UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

ANDRÉ LUAN DOS SANTOS PAVANELLI

Estudos das fototransformações de fotossensibilizadores de interesse em
fotoquimioterapia na presença de nanoestruturas

Ribeirão Preto

2016

ANDRÉ LUAN DOS SANTOS PAVANELLI

Estudos das fototransformações de fotossensibilizadores de interesse em
fotoquimioterapia na presença de nanoestruturas

Dissertação 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 Mestre
em Ciências

Área de Concentração: Física Aplicada à
Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

Ribeirão Preto

2016

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

Pavanelli, André Luan dos Santos

Estudos das fototransformações de fotossensibilizadores de interesse em fotoquimioterapia na presença de nanoestruturas / André Luan dos Santos Pavanelli; orientador: Iouri Borissevitch — Ribeirão Preto, 2016.

96 p.: il.; 30 cm

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

1. Ponto Quântico; 2. Porfirina; 3. Características espectroscópicas; 4. Interação; 5. Fototransformação.

Nome: PAVANELLI, André Luan dos Santos

Título: Estudos das fototransformações de fotossensibilizadores de interesse em fotoquimioterapia na presença de nanoestruturas.

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciência

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*Em memória de meus pais, André e Rosana, que
sempre guiaram o meu caminho.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas sem as quais essa dissertação jamais se concretizaria.

Ao prof. Iouri por toda a paciência, conselhos, lições e por nunca ter desistido de mim nas horas mais difíceis.

À minha família, que sempre me apoiou, em especial: ao meu irmão Paulo por ser a pessoa mais prestativa e amigável que eu já tive o prazer de conhecer, à minha avó Eunice por toda a ajuda e carinho, à tia Edna por todo o incentivo e por ter me apresentado, ainda na infância, ao amor pela leitura, à minha avó Julia por todo carinho e atenção e a todos os meus tios, tias, primos e agregados.

À minha amada Ligéia, que esteve ao meu lado desde o início e sem a qual eu não iria a lugar nenhum.

À minha sogra dona Antônia por todos os conselhos, apoio e por ter me acolhido como um filho, ao Edgar pelas conversas, à Carmilla, ao meu sogro Aristides e a Josi.

Ao Danilo pela amizade ao longo desses anos, discussões e conselhos; ao Sérgio pelas dicas, conselhos e cervejas, três coisas que combinam muito bem; ao Leonardo pelos chás, dicas, discussões e conversas. À prof. Galina pelo carinho e pelos conselhos.

A todos os amigos do grupo de fotobiofísica: André Miele, Débora, Wallance, Matheus, ao técnico Adriano, ao prof. Luciano Bachmann, ao prof. Amando Ito e todos aqueles que por ventura eu tenha me esquecido no momento de escrever esse agradecimento.

Aos amigos do departamento: Minhoca (Guilherme), Ste, Cueva (João), Laranja (Jéssica), Rafael Pianca e a tantos outros que não caberiam nesse espaço. Aos funcionários Nilza Marinho, ao Júlio, ao Élcio e a todos os outros funcionários do departamento de física, sempre dispostos a ajudar.

Ao Leandro Máximo e ao prof. Roberto Santana por terem gentilmente sintetizado os pontos quânticos usados neste trabalho.

Agradeço também à FFCLRP e à USP pelo suporte e estrutura e ao CNPq pelo auxílio financeiro através do processo 146425/2014-6.

Agradeço imensamente a todos que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento desse trabalho, através de dicas ou conversas descontraídas.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

— Carl Sagan

RESUMO

PAVANELLI, A. L.S. **Estudos das fototransformações de fotossensibilizadores de interesse em fotoquimioterapia na presença de nanoestruturas.** 2016. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um método de tratamento do câncer e de outras doenças baseado no efeito conjunto de um composto fotoativo, luz da região visível ou infravermelho próximo e oxigênio molecular. O diagnóstico por fluorescência (DF) é uma técnica para o diagnóstico precoce de diversas doenças que consiste em utilizar algum composto fluorescente para distinguir tecido tumoral de tecido saudável. As porfirinas são amplamente utilizadas como fotossensibilizadores (FS) na TFD e como fluoróforos (FF) no DF. Os pontos quânticos (PQ) são novas nanoestruturas que possuem intenso e largo espectro de absorção na região espectral UV e visível, espectro de luminescência muito intenso e estreito e são fotoestáveis. Isso os torna promissores para o uso em TFD ou em DF, competindo com FS e FF orgânicos. A interação entre PQ e FS orgânicos pode aumentar a eficiência de ambos, devido aos processos de transferência de energia e/ou de carga. Durante o fototratamento os FS podem sofrer fototransformações, perdendo sua fotoatividade e formando produtos estáveis tóxicos. Isso torna importante o estudo da fototransformação dos FS. Neste trabalho, estudou-se, através da espectroscopia de absorção óptica, da fluorescência com resolução temporal e de *flash*-fotólise, a interação das porfirinas meso-tetrametil piridil (TMPyP) e meso-tetrasulfonatofenil (TPPS₄) com o PQ de Telureto de Cádmio (CdTe) encapsulado com ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) e sua fotólise individual e em conjunto. Os experimentos entre a TMPyP e o PQ mostraram que existe a formação de um complexo de transferência de carga entre a porfirina e o PQ. Verificou-se que a formação do complexo TMPyP-PQ aumenta a eficiência do processo de fotólise. A interação entre a p TPPS₄ e o PQ em pH 4,0 (TPPS₄ biprotonada) induz a transferência dos prótons para o PQ. A porfirina TPPS₄ em pH 7,0 com adição de PQ não apresentou mudanças espectrais. Entretanto, em ambos os pHs, o PQ causava o aumento da velocidade de fotólise da TPPS₄, sendo que o efeito do PQ foi maior em pH 4,0. Os resultados obtidos mostraram a importância da carga dos componentes, tanto na sua interação, como na eficiência de fotólise, devido à sua interação eletrostática. Também foi observado um aumento da intensidade da fluorescência de sistemas porfirina-PQ durante a fotólise.

Esse efeito pode ser explicado pela redução da supressão da fluorescência devido à diminuição das concentrações dos componentes durante a fotólise.

Palavras-chave: Ponto Quântico, Porfirina, Características espectroscópicas, Interação, Fototransformação.

ABSTRACT

PAVANELLI, A. L.S. **Studies of the phototransformations of photosensitizers of interest in photochemotherapy in the presence of nanostructures.** 2016. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The Photodynamic Therapy (PDT) is a method of treatment of cancer and other diseases based on combined effects of a photoactive compound, visible or near infrared light and molecular oxygen. The diagnosis by fluorescence (DF) is a technique for diagnostics of disease that consists in utilizing fluorescence compound to discern tumor tissue from a healthy one. Porphyrins are widely used as photosensitizer (PS) in PDT and as fluorophore (FP) in DF. Quantum dots (QD) are new nanostructures, which have intense and broad absorption spectrum in the UV and visible light region, intense and narrow luminescence spectrum and possess high photostability. They are considered promising for clinical application in PDT and/or DF, competing with organic PS and FP. Interaction between QD and organic PS can increase the efficiencies of both, due to the energy and/or charge transfer processes. The PS phototransformation during phototreatment may lead to loss of the PS photoactivity and formation of toxic products, that is important to study the processes of the PS phototransformation. In this work, with the support of absorption spectroscopy, steady state and time resolved fluorescence and flash-photolysis, we study interaction of meso-tetramethyl pyridyl (TMPyP) and meso-tetrakis sulfonatofenyl (TPPS₄) porphyrins with CdTe QD functionalized with 3-mercaptopropionic acid (MPA) and their photolysis individual and in mutual. Experiments with TMPyP and QD demonstrate formation of a charge transfer complex between the porphyrin and the QD. We have verified that TMPyP-QD complex increases the efficiency of the porphyrin photolysis. The photolysis of the proper complex has been observed, as well. The interaction between TPPS₄ and QD at pH 4.0 (biprotonated TPPS₄) provokes deprotonation of the porphyrin via the proton transfer to QD. At pH 7.0 (deprotonated TPPS₄) interaction of the porphyrin with the QD does not change TPPS₄ spectral characteristics. Nevertheless, at both pHs QD cause increase in the TPPS₄ photolysis rate, the effect being higher at pH 4.0. The observed results demonstrate the importance of the component charges both at their interaction and in photolysis efficiency, associated with their electrostatic interaction. The fluorescence intensity of

the porphyrin-QD systems is enhanced during photolysis. This effect may be explained as the fluorescence quenching reduction due to decrease of the compound concentrations in the photolysis process.

Keywords: Quantum Dot, Porphyrin, Spectroscopic Characteristic, Interaction, Phototransformation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Passos do tratamento de TFD: I- paciente com tumor; II- aplicação do FS; III- acúmulo do FS no tumor e aplicação da luz; IV- início da destruição celular e V- remoção do tumor.....	4
Figura 2. Penetração da luz no tecido.....	5
Figura 3. Níveis de energia da molécula de oxigênio.	5
Figura 4. Esquema das reações Tipo I e Tipo II que ocorrem na TFD.....	6
Figura 5. Esquema dos níveis de energia na transferência de energia FRET.	8
Figura 6. Esquema dos níveis de energia na transferência de energia Dexter.....	10
Figura 7. Esquema simplificado da transferência de carga.....	11
Figura 8. Esquema da supressão estática de um estado excitado.....	14
Figura 9. Curvas de supressão antes (esquerda) e depois (direita) da aplicação da equação modificada de Stern-Volmer.....	15
Figura 10. Esquema de foto-oxidação de hematoporfirina.....	16
Figura 11. estrutura geral das porfirinas desprotonada (a), monoprotonada (b) e biprotonada (c).....	17
Figura 12. Influência do tamanho na emissão dos PQs.....	18
Figura 13. Estrutura química das porfirinas TMPyP e TPPS ₄	21
Figura 14. Espectros normalizados de absorção (preto) e fluorescência (vermelho) da porfirina TMPyP.....	22
Figura 15. Espectros de absorção óptica (a) e fluorescência (b) da TPPS ₄ em pH 4,0 (preto) e 7,0 (vermelho).....	22
Figura 16. Apresentação esquemática da estrutura do PQ de CdTe e seu agente encapsulante MPA em meio aquoso.....	23
Figura 17. Espectros normalizados da absorbância (preto) e da luminescência (vermelho) do PQ de CdTe-MPA.....	24
Figura 18. Esquema de montagem de um espectrofotômetro.....	25
Figura 19. Diagrama de Jablonski.....	26
Figura 20. Esquema de montagem de um fluorímetro estático.....	28
Figura 21. Esquema de aparelho de “time correlated single photon counting” (TCSPC).....	30

Figura 22. Esquema de um equipamento de flash-fotólise.	31
Figura 23. Espectros normalizados de absorção óptica de TMPyP (preto), TPPS ₄ em pH 4,0 (azul), TPPS ₄ em pH 7,0 (lilás), PQ de CdTe-MPA (verde) e espectro de emissão normalizado da lâmpada acoplada com um filtro (vermelho).	34
Figura 24. Espectros de absorção da TMPyP com PQ (preto), do PQ (vermelho) puro e da TMPyP com o PQ após correção usando o espectro do PQ como a linha base (azul).	37
Figura 25. Espectros de absorção óptica (a) e de fluorescência (excitando em 420nm) (b) de 2,9 μ M de TMPyP com a adição de CdTe.	38
Figura 26. Ajuste dos dados experimentais de absorção ópticas da solução de PQ com TMPyP de acordo com a equação 31.	40
Figura 27. Ajuste da fluorescência da TMPyP com adição de PQ em acordo com a equação de Stern-Volmer.	41
Figura 28. Espectros de absorção óptica (a) e de fluorescência (b) do PQ de CdTe-MPA com a adição de TMPyP.	42
Figura 29. Curvas de decaimento da fluorescência do PQ com adição de TMPyP (a) e da TMPyP com adição de PQ (b).	42
Figura 30. Relação entre os fatores pré-exponenciais R_1 R_2 e R_3 (a) e relação entre as componentes 1 e 2 R_{12} e R_{21} (b) em função da concentração do PQ.	45
Figura 31. Gráfico da razão entre a intensidade de fluorescência inicial do PQ e a intensidade conforme se adiciona TMPyP em função da concentração da porfírina.	45
Figura 32. Gráfico da razão entre a intensidade de fluorescente pelo inverso da concentração de TMPyP com ajuste usando equação de Stern-Volmer modificada.	46
Figura 33. Esquema do complexo do tipo rede formado entre TMPyP e CdTe-MPA, retirado de [19].	47
Figura 34. Espectros de absorção óptica (a) e da absorbância em $\lambda = 422$ nm (b) da TMPyP na presença de O ₂ em função do tempo da irradiação.	48
Figura 35. Espectros de absorção óptica (a) e de absorbância em $\lambda = 422$ nm (b) da TMPyP na ausência de O ₂ em função do tempo de irradiação.	49
Figura 36. Espectros de absorção óptica (a), de absorbância em $\lambda = 450$ nm (b), de fluorescência (c) e da intensidade integral da fluorescência em função do tempo de irradiação (d) da TMPyP na presença do PQ em função do tempo de irradiação na presença de O ₂	50

Figura 37. Espectros de absorção óptica (a), de absorbância em $\lambda = 450$ nm (b), de fluorescência (c) e da intensidade integral da fluorescência (d) da TMPyP na presença de PQ em função do tempo de irradiação na ausência de O_2 .	51
Figura 38. a) Espectros de absorção óptica da TPPS ₄ em pH 7,0 e b) Espectros de fluorescência da solução de TPPS ₄ +PQ em pH 7,0 com a excitação em $\lambda = 410$ nm ambos em função da concentração do	54
Figura 39. Espectros de excitação da solução TPPS ₄ +PQ com emissão em $\lambda = 650$ nm em função da concentração do PQ.	54
Figura 40. Espectros de absorbância da TPPS ₄ com pH 4,0 com adição de PQ (a) e espectros de fluorescência da porfirina com a adição de PQ excitando em $\lambda = 420$ nm(b).	55
Figura 41. Ajuste da fluorescência da TPPS ₄ + PQ em pH 4,0 em acordo com a equação de Stern-Volmer.	56
Figura 42. Espectros de fluorescência de: PQ em pH 4,0 (a) e em pH 7,0 (b), excitando em $\lambda = 350$ nm, em função da concentração da TPPS ₄ .	57
Figura 43. Razão entre a intensidade de fluorescência do PQ puro e do PQ + TPPS ₄ em pH 4,0 (a) e pH 7,0 (b) em função da concentração da TPPS ₄ .	57
Figura 44. Ajuste da fluorescência do PQ de CdTe-MPA em função da concentração da TPPS ₄ , em pH 4,0 (a) e em pH 7,0 (b) em acordo com a equação de Stern-Volmer modificada.	58
Figura 45. Curvas de decaimento de fluorescência do PQ com adição de TPPS ₄ em pH 4,0 excitando em $\lambda = 350$ nm (a) e em pH 7,0 excitando em $\lambda = 350$ nm (b); TPPS ₄ com adição de PQ em pH 4,0 excitando em $\lambda = 420$ nm (c) e em pH 7,0 excitando em $\lambda = 415$ nm (d).	59
Figura 46. Relação entre os fatores pré-exponenciais R_1 R_2 e R_3 (a) e relação entre as componentes 1 e 2 R_{12} e R_{21} (b) em função da concentração da TPPS ₄ em pH 4,0.	61
Figura 47. Relação entre os fatores pré-exponenciais das curvas de decaimento da fluorescência da TPPS ₄ em função da concentração do PQ em pH 4,0.	63
Figura 48. Curvas de decaimento do estado excitado tripleto da TPPS ₄ em função da concentração de PQ em pH 4,0 excitando em $\lambda = 532$ nm.	64
Figura 49. Espectros de absorção óptica (a) e da absorbância em $\lambda = 435$ nm (b) da TPPS ₄ em pH 4,0 em função do tempo de irradiação.	66

