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

Fábio Antonio Schaberle

**Efeitos do Meio e da Interação com DNA e Micelas nas Características
Espectrais dos Corantes Ciânicos com Dois Cromóforos**

Ribeirão Preto - SP
2007

Fábio Antonio Schaberle

**Efeitos do Meio e da Interação com DNA e Micelas nas Características
Espectrais dos Corantes Ciânicos com Dois Cromóforos**

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

Área de Concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

Ribeirão Preto - SP

2007

Sumário

Agradecimentos

Créditos de Uso dos Laboratórios

Créditos Científicos

Abstract

Resumo

1	Introdução	p. 21
2	Base Científica	p. 25
2.1	Fotoprocessos Primários em Fotoquimioterapia	p. 25
2.1.1	Absorção de Luz	p. 26
2.1.2	Perda de Energia Absorvida	p. 27
2.2	Terapia Fotodinâmica	p. 33
2.2.1	Fotossensibilizadores para PDT	p. 35
2.3	Efeito dos Solventes	p. 42
2.3.1	Solvatação não Específica	p. 42
2.3.2	Solvatação Específica	p. 45
2.4	Agregados	p. 46
3	Objetivo	p. 51
3.1	Objeto de Estudo	p. 51

4	Métodos Experimentais	p. 53
4.1	Caracterização do Estado Singlete	p. 53
4.1.1	Absorção Ótica	p. 53
4.1.2	Fluorescência Estática	p. 54
4.1.3	Tempo de Vida de Fluorescência	p. 55
4.2	Caracterização do Estado Triplete	p. 59
4.2.1	Método de Flash-Fotólise.	p. 59
4.2.2	Fosforescência	p. 62
4.2.3	Calorimetria Fotoacústica Resolvida no Tempo (PAC)	p. 62
4.2.4	Rendimento Quântico e Tempo de Vida do Oxigênio Singlete	p. 66
4.3	Anisotropia de Fluorescência	p. 68
4.4	Dicroísmo Circular	p. 69
4.5	Métodos Computacionais	p. 71
4.5.1	Análise Geométrica e Absorção S - S	p. 71
5	Material e Métodos	p. 75
6	Estado da Arte dos BCD	p. 77
7	Resultados e Discussão	p. 81
7.1	Resultados Computacionais	p. 81
7.1.1	Geometria dos BCD	p. 81
7.1.2	Absorção Ótica	p. 84
7.2	Efeito dos Solventes	p. 90
7.2.1	Coeficiente de Absorção Molar e Análise Espectral	p. 90
7.2.2	Fluorescência	p. 95
7.2.3	Tempo de Vida de Fluorescência	p. 97
7.3	Interação com Tensoativos	p. 102

7.3.1	Interação dos BCD com LPC	p. 102
7.3.2	Interação dos BCD com SDS	p. 105
7.3.3	Interação dos BCD com CTAB	p. 109
7.4	Interação com DNA	p. 109
7.4.1	Constantes de Ligação BCD-DNA	p. 112
7.4.2	Espectros e Rendimento Quântico de Fluorescência	p. 113
7.4.3	Anisotropia Estática de Fluorescência	p. 115
7.4.4	Tempo de Vida de Fluorescência	p. 116
7.4.5	Tempo de Vida e Absorção Triplete-Tripleto	p. 118
7.4.6	Rendimento Quântico de Formação do Estado Tripleto	p. 122
7.4.7	Rendimento Quântico de Formação de Oxigênio Singlete	p. 125
7.5	Fotodecomposição	p. 127
7.5.1	Modelo Teórico de Fototransformação do BCD	p. 132
8	Conclusões	p. 135
	Referências Bibliográficas	p. 139

“Per me si va ne la cittá dolente,
Per me si va ne l’eterno dolore,
Per me si va tra la perduta gente.
Giustizia mosse il mio alto fattore:
fecemi la divina podestate,
la somma sapienza e ’l primo amore.
Dinanzi a me non fuor cose create
se non eterne, e io eterno duro.
Lasciate ogne speranza, voi ch’intrate”

(Alighieri, Dante; La Divina Commedia -
Inferno canto III)

“.....
- Não tive filhos, não transmiti
a nenhuma criatura o legado de
nossa miséria”

(Assis, Machado de; Memórias
Póstumas de Brás Cubas - úl-
tima linha)

Agradecimentos

- Ao orientador Prof. Dr. Iouri Borissevitch pela excelente orientação, amizade e apoio.
- A Profa. Dra. Galina Borissevitch pela amizade, discussões e pelas valiosas sugestões neste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Sebastião Formosinho e ao Prof. Dr. Luís G. Arnaut agradeço o caloroso apoio e acolhimento durante a minha estada na Universidade de Coimbra em Portugal.
- Aos amigos do grupo de Fotobiofísica pela boa convivência, apoio pessoal e científico.
- A agência de fomento CAPES pela bolsa de doutorado.

Créditos de Uso dos Laboratórios

Responsável: Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco

Laboratório: Fotobiologia e Fotomedicina

Equipamento: Fluorímetro

Instituição: Depto. Química - USP - Ribeirão Preto

Responsável: Prof. Dr. Richard John Ward

Laboratório: Estrutura e Função de Proteínas

Equipamento: Fluorímetro, Espectropolarímetro

Instituição: Depto. Química - USP - Ribeirão Preto

Responsável: Prof. Dr. Sérgio Emanuel Galembeck

Laboratório: Química Molecular

Equipamento: Programas de Cálculo de Orbital Molecular

Instituição: Depto. Química - USP - Ribeirão Preto

Responsável: Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista

Laboratório: Moléculas Fotoativas e Interfaces

Equipamento: Flash-Fotólise (Fosforescência Resolvida no Tempo)

Instituição: Depto. Bioquímica - Instituto de Química - USP

Responsável: Prof. Dr. Luís G. Arnaut

Laboratório: Fotoquímica

Equipamento: Vários (Técnica: Calorimetria Fotoacústica resolvida no tempo)

Instituição: Depto. Química - Depto. de Química - Universidade de Coimbra - Portugal

Créditos Científicos

- A seção - Efeito dos Solventes - foi realizado em colaboração com Luciana S. Murakami como parte de seu projeto de iniciação científica.
- A seção - Interação com Micelas - foi realizado em colaboração com Marcos M. Botelho como parte de seu projeto de iniciação científica.
- A seção - Fotodecomposição (parte experimental) - foi realizado em colaboração com Leila B. Mostaço como parte de seu projeto de iniciação científica.
- A seção - Computacional - foi desenvolvida em colaboração com o Prof. Dr. Sérgio E. Galembeck líder do grupo de Modelagem Molecular do Depto. de Química da USP/RP.
- A seção - Calorimetria Fotoacústica Resolvida no Tempo - foi desenvolvida, em estágio de doutorado sanduíche deste candidato, em colaboração com o Prof. Dr. Luís G. Arnaut no Depto. de Química da Universidade de Coimbra .

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) consists in the administration of photoactive compounds (photosensitizers) in an organism with subsequent application of visible light to the area to be treated. This procedure leads to the activation of the compound which kills neoplastic cells, as well as fungus and bacteria. The photosensitizers used nowadays show some disadvantages, thus motivating the search for more effective compounds. Bichromophoric cyanine dyes (BCD) exhibit good spectral characteristics to be used in PDT, encouraging the development of this study. This work aimed at studying spectral, energetic and photodecomposition characteristics of BCD: (i) in different solvents (chosen accordingly to their dielectric constant ξ and the capacity to form hydrogen bonds), (ii) at their interaction with micelles and (iii) at their interactions with DNA.

Four BCD isomers with equal chromophores and different structure of the central part of the molecule were studied. Static and time resolved spectroscopic methods such as optical absorption, fluorescence, anisotropy, circular dichroism and photoacoustic calorimetry were used. Experimental results were compared with computational ones, based on geometry optimization and analysis of electronic orbital densities, energy levels and transition probabilities. This data allowed to create the BCD singlet absorption spectrum. The computer modelling confirmed that the transition probabilities depended on the angle between chromophores determined by the central structure. The 180° BCD showed a single absorption band, while the 90° BCD showed two bands of equal intensities. It was demonstrated that at $< 100^\circ\text{C}$ BCD chromophores are present in the trans-trans form, except for the BCD with 120° where the mixture of trans-trans and cis-trans forms was present in the 0° – 100°C temperature interval.

Experimental results have shown that BCD did not form aggregates in organic solvents. The BCD spectral characteristics did not followed the Lippert equation, which means that both non-specific and specific mechanisms, such as the hydrogen bond formation determined the BCD solvation. The life times (τ_{S1}, τ_{T1}) and quantum yields (ϕ_{S1}, ϕ_{T1}) of singlet and triplet excited states decreased with increase of the solvent dielectric constant ξ . Though, the solvent viscosity increment caused the increase of these parameters. The addition of water to organic solvents led to BCD aggregation. The τ_{S1}, τ_{T1} and ϕ_{S1}, ϕ_{T1} values decreased, probably due to two effects: the decrease of microviscosity around the molecules and aggregation of BCD due to interaction with water.

The interaction of BCD with micelles depended on the micelle electric charge. In the presence of negatively charged ones three species were produced in the solution: BCD free monomers, BCD aggregates bound to micelles and BCD monomers bound to micelles. Zwitterionic micelles produced two species: BCD free monomers and monomers bound to micelles. The binding constants with zwitterionic LPC micelles were $\sim 10^6\text{M}^{-1}$. Positively charged micelles did not interact with BCD. Interaction with DNA stimulated the BCD aggregation. Three species were produced in the solution: BCD free monomers and monomers bound to DNA and BCD aggregates bound to DNA. The relative content of these species depended on the $[\text{BCD}]/[\text{DNA}]$

ratio. The BCD monomer to DNA binding constants were $\sim 10^7 M^{-1}$. The τ_{S1} , τ_{T1} and ϕ_{S1} , ϕ_{T1} values increased with BCD binding to DNA, indicating that non radioactive processes decreased in comparison with pure water and homogeneous organic solvents.

The BCD photodecomposition depended on the oxygen presence. This fotodecomposition occured when singlet oxygen (generated due to the energy transfer from the BCD molecule in its triplet state to molecular oxygen) interacted with one of the BCD chromophores destroying its π -conjugation system.

The obtained results (high affinity to biological and model systems, high triplet state quantum yields at interaction with these systems, singlet oxygen formation) showed that BCD possess promising characteristics for application as photosensitizers in PDT, encouraging future studies on their phototoxicity and *in vivo* tests.

Resumo

A terapia fotodinâmica (PDT) consiste em introduzir no organismo um composto fotoativo (fotossensibilizador) e irradiar o local a ser tratado com a luz visível. Este procedimento permite obter a(s) forma(s) ativa(s) do composto que tem a capacidade de matar células neoplásicas, bem como fungos e bactérias. Algumas desvantagens dos fotossensibilizadores atualmente aplicados na clínica estimulam a busca de novos compostos mais adequados. Os corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD) possuem características espectrais promissoras para aplicação em PDT. Isso estimulou a realização deste trabalho que teve como finalidade estudar as características espectrais, energéticas e de fotodecomposição dos BCD: (i) em diferentes solventes (escolhidos pela constante dielétrica ξ e capacidade de formar ligação hidrogênio), (ii) na interação com micelas, e (iii) na interação com DNA.

Foram estudados 4 isômeros de corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD) com estruturas iguais. Estes isômeros diferem pela estrutura da parte central da molécula. Foram utilizados métodos espectroscópicos estáticos e com resolução temporal tais como absorção ótica, flash-fotólise, fluorescência, anisotropia, dicroísmo circular e calorimetria fotoacústica. Os resultados experimentais foram analisados em comparação com resultados obtidos do cálculo computacional em que foi feita a otimização geométrica das moléculas, análise de orbitais eletrônicos, dos níveis de energia e das probabilidades de transição entre estes. A partir destes dados foram construídos os espectros de absorção S-S dos corantes. Os cálculos confirmaram que a probabilidade de transição entre os níveis de energia dos BCD depende do ângulo entre os cromóforos que é determinado pela estrutura da parte central da molécula. Para um ângulo de 180° somente uma banda de absorção está presente no espectro e para o de 90° aparecem duas bandas de intensidades iguais. Foi mostrado que no intervalo de temperaturas $< 100^\circ$ as conformações dos cromóforos de BCD no estado fundamental são trans-trans, exceto para o BCD com ângulo de 120° entre os cromóforos em que no intervalo 0° a 100° ocorre a mistura das conformações trans-trans e cis-trans.

Os resultados experimentais mostraram que em solventes orgânicos os BCD não formam agregados. Como suas características espectroscópicas não seguem a equação de Lippert concluímos que sua solvatação está determinada tanto pelo mecanismo não específico como específico devido as ligações hidrogênio. Os tempos de vida (τ_{S1}, τ_{T1}) e rendimentos quânticos (ϕ_{S1}, ϕ_{T1}) dos estados excitados singleto e tripleto dos BCD diminuíram com o aumento da constante dielétrica ξ do solvente. Entretanto o aumento da viscosidade do solvente aumentou estes parâmetros. A presença de água nos solventes orgânicos promove a formação dos agregados de BCD. Os valores de τ_{S1}, τ_{T1} e ϕ_{S1}, ϕ_{T1} diminuíram, provavelmente, devido a dois efeitos: diminuição da microviscosidade ao redor da molécula de BCD e agregação do BCD estimulada pela presença da água.

A interação dos BCD com micelas depende da carga dos tensoativos. Para uma carga negativa houve a presença de 3 espécies do corante dependendo da concentração das micelas: os monômeros livres, os monômeros ligados à micela e os agregados ligados a micela. O tensoa-

tivo zwitteriônico gerou duas espécies: os monômeros livres e os monômeros ligados à micela. As constantes de ligação dos BCD com micelas de LPC são da ordem $10^7 M^{-1}$. Não houve interação com os tensoativos positivos. A interação com DNA estimula a agregação de BCD. Na presença de DNA em solução existem três espécies de BCD: os monômeros livres e ligados com DNA e os agregados de BCD na superfície do DNA. O conteúdo relativo dessas espécies depende da razão $[BCD]/[DNA]$. As constantes de ligação dos monômeros de todos BCD com DNA foram da ordem de $10^7 M^{-1}$. Os valores de τ_{S1} , τ_{T1} e ϕ_{S1} , ϕ_{T1} aumentaram com a ligação dos BCD ao DNA, o que significa que a contribuição dos processos não radiativos diminuiu em comparação a água e aos solventes orgânicos. Os BCD sofrem fotodecomposição e esta depende da presença de oxigênio. Na fotodecomposição do BCD ocorre destruição do sistema de conjugação- π num dos cromóforos pela ligação do oxigênio singlete, formado devido a transferência de energia do estado tripleto do próprio BCD para oxigênio molecular.

Os resultados obtidos (alta afinidade com sistemas biológicos e modelos, altos rendimentos quânticos do estado tripleto na interação com estes sistemas, formação de oxigênio singleto) mostram que os BCD apresentam características vantajosas para suas aplicações como fotossensibilizadores em PDT, motivo pelo qual o estudo da sua fototoxicidade e testes in vivo deve prosseguir.

1 Introdução

O uso clínico das técnicas baseadas na aplicação conjunta de luz visível e compostos fotoativos (fotossensibilizadores) para o tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer, se desenvolveu rapidamente a partir da década de 70 do século XX [1]. Genericamente estas técnicas são chamadas de Fotoquimioterapias (FQT). O princípio da Fotoquimioterapia baseia-se em introduzir no organismo do paciente, ou aplicação tópica, um fotossensibilizador e em seguida irradiar o local a ser tratado com luz visível. O fotossensibilizador não é ativo no seu estado fundamental e será ativado pela luz, após ativado este produzirá espécies ativas que são capazes de matar as células.

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma forma de FQT mais desenvolvida. O mecanismo de ação da PDT está baseado na transferência de um elétron ou próton (mecanismo tipo I) ou de energia (mecanismo tipo II) dos estados excitados (singleto ou tripleto) do fotossensibilizador para o oxigênio molecular formando espécies ativas de oxigênio [2, 3]. A PDT tem sido usada para tratamento de várias doenças de pele como psoríase e vitiligo, vários tipos de micoses e, em especial, teve seu grande impacto no tratamento de câncer. Além destas existem outras aplicações de PDT como sua aplicação na oftalmologia para o tratamento da degeneração macular relacionada à idade (DMRI) [4].

As pesquisas na área de PDT crescem progressivamente. Desde 1970 até esta data foram publicados cerca de 7800 artigos, e somente entre 2005 e o primeiro semestre de 2006 foram publicados 1451 artigos sobre PDT em revistas indexadas. Recentemente foi lançado um periódico específico para publicações de pesquisas em PDT [5, 6]. Uma das razões para tanto interesse da aplicação de PDT no tratamento de câncer é que, além da sua alta eficácia, os efeitos colaterais deste tratamento são muito menores quando comparados com as técnicas convencionais como radioterapia e quimioterapia pois, diferente da radiação ionizante, a luz não causa nenhum efeito deletério ao organismo e os fotossensibilizadores no escuro são, em geral, inócuos comparados as drogas usadas na quimioterapia.

Atualmente as pesquisas em PDT buscam aumentar a eficácia do tratamento e baratear

seu preço. Isto estimula a busca de novos fotossensibilizadores bem como tratamentos mais eficientes.

Um fotossensibilizador ideal deve possuir características tais como:

- Alto coeficiente de absorção molar na região espectral entre $600nm$ e $800nm$ (janela terapêutica), em que os tecidos biológicos são relativamente transparentes. Na janela terapêutica consegue-se a melhor relação entre penetração da luz no tecido e energia da luz necessária para produzir espécies ativas de oxigênio.
- Alta razão da sua toxicidade sob irradiação com luz visível em relação com esta no escuro.
- Baixo tempo de retenção do fotossensibilizador pelo organismo após o tratamento (alto *clearance*).

Entre os principais compostos usados hoje na clínica em PDT estão os derivados de hematoportfirinas (HPD): Photofrin, Photogem, Photosan. Os fotossensibilizadores usados atualmente têm alguns problemas e causam alguns efeitos indesejáveis. Entre estes estão o baixo coeficiente de absorção molar dentro da janela terapêutica, a longa retenção destes no organismo do paciente após tratamento e em alguns casos neurotoxicidade, baixa mas não desprezível [7]. Buscando minimizar os efeitos indesejáveis da terapia atualmente diversos tipos de fotossensibilizadores estão em fase de pesquisas clínicas e laboratoriais. Entre estes estão os derivados de benzoporfirinas, clorinas, ftalocianinas e corantes ciânicos, entre outros [8].

Na busca de novos fotossensibilizadores promissores para PDT uma classe de corantes ciânicos com características promissoras foi sintetizada (seção 2.2.1). Estes corantes são formados por dois cromóforos interagentes (Biscyanine Dyes, BCD) ligados por um heterociclo central. Essa estrutura possibilita a síntese de isômeros com diferentes comprimentos dos cromóforos e diferentes ângulos entre estes, possibilitando assim variar suas características espectroscópicas. Os espectros de absorção ótica dos BCD estão na região entre $450nm$ a $700nm$ com coeficientes de absorção molar na janela terapêutica da ordem de $10^5 M^{-1} cm^{-1}$. Eles possuem alta afinidade por estruturas biológicas como DNA e modelos de membrana [9, 10]. Testes preliminares mostraram a efetividade dos BCD, aplicados na forma de PDT, em cultura de células de várias linhagens. Estas propriedades promissoras dos BCD para a PDT motivaram a caracterização fotofísica e fotoquímica mais detalhada dos BCD.

Para aplicação terapêutica de um fotossensibilizador é essencial o estudo dos efeitos do ambiente nas suas características. Entre esses estão os efeitos da força iônica, da presença de solventes orgânicos e, especialmente, da presença de estruturas microorganizadas, tais como

biomacromoléculas (DNA, proteínas) e membranas celulares. Estas constituem as principais estruturas com as quais os fotossensibilizadores interagem no organismo [11].

O objetivo deste trabalho foi estudar as características espectrais e energéticas de uma classe de corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD) e a dinâmica da sua fototransformação na interação com sistemas biológicos, miméticos e reais, bem como o efeito do ambiente. Este estudo visa uma possível aplicação dos BCD como fotossensibilizadores em PDT. Para melhor entendimento da formação dos espectros dos BCD e dos mecanismos da sua fototransformação os resultados experimentais foram analisados em comparação com resultados obtidos através de cálculos quânticos semiempíricos, onde foram calculados os níveis de energia dos orbitais HOMO (*High Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Low unoccupied Molecular Orbital*) dos BCD, bem como a distribuição eletrônica no seu estado fundamental e nos estados excitados e suas estruturas espaciais mais prováveis.

2 *Base Científica*

2.1 Fotoprocessos Primários em Fotoquimioterapia

O efeito fotoquimioterapêutico está baseado na produção de espécies ativas pela ação de luz visível que induzem a morte celular. Essas espécies são formadas devido a fotoexcitação das moléculas do fotossensibilizador através da luz. Os fotoprocessos primários envolvidos na produção de espécies ativas estão representados pelo diagrama de Jablonski (figura 2.1). A discussão deste capítulo foi baseada principalmente nas referências [12–14].

Figura 2.1: Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripleto estão representados por S e T, respectivamente. Modificado de [12].

2.1.1 Absorção de Luz

O processo inicial de qualquer fotoreação é a absorção da energia luminosa por uma molécula. Este processo é caracterizado pela energia do fóton absorvido e pela probabilidade de absorção desta pela molécula. Experimentalmente a energia do fóton é caracterizada aproximadamente pela posição do máximo da banda de absorção em função da frequência (ν_{max}) ou do comprimento de onda (λ_{max}) da luz. A probabilidade de absorção está contida no coeficiente de absorção molar ϵ da molécula, que pode ser determinado pela lei de Lambert-Beer:

$$I_t = I_0 10^{-A} = I_0 10^{-\epsilon Cl} \quad (2.1)$$

Em que I_0 e I_t são respectivamente a intensidade de luz incidente e a transmitida pela amostra. $A = \epsilon Cl$ é a absorbância da amostra, C é a concentração do composto absorvedor e l é o caminho ótico que a luz percorre dentro da amostra.

Na teoria quântica a energia de um fóton absorvido por uma molécula é dado pela equação:

$$h\nu = E_n - E_0 \quad (2.2)$$

em que h é a constante de Planck e E_n e E_0 são as energias dos níveis final (S_n , excitado) e inicial (S_0 , fundamental) da molécula. A probabilidade de transição da molécula entre estes estados é definida pelo quadrado do momento de transição M , que pode ser obtido através da expressão:

$$M = \int \psi_{me}^* \mu_e \psi_{ne} d\tau_e \quad (2.3)$$

sendo ψ^* e ψ são as funções de onda dos estados excitado e fundamental, μ é o operador momento de dipolo de transição. Uma transição é permitida se a quantidade M^2 para essa transição é maior que zero.

Nos cálculos o valor de M é sempre obtido com algumas aproximações como a aproximação adiabática (Born-Oppenheimer), que trata as posições dos núcleos como um parâmetro fixo durante uma transição eletrônica, e desconsidera a interação spin-órbita. Com estas aproximações é possível apresentar as funções da onda da molécula como produto de quatro funções de onda independentes entre si: rotacional, vibracional, eletrônica e de spin.

$$\Psi_m^* = \Psi_{mR}^* \Psi_{mV}^* \Psi_{mE}^* \Psi_{mS}^* \quad (2.4)$$

$$\Psi_n = \Psi_{nR} \Psi_{nV} \Psi_{nE} \Psi_{nS} \quad (2.5)$$

Os índices R , V , E e S correspondem aos números quânticos rotacional, vibracional, eletrônico e de spin de cada nível (no decorrer do texto apenas os estados eletrônicos, vibracionais e de spin serão discutidos).

Considerando as aproximações acima que tornam as coordenadas dessas funções independentes entre si, a integração pode ser feita separadamente:

$$M = \int \Psi_{mv}^* \Psi_{nv} d\tau_n \int \Psi_{me}^* \mu_e \Psi_{ne} d\tau_e \int \Psi_{ms}^* \Psi_{ns} d\tau_s \quad (2.6)$$

Entretanto devido a estas aproximações o cálculo de M não é completamente correto e os processos, que seguindo este cálculo são formalmente proibidos, na realidade podem acontecer. Porém estes ocorrem com probabilidade muito menor do que os processos permitidos nesta aproximação. Por exemplo, quando dois estados possuem a multiplicidade de spin $2S + 1$ diferente de 1 (aqui S é a soma dos spins dos elétrons da molécula em cada estado), as funções de onda de spin destes estados são ortogonais e a integral $\int \Psi_{ms}^* \Psi_{ns} d\tau_s = 0$. Isto significa que a probabilidade de transição entre estes estados é zero e, portanto, proibida (regra de seleção por spin). Assim, uma transição em que os estados eletrônicos finais resultem em $\Delta S = 1$ é proibida por spin. Apesar de proibida esta transição acontece em várias moléculas orgânicas com alta probabilidade e, em particular, esta transição é a base do mecanismo fotodinâmico do tipo II, como será abordado na seção 2.2.

Os valores comparativos dos coeficientes de absorção molar para transições permitidas e proibidas estão apresentados na Tabela 2.1.

Condição	Valor aproximado de ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Proibido por spin	$10^{-5} - 10^0$
Proibido eletronicamente e permitido por spin	$10^0 - 10^3$
Permitido por spin e eletronicamente	$10^3 - 10^5$

Tabela 2.1: Valores aproximados de ϵ pelas regras de seleção [12]

2.1.2 Perda de Energia Absorvida

Processos Monomoleculares

Ao absorver um fóton a molécula passa de um estado eletrônico fundamental (S_0) para um excitado (S_n). Geralmente em temperaturas ambientais as moléculas no estado fundamental

ocupam o nível vibracional com a menor energia possível ($S_{0,0}$). Entretanto, depois de absorver um fóton a molécula pode ser promovida para os níveis vibracionais do estado S_n que possuem energia maior que a menor vibracional ($S_{n,k}$, $k > 0$). O excesso de energia (tanto eletrônica quanto vibracional) obtido nesse processo, na ausência da interação com outros sistemas, pode ser perdido em processos monomoleculares.

Inicialmente, estando no estado eletrônico S_n , a molécula perde a energia pelo processo não radiativo denominado de relaxação vibracional, caracterizado pela transição entre o estado $S_{n,k}$ para o estado $S_{n,0}$, que possui a menor energia vibracional possível no estado S_n . Neste ponto a molécula sofre transição pelo processo isoenergético de conversão interna (*IC*) para estado eletrônico-vibracional $S_{n-1,m}$ e novamente pela relaxação vibracional passa para estado $S_{n-1,0}$. O mecanismo de *IC* ocorre quando há sobreposição do nível vibracional 0 do estado $S_{n,0}$ com o nível vibracional m do estado $S_{n-1,m}$. Repetindo esse processo várias vezes a molécula chega finalmente no estado eletrônico excitado $S_{1,0}$. No estado $S_{1,0}$ a molécula pode voltar para estado eletrônico fundamental S_0 através do processo de *IC* ou pela emissão de um fóton que caracteriza a fluorescência, transicionando assim para o estado vibracional $S_{0,n}$ e através de relaxação vibracional voltar para estado $S_{0,0}$.

Outro caminho para a molécula é o processo isoenergético de inversão do spin do elétron na passagem do estado singleto $S_{1,0}$ para o estado tripleto $T_{1,h}$, denominado de cruzamento intersistema *ISC*. Diferente do processo *IC*, em que não há a mudança de spin do estado $\Delta S = 0$, o processo de *ISC* ocorre com $\Delta S = 1$, mas somente quando há sobreposição do nível vibracional 0 do estado $S_{1,0}$ e o nível vibracional h do estado $T_{1,h}$. Neste estado a molécula pode perder o excesso de energia vibracional através da relaxação vibracional chegando no nível $T_{1,0}$ e daqui, de modo não radiativo através de outra inversão de spin (*ISC*) e em sequência com a relaxação vibracional, voltar ao estado $S_{0,0}$. Outro caminho possível é emitir um fóton transicionando do estado $T_{1,0}$ para o estado $S_{0,n}$ no processo denominado de fosforescência.

No estado tripleto a molécula pode receber energia térmica passando para o estado $T_{1,f}$ e através do processo de *ISC*, voltar para o $S_{1,d}$ seguindo o processo de relaxação descrito anteriormente e voltar ao estado eletrônico fundamental por emissão de fluorescência. Este mecanismo é denominado de fluorescência retardada. Apesar de a fluorescência retardada ocorrer, a probabilidade deste processo é baixo e este caminho de perda de energia do estado T_1 não compete essencialmente com *ISC* e fosforescência.

A velocidade com que a concentração dos estados excitados de uma molécula $\frac{dn}{dt}$ diminui depende das taxas dos processos que participam na sua desativação na forma:

$$\frac{dn}{dt} = - [\sum k_i] n \quad (2.7)$$

Em que k_i representa as taxas características de cada mecanismo. Integrando a equação 2.7 obtém-se:

$$n = n_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.8)$$

em que $\tau = \frac{1}{\sum k_i}$ é o tempo da vida do estado excitado.

Os caminhos de perda de energia competem entre si determinando assim o tempo de vida do estado excitado. A emissão espontânea (fluorescência ou fosforescência), por exemplo, compete com os mecanismos não radiativos *IC* e *ISC*, sendo que o tempo de vida do estado será menor do que se o mesmo processo ocorresse somente pela emissão e sem a interferência dos mecanismos não radiativos. A tabela 2.2 ilustra as taxas características dos mecanismos de desativação dos estados excitados .

Mecanismo	$k \text{ (s}^{-1}\text{)}$
Vibracional (V)	10^{12}
Conversão Interna (IC) ($S_n - S_1$) e ($S_1 - S_0$)	$10^{12} - 10^{14} \text{ e } < 10^8$
Cruzamento Intersistema (ISC) ($S_1 - T_1$) e ($T_1 - S_0$)	$10^6 - 10^{11} \text{ e } 10^4 - 10^{-1}$
Fluorescência	$10^6 - 10^9$
Fosforescência	$10^{-2} - 10^4$

Tabela 2.2: Ordem dos tempos de vida dos processos monomoleculares [12].

Outra característica importante dos processos de desativação dos estados excitados eletrônicos é o rendimento quântico ϕ_x de cada processo. Este é definido como a razão entre o número de moléculas que perderam a energia pelo processo (n_x) e o número de moléculas que foram excitadas (n_{ex}) :

$$\phi_x = \frac{n_x}{n_{ex}} \quad (2.9)$$

A relação entre a taxa do processo e seu rendimento quântico fica:

$$\phi_x = \frac{k_x}{\sum k_i} \quad (2.10)$$

em que k_x é a taxa do processo x , e $\sum k_i$ é a soma das taxas de todos processos envolvidos na desativação molecular.

Processos Bimoleculares

Além dos processos monomoleculares a energia de excitação pode ser perdida por processos de interação da molécula excitada com uma outra molécula. Os processos bimoleculares podem ser separados em fotofísicos, que são os que não produzem mudanças estruturais da molécula excitada, ou reações fotoquímicas em que a estrutura da molécula final é alterada.

Processos Fotofísicos (supressão)

Os processos bimoleculares fotofísicos responsáveis pela perda da energia de excitação da molécula são chamados em geral de processos de supressão. Estes podem ser de dois tipos:

- Transferência não radiativa de energia da molécula excitada para a molécula do supressor.
- Aumento das taxas dos processos não radiativos de perda de energia de excitação da molécula, estimulado pelo supressor como acontece na supressão paramagnética, causada pela interação da molécula excitada com radicais livres ou na supressão por átomos pesados.

O mecanismo de maior interesse deste trabalho é o de transferência de energia, pois este é o principal mecanismo da terapia fotodinâmica (seção 2.2). Este mecanismo ocorre apenas em uma etapa:

Em que a molécula excitada (D) transfere diretamente a sua energia para a molécula no estado fundamental (A). A probabilidade da transição entre os estados inicial e final do par doador + aceitador será dado pelo quadrado da equação 2.11, semelhante a equação 2.3 para uma molécula:

$$\beta = \langle \Psi_f | H | \Psi_i \rangle \quad (2.11)$$

O operador hamiltoniano (H) contém duas partes: um operador coulombiano H_c , que inclui as interações eletrostáticas de todos os elétrons do doador com os do aceitador, e um operador de troca dos elétrons entre doador e aceitador H_t . A quantidade β então pode ser escrita pela soma de dois termos: interação coulombiana e de troca.

$$\beta = \langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | H_c | \Psi_D(1) \Psi_{A^*}(2) \rangle - \langle \Psi_{D^*}(1) \Psi_A(2) | H_t | \Psi_D(2) \Psi_{A^*}(1) \rangle \quad (2.12)$$

O primeiro termo, chamado também de transferência de energia por ressonância (*Resonance Energy Transfer*, RET), ou transferência por mecanismo de Förster (FRET), representa a interação dipolo-dipolo entre uma molécula de doador no estado excitado e uma molécula de aceitador no estado fundamental. A teoria mostra que a taxa de transferência de energia por este mecanismo pode ser obtida:

$$K_f = \frac{9000k^2\phi^2}{128\pi^5n^4Nr^6\tau} \int_0^\infty \frac{F_D(\nu)\epsilon_a(\nu)}{\nu^4} d\nu \quad (2.13)$$

Em que k é um coeficiente de orientação relativa de doador e de aceitador, ϕ é o rendimento quântico da fluorescência do doador na ausência de aceitador, n é o índice de refração relativo, N é o número de Avogadro, r é a distância entre o doador e o aceitador, τ é o tempo de vida do estado excitado de doador na ausência de aceitador, ν é a frequência, F_D é a intensidade da fluorescência do doador normalizada, e ϵ_a é o coeficiente de absorção molar do aceitador. O integral caracteriza a sobreposição dos espectros de emissão do doador e da absorção do aceitador.

A taxa da transferência da energia pelo mecanismo de troca de elétrons, chamado também mecanismo de Dexter, é dada pela equação:

$$K_D = \frac{2\pi}{\hbar} e^{-\frac{2r}{L}} \int_0^\infty F_D(\nu) \epsilon_{na}(\nu) d\nu \quad (2.14)$$

Em que L é uma constante proporcional a soma dos raios de van der Waals do doador e do aceitador, F_d e ϵ_{na} são, respectivamente, a fluorescência e o coeficiente de absorção molar normalizados.

O mecanismo de Förster é dominante quando ϵ_a é grande, o que significa, quando a transição “estado fundamental $\rightarrow$ estado excitado” do aceitador é permitida, como é o caso do processo:

Quando estas transições são proibidas, como por exemplo, para o processo de transferência de energia triplete - triplete:

o integral $\int_0^\infty \frac{F_D(v)\epsilon_a(v)}{v^4} dv$ se torna desprezível e o mecanismo de troca começa a dominar, pois ϵ_{na} é normalizado e o valor do integral $\int_0^\infty F_D(v)\epsilon_{na}(v) dv$ não depende do valor real ϵ_a .

O mecanismo de Förster é baseado na interação dipolo-dipolo. Para este ocorrer não é necessário o contato direto entre as moléculas de doador e do aceitador. Este torna-se significativo para distâncias maiores que $5nm$ entre o doador e o aceitador. De modo oposto, para o mecanismo de Dexter é necessária a sobreposição (*overlap*) entre as nuvens eletrônicas de moléculas do doador e do aceitador. Por isso este ocorre somente quando há colisões entre a molécula excitada do doador e a molécula não excitada do aceitador. As distâncias características deste mecanismo são $1,0nm - 1,5nm$.

Processos Fotoquímicos

De um modo geral os processos fotoquímicos são aqueles em que há alteração das moléculas iniciais depois da reação. Alguns exemplos de reações fotoquímicas são: fotoadição, fotossustituição, fotocicloadição, fotoisomerização entre outras.

Os principais casos para desativação dos estados excitados são as formações de *excimers* ou *exciplexes*, que são complexos formados por duas moléculas iguais ou diferentes, respectivamente. Os *excimers* se formam quando a concentração do composto é alta e suas moléculas excitadas podem formar um complexo com as não excitadas. A formação do *exciplex* depende da presença no meio, além do doador, de outros tipos de moléculas aceitadoras que podem formar complexos com as moléculas excitadas do doador. Em ambos complexos ocorre a transferência de carga causando a diminuição dos tempos de vida dos estados excitados devido ao aumento das taxas dos processos de desativação. Em alguns casos pode acontecer a transferência completa de elétron e o *excimer* ou *exciplex* se transforma em um par de íon-radicais que pode se dissociar formando radicais livres de doador e de aceitador.

Processos bimoleculares, tanto fotofísicos quanto fotoquímicos, trazem novos caminhos para a desativação dos estados excitados. Nesse caso a velocidade $\frac{dn}{dt}$ é definida pela equação:

$$\frac{dn}{dt} = -(\sum k_i + \sum k_{qj}[Q_j]) \quad (2.17)$$

em que k_{qj} representa as constantes bimoleculares de interação entre a molécula excitada e o supressor, $[Q_j]$ as concentrações de respectivos supressores, e $k_{qj}[Q_j]$ as taxas dos respectivos processos de supressão. Nesse caso o tempo de vida do estado excitado será:

$$\tau = \frac{1}{\sum k_i + \sum k_{qj}[Q]_j} \quad (2.18)$$

E o rendimento quântico do processo será:

$$\phi_x = \frac{K_x}{\sum k_i + \sum k_{qj}[Q]_j} \quad (2.19)$$

em que $x = i$ ou j .

2.2 Terapia Fotodinâmica

Esta seção foi baseada nas referências [1–3]. Entre os diferentes métodos de fotoquimioterapia, a terapia fotodinâmica é a mais desenvolvida para uso clínico e atualmente um grande número de aplicações da PDT têm sido utilizadas no tratamento de vários tipos de doenças, além de outras aplicações que são objetos de pesquisas clínicas e científicas.

O efeito fotodinâmico, no qual se baseia a PDT, ocorre numa sequência de fotoprocessos. A molécula do fotossensibilizador absorve um fóton e sai do seu estado fundamental S_0 para o estado excitado singleto S_1 e em seguida, por inversão de spin, vai para o estado excitado tripleto T_1 . Destes dois estados a molécula pode, através dos mecanismos bimoleculares, transferir um elétron ou próton para outras moléculas iniciando reações em cadeia que induzirão a morte das células na região do corpo onde o fotossensibilizador está presente. Esse mecanismo é denominado de mecanismo Tipo I. A participação deste processo para os fotossensibilizadores atualmente usados em PDT não ultrapassa 10% do efeito total [15].

Outro mecanismo denominado de mecanismo Tipo II é baseado na formação de uma espécie ativa de oxigênio molecular chamada de oxigênio singleto. Quando a molécula do fotossensibilizador nos seus estados S_1 ou T_1 encontra uma molécula de oxigênio O_2 , que tem seu estado fundamental também tripleto T_1 , esta transfere sua energia para O_2 formando finalmente o estado excitado singleto do oxigênio $^1\Delta_g$ [1, 3, 13]. Devido a transição do estado $^1\Delta_g$ para estado fundamental T_1 de O_2 ser proibida pela regra de spin, o estado $^1\Delta_g$ possui tempo de vida relativamente longo $\sim 10^{-6}s$ em soluções aquosas. Além disto, $^1\Delta_g$ é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações com componentes das células tais como DNA, proteínas e fosfolípidos da membrana celular entre outros, tendo como resultado a morte da célula [11]. Então, para formar o estado $^1\Delta_g$ do oxigênio é necessário a sobreposição entre o estado excitado do fotossensibilizador com o fundamental da molécula de O_2 . Devido ao fato de o tempo de

vida do estado T_1 do fotossensibilizador ser no mínimo duas ordens de grandeza maior que do seu estado S_1 , a formação do estado $^1\Delta_g$ é mais provável devido a transferência da energia do estado T_1 do fotossensibilizador do que S_1 . O estado $^1\Delta_g$ do oxigênio também é um estado excitado que, além de reagir com alvos biológicos, pode perder a sua energia por outros caminhos. Considerando isto a eficiência ϕ_r do mecanismo tipo II pode ser descrita pela equação:

$$\phi_r = \phi_T \frac{k_{q1}[O_2]}{\frac{1}{\tau_T} + [O_2] \sum k_{qj}} * \frac{\sum k_{rl}[B_l]}{\frac{1}{\tau_0} + \sum k_{rl}[B_l] + \sum k_{rl}[B_l]} \quad (2.20)$$

em que,

$$\phi_T = \frac{k_{ISC1}}{k_{fl} + k_{IC} + k_{ISC1} + \sum k_{qi}[Q_i]} \quad (2.21)$$

é o rendimento quântico do tripleto do fotossensibilizador, k_{ISC1} é a taxa do cruzamento intersistêmico $S_1 \rightarrow T_1$, k_{IC} é a taxa da conversão interna $S_1 \rightarrow S_0$, k_{fl} é a taxa da fluorescência, k_{qi} representa constantes bimoleculares da supressão do estado S_1 pelos diversos supressores e $[Q_i]$ as concentrações dos respectivos supressores.

$$\tau_T = \frac{1}{k_{ISC2} + k_{fos} + \sum k_{qn}[Q]_n} \quad (2.22)$$

A equação 2.22 é tempo de vida τ_T do estado T_1 na ausência de oxigênio molecular, em que k_{ISC2} é a taxa do cruzamento intersistemas $T_1 \rightarrow S_0$, k_{fos} é a taxa da fosforescência, k_{qn} representa constantes bimoleculares da supressão do estado T_1 pelos diversos supressores, incluindo o oxigênio, e $[Q]$ as concentrações de respectivos supressores. k_{q1} é a constante bimolecular de transferência de energia do estado T_1 para O_2 , formando estado $^1\Delta_g$ e k_{qj} as constantes bimoleculares de todos os processos de supressão do estado T_1 pelo O_2 que pode ser, por exemplo, a formação do radical $O_2^{\bullet-}$ [16]. k_{ri} representa as constantes bimoleculares da reação do oxigênio no estado $^1\Delta_g$ com alvos B_l em que $[B_l]$ são as concentrações dos respectivos alvos.

$$\tau_0 = \frac{1}{k_{fos2} + k_{ISC3} + \sum k_{qm}[Q_m]} \quad (2.23)$$

O parâmetro τ_0 é o tempo de vida do estado $^1\Delta_g$ na ausência dos alvos B_l , em que k_{ISC3} é a taxa do cruzamento intersistêmico $^1\Delta_g \rightarrow O_2(T_1)$, k_{fos2} é a taxa da fosforescência do estado

$^1\Delta_g$, k_{qm} as constantes bimoleculares de todos os processos da supressão do estado $^1\Delta_g$ pelos supressores Q_m , incluindo os alvos B_l , e $[Q_m]$ as concentrações de relativos supressores.

Pode-se notar da equação 2.20 que com o aumento de ϕ_T , τ_T e τ_0 a eficiência de ϕ_r aumenta. Outro caminho para aumentar ϕ_r é aumentar a concentração do oxigênio molecular dentro do organismo, colocando o paciente numa barocâmara de alta pressão (até 4atm) com alto conteúdo de oxigênio. Outra possibilidade é aumentar as constantes k_{ri} de reação do oxigênio singlete com alvos biológicos (biomoléculas e membranas). Isto acontece quando o estado $^1\Delta_g$ do oxigênio é gerado perto destes alvos, o que significa aumentar a probabilidade de encontro do alvo com $^1\Delta_g$. Isto acontece, por exemplo, quando o fotossensibilizador que fornece sua energia para o oxigênio já está ligado com o alvo. Portanto o processo fotodinâmico deve ser mais efetivo para fotossensibilizadores que possuam maior afinidade com as estruturas que devem ser destruídas.

2.2.1 Fotossensibilizadores para PDT

Esta seção foi baseada nas referências [2, 4, 17]. Para aplicação em PDT os fotossensibilizadores devem possuir características adequadas como:

- Alta absorção ótica na região espectral da janela terapêutica 600 – 800nm.
- Alto rendimento quântico e longo tempo de vida do estado T_1 .
- Alta estabilidade química.
- Toxicidade no seu estado fundamental muito menor do que no estado excitado.
- Alta afinidade com sistemas biológicos.
- Transferência energética favorável T-T entre o corante e o oxigênio.

A alta absorção na janela terapêutica dos compostos orgânicos depende, geralmente, destes possuírem estruturas de conjugação- π . Sistemas com alta conjugação- π possuem caráter hidrofóbico o que, por um lado, aumenta a sua afinidade com partes hidrofóbicas das estruturas biológicas aumentando assim a probabilidade da reação entre $^1\Delta_g$ e o seu alvo biológico, mas por outro lado a hidrofobicidade estimula a agregação dos fotossensibilizadores prejudicando a sua atividade devido a diminuição dos tempos de vida dos seus estados excitados.

Derivados de Porfirinas

Como já foi comentado, entre os principais compostos usados atualmente na clínica em PDT estão os derivados de hematoporfirinas (HPD): Photofrin, Photogem, Photosan; estes apresentando bons resultados clínicos no tratamento de câncer. Vários outros derivados de porfirinas estão em estudo [2, 8]. As porfirinas possuem cromóforos com estrutura cíclica, o que determina sua alta rigidez (figura 2.2). Devido a isto as porfirinas são caracterizadas por possuírem alto rendimento quântico e longo tempo de vida do estado T_1 e, conseqüentemente, alta produção de oxigênio singlete. Além disto, as porfirinas possuem afinidade com várias estruturas biológicas tais como proteínas, DNA e membranas, bem como estabilidade química e fotoquímica [2, 18, 19].

Figura 2.2: Estrutura da *meso-tetrakis(4-N-methyl-pyridiniumyl)* porfirina.

A estrutura das porfirinas pode ser de base livre, ou ligada a um metal no centro do anel. A estrutura espacial também varia com a carga dos grupos laterais ligados ao anel. Além disto, a variação das condições externas como pH e força iônica podem afetar na sua carga líquida e nas características espectrais. Todas estas propriedades tornam as porfirinas promissoras para aplicação em PDT. Entretanto, o coeficiente de absorção molar das porfirinas na janela terapêutica é da ordem de $10^3 M^{-1} cm^{-1}$, que é relativamente baixo em comparação com outros fotossensibilizadores orgânicos. Tudo isto motiva a busca de outros fotossensibilizadores para PDT.

Corantes Ciânicos

Os corantes ciânicos (CC), ou polimetíneos, são compostos orgânicos que possuem um cromóforo que inclui um sistema linear de conjugação- π com dois átomos de nitrogênio nas suas extremidades (figura 2.3).

Este tipo de estrutura possibilita que os elétrons se movam dentro da cadeia de conjugação- π com certa liberdade. Os CC possuem alta absorção ($\sim 10^5 M^{-1} cm^{-1}$) na região espectral visível. As características espectrais e energéticas dos CC podem ser analisadas usando, como

Figura 2.3: Estrutura geral de um corante cianico simétrico.

uma boa aproximação, o modelo do elétron livre numa caixa com paredes de potencial infinito [20]. De acordo com este modelo, a energia de transição entre dois níveis de energia da molécula de CC que determina a posição de máximo da banda de absorção é definida pela equação:

$$\Delta E = \frac{h^2(N+1)}{8mL^2} \quad (2.24)$$

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

$$\lambda = \frac{8mcL^2}{h(N+1)} \quad (2.25)$$

O comprimento de onda do máximo de transição aumenta com L^2 , logo a energia de transição é inversamente proporcional ao quadrado do tamanho do cromóforo. Deste modo aumentando o comprimento do cromóforo é possível deslocar facilmente a posição do máximo do espectro de absorção ótica do corante para comprimentos de onda maiores para atingir a janela terapêutica. Porém o aumento do comprimento da cadeia de conjugação- π aumenta a flexibilidade da molécula e conseqüentemente as taxas dos processos não radiativos de perda de energia, diminuindo os tempos de vida e rendimentos quânticos dos estados excitados e, além disto, diminui a sua estabilidade química e fotoquímica. Portanto tem que haver um compromisso entre o aumento do comprimento do cromóforo dos CC com a perda da sua atividade e estabilidade, de modo a manter as características adequadas para a PDT. Além disto, um processo característico que ocorre para os CC é a fotoisomerização, esta abre mais um caminho para a perda de energia de excitação diminuindo ainda mais os rendimentos quânticos e os tempos de vida dos seus estados excitados.

Uma característica favorável dos CC é que as taxas dos processos não radiativos e de fotoisomerização destas moléculas diminuem quando se ligam a biomoléculas ou sistemas, aumen-

tando a sua rigidez e os rendimentos quânticos de fluorescência e do estado T_1 , bem como os tempos de vida destes. Isto realmente acontece quando os CC se ligam a moléculas de DNA e a membranas biológicas, com as quais os CC possuem alta afinidade [21]. Isto favorece a aplicação dos CC como marcadores fluorescentes destas estruturas e os torna fotossensibilizadores promissores para a PDT.

Corantes Ciânicos com Dois Cromóforos

Os corantes ciânicos com dois cromóforos (BCD) são formados por dois cromóforos lineares, semelhantes aos CC, separados por um heterociclo central (figura 2.4). A estrutura do heterociclo central determina o ângulo entre os cromóforos.

Figura 2.4: Estrutura geral dos BCD, sendo α o ângulo entre os cromóforos.

Os BCD possuem alta absorção ótica na região visível com ϵ maior que o dos CC. Além disto, diferentemente dos CC, os BCD não sofrem fotoisomerização e o deslocamento dos comprimentos de onda da sua banda de absorção para a região da janela terapêutica pode ser realizado não pelo aumento do comprimento da cadeia de conjugação- π , mas pela variação da interação entre os seus cromóforos.

Uma propriedade particular dos BCD é a presença de duas bandas de absorção na região espectral visível, cujas intensidades relativas dependem do ângulo entre os cromóforos. O aparecimento destas duas bandas ocorre pela interação entre os cromóforos do BCD por dois mecanismos: interação dipolo-dipolo entre os cromóforos e o tunelamento do elétron de um cromóforo para outro através do heterociclo central [14, 22]. Seguindo a teoria de Förster, o hamiltoniano da interação dipolo-dipolo (H) pode ser descrito como a soma dos hamiltonianos de cada cromóforo (H_1 e H_2) mais o potencial de interação dipolo-dipolo (V_{12}) entre estes:

$$H = H_1 + H_2 + V_{12} \quad (2.26)$$

$$V_{12} = \frac{\mu_1 \mu_2}{R^3} - 3 \frac{(\mu_1 R_{12})(\mu_2 R_{21})}{R_{12}^5} \quad (2.27)$$

As funções de onda que solucionam a equação de Schrödinger para este sistema podem ser escritas como o produto cruzado das funções para cada cromóforo no estado fundamental (Φ_{10} e Φ_{20}) e excitado (Φ_{1ex} e Φ_{2ex}):

$$\Psi_0 = \Phi_{10} \Phi_{20} \quad (2.28)$$

$$\Psi_{1ex} = \Phi_{1ex} \Phi_{20} \quad (2.29)$$

$$\Psi_{2ex} = \Phi_{10} \Phi_{2ex} \quad (2.30)$$

Levando em conta as propriedades de simetria das funções de onda e as equações de auto estados e auto valores de energia: $H_1 |\phi_{1a}\rangle = E_a |\phi_{1a}\rangle$, $H_2 |\phi_{2a}\rangle = E_a |\phi_{2a}\rangle$, $H_1 |\phi_{10}\rangle = E_0 |\phi_{10}\rangle$ e $H_2 |\phi_{20}\rangle = E_0 |\phi_{20}\rangle$, duas soluções são possíveis:

$$\Psi_{E^+} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_{1ex} + \Psi_{2ex}) \quad (2.31)$$

$$\Psi_{E^-} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_{1ex} - \Psi_{2ex}) \quad (2.32)$$

$$E^+ = \langle \Psi_{E^+} | H_1 + H_2 + V_{12} | \Psi_{E^+} \rangle = E_{ex} + E_0 + V_{12} \quad (2.33)$$

$$E^- = \langle \Psi_{E^-} | H_1 + H_2 + V_{12} | \Psi_{E^-} \rangle = E_{ex} + E_0 - V_{12} \quad (2.34)$$

Em que E^+ é a energia do estado excitado dada pela solução simétrica, E^- a energia do segundo estado excitado dado pela solução antissimétrica, E_{ex} é a energia do estado excitado de um cromóforo isolado, E_0 é a energia do estado fundamental de um cromóforo isolado. No caso de cromóforos não interagentes, ou seja $V_{12} = 0$, as soluções são iguais e os níveis de energia são degenerados. No caso de dois cromóforos interagentes pela interação dipolo-dipolo a diferença $E^+ - E^- = 2V_{12}$. Pode-se notar que neste caso as energias desses dois níveis E^+ e E^- possuem simetria em relação ao $E_{ex} + E_0$ (Figura 2.5) [14].

Figura 2.5: Esquema de níveis para os BCD com os efeitos de tunelamento e interação dipolo-dipolo entre os cromóforos [22].

O efeito de tunelamento pode ser estimado de forma simplificada resolvendo-se a equação de Schrödinger independente do tempo para o modelo do elétron livre numa caixa de potencial com barreira [22]. Os heterociclos laterais representam as paredes de potencial da caixa, e o heterociclo central representa a barreira de potencial no centro da caixa com altura U_0 . A largura da caixa mede $2b$ e a do heterociclo central $2a$ como é mostrado na figura 2.6.

Figura 2.6: Esquema do poço de potencial com barreira para o cálculo de energia dos BCD devido ao efeito tunel [22].

As soluções simétrica e antissimétrica da equação de Schrödinger para a energia do elétron $E_n \ll U_0$ são:

$$E_n^s = E_{n_0} \left[1 - \frac{2c}{b-a} \left(\frac{1}{\sqrt{U_0}} + \frac{c}{aU_0} \right) \right] \quad (2.35)$$

$$E_n^a = E_{n_0} \left[1 - \frac{2c}{b-a} \left(\frac{1}{\sqrt{U_0}} - \frac{c}{aU_0} \right) \right] \quad (2.36)$$

Em que E_{n_0} corresponde a energia da molécula com um cromóforo isolado. Pelo princípio de Pauli o mais alto estado quântico ocupado deve ser antissimétrico para o mesmo n , então apenas duas transições eletrônicas são permitidas para os BCD, uma com comprimento de onda curto ΔE_{shw} e outra longo ΔE_{lw} :

$$\Delta E_{shw} = E_{n+1}^a - E_n^a \quad (2.37)$$

$$\Delta E_{lw} = E_{n+1}^s - E_n^a \quad (2.38)$$

Destas duas últimas equações pode-se notar que a energia de ambas transições é menor que a energia de transição ΔE_0 para um cromóforo isolado (figura 2.5).

O efeito conjunto da interação dipolo-dipolo e tunelamento produz um *splitting* assimétrico dos níveis de energia (figura 2.5), que se reflete no aparecimento de duas bandas de absorção: uma delas está deslocada para comprimentos de onda menores e outra para maiores se comparado a uma molécula com um cromóforo. Experimentalmente foi possível bloquear o efeito de tunelamento sintetizando moléculas com um heterociclo central que não permitisse a passagem dos elétrons, e neste caso o *splitting* é simétrico conforme visto na teoria anteriormente [23].

Os cálculos mostram que a probabilidade de transição depende somente da simetria espacial da molécula. Por isso para ambas interações tem-se:

$$D_{0a\pm} = |\langle \Psi_0 | \mu_1 + \mu_2 | \Psi_{A\pm} \rangle|^2 = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \quad (2.39)$$

em que θ é o ângulo entre os cromóforos. Por esta equação, quando o ângulo entre os cromóforos é 0° aparece somente a banda de menor comprimento de onda. Quando o ângulo entre as direções dos cromóforos é igual a 180° ocorre o contrário. Isto pode ser explicado qualitativamente porque a onda eletromagnética incidente induz dipolos com o mesmo sentido nos dois cromóforos, o que aumenta a repulsão eletrostática entre estes quando ângulo é 0. Quando os dipolos são induzidos no corante com ângulo de 180° entre os cromóforos o pólo positivo de um fica ao lado do pólo negativo do outro cromóforo, diminuindo a repulsão eletrostática entre estes e aumentando a probabilidade de transição eletrônica da banda de menor energia. Já para o ângulo entre os planos dos cromóforos de 90° o efeito depende da orientação relativa entre a direção do vetor do campo elétrico da onda eletromagnética e da molécula resultando, em mé-

dia, em intensidades iguais para as duas bandas. As posições relativas e o efeito de polarização causada pela interação com a onda eletromagnética para os ângulos de 0° , 90° e 180° entre os cromóforos estão representadas na figura 2.7.

Figura 2.7: Diagrama dos níveis de energia para dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição. (a) Agregados J ; (b) Agregados H e (c) Agregados mistos. As setas indicam a orientação dos momentos de dipolo de cada monômero, as linhas contínuas e tracejadas (dos dímeros) representam a transição de maior e menor probabilidade, respectivamente [14].

2.3 Efeito dos Solventes

Esta seção foi baseada na referência [24]. A interação entre as moléculas de um soluto com as do solvente é denominada de solvatação. Esta interação pode produzir mudanças na estrutura eletrônica e espacial da molécula de soluto alterando as energias dos seus níveis eletrônicos, vibracionais e rotacionais. Isto pode afetar o perfil dos espectros de absorção e emissão do soluto e mudar a contribuição dos processos radiativos e não radiativos de desativação dos seus estados excitados. O efeito da solvatação nas moléculas pelo solvente pode ser não específico ou específico.

2.3.1 Solvatação não Específica

As interações não específicas são as que não produzem ligações químicas entre as moléculas do solvente e do soluto. Estas interações intermoleculares possuem a mesma natureza das interações discutidas na seção 2.4.

Um dos modelos, baseado em efeitos clássicos, que interpreta o efeito dos solventes não específicos é o modelo de Önsager. Este trata o solvente como um meio contínuo caracterizado pelas propriedades elétricas macroscópicas: constante dielétrica ξ e índice de refração n . Segundo este modelo a interação ocorre entre os dipolos das moléculas do solvente e do soluto, sendo que as moléculas do solvente formam uma casca esférica em torno do soluto. Dependendo da polaridade das moléculas do soluto as moléculas do solvente tendem a se reorientar em torno desta devido ao campo de reação, de modo que ocorre um rearranjo da distribuição eletrônica. Baseado neste modelo Lippert e Mataga independentemente chegaram numa equação que quantifica, em função de ξ e n do solvente, o deslocamento do máximo do espectro da emissão do soluto em relação ao espectro de absorção: deslocamento de Stokes induzido pela interação com solvente Δv_{solv} . Este deslocamento é adicional ao deslocamento de Stokes no vácuo Δv_{vacuo} . O deslocamento total de Stokes observado experimentalmente é:

$$\Delta v_{total} = v_{abs} - v_{em} = \Delta v_{vacuo} - \Delta v_{solv} \quad (2.40)$$

A natureza do deslocamento Δv_{solv} pode ser entendida da seguinte forma: quando a molécula do soluto está no estado fundamental as moléculas de solvente se orientam ao redor desta dependendo do seu momento de dipolo, permanente ou induzido pela interação com a molécula de soluto. Depois da excitação a molécula de soluto tem sua estrutura eletrônica mudada e as moléculas de solvente devem reorientar-se para se adequar a esta nova estrutura. O processo da absorção de luz é extremamente rápido ($\sim 10^{-15}s$) e devido a alta mobilidade da estrutura eletrônica das moléculas do solvente o tempo de adaptação dos seus dipolos induzidos é comparado com o tempo de transição entre os níveis energéticos da molécula de soluto e, nesta teoria, este processo de adaptação é considerado instantâneo. Entretanto a reorientação dos dipolos permanentes das moléculas de solvente é um processo muito mais lento ($10^{-12} - 10^{-11}s$) e estes se reorientam já depois da excitação do soluto. Devido a esta reorientação o nível do estado excitado do sistema soluto + solvente diminui durante o tempo de vida do estado excitado do soluto (10^{-9}). Por isto a desativação do soluto acontece do nível de menor energia o qual este foi excitado (figura 2.8). Depois da desativação deste nível a estrutura eletrônica da molécula de soluto volta para sua estrutura característica do estado fundamental. O processo de emissão de um fóton pela molécula é também da ordem de $10^{-15}s$. Neste caso a orientação dos dipolos permanentes das moléculas de solvente, que foram adaptados para estado excitado do soluto, novamente não se adequa ao estado fundamental e durante $10^{-12} - 10^{-11}s$ estes se reorientam abaixando o nível fundamental do sistema soluto + solvente (figura 2.8). Finalmente aparece a diferença entre a energia de excitação e de emissão do soluto induzida pela sua interação com

solvente que se reflete em Δv_{solv} . Portanto, somente a reorientação dos dipolos permanentes das moléculas de solvente é responsável pelo aparecimento de Δv_{solv} .

Figura 2.8: Representação do efeito da reorientação dos dipolos permanentes do solvente nos níveis eletrônicos do soluto. $\rightsquigarrow$ representa a diminuição do nível durante a reorientação dos dipolos.

No modelo de Lippert a molécula do soluto é considerada um dipolo pontual num meio dielétrico contínuo. Neste caso a energia do dipolo é dada por:

$$E = -\mu R \quad (2.41)$$

Em que R é o campo reativo causado pela redistribuição das cargas na casca de solvatação. O campo reativo é paralelo e oposto a direção do dipolo formado pela molécula do soluto e proporcional a sua magnitude:

$$R = 2 \frac{\mu}{\alpha^3} f \quad (2.42)$$

Nesta equação α é o raio da cavidade formada pelas moléculas do solvente em torno da molécula do soluto e f é polarizabilidade do solvente.

O fator f se associa com ambos momentos dipolos das moléculas do solvente, ou seja tanto momentos de dipolos permanentes quanto induzidos pela interação com a molécula do soluto. A constante dielétrica ξ do solvente também se associa com ambos tipos de dipolos do solvente. Da teoria têm-se que a polarizabilidade do solvente é:

$$f = \frac{\xi - 1}{2\xi + 1} \quad (2.43)$$

Por outro lado, parte da polarizabilidade do solvente associada com seus momentos de dipolos

induzidos se liga com seu índice da refração n através da equação:

$$f_n = \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2.44)$$

Pois Δv_{solv} se associa somente com dipolos permanentes do solvente ele deve depender da diferença $f - f_n$. Realmente a teoria mostra que Δv_{solv} é dado pela equação de Lippert:

$$\Delta v_{total} = \Delta v_{total} - \Delta v_{solv} \simeq \frac{2\Delta_f(\mu^* - \mu)}{hc\alpha^3} \quad (2.45)$$

em que μ é o momento de dipolo da molécula do soluto no estado excitado (*) e fundamental, respectivamente, h é a constante do Planck, c é a velocidade da luz e Δ_f é:

$$\Delta f = f - f_n = \frac{\xi - 1}{2\xi + 1} - \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (2.46)$$

Se o solvente não possui momento de dipolo permanente temos:

$$\xi \simeq n^2 \rightarrow \Delta f \simeq 0 \Delta v_{solv} \simeq 0 \quad (2.47)$$

Pois o tempo de reorientação dos dipolos permanentes do solvente depende da temperatura e da viscosidade do solvente Δv_{solv} também depende da temperatura e da viscosidade.

2.3.2 Solvatação Específica

A equação de Lippert apesar de ser baseada em conceitos clássicos e simples, dependência apenas de parâmetros macroscópicos como índice de refração e constante dielétrica, descreve bem o comportamento de moléculas em solventes que não formam ligações de hidrogênio (apróticos) ou não são capazes de formar complexos de transferência da carga (*Charge Transfer Complexes*, CTC) entre soluto e solvente. Já em solventes próticos, que formam ligações de hidrogênio ou na presença de CTC, as interações específicas são dominantes e este modelo falha. Neste caso o tratamento deve incluir uma análise com bases moleculares do sistema soluto + solvente.

Assim a solvatação específica é considerada como aquela que influencia na estrutura da molécula através da formação de ligações de hidrogênio e/ou a formação de CTC, por exemplo a formação de complexos- π [25]. A ligação de hidrogênio tem uma importância especial pois estas são responsáveis pelas propriedades peculiares da água e, apesar de ocorrer em outros

solventes, na estrutura da água este tipo de ligação é responsável por propriedades diferenciadas como o forte direcionamento das ligações hidrogênio. Deste modo as ligações de hidrogênio determinam a estrutura da água e outros solventes próticos, tanto puros quanto na presença de um soluto. As ligações de hidrogênio determinam a estrutura espacial de sistemas biológicos tais como DNA e proteínas. Os complexos- π são responsáveis pela formação e estabilidade dos agregados H de compostos orgânicos que possuem um sistema desenvolvido de conjugação- π , e este é um processo comum para estes compostos [18, 26, 27]. A formação dos complexos ou ligações de hidrogênio entre moléculas de soluto e solvente pode modificar a estrutura espacial das moléculas de soluto.

A interação dos BCD com solventes próticos produz efeitos devido as ligações de hidrogênio que são importantes nas características energéticas dos BCD. A Ligação de hidrogênio é uma interação atrativa que consiste no compartilhamento do átomo de hidrogênio entre dois átomos eletronegativos, porém com distâncias diferentes entre o átomo de hidrogênio e os dois eletronegativos na forma $A - H \cdots B$ em que A e B são elementos eletronegativos e B tem um par isolado de elétrons. Para a molécula de água a distância típica da ligação covalente $O - H$ é de $0,1nm$, enquanto que na ligação de hidrogênio $H \cdots O$ é de $0,17nm$. Devido as ligações de hidrogênio os compostos sofrem mudanças de suas características espectroscópicas e físico-químicas tais como: aumento dos pontos de fusão e ebulição, mudança das posições e intensidades das bandas de absorção e fluorescência, tempos de vida, rendimentos quânticos dos estados excitados, entre outros. Um exemplo típico é o deslocamento para menores comprimentos de onda de um composto quando aumenta-se a constante dielétrica que só pode ser entendido pelas interações específicas, pois segundo a equação de Lippert este deslocamento espectral deveria ser para maiores comprimentos de onda quanto maior fosse a constante dielétrica do solvente.

Em muitos casos as ligações de hidrogênio com solventes estabilizam a estrutura das moléculas de soluto tornando elas mais rígidas. Isto se reflete no aumento dos rendimentos quânticos dos processos radiativos de perda de energia de excitação dessas moléculas e no aumento do tempo de vida dos seus estados excitados.

2.4 Agregados

O fenômeno de agregação é de grande importância na natureza. O elemento principal na arquitetura da célula viva, a membrana, é o resultado de agregação dos fosfolipídios que formam uma bicamada separando o interior da célula do ambiente exterior. Em plantas a fotossíntese ocorre devido a antenas de armazenamento de luz e centros fotoreativos, os quais são compostos

de uma associação de moléculas de clorofila.

Um agregado pode ser considerado como um aglomerado de algumas partículas ou moléculas que se juntam sem ligações químicas. Este é caracterizado pela sua estrutura espacial (posição relativa de partículas dentro do agregado) e pelo número de agregação n (número médio de partículas no agregado). O tamanho destes sistemas complexos pode variar de poucos nanômetros (micelas) a vários micrômetros ou mais (filmes finos, membranas). Os agregados podem ser homogêneos ou heterogêneos. Os homogêneos são constituídos de moléculas (monômeros) do mesmo composto que se unem formando agregados de diversos graus de agregação (dímeros, trímeros, quadrímeros, etc.), e os heterogêneos são os que incluem na sua estrutura moléculas diferentes.

Os estudos da agregação de compostos em sua interação com sistemas biológicos e biomiméticos são de grande importância para a medicina e a biologia bem como para o desenvolvimento tecnológico. Em particular a agregação afeta a atividade fotodinâmica dos fotossensibilizadores pois induz a redução dos rendimentos quânticos e tempos de vida dos estados excitados singlete e tripleto e conseqüentemente reduz a produção de oxigênio singlete [19, 28]. Os efeitos que são responsáveis pela formação de agregados são interação hidrofóbica, eletrostática e formação de ligação de hidrogênio e complexos- π .

Interação Hidrofóbica

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

Interação Eletrostática

Em agregados homogêneos formados por moléculas carregadas, as últimas moléculas sofrem repulsão eletrostática cuja energia é a energia coulombiana.

$$W_Q = \frac{Q}{4\pi\epsilon_0 r^2} \quad (2.48)$$

Em que Q é a carga do monômero, ϵ_0 é a constante dielétrica do meio e r é a distância entre os monômeros.

Quando os monômeros possuem momentos de dipolos permanentes a força entre eles depende da sua orientação relativa. Para os dipolos livres a força resultante é atrativa. A energia dessa interação (energia de Keesom) é dada por:

$$W_k = -\frac{\mu^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 k T r^6} \quad (2.49)$$

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

Além dessas interações, entre duas moléculas ou dois átomos sempre existe uma força atrativa conhecida como força de London, força de dispersão ou força de dispersão de van der Waals. A origem desta força é a interação entre dois dipolos que cada partícula induz uma na outra. A energia dessa interação é dada por:

$$W_L = -\frac{3}{4} \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (2.50)$$

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

Entre essas três interações a eletrostática é de longo alcance, pois é proporcional a r^{-2} . As duas atrativas, proporcionais a r^{-6} , são mais eficientes em distâncias curtas. Além disso, para distâncias muito curtas entre as moléculas mais uma interação repulsiva se destaca devido à repulsão entre os núcleos dos átomos que compõem as moléculas. Essa interação repulsiva é proporcional a r^{-12} . Para moléculas que possuem mesma carga, a energia potencial da interação total pode ser apresentada pelo potencial de Lennard-Jones mais a energia da repulsão eletrostática (figura 2.9). Finalmente, para se associar e atingir o mínimo da energia potencial as moléculas carregadas devem ultrapassar uma barreira de potencial, que existe devido à repulsão eletrostática. De modo contrário, para agregados heterogêneos formados pelas moléculas com cargas opostas, a atração eletrostática entre estes favorece a agregação.

Ligação de Hidrogênio

Figura 2.9: Curvas de energia potencial para interação entre partículas.

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

Complexos- π

A formação de agregados é um processo comum para os compostos orgânicos com sistema de conjugação- π . As moléculas com sistemas desenvolvidos de conjugação- π são capazes de formar complexos através da sobreposição de suas nuvens de elétrons- π (figura 2.10) [25]. Portanto esse tipo de ligação é eficiente somente para distâncias curtas. A interação $\pi - \pi$ diminui na presença de sal, pois os íons formam uma barreira que impede a aproximação necessária para a formação do complexo (figura 2.10-b).

Entre os agregados moleculares existem duas importantes classes que possuem um arranjo altamente ordenado das moléculas que os constituem. Eles são conhecidos como agregados J e H , nos quais as moléculas estão dispostas em diferentes modos. O agregado J é um arranjo de moléculas dispostas lado a lado enquanto que arranjos de moléculas dispostas face a face são chamados agregados H . Ainda, em muitos casos, podem ser observados os agregados mistos HJ , onde o contato face a face não é completo (figura 2.11).

A estabilidade do agregado depende da área de contato entre os monômeros. Por isso, os

Figura 2.10: Sobreposição de nuvens de elétrons- π durante agregação de duas moléculas na ausência (a) e na presença (b) de íons de sal (positivos ou negativos) [[25]].

Figura 2.11: Geometria dos agregados H , J e misto.

agregados H , em que as moléculas possuem uma maior área de contato, deveriam ser mais estáveis. Contudo vários fatores podem atrapalhar a formação de agregados do tipo H favorecendo a formação de agregados do tipo J . A primeira descrição para a formação de agregados J ocorreu em 1936 [29]. Estes eram agregados unidimensionais de cianinas, os quais são usados como eficientes fotossensibilizadores em emulsões fotográficas. Algumas porfirinas iônicas que formam agregados similares foram descobertas posteriormente, em 1971 [30].

As propriedades eletrