário (Figura 35A) e dependência linear para o experimento com resolução temporal (Figura 35B).

Figura 35. Curva de supressão de Stern-Volmer para o par (CdTe)543MPA+TMPyP: (A) dependência não linear para o experimento no estado estacionário e (B) dependência linear para o experimento com resolução temporal.

Isso mostra que, possivelmente, o agregado misto (PQ&PPh&PQ) observado na Seção anterior, pode também estar se formando na interação entre o ponto quântico (CdTe)543MPA e a porfirina TMPyP. Neste caso o fator de acessibilidade (f_a) foi igual a $f_a = 2,5$ (Tabela 11).

Os dados que corroboram a formação dos agregados mistos neste caso são semelhantes aos resultados encontrados para os pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh, isto é, ocorrência de aumento da intensidade do espalhamento de luz ressonante (Figura 36), aumento no tamanho linear das partículas do sistema e, neste caso, a diminuição do potencial zeta do sistema, indicando interação eletrostática atrativa (Tabela 10).

Figura 36. Espectro de espalhamento de luz ressonante do par do PQ (CdTe)543MPA na ausência e na presença da porfirina TMPyP.

Tabela 10 Tamanho das partículas e potencial zeta do sistema contendo o ponto quântico (CdTe)543MPA em função da concentração de porfirina TMPyP

Par	[Porfirina] $\times 10^{-6}$ (M)	Tamanho (nm)	ζ (mV)
(CdSe/ZnS)543MPA+TMPyP	0	$29,3 \pm 20,6$	$-26,0 \pm 1,6$
	0,02	$28,0 \pm 18,3$	$-29,5 \pm 0,7$
	0,06	$65,2 \pm 53,4$	$-28,3 \pm 0,9$
	0,1	$174,7 \pm 112,7$	$-28,6 \pm 1,4$
	0,15	$224,0 \pm 245,7$	$-25,3 \pm 1,6$
	0,30	$100,7 \pm 69,0$	$-20,6 \pm 1,7$
	0,50	$352,6 \pm 446,3$	$-16,0 \pm 2,7$

Os valores de constantes bimoleculares de supressão também foram maiores que o limite por difusão. Entretanto os valores de k_q obtidos em experimentos com a resolução temporal foram menores que os obtidos nos experimentos no estado estacionário, mostrando que existem no mínimo dois mecanismos de supressão diferentes, como encontrado para os pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh.

Tabela 11 Valores de fator de acessibilidade f_a , constantes de supressão de Stern-Volmer (K_{SV}), tempos médios da luminescência (τ_m) e constantes bimoleculares (k_q) para interação do par (CdTe)543MPA+TMPyP obtidos em experimentos no estado estacionário e com resolução temporal

Experimento		f_a	K_{Sv} (M ⁻¹)	τ (x10 ⁻⁹ s)	k_q (M ⁻¹ s ⁻¹)
Estado estacionário		2,5	1,47x10 ⁷	9,1x10 ⁻⁹	1,6x10 ¹⁵
Resolução temporal	τ_1	1	(1,3 ± 0,6)x10 ⁷	0,57 ± 0,01	(2,3 ± 0,1)10 ¹⁶
	τ_2	1	(3,0 ± 0,8)x10 ⁶	10,0 ± 0,1	(3,0 ± 0,3)10 ¹⁴
	τ_m	1	(3,2 ± 0,9)x10 ⁶	9,1 ± 0,1	(3,5 ± 0,1)10 ¹⁴

O experimento que consistiu em fixar a concentração de [TMPyP] = $3,2 \times 10^{-5}$ M e adicionar alíquotas de PQ, mostrou mudança no perfil do espectro de absorção da PPh (Figura 37A) e mudança da intensidade da sua fluorescência (Figura 37B) que no início aumentou e com maior adição de PQ foi suprimida.

Figura 37. Mudança no espectro de absorção da porfirina TMPyP(A) e na intensidade de fluorescência (B) com a adição de (CdTe)543MPA com aparecimento de ponto isobéstico ($\lambda = 438$ nm) em (A).

Essas mudanças podem ser associadas à transferência de carga entre porfirina e PQ. Entretanto, o aumento inicial da intensidade da fluorescência pode ser associado à transferência de energia de PQ para porfirina, privilegiada no início do processo quando a concentração do PQ é baixa. Os cálculos da distância entre o doador de energia e o aceitador, segundo a teoria de Förster, para o par (CdTe)543MPA+TMPyP dá um resultado de $4,0 \text{ nm} \leq r \leq 4,3 \text{ nm}$. A transferência de energia é possível uma vez que existe sobreposição espectral entre o espectro de emissão de luminescência do PQ e o espectro de absorção da TMPyP (ver Figura 31A e Figura 24A).

Tendo em vista a mudança dos espectros de absorção da TMPyP, sugerindo a transferência de carga entre o PQ e a PPh, aprofundamos nossos estudos sobre a transferência de carga no par (CdTe)543MPA+TMPyP.

Inicialmente, estudamos como a variação da concentração da TMPyP influencia a transferência de carga entre o PQ e a PPh. Para isto, fixamos a concentração do [PQ] = $1,5 \times 10^{-6}$ M.

Figura 38. Transferência de carga entre a TMPyP e o PQ (CdTe)543MPA em função da concentração da porfirina. A concentração do [PQ] = $1,5 \times 10^{-6}$ M.

A Figura 38 mostra que a transferência de carga depende da razão [TMPyP] / [PQ], sendo privilegiada para [TMPyP] $\geq 5,0 \times 10^{-6}$ M.

Nos estudos seguintes, fixamos a concentração [TMPyP] = $5,0 \times 10^{-6}$ M. Nossa hipótese para a transferência de carga é a formação de um complexo $[PQ^{\delta+} \cdots TMPyP^{\delta-}]$, em que a carga, provavelmente, é transferida do PQ para a TMPyP, que está carregada positivamente.

Foram observadas mudanças tanto nos espectros de absorção da TMPyP, com surgimento de ponto isobéstico (Figura 39A), quanto nos espectros de emissão de fluorescência com mudanças da intensidade e deslocamento da banda de emissão de fluorescência de 660 nm para 632 nm (Figura 39C).

Figura 39. Mudança no espectro de absorção da porfirina TMPyP com aparecimento de ponto isobéstico (A) e na intensidade de fluorescência com deslocamento da banda de emissão (C) a partir da adição de (CdTe)543MPA, $\lambda_{ex} = 436$ nm.

O surgimento do ponto isobéstico indica a presença de no máximo duas espécies, as quais nós associamos às moléculas de porfirina livres na solução e o surgimento de uma nova espécie, o complexo (PQ $\cdots$ TMPyP). Outro resultado que corrobora a formação de um complexo

é a mudança observada no espectro de excitação de fluorescência (Figura 40) ao monitorarmos a emissão da TMPyP (660 nm).

Figura 40. Mudança no espectro de excitação de fluorescência com a formação do complexo (PQ...TMPyP) em função da concentração do PQ. Os espectros foram obtidos com $\lambda_{em} = 660$ nm.

A sugestão sobre formação de uma nova estrutura associada a um complexo com a transferência de carga entre o PQ e a porfirina está em acordo com os resultados observados em experimentos com resolução temporal (Figura 41). Realmente, o perfil de decaimento da fluorescência em comprimento de onda do máximo de fluorescência da nova espécie ($\lambda = 632$ nm; $\tau_{632nm} = 1,3$ ns) foi diferente tanto no perfil de decaimento de fluorescência da porfirina ($\lambda = 660$ nm; $\tau_{TMPyP} = 4,9$ ns), quanto do PQ ($\lambda = 543$ nm), Figura 22B. Os tempos de vida de fluorescência do complexo obtidos para $\lambda_{em} = 660$ nm (emissão da TMPyP) e $\lambda_{em} = 632$ nm (emissão do complexo) foram iguais, $\tau_{660nm} = \tau_{632nm} = 1,3$ ns, demonstrando que esse tempo é o tempo de vida de fluorescência característico do complexo.

Figura 41. Curvas de decaimento de fluorescência da porfirina TMPyP e do complexo (PQ...TMPyP) formado a partir da interação da porfirina com o ponto quântico (CdTe)543MPA. As curvas de decaimento de fluorescência representam a emissão da porfirina ($\lambda_{em} = 660$ nm) para a amostra contendo apenas TMPyP (linha preta) e para o complexo (linha vermelha). A emissão do complexo ($\lambda_{em} = 632$ nm) é representada pela linha verde.

Como dito anteriormente, a interação do PQ (CdTe)543MPA+TMPyP para baixas concentrações de TMPyP forma o agregado misto em que uma molécula de PPh interage com mais de um PQ. Contudo, ao aumentarmos a concentração do PQ privilegia-se a transferência de carga, logo a formação do complexo. Um dado que confirma que o complexo formado da transferência de carga entre o PQ e a PPh está presente no agregado misto é o aumento da intensidade do espalhamento de luz ressonante (Figura 42). Nele, vemos que as moléculas de TMPyP livres são consumidas durante a formação do complexo com o surgimento do vale em 460 nm, característico da banda de absorção do complexo. Paralelamente, o aumento da intensidade no ELR característica da TMPyP, 420-600 nm, mostra que o complexo (PQ...TMPyP) interage com moléculas de PPh, formando o agregado misto (PQ...TMPyP)&TMPyP.

Figura 42. Espectros de espalhamento de luz ressonante da formação do complexo (PQ...TMPyP) em função da concentração do PQ.

As medidas de *FLIM* (Figura 43) mostraram que realmente são observadas as partículas de tamanho linear > 400 nm.

Figura 43. Imagem do complexo (PQ...TMPyP) formado a partir de $20 \times 10^{-9} \text{ M}$ de porfirina TMPyP na presença de $4,55 \times 10^{-11} \text{ M}$ do ponto quântico (CdTe)543MPA (A) e.; histograma utilizado para gerar a imagem (C) dos tempos de vida de luminescência (FLIM).

Associamos os resultados acima a formação dos agregados mistos, e analisando em conjunto com os descritos anteriormente (experimentos: ELR, DLS, potencial zeta e FLIM), nosso modelo de interação em que uma porfirina interage com mais de um ponto quântico é corroborado.

O modelo de interação entre o PQ e a porfirina que propomos é a intercalação dos grupos funcionais do PQ ao anel porfirínico e uma dentre as quatro cargas positivas da porfirina interage de forma atrativa com o grupo carboxilato do MPA do PQ mais próximo (Figura 44).

Figura 44. Formação do complexo (PQ...TMPyP) resultado da interação entre o ponto quântico (CdTe)543MPAe a porfirina TMPyP. O anel porfirínico interage diretamente com o grupo carboxílico do MPA que funcionaliza o PQ, resultado na transferência de carga do PQ para a PPh.

Para comprovar a hipótese de intercalação do anel porfirínico com a funcionalização do PQ realizamos cálculos teóricos de Química Quântica. Buscou-se comprovar a mudança conformacional da porfirina a partir da interação de seu anel central com o grupo carboxilato da funcionalização do PQ. Procuramos, também, determinar qualitativamente, o deslocamento da banda de Soret ocorrido através da transferência de carga, calculando as transições eletrônicas verticais do estado fundamental tanto da TMPyP livre quanto do complexo (PQ...TMPyP), este representado pela funcionalização do PQ e a porfirina.

Os cálculos foram realizados utilizando segundo a Teoria do Funcional da Densidade (DFT, Density Functional Theory na sigla em inglês). Utilizou-se o programa computacional TurboMOLE 6.2 com o funcional híbrido B-P+dispersão e o conjunto de bases def2-SV(P) para determinar a geometria de equilíbrio[114–116]. Os espectros UV-Vis (excitações verticais) foram calculados utilizando o método TD-DFT com o funcional B-VWN e o conjunto de bases def2-SV(P). Todas as otimizações de geometrias foram realizadas sem o efeito do meio, isto é, sem efeito de solvente. Para efeitos de solvatação, as geometrias foram otimizadas para o solvente água ($\epsilon = 78,4$) utilizando o modelo COSMO (nativo do TurboMOLE).

A)

B)

Figura 45. Geometrias encontradas através dos cálculos teóricos de Química Quântica considerando o efeito de solvente para a TMPyP (A) e para o complexo (PQ...TMPyP) (B). O anel porfirínico em (A) é plano, porém ao transferir carga para o grupo carboxilato do MPA (B), o anel central é distorcido provocando mudanças nos ângulos diedrais entre os quatro grupos radicais e o anel central da porfirina.

Como podemos observar na Figura 45A, a porfirina TMPyP possui uma geometria plana em seu anel central com os quatro radicais dispostos em um ângulo diedral $\sim 64^\circ$ ao anel central.

A)

B)

Figura 46. Geometrias encontradas através dos cálculos teóricos de Química Quântica considerando o efeito de solvente para a TMPyP (A) e para o complexo (PQ...TMPyP) (B).

Contudo, da interação entre esse anel central e o grupo carboxilato da funcionalização do PQ – com distância entre eles de 1,465 Å – ocorre a transferência de carga da porfirina para a funcionalização. Isto é refletido na mudança conformacional da TMPyP (Figura 46B), alterando sua estrutura eletrônica, que por sua vez provoca o deslocamento da banda de Soret de 421 nm para 461 nm – resultado experimental – e 416 nm (força do oscilador = 0,5377) para 433 nm (força do oscilador = 0,2300) – cálculos teóricos.

A observação experimental mostrou que a formação do complexo (PQ...TMPyP) é dinâmica (Figura 47A e B). Essa dinâmica é refletida no espectro de emissão de fluorescência e no espalhamento de luz ressonante (Figura 47C e D).

Figura 47. A formação do complexo (PQ...TMPyP) é dinâmica. Formação do complexo em função do tempo para $[TMPyP] = 5,1 \times 10^{-6}$ M e $[PQ] = 80 \times 10^{-9}$ M (A) e as cinéticas de consumo da TMPyP com a respectiva cinética de formação do complexo (B). Da mesma forma os espectros de emissão (C) e espalhamento de luz ressonante durante a cinética de formação do complexo (PQ...TMPyP), nas mesmas condições.

Analisando as curvas cinéticas da formação do complexo calculamos para cada concentração do PQ a concentração da TMPyP livre e envolvida no complexo usando as equações

$$[TMPyP]_{final} = A_{421} / \epsilon_{421}$$

$$[TMPyP]_{ligada} = [TMPyP]_0 - [TMPyP]_{final}$$

em que ϵ_{421} é o coeficiente de absorção molar da TMPyP e A_{421} é a absorbância da solução no comprimento de onda 421 nm, $[TMPyP]_{final}$, $[TMPyP]_{ligada}$, e $[TMPyP]_0$ são as concentrações da TMPyP livre, complexada e sua concentração inicial, respectivamente.

Figura 48. Cinética de consumo da TMPyP (abs 421nm) e a respectiva cinética de formação do complexo (abs 461 nm) para $[PQ] = 8 \times 10^{-9}$ M.

Os cálculos mostram que para todas as concentrações do PQ as $[TMPyP]_{ligada}$ é de duas ordens de grandeza maior do que $[PQ]$ (veja Tabela 12).

Tabela 12 Valor da concentração inicial e final da TMPyP e da TMPyP ligada ao PQ em função da concentração do inicial do PQ, $[PQ]_0$ e os respectivos tempos de formação (τ_1) e separação (τ_{-1}) do complexo

$[PQ]_0$ (M)	$[TMPyP]_0$ (M)	$[TMPyP]_{final}$ (M)	$[TMPyP]_{ligada}$ (M)	$[TMPyP]_{ligada} / [PQ]_0$	τ_1 (s)	τ_{-1} (s)
8×10^{-9}	$4,64 \times 10^{-6}$	$3,25 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^{-6}$	174	7000 ± 100	7100 ± 100
16×10^{-9}	$4,91 \times 10^{-6}$	$2,50 \times 10^{-6}$	$2,41 \times 10^{-6}$	151	6000 ± 200	5900 ± 200
24×10^{-9}	$4,84 \times 10^{-6}$	$1,70 \times 10^{-6}$	$3,14 \times 10^{-6}$	131	3100 ± 100	3200 ± 100
40×10^{-9}	$4,66 \times 10^{-6}$	$9,27 \times 10^{-7}$	$3,73 \times 10^{-6}$	93	900 ± 10	990 ± 20
79×10^{-9}	$4,69 \times 10^{-6}$	$8,80 \times 10^{-7}$	$3,81 \times 10^{-6}$	48	290 ± 1	340 ± 10

Isso significa que um ponto quântico forma o complexo com várias moléculas (~ 100) de TMPyP. Tendo em vista que a concentração do PQ é bem menor do que $[TMPyP]_{ligada}$ podemos supor que praticamente todos PQs formam o complexo com a TMPyP e baseando-se nessa suposição calculamos o número médio de moléculas da TMPyP ligadas com um PQ como

$$n = [TMPyP]_{ligada} / [PQ]_0$$

em que $[PQ]_0$ é a concentração do PQ, adicionada na solução.

Pode se ver (Tabela 12) que esse número diminui quando $[PQ]_0$ aumenta. Entretanto, cada PQ pode formar o complexo com mais do que 100 moléculas da porfirina. Este resultado está em acordo com nossa sugestão de formação dos agregados mistos que incluem várias moléculas de porfirina e vários pontos quânticos.

A formação dos agregados mistos torna difícil a análise das características temporais do processo de formação de complexo de transferência de carga (PQ...TMPyP). Uma análise mais aprofundada desses resultados será realizada futuramente.

A partir dos resultados anteriores, continuamos os estudos de transferência de carga utilizando a técnica de *Flash*-fotólise. Nesta técnica podemos estudar estados excitados e espécies intermediárias cujos tempo de vida são extremamente curtos ($\sim 10^{-3}$ - 10^{-13} s). A técnica de fotólise por pulso de laser permite estudar os espectros e dinâmica de formação/desativação dos estados excitados (eletrônicos, vibracionais e rotacionais) de radicais livres, fotoisômeros e a formação de fotoprodutos secundários [117,118].

Nesta abordagem fixamos a concentração da porfirina [TMPyP] = 5×10^{-6} M e adicionamos alíquotas de PQ para estudar o estado excitado tripleto da porfirina em função da concentração do PQ. Monitoramos a formação do complexo através dos espectros de absorção ótica.

Sob ação de pulsos curtos do laser a porfirina, na ausência do PQ, forma um sinal associado com a formação do seu tripleto que, na ausência de oxigênio, se dissipa com um tempo característico de $175 \mu\text{s}$ (Figura 49A, curva preta).

Figura 49. Decaimentos monoexponencial do estado excitado tripleto da TMPyP e do complexo (PQ...TMPyP). O tempo de vida do tripleto para a TMPyP foi $175 \mu\text{s}$ e para o complexo $53 \mu\text{s}$ (A) e espectro diferencial normalizado do estado tripleto da porfirina TMPyP e do complexo (PQ...TMPyP) (B). Máximo de absorção do estado tripleto em: $\lambda = (470 \pm 5) \text{ nm}$ para TMPyP (—■—) e $\lambda = (495 \pm 5) \text{ nm}$ para (PQ...TMPyP) (—●—).

O espectro diferencial de absorção óptica do tripleto da TMPyP foi obtido variando o comprimento de onda de observação entre 350 e 800 nm (Figura 49B, curva preta).

Depois da adição do PQ, a amplitude desse sinal diminui com tempo conforme a diminuição da concentração da PPh livre e a formação do complexo e depois o sinal se torna negativo. Os valores negativos de $\Delta A_{470\text{nm}}$ apresentados na Figura 49A (curva verde) são associados

com a cinética de decaimento do estado excitado do complexo. O tempo obtido para essa cinética foi $\tau_1 \cong 53 \mu\text{s}$, o qual atribuímos exclusivamente ao estado excitado do complexo (PQ...TMPyP), já que o ponto quântico não possui estados excitados com tempos de vida maiores que unidades de nanossegundos. O espectro diferencial de absorção óptica do complexo é apresentado na Figura 49B, curva vermelha.

Analisando as curvas de decaimento do tripleto para diferentes concentrações do PQ pode-se concluir que não há supressão do tripleto pelo PQ (Figura 50A). Na presença de oxigênio (solução saturada com $\text{O}_2 \sim 1,5 \text{ mM}$) o estado excitado do complexo também está suprimido (Figura 50B).

Figura 50. Curvas normalizadas do decaimento do estado tripleto em $\lambda_{\text{em}} = 470 \text{ nm}$ em função da concentração do PQ. A concentração do oxigênio no experimento (A) foi $[\text{O}_2] \sim 0,3 \text{ mM}$ (atm) e no experimento (B) $[\text{O}_2] \sim 1,5 \text{ mM}$.

O valor negativo de ΔA (Figura 49B, curva vermelha), mostra que no comprimento de onda $\lambda = 470 \text{ nm}$ a absorção do estado excitado do complexo é menor em relação ao seu estado fundamental. Para altas concentrações do complexo (alta concentração de PQ) a absorção do complexo predomina e por isso depois da excitação acontece o “*clearence*” da solução – diminuição da intensidade do sinal da solução em função do tempo de análise da amostra, ou seja, irradiação pela lâmpada de análise – cuja cinética de decaimento é o decaimento do estado excitado do complexo.

Em outras palavras, a absorção óptica em qualquer comprimento de onda no caso da formação do complexo depois da excitação é

$$\begin{aligned}
A = & \varepsilon_{TMPyP}(S_0 \rightarrow S_1)[TMPyP] + \varepsilon_{TMPyP}(T_1 \rightarrow T_n)[T_1^*]_{TMPyP} \\
& + \varepsilon_{complexo}(X)[PQ \cdots TMPyP]_X + \varepsilon_{complexo}(X^*)[PQ \cdots TMPyP]_{X^*} \\
& + \varepsilon_{PQ}(X)[PQ]_X + \varepsilon_{PQ}(X^*)[PQ]_{X^*}
\end{aligned}$$

em que os índices X e X* representam, respectivamente, o estado fundamental e o estado excitado para o complexo (PQ...TMPyP) e para o PQ.

Caso haja excesso de PQ, praticamente, toda porfirina estará complexada. Assim, podemos considerar $[TMPyP] = [T_1^*] = 0$. O PQ em 470 nm não possui absorção. Por isso $[PQ]_X = [PQ]_{X^*} = 0$. Logo,

$$A = \varepsilon_{complexo}(X)[PQ \cdots TMPyP]_X + \varepsilon_{complexo}(X^*)[PQ \cdots TMPyP]_{X^*}$$

Por outro lado,

$$[PQ \cdots TMPyP]_X = [PQ \cdots TMPyP]_{X0} - [PQ \cdots TMPyP]_{X^*}$$

em que $[PQ \cdots TMPyP]_{X0}$ é a concentração do complexo antes do pulso de laser. Portanto,

$$A = \varepsilon_{complexo}(X)[PQ \cdots TMPyP]_{X0} + \{\varepsilon_{complexo}(X^*) - \varepsilon_{complexo}(X)\}[PQ \cdots TMPyP]_{X^*}$$

$$\varepsilon_{complexo}(X)[PQ \cdots TMPyP]_{X0} = A_0; \text{ absorbância antes do pulso de laser}$$

$$\Delta A = A_0 - A = \{\varepsilon_{complexo}(X) - \varepsilon_{complexo}(X^*)\}[PQ \cdots TMPyP]_{X^*}$$

ou

$$\Delta A(t) = \text{constante}[PQ \cdots TMPyP]_{X^*} = \Delta A_0 e^{-t/\tau}$$

em que τ é o tempo de vida do estado excitado do complexo.

Vimos, portanto, que o estado excitado tripleto do complexo (PQ...TMPyP) possui cinética e tempo característico de 53 μ s. A cinética é independente da concentração do PQ e o estado tripleto do complexo é suprimido pelo oxigênio molecular. Vimos também que o complexo possui espectro diferencial distinto do espectro diferencial da porfirina, sendo seu máximo em 495 nm ao invés de 470 nm para a TMPyP.

5.3.3 PQ funcionalizados com cisteína (Cys)

Um efeito extraordinário, e curioso, foi observado na interação do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys com a porfirina TPPS₄, ambos carregados negativamente (Tabela 3 e Tabela 4). Ao invés de ocorrer a esperada supressão da luminescência do PQ pela adição da porfirina, observamos o aumento da intensidade de luminescência do PQ (Figura 51A). Efeito semelhante foi observado nos experimentos com resolução temporal, em que os tempos de vida de luminescência do PQ aumentaram, ao invés de diminuir (Figura 51B). Buscamos investigar quais foram os processos responsáveis por esses aumentos. Realizamos experimentos de fluorescência no estado estacionário e com resolução temporal, calculamos o rendimento quântico do sistema e realizamos medidas de tamanho das partículas utilizando a técnica de *DLS*. Todos os espectros de luminescência foram corrigidos pela absorção no comprimento de onda de excitação, $\lambda_{ex} = 460$ nm, exceto os experimentos com resolução temporal.

Figura 51. Aumento da luminescência do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys quando adicionadas alíquotas da porfirina TPPS₄ (A). Os espectros de luminescência do PQ foram obtidos excitando em $\lambda_{ex} = 460$ nm (excitação do PQ apenas) e $\lambda_{em} = 558$ nm (emissão do PQ apenas) e (B) mudança nos perfis de decaimento de luminescência do ponto quântico ($\lambda_{ex} = 460$ nm e $\lambda_{em} = 558$ nm) quando adicionado alíquotas de TPPS₄.

Observamos que os espectros de absorção ótica da TPPS₄ não sofreram alteração na presença do PQ (Figura 52A) e que a adição da porfirina apenas aumenta a intensidade do espectro proporcionalmente à concentração da porfirina, como esperado. Paralelamente, a adição da TPPS₄ diminui a intensidade de espalhamento de luz ressonante do sistema (Figura 52B), indicando uma interação entre o PQ e a porfirina. Essa diminuição não pode ser atribuída à diluição do PQ pela adição de alíquotas de porfirina, pois a concentração final do PQ variou

apenas 6,5%. Logo, a adição da TPPS₄ estimula a desagregação do PQ-Cys, supondo que este se encontra na forma agregada.

Figura 52. A interação entre o (CdSe/ZnS)558Cys e a TPPS₄ não altera os espectros de absorção ótica (A) e a adição de TPPS₄ diminui a intensidade de espalhamento de luz ressonante do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys (B).

Então, o aumento na intensidade de luminescência do PQ na Figura 51A pode estar associado à desagregação do PQ pela interação com a porfirina.

Outro dado relevante que contribui para a hipótese de o PQ encontrar-se na forma agregada é a diminuição do tamanho do PQ (Tabela 13) quando realizamos sucessivas diluições da solução inicial contendo apenas PQ. Os tamanhos foram obtidos através da técnica de *DLS*.

Tabela 13 Valores do tamanho do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys em função da sua concentração. A diminuição desses valores indica a desagregação do PQ

[PQ]x10 ⁻⁹ (M)	Tamanho (nm)
571	(Área = 88,6) 206 ± 88 (Área = 11,4) 1494 ± 770
461	(Área = 96,0) 210 ± 95 (Área = 4,0) 1792 ± 882
368	(Área = 98,5) 74 ± 34 (Área = 1,5) 335 ± 166
301	166 ± 70
253	146 ± 74
195	25 ± 6

Da mesma forma, as sucessivas diluições da solução inicial de PQ apresentou diminuição da intensidade de luminescência no experimento de espalhamento de luz ressonante (Figura 53). Corroborando a hipótese de que o ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys encontra-se na forma agregada.

Figura 53. Diminuição da intensidade de espalhamento de luz ressonante (ELR) do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys quando a solução inicial foi submetida a sucessivas diluições. Hipótese de que o (CdSe/ZnS)558Cys encontra-se na forma agregada. A intensidade da ELR foi corrigida em acordo com a diluição da solução do PQ.

É sabido que a forma agregada de uma molécula tem o valor de rendimento quântico de fluorescência (QY) menor em comparação com o QY da forma monomérica. Assim, para finalmente comprovar nossa hipótese de que os PQ encontram-se na forma agregada e que a porfirina provoca desagregação, calculamos o rendimento quântico de luminescência (QY) do PQ através do método relativo, utilizando como fluoróforo padrão 1-palmitoyl,2-(12-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]dodecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (C12-NBD-PC), amplamente utilizado como sonda fluorescente em membranas modelos, com $QY = 0,34$ em etanol [119,120].

Figura 54. Determinação do rendimento quântico de luminescência do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys em função da concentração do PQ. O aumento do rendimento quântico de luminescência indica que o ponto quântico sofre desagregação conforme a solução é diluída.

Nota-se que, a diminuição da concentração do PQ aumenta seu QY, atingindo $QY \cong 0,75$ (Figura 54B), valor este muito próximo dos reportados na literatura [16,50,121].

Elaborada a hipótese de que os PQ encontram-se na forma agregada e que a adição da TPPS₄ estimula a desagregação do mesmo, resta-nos explicar como se dá o processo de desagregação. Mais uma vez, recorreremos as interações eletrostáticas – atrativas e repulsivas – entre o PQ e a PPh.

Neste caso, nossa explicação é que apenas um grupo $-SO_3^-$, dos quatro existentes, da porfirina interage atrativamente com o grupo $-NH_3^+$ da cisteína, restando três grupos $-SO_3^-$ livres, os quais interagiriam de forma repulsiva com o grupo $-COO^-$ da cisteína. Essa mesma molécula de TPPS₄ que interage atrativamente com o PQ, repeliria as demais moléculas livres de TPPS₄ presentes na solução (Figura 55).

Aqui cabe uma ressalva: a cisteína tem ponto isoelétrico $pI = 5,02$, o que justifica o valor do potencial zeta $\sim -36,0$ mV nos PQ passivados por este aminoácido. Porém, esse aminoácido possui três pontos de pK_a : $pK_1 = 1,92$, $pK_2 = 10,78$ e $pK_3 = 8,33$ sendo este último referente ao grupo tiol ($-C-SH$), o qual no processo de síntese do PQ sofre desprotonação ($-C-S^-$) para que haja passivação da superfície do PQ pelo aminoácido. Logo, em $pH = 7,3$, a cisteína é zwitteriônica – desprotonada no grupo carboxila dando origem a um carboxilato ($-R-COO^-$) e protonada na amina primária originando $-R-NH_3^+$.

Figura 55. Esquema de interação entre o ponto quântico (CdSe/Zns)558Cys e a porfirina TPPS₄. Uma dentre as quatro cargas negativas da porfirina interage de forma atrativa com o grupo $-R-NH_3^+$ da cisteína, enquanto que as outras três cargas da porfirina são repelidas pela carga do grupo $-R-COO^-$ da cisteína.

Os pontos quânticos que antes estariam agregados suprimiriam a luminescência do seu vizinho mais próximo, diminuindo o tempo longo atribuído aos defeitos na superfície do PQ, isto é, no contato entre os PQ. Nossos resultados de desagregação do PQ mostraram que o tempo longo médio ($\langle \tau_3 \rangle$) de luminescência do PQ aumenta conforma adicionamos TPPS₄ à solução (Figura 56B), assim como na diluição da solução contendo apenas PQ (Figura 56D). Ao mesmo tempo há diminuição do tempo curto médio ($\langle \tau_2 \rangle$), em ambos os casos (Figura 56A e C), atribuído à emissão do interior do ponto quântico.

Figura 56. Variação dos tempos médios τ_2 e τ_3 do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys na presença da TPPS₄ (A) e (B), e ao sofrer sucessivas diluições da solução original de PQ (C) e (D).

A prova de que a interação repulsiva entre a PPh e o PQ estimula sua desagregação foi corroborada no experimento em que substituímos a porfirina TPPS₄ pelo sal iodeto de sódio (NaI). Os experimentos para este caso foram os mesmos realizados para a TPPS₄. Procurou-se manter a mesma concentração do PQ ao longo do experimento, evitando-se que a adição de alíquotas da solução estoque de NaI provocasse diluição da solução com PQ. A variação da concentração de PQ foi de ~3,1% ao final do experimento.

Embora haja um equilíbrio de cargas entre o sal, e que a partir de sua solvatação Na⁺ e I⁻, e o PQ (–R–COO⁻ e –R–NH₃⁺), o ânion I⁻ (Z = 53) possui 54 elétrons. Logo, sua nuvem eletrônica consegue interagir repulsivamente com a nuvem eletrônica do grupo –R–COO⁻ do PQ e assim desagregar o PQ (Figura 57).

Figura 57. Aumento da luminescência do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys quando adicionadas alíquotas do sal iodeto de sódio NaI (A). Os espectros de luminescência do PQ foram obtidos excitando em $\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm (excitação do PQ apenas) e $\lambda_{\text{em}} = 558$ nm (emissão do PQ apenas) e (B) mudança nos perfis de decaimento de luminescência do ponto quântico ($\lambda_{\text{ex}} = 460$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 558$ nm) quando adicionado alíquotas de NaI. Variação dos tempos médios τ_2 (C) e τ_3 (D) do ponto quântico (CdSe/ZnS)558Cys na presença do sal NaI.

Apesar de o ânion I^- possuir um raio solvatado igual a $2,4 \text{ \AA}$ [122] e este ser próximo ao raio da TPPS₄ igual a $5,0 \text{ \AA}$ [123], a porfirina possui 482 elétrons ($\text{C}_{44}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_{12}\text{S}_4$, $Z = 478$; carga = -4). Essa superioridade no número de elétrons reflete em uma constante de interação semelhante à constante de Stern-Volmer [124] maior, $K_M(\text{TPPS}_4) = 2,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1} > K_M(\text{NaI}) = 3,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Figura 58A e B). Essa diferença na K_M é refletida na constante de interação bimolecular $k_{q-M}(\text{TPPS}_4) = 6,3 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} > k_{q-M}(\text{NaI}) = 8,3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Revelando que existe pelo menos um processo não dinâmico, já que $k_{q-M}^{\text{Steady-State}} > k_q^{\text{difusão}} (\approx 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ em solução aquosa})$, e que esse processo é mais acentuado na presença da TPPS₄ do que na presença do sal.

Figura 58. Constantes de interação (K_M) obtidas para a TPPS₄ (A) e para o sal NaI (B). A constante K_M é semelhante à constante de Stern-Volmer e foi obtida segundo [124].

Concluimos, portanto, que a mudança nos perfis de decaimento de luminescência, a diminuição do tamanho e o aumento do rendimento quântico de luminescência evidenciam que o PQ (CdSe/ZnS)558Cys encontra-se na forma agregada. A interação eletrostática repulsiva entre o PQ e a PPh carregada negativamente, TPPS₄, e ânion do sal NaI, estimula a desagregação do PQ de forma mais acentuada para TPPS₄ do que para NaI, devido a carga líquida da TPPS₄⁴⁻ ser mais negativa em relação ao I⁻, desagregando uma maior quantidade de pontos quânticos. Devido a esta desagregação, as interações PQ-TPPS₄ e PQ-NaI induzem o aumento na intensidade de luminescência além de mudanças nos perfis de decaimento da luminescência do PQ, provocando um aumento na contribuição dos tempos longos (superfície).

5.4 Interações PQ-FS na presença de sistemas nano-organizados - modelos de estruturas biológicas

5.4.1 Albumina do Soro Bovino (BSA)

Nesta etapa apresentaremos os resultados obtidos sobre a interação do ponto quântico (CdSe/ZnS)575Cys e a BSA.

O procedimento experimental consistiu em:

- 1) Concentração fixa de PQ e adição de BSA: fixou-se [PQ] ~ 500 nM (vol. 20 µL da solução estoque de PQ) em 2mL de tampão fosfato, e adicionou-se sucessivas alíquotas de BSA (solução estoque 2,0 mM)
 - a) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ (ponto quântico)
 - b) $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ (BSA); e
- 2) Concentração fixa de BSA e adição de PQ: fixou-se [BSA] = 150 µM em 2,0 mL de tampão fosfato, e adicionaram-se sucessivas alíquotas da solução estoque de PQ
 - a) $\lambda_{\text{ex}} = 450 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 575 \text{ nm}$ (ponto quântico)
 - b) $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$ (BSA).

Como mostrado a seguir, a adição de BSA não altera o espectro de absorção ótica do PQ quando este possui concentração fixa (Figura 59A) nem quando fixamos a concentração de BSA (Figura 59B), demonstrando que não há transferência de carga neste caso.

Figura 59. Espectros de absorção ótica para concentração fixa do ponto quântico com adição de BSA (A) e para concentração fixa de BSA com adição de ponto quântico (B). Não há alteração do espectro de absorção do PQ na presença da BSA.

Contudo, a adição de BSA ao sistema aumenta a intensidade de luminescência do PQ como mostrado na Figura 60A e B, e também seu tempo de vida (Figura 60C).

Figura 60. Aumento da luminescência do ponto quântico quando (CdSe/ZnS)575Cys adicionadas alíquotas de BSA (B). Os espectros de luminescência do PQ (A) foram obtidos excitando em $\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm (excitação do PQ apenas) e $\lambda_{\text{em}} = 575$ nm (emissão do PQ apenas). (C) Mudança nos perfis de decaimento de luminescência do ponto quântico ($\lambda_{\text{ex}} = 450$ nm e $\lambda_{\text{em}} = 575$ nm) quando adicionado alíquotas de BSA. O tempo τ_1 permaneceu constante enquanto que os tempos τ_2 e τ_3 aumentaram. Indicação de interação da BSA com a superfície do ponto quântico.

Nós explicamos essas mudanças como resultado da desagregação do PQ pela interação com a BSA, similarmente como mostrado na Seção 5.3.3 PQ funcionalizados com cisteína (Cys) e nas Refs. [41,125,126].

A BSA possui vários sítios de ligação [127]. Nesses sítios de ligação existem resíduos com carga líquida positiva, negativa ou neutra (Figura 61).

Figura 61. Modelo em fita da molécula de albumina do soro bovino (BSA). Os resíduos coloridos em vermelho possuem carga líquida positiva: lisina (Lys), histidina (His) e arginina (Arg); os resíduos coloridos em azul possuem carga líquida negativa: ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu); e resíduos com carga líquida nula estão coloridos em cinza. Os dois resíduos de triptofano (Trp) presentes na molécula de BSA estão indicados em verde como Trp-134 e Trp-213, respectivamente.

Nas albuminas, em pH 7, os aminoácidos com carga líquida negativa superam os de carga positiva/neutra, variando entre -12 e -17 [127], corroborando nosso resultado $\zeta = (-15,9 \pm 0,7)$ mV. Em nossa condição experimental (tampão fosfato, $T = 23$ °C; pH 7,3; $7,5 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹) os resíduos de aminoácidos da BSA que possuem carga líquida diferente de zero (Figura 62) são:

- Carga líquida positiva: lisina (Lys), histidina (His) e arginina (Arg)
- Carga líquida negativa: ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu)
- Os aminoácidos restante possuem carga neutra

Figura 62. Estruturas dos aminoácidos da BSA que possuem carga líquida diferente de zero. Os aminoácidos ácido aspártico (Asp) e ácido glutâmico (Glu) possuem carga líquida negativa e os aminoácidos lisina (Lys), arginina (Arg) e histidina (His) possuem carga líquida positiva.

Paralelamente, em pH 7,3 o grupo COOH e o grupo NH_2 da cisteína que funcionaliza a superfície do PQ desprotona e protona, respectivamente, COO^- e NH_3^+ . Podemos então, supor que a interação eletrostática decorre da interação eletrostática entre os resíduos com carga líquida negativa da BSA (resíduos Asp e Glu) e o grupo NH_3^+ do PQ. Por isso o potencial zeta do sistema varia de $(-42,2 \pm 1,3)$ mV – contendo apenas PQ – para $(-16,8 \pm 0,7)$ mV quando a razão $[\text{BSA}]/[\text{PQ}] = 1200$ (Tabela 14). A ligação de PQ com a BSA produz um obstáculo para o contato deste ponto quântico com outros, estimulando sua desagregação.

Tabela 14 Potencial zeta e raio hidrodinâmico para diferentes razões $[\text{BSA}]/[\text{PQ}]$

$[\text{BSA}]/[\text{PQ}]$	ζ (mV)	R_h (nm)
0	$-42,2 \pm 1,3$	$32,3 \pm 16,8$
2	$-33,2 \pm 0,7$	(Área = 98,5) $43,3 \pm 21,1$ (Área = 1,5) $125,7 \pm 73,6$
10	$-29,1 \pm 1,2$	$69,1 \pm 37,3$
20	$-28,4 \pm 0,5$	$76,0 \pm 38,0$
40	$-25,4 \pm 0,5$	$95,7 \pm 49,5$
100	$-23,4 \pm 0,5$	$126,9 \pm 75,8$
200	$-21,8 \pm 0,7$	$148,2 \pm 76,9$
300	$-19,1 \pm 0,5$	$180,2 \pm 86,7$
400	$-19,8 \pm 0,9$	$402,8 \pm 224,2$
500	$-17,7 \pm 0,6$	$371,0 \pm 177,9$
1200	$-16,8 \pm 0,7$	$515,3 \pm 289,7$

Outra informação que suporta nossa suposição de interação eletrostática é o fato de a distribuição líquida de cargas mostrar um gradiente ao longo da molécula de BSA. Por exemplo, o domínio I tem maior proporção de carga líquida negativa, já o domínio II tem uma proporção intermediária enquanto que o domínio III é quase neutro (Figura 64A). Em pH fisiológico o valor calculado da carga líquida para cada domínio é -11, -7, e +1, respectivamente para os domínios I, II, e III [127].

Da interação atrativa entre o grupo $-NH_3^+$ do PQ e os grupos $-COO^-$ dos aminoácidos Asp e Glu da BSA, resta uma proporção maior de resíduos com carga líquida positiva e neutra em relação aos sítios com carga líquida negativa, fazendo com que o potencial zeta do sistema fique menos negativo. Essa interação, seguramente, não se dá através da Folha β nem da α -hélice da molécula de BSA, como fica claro ao verificarmos a inexistência de mudança espectral na (Figura 63A e B), concordando com os dados da literatura [127]. Não há mudança significativa na intensidade nem deslocamento nos espectros de DC.

Figura 63. Espectros de dicroísmo circular da albumina do soro bovino: BSA apenas (preto), na presença do ponto quântico (vermelho), da porfirina TMPyP ou TPPS₄ (verde) e do complexo PPh&PQ (azul).

Outro resultado que corrobora nossa hipótese de interação atrativa é a supressão da fluorescência dos triptofanos da BSA. Na molécula de BSA os triptofanos correspondem aos resíduos Trp-134 e Trp-213, localizados nos subdomínios IB (região mais externa) e IIA (região mais interna), respectivamente (Figura 64A). O armazenamento de compostos pelas albuminas é realizado nos subdomínios IIA e IIIA, conhecidos como sítios I e II de Sudlow [43].

A)

B)

C)

Figura 64. (A) Estrutura em fita da molécula de BSA com os domínios I, II e III e seus respectivos subdomínios, retirado de [43]; e B) Modelo de preenchimento espacial da molécula de BSA com a região destacada onde se encontram os resíduos de Triptofano: Trp-134 (região mais externa) e Trp-213 (região mais interna); e C) modelo em fita da molécula de BSA.

A inexistência de mudança no perfil de decaimento de fluorescência dos triptofanos (Figura 65C) mostra que o mecanismo da supressão é estático. Sabendo disso, e considerando a interação eletrostática atrativa, podemos supor que a supressão ocorre no subdomínio IB da BSA, decorrente da interação entre o PQ e a região onde se localiza o Trp-134, já que o resíduo Trp-213 está inacessível ao PQ por localizar-se mais internamente (Figura 64B, destaque em zoom).

Figura 65. Supressão estática da fluorescência do triptofano ($\lambda_{ex} = 300$ nm e $\lambda_{em} = 350$ nm) pela adição de PQ. (A) Supressão da fluorescência do triptofano quando adicionado alíquotas de PQ observada no experimento de estado estacionário e (B) não há mudança no perfil de decaimento no tempo de vida de fluorescência do triptofano.

Para este caso a fração de fluoróforos acessíveis ao supressor $f_a = 1,9 \pm 0,1$ e a constante de supressão de SV para a dada fração é $K_a = (3,3 \pm 0,2) \times 10^6 M^{-1}$ (inserção, Figura 65B), por sua vez se a supressão fosse dinâmica a constante de supressão bimolecular seria: $k_q = K_a/\tau_m = (2,8 \pm 0,2) \times 10^{15} M^{-1} s^{-1}$, já que $k_q^{Steady-State} > k_q^{difusão}$ ($\approx 1 \times 10^{10} M^{-1} s^{-1}$ em solução aquosa). Do valor de f_a acima, podemos supor que uma molécula de BSA interage com mais de um PQ, formando agregados mistos como no caso do sistema (CdSe/ZnS)570PEG&TPPS₄, ou seja, agregados do tipo (PQ&BSA&PQ)_n.

O aumento do valor da anisotropia de fluorescência no monitoramento do PQ – dados em preto da Figura 66A – com a adição de BSA no sistema, indica uma menor rotação do momento de dipolo total do PQ de acordo com o aumento da razão [BSA]/[PQ]. Isto indica que o PQ "experimenta" um novo ambiente ocasionado pela interação com a BSA, considerando que esse PQ está envolto com duas ou mais BSA. Essa análise é corroborada pela Figura 66B, a qual mostra que o experimento inverso, concentração fixa de BSA com adição de PQ, leva ao mesmo valor de anisotropia considerando o erro experimental (dados em verde). Já os valores da anisotropia quando monitorada a BSA – dados em vermelho da Figura 66A e dados em azul da Figura 66B – tendem ao valor da anisotropia encontrado para uma solução contendo apenas BSA (Tabela 14). Isto é, essa tendência no valor de anisotropia pode ser atribuída às moléculas de BSA livres que não estão ligadas com PQ.

Figura 66. Anisotropia estática de fluorescência do sistema (A) concentração fixa de PQ ~ 500 nM e adição de alíquotas de BSA da solução estoque $[BSA] = 2,0$ mM, e (B) concentração fixa de BSA $= 150$ μ M e adição de alíquotas PQ. Em ambos os experimentos o volume inicial foi de 2,0 mL.

Portanto, o aumento do valor da anisotropia monitorando o PQ é devido exclusivamente a formação dos agregados mistos PQ&BSA&PQ, como suposto anteriormente. A Tabela 15 e Tabela 16 confirmam tal afirmação, já que não há mudança significativa dos valores de anisotropia quando estudados isoladamente, PQ e BSA. Em ambos os casos os valores de anisotropia permanecem constantes considerando o erro experimental.

Tabela 15 Anisotropia estática de fluorescência do PQ em função de sua concentração. O valor de $A_{\text{estático}}$ não varia com a concentração do PQ

vol. ad. PQ (μ L)	$A_{\text{estático}}$
5,0	$0,07 \pm 0,02$
10,0	$0,06 \pm 0,01$
15,0	$0,05 \pm 0,01$
20,0	$0,06 \pm 0,01$

Tabela 16 Anisotropia estática de fluorescência da BSA em função de sua concentração. O valor de $A_{\text{estático}}$ fica constante para $[BSA] \geq 5,00$ μ M

$[BSA]$ (μ M)	$A_{\text{estático}}$
1,00	$0,153 \pm 0,001$
5,00	$0,172 \pm 0,001$
10,0	$0,169 \pm 0,001$
20,0	$0,170 \pm 0,001$
50,0	$0,170 \pm 0,001$
100	$0,173 \pm 0,001$
150	$0,175 \pm 0,001$

Analisando a Figura 66A, percebe-se que o valor da anisotropia monitorando o PQ cresce e permanece constante em $[BSA]/[PQ] \geq 40$, com $A_{\text{estático}} \cong 0,225$. A formação desse agregado misto é dinâmica e obedece a reação de formação

Para a razão $[BSA]/[PQ] < 40$, a reação é deslocada para a esquerda, favorecendo a presença de moléculas livres de PQ. A partir da razão $[BSA]/[PQ] \geq 40$ a reação acima é deslocada para a direita, favorecendo a formação de agregados mistos. Assim, para $[BSA]/[PQ] \geq 40$ há o surgimento de um *bulk* de agregado misto PQ&BSA&PQ. Após essa razão, as moléculas livres de BSA podem formar uma coroa proteica entorno desse *bulk*, como sugerido pela literatura [125,126]. A formação dessa coroa proteica também obedece a um processo dinâmico.

. Na Figura 67A temos o aumento da intensidade de espalhamento de luz ressonante do sistema BSA+PQ quando a concentração de PQ é fixa e adiciona-se BSA à solução, indicando novamente a agregação do sistema BSA+PQ. Já a Figura 67B relaciona os valores de anisotropia estática do sistema com valores do raio hidrodinâmico e de potencial zeta (Tabela 14). Os valores em azul indicam a variação do raio hidrodinâmico (em nm) do sistema e os valores em vermelho indicam a variação do potencial zeta (em mV) do sistema.

Figura 67. Indicação de agregação entre a BSA e o PQ em (A) aumento da intensidade de espalhamento ressonante de luz e (B) anisotropia estática de fluorescência do sistema com excitação do PQ ($\lambda_{ex} = 450$ nm) e excitação do triptofano ($\lambda_{ex} = 300$ nm). Os dados em preto e vermelho correspondem a concentração fixa de PQ com adição de BSA e os dados em verde e azul a concentração fixa de BSA com adição de PQ. Os valores em azul correspondem aos raios hidrodinâmicos (em nm) obtidos através da técnica de *DLS* e os valores em vermelho aos potenciais zeta (em mV).

Em suma, o aumento de luminescência nós atribuímos à desagregação do ponto quântico (CdSe/ZnS)Cys após este ligar-se à molécula de albumina. Por sua vez, essa desagregação gera agregados mistos do tipo rede na forma $(PQ\&BSA\&PQ)_n$, como propusemos para interação entre (CdSe/ZnS)570PEG e porfirina aniônica TPPS₄ [128]. A formação desses agregados não altera a estrutura terciária da BSA, como demonstrado nos espectros de DC, e, portanto, promove a bioviabilidade dos PQ para uso em ensaios in vitro e aplicações in vivo. Por outro lado, o tamanho e o número de agregados $(PQ\&BSA\&PQ)_n$ depende da razão $[BSA]/[PQ]$. Pois, para $[BSA]/[PQ] > 300$ há a formação de agregados muito grandes, os quais podem causar entupimento no sistema circulatório, quando dentro da corrente sanguínea.

5.4.2 Monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett

Nesta etapa apresentaremos os resultados sobre a interação do ponto quântico (CdSe/ZnS)570PEG (Tabela 3) na presença das porfirinas TMPyP (carregada positivamente) ou TPPS₄ (carregada negativamente) obtidos em experimentos na cuba de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett (LB) utilizando os fosfolipídios 1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato (DMPA) de caráter aniônico ou 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) de caráter zwitteriônico.

5.4.2.1 Monocamadas de Langmuir

Os experimentos na cuba de Langmuir envolvendo a compressão das PPh (TMPyP ou TPPS₄, ver Tabela 4), PQ (CdSe/ZnS-570PEG, ver Tabela 3) e suas misturas na subfase, na ausência de fosfolipídios, não apresentaram alteração na pressão superficial (π), demonstrando que não há qualquer atividade de superfície.

As isotermas π -A obtidos para o DMPA e o DPPC em água pura apresentou perfis característicos para estes lipídios (Figura 68A-D) [129,130]. As isotermas contendo apenas fosfolipídios revelaram um ligeiro aumento inicial da pressão superficial π , característica da formação da fase líquido-expandida (LE). Uma região com π constante se segue, a qual é associada com a transição de LE para a fase líquido-condensada (LC). Em seguida, um aumento acentuado em π , caracteriza formação da fase LC.

Figura 68. Isotermas π -A para as monocamadas de Langmuir de (A, B) DMPA e (C, D) DPPC em diferentes sub-fases: (preto)-água pura; (vermelho)-PQ; (azul)-PPh; (verde)-PPh&PQ. As respectivas porfirinas estão indicadas na legenda da figura.

A expansão da área ocupada pela molécula de DMPA é mais pronunciada na presença de TMPyP&PQ, em vez de TMPyP ou PQ separadamente, indicando que a formação de agregados mistos PQ&TMPyP&PQ reforça a interação com o DMPA (Figura 68A). Para pressões superficiais maiores que 30 mN.m^{-1} , a área mínima por molécula de DMPA diminui na presença de ambos, TMPyP e TMPyP&PQ. Isto indica que a porfirina TMPyP, carregada positivamente, continua interagindo com cabeça polar do DMPA. A molécula de TMPyP encontra-se abaixo da monocamada e perto da cabeça polar do fosfolípido, reorganizando as moléculas de lipídio na interface, atraída pela carga negativa do DMPA.

A presença na subfase da TPPS₄, carregada negativamente, expande as isotermas do DMPA. A TPPS₄ e a cabeça polar do DMPA – com carga negativa também – repelem-se mutuamente, aumentando assim a área ocupada por cada molécula de lipídio para valores de π baixos (Figura 68B). Por outro lado, a isoterma de DMPA na subfase contendo TPPS₄&PQ é muito se-

melhante à obtida para a isoterma de DMPA em água pura. A presença do agregado misto PQ&TPPS₄&PQ não afeta a isoterma de DMPA para valores de π baixos. No entanto, diminui a área mínima por molécula de lipídio para π com valor alto, devido a formação de um complexo de transferência de carga com a cabeça polar do fosfolipídio. Esse resultado foi confirmado pelo espectro de absorção UV-vis (ver discussão abaixo).

A presença da PPh e do PQ na subfase afeta o empacotamento do DPPC na interface ar/líquido (Figura 68C-D), mas este efeito é, geralmente, menos evidente do que o efeito observado para o DMPA. A TMPyP aumenta a pressão na transição de fase LC-LE do DPPC. Na presença da TMPyP, carregada positivamente, a isoterma de DPPC expande. Em pressões superficiais baixas, as moléculas de TMPyP penetram na interface e interagem com o fosfolipídio, formando um complexo com atividade de superfície maior do que a própria DPPC, fazendo com que ocorra um aumentando nos valores de π característicos para a subfase em água pura. Em pressões de superfície acima de 30 mN.m⁻¹, as moléculas de TMPyP parecem se afastar da interface – a área mínima por molécula de DPPC aproxima-se do valor de área da subfase em água pura. Quando o agregado misto PQ&TMPyP&PQ está presente na subfase, a pressão superficial característica da fase de transição LE-LC aumenta. No entanto, para valores elevados de pressão superficial, isto é $\pi = 30$ mN.m⁻¹, a área mínima por molécula diminui devido à presença do PQ, o qual altera a interação entre o DPPC e a TMPyP.

Embora a presença da TPPS₄ exerce pouca influência sobre a transição de fase LE-LC, na presença desta PPh a área mínima por molécula de DPPC diminui de 60 para 55 Å²/molécula (Figura 68D). A presença, apenas, do PQ na subfase também reduz a área mínima por molécula de lipídio, mas o efeito do agregado misto PQ&TPPS₄&PQ no empacotamento do DPPC é praticamente insignificante, mostrando que a agregação PQ&TPPS₄&PQ não impede o ancoramento da TPPS₄ ao DPPC.

É possível avaliar a área ocupada por molécula de PPh, de nanocristal PQ, e do complexo PPh&PQ em diferentes pressões superficiais, a partir das isotermas π -A das monocamadas de dois componentes. Os resultados dessa análise estão apresentados na Figura 69.

Figura 69. Áreas médias ocupadas por PPh, PPh&PQ ou PQ em função da pressão superficial para as monocamadas de Langmuir (A) DMPA e (B) DPPC.

A diferença entre as áreas das isotermas de fosfolípidios obtidas na subfase contendo água pura e as áreas das isotermas de fosfolípidios obtidas na presença de outras moléculas/nanocristais corresponde a uma superfície ocupada por estas inserções, e indica a diferença na organização estrutural e/ou quantidade destas inserções ligadas ao lipídio. A Figura 69 mostra o gráfico dessas áreas em função da pressão superficial. A área molecular da TMPyP foi descrita como 320 Å^2 [123]. A diferença de 30 Å^2 nas áreas obtidas a partir da isoterma expandida do DMPA (Figura 69A) sugeriria a inserção do complexo TMPyP&PQ; entretanto, apenas uma pequena fração das moléculas de TMPyP pode se inserir no interior da matriz lipídica, enquanto a maior fração permanece adsorvida nas cabeças do fosfolípido como monômeros ou dímeros de [123]. O aumento do empacotamento do fosfolípido expulsa parte do complexo TMPyP&PQ da interface até $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$. Nesta pressão, o complexo ainda parece estar na interface ocupando uma área de perto de 2 Å^2 .

Analisando apenas as moléculas de TMPyP, a diferença inicial de área é 10 Å^2 , a qual mostra que a inserção da PPh na monocamada de DMPA é menor na ausência de PQ. Além disso, para π próxima a 20 mN.m^{-1} , os valores das áreas ficam negativos (Figura 69A) indicando que a PPh se liga ao DMPA e encontra-se embaixo da monocamada.

5.4.2.2 Características óticas dos filmes LB

A Figura 70 mostra os espectros de absorção UV-Vis para os filmes LB-DMPA e DPPC contendo PQ, PPh e agregados mistos PQ&PPh&PQ.

Figura 70. Espectros de absorção UV-Vis dos filmes LB para: (A e B) DMPA e (C e D) DPPC. Os filmes LB foram transferidos a partir da subfase contendo PQ (preto), PPh (vermelho) e PPh&PQ (azul). Os filmes LB continham 5 camadas de deposição através da técnica de deep-coating em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$ segundo o procedimento experimental em [103].

A banda de Soret da PPh (445 nm) no filme LB-DMPA contendo o agregado misto PQ&TMPyP&PQ é mais intensa quando comparada a banda de Soret DMPA:TMPyP (Figura 70A). A absorptividade molar da PPh não sofre alteração na presença do PQ, de modo que os resultados com absorbância maior refletem a maior quantidade de moléculas de PPh presente no filme LB. A porfirina TPPS₄ e seu respectivo agregado misto, PQ&TPPS₄&PQ, exibem comportamento oposto: mais moléculas de TPPS₄ são inseridas na monocamada de DMPA na ausência do PQ (Figura 69A). No entanto, o agregado misto PQ&TPPS₄&PQ é transferido com maior eficácia para o filme LB do que a TPPS₄ sozinha. Isto ocorre porque o agregado misto PQ&TPPS₄&PQ se liga mais fortemente as moléculas de DMPA, pela presença da banda Soret no espectro de absorção UV-Vis do filme LB (Figura 70B). Na realidade, não é possível visualizar

as bandas da TPPS₄ para o filme LB na ausência de PQ. Quando a TPPS₄ na presença de PQ (superfície recoberta com PEG) interage com o DMPA, ocorre ligação de hidrogênio entre os grupos –OH do PEG e do DMPA, o que favorece a transferência do agregado misto PQ&TPPS₄&PQ para o filme LB. A inserção da PPh e do agregado misto PQ&PPh&PQ é baixa para as monocamadas formadas de DPPC, em comparação com as monocamadas de DMPA e a presença do PQ não melhora a inserção da PPh (Figura 70C-D).

A própria TPPS₄ não se insere nas monocamadas de DPPC, mas situa-se logo abaixo da cabeça polar do fosfolípido. Isto reduz a área molecular mínima, tal como demonstrado pela diferença de área negativa para todos os valores estudados de π (Figura 69B). Embora a interação ocorra, não é forte o suficiente para permitir a transferência da TPPS₄ nos filmes LB-DPPC. O agregado misto PQ&TPPS₄&PQ não é transferido para o filme LB-DPPC, tal como confirmado pela ausência da banda Soret da TPPS₄ no espectro de absorção UV-Vis (Figura 70D). É importante frisar que não é possível ligação de hidrogênio entre PQ e o DPPC porque os prótons do grupo colina estão ligados a átomos de C, o qual possui baixa eletronegatividade. Além disso, a carga positiva do grupo colina está estericamente impedida por grupos metila, o que dificulta a aproximação da TPPS₄, carregada negativamente.

Por outro lado, há transferência da TMPyP e do PQ&TMPyP&PQ para o filme LB-DPPC. A carga negativa do grupo fosfatidil está mais disponível para ligação, o que favorece a interação com a TMPyP, carregada positivamente. A presença do PQ diminui a quantidade transferida de TMPyP, como mostrado pelo baixo valor de absorbância da banda Soret para este caso. A análise desses espectros corroborara os resultados referentes as interações fosfolípidios:PPh e fosfolípidios:PPh&PQ.

5.4.2.3 Potencial superficial ζ dos filmes LB

O estudo mais detalhado inclui a análise do potencial superficial ζ dos filmes de LB. A Tabela 17, abaixo, mostra os valores obtidos do ζ de superfície dos filmes LB-DPPC e DMPA contendo PQ, PPh e o agregado misto PQ&PPh&PQ.

Tabela 17 Potencial zeta de superfície (ζ) dos filmes LB contendo fosfolipídios na presença de PQ, PPh e agregado misto PQ&PPh&PQ

Filme LB	ζ (mV)	ζ (mV)
	DPPC	DMPA
PQ	+17 $\pm$ 1	-21 $\pm$ 2
TMPyP	+110 $\pm$ 25	+2 $\pm$ 1
TMPyP&PQ	+15 $\pm$ 5	-22 $\pm$ 1
TPPS ₄	+8,6 $\pm$ 0,5	-4,6 $\pm$ 2,6
TPPS ₄ &PQ	+19 $\pm$ 4	-12 $\pm$ 2

Existem algumas limitações experimentais para a transferência de DMPA e de DPPC puro para os suportes de silício, de modo que os valores de referência usados aqui são os obtidos para o filme LB fosfolipídio:PQ na ausência de PPh, porque o valor de ζ do PQ está próximo a zero. O filme LB-DPPC contendo a TMPyP, carregada positivamente, tem ζ igual a +110 mV. Os valores de ζ obtidos para os filmes contendo TMPyP&PQ (ζ = +15 mV) e TPPS₄&PQ (ζ = +19 mV) é menos positivo e semelhante ao valor de ζ obtido para o filme DPPC:PQ (ζ = +17 mV). Assim, as propriedades de superfície do PQ ditam as características de carga líquida do filme.

Os espectros de absorção UV-vis não detectaram a TPPS₄, carregada negativamente, no filme LB-DPPC, mas o ζ igual a +8,6 mV obtido para este filme indica que TPPS₄ pode estar presente em quantidade suficiente para diminuir a quantidade de carga na monocamada de DPPC. Os valores de ζ para DMPA:TMPyP e DMPA:TMPyP&PQ seguem a mesma tendência: a presença da TMPyP produz um filme LB com ζ positivo, enquanto que na presença de PQ&TMPyP&PQ o valor de ζ é semelhante ao encontrado para o sistema contendo apenas DMPA:PQ. A presença de ambos TPPS₄ e TPPS₄&PQ no filme LB reduz o ζ . Os resultados de absorção UV-Vis indicam que a TPPS₄ não é transferida com eficácia para o filme LB-DMPA, porém o agregado misto PQ&TPPS₄&PQ o é (Figura 70B). Novamente, o valor obtido na presença do agregado misto está mais perto do valor encontrado na presença de PQ apenas, confirmando que a superfície do PQ é importante para melhorar a interação fosfolipídio:PPh.

A interação do PQ com DMPA ou DPPC não afeta o perfil do espectro de absorção do PQ, ou seja, a absorção larga na região de $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$ permanece inalterada [13].

Em soluções aquosas, as bandas de Soret da TMPyP e da forma não protonada da TPPS₄ possuem máximos em λ = 421 nm e 413 nm, respectivamente (Figura 24), de acordo com os valores descritos na literatura [101,105,106]. O espectro de absorção dos filmes LB formados

na presença de PPh e de PPh&PQ mostram as bandas de absorção características da PPh. No entanto, as posições e intensidades dependem da natureza do fosfolipídio e da PPh.

No caso DMPA:TMPyP na presença e ausência de PQ, a banda Soret é deslocada para o vermelho: de 421 nm para 444 nm (Figura 70A), e a absorção é mais intensa na presença do PQ. Esta mudança é, muito provavelmente, devido à transferência de carga a partir do lipídio carregado negativamente para a TMPyP carregada positivamente [106]. A maior intensidade da banda de absorção na presença do PQ indica que o agregado misto PQ&TMPyP&PQ é incorporado com maior efetividade na estrutura do filme LB em comparação com a TMPyP isolada. Isso acontece provavelmente porque o PQ revestido com polietileno glicol e os grupos –OH da cabeça polar do DMPA formam ligações de hidrogênio (Figura 20A).

Os filmes LB-DMPA formados na presença de TPPS₄ não apresentam absorção da PPh, o que demonstra a fraca incorporação da TPPS₄ na estrutura do filme devido à repulsão eletrostática entre o DMPA e a TPPS₄. Curiosamente, para o espectro de absorção da TPPS₄ (Figura 70B), uma banda de absorção intensa aparece na presença do PQ. Isto significa que o agregado misto PQ&TPPS₄&PQ é incorporado com eficácia na estrutura do filme LB-DMPA. O pico de absorção da banda de Soret da TPPS₄ para esse filme, desloca-se para o vermelho, de 413 nm para 439 nm (Figura 70B). Neste caso, as ligações de hidrogênio entre o PQ (revestido com PEG) e grupos –OH do DMPA permitem a transferência de carga do anel porfirínico da PPh para o grupo fosfatidil do DMPA.

O espectro de absorção do filme LB-DPPC na presença da TMPyP apresenta a banda de Soret com intensa absorção em 428 nm (Figura 70C). Esse pequeno deslocamento para o vermelho pode ser ignorado para esse caso, em comparação o valor encontrado em solução aquosa. Na presença de PQ, esse pico é deslocado para o vermelho, de 421 nm para 442 nm.

O menor deslocamento observado no espectro de absorção do filme DPPC:TMPyP sugere que a transferência de carga entre o fosfolipídio e a PPh não é eficaz. Isto, provavelmente, é devido às forças de repulsão entre o grupo colina do fosfolipídio e a TMPyP, dificultando a aproximação entre eles. Na presença do PQ essa distância diminui, resultando em uma transferência de carga mais eficaz. De fato, o potencial ζ do filme DPPC:TMPyP é +110 mV, mas na presença do PQ diminui para +15 mV (Tabela 17). Em outras palavras, o PQ diminui a carga líquida positiva da TMPyP, reduzindo sua repulsão pelo grupo colina do DPPC.

Os espectros de absorção dos filmes LB-DPPC permanecem praticamente inalterados na presença da TPPS₄ e na ausência do PQ (Figura 70D). Assim, a incorporação da TPPS₄ e do agregado misto PQ&TPPS₄&PQ no filme LB-DPPC é fraca.

5.4.2.4 Imagens de FLIM dos filmes LB

Como já demonstrado nos resultados para π -A, potencial zeta e espectros de absorção UV-Vis, a presença do PQ afeta a maneira como a PPh e o agregado misto interage com as monocamadas lipídicas. As imagens de FLIM podem dar informações morfológicas e qualitativas dessa interação.

As imagens de FLIM dos filmes LB apresentam estruturas com diferentes morfologias para cada sistema DMPA/DPPC:PQ, DMPA/DPPC:PPh e DMPA/DPPC:PPh&PQ. Esses resultados indicam como a PPh ou o agregado misto PQ&PPh&PQ modifica a organização da monocamada de fosfolípido, por exemplo, a organização e o padrão esférico observado no filme DMPA:TMPyP&PQ (Figura 71E) causada pela presença do agregado misto PQ&TMPyP&PQ.

Assim como nos ajustes dos perfis de decaimento de fluorescência, na composição das imagens de FLIM utilizamos uma equação biexponencial para fazer os ajustes.

Uma imagem de FLIM pode ser analisada por diferentes parâmetros tais como tempo de vida médio, modo RGB, intensidade de fluorescência/luminescência, etc. A análise por intensidade de fluorescência (I_{fl}) é uma maneira qualitativa para avaliar qual sistema é melhor transferido para o filme LB e inferir sobre a organização da monocamada fosfolípida. A Tabela 18 mostra a intensidade de fluorescência obtida para cada um dos filmes LB contendo PPh e os agregados mistos PQ&PPh&PQ.

Tabela 18 Intensidade de fluorescência das imagens FLIM para os filmes LB-DMPA e DPPC transferidos na presença de PPh e PPh&PQ

Sistema	I_{fl} (Contagens)
<i>DMPA:PQ</i>	418
<i>DPPC:PQ</i>	25
<i>DMPA:TMPyP</i>	49
<i>DMPA:TMPyP&PQ</i>	519
<i>DMPA:TPPS₄</i>	190
<i>DMPA:TPPS₄&PQ</i>	570
<i>DPPC:TMPyP</i>	32
<i>DPPC:TMPyP&PQ</i>	35
<i>DPPC:TPPS₄</i>	75
<i>DPPC:TPPS₄&PQ</i>	245

Como já demonstrado nos resultados para π -A, potencial zeta e espectros de absorção UV-Vis, a presença do PQ por si só afeta o empacotamento do DMPA, aumentando a área molecular mínima ocupada pela molécula de fosfolípido em $\pi = 30 \text{ mN.m}^{-1}$. Esta diferença é igual a $1,45 \text{ Å}^2/\text{molécula}$ e corresponde a uma distância mínima $r_{\min}$ de $0,34 \text{ Å}$ entre as moléculas, considerando um modelo esférico. Este resultado é apoiado por imagens de FLIM quando intensidade e morfologia da imagem são analisadas simultaneamente. A imagem da Figura 71A mostra estruturas homogêneas e intensidade de fluorescência alta, $I_{fl} = 418$ contagens, para DMPA:PQ, mas nenhuma estrutura pode ser observada para o sistema DPPC:PQ, $I_{fl} = 25$ contagens (Figura 71B). O sistema DMPA:PQ tem I_{fl} maior do que DPPC:PQ, provavelmente devido a ligação de hidrogênio formada entre a funcionalização do PQ, polietileno glicol (PEG), e a porção $-\text{OH}$ do grupo fosfato do DMPA, que ajuda na transferência do PQ para os filmes LB formado com esse fosfolípido.

Para o sistema DMPA:TMPyP uma quantidade maior de pontos brilhantes são observados na imagem de FLIM (Figura 71C). Para PQ&TMPyP&PQ o filme LB-DMPA, correspondente, apresenta domínios esféricos maiores associados ao agregado misto PQ&PPh&PQ, com $I_{fl} = 519$ contagens (Figura 71E). Esse resultado corrobora os resultados espectroscópicos UV-Vis, apresentados acima, uma vez que observou-se uma maior quantidade de PPh transferida na presença do PQ. Isso resulta em maior intensidade de fluorescência nas imagens de FLIM. A imagem de FLIM para o filme LB DMPA:TPPS₄&PQ mostra alguns domínios brilhantes sobre a superfície, como esperado para a transferência deste agregado misto ao substrato (Figura 71I). A

intensidade de fluorescência ($I_{fl} = 570$ contagens) é maior, devido à presença de grande quantidade de PQ transferida pela presença da PPh. Por outro lado, a imagem obtida o sistema DMPA:TPPS₄, sem PQ, mostra apenas alguns pontos brilhantes com intensidade de fluorescência menor, $I_{fl} = 190$ contagens (Figura 71G).

Apesar de ter sido demonstrada a importância da formação de ligação de hidrogênio nos sistemas DMPA:PQ/PPh/PPh&PQ, nos sistemas formados pelo fosfolipídio DPPC não existe a possibilidade de formar ligação de hidrogênio, predominando a interação eletrostática. No sistema DPPC:TMPyP, a imagem de FLIM apresenta intensidade de fluorescência fraca e homogênea ($I_{fl} = 32$ Counts) como observado para o filme LB-DMPA:TMPyP. Tal resultado indica que o grupo de fosfatidil do DPPC está disponível para interagir com a PPh carregada positivamente, permitindo sua transferência para o filme LB. Isso corrobora os resultados espectroscópicos UV-Vis e os de monocamadas de Langmuir, mostrando que as moléculas de TMPyP são transferidas para o suporte na presença do DPPC.

A imagem de FLIM para DPPC:TMPyP&PQ (Figura 71F) também exibe domínios grandes relacionados com a transferência do agregado misto, porém com intensidade de fluorescência fraca ($I_{fl} = 35$ contagens). Para o filme LB-DPPC:TPPS₄ (Figura 71H) existem alguns domínios com intensidade baixa ($I_{fl} = 75$ contagens) resultantes do ancoramento da TPPS₄ com o grupo colina do DPPC. Por outro lado, a imagem de FLIM do filme LB-DPPC:TPPS₄&PQ mostra domínios brilhantes com forma esférica, atribuída à formação de agregado misto PQ&TPPS₄&PQ, e uma maior intensidade de fluorescência, $I_{fl} = 245$ contagens. Esta I_{fl} superior é devido à proximidade do PQ com a superfície, ocasionada pelas forças atrativas entre a carga negativa da TPPS₄ e a carga positiva do grupo colina. Isto é demonstrado pela redução na área molecular mínima do DPPC na presença desse agregado misto (Figura 69B).

A) DMPA:PQ

B) DPPC:PQ

C) DMPA:TMPyP

D) DPPC:TMPyP

E) DMPA:TMPyP&PQ

F) DPPC:TMPyP&PQ

G) DMPA:TPPS₄ H) DPPC:TPPS₄ I) DMPA:TPPS₄&PQ J) DPPC:TPPS₄&PQ

Figura 71. Imagens FLIM em modo intensidade para os filmes LB.

Dos resultados provenientes dos estudos com monocamadas de Langmuir e filmes Langmuir-Blodgett, podemos concluir que a presença de porfirinas na subfase afeta a formação das monocamadas lipídicas de Langmuir. Isto é uma consequência direta da interação eletrostática entre as moléculas de porfirina e a cabeça polar do lipídio e, em alguns casos, gera transferência de carga entre lipídios:PPh/PPh&PQ/PQ. Os pontos quânticos podem formar agregados mistos com as porfirinas (PQ&PPh&PQ) e aumentar sua interação com os lipídios, seja pela interação parcial, através da carga da porfirina, ou a formação de ligações de hidrogênio entre o agregado misto PQ&PPh&PQ e os fosfolipídios. A presença dos PQs melhora o ancoramento da TPPS₄ com os modelos de membranas celulares estudados, podendo melhorar a eficiência do tratamento em Terapia Fotodinâmica que faz uso do sistema PPh&PQ.

Capítulo 6 – Conclusões

Os pontos quânticos interagem efetivamente com as porfirinas, cuja interação se manifesta pelas mudanças da intensidade e do perfil dos espectros, das curvas de decaimento da luminescência dos PQs e da porfirina, do tamanho das partículas na solução e do potencial zeta, dentre outros parâmetros espectroscópicos e físico-químicos.

Dependendo da estrutura tanto da porfirina como do ponto quântico dentro das soluções aquosas homogêneas, a formação de agregados mistos (PQ&PPh&PQ) é favorecida, nos quais uma molécula de porfirina pode interagir com vários PQ, como foi observado para pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh e (CdTe)543MPA+TMPyP, ou de agregados simples (1:1) do tipo PQ&PPh para o par (CdTe)543MPA+TPPS₄.

Os mecanismos da desativação dos estados excitados entre os pares PQ + porfirina podem ser tanto de curto como de longo alcance. O mecanismo de longo alcance é, provavelmente, transferência de energia por ressonância (Förster) ou semelhante (não Förster).

Entre os mecanismos de curto alcance que necessitam de contato direto entre a molécula de porfirina e o PQ, pode ocorrer transferência de energia pela troca de elétrons entre a porfirina e o PQ (Dexter), transferência de carga entre eles ou processos não radiativos de dissipação de energia. A predominância de um ou de outro tipo de mecanismo é modulada pela estrutura do PQ e da porfirina, em particular, pela estrutura dos grupos funcionais da camada externa do PQ.

Entretanto, a interação eletrostática repulsiva entre o PQ e outro composto pode estimular a desagregação dos PQs induzindo o aumento na intensidade da sua luminescência e do seu tempo de vida. Observou-se um aumento na contribuição dos tempos longos do decaimento da luminescência associados à superfície do PQ. Esses efeitos foram observados para o par (CdSe/ZnS)558Cys e a PPh carregada negativamente, TPPS₄, como também na presença do sal NaI. A desagregação é mais acentuada para a TPPS₄ do que para NaI, devido a carga líquida da TPPS₄⁴⁻ ser mais negativa em relação ao I⁻, desagregando uma maior quantidade de pontos quânticos. Em geral, o sal blindas as cargas e diminui a interação eletrostática (atrativa ou repulsiva), ou seja, se estava atraindo (agregação) tende a desagregar. No entanto, a associação de

um composto a um PQ pode aumentar a interação repulsiva entre eles (ou diminuir a interação atrativa), estimulando a desagregação do PQ.

A interação do PQ (CdSe/ZnS)575Cys com a albumina do soro bovino (BSA) como modelo de estrutura biológica apresentou aumento de luminescência do PQ, sendo este aumento atribuído à desagregação do PQ após ligar-se à molécula de albumina. Por sua vez, essa desagregação gera agregados mistos (do tipo (PQ&BSA&PQ)), como proposto para os pares (CdSe/ZnS)PEG+PPh e (CdTe)543MPA+TMPyP. A formação desses agregados não altera a estrutura terciária da BSA e, portanto, promove a bioviabilidade dos PQ para uso em ensaios *in vitro* e aplicações *in vivo*.

A presença das PPhs na subfase afetou a formação das monocamadas lipídicas de Langmuir, como consequência direta da interação eletrostática entre as moléculas de PPh e a cabeça polar dos lipídios estudados. Em alguns casos, gerou transferência de carga entre lipídios: PPh/PPh&PQ/PQ. Os agregados mistos PQ&PPh&PQ aumentaram a interação com os lipídios, seja pela interação parcial, através da carga da PPh, ou a formação de ligações de hidrogênio entre os agregados mistos e os fosfolipídios. A presença do PQ melhorou o ancoramento das PPhs nos modelos de membranas celulares estudados, podendo aumentar a eficiência do tratamento em Terapia Fotodinâmica que faz uso do sistema PQ&PPh.

Futuramente, pretendemos estudar os sistemas PQ&PPh na presença de vesículas unilamelares gigantes (GUVs, da sigla em inglês) utilizando outros fosfolipídios, ou composição desses, que compõem a membrana celular de células de mamíferos ou bactérias.

Referências

- [1] S. Andersson-Engels, C. af Klinteberg, K. Svanberg, S. Svanberg, In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics, *Phys. Med. Biol.* 42 (1997) 815–824. doi:10.1088/0031-9155/42/5/006.
- [2] K. Berg, P.K. Selbo, A. Weyergang, A. Dietze, L. Prasmickaite, A. Bonsted, et al., Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications., *J. Microsc.* 218 (2005) 133–47. doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01471.x.
- [3] R. Allison, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 27–42. doi:10.1016/S1572-1000(04)00007-9.
- [4] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy., *Phys. Med. Biol.* 53 (2008) R61–109. doi:10.1088/0031-9155/53/9/R01.
- [5] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects., *Lasers Med. Sci.* 24 (2009) 259–68. doi:10.1007/s10103-008-0539-1.
- [6] M. Zanolli, Phototherapy treatment of psoriasis today*, *J. Am. Acad. Dermatol.* 49 (2003) 78–86. doi:10.1016/S0190-9622(03)01139-3.
- [7] E.M. van der Snoek, D.J. Robinson, J.J. van Hellemond, H.A.M. Neumann, A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis., *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 22 (2008) 918–22. doi:10.1111/j.1468-3083.2008.02805.x.
- [8] K. Konopka, T. Goslinski, Photodynamic therapy in dentistry., *J. Dent. Res.* 86 (2007) 694–707. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17652195>.
- [9] B. Schäfer, H. Gemeinhardt, V. Uhl, K.O. Greulich, Single Molecule DNA Restriction Analysis in the Light Microscope, *Single Mol.* 1 (2000) 33–40. doi:10.1002/(SICI)1438-5171(200004)1:1<33::AID-SIMO33>3.0.CO;2-Y.
- [10] X. Meng, W. Cai, D.C. Schwartz, Inhibition of restriction endonuclease activity by DNA binding fluorochromes., *J. Biomol. Struct. Dyn.* 13 (1996) 945–51. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8832377> (accessed August 26, 2011).
- [11] J.M. Ribó, J. Crusats, J.-A. Farrera, M.L. Valero, Aggregation in water solutions of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1994) 681. doi:10.1039/c39940000681.
- [12] D.L. Akins, H.-R. Zhu, C. Guo, Absorption and Raman Scattering by Aggregated meso-Tetrakis(p-sulfonatophenyl)porphine, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 3612–3618. doi:10.1021/j100065a012.
- [13] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes., *Chem. Rev.* 105 (2005) 1025–102. doi:10.1021/cr030063a.
- [14] G.P.C. Drummen, Quantum dots-from synthesis to applications in biomedicine and life sciences., *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 154–63. doi:10.3390/ijms11010154.
- [15] M.F. Frasco, N. Chaniotakis, Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 229–240. doi:10.1007/s00216-009-3033-0.
- [16] X. Michalet, F.F. Pinaud, L. a Bentolila, J.M. Tsay, S. Doose, J.J. Li, et al., Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics., *Science*. 307 (2005) 538–544. doi:10.1126/science.1104274.

- [17] T. Nann, Nanoparticles In Photodynamic Therapy, *Nano Biomed. Eng.* 3 (2011) 137–143. doi:10.5101/Nbe.V3i2.P137-143.
- [18] L. Shi, B. Hernandez, M. Selke, Singlet oxygen generation from water-soluble quantum dot-organic dye nanocomposites., *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 6278–9. doi:10.1021/ja057959c.
- [19] Y. Wen, W. Song, L. An, Y. Liu, Y. Wang, Y. Yang, Activation of porphyrin photosensitizers by semiconductor quantum dots via two-photon excitation, *Appl. Phys. Lett.* 95 (2009) 143702. doi:10.1063/1.3243979.
- [20] S. Moeno, M. Idowu, T. Nyokong, Spontaneous charge transfer between zinc tetramethyl-tetra-2,3-pyridinoporphyrine and CdTe and ZnS quantum dots, *Inorganica Chim. Acta.* 361 (2008) 2950–2956. doi:10.1016/j.ica.2008.02.048.
- [21] M.F. Frasco, V. Vamvakaki, N. Chaniotakis, Porphyrin decorated CdSe quantum dots for direct fluorescent sensing of metal ions, *J. Nanoparticle Res.* (2009). doi:10.1007/s11051-009-9714-y.
- [22] X. Zhang, Z. Liu, L. Ma, M. Hossu, W. Chen, Interaction of porphyrins with CdTe quantum dots., *Nanotechnology.* 22 (2011) 195501. doi:10.1088/0957-4484/22/19/195501.
- [23] M. Artemyev, E. Ustinovich, I. Nabiev, Efficiency of energy transfer from organic dye molecules to CdSe-ZnS nanocrystals: nanorods versus nanodots., *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 8061–5. doi:10.1021/ja809839h.
- [24] I. Martynenko, V. Kuznetsova, A. Orlova, P. Kanaev, Y. Gromova, V. Maslov, et al., ZnSe/ZnS quantum dots - photosensitizer complexes: optical properties and cancer cell photodynamic destruction effect, in: D.L. Andrews, J.-M. Nunzi, A. Ostendorf (Eds.), 2014: p. 91263C. doi:10.1117/12.2052528.
- [25] E.I. Zenkevich, C. von Borczyskowskib, Self-organization principles in the formation of multiporphyrin complexes and “semiconductor quantum dot-porphyrin” nanoassemblies, *J. Porphyr. Phthalocyanines.* (2013) 1–19. doi:10.1142/S1088424613300097.
- [26] A. Rakovich, D. Savateeva, T. Rakovich, J.F. Donegan, Y.P. Rakovich, V. Kelly, et al., CdTe Quantum Dot/Dye Hybrid System as Photosensitizer for Photodynamic Therapy., *Nanoscale Res. Lett.* 5 (2010) 753–60. doi:10.1007/s11671-010-9553-x.
- [27] M.H.J. Oh, M. Chen, C. Chuang, G.J. Wilson, C. Burda, M.A. Winnik, et al., Charge Transfer in CdSe Nanocrystal Complexes with an Electroactive Polymer, *J. Phys. Chem. C.* 117 (2013) 18870–18884. doi:10.1021/jp406196a.
- [28] a. O. Orlova, V.G. Maslov, a. a. Stepanov, I. Gounko, a. V. Baranov, Formation of QD-porphyrin molecule complexes in aqueous solutions, *Opt. Spectrosc.* 105 (2008) 889–895. doi:10.1134/S0030400X08120126.
- [29] C. Kirchner, T. Liedl, S. Kudera, T. Pellegrino, A. Muñoz Javier, H.E. Gaub, et al., Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles., *Nano Lett.* 5 (2005) 331–8. doi:10.1021/nl047996m.
- [30] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Cytotoxicity of nanoparticles., *Small.* 4 (2008) 26–49. doi:10.1002/smll.200700595.
- [31] V. Bagalkot, L. Zhang, E. Levy-Nissenbaum, S. Jon, P.W. Kantoff, R. Langer, et al., Quantum dot-aptamer conjugates for synchronous cancer imaging, therapy, and sensing of drug delivery based on bi-fluorescence resonance energy transfer., *Nano Lett.* 7 (2007) 3065–70. doi:10.1021/nl071546n.
- [32] J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer, 2006.
- [33] H. Wennerström, Micelles. Physical chemistry of surfactant association, *Phys. Rep.* 52 (1979) 1–86. doi:10.1016/0370-1573(79)90087-5.

- [34] K. Kataoka, a Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 113–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251249>.
- [35] L. Rusu, A. Gambhir, S. McLaughlin, J. Rädler, Fluorescence correlation spectroscopy studies of Peptide and protein binding to phospholipid vesicles., *Biophys. J.* 87 (2004) 1044–53. doi:10.1529/biophysj.104.039958.
- [36] D. de Sousa Neto, M. Tabak, Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles., *J. Colloid Interface Sci.* 381 (2012) 73–82. doi:10.1016/j.jcis.2012.05.041.
- [37] H. Brockman, Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions?, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9 (1999) 438–43. doi:10.1016/S0959-440X(99)80061-X.
- [38] O.N. Oliveira Jr., Langmuir-Blodgett films—properties and possible applications, *Brazilian J. Phys.* 22 (1992) 60–69.
- [39] C.C. Fleischer, C.K. Payne, Nanoparticle-Cell Interactions: Molecular Structure of the Protein Corona and Cellular Outcomes., *Acc. Chem. Res.* (2014). doi:10.1021/ar500190q.
- [40] D.-H. Tsai, F.W. DelRio, A.M. Keene, K.M. Tyner, R.I. MacCuspie, T.J. Cho, et al., Adsorption and conformation of serum albumin protein on gold nanoparticles investigated using dimensional measurements and in situ spectroscopic methods., *Langmuir.* 27 (2011) 2464–77. doi:10.1021/la104124d.
- [41] R. Zhong, Y. Liu, P. Zhang, J. Liu, G. Zhao, F. Zhang, Discrete Nanoparticle-BSA Conjugates Manipulated by Hydrophobic Interaction., *ACS Appl. Mater. Interfaces.* (2014). doi:10.1021/am506497s.
- [42] E.L. Gelamo, C.H.T.P. Silva, H. Imasato, M. Tabak, Interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants: spectroscopy and modelling., *Biochim. Biophys. Acta.* 1594 (2002) 84–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825611>.
- [43] R.E. da Silva, K.C.F. Toledo, H.B. Jorge, B. Moreira Neto, V.R. de Souza, H.S. Nakatani, INTERACTION OF RUTHENIUM COMPLEX WITH BOVINE SERUM ALBUMIN FOR AMPEROMETRIC DETECTION OF ASCORBIC ACID, *Quim. Nova.* X (2014) 1–6. doi:10.5935/0100-4042.20140230.
- [44] A. Pavinatto, A.L. Souza, J.A.M. Deleuzuk, F.J. Pavinatto, S.P. Campana-Filho, O.N. Oliveira, Interaction of O-acylated chitosans with biomembrane models: Probing the effects from hydrophobic interactions and hydrogen bonding, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 114 (2014) 53–59. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.034.
- [45] S. V. Gaponenko, *Optical Properties of Semiconductor Nanocrystals*, Cambridge University Press, 2005.
- [46] C. Ronda, ed., *Luminescence: From Theory to Applications*, 1st editio, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2007. doi:10.1002/9783527621064.
- [47] M. a. Reed, Quantum Dots, *Sci. Am.* 268 (1993) 118–123. doi:10.1038/scientificamerican0193-118.
- [48] A. Rogach, Quantum dots still shining strong 30 years on., *ACS Nano.* 8 (2014) 6511–2. doi:10.1021/nn5036922.
- [49] K. Sanderson, Quantum dots go large., *Nature.* 459 (2009) 760–1. doi:10.1038/459760a.
- [50] X. Ji, F. Peng, Y. Zhong, Y. Su, Y. He, Fluorescent quantum dots : Synthesis , biomedical optical imaging , and biosafety assessment, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 124 (2014) 132–139. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.08.036.
- [51] W. a Hild, M. Breunig, a Goepferich, Quantum dots - nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68 (2008) 153–68. doi:10.1016/j.ejpb.2007.06.009.

- [52] V. Biju, T. Itoh, A. Anas, A. Sujith, M. Ishikawa, Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications., *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2469–95. doi:10.1007/s00216-008-2185-7.
- [53] A. Hoshino, N. Manabe, K. Fujioka, K. Suzuki, M. Yasuhara, K. Yamamoto, Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine: surface modification regulates biological function, including cytotoxicity., *J. Artif. Organs.* 10 (2007) 149–57. doi:10.1007/s10047-007-0379-y.
- [54] D. Maysinger, J. Lovrić, A. Eisenberg, R. Savić, Fate of micelles and quantum dots in cells., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (2007) 270–81. doi:10.1016/j.ejpb.2006.08.011.
- [55] U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, T. Nann, Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels., *Nat. Methods.* 5 (2008) 763–75. doi:10.1038/nmeth.1248.
- [56] S. Hoogland, The Fuss About Quantum Dots, January 2008. (2008). <http://www.photonics.com/Article.aspx?AID=31908> (accessed September 18, 2012).
- [57] G. Wannier, The Structure of Electronic Excitation Levels in Insulating Crystals, *Phys. Rev.* 52 (1937) 191–197. doi:10.1103/PhysRev.52.191.
- [58] J. Frenkel, On the Transformation of light into Heat in Solids. I, *Phys. Rev.* 37 (1931) 17–44. doi:10.1103/PhysRev.37.17.
- [59] A.L. Efros, A.L. Efros, Interband absorption of light in a semiconductor sphere, *Sov. Phys. Semicond.* 16 (1982) 772–775. <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=18785991>.
- [60] P.Y. Yu, M. Cardona, *Fundamentals of Semiconductors*, 4th ed., Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2010. doi:10.1007/978-3-642-00710-1.
- [61] A.P. Alivisatos, Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots, *Science* (80-.). 271 (1996) 933–937. doi:10.1126/science.271.5251.933.
- [62] L.E. Brus, Electron–electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state, *J. Chem. Phys.* 80 (1984) 4403. doi:10.1063/1.447218.
- [63] L. Brus, Electronic wave functions in semiconductor clusters: experiment and theory, *J. Phys. Chem.* 90 (1986) 2555–2560. doi:10.1021/j100403a003.
- [64] A.P. Alivisatos, Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 13226–13239. doi:10.1021/jp9535506.
- [65] Y. Wang, N. Herron, Nanometer-sized semiconductor clusters: materials synthesis, quantum size effects, and photophysical properties, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 525–532. doi:10.1021/j100155a009.
- [66] M.G. Bawendi, M.L. Steigerwald, L.E. Brus, The Quantum Mechanics of Larger Semiconductor Clusters (“Quantum Dots”), *Annu. Rev. Phys. Chem.* 41 (1990) 477–496. doi:10.1146/annurev.pc.41.100190.002401.
- [67] J. Han, X. Bu, D. Zhou, H. Zhang, B. Yang, Discriminating Cr(III) and Cr(VI) using aqueous CdTe quantum dots with various surface ligands, *RSC Adv.* 4 (2014) 32946. doi:10.1039/C4RA04535A.
- [68] X. Wang, L. Cao, F. Lu, M.J. Meziani, H. Li, G. Qi, et al., Photoinduced electron transfers with carbon dots., *Chem. Commun. (Camb).* (2009) 3774–6. doi:10.1039/b906252a.
- [69] I. Borissevitch, More about the inner filter effect: corrections of Stern–Volmer fluorescence quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher, *J. Lumin.* 81 (1999) 219–224. doi:10.1016/S0022-2313(98)00063-5.

- [70] T. Förster, 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation, *Discuss. Faraday Soc.* 27 (1959) 7. doi:10.1039/df9592700007.
- [71] P.G. Wu, L. Brand, Resonance Energy Transfer: Methods and Applications, *Anal. Biochem.* 218 (1994) 1–13. doi:10.1006/abio.1994.1134.
- [72] B. Valeur, M.N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, 2 edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, 2012. doi:10.1002/9783527650002.
- [73] D.L. Dexter, A Theory of Sensitized Luminescence in Solids, *J. Chem. Phys.* 21 (1953) 836. doi:10.1063/1.1699044.
- [74] V.A. Kuzmin, A.S. Tatikolov, Y.E. Borisevich, Charge transfer complexing in the course of triplet state quenching of carbocyanine dyes by nitroxyl radical, *Chem. Phys. Lett.* 53 (1978) 52–55. doi:10.1016/0009-2614(78)80387-X.
- [75] V.A. Kuzmin, I.V. Renge, Y.E. Borisevich, Triplet quenching of polycyclic hydrocarbons by electron acceptors, *Chem. Phys. Lett.* 70 (1980) 257–261. doi:10.1016/0009-2614(80)85329-2.
- [76] D.M. Adams, L. Brus, C.E.D. Chidsey, S. Creager, C. Creutz, C.R. Kagan, et al., Charge Transfer on the Nanoscale: Current Status, *J. Phys. Chem. B.* 107 (2003) 6668–6697. doi:10.1021/jp0268462.
- [77] M. Jurow, A.E. Schuckman, J.D. Batteas, C.M. Drain, Porphyrins as Molecular Electronic Components of Functional Devices., *Coord. Chem. Rev.* 254 (2010) 2297–2310. doi:10.1016/j.ccr.2010.05.014.
- [78] G.G. Parra, Estudos da dinâmica de fototransformação do agente antibacteriano Nitrofurantoína e da formação das espécies ativas durante sua fototransformação, (Mestrado - Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.
- [79] M. Berardi, Análogos fluorescentes de agentes antiparasitários: interações com agregados anfífilos, (Dissertação - Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2010.
- [80] A.M. Amado, Agregação da Acridina Laranja em soluções aquosas e na interação com micelas de SDS, (Dissertação - Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2013.
- [81] P.J. Collings, E.J. Gibbs, T.E. Starr, O. Vafek, C. Yee, L. a. Pomerance, et al., Resonance Light Scattering and Its Application in Determining the Size, Shape, and Aggregation Number for Supramolecular Assemblies of Chromophores, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 8474–8481. doi:10.1021/jp991610s.
- [82] R. Pasternack, P. Collings, Resonance light scattering: a new technique for studying chromophore aggregation, *Science* (80-.). 269 (1995) 935–939. doi:10.1126/science.7638615.
- [83] I. Borissevitch, Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin, *Anal. Chim. Acta.* 343 (1997) 281–286. doi:10.1016/S0003-2670(97)00038-X.
- [84] J.C.W. Corbett, F. McNeil-Watson, R.O. Jack, M. Howarth, Measuring surface zeta potential using phase analysis light scattering in a simple dip cell arrangement, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 396 (2012) 169–176. doi:10.1016/j.colsurfa.2011.12.065.
- [85] T.L. Doane, C.-H. Chuang, R.J. Hill, C. Burda, Nanoparticle ζ -potentials., *Acc. Chem. Res.* 45 (2012) 317–26. doi:10.1021/ar200113c.
- [86] W.M. Pazin, Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo, (Dissertação - Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2012.

- [87] S. Trautmann, V. Buschmann, S. Orthaus, F. Koberling, U. Ortmann, R. Erdmann, Application Note - Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) in Confocal Microscopy Applications: An Overview, PicoQuant GmbH, Berlin, 2013.
- [88] E. Yaghini, F. Giuntini, I.M. Eggleston, K. Suhling, A.M. Seifalian, A.J. Macrobert, Fluorescence Lifetime Imaging and FRET-Induced Intracellular Redistribution of Tat-Conjugated Quantum Dot Nanoparticles through Interaction with a Phthalocyanine Photosensitiser., *Small*. (2013). doi:10.1002/smll.201301459.
- [89] M.B. Barioni, Propriedades estruturais de membranas modelo em interação com o composto anti-Leishmania miltefosina, (Doutorado - Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2014.
- [90] E. Haustein, P. Schwille, Fluorescence correlation spectroscopy: novel variations of an established technique., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36 (2007) 151–69. doi:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132612.
- [91] M.A. Pires, Caracterização das monocamadas mistas (DPPC+BCD) de Langmuir: efeito da estrutura e concentração do BCD e da força iônica na subfase, (Dissertação - Programa de pós-graduação em Física Aplicada à Medicina e Biologia). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2008.
- [92] K.B. Blodgett, MONOMOLECULAR FILMS OF FATTY ACIDS ON GLASS, *J. Am. Chem. Soc.* 56 (1934) 495–495. doi:10.1021/ja01317a513.
- [93] A. Girard-Egrot, Preferential orientation of an immunoglobulin in a glycolipid monolayer controlled by the disintegration kinetics of proteo-lipidic vesicles spread at an air–buffer interface, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1617 (2003) 39–51. doi:10.1016/j.bbamem.2003.09.001.
- [94] O.N. Oliveira, D.S. Dos Santos, D.T. Balogh, V. Zucolotto, C.R. Mendonça, Optical storage and surface-relief gratings in azobenzene-containing nanostructured films., *Adv. Colloid Interface Sci.* 116 (2005) 179–92. doi:10.1016/j.cis.2005.05.008.
- [95] I. Borissevitch, Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation, *J. Lumin.* 69 (1996) 65–76. doi:10.1016/0022-2313(96)00037-3.
- [96] I.E. Borissevitch, S.C. Gandini, Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA., *J. Photochem. Photobiol. B.* 43 (1998) 112–20. doi:10.1016/S1011-1344(98)00093-1.
- [97] D. Kessel, P. Thompson, K. Saatio, K.D. Nantwi, TUMOR LOCALIZATION AND PHOTSENSITIZATION BY SULFONATED DERIVATIVES OF TETRAPHENYLPORPHINE, *Photochem. Photobiol.* 45 (1987) 787–790. doi:10.1111/j.1751-1097.1987.tb07883.x.
- [98] S. BROWN, E. BROWN, I. WALKER, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *Lancet Oncol.* 5 (2004) 497–508. doi:10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
- [99] I.E. Borissevitch, T.T. Tominaga, C.C. Schmitt, Photophysical studies on the interaction of two water-soluble porphyrins with bovine serum albumin. Effects upon the porphyrin triplet state characteristics, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 114 (1998) 201–207. doi:10.1016/S1010-6030(98)00216-0.
- [100] I.E. Borissevitch, N. Rakov, G.S. Maciel, C.B. de Araújo, Changes in porphyrin nonlinear absorption owing to interaction with bovine serum albumin., *Appl. Opt.* 39 (2000) 4431–5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18350032>.

- [101] L.P.F. Aggarwal, M.S. Baptista, I.E. Borissevitch, Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 186 (2007) 187–193. doi:10.1016/j.jphotochem.2006.08.003.
- [102] L.P.F. Aggarwal, Interação das porfirinas aquo-solúveis TPPS4 e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos do pH e da força iônica., 2005.
- [103] A.P. Ramos, C. Pavani, Y. Iamamoto, M.E.D. Zaniquelli, Porphyrin-phospholipid interaction and ring metallation depending on the phospholipid polar head type., *J. Colloid Interface Sci.* 350 (2010) 148–54. doi:10.1016/j.jcis.2010.06.021.
- [104] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2854–2860. doi:10.1021/cm034081k.
- [105] P.J. Gonçalves, L. De Boni, N.M.B. Neto, J.J. Rodrigues, S.C. Zílio, I.E. Borissevitch, Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra(sulfonatophenyl) porphyrin, *Chem. Phys. Lett.* 407 (2005) 236–241. doi:10.1016/j.cplett.2005.03.100.
- [106] K. Kalyanasundaram, Photochemistry of water-soluble porphyrins: comparative study of isomeric tetrapyrrolyl- and tetrakis (N-methylpyridiniumyl) porphyrins, *Inorg. Chem.* 2314 (1984) 2453–2459. doi:10.1021/ic00184a019.
- [107] E.I. Zenkevich, C. von Borczyskowski, Photoinduced Relaxation Processes in Self-Assembled Nanostructures: Multiporphyrin Complexes and Composites “CdSe/ZnS Quantum Dot - Porphyrin,” *Macroheterocycles*. 2 (2009) 206–220.
- [108] E. Zenkevich, T. Blaudeck, M. Abdel-Mottaleb, F. Cichos, a. Shulga, C. Von Borczyskowski, Photophysical properties of self-aggregated porphyrin: Semiconductor nanoassemblies, *Int. J. Photoenergy*. 2006 (2006) 1–8. doi:10.1155/IJP/2006/90242.
- [109] C. Burda, T.C. Green, S. Link, M.A. El-Sayed, Electron Shuttling Across the Interface of CdSe Nanoparticles Monitored by Femtosecond Laser Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B.* 103 (1999) 1783–1788. doi:10.1021/jp9843050.
- [110] A.C.S. Samia, S. Dayal, C. Burda, Quantum dot-based energy transfer: perspectives and potential for applications in photodynamic therapy., *Photochem. Photobiol.* 82 (2006) 617–25. doi:10.1562/2005-05-11-IR-525.
- [111] a. O. Orlova, V.G. Maslov, Y. a. Toporova, E. V. Ushakova, a. V. Fedorov, M. V. Artem’ev, et al., A film luminescent nanosensor based on a quantum dot—organic molecule complex, *Nanotechnologies Russ.* 5 (2010) 49–57. doi:10.1134/S1995078010010040.
- [112] E.I. Zenkevich, T. Blaudeck, A. Milekhin, C. von Borczyskowski, Size-Dependent Non-FRET Photoluminescence Quenching in Nanocomposites Based on Semiconductor Quantum Dots CdSe/ZnS and Functionalized Porphyrin Ligands, *Int. J. Spectrosc.* 2012 (2012) 1–14. doi:10.1155/2012/971791.
- [113] S. Dayal, Y. Lou, A.C.S. Samia, J.C. Berlin, M.E. Kenney, C. Burda, Observation of non-Förster-type energy-transfer behavior in quantum dot-phthalocyanine conjugates., *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 13974–5. doi:10.1021/ja063415e.
- [114] D. Sundholm, Density functional theory calculations of the visible spectrum of chlorophyll a, *Chem. Phys. Lett.* 302 (1999) 480–484. doi:10.1016/S0009-2614(99)00194-3.
- [115] D. Sundholm, Comparison of the electronic excitation spectra of chlorophyll a and pheophytin a calculated at density functional theory level, *Chem. Phys. Lett.* 317 (2000) 545–552. doi:10.1016/S0009-2614(99)01428-1.

- [116] D. Sundholm, Density functional theory study of the electronic absorption spectrum of Mg-porphyrin and Mg-etiochlorophyll-a, *Chem. Phys. Lett.* 317 (2000) 392–399. doi:10.1016/S0009-2614(99)01422-0.
- [117] G. Porter, Flash Photolysis and Spectroscopy. A New Method for the Study of Free Radical Reactions, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 200 (1950) 284–300. doi:10.1098/rspa.1950.0018.
- [118] G. Porter, Flash Photolysis and Some of Its Applications., *Science*. 160 (1968) 1299–1307. doi:10.1126/science.160.3834.1299.
- [119] S. Fery-Forgues, J.-P. Fayet, A. Lopez, Drastic changes in the fluorescence properties of NBD probes with the polarity of the medium: involvement of a TICT state?, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 70 (1993) 229–243. doi:10.1016/1010-6030(93)85048-D.
- [120] a. Chattopadhyay, Chemistry and biology of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids: Fluorescent probes of biological and model membranes, *Chem. Phys. Lipids*. 53 (1990) 1–15. doi:10.1016/0009-3084(90)90128-E.
- [121] G. Xiao, Y. Wang, J. Ning, Y. Wei, B. Liu, W.W. Yu, et al., Recent advances in IV–VI semiconductor nanocrystals: synthesis, mechanism, and applications, *RSC Adv.* 3 (2013) 8104. doi:10.1039/c3ra23209c.
- [122] Y. Marcus, Ionic-Radii in Aqueous-Solutions, *Chem. Rev.* 88 (1988) 1475–1498. doi:10.1021/cr00090a003.
- [123] M.T. Martín, I. Prieto, L. Camacho, D. Möbius, Partial Stacking of a Water-Soluble Porphyrin in Complex Monolayers with Insoluble Lipid, *Langmuir*. 12 (1996) 6554–6560. doi:10.1021/la960695a.
- [124] M. Tabak, I.E. Borisevitch, Interaction of dipyrromethane with micelles of lysophosphatidylcholine and with bovine serum albumin: Fluorescence studies, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1116 (1992) 241–249. doi:10.1016/0304-4165(92)90017-O.
- [125] B. Sahoo, M. Goswami, S. Nag, S. Maiti, Spontaneous formation of a protein corona prevents the loss of quantum dot fluorescence in physiological buffers, *Chem. Phys. Lett.* 445 (2007) 217–220. doi:10.1016/j.cplett.2007.07.075.
- [126] S. Dominguez-Medina, J. Blankenburg, J. Olson, C.F. Landes, S. Link, Adsorption of a Protein Monolayer via Hydrophobic Interactions Prevents Nanoparticle Aggregation under Harsh Environmental Conditions, *ACS Sustain. Chem. Eng.* (2013) 130415083117001. doi:10.1021/sc400042h.
- [127] T.P. Jr., *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, 1 edition, Academic Press, New York, 1995.
- [128] I.E. Borisevitch, G.G. Parra, V.E. Zagidullin, E.P. Lukashev, P.P. Knox, V.Z. Paschenko, et al., Cooperative effects in CdSe/ZnS-PEGOH quantum dot luminescence quenching by a water soluble porphyrin, *J. Lumin.* 134 (2013) 83–87. doi:10.1016/j.jlumin.2012.09.008.
- [129] A.P. Ramos, C. Pavani, Y. Iamamoto, M.E.D. Zaniquelli, Porphyrin-phospholipid interaction and ring metallation depending on the phospholipid polar head type, *J. Colloid Interface Sci.* 350 (2010) 148–154. doi:10.1016/j.jcis.2010.06.021.
- [130] C.B. Tovani, J.F.V. De Souza, T.D.S. Cavallini, G.J.F. Demets, A. Ito, M.B. Barioni, et al., Comparison between cucurbiturils and β -cyclodextrin interactions with cholesterol molecules present in Langmuir monolayers used as a biomembrane model, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 111 (2013) 398–406. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.05.006.

APÊNDICE A – Fundamentos da Mecânica Quântica

Este apêndice foi escrito utilizando como base, principalmente, dois livros texto Ref. [45] e Ref. [46]. Contudo, qualquer livro texto utilizado em disciplinas ministradas em cursos de graduação de Física, Química ou semelhante servem como base para abordar o tema.

A.1 Partícula em uma Caixa – 1D

Para explicar as características espectroscópicas de sistemas com escala nanométrica é útil um modelo quântico da “Partícula em um poço de potencial”.

Inicialmente analisamos as características da uma partícula de massa m num poço de potencial infinito unidimensional, chamado também “Partícula em uma Caixa – 1D”. Posteriormente aplicaremos um potencial U_0 correspondente à altura da caixa. Apresentaremos de forma sucinta a solução da equação de Schrödinger independente de tempo.

Para uma partícula em uma caixa unidimensional de largura a e potencial infinito $U(x)$

$$U(x) = \begin{cases} 0 & \text{para } |x| \leq a/2 \\ \infty & \text{para } |x| > a/2 \end{cases} \quad (A.1)$$

a equação de Schrödinger independente do tempo é descrita por

$$-(\hbar^2/2m) \partial^2 \psi(x) / \partial x^2 + U(x) \psi(x) = E \psi(x) \quad (A.2)$$

sendo, m a massa e E a energia da partícula e $\psi(x)$ a função de onda dela.

A energia encontrada a partir de (A.1) é a energia cinética da partícula descrita. É importante perceber que as soluções que encontraremos para a equação A.1 estão relacionadas exclusivamente à condição de contorno de que a probabilidade de encontrar a partícula no limite da caixa e fora dela é zero ($\psi\psi^* = 0$). Isto é, apenas as soluções das funções de onda que apresentam valores diferentes de zero serão válidas. Além disso, vamos supor que a probabilidade de encontrar a partícula é simétrica (dada pelo quadrado da função de onda) em torno do centro da caixa.

Dada a solução da equação de Schrödinger, obtêm-se a energia dessa partícula

$$E_n = (\pi^2 \hbar^2 / 2ma^2) n^2 \quad (A.3)$$

Essa relação é obtida utilizando a relação clássica entre a energia cinética e o momento p e a relação da mecânica quântica entre o momento p e o número de onda k , como a seguir

$$E = p^2/2m; p = \hbar k; k = n \frac{\pi}{a} \quad (A.4)$$

cujo principal resultado é a necessidade de apenas um número quântico n para caracterizar um estado.

Assim sendo, as soluções de (A.1) para a função de onda $\psi(x)$ normalizada é dada por
Para funções ímpar

$$\psi_{\text{ímpar}} = \sqrt{2/a} \cos\left(\frac{\sqrt{2mE}}{\hbar} \cdot x\right); n = 1, 3, 5, \dots \quad (A.5)$$

Para funções par

$$\psi_{\text{par}} = \sqrt{2/a} \sin\left(\frac{\sqrt{2mE}}{\hbar} \cdot x\right); n = 2, 4, 6, \dots \quad (A.6)$$

As equações A.5 e A.6 estão representadas na Figura 72a e b, a qual mostra os níveis de energia para as respectivas funções de onda $n = 1, 2, 3$.

Figura 72. Níveis de energia e funções de onda para (a) partícula em um poço de potencial infinito, e (b) partícula em um poço de potencial finito U_0 . (c) Curva de dispersão de uma partícula livre. Os pontos sobre estas curvas são os valores de energia quantizada para uma partícula dentro de uma caixa, para n tendendo ao infinito o regime clássico é atingido. Retirado de [45].

Da equação A.3 pode-se obter a separação dos dois níveis de energia subsequentes, dado por:

$$\Delta E_n = E_{n+1} - E_n = \frac{\pi^2 \hbar^2 (2n + 1)}{2ma^2} \quad (A.7)$$

Da equação A.7 concluímos que ΔE_n aumenta conforme o número quântico n aumenta.

A energia mínima da partícula ou energia de ponto-zero ($n = 1$) é diferente de zero e dada por (A.3)

$$E_1 = \pi^2 \hbar^2 / 2ma^2 \quad (A.8)$$

A relação (A.8) também pode ser obtida através do princípio da incerteza de Heisenberg

$$\Delta p \Delta x \geq \hbar/2 ; \text{ com } \Delta x = a \Rightarrow \Delta p \geq \hbar/2a \therefore \Delta E = \Delta p^2 / 2m = \hbar^2 / 8ma^2 \quad (A.9)$$

a qual se assemelha a equação A.3, porém com uma precisão $\pi^2/4$.

Obviamente, no caso de uma caixa com altura finita dada pelo potencial U_0 , a função de onda não desaparece na borda do poço, mas decai exponencialmente dentro da região clássica proibida $|x| > a/2$ (Figura 72b). Desta forma, as soluções obtidas são muito semelhantes ao caso do potencial infinito, salvo algumas diferenças. Quando a energia da partícula se torna maior do que a altura da caixa U_0 , os estados energéticos da partícula formam um *continuum* (Figura 72b). Além disso, a probabilidade de encontrar uma partícula fora da caixa é maior que zero e a probabilidade aumenta com o aumento n . O número de estados dentro do poço é dado pela expressão

$$a\sqrt{2mU_0} > \pi\hbar(n-1) \quad (A.10)$$

Consequentemente, existe pelo menos um estado dentro da caixa com qualquer combinação de a e U_0 . A equação A.10 fornece o número máximo possível de estados dentro da caixa para o dado valor de n . A posição absoluta dos níveis de energia para U_0 finito é um pouco menor se comparar com os mesmos níveis para $U_0 \rightarrow \infty$. Por isso o comprimento de onda efetivo da partícula nesse caso torna-se maior do que na caixa infinita (Figura 72b, área hachurada). Todos os estados com $E_n < U_0$ possuem energia quantizada, para $E_n > U_0$ os níveis da energia formam o *continuum* de estados.

Um conceito importante é a relação de dispersão (energia cinética da partícula em função de k) obtida a partir da equação A.4 e representada na Figura 72c como pontos cheios na parábola

$$E = \hbar^2 k^2 / 2m \quad (A.11)$$

Dessa expressão deriva a definição da “massa da partícula” no estado sólido. Essa massa é definida, originalmente, para uma partícula livre, mas pode ser estendida ao estado sólido cuja denominação passa a ser “massa efetiva”.

A.2 Partícula em uma Caixa – 3D

Estendendo o problema da partícula em uma caixa unidimensional para uma caixa tridimensional, necessitamos de coordenadas que satisfaçam a geometria do problema. Para tal, as coordenadas esféricas são as mais adequadas (r, θ, ϕ) , porque o potencial é central. A função de onda é escrita como o produto de uma porção radial e uma angular

$$\psi = R(r)\Theta(\theta)\Phi(\phi) \Rightarrow \psi_{n,l,m}(r, \theta, \phi) = \frac{u_{n,l}(r)}{r} Y_{lm}(\theta, \phi) \quad (A.12)$$

sendo $Y_{lm}(\theta, \phi)$ denominados esféricos harmônicos um grupo de funções bem definido e $R_{n,l}(r) = \frac{u_{n,l}(r)}{r}$ é a função radial. Assim, a equação de Schrödinger para o caso 3D pode ser escrita como

$$-\frac{\hbar}{2m} \frac{d^2 u}{dr^2} + \left[U(r) + \frac{\hbar}{2mr^2} l(l+1) \right] u = Eu \quad (A.13)$$

Note que agora são necessários três números quânticos (excluindo o spin): o número quântico principal n , o número quântico secundário ou azimutal l e o número quântico magnético m . O número quântico principal continua possuindo valor mínimo igual a 1 e $n=1,2,3,\dots$, enquanto que o número quântico secundário l determina o momento angular L , com l possuindo $(2l+1)$ estados degenerados e valores $l = (n-1) = 0,1,2,3,\dots$. Já o número quântico magnético m determina a orientação dos orbitais e é representada componente de L_z paralela ao eixo de quantização com m possuindo valores $m = -l, \dots, 0, \dots, l$, sendo número total de m igual $(2l+1)$ para certo valor l . Similarmente a equação A.3, obtém-se a energia para um poço de potencial infinito

$$U(r) = \begin{cases} 0 & \text{para } r \leq a \\ \infty & \text{para } r > a \end{cases}$$

$$E_{n,l} = (\hbar^2/2ma^2) \chi_{nl}^2 \quad (A.14)$$

as quais χ_{nl} são raízes das funções de Bessel sendo n o número da raiz e l a ordem da função. Para $l = 0$ a equação A.14 é igual a equação A.3.

Supondo que o poço é esférico e de potencial finito U_0 , a equação A.14 pode ser considerada uma boa aproximação se

$$U_0 \gg (\pi^2 \hbar^2 / 8ma^2) \quad (A. 15)$$

O segundo membro da inequação acima é uma consequência direta do princípio da incerteza e apenas para valores de U_0 muito maiores que os dados pelo princípio da incerteza que será possível determinar $E_{n,l}$ do sistema.

O problema tridimensional de uma partícula na caixa será útil ao estendermos este problema aos PQ. Como veremos nas próximas seções, os PQ são partículas esféricas com dimensão 3D.

A.3 Elétron em um Potencial Coulombiano

Introduziremos nesta seção o comportamento de um elétron na presença de um potencial Coulombiano. Isso é importante pois, como veremos a seguir, a energia entre dois estados subsequentes não obedece o comportamento observado na Seção A.1, na qual ΔE_n aumenta conforme o número quântico n aumenta. A partir dessa iteração Coulombiana introduziremos o conceito do raio de Bohr, um conceito importante e diretamente ligado ao confinamento quântico do elétron, base para os fundamentos das propriedades óticas nos pontos quânticos.

O potencial Coulombiano é dado por:

$$U(r) = -\frac{e^2}{r}, \text{ omitindo o termo } (1/4\pi\epsilon_0) \quad (A. 16)$$

Aplicando esse potencial na equação (2.13) e tomando apenas a parte radial, tem-se:

$$\left[\frac{d^2}{d\rho^2} + \varepsilon + \frac{2}{\rho} - \frac{l(l+1)}{\rho^2} \right] u(\rho) = 0 \quad (A. 17)$$

Sendo o argumento adimensional e a energia, $\rho = r/a_0$ e $\varepsilon = E/E_0$, expressos em função da unidade de comprimento atômico a_0 e E_0 é a energia de ionização, dadas respectivamente por:

$$a_0 = \frac{\hbar^2}{m_0 e^2} \approx 0,529 \text{ \AA}, m_0 \equiv \text{massa do elétron} \quad (A. 18)$$

$$E_0 = \frac{e^2}{2a_0} \approx 13.6 \text{ eV} \quad (A. 19)$$

A solução de A.17 para a energia E obedece a série $E = -E_0/(n_r + l + 1)^2$, mas $l = (n - 1)$, logo

$$E = -\frac{E_0}{(n_r + n - 1 + 1)^2} \equiv -\frac{E_0}{n^2} \quad (A.20)$$

Conforme dito acima, contraditoriamente ao caso da Seção A.1 a energia de uma partícula entre seus dois estados subsequentes decresce conforme n aumenta no caso de um potencial Coulombiano. Para $E > 0$, qualquer energia é possível para a partícula.

Agora, estamos aptos a descrever o raio de Bohr como sendo a distância mais provável onde o elétron pode ser encontrado em relação ao centro dessa simetria esférica. Na equação A.16 temos o sinal negativo, característica de forças atrativas e a carga sendo o quadrado da carga elementar do elétron.

A.4 Átomo de Hidrogênio

Nas seções anteriores descrevemos os problemas para uma única partícula em um caso ideal. Nesta seção iremos apresentar a mesma abordagem da Seção A.3, porém para o caso real: o átomo de hidrogênio. Isto terá implicações importantes para a descrição de elétrons e buracos em nanopartículas, especialmente nos nanocristais já que as equações para duas partículas são utilizadas para descrever a formação dos éxcitons (interação entre o par elétron-buraco).

O átomo de hidrogênio é constituído por um próton de massa M_0 e carga $+e$ orbitado por um elétron de massa m_0 e carga $-e$.

A equação de Schrödinger que descreve esse sistema contendo duas partículas é composta por três termos: 1) um termo que descreve cada partícula isoladamente; 2) um termo que descreve a interação entre essas duas partículas; e 3) o termo que descreve a interação Coulombiana entre elas:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2M_0}\nabla_p^2 - \frac{\hbar^2}{2m_0}\nabla_e^2 - \frac{e^2}{|\mathbf{r}_p - \mathbf{r}_e|} \quad (A.21)$$

os quais p e e os índices para próton e elétron, respectivamente, e $\mathbf{r}$ o vetor radial para cada partícula. Dessa forma, podemos escrever:

$$\mathbf{r} = \mathbf{r}_p - \mathbf{r}_e \quad (A.22)$$

$$\mathbf{R} = \frac{m_0\mathbf{r}_e + M_0\mathbf{r}_p}{m_0 + M_0} \quad (A.23)$$

Da mesma forma, podemos reescrever as massas do sistemas como M a massa total e μ a massa reduzida:

$$M = m_0 + M_0 \quad (A.24)$$

$$\mu = \frac{m_0 M_0}{m_0 + M_0} \quad (A.25)$$

Substituindo as expressões (A.22), (A.23), (A.24) e (A.25) na equação A.21, teremos:

$$H = -\frac{\hbar^2}{2M} \nabla_R^2 - \frac{\hbar^2}{2\mu} \nabla_r^2 - \frac{e^2}{r} \quad (A.26)$$

O primeiro termo da equação A.26 está relacionado ao movimento do centro de massa do átomo de hidrogênio (núcleo e elétron), descrevendo um movimento que não é quantizado, enquanto que os dois termos subsequentes descrevem estados internos do sistema. A energia desses estados pode ser escrita como:

$$E_n = -\frac{R_y}{n^2}, \text{ para } E < 0 \quad (A.27)$$

com $R_y = e^2/2a_B$ e $a_B = \hbar^2/\mu e^2$. Note que $R_y = 13.6$ eV é denominada constante de Rydberg e corresponde a energia de ionização para o átomo de hidrogênio a partir do estado de menor energia, e a_B é o raio de Bohr para o átomo de hidrogênio. Assim como na Seção A.3 a diferença entre os níveis de energia diminui conforme n aumenta, e para $E > 0$ os estados do elétron e do próton não são quantizados.

Ao compararmos os raios de Bohr a_0 e a_B nota-se que a diferença entre eles é que o primeiro considera a massa do elétron m_0 e o segundo a massa reduzida μ . Isso nos leva a concluir que as equações utilizadas para o caso da partícula livre podem ser extrapoladas para o caso do átomo de hidrogênio, já que $\mu/m_0 = 0,9995$.