- Figura 50.** Espectros de absorção óptica (a), de fluorescência (b), da absorbância em $\lambda = 413$ nm (c) e da intensidade integral da fluorescência em função do tempo de irradiação (d) de 3,0 μ M de TPPS₄ + PQ em pH 4,0 em função do tempo de irradiação. 66
- Figura 51.** Espectros de absorção óptica (a) e da absorbância em $\lambda = 413$ nm (b) da TPPS₄ em pH 7,0 em função do tempo de irradiação. 67
- Figura 52.** Espectros de absorção óptica (a), de absorbância em $\lambda = 413$ nm (b), de fluorescência (c) e da intensidade integral da fluorescência (d) da TPPS₄ em pH 7,0 na presença de PQ em função do tempo de irradiação. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores calculados para a constante de formação de complexo K.	40
Tabela 2. Resultado dos ajustes dos decaimentos do tempo de vida do PQ com adição de TMPyP.	43
Tabela 3. Resultado dos ajustes dos decaimentos do tempo de vida da TMPyP com adição de PQ.	44
Tabela 4. Tempos característicos de fotólise de TMPyP e do sistema TMPyP + CaTe-MPA e os fatores pré-exponenciais ajustados na presença e na ausência de O ₂	52
Tabela 5. fatores de acessibilidade e constantes de supressão da fluorescência do CdTE-MPA pela porfirina TPPS ₄ em pH 7,0 e 4,0.....	58
Tabela 6. Resultado dos ajustes dos decaimentos de fluorescência do PQ com adição de TPPS ₄ em pH 4,0	60
Tabela 7. Resultado dos ajustes dos decaimentos do tempo de vida de fluorescência do PQ com adição de TPPS ₄ em pH 7,0	61
Tabela 8. Resultado dos ajustes dos decaimentos de fluorescência da TPPS ₄ em pH 4,0 com adição de PQ.....	62
Tabela 9. Resultado dos ajustes dos decaimentos do tempo de vida de fluorescência da TPPS ₄ em pH 7,0 com adição de PQ.....	63
Tabela 10. ajustes das curvas de decaimento do estado excitado tripleto da porfirina TPPS ₄ em pH 4,0 com adição do PQ de CdTe.....	65
Tabela 11. Valores dos tempos de fotólise dos ajustes da TPPS ₄ na presença e na ausência de CeTd-MPA em pH 4,0	67
Tabela 12. Valores dos tempos de fotólise dos ajustes da TPPS ₄ em pH 7,0	69

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos Teóricos TFD	4
1.2. Processos de transferência de energia e carga	7
1.2.1. Transferência de energia por mecanismo de Förster	7
1.2.2. Transferência de energia por mecanismo de Dexter	9
1.2.3. Transferência de carga.....	10
1.2.4. Supressão da Fluorescência.....	12
1.3. Fotólise.....	15
1.4. Porfirinas.....	16
1.5. Pontos Quânticos (PQ).....	17
1.6. Objetivos.....	19
2. MATERIAIS E MÉTODOS	20
2.1. Objetos do Estudo	21
2.2. Técnicas Experimentais	24
2.2.1. Espectroscopia de Absorção ótica	24
2.2.2. Espectroscopia de Fluorescência Estática e Resolvida no Tempo	26
2.2.3. <i>Flash</i> -Fotólise	31
2.3. Metodologia experimental	33
2.3.1. Experimentos de fotólise	33
2.3.2. Estudos dos efeitos de carga.....	34

2.3.3. Estudos dos efeitos da interação Porfirina-PQ na intensidade e no tempo de vida da fluorescência.....	35
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
3.1. Sistema PQ + TMPyP	37
3.1.1. Efeitos da interação entre TMPyP e CdTe-MPA	37
3.1.2. Estudo da fotólise	47
3.2. Sistema PQ + TPPS ₄	53
3.2.1. Estudos dos efeitos de pH.....	53
3.2.2. Estudo da Fotólise	65
4. CONCLUSÕES	70
4.1. Conclusões do estudo da TMPyP + CdTe-MPA	71
4.2. Conclusões do estudo da TPPS ₄ + CdTe-MPA	71
4.3. Conclusões Gerais.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1. INTRODUÇÃO

Quarenta e cinco anos após a “guerra contra o câncer” ter sido declarada, o desenvolvimento de novas drogas anticâncer continuam sendo um grande desafio [1]. O câncer é a denominação de um conjunto de doenças que têm em comum o crescimento descontrolado de células, as quais podem invadir e se espalhar em locais distantes do corpo [2].

Estimativas apontam que, para este ano de 2016, são esperados cerca de 14 milhões de novos casos de câncer e 8 milhões de mortes causadas por esta doença em todo o mundo [3]. Segundo a OMS é esperado para as próximas duas décadas um aumento de cerca de 70% no número dos novos casos por ano [2].

Devido à grande incidência e mortalidade desta doença, além do crescente número de casos, existe a busca por métodos de tratamento e diagnóstico cada vez mais eficazes.

O diagnóstico precoce, para muitos tipos de cânceres, pode aumentar consideravelmente as chances de cura da doença [3–6]. Dessa forma se faz necessário o uso de técnicas cada vez mais eficazes e de fácil acesso. Para isso é necessário o desenvolvimento de formas de diagnóstico que sejam eficazes e de baixo custo. Aliado ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico, deve-se buscar também o aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas de tratamento que melhore as chances de cura e a qualidade de vida dos pacientes.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um método de tratamento do câncer e de outras doenças, como doenças dermatológicas [7]. Esse método está baseado no efeito conjunto de um composto fotoativo (fotossensibilizador, FS), luz da região visível ou infravermelho próximo e o oxigênio molecular. Esse tipo de tratamento vem sendo implementado na clínica a mais de duas décadas, alcançando sucesso contra diversos tipos de tumores, como tumores ginecológicos, tumores de cabeça e pescoço e câncer do reto [9].

Diferente dos métodos atualmente empregados massivamente na clínica (quimioterapia e radioterapia), a TFD apresenta efeitos colaterais mais brandos que a quimioterapia e a radioterapia, pois os fotossensibilizadores utilizados possuem toxicidade muito menor que os compostos aplicados na quimioterapia. Além disso, diferente das radiações ionizantes, as quais são base da radioterapia, a luz visível não produz efeitos negativos no organismo [10]. Outra vantagem da TFD é que, diferente dos métodos convencionais de tratamento, ela pode ser aplicada sem limitação de

dose, podendo ser repetida ilimitadamente. O processo de tratamento resulta em pequenas ou quase nenhuma cicatriz [11]. Por fim, esse método é não invasivo e fácil de aplicar.

O diagnóstico por fluorescência é uma técnica relativamente nova (≈ 20 anos) que tem sido cada vez mais utilizada e implementada na clínica para o diagnóstico precoce de câncer, como no diagnóstico do câncer de bexiga [12] e de neoplasia intra-epitelial cervical [13]. A técnica consiste em utilizar algum composto que se acumule preferencialmente em células tumorais, que absorvam comprimentos de onda na faixa de comprimentos de onda do UV-azul ($\lambda < 400$ nm) e emitam preferencialmente no vermelho, dessa forma pode-se distinguir, mesmo visualmente, tecido tumoral de tecido sadio [11,12].

Durante o tratamento o fotossensibilizador (FS) utilizado pode sofrer fototransformação, mudando sua estrutura química. Por conseguinte, além de diminuir a efetividade do tratamento, também corre o risco de gerar fotoprodutos tóxicos no escuro — na ausência de luz — o que não é desejável. Por outro lado, pode-se usar essa fotodecomposição como forma de monitorar o andamento do tratamento em tempo real, através da redução da fotoatividade e da fluorescência do FS, como observado no modelo animal [14]. Assim, faz-se importante o estudo da dinâmica de fototransformação do proeminente FS.

As porfirinas são amplamente utilizadas como FS na TFD [8,14] devido a suas características promissoras para a TFD: baixa toxicidade no escuro, alto coeficiente de absorção molar e em alguns casos, alto rendimento do estado tripleto. Por outro lado, os pontos quânticos (PQ) são promissores para uso clínico, eles possuem alta absorção no visível, largo espectro de absorção e emissão luminescente intensa, características essas que os tornam bastante promissores, tanto para uso em diagnóstico, como para uso de maneira a aumentar a eficiência dos tratamentos de TFD [15].

Neste trabalho procurou-se estudar, através de técnicas espectroscópicas, a interação entre as porfirinas meso-tetrametil piridil (TMPyP) e meso-tetrasulfonatofenil (TPPS₄), catiônica e aniônica respectivamente, e o ponto quântico (PQ) de CdTe encapsulado com ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), o qual tem carga aniônica. Também estudamos a fototransformação dessas porfirinas e das porfirinas com o PQ com o intuito de avaliar se há mudanças nas características de fotodecomposição da porfirina com a adição do PQ.

1.1. Aspectos Teóricos TFD

A TFD é uma modalidade de tratamento que, através de luz, FS e oxigênio molecular, forma espécies ativas, as quais produzirão dano e morte celular das células alvo [9,14].

O tratamento de TFD começa com a aplicação do FS, que pode ser tópica ou sistêmica. Devido às suas características, esse FS se acumulará no tecido a ser tratado. Após determinado intervalo de tempo, para o acúmulo do FS no local do tratamento, aplica-se luz visível.

Figura 1. Passos do tratamento de TFD: I- paciente com tumor; II- aplicação do FS; III- acúmulo do FS no tumor e aplicação da luz; IV- início da destruição celular e V- remoção do tumor, retirado de [7].

A luz aplicada deve ter comprimento de onda entre 600 e 800 nm, intervalo conhecido como janela fototerapêutica. O limite inferior da janela fototerapêutica é escolhido assim porque para comprimentos de onda menores que 600 nm há grande absorção da luz pelo tecido biológico, tendo a luz pouca penetração no tecido (Figura 2).

Figura 2. Penetração da luz no tecido, retirado de [16].

Já o limite superior da janela fototerapêutica em comprimentos de onda maiores que 800 nm é determinado pela pouca energia do nível excitado do FS, de onde será transferida energia para o oxigênio. Essa energia não é suficiente para formar o estado excitado singleto do oxigênio (Figura 3) [9,16-18].

Figura 3. Níveis de energia da molécula de oxigênio.

Após a absorção do fóton de luz, o FS vai para o estado excitado (essa transição está detalhada na seção 2.1.2), desse estado o FS pode tomar dois caminhos que realizarão o tratamento, chamados de reações tipo I e reações tipo II [15].

As reações do tipo I têm maior ocorrência quando o FS tem alta afinidade com o substrato alvo ou quando o tecido a ser tratado está em hipóxia. Essas reações incluem a transferência de

carga entre o estado excitado do FS para o substrato, gerando radicais livres, que irão se ligar às estruturas das células a serem tratadas, induzindo morte celular. A transferência de cargas produzirá FS reduzido e substrato oxidado. O FS reduzido pode capturar um elétron do O_2 , gerando radical superóxido, este radical é altamente reativo, atacando as estruturas celulares e causando morte celular [9,14].

Reações do tipo II envolvem produção de oxigênio singlete e ocorrem com maior frequência nos tratamentos de TFD. Elas ocorrem quando o FS no estado excitado tripleto transfere energia para o O_2 , que está no estado fundamental tripleto, então o O_2 é promovido para o estado excitado singlete. Nesse estado o O_2 é altamente reativo, com tempo de vida nesse estado na água de $\approx 5 \mu s$, diminuindo até para $0,2 \mu s$ em meio biológico, tendo um diâmetro de reação de 10 nm [15]. O O_2 no estado singlete tem alta citotoxicidade, atacando estruturas essenciais à célula, tais como membrana celular, mitocôndria, lisossomos e núcleo, causando morte celular por necrose ou apoptose [17].

Figura 4. Esquema das reações Tipo I e Tipo II que ocorrem na TFD, retirado de [15].

As características dos FS que aumentam a eficiência do processo de tratamento são: i) habilidade de acumular-se preferencialmente no tecido doente; ii) absorção na janela fototerapêutica; iii) alto rendimento quântico do estado tripleto; iv) baixa toxicidade no escuro; v) curto intervalo de tempo entre a administração da droga e vi) máximo acúmulo no tumor e rápida eliminação do organismo [9].

A aplicação para o diagnóstico ocorre de maneira diferente da observada para a TFD. Em geral, no diagnóstico procura-se diferenciar o tecido doente do saudável. Portanto, buscam-se aqui

compostos que se acumulem em células doentes, tenham alto rendimento quântico de fluorescência e que não sejam tóxicos. No diagnóstico por fluorescência pode-se detectar o câncer em estágios iniciais, além de ter uma boa delimitação entre tecidos sadios e doentes [7].

1.2 Processos de transferência de energia e carga

Existem algumas maneiras de uma molécula, que está no estado excitado, transferir energia para outra molécula presente no meio. Essa transferência pode acontecer via interações eletromagnéticas de longo alcance, chamados de Transferência de energia ressonante de Förster (do inglês *Förster Resonance Energy Transfer*, *FRET*) ou por mecanismo de curto alcance de Dexter.

Também há a possibilidade da molécula doadora formar um complexo de transferência de carga ou transferir um elétron completo para o aceitador, gerando assim dois íons. Além disso, existe uma possibilidade de transferir um próton entre molécula doadora e aceitador.

1.2.1. Transferência de energia por mecanismo de Förster

No processo de FRET a energia é transferida por ressonância eletromagnética de um doador, que se encontra no estado excitado (D^*), para um aceitador que está no estado fundamental (A). Essa transferência ocorre por meio de interação dipolo-dipolo, justamente por essa interação esse processo é caracterizado por ter um longo alcance, com distâncias típicas variando entre 20 e 200 Å [19–21].

Com a transferência da energia haverá o retorno do doador para o estado fundamental e a promoção do aceitador para o estado excitado [19–21], conforme esquema da Figura 5.

Figura 5. Esquema dos níveis de energia na transferência de energia FRET, retirado de [20].

Para esse processo de transferência de energia, pode-se calcular a taxa de energia transferida de D^* para A ($k_F(r)$) como:

$$k_F(r) = \frac{\Phi_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left(\frac{9000 \ln 10}{128 \pi^5 N n^4} \right) \int_0^\infty F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (1)$$

onde Φ_D é o rendimento quântico de fluorescência do doador na ausência do aceitador, n é o índice de refração do meio, N é o número de Avogadro, τ_D é o tempo de vida da fluorescência do doador na ausência do aceitador, r é a distância de separação entre D e A, $F_D(\lambda)$ é a intensidade de fluorescência do doador no comprimento de onda λ , cuja integral de λ até $\lambda + \Delta\lambda$ está normalizada, $\varepsilon_A(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador no comprimento de onda λ e κ é o fator de orientação relativa entre os dipolos de A e D.

Como a taxa de transferência ($k_F(r)$) depende de r , definiu-se a distância de Förster (R_0) como a distância na qual metade dos doadores excitados perdem sua energia por transferência de energia e a outra metade via decaimentos usuais. Para isso é feito $k_F(R_0) = \tau_D^{-1}$ [20], sendo então:

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

A eficiência do processo de transferência por FRET (Φ_F) pode ser obtida experimentalmente por meio da relação entre as intensidades de fluorescência na presença e na ausência do doador:

$$\Phi_F = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (3)$$

onde I_D e I_{DA} são a intensidade de fluorescência do doador e do doador na presença do aceitador, respectivamente.

Quando a molécula doadora se encontra próximo à molécula aceitadora, existem outras interações eletrostáticas que ocorrem no curto alcance, sendo possível, além da interação dipolo-dipolo, as interações dipolo-quadrupolo para distâncias $< 8 \text{ \AA}$ e interação quadrupolo-quadrupolo para distâncias $< 2 \text{ \AA}$.

1.2.2. Transferência de energia por mecanismo de Dexter

Se as moléculas D e A estiverem próximas o suficiente para que haja sobreposição das nuvens eletrônicas, pode ocorrer o processo de transferência de energia por troca de elétrons, conhecido como mecanismo de Dexter. Esse mecanismo de curto alcance acontece quando as moléculas do D e do A estão separadas por distâncias entre 10 e 15 $\text{\AA}$.

Este processo de transferência de energia acontece quando o doador, que está com um elétron no nível eletrônico excitado (D^*), está com sua nuvem eletrônica sobreposta com a nuvem da molécula aceitadora, que está no estado fundamental (A), e os níveis eletrônicos-vibracionais coincidem. Neste processo, o elétron do estado excitado de D passa para A e o elétron do estado fundamental de A é transferido para o estado fundamental de D, dessa forma D volta ao estado fundamental e A vai para o estado excitado A^* , conforme é possível observar no esquema da Figura 6.

Figura 6. Esquema dos níveis de energia na transferência de energia Dexter, retirado de [19,20].

A taxa de transferência de energia por troca de elétrons está relacionada com a distância (r) entre D e A e com a sobreposição das nuvens:

$$k_D = \frac{2\pi}{\hbar} K e^{\frac{-2r}{L}} \quad (4)$$

onde K é uma constante empírica, L o raio de van der Waals e $\hbar$ a constante de Planck.

Observa-se que diferentemente do mecanismo de Förster não há dependência com a intensidade da fluorescência do doador ou com a capacidade de absorver fótons do aceitador, sendo importante apenas a sobreposição das nuvens e dos níveis eletrônicos das moléculas envolvidas no processo e as regras de seleção que determina a probabilidade de transferência.

1.2.3. Transferência de carga

A transferência de carga ocorre para distâncias muito curtas (entre 1 e 5 Å). Nesse processo o D se junta com o A, formando um complexo de transferência de carga, onde um elétron está transferido "parcialmente" do doador para o aceitador.

Esse complexo é metaestável e D e A estão unidos por uma ligação fraca. A energia do estado de transferência de carga (E_{TC}) é dado por:

$$E_{TC} = I_d - E_R - C - \alpha \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{4n^2 + 2} \right) \quad (6)$$

onde I_d é o potencial de ionização de D, E_R é a afinidade eletrônica da molécula aceitadora, C a energia Coulombiana de estabilização do complexo, α uma constante empírica, ε a constante dielétrica e n o índice de refração do meio onde o complexo foi formado.

Existe também a possibilidade da transferência completa de um elétron entre um doador e um aceitador, formando dois íons-radicais. Uma forma simples de visualizar esse processo pode ser vista na Figura 7.

Figura 7. Esquema simplificado da transferência de carga, adaptado de [20].

Cabe ressaltar que a transferência de carga pode ocorrer tanto nos estados excitados do doador ou do aceitador, formando um exciplexo, como nos estados fundamentais. Sendo necessária apenas a afinidade para a formação do complexo e a sobreposição das nuvens eletrônicas.

O complexo de transferência de carga tem características espectroscópicas diferentes em relação às moléculas que o compõem. As mudanças mais comuns são: deslocamento do pico de absorção óptica, do pico de fluorescência e a mudança dos tempos de vida dos estados excitados.

1.2.4. Supressão da Fluorescência

É definido como supressão da fluorescência qualquer processo que cause diminuição da intensidade de fluorescência da amostra, que pode ser por transferência de energia, formação de complexo no estado fundamental, etc. Além disso, este efeito de supressão pode ser observado em meios com alta densidade óptica, devido ao efeito de filtro interno, dando a falsa impressão de que a fluorescência está sendo suprimida [20].

Serão descritos a seguir dois mecanismos da supressão dos estados excitados: a supressão colisional (ou dinâmica) e a supressão estática.

A supressão dinâmica ocorre quando um supressor colide com o fluoróforo, que está no estado excitado, e absorve a energia do fluoróforo sem que este emita um fóton. Neste tipo de supressão o contato é fator determinante para sua efetividade. Outro ponto a se destacar é a importância da difusão das moléculas de supressor pelo fluoróforo. Como esse processo deve ocorrer antes da emissão do fóton, o aumento da concentração do supressor causa diminuição no tempo de vida de fluorescência. As mudanças do tempo de vida do estado excitado estão relacionadas com a concentração do supressor através da equação 7, chamada de equação de Stern-Volmer.

$$\frac{I_0}{I} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_D [Q] \quad (7)$$

onde I_0 e τ_0 são, respectivamente, a intensidade e tempo de vida da emissão do fluoróforo na ausência do supressor, I e τ são, respectivamente, a intensidade e tempo de vida do fluoróforo na presença da concentração $[Q]$ de supressor, a constante K_D é a constante de Stern-Volmer para a supressão dinâmica e k_q é a constante de supressão bimolecular, essa constante está relacionada à eficiência do processo de supressão.

A supressão colisional pode ser desdobrada em dois casos: se o processo de supressão não é limitado pela difusão, ou seja, em meio aquoso $k_q < 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, então pode-se relacionar a constante bimolecular com a constante difusional (k_1), $k_q = p k_1$, onde p é a eficiência da reação. Por

outro lado, se o processo é limitado pela difusão, ou seja, $p=1$, $k_q \approx 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, então a constante k_q é relacionada com a constante de difusão.

A supressão estática, diferentemente da supressão dinâmica, não depende do tempo e é causada pela formação de um complexo não radiativo, o qual dissipará a energia de excitação por meio de processos de relaxação ou com o espectro de fluorescência do complexo deslocado em relação ao do fluoróforo.

É possível descrever a supressão estática por meio da constante de formação de complexo K_S , dada por:

$$K_S = \frac{[F \cdots Q]}{[F][Q]} \quad (8)$$

onde $[F]$ e $[Q]$ são as respectivas concentrações de fluoróforo e de supressor e $[F \cdots Q]$ é a concentração de complexo.

Essa constante pode ser obtida por meio da equação de Stern-Volmer, sendo relacionada as intensidades da fluorescência emitida pelo fluoróforo na presença (I_0) e na ausência do supressor (I).

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S[Q] \quad (9)$$

Percebe-se que ambas as equações para supressão (equações 7 e 9) são idênticas, sendo difícil identificar qual o tipo de supressão apenas com as intensidades de emissão. Uma forma de distinguir é observar se há dependência temporal com a concentração do supressor, pois apenas a supressão dinâmica depende do tempo. Outro método para saber de qual processo de supressão se trata é observar se há mudanças no espectro de absorção, pois a supressão dinâmica afeta apenas estados excitados, enquanto a supressão estática altera as propriedades espectroscópicas do sistema em geral [20].

Figura 8. Esquema da supressão estática de um estado excitado, retirado de [22].

Existe ainda a possibilidade de ocorrer os dois tipos de supressão simultaneamente. Nesse caso a relação entre as intensidades com a concentração de supressor será uma parábola.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_D + K_S)[Q] + K_D K_S [Q]^2 \quad (10)$$

Cabe ressaltar aqui que a constante K_D pode ser obtida através de experimentos de fluorescência temporal por meio da equação 7.

Um efeito que pode ocorrer, modificando a forma como acontece a supressão, são os fluoróforos serem parcialmente acessíveis aos supressores. Nesse caso a dependência das intensidades de fluorescência do fluoróforo na presença do supressor não dependerá linearmente da concentração de supressor (Figura 9), sendo necessário ajustar a equação para levar em conta a fração acessível dos fluoróforos.

$$\frac{I_0}{I_0 - I} = \frac{1}{f} + \frac{1}{f K_a [Q]} \quad (11)$$

Onde f é o fator de acessibilidade dos supressores ao fluoróforo e K_a é a constante de Ster-Volmer dos supressores acessíveis aos fluoróforos.

Figura 9. Curvas de supressão antes (esquerda) e depois (direita) da aplicação da equação modificada de Stern-Volmer, retirado de [20].

1.3. Fotólise

A fotólise é definida como a perda da estrutura do composto devido à irradiação da região visível ou UV. Geralmente a fotólise (ou fototransformação ou fotodecomposição) está acompanhada de mudanças nos espectros de absorção óptica e de fluorescência [23]. Essas mudanças podem mudar apenas algumas características do cromóforo, deslocando o comprimento de onda de absorção óptica máxima para comprimentos de onda menores ou então destruir o cromóforo, ocorrendo o fotobranqueamento [23,24].

Em muitos casos a fotodecomposição está associada com a formação de oxigênio singlete — que é altamente reativo com ligações duplas — e a produção de radicais livres, que podem ser produzidos em processos envolvendo oxigênio ou diretamente com o composto (análogo às reações Tipo-I da TFD). Na Figura 10 é demonstrado um esquema da fotodegradação da hematoporfirina por meio de reações envolvendo o oxigênio molecular do meio. Percebe-se que o oxigênio singlete ataca as ligações duplas da porfirina, destruindo a estrutura de conjugação π do anel, causando perda da fotoatividade da hematoporfirina e mudando suas características espectrais.

Figura 10. Esquema de foto-oxidação de hematoporfirina, retirado de [25].

É interessante o estudo da fototransformação dos candidatos a FS em TFD e dos compostos já aplicados, pois o processo de fotólise pode causar problemas como a perda de fotoatividade, o que diminui a eficiência do tratamento, além do fotoproduto gerado poder ser tóxico. Por outro lado, o tratamento de TFD e o processo de fototransformação são processos paralelos, pode-se então utilizar este processo para o controle e o monitoramento do tratamento e da dose utilizada, como proposto em [14].

1.4. Porfirinas

Porfirinas são moléculas formadas a partir de um anel porfirínico, o qual contém um cromóforo tetrapirrólico conjugado. Esse cromóforo faz com que as porfirinas tenham alto coeficiente de absorção molar na região do visível, sendo característica comum às porfirinas a forte coloração.

O anel porfirínico contém quatro átomos de nitrogênio em seu centro, dos quais dois se encontram ligados a átomos de hidrogênio e os outros dois estão livres. Esses nitrogênios livres são suscetíveis a se ligarem com o átomo de hidrogênio, causando protonação da porfirina (Figura 11).

Figura 11. estrutura geral das porfirinas desprotonada (a), monoprotonada (b) e biprotonada (c), retirado de [26].

Os grupos colaterais (R) são o que diferenciam as porfirinas, sendo responsáveis por mudanças nas características espectroscópicas da molécula, tais como: comprimento de onda do máximo de absorção e de fluorescência, rendimentos quânticos e tempos de vida dos estados excitados, etc.

Atualmente as porfirinas e seus derivados, que são considerados como FS para TFD de primeira geração e constituem a grande maioria dos compostos utilizados na clínica, sendo aplicados desde derivados de hematoporfirina (Photofrin, Photogem, Photosan) até compostos que induzem a produção de protoporfirina IX (Ácido aminolevulínico, ALA) [16]. As porfirinas já foram utilizadas para o tratamento de diversos tumores, tais como: linfoma cutâneo, mesotelioma, câncer esofageal, testicular, gástrico, laringeal, pulmonar, mama, etc [10,26].

1.5. Pontos Quânticos (PQ)

Pontos quânticos são semicondutores nanocristalinos com tamanho característico entre 1 e 10 nm que possuem amplo e intenso espectro de absorção óptica na região do UV-visível, espectro de luminescência intenso e estreito e alta fotoestabilidade.

Em função das suas características, os PQ apresentam aplicabilidade nos mais diversos campos da ciência e tecnologia. Já foram usados como agente antimicrobiano [27]; na detecção biológica ultrasensível [28]; como célula solar [29], na computação quântica [30], no diagnóstico e fototratamento de doenças [31], entre outras aplicações.

As características ópticas dos PQs surgem do confinamento quântico forte a que está submetido o par elétron-buraco (chamado de éxciton). A energia de transição do PQ ($E_{1,0}$) é dada por:

$$E_{1,0} = E_g + \frac{\pi^2 \hbar^2}{2\mu R^2} - 1,786 \frac{e^2}{\epsilon R} \quad (12)$$

onde E_g é a energia da banda de Gap, μ é a massa reduzida do par elétron-buraco, e a carga do elétron, ϵ é a constante dielétrica do cristal e R o raio da nanopartícula.

Em função do confinamento quântico forte [19] em um espaço muito menor que o raio de Bohr do par elétron-buraco é possível alterar as características espectroscópicas dos PQs alterando o tamanho das partículas [32], pela equação 12 é possível perceber que quanto menor o raio, maior a energia do éxciton, assim a emissão de fluorescência é deslocado para o azul. Em contrapartida, para diâmetros de partícula maiores a energia armazenada é menor e a emissão é deslocada para comprimentos de onda maiores (Figura 12).

Figura 12. *Influência do tamanho na emissão dos PQs, retirado de [32].*

Quando o PQ absorve um fóton, o elétron da camada de valência ganha energia e é promovido para a camada de condução. Devido ao confinamento, ele não se distanciará do buraco formado, sendo em seguida atraído e aniquilado pelo buraco emitindo um fóton.

Os tempos de vida da fluorescência dos PQs apresentam caráter multiexponencial. Esse perfil é atribuído ao decaimento não radiativo e a defeitos na superfície do PQ. Geralmente os

tempos de vida do PQ podem ser separados em duas escalas: uma mais curta, relacionada à luminescência do núcleo do PQ e outra mais longa associada à superfície [33].

Um dos limitantes da aplicação dos PQs em tratamentos ou diagnóstico ainda tem sido a sua toxicidade, pois de forma geral, os PQs são feitos de materiais tóxicos ao organismo. Uma forma de tentar contornar isso é através da funcionalização do PQ, o que além de diminuir a toxicidade da nanopartícula, também pode adicionar características que melhorem seu desempenho, podendo torná-lo solúvel em água, ter maior afinidade com um alvo de ação escolhido, etc [34].

1.6. Objetivos

O objetivo que guiou este trabalho foi a investigação da interação entre porfirinas, uma catiônica e outra aniônica, e o PQ de CdTe funcionalizado com ácido mercaptopropiônico (MPA), que em meio aquoso tem carga negativa. Além da interação entre PQ e porfirina, também foram estudados os efeitos que esse contato poderia causar na fotodegradação das porfirinas. Esse estudo se justifica no aprofundamento do conhecimento das relações entre porfirinas e PQs, além de uma forma de tentar obter dados relevantes de fenômenos que ocorreriam durante um tratamento de TFD ou mesmo em um diagnóstico por fluorescência.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Objetos do Estudo

Neste trabalho foram estudadas as porfirinas meso-tetrasulfonatofenil (TPPS₄), meso-tetrametil piridil (TMPyP) (Figura 13) e sua interação com o PQ de CdTe solúvel em água, funcionalizado com ácido 3-mercaptopropiônico (MPA).

Figura 13. Estrutura química das porfirinas TMPyP e TPPS₄.

As porfirinas possuem a mesma estrutura central, consistindo em um anel tetrapirrólico cíclico com estrutura desenvolvida de conjugação π , e diferenciam-se pelos grupos colaterais. A estrutura desenvolvida de conjugação π é responsável pelo alto coeficiente de absorção molar (ϵ) das porfirinas na região espectral visível e sua rigidez determina o alto rendimento quântico do estado tripleto e a fluorescência relativamente intensa.

A porfirina TMPyP contém quatro grupos colaterais metilpiridil (Figura 13). Esses grupos possuem um nitrogênio carregado positivamente, o que torna esses grupos carregados positivamente e a soma das cargas da molécula em meio aquoso é + 4 a partir do pH 2,0.

Figura 14. Espectros normalizados de absorção (preto) e fluorescência (vermelho) da porfirina TMPyP.

A TPPS₄ por sua vez, tem quatro grupos colaterais sulfonato (Figura 13) carregados negativamente. A carga líquida da TPPS₄ depende do pH, que em pH ácido causa dupla protonação do anel central da porfirina. A TPPS₄ possui dois pontos de pKa próximos do pH 5,0, dessa forma, no pH 4,0 a TPPS₄ está em sua forma biprotonada com carga líquida -2. Em contrapartida, no pH 7,0 o anel central da porfirina se encontra desprotonado, fazendo com que a carga líquida da molécula, neste caso, seja -4 [26].

O efeito do pH pode ser observado através das mudanças dos espectros de absorção óptica e da fluorescência da porfirina, conforme Figura 15.

Figura 15. Espectros de absorção óptica (a) e fluorescência (b) da TPPS₄ em pH 4,0 (preto) e 7,0 (vermelho).

Ambas as porfirinas foram obtidas da *Midcentury Chemicals* e usadas sem qualquer purificação adicional.

A estrutura esquematizada do PQ de CdTe-MPA utilizado neste trabalho está demonstrada na Figura 16.

Figura 16. Apresentação esquemática da estrutura do PQ de CdTe e seu agente encapsulante MPA em meio aquoso.

Os PQs foram sintetizados pelo aluno de doutorado Ms. Leandro Máximo do grupo de Bioatividade de compostos de coordenação, liderado pelo professor Dr. Roberto Santana da FCFRP da USP.

Os PQ de CdTe fornecidos foram funcionalizados usando ácido 3-mercaptopropiônico (MPA) como agente encapsulador. Mais detalhes sobre os métodos de síntese empregados na produção dos PQs podem ser obtidos em [20,21].

O diâmetro médio e o coeficiente de absorção molar (ϵ) foram obtidos em um cálculo usando o comprimento de onda do pico de absorção óptica característico (λ) do CdTe-MPA. A relação entre o comprimento de onda do pico (λ), o diâmetro médio das partículas (D) e o coeficiente de absorção molar (ϵ) estão relacionados através das equações 13 e 14 [35]:

$$D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - (194,84) \quad (13)$$

$$\epsilon = 10043 \times D^{2,12} \quad (14)$$

Os espectros de absorção óptica e de luminescência normalizados do PQ de CdTe-MPA estão mostrados na Figura 17. Observa-se que o espectro de absorbância é bastante amplo, abrangendo a região de $\lambda = 200$ nm até $\lambda = 550$ nm.

Figura 17. Espectros normalizados da absorbância (preto) e da luminescência (vermelho) do PQ de CdTe-MPA.

O pico de absorbância, conforme a Figura 17, está centrado em $\lambda = 505$ nm. Usando esse valor de comprimento de onda máximo do PQ nas equações 13 e 14, se obteve o diâmetro médio das partículas e coeficiente de absorção molar do PQ, respectivamente, de $D \approx 2,5$ nm e $\varepsilon = 7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2. Técnicas Experimentais

2.2.1. Espectroscopia de Absorção ótica

A energia dos fótons que serão absorvidos pela molécula é igual a energia necessária para promover o elétron do estado de menor energia (estado fundamental) para algum de seus estados excitados [36]. Essa característica, intrínseca da matéria, reflete no espectro de absorção óptica da molécula. Tal espectro é a dependência da absorção óptica $A(\lambda)$ em função do comprimento de onda λ .

Experimentalmente, a medida da Absorção é feita de acordo com a lei de Lambert-Beer, que associa $A(\lambda)$ com o logaritmo da razão entre a intensidade de luz incidente e a intensidade de luz transmitida no comprimento de onda λ (equação (15)).

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \quad (15)$$

Onde $I_0(\lambda)$ é a intensidade da luz de comprimento de onda λ incidente sobre a amostra, $I(\lambda)$ é a intensidade transmitida através da amostra, ou seja, detectado após atravessar a amostra e $A(\lambda)$ é a absorbância. A absorbância é relacionada com o coeficiente de absorção molar (ϵ), dado em $M^{-1}cm^{-1}$, a concentração (C) e o caminho óptico (l) (equação 16):

$$A = \epsilon Cl \quad (16)$$

As medidas de absorção são realizadas da seguinte maneira: incide-se sobre a amostra um feixe de fótons de comprimento de onda λ , chamado de feixe incidente. E após isso monitora-se a intensidade do feixe transmitido através da amostra, obtendo o valor de absorbância com a equação 15.

Para a realização dessa medida o aparato experimental é disposto conforme esquema da Figura 18.

Figura 18. Esquema de montagem de um espectrofotômetro.

Os itens numerados correspondem, respectivamente a: 1) fonte da luz; 2) monocromador; 3) amostra; 4) registrador (fotomultiplicadora); 5) analisador (computador, etc.); 6) e 6') fontes da energia elétrica; L₁, L₂, L₃ e L₄ Sistema ótico.

As medidas de absorção óptica realizadas para este trabalho foram realizadas nos espectrofotômetros Beckman Coulter 640 DU e Ultraspec 2100 pro.

2.2.2. Espectroscopia de Fluorescência Estática e Resolvida no Tempo [22,23]

Uma molécula ao absorver um fóton passa do seu estado fundamental (S_0) para um estado eletronicamente excitado (S_1). A partir desse momento, existem diversas possibilidades de perda da energia excedente da molécula. Esses processos estão mostrados no diagrama de Jablonski (Figura 19)

Figura 19. Diagrama de Jablonski, retirado de [37].

No diagrama, observa-se que ao absorver um fóton durante um tempo extremamente curto ($t \approx 10^{-15}$ s), a molécula passa do seu estado eletrônico fundamental S_{00} para um estado excitado S_{nv} . Essa transição ocorre entre dois níveis de energia bem definidos, mudando não apenas o nível eletrônico 0 para n, mas também o vibracional 0 para v, mantendo a configuração dos spins eletrônicos (do estado fundamental singlete para o estado excitado singlete).

A partir no nível excitado S_{nv} , a molécula relaxa por processos não radiativos de conversão interna e relaxação vibracional até o primeiro estado excitado vibracional do nível eletrônico S_1 . A partir desse ponto, devido aos processos de conversão interna e de relaxação vibracional, o elétron pode ir para o estado fundamental S_{00} , dissipando calor, ou com a inversão do elétron através do processo de cruzamento intersistema, passar para o estado tripleto (T_{1v}). O processo de cruzamento intersistema é proibido segundo as regras de transição da mecânica quântica [36] e ocorre com baixa frequência na maioria dos cromóforos. Do nível T_{1v} a molécula pode relaxar até o nível T_{10} . Desse nível a molécula pode voltar ao estado fundamental por processos não radiativos ou emitir um fóton voltando ao estado S_{00} , através da fosforescência.

Do nível S_{10} a molécula pode emitir um fóton, retornando ao estado S_{00} . Esse processo é chamado de fluorescência. Diferentemente da fosforescência, esse processo é permitido pelas regras de seleção quânticas [36].

Ambos os processos luminescentes (fluorescência e fosforescência) podem ser estudados através da técnica de espectroscopia da luminescência no estado estacionário ou resolvido no tempo. Tais medidas podem dizer muito sobre os sistemas a serem estudados, tais como mobilidade, interação, transferência de energia, formação de agregados entre outras informações [20].

O espectro de fluorescência estático é uma varredura da intensidade emitida pela amostra em função do comprimento de onda após a excitação com um comprimento de onda fixo. Nessa técnica, há uma fonte de luz branca, usada para excitação, essa luz é incidida sobre um monocromador, que determinará uma faixa bastante estreita de comprimentos de onda usados para a excitação da amostra. Em seguida, o feixe, com comprimentos de onda já definidos, incide continuamente sobre a amostra. A aquisição é feita perpendicularmente ao feixe de incidência (para evitar o feixe da luz incidente e diminuir os efeitos da luz espalhada), a luz emitida pela amostra passa por um monocromador de emissão e então é detectada por uma fotomultiplicadora.

Com esta mesma montagem experimental podemos estudar quais os comprimentos de onda são capazes de excitar a amostra. Isso é feito se fixando o monocromador de emissão em um determinado comprimento de onda e fazendo uma varredura dos comprimentos de onda de excitação, verificando a intensidade da luz emitida para cada comprimento de onda de excitação.

Um esquema do equipamento está apresentado na Figura 20.

Figura 20. Esquema de montagem de um fluorímetro estático.

No esquema da Figura 20 os números correspondem a: 1) fonte de luz; 2) e 4) monocromadores de excitação e emissão, respectivamente; 3) amostra; 5) registrador e 6) computador.

Os estados excitados, em sistemas líquidos, geralmente têm tempos de vida muito curtos (de 10^{-3} a 10^{-12} s). Isso dificulta o estudo através das técnicas estáticas convencionais. Por isso, para medir os tempos de vida dos estados excitados estão utilizadas as técnicas de pulso curto: fluorímetros com a resolução temporal e *flash*-fotólise. O princípio dessas técnicas é a excitação da amostra através de um pulso curto de luz e, após o término desse pulso, registrar as mudanças da população dos estados excitados, que foram induzidos pelo pulso, através das mudanças da intensidade da fluorescência da amostra (fluorímetro) ou da sua absorção óptica (*flash*-fotólise).

A técnica de fluorescência com resolução temporal é realizada da seguinte forma: um pulso de luz bastante curto ($< 10^{-9}$ s) é usado na excitação da amostra. O pulso cria uma população N_0 no estado excitado. Essa população voltará ao seu estado fundamental através dos diversos caminhos anteriormente mencionados. Pode-se equacionar isso utilizando as constantes de cada tipo de decaimento, a saber: não radiativo (k_{nr}) e radiativo (k_r). A equação será:

$$\frac{dN}{dt} = -(k_r + k_{nr})N \quad (17)$$

Assumindo como condição inicial que em $t = 0$ a população do estado excitado é $N = N_0$ e em $t = \infty$ é $N = 0$, a população do estado excitado em t será dada por:

$$N = N_0 e^{\frac{-t}{\tau}} \quad (18)$$

$$\tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}} \quad (19)$$

Onde o tempo τ é chamado de tempo de vida da fluorescência, pois fazendo a média dos tempos de vida para infinitos fluoróforos teremos os seguintes valores:

$$\bar{t} = \frac{\int_0^\infty t N dt}{\int_0^\infty N dt} = \frac{\int_0^\infty t N_0 e^{\frac{-t}{\tau}} dt}{\int_0^\infty N_0 e^{\frac{-t}{\tau}} dt} = \tau \quad (20)$$

Quando existe mais de uma espécie de fluoróforo ou mais de um meio de decaimento, podemos ter um decaimento multiexponencial. Nesse tipo de decaimento, cada tempo τ representa o decaimento da fluorescência de um fluoróforo. Nesse tipo de decaimento podemos obter o tempo médio das componentes ponderando cada tempo τ com o seu respectivo fator pré-exponencial como na equação 21.

$$\bar{\tau} = \frac{\sum_{i=1}^n A_i \tau_i}{\sum_{i=0}^n A_i} \quad (21)$$

A técnica utilizada para a realização dos experimentos foi a de contagem de fótons únicos em correlação com o tempo (em inglês, *Time-Correlated Single Photon Counting*, *TCSPC*). Nessa técnica, um pulso de luz muito curto é dividido em dois feixes: um deles irá incidir diretamente em uma fotomultiplicadora, enquanto o outro feixe incidirá na amostra excitando os fluoróforos lá presentes. O primeiro evento inicia a contagem do tempo através de uma rampa de voltagem, a qual será interrompida após a detecção de um fóton da fluorescência da amostra pela outra fotomultiplicadora. A amplitude do pulso elétrico formado é proporcional ao intervalo de tempo entre o pulso de excitação e a chegada do fóton da fluorescência. Dependendo da sua amplitude, esse pulso será registrado em um dos canais de um analisador das amplitudes [20]. Assim a cada canal atribui-se um determinado intervalo de tempo. Esse processo é repetido inúmeras vezes, formando-se um histograma, cujo perfil reflete o decaimento da fluorescência. O esquema do equipamento de *TCSPC* pode ser observado na Figura 21 [38].

Figura 21. Esquema de aparelho de “time correlated single photon counting” (TCSPC), retirado de [20].

Os experimentos que envolvam fluorescência estática tratados neste trabalho foram realizados no fluorímetro Hitachi F-7000. Os experimentos de fluorescência resolvidos no tempo foram feitos utilizando como fonte de excitação um *laser* pulsado Tsunami 3950 (*Spectra Physics*) de titânio-safira bombeado pelo *laser* de estado sólido *Millennia Xs*. Os fótons emitidos pelas amostras foram detectados pela fotomultiplicadora refrigerada *Hamamatsu C4878*.

2.2.3. Flash-Fotólise

A técnica de *flash-fotólise* consiste no estudo da absorção óptica do estado excitado em função do tempo.

Após um pulso de luz curto, o estado excitado ficará populado e tenderá a voltar ao estado fundamental. A absorção do estado excitado em determinado comprimento de onda sofrerá um decaimento, devido à queda da população desse estado. Essa mudança na absorção do estado excitado é observada utilizando uma fonte de luz branca, a qual incidirá constantemente sobre a amostra. Em seguida seleciona-se a luz transmitida pela amostra através de um monocromador e com uma fotomultiplicadora monitora-se a mudança na absorbância em função do tempo decorrido após do pulso. O esquema desse aparelho pode ser observado na Figura 22:

Figura 22. Esquema de um equipamento de flash-fotólise, retirado de [39].

A absorção do estado transiente pode ser obtida utilizando a equação 15 na forma exponencial, em que se observa a intensidade transmitida em função da absorbância. Dessa forma teremos os seguintes valores da intensidade transmitida antes e depois do pulso, respectivamente:

$$I_1 = I_0 10^{-A_1} \quad (22)$$

$$I_2 = I_0 10^{-A_2} \quad (23)$$

Onde I_0 é a intensidade incidente da lâmpada de análise, A_1 e A_2 a absorbâncias da amostra antes e após o pulso, respectivamente.

Fazendo a razão entre as intensidades I_2 e I_1 , obteremos:

$$\frac{I_2}{I_1} = 10^{A_1 - A_2} = 10^{\Delta A} \quad (24)$$

Da lei de Lambert-Beer (equação 16), podemos observar as concentrações das espécies do estado excitado:

$$\Delta A = A_1 - A_2 = (\varepsilon_1 - \varepsilon_2) C_{ex} \quad (25)$$

Onde ε_1 é o coeficiente de absorção molar do estado fundamental, ε_2 é o coeficiente de absorção molar do estado excitado e C_{ex} é a concentração do estado excitado.

O termo $(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)$ é constante, portanto ΔA tem uma dependência temporal proporcional à C_{ex} , o que faz com que possamos observar o tempo de vida e o decaimento dessa espécie.

Para este trabalho foi utilizado pulso de excitação no segundo harmônico do *laser* de Nd:Yag da *Quantel*, que possui energia de aproximadamente 50 mJ, comprimento de onda de 532 nm, duração do pulso de 5 ns e frequência de repetição dos pulsos e 10 Hz. Para a leitura foram utilizados monocromador e fotomultiplicadora da *Sciencetech*.

2.3. Metodologia experimental

Todos os experimentos foram realizados em tampão fosfato com força iônica 7,5 mM. Para variar o pH nos experimentos com TPPS₄ foram utilizadas soluções de NaOH (hidróxido de sódio) e HCl (ácido clorídrico). Os experimentos com TMPyP foram realizados em pH 6,8.

Os principais experimentos deste trabalho foram os associados com o estudo da interação das porfirinas com os PQ em função da carga da porfirina e efeito dessa interação no processo da sua fotólise.

2.3.1. Experimentos de fotólise

Para ambas as porfirinas foram feitos experimentos na presença e ausência do PQ de CdTe-MPA. Com a porfirina TMPyP também foram estudados os efeitos de fotólise na ausência e presença de Oxigênio molecular.

A irradiação foi feita utilizando uma lâmpada de Xenônio de alta pressão com potência (71 ± 2) W posicionada a uma distância de ($22,3 \pm 0,1$) cm da cubeta contendo a amostra. Em frente à lâmpada foi utilizado um filtro passa alta e em frente à amostra foi colocada uma cubeta com água, a fim de evitar efeitos térmicos na amostra, causados por radiação infravermelha. Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de (24 ± 1)° C.

O espectro de emissão da lâmpada normalizado juntamente com o filtro e os espectros de absorção óptica normalizados dos compostos estudados estão apresentados na Figura 23.

Figura 23. Espectros normalizados de absorção óptica de TMPyP (preto), TPPS₄ em pH 4,0 (azul), TPPS₄ em pH 7,0 (lilás), PQ de CdTe-MPA (verde) e espectro de emissão normalizado da lâmpada acoplada com um filtro (vermelho).

Nos experimentos que envolviam a retirada de O₂ das amostras, foi utilizada uma cubeta em forma de “garrafa”, onde o O₂ presente na amostra era retirado borbulhando-se o gás N₂ na cubeta. O tempo de retirada do O₂ foi de aproximadamente 15 min.

Após intervalos de tempo determinados de irradiação eram obtidos espectros de absorção óptica e fluorescência. Posteriormente, os dados obtidos foram analisados com o uso do software de análises gráficas Origin[®], da Microcal.

2.3.2. Estudos dos efeitos de carga

O PQ de CdTe-MPA possui carga residual negativa, isso já foi demonstrado em trabalhos anteriores, o qual apresentou potencial zeta negativo, no valor de $\zeta = (-30,8 \pm 2,2)$ mV [19]. A porfirina TMPyP possui carga positiva +4 e a porfirina TPPS₄ possui carga líquida -4 em pH 7,0 e -2 em pH 4,0 [16,18].

Primeiramente, fixou-se a concentração da porfirina em uma das condições indicadas anteriormente e foram adicionadas alíquotas de PQ na solução, sempre monitorando as mudanças por meio dos espectros de absorção e de fluorescência.

O mesmo procedimento foi realizado fixando-se a concentração do PQ e adicionando porfirina.

Estes experimentos foram realizados para os pares TMPyP/CdTe-MPA e TPPS₄/ CdTe-MPA em pH 4,0 e 7,0.

Na análise do experimento foram observados os espectros, fazendo-se a comparação entre os perfis e a intensidade de fluorescência e de absorção em função da quantidade de PQ adicionado.

Por fim foi realizado o estudo da cinética de decaimento através da flash-fotólise do estado tripleto da TPPS₄ em pH 4,0 na ausência de O₂. O objetivo da retirada do O₂ foi evitar a supressão do estado excitado tripleto da porfirina, aumentando consideravelmente seu tempo de vida. Com a solução de TPPS₄ desoxigenada foram adicionadas alíquotas de PQ, através de micro seringas, e realizadas as medidas das cinéticas de decaimento do estado tripleto acompanhado por medidas dos espectros de absorção.

2.3.3. Estudos dos efeitos da interação Porfirina-PQ na intensidade e no tempo de vida da fluorescência

Os experimentos foram feitos com as duas porfirinas (TMPyP e TPPS₄) e o PQ de CdTe-MPA, sendo a porfirina TPPS₄ em pH 4,0 e 7,0. Foi estudada a influência da interação na fluorescência, tanto das porfirinas, como do PQ. No primeiro caso, com uma concentração definida de porfirina, adicionava-se alíquotas de PQ e monitorava-se os espectros e os tempos de vida de fluorescência. Esse procedimento foi repetido fixando-se a concentração de PQ e adicionando porfirina à solução de PQ.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Sistema PQ + TMPyP

3.1.1. Efeitos da interação entre TMPyP e CdTe-MPA

Em uma cubeta contendo solução de TMPyP eram adicionadas alíquotas do PQ de CdTe-MPA e posteriormente monitorados os espectros de absorção e fluorescência, conforme descrito anteriormente. A alta absorção do PQ dificulta a análise dos espectros de absorção da porfirina. Para facilitar essa análise, foram subtraídos os espectros do PQ correspondente à concentração da amostra estudada até então. A subtração foi feita usando o espectro de PQ na ausência da porfirina como linha base (Figura 24).

Figura 24. Espectros de absorção da TMPyP com PQ (preto), do PQ (vermelho) puro e da TMPyP com o PQ após correção usando o espectro do PQ como a linha base (azul).

Os espectros de absorção óptica corrigidos e os de fluorescência estão mostrados na Figura 25.

Figura 25. Espectros de absorção óptica (a) e de fluorescência (excitando em 420nm) (b) de 2,9 μM de TMPyP com a adição de CdTe.

Nos espectros de absorção, observa-se queda da banda de Soret, localizada em $\lambda = 420 \text{ nm}$, e o surgimento de um novo pico em $\lambda = 450 \text{ nm}$. Nos espectros de fluorescência observam-se a queda da intensidade da fluorescência da porfirina, em $\lambda = 653 \text{ nm}$, e a formação de uma nova banda com máximo em $\lambda = 532 \text{ nm}$. Além disso, nos espectros de absorção é perceptível um ponto isobéstico próximo ao comprimento de onda $\lambda = 435 \text{ nm}$. Como subtraímos o espectro do PQ dos espectros de absorção, esses resultados indicam a presença de duas espécies na solução: a porfirina livre e o complexo PQ-porfirina, cujo conteúdo relativo depende da concentração do PQ. Resultado semelhante foi observado em trabalho de tese de doutorado do Gustavo Gimenez Parra do grupo de fotobiofísica apresentada em 2015 [19].

Considerando o equilíbrio entre as espécies:

foram realizados cálculos da constante de ligação K da TMPyP com o PQ de CdTe-MPA:

$$K = \frac{[\text{complexo}]}{[\text{PQ}][\text{TMPyP}]} \quad (27)$$

A absorção óptica observada na Figura 25a, não leva em conta a absorbância do PQ, a qual foi utilizada como linha base. Assumindo, para efeitos de cálculo, que a absorbância no

comprimento de onda λ é correspondente a soma das absorbâncias da TMPyP e do complexo TMPyP-PQ, sendo então:

$$A = A_{TMPyP} + A_{complexo} = \varepsilon_{TMPyP}[TMPyP] + \varepsilon_{complexo}[complexo] \quad (28)$$

Assumindo ainda que a concentração do complexo aumenta consumindo a porfirina e o PQ, podemos relacionar:

$$[complexo] = [TMPyP]_0 - [TMPyP] = [PQ]_0 - [PQ] \quad (29)$$

dessa forma, substituindo a primeira igualdade da equação (28) na equação (29) temos que:

$$\begin{aligned} A &= \varepsilon_{TMPyP}[TMPyP] + \varepsilon_{complexo}([TMPyP]_0 - [TMPyP]) \\ &= \varepsilon_{complexo}[TMPyP]_0 + (\varepsilon_{TMPyP} - \varepsilon_{complexo})[TMPyP] \end{aligned} \quad (30)$$

chamando $A_\infty = \varepsilon_{complexo}[TMPyP]_0$ e $A_0 = \varepsilon_{TMPyP}[TMPyP]_0$ e ajustando a equação (30), teremos finalmente:

$$\left(\frac{A - A_0}{A_\infty - A_0} \right) \frac{[TMPyP]_0}{[PQ]_0} = \frac{1}{k} \left[\left(\frac{A_0 - A}{A_\infty - A_0} \right) \frac{1}{[PQ]_0} \right] - 1 \quad (31)$$

onde o termo A_∞ é a absorbância da solução após a saturação da formação de complexo; A_0 é a absorbância da TMPyP sem PQ e A a absorbância do complexo.

Com a equação 31, foi possível ajustar com uma reta as concentrações iniciais de PQ e TMPyP e a absorção óptica, calculando a constante de formação de complexo.

Figura 26. Ajuste dos dados experimentais de absorção óptica da solução de PQ com TMPyP de acordo com a equação 31.

Esse ajuste foi feito para três concentrações iniciais da porfirina TMPyP, para cada porfirina foi calculado o valor da constante de formação de complexo K, os quais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Valores calculados para a constante K de formação de complexo PQ+TMPYP.

Concentração inicial de TMPyP (μM)	0,6	1,6	4,4
Constant calculada K ($\times 10^6 \text{M}^{-1}$)	$6,8 \pm 1,8$	$4,8 \pm 0,5$	$7,8 \pm 3,2$

Observa-se que os dados obtidos estão em torno de um valor médio de $K = (6,5 \pm 1,5) \times 10^6 \text{M}^{-1}$.

A constante de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da TMPyP pelo PQ de CdTe-MPA (K_{SV}) foi calculada de acordo com a equação 32 [20]:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (32)$$

em que I_0 e I são intensidades integrais da fluorescência da porfirina na ausência do PQ e na sua presença em concentração $[Q]$, respectivamente.

O valor obtido para a constante de supressão é próximo do observado com os dados de absorção, sendo observados os seguintes valores: $K_{SV} = (5,9 \pm 0,5) \times 10^6 M^{-1}$ (Figura 27).

Figura 27. *Ajuste da fluorescência da TMPyP com adição de PQ em acordo com a equação de Stern-Volmer.*

O valor da constante de formação de complexo calculado é bastante razoável devido à forte interação entre a porfirina catiônica TMPyP e o PQ de CdTe-MPA. O agente encapsulador MPA tem caráter aniônico, portanto existe uma forte interação eletrostática entre essas duas espécies. Os dados do trabalho [41] confirmam a forte interação e consequente transferência de carga entre a porfirina carregada positivamente TMPyP e o PQ de CdTe com o agente encapsulador negativo TGA (ácido tioglicólico). Dessa forma, associamos que há uma formação de complexo, com pico de absorção óptica em $\lambda = 450$ nm e de fluorescência em $\lambda = 532$ nm, com transferência de carga entre TMPyP e PQ.

Também foram estudados os efeitos da adição de TMPyP nos espectros de absorção óptica, de fluorescência e nos tempos de vida da fluorescência de PQ.

Os espectros de absorção mostram a formação de um complexo, com máximo em $\lambda = 450$ nm, que foi observado na adição do PQ à solução de porfirina (Figura 28a). Paralelamente foi observada a queda de intensidade da fluorescência do ponto quântico com a mudança do perfil do espectro (Figura 28b). Isso confirma a formação do complexo entre PQ e porfirina.

Figura 28. Espectros de absorção óptica (a) e de fluorescência (b) do PQ de CdTe-MPA com a adição de TMPyP.

Os dados do monitoramento do decaimento da fluorescência do PQ com adição da TMPyP e de TMPyP com adição de PQ estão mostrados na Figura 29a e 29b, respectivamente.

Figura 29. Curvas de decaimento da fluorescência do PQ com adição de TMPyP (a) e da TMPyP com adição de PQ (b).

A análise mostrou que a cinética de decaimento da fluorescência do PQ se ajusta à função biexponencial:

$$I(t) = I_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + I_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} \quad (33)$$

com tempos de vida das componentes de $\tau_1 = (28,4 \pm 0,4)$ ns e $\tau_2 = (4,5 \pm 0,4)$ ns. Notadamente, praticamente não há alterações no perfil de decaimento do CdTe-MPA, mostrando que o conteúdo das componentes (fatores pré-exponenciais) fica inalterado (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado dos ajustes dos decaimentos da fluorescência do PQ com adição de TMPyP.

[TMPyP] (μ M)	I_1	τ_1 (ns)	I_2	τ_2 (ns)	R^2
0,0	$0,643 \pm 0,002$	$28,4 \pm 0,2$	$0,292 \pm 0,002$	$5,1 \pm 0,1$	0,9991
0,1	$0,640 \pm 0,002$	$28,2 \pm 0,2$	$0,300 \pm 0,002$	$4,5 \pm 0,1$	0,9987
0,2	$0,625 \pm 0,002$	$28,5 \pm 0,2$	$0,296 \pm 0,002$	$4,6 \pm 0,1$	0,9986
0,3	$0,614 \pm 0,002$	$28,6 \pm 0,2$	$0,289 \pm 0,002$	$4,5 \pm 0,1$	0,9985
0,4	$0,606 \pm 0,002$	$27,7 \pm 0,2$	$0,269 \pm 0,002$	$4,1 \pm 0,1$	0,9984
0,5	$0,557 \pm 0,001$	$28,7 \pm 0,1$	$0,252 \pm 0,002$	$4,0 \pm 0,1$	0,9984

Conseguimos ajustar as cinéticas de decaimento da fluorescência da TMPyP na presença de PQ (Figura 29b) apenas com a função triexponencial:

$$I(t) = I_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + I_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + I_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}} \quad (34)$$

Os tempos de vida das componentes $\tau_1 = (5,3 \pm 0,2)$ ns, $\tau_2 = (1,6 \pm 0,2)$ ns e $\tau_3 = (0,16 \pm 0,07)$ ns não se alteram (Tabela 3). Entretanto, as contribuições das componentes mudam com o aumento da concentração do PQ (Tabela 3). Na ausência do PQ, somente uma componente está presente, com tempo de vida τ_1 . Este tempo de vida é característico para o tempo de vida da fluorescência da TMPyP pura [42]. Por isso associamos esta componente com a porfirina livre. A contribuição dessa componente foi calculada como: $R_1 = \frac{I_1}{I_1 + I_2 + I_3}$. Essa razão cai com o aumento da concentração do PQ (Figura 30a). A terceira componente tem o tempo de vida τ_3 extremamente curto, próximo da duração do pulso de excitação, por isso associamos essa componente com a luz espalhada. A contribuição dessa componente, dada como $R_3 = \frac{I_3}{I_1 + I_2 + I_3}$, aumenta com o aumento da concentração do PQ. Devido à supressão observada em experimentos no estático, associamos esse aumento à diminuição da intensidade da fluorescência em relação à intensidade da luz espalhada.

A contribuição da componente do tempo de vida τ_2 , $R_2 = \frac{I_2}{I_1+I_2+I_3}$, cai lentamente com o aumento da concentração do PQ. Entretanto, sua contribuição relativa à primeira componente, calculada como $R_{21} = \frac{I_2}{I_1+I_2}$, aumenta com maior concentração de PQ e a contribuição da primeira componente, $R_{12} = \frac{I_1}{I_1+I_2}$, cai em relação da segunda (Figura 30b). Associamos essa componente I_2 com a fluorescência do complexo TMPyP-PQ. Essa hipótese está em concordância com os dados obtidos pelo Gustavo Gimenez Parra [19], que observou a formação do estado tripleto do complexo TMPyP-PQ.

O tempo de vida da fluorescência do complexo é mais curto que os tempos da porfirina e do PQ, esse tempo apresentado pelo estado tripleto do complexo é mais curto em comparação com o tempo de vida do estado excitado da porfirina ou do PQ.

Tabela 3. Resultado dos ajustes dos decaimentos da fluorescência da TMPyP com adição de PQ.

[PQ] (nM)	I_1	τ_1 (ns)	I_2	τ_2 (ns)	I_3	τ_3 (ns)	R^2
0	$0,913 \pm 0,001$	$4,81 \pm 0,01$	-	-	-	-	0,9969
19	$0,549 \pm 0,005$	$5,34 \pm 0,03$	$0,322 \pm 0,004$	$1,50 \pm 0,03$	$0,3 \pm 0,1$	$0,06 \pm 0,01$	0,9949
45	$0,412 \pm 0,006$	$5,28 \pm 0,04$	$0,350 \pm 0,004$	$1,45 \pm 0,03$	$0,206 \pm 0,004$	$0,13 \pm 0,01$	0,9988
68	$0,249 \pm 0,012$	$5,42 \pm 0,15$	$0,34 \pm 0,01$	$1,60 \pm 0,07$	$0,329 \pm 0,006$	$0,20 \pm 0,01$	0,9971
90	$0,163 \pm 0,004$	$5,15 \pm 0,08$	$0,369 \pm 0,003$	$1,32 \pm 0,02$	$0,417 \pm 0,021$	$0,13 \pm 0,01$	0,9987
130	$0,036 \pm 0,004$	$5,50 \pm 0,01$	$0,259 \pm 0,006$	$1,73 \pm 0,07$	$0,496 \pm 0,009$	$0,27 \pm 0,01$	0,9778
170	$0,012 \pm 0,002$	$5,50 \pm 0,01$	$0,162 \pm 0,004$	$1,70 \pm 0,01$	$0,648 \pm 0,007$	$0,20 \pm 0,01$	0,9746

Figura 30. Relação entre os fatores pré-exponenciais R_1 , R_2 e R_3 (a) e relação entre as componentes 1 e 2 R_{12} e R_{21} (b) em função da concentração do PQ.

A queda da intensidade da fluorescência do PQ, observada em experimentos estáticos, é relacionada à supressão estática da fluorescência causada pela formação do complexo entre a porfirina e o PQ. A constante de supressão foi calculada fazendo a razão entre a intensidade da fluorescência do PQ (I_0) na ausência da porfirina e do PQ (I) em função da concentração da porfirina e aplicando a equação de Stern-Volmer para supressão (equação 32) [20]. Entretanto, o gráfico da relação entre $\frac{I_0}{I}$ e $[Q]$ (Figura 31) não ficou linear conforme esperado pela equação 32.

Figura 31. Gráfico da razão entre a intensidade de fluorescência inicial do PQ e a intensidade conforme se adiciona TMPyP em função da concentração da porfirina.

Essa relação pode ser associada com a existência de dois tipos de supressão: estática e dinâmica [20,22]. Porém, não foram observadas mudanças no tempo de vida da fluorescência do PQ com a adição do supressor (TMPyP), o que descarta a hipótese de que há supressão dinâmica envolvida no processo.

Foi feito o ajuste utilizando a equação de Stern-Volmer modificada:

$$\frac{I_0}{(I_0 - I)} = \frac{1}{f} + \frac{1}{K_{SV}[Q]} \quad (35)$$

onde f é a fração acessível do PQ ao supressor e K_{SV} é a constante de supressão de Stern-Volmer. O ajuste dos dados do experimento de fluorescência no estado estático com a equação 35 está demonstrado na Figura 32.

Figura 32. Gráfico da razão entre a intensidade de fluorescência pelo inverso da concentração de TMPyP com ajuste usando equação de Stern-Volmer modificada.

Os valores fornecidos pelos ajustes foram: $f = 1,17 \pm 0,05$ e $K_{SV} = (5,0 \pm 0,3) \times 10^6 M^{-1}$.

Geralmente o fator f varia entre 0 e 1, todavia quando esse valor é maior que um ($f > 1$) significa que o supressor pode suprimir mais de um fluoróforo simultaneamente [43]. Esse resultado corrobora com os observados em [27], que associam essa possibilidade com a formação de complexos tipo uma rede, que inclui vários PQs e várias moléculas de supressor (Figura 33).

Figura 33. Esquema do complexo do tipo rede formado entre TMPyP e CdTe-MPA, retirado de [19].

3.1.2. Estudo da fotólise

Para calcularmos as características temporais de fotólise, tais como: velocidade V , constante da velocidade de fotólise k e o tempo de fotólise τ , basta derivar a concentração do composto $[C]$ em função do tempo de irradiação.

$$V = \frac{d[C]}{dt} = -\frac{[C]_0}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (36)$$

sendo então a velocidade inicial V_0 igual a

$$V_0 = \frac{[C]_0}{\tau} \quad (37)$$

$$\frac{V_0}{[C]_0} = \frac{1}{\tau} = k \quad (38)$$

onde $[C]_0$ é a concentração inicial do composto [24].

A concentração é diretamente proporcional à absorção óptica pela lei de Lambert-Beer equação 16, podendo então os tempos e as constantes características da fotólise serem calculadas diretamente pelo decaimento da absorbância.

Usando esse mesmo raciocínio, caso existam dois processos paralelos de fotólise, a cinética de fototransformação deve possuir caráter biexponencial, com dois tempos característicos τ_1 e τ_2 .

Nesse estudo foram realizadas avaliações da fotólise da porfirina TMPyP e do sistema TMPyP + CdTe-MPA, também foi estudado a influência do O_2 nos tempos de fototransformação.

Os experimentos foram feitos para três concentrações diferentes de TMPyP (0,9 μM , 2,7 μM e 4,4 μM).

A TMPyP pura apresentou os seguintes resultados de fotólise (Figura 34):

Figura 34. Espectros de absorção óptica (a) e da absorbância em $\lambda = 422 \text{ nm}$ (b) da TMPyP na presença de O_2 em função do tempo da irradiação.

Procedimento semelhante foi realizado na ausência de O_2 (Figura 35).

Figura 35. Espectros de absorção óptica (a) e de absorbância em $\lambda = 422$ nm (b) da TMPyP na ausência de O_2 em função do tempo de irradiação.

Para o estudo do sistema PQ-TMPyP foi CdTe-MPA até a total formação do complexo, que foi monitorado pela banda de absorção óptica em $\lambda = 450$ nm, relacionada ao complexo PQ-TMPyP, observada anteriormente na Figura 25.

Figura 36. Espectros de absorção óptica (a), de absorbância em $\lambda = 450 \text{ nm}$ (b), de fluorescência (c) e da intensidade integral da fluorescência em função do tempo de irradiação (d) da TMPyP na presença do PQ em função do tempo de irradiação na presença de O_2 .

Na ausência de O_2 , foram obtidos os seguintes resultados:

Figura 37. Espectros de absorção óptica (a), de absorbância em $\lambda = 450$ nm (b), de fluorescência (c) e da intensidade integral da fluorescência (d) da TMPyP na presença de PQ em função do tempo de irradiação na ausência de O_2 .

As curvas de absorbância mostraram caráter monoexponencial, contando com apenas um tempo de fotólise (τ_1), ou biexponencial, contando com dois tempos de fotólise característicos (τ_1 e τ_2). A absorbância final da solução tende a um valor ao ser irradiado por um longo tempo (A_∞).

A intensidade da fluorescência do sistema está crescendo com aumento do tempo de radiação. Associamos esse efeito com a diminuição da supressão da fluorescência devido a diminuição da concentração dos componentes durante a fotólise.

Os tempos de fotólise e seus respectivos fatores pré-exponenciais (A_i) estão demonstrados para todas as concentrações na Tabela 4.

Tabela 4. *Tempos característicos de fotólise de TMPyP e do sistema TMPyP + CaTe-MPA e os fatores pré-exponenciais ajustados na presença e na ausência de O₂.*

		[TMPyP] (μM)	A_{∞}	A_1	τ_1 (min)	A_2	τ_2 (min)	R^2
TMPyP	Presença O ₂	4,4	-	-	-	-	-	-
		2,7	$0,45 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,02$	300 ± 90	-	-	0,9876
		0,9	$0,03 \pm 0,01$	$0,15 \pm 0,01$	550 ± 20	-	-	0,9987
	Ausência O ₂	4,4	$0,64 \pm 0,03$	$0,51 \pm 0,03$	1500 ± 150	-	-	0,9980
		2,7	$0,34 \pm 0,14$	$0,34 \pm 0,14$	1300 ± 700	-	-	0,9940
		0,9	$0,02 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$	750 ± 100	-	-	0,9940
TMPyP + PQ	Presença O ₂	4,4	$0,04 \pm 0,01$	$0,30 \pm 0,02$	30 ± 3	$0,15 \pm 0,02$	$6,0 \pm 1,0$	0,9993
		2,7	$0,03 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	37 ± 3	$0,16 \pm 0,01$	$6,0 \pm 1,0$	0,9994
		0,9	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,01$	145 ± 200	$0,10 \pm 0,01$	$15,0 \pm 1,0$	0,9971
	Ausência O ₂	4,4	$0,20 \pm 0,10$	$0,72 \pm 0,08$	400 ± 70	-	-	0,9975
		2,7	$0,04 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,06$	250 ± 90	-	-	0,9721
		0,9	$0,02 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$	100 ± 10	-	-	0,9863

Através da Tabela 4, pode-se perceber que a TMPyP pura apresenta as curvas de fotólise monoexponenciais. Os tempos de fotólise na presença do O₂ são mais curtos. Os tempos de fototransformação da porfirina tanto na presença, como na ausência do O₂, não mostram dependência com a concentração inicial de porfirina.

Para o sistema TMPyP + PQ os tempos de fotólise são muito mais curtos em comparação à TMPyP pura, tanto na presença, quanto na ausência do O₂. Semelhante à fotólise da porfirina pura, a presença do O₂ diminui o tempo de fotólise do sistema TMPyP + PQ. Além disso, na presença do O₂ a fotólise do sistema TMPyP + PQ possui caráter biexponencial, sendo que a segunda componente, cuja contribuição aumenta com a diminuição da concentração da TMPyP, possui o

tempo muito mais curto do que a primeira componente. Na ausência do O_2 os tempos de fotólise diminuem com a diminuição da concentração de TMPyP.

Pode-se concluir que a formação do complexo de transferência de carga torna a fotodegradação da TMPyP mais eficiente, diminuindo os tempos de fotólise. A diminuição dos tempos de fotólise na presença do O_2 pode ser associada com a formação de oxigênio singlete, devido a transferência da energia da molécula de TMPyP no seu estado excitado tripleto para o O_2 (no estado fundamental tripleto), semelhante observado em [44]. O oxigênio singlete pode atacar as ligações duplas de TMPyP, quebrando o sistema da conjugação π . Como foi mostrado em [19], o complexo TMPyP + PQ também forma estado excitado de caráter tripleto, que pode formar oxigênio singlete. Esse último, por sua vez, pode atacar tanto ligações duplas do TMPyP, quanto do grupo MPA do PQ. Isso determina o caráter biexponencial da fotólise do sistema TMPyP + QD na presença do O_2 .

Entretanto, a fototransformação tanto da TMPyP pura como da TMPyP + PQ na ausência de O_2 mostra que deve existir outro mecanismo de fototransformação.

3.2. Sistema PQ + TPPS₄

3.2.1. Estudos dos efeitos de pH

Os mesmos procedimentos experimentais utilizados no estudo dos efeitos de carga anteriormente utilizados foram agora aplicados ao sistema TPPS₄ + CdTe-MPA em dois pHs distintos: 7,0 e 4,0.

Em pH 7,0, a TPPS₄ se encontra na forma desprotonada, caracterizada pelo pico de Soret com absorção óptica em $\lambda = 413$ nm; uma sequência de quatro picos de absorção na região das bandas Q, cuja intensidade diminui com o aumento do comprimento de onda (Figura 38a); e da fluorescência, com máximo em $\lambda = 640$ nm (Figura 38b).

A adição do PQ na solução de TPPS₄ em pH 7,0 não causa alterações no espectro de absorção óptica (Figura 38a).

A fluorescência da solução TPPS₄ + PQ sofre um aumento, atribuído à fluorescência do PQ, que tem pico em $\lambda = 550$ nm (Figura 38b), pois a fluorescência da porfirina permaneceu sem alterações significativas. Isto foi confirmado pelo espectro de excitação do sistema em análise (Figura 39).

Figura 38. a) Espectros de absorção óptica da TPPS₄ em pH 7,0 e b) Espectros de fluorescência da solução de TPPS₄+PQ em pH 7,0 com a excitação em $\lambda = 410$ nm ambos em função da concentração do PQ.

Figura 39. Espectros de excitação da solução TPPS₄+PQ com emissão em $\lambda = 650$ nm em função da concentração do PQ.

Fica claro que a contribuição do PQ de CdTe-MPA na fluorescência da amostra aumenta consideravelmente com o aumento de sua concentração.

Observando os espectros de absorção óptica e de fluorescência do sistema TPPS₄ + PQ em pH 4 (Figura 40) nota-se uma clara mudança nos espectros de absorção óptica e de fluorescência.

Figura 40. Espectros de absorbância da TPPS₄ com pH 4,0 com adição de PQ (a) e espectros de fluorescência da porfirina com a adição de PQ excitando em $\lambda = 420$ nm(b).

O espectro de absorção da TPPS₄ em pH 4,0, onde a porfirina é biprotonada, está caracterizado pelo pico de Soret em 435 nm e também pelos quatro picos de absorção na região das bandas Q, os quais a intensidade cresce com o aumento do comprimento de onda (Figura 40a). O pico de fluorescência da TPPS₄ na forma biprotonada está localizado em $\lambda = 665$ nm.

Quando se adicionou o PQ de CdTe-MPA à solução de TPPS₄ em pH 4,0, a banda de Soret teve seu pico deslocado de 435 nm para 415 nm. Esse novo comprimento de onda coincide com o pico de absorção da TPPS₄ na sua forma desprotonada, sendo igual ao pico observado no experimento com pH 7,0 (Figura 38a). As bandas Q também se modificaram neste sentido, passando a assumir o mesmo espectro de absorção observado no pH 7,0 (Figura 38a).

A intensidade de fluorescência da TPPS₄ caiu com a adição do PQ e o seu pico foi deslocado para comprimentos de onda menores, passando de 665 para 640 nm.

Observando o deslocamento do pico de emissão da TPPS₄ em pH 4,0 em relação ao pico observado no espectro de fluorescência emitido pela TPPS₄ em pH 7,0 (Figura 38a), nota-se que são exatamente os mesmos picos.

Os dados apresentados indicam que em pH 4,0 ocorre a transferência dos prótons de moléculas protonadas da TPPS₄2H⁺ para CdTe-MPA, induzindo a desprotonação da molécula da porfirina de TPPS₄.

A constante de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da porfirina TPPS₄ por PQ em pH 4,0 (Figura 41) foi $K_{SV} = (2,4 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Figura 41. Ajuste da fluorescência da TPPS₄ + PQ em pH 4,0 em acordo com a equação de Stern-Volmer.

No estudo da influência das porfirinas na intensidade de fluorescência do PQ, foram observados os seguintes resultados:

Figura 42. Espectros de fluorescência de: PQ em pH 4,0 (a) e em pH 7,0 (b), excitando em $\lambda = 350$ nm, em função da concentração da TPPS₄.

Da Figura 42, observa-se que a fluorescência do PQ diminui em ambos os pHs, sendo que no pH 4,0 essa intensidade diminui de maneira mais efetiva.

A análise dos dados com a finalidade de obter a constante de Stern-Volmer da supressão da fluorescência do CdTe-MPA com TPPS₄ (Figura 43) não foi satisfatória.

Figura 43. Razão entre a intensidade de fluorescência do PQ puro e do PQ + TPPS₄ em pH 4,0 (a) e pH 7,0 (b) em função da concentração da TPPS₄.

Ao utilizar a equação de Stern-Volmer modificada (equação 35) foram obtidos resultados com dependências lineares (Figura 44), os valores de K_{SV} e de f estão mostrados na Tabela 5.

Figura 44. Ajuste da fluorescência do PQ de CdTe-MPA em função da concentração da TPPS₄, em pH 4,0 (a) e em pH 7,0 (b) em acordo com a equação de Stern-Volmer modificada.

Com o ajuste das curvas da Figura 44 foi possível calcular o valor das constantes de supressão e dos fatores de acessibilidade para cada caso.

O fator de acessibilidade f e a constante de supressão K_{SV} são:

Tabela 5. Fatores de acessibilidade e constantes de supressão da fluorescência do CdTE-MPA pela porfirina TPPS₄ em pH 7,0 e 4,0.

pH	f	$K_{SV} (\times 10^6 M^{-1})$
7,0	$0,37 \pm 0,03$	$2,5 \pm 0,1$
4,0	$0,75 \pm 0,01$	$6,1 \pm 0,2$

Percebe-se que independentemente da ausência de mudanças significativas nos espectros de absorção e de fluorescência da porfirina em pH 7,0, existe interação entre PQ e a porfirina neste pH, porém em pH 4,0 a constante de supressão e o fator de acessibilidade são maiores do que em pH 7,0.

A discrepância entre os fatores de acessibilidade f e as constantes K_{SV} da TPPS₄ em diferentes pHs é devida, principalmente, a diferença do estado de carga da porfirina, que em pH 7,0 possui carga líquida -4 e em pH 4,0 tem carga -2.

A protonação diminui a repulsão eletrostática entre porfirina e o PQ — que tem carga negativa. A diminuição pela metade da carga negativa da porfirina diminui pela metade força de repulsão eletrostática, dobrando a constante de supressão e do fator de acessibilidade.

Também foram monitorados os tempos de decaimento da fluorescência da TPPS₄ com a adição de PQ e do PQ com a adição da TPPS₄ em ambos os pHs.

Figura 45. *Curvas de decaimento de fluorescência do PQ com adição de TPPS₄ em pH 4,0 excitando em $\lambda = 350$ nm (a) e em pH 7,0 excitando em $\lambda = 350$ nm (b); TPPS₄ com adição de PQ em pH 4,0 excitando em $\lambda = 420$ nm (c) e em pH 7,0 excitando em $\lambda = 415$ nm (d).*

Os tempos médios e os fatores pré-exponenciais obtidos por meio dos ajustes exponenciais estão demonstrados a seguir.

No caso da supressão da fluorescência do PQ pela TPPS₄ em pH 4,0, as curvas de decaimento foram ajustadas pela função triexponencial (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado dos ajustes dos decaimentos de fluorescência do PQ com adição de TPPS₄ em pH 4,0.

[TPPS ₄] (μM)	I_1	τ_1 (ns)	I_2	τ_2 (ns)	I_3	τ_3 (ns)	R^2
0	$0,133 \pm 0,001$	$29,6 \pm 0,2$	$0,159 \pm 0,001$	$4,0 \pm 0,1$	$0,663 \pm 0,001$	$0,40 \pm 0,01$	0,9979
0,2	$0,070 \pm 0,001$	$31,9 \pm 0,3$	$0,122 \pm 0,001$	$4,0 \pm 0,1$	$0,672 \pm 0,001$	$0,40 \pm 0,01$	0,9975
0,4	$0,044 \pm 0,001$	$30,0 \pm 0,1$	$0,098 \pm 0,001$	$4,0 \pm 0,1$	$0,754 \pm 0,001$	$0,38 \pm 0,01$	0,9969
0,8	$0,033 \pm 0,001$	$36,7 \pm 0,1$	$0,088 \pm 0,001$	$4,0 \pm 0,1$	$0,740 \pm 0,001$	$0,40 \pm 0,01$	0,9974
1,2	$0,027 \pm 0,001$	$30,0 \pm 0,1$	$0,073 \pm 0,001$	$4,0 \pm 0,1$	$0,764 \pm 0,001$	$0,40 \pm 0,01$	0,9954
2,0	$0,021 \pm 0,001$	$35,0 \pm 0,1$	$0,076 \pm 0,001$	$4,0 \pm 0,1$	$0,760 \pm 0,001$	$0,40 \pm 0,01$	0,9975

Observou-se que os tempos de decaimento em si não sofreram mudanças significativas, apresentando apenas mudanças nos fatores pré-exponenciais.

A contribuição do tempo mais curto (τ_3) aumentou, enquanto as contribuições relativas aos componentes de tempos mais longos (τ_1 e τ_2) diminuíram. Os tempos τ_1 e τ_2 são bem próximos dos tempos de decaimento da fluorescência do PQ puro, e por isso podem ser associados aos PQs. O tempo τ_3 é da ordem do tempo característico do pulso utilizado na excitação. Por esta razão foi associado esse tempo com o decaimento da luz espalhada. O fato do tempo τ_3 ser maior que o pulso de excitação, pode ser devido aos problemas com o ajuste tri-exponencial em tempos curtos.

Com o aumento da concentração da TPPS₄ a intensidade da fluorescência do PQ diminuiu. Por isso a intensidade de luz espalhada aumenta em relação da intensidade da fluorescência do PQ (Figura 46a). A contribuição da componente τ_2 aumenta em relação à contribuição da componente τ_1 (Figura 46b). A teoria associa o tempo mais curto do decaimento da fluorescência ao interior do PQ, enquanto o tempo mais longo está associado com a sua superfície [34,35] Provavelmente a TPPS₄ suprime de forma mais eficientemente os centros de fluorescência da superfície do PQ e assim diminui sua contribuição na fluorescência total de PQ.

Figura 46. Relação entre os fatores pré-exponenciais R_1 , R_2 e R_3 (a) e relação entre as componentes 1 e 2 R_{12} e R_{21} (b) em função da concentração da TPPS₄ em pH 4,0.

Os tempos e os fatores pré-exponenciais do PQ com adição de TPPS₄ em pH 7,0, o qual foi feito com ajuste biexponencial estão expostos na Tabela 7.

Tabela 7. Resultado dos ajustes dos decaimentos de fluorescência do PQ com adição de TPPS₄ em pH 7,0.

[TPPS ₄] (μM)	I_1	τ_1 (ns)	I_2	τ_2 (ns)	R^2
0	$0,618 \pm 0,002$	$29,5 \pm 0,2$	$0,299 \pm 0,003$	$5,22 \pm 0,07$	0,9988
0,2	$0,610 \pm 0,002$	$29,4 \pm 0,2$	$0,293 \pm 0,002$	$5,19 \pm 0,07$	0,9988
0,4	$0,617 \pm 0,002$	$28,2 \pm 0,1$	$0,290 \pm 0,002$	$4,53 \pm 0,05$	0,9987
0,8	$0,618 \pm 0,002$	$28,8 \pm 0,1$	$0,303 \pm 0,002$	$4,81 \pm 0,06$	0,9988
1,2	$0,613 \pm 0,001$	$28,1 \pm 0,1$	$0,307 \pm 0,002$	$4,50 \pm 0,01$	0,9987
2,0	$0,601 \pm 0,002$	$29,1 \pm 0,2$	$0,304 \pm 0,002$	$5,07 \pm 0,06$	0,9987

Observando a Figura 45b e a Tabela 7, observa-se que nem os tempos de decaimento, nem os fatores pré-exponenciais das curvas de decaimento da fluorescência do PQ apresentaram mudanças na presença de TPPS₄ em pH 7,0. Esses resultados indicam que a interação do CdTe-MPA com a TPPS₄ nesse pH não influencia na cinética de decaimento da fluorescência do PQ, evidenciando que a supressão ocorre pelo mecanismo estático.

Os tempos de decaimentos e os fatores pré-exponenciais obtidos por meio do ajuste biexponencial das curvas de decaimento da fluorescência TPPS₄ na presença de PQ, em pH 4,0, estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8. Resultado dos ajustes dos decaimentos de fluorescência da TPPS₄ em pH 4,0 com adição de PQ.

[PQ] (nM)	I_1	τ_1 (ns)	I_2	τ_2 (ns)	R^2
0	$0,99 \pm 0,01$	$3,74 \pm 0,01$	-	-	0,9994
23	$0,98 \pm 0,01$	$3,73 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$11,7 \pm 0,5$	0,9995
46	$0,95 \pm 0,01$	$3,80 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$11,7 \pm 0,5$	0,9993
68	$0,94 \pm 0,01$	$3,87 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$	$11,7 \pm 0,5$	0,9991
90	$0,86 \pm 0,01$	$3,49 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$	$9,8 \pm 0,3$	0,9995
130	$0,74 \pm 0,02$	$3,37 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,02$	$9,9 \pm 0,4$	0,9993
170	$0,56 \pm 0,01$	$3,11 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,01$	$9,7 \pm 0,2$	0,9994

De acordo com a Tabela 8, é possível observar que os tempos de decaimento praticamente não mudam, constatando apenas mudança nos fatores pré-exponenciais.

O tempo τ_1 está associado com a forma biprotonada de TPPS₄. O tempo τ_2 coincide com o tempo de decaimento característico da forma desprotonada da TPPS₄ (Tabela 9). A contribuição da componente pré-exponencial de τ_1 diminui com o aumento da concentração do PQ, enquanto o tempo de decaimento τ_2 aumenta (Figura 47). Esses resultados mostram, mais uma vez, que a interação da TPPS₄ com CdTe-MPA estimula a desprotonação da porfirina.

Figura 47. Relação entre os fatores pré-exponenciais das curvas de decaimento da fluorescência da TPPS₄ em função da concentração do PQ em pH 4,0.

Os resultados dos ajustes biexponenciais da porfirina em pH 7,0 estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Resultado dos ajustes dos decaimentos da fluorescência da TPPS₄ em pH 7,0 com adição de PQ.

[PQ] (nM)	I_1	τ_1 (ns)	I_2	τ_2 (ns)	R^2
0	$0,973 \pm 0,001$	$10,1 \pm 0,1$	-	-	0,9994
23	$0,956 \pm 0,001$	$9,6 \pm 0,1$	$0,035 \pm 0,002$	$28,0 \pm 0,1$	0,9996
46	$0,921 \pm 0,001$	$9,5 \pm 0,1$	$0,055 \pm 0,001$	$28,0 \pm 0,1$	0,9995
68	$0,896 \pm 0,001$	$9,2 \pm 0,1$	$0,078 \pm 0,001$	$28,0 \pm 0,1$	0,9995
90	$0,863 \pm 0,001$	$9,0 \pm 0,1$	$0,095 \pm 0,001$	$28,0 \pm 0,1$	0,9993
130	$0,821 \pm 0,001$	$9,0 \pm 0,1$	$0,112 \pm 0,001$	$28,0 \pm 0,1$	0,9992

Os tempos de decaimento das componentes I_1 e I_2 permaneceram inalterados com a adição do CdTe-MPA.

O tempo τ_1 está associado com o decaimento da fluorescência da porfirina, enquanto o tempo τ_2 está relacionado ao decaimento da fluorescência do PQ. Observando as mudanças dos fatores pré-exponenciais, percebe-se que há uma diminuição do fator relativo ao tempo da porfirina (τ_1) e crescimento do fator atribuído ao PQ (τ_2), seguindo o aumento de concentração do último.

Com os dados expostos até agora, é perceptível que em pH 7,0 não houve nenhuma mudança na intensidade de fluorescência da porfirina com a adição do PQ de CdTe-MPA. Porém os dados obtidos com a fluorescência do PQ na presença de TPPS₄ mostram que em pH 7,0 há interação entre o PQ e a porfirina desprotonada que afeta a fluorescência do PQ sem afetar a fluorescência da TPPS₄.

Com o sistema TPPS₄-PQ em pH 4,0 foi estudado o efeito do PQ de CdTe-MPA no estado excitado tripleto da porfirina em questão. Para isso foi utilizada a técnica de *Flash*-fotólise, sendo obtidos por meio destes os decaimentos dos tempos de vida do estado tripleto da porfirina.

Figura 48. Curvas de decaimento do estado excitado tripleto da TPPS₄ em função da concentração de PQ em pH 4,0 excitando em $\lambda = 532 \text{ nm}$.

Os tempos de vida e os fatores pré-exponenciais do estado excitado estão dados na Tabela 10.

Tabela 10. ajustes das curvas de decaimento do estado excitado tripleto da porfirina TPPS₄ em pH 4,0 com adição do PQ de CdTe.

[PQ] (nM)	ΔA	$\tau(\mu s)$	R^2
0	$0,049 \pm 0,001$	$100,0 \pm 1,2$	0,9724
23	$0,055 \pm 0,001$	$90,0 \pm 1,2$	0,9681
46	$0,053 \pm 0,001$	$90,0 \pm 1,0$	0,9716
68	$0,057 \pm 0,001$	$90,0 \pm 0,9$	0,9798
90	$0,041 \pm 0,001$	$70,0 \pm 0,9$	0,9707
130	$0,061 \pm 0,001$	$90,0 \pm 0,7$	0,9828

Observa-se que a presença do CdTe-MPA não produz modificações no estado excitado tripleto da porfirina TPPS₄ em pH 4,0.

3.2.2. Estudo da Fotólise

O estudo da fotólise da TPPS₄ foi feito em pH 4,0 e 7,0, na ausência e presença de PQ. A ideia central do experimento foi observar o efeito da interação com CdTe-MPA nos tempos característicos de fotólise da TPPS₄ em função do seu estado da protonação. Os experimentos foram feitos para TPPS₄ em três concentrações: 3,0, 1,5 e 0,5 μM .

No pH 4,0 a porfirina demonstrou sofrer fotólise, conforme indica Figura 49. Nesse caso a fluorescência não sofreu qualquer mudança.

Figura 49. Espectros de absorção óptica (a) e da absorbância em $\lambda = 435 \text{ nm}$ (b) da TPPS_4 em pH 4,0 em função do tempo de irradiação.

A irradiação do sistema TPPS_4 -PQ em pH 4,0 apresentou os resultados apresentados na Figura 50:

Figura 50. Espectros de absorção óptica (a), de fluorescência (b), da absorbância em $\lambda = 413 \text{ nm}$ (c) e da intensidade integral da fluorescência em função do tempo de irradiação (d) de $3,0 \mu\text{M}$ de $\text{TPPS}_4 + \text{PQ}$ em pH 4,0 em função do tempo de irradiação.

O ajuste das curvas de fotólise apresentou caráter monoexponencial. Os tempos de fotólise ajustados e seus respectivos fatores pré-exponenciais estão demonstrados na Tabela 11:

Tabela 11. Valores dos tempos de fotólise dos ajustes da TPPS₄ na presença e na ausência de CeTd-MPA em pH 4,0.

	[TPPS ₄] (μ M)	A_{∞}	A_1	τ_1 (min)	R^2
TPPS ₄	3,0	0,60 + 0,05	0,12 + 0,04	600 + 250	0,9902
	1,5	0,41 + 0,02	0,06 + 0,02	785 + 320	0,9903
	0,5	0,17 + 0,01	0,02 + 0,01	420 + 200	0,9938
TPPS ₄ + PQ	3,0	0,16 + 0,01	0,55 + 0,01	350 + 20	0,9997
	1,5	0,16 + 0,03	0,27 + 0,03	360 + 70	0,9952

Os tempos de fotólise não apresentaram dependência com a concentração da TPPS₄, tanto na ausência como na presença de PQ. Apresentando, porém, diferença significativa entre os tempos de fotólise da TPPS₄ na presença de PQ e a porfirina pura, sendo que esses eram maiores que aqueles.

Esse resultado reforça a hipótese de que há interação entre a porfirina TPPS₄ e o PQ em pH 4,0. Essa interação pode estar ocorrendo pela transferência de prótons da TPPS₄ na sua forma protonada para o CdTe-MPA.

Para os experimentos envolvendo TPPS₄ em pH 7,0, obtivemos os seguintes resultados da fotólise:

Figura 51. Espectros de absorção óptica (a) e da absorbância em $\lambda = 413$ nm (b) da TPPS₄ em pH 7,0 em função do tempo de irradiação.

Em pH 7,0 a porfirina está sofrendo fototransformação, como pode se observar no decaimento da absorção.

No sistema TPPS₄-PQ em pH 7,0, foram obtidas as seguintes mudanças nos espectros de absorção óptica e de fluorescência:

Figura 52. Espectros de absorção óptica (a), de absorbância em $\lambda = 413$ nm (b), de fluorescência (c) e da intensidade integral da fluorescência (d) da TPPS₄ em pH 7,0 na presença de PQ em função do tempo de irradiação.

Os tempos de fotólise foram calculados com o ajuste monoexponencial do decaimento do pico de absorção da porfirina, sendo obtidos os dados da Tabela 12.

Tabela 12. Valores dos tempos de fotólise da TPPS₄ em pH 7,0.

	[TPPS ₄] (μ M)	A_{∞}	A_1	τ_1 (min)	R^2
TPPS ₄	3,0	$0,15 \pm 0,11$	$0,84 \pm 0,11$	900 ± 150	0,9992
	1,5	$0,22 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,04$	700 ± 100	0,9980
	0,5	$0,08 \pm 0,01$	$0,10 \pm 0,01$	370 ± 60	0,9949
TPPS ₄ + PQ	3,0	$-0,03 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,01$	240 ± 5	0,9999
	1,5	$0,01 \pm 0,03$	$0,59 \pm 0,03$	250 ± 20	0,9989
	0,5	$0,03 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$	250 ± 10	0,9915

Pelos dados da Tabela 12, pode-se observar que os tempos de fotólise da TPPS₄ em pH 7,0 são mais longos que em pH 4,0. Outro ponto interessante é que a presença do PQ diminui drasticamente os tempos de fotólise. Na presença do PQ, o tempo de fotólise não manteve a dependência com a concentração de porfirina.

Esses resultados corroboram com a hipótese proposta, a qual diz que no sistema TPPS₄-PQ em pH 7,0 há transferência de energia do PQ excitado para a TPPS₄ aumentando a velocidade de fotólise da porfirina.

Foi observado tanto no pH 7,0 como no pH 4,0, que na presença do PQ um aumento da intensidade da fluorescência durante a fotólise tanto do PQ, quanto da porfirina. Semelhante de sistema TMPyP+PQ isso pode ser explicado por diminuição da supressão da fluorescência de ambos devido à diminuição da supressão da fluorescência por causa de diminuição da concentração dos componentes. Entretanto, para alcançar uma explicação desse fato é necessária a realização de experimentos mais detalhados.

4. CONCLUSÕES

4.1. Conclusões do estudo da TMPyP + CdTe-MPA

Os experimentos de interação entre a TMPyP e o CdTe-MPA demonstraram que existe a formação de um complexo de transferência de carga entre porfirina e PQ. A taxa de formação de complexo foi calculada como $K = (6,5 \pm 1,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, a constante de Stern-Volmer para a supressão da intensidade de fluorescência da TMPyP pelo PQ foi obtido o valor de $K_{SV} = (5,9 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e a constante de Stern-Volmer para a supressão da intensidade de fluorescência do PQ pela TMPyP foi $K_{SV} = (5,0 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com uma acessibilidade de $f = 1,17 \pm 0,3$. Interessante notar que não houveram modificações dos tempos de decaimento da fluorescência em nenhum dos casos estudados, confirmando que a supressão era feita de forma estática, por meio do complexo formado de [PQ...porfirina], conforme proposto em [19].

Com relação à fotólise do sistema TMPyP-CdTe-MPA foi verificado que a formação do complexo aumenta a eficiência do processo de fotólise. Isso foi convalidado pela drástica queda dos tempos de fotólise da porfirina na presença do PQ em relação a TMPyP pura. Outro fator observado foi a influência do O_2 na fotólise, diminuindo os tempos de fotodegradação, tanto na ausência como na presença de PQ.

4.2. Conclusões do estudo da TPPS₄ + CdTe-MPA

Pelos experimentos foi demonstrado que existe interação entre TPPS₄ e PQ no pH 4,0, onde a constante de Stern-Volmer para a supressão da fluorescência da porfirina pelo PQ foi $K_{SV} = (2,4 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. Para a supressão da fluorescência do PQ pela porfirina no pH 4,0 a constante de Stern-Volmer foi $K_{SV} = (6,1 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ com um fator de acessibilidade de $f = 0,75 \pm 0,01$. Outro ponto notado foi a mudança dos espectros de absorção e de fluorescência da porfirina com a adição de PQ, indicando que a porfirina está passando da forma biprotonada para a forma desprotonada devido a transferência de prótons da TPPS₄ biprotonada para o PQ.

A porfirina TPPS₄ em pH 7,0 não apresentou mudanças no espectro de absorção e de fluorescência com a adição de PQ. A supressão da fluorescência do PQ pela porfirina foi $K_{SV} =$

$(2,5 \pm 0,1) \times 10^6 \text{M}^{-1}$ com fator de acessibilidade $f = 0,37 \pm 0,03$. Neste pH foram observadas poucas mudanças, porém ainda assim houveram interações.

A fotólise da TPPS₄ em ambos os pHs não apresentou dependência com a concentração da mesma, porém a adição de PQ causava uma queda nos tempos de fotólise. Estes dados confirmam que a porfirina interage com o PQ em ambos os casos, aumentando a eficiência da fotólise.

Foi observado um aumento da intensidade de fluorescência dos sistemas TMPyP-PQ e TPPS₄-PQ durante a fotólise. A hipótese proposta para explicar esse fato é a diminuição da concentração dos componentes, reduzindo a supressão da fluorescência de ambos os componentes, porém para um maior entendimento desse fato é necessário um estudo mais aprofundado.

4.3. Conclusões Gerais

Baseando-se nos dados apresentados, podemos concluir que:

1. O estado de carga dos componentes influencia no contato entre porfirina e PQ devido à interação eletrostática entre eles.
2. Na interação entre as porfirinas e PQ pode ocorrer transferência de energia, de carga ou de próton.
3. A interação com PQ aumenta a velocidade de fototransformação das porfirinas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Kamb, A. Kamb, S. Wee, S. Wee, C. Lengauer, and C. Lengauer, “Why is cancer drug discovery so difficult?,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 6, no. 2, pp. 115–20, 2007.
- [2] Who, “WHO | Cancer.” [Online]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. [Acessado em: 19-Junho-2016].
- [3] Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva, “INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016,” *Ministério da Saúde Instituto Nacional de Cancer José Alencar Gomes da Silva*. p. 124, 2016.
- [4] K. C. Chu, R. E. Tarone, L. G. Kessler, L. a Ries, B. F. Hankey, B. a Miller, and B. K. Edwards, “Recent trends in U.S. breast cancer incidence, survival, and mortality rates.,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 88, no. 21, pp. 1571–1579, 1996.
- [5] R. G. Roetzheim, N. Pal, C. Tennant, L. Voti, J. Z. Ayanian, A. Schwabe, and J. P. Krischer, “Effects of health insurance and race on early detection of cancer,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 91, no. 16, pp. 1409–1415, 1999.
- [6] K. E. Rodrigues and B. de Camargo, “Early diagnosis of childhood cancer: a team responsibility,” *Rev. Assoc. Med. Bras.*, vol. 49, no. 1, pp. 29–34, 2003.
- [7] K. Kalka, H. Merk, and H. Mukhtar, “Photodynamic therapy in dermatology.,” *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 42, no. 3, pp. 389–413; quiz 414–6, Mar. 2000.
- [8] I. Duarte, R. Buense, and C. Kobata, “Fototerapia,” *An. Bras. Dermatol.*, vol. 81, no. 1, pp. 74–82, 2006.
- [9] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, and M. Reed, “The history of photodetection and photodynamic therapy.,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, no. 5, pp. 656–69, Nov. 2001.
- [10] W. M. Sharman, C. M. Allen, and J. E. van Lier, “Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications,” *Drug Discov. Today*, vol. 4, no. 11, pp. 507–517, 1999.
- [11] S. B. Brown, E. a Brown, and I. Walker, “The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment.,” *Lancet Oncol.*, vol. 5, no. 8, pp. 497–508, 2004.
- [12] P. Jichlinski, L. Guillou, S. J. Karlsen, P.-U. Malmström, D. Jocham, B. Brennhovd, E.

- Johansson, T. Gärtner, N. Lange, H. van den Bergh, and H.-J. Leisinger, “Hexyl Aminolevulinate Fluorescence Cystoscopy: A New Diagnostic Tool for Photodiagnosis of Superficial Bladder Cancer—A multicenter study,” *J. Urol.*, vol. 170, no. 1, pp. 226–229, 2003.
- [13] N. Ramanujam, M. F. Mitchell, a. Mahadevan, S. Thomsen, E. Silva, and R. Richards-Kortum, “Fluorescence Spectroscopy: A Diagnostic Tool for Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN),” *Gynecologic Oncology*, vol. 52, no. 1, pp. 31–38, 1994.
- [14] E. R. Reis, K. Metze, E. M. D. Nicola, J. H. Nicola, and I. E. Borissevitch, “Photodynamic activity of protoporphyrin IX in Harderian glands of Wistar rats: Monitoring by gland fluorescence,” *J. Lumin.*, vol. 137, p. 3236, 2013.
- [15] I. J. Macdonald and T. J. Dougherty, “Basic principles of photodynamic therapy,” *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 05, no. 02, pp. 105–129, 2001.
- [16] E. D. Sternberg, D. Dolphin, and C. Brückner, “Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy,” *Tetrahedron*, vol. 54, no. 17, pp. 4151–4202, 1998.
- [17] M. Ochsner, “Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours,” *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 39, no. 1, pp. 1–18, May 1997.
- [18] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*. 1991.
- [19] Parra, G. G. “Interação de pontos quânticos com fotossensibilizadores orgânicos na presença de estruturas nano-organizadas,” 2015, 148 p. Tese de doutorado, FFLRPP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.
- [20] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition*, Joseph R. Lakowicz, editor. 2006.
- [21] P. G. Wu and L. Brand, “Resonance Energy Transfer: Methods and Applications,” *Analytical Biochemistry*, vol. 218, no. 1, pp. 1–13, 1994.
- [22] B. Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*, vol. 8. 2001.
- [23] R. Bonnett, B. D. Djelal, P. A. Hamilton, G. Martinez, and F. Wierrani, “Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 53, no. 1–3, pp. 136–143, 1999.

- [24] Silva, É. R. “Estudo da cinética e dos mecanismos da fototransformação de corantes ciânicos com dois cromóforos em interação com sistemas biomim[éticos sob a ação da luz visível,” 2015, 174 p. Tese de doutorado, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2015.
- [25] R. Bonnett and G. Martínez, “Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy,” *Tetrahedron*, vol. 57, no. 47, pp. 9513–9547, 2001.
- [26] Aggarwal, L. P. F., “Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS4 e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos de pH e da força iônica.” 2005. 158 p. Tese de Doutorado, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- [27] M. Amitava, C. Kristyna, M. Vedran, K. Pavel, A. Vojtech, H. Zbyněk, and K. Rene, “Preparation and antimicrobial activity of nucleobase-conjugated CdTe / ZnSe core / shell quantum dots,” pp. 14–19, 2015.
- [28] W. C. W. Chan and S. Nie, “Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection,” *Science*, vol. 281, no. 5385, pp. 2016–2018, 1998.
- [29] C.-H. Chang and Y.-L. Lee, “Chemical bath deposition of CdS quantum dots onto mesoscopic TiO₂ films for application in quantum-dot-sensitized solar cells,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 91, no. 5, pp. 053503/1–053503/3, 2007.
- [30] S. De Rinaldis, I. D’Amico, E. Biolatti, R. Rinaldi, R. Cingolani, and F. Rossi, “Intrinsic exciton-exciton coupling in GaN-based quantum dots: Application to solid-state quantum computing,” *Phys. Rev. B*, vol. 65, no. 8, p. 081309, 2002.
- [31] G. P. C. Drummen, “Quantum Dots—From Synthesis to Applications in Biomedicine and Life Sciences,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 154–163, 2010.
- [32] F. O. Silva, L. C. de S. Viol, D. L. Ferreira, J. L. A. Alves, and M. A. Schiavon, “O estado da arte da síntese de semicondutores nanocristalinos coloidais,” *Quim. Nova*, vol. 33, no. 9, pp. 1933–1939, 2010.
- [33] Z. Fang, L. Liu, L. Xu, X. Yin, and X. Zhong, “Synthesis of highly stable dihydrolipoic acid capped water-soluble CdTe nanocrystals,” *Nanotechnology*, vol. 19, no. 23, p. 235603, 2008.
- [34] J. Liu, R. Hu, J. Liu, B. Zhang, Y. Wang, X. Liu, W.-C. Law, L. Liu, L. Ye, and K.-T. Yong, “Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human

cancer cell models,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 57, pp. 222–231, 2015.

[35] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, and X. Peng, “Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals,” *Chem. Mater.*, vol. 15, no. 14, pp. 2854–2860, Jul. 2003.

[36] R. Eisberg and R. Resnick, *Física Quântica*, 8ª Edição. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1994.

[37] J. Klesinger, M. Michl, *Excited States and photochemistry of Organic Molecules*, VCH. 1995.

[38] Pazin, W. M. “Anisotropia de fluorescência: aplicações em membranas modelo,” 2012, 136 p. Dissertação de Mestrado, FFLCRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

[39] Gonçalves, P. J. “Estudos das características fotofísicas da porfirina mesotetrasulfonatofenil (TPPS₄): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB,” 2006, 140 p. Tese de Doutorado, FFCLRP, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

[40] K. Kalyanasundaram, *Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes*. Academic Press, 1992.

[41] M. A. Jhonsi and R. Renganathan, “Investigations on the photoinduced interaction of water soluble thioglycolic acid (TGA) capped CdTe quantum dots with certain porphyrins,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 344, no. 2, pp. 596–602, Apr. 2010.

[42] P. J. Goncalves, P. L. Franzen, D. S. Correa, L. M. Almeida, M. Takara, A. S. Ito, S. C. Zílio, and I. E. Borissevitch, “Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP),” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 79, no. 5, pp. 1532–1539, 2011.

[43] I. E. Borissevitch, G. G. Parra, V. E. Zagidullin, E. P. Lukashev, P. P. Knox, V. Z. Paschenko, and a. B. Rubin, “Cooperative effects in CdSe/ZnS-PEGOH quantum dot luminescence quenching by a water soluble porphyrin,” *J. Lumin.*, vol. 134, pp. 83–87, 2013.

[44] I. E. Borissevitch and S. C. Gandini, “Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA,” *J. Photochem. Photobiol. B.*, vol. 43, no. 2, pp. 112–20, 1998.

- [45] Y. Wang and N. Herron, “Nanometer-sized semiconductor clusters: materials synthesis, quantum size effects, and photophysical properties,” *J. Phys. Chem.*, vol. 95, no. 2, pp. 525–532, Jan. 1991.
- [46] M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, and L. E. Brus, “The Quantum Mechanics Of Larger Semiconductor Clusters,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 41, no. 4, pp. 477–496, 1990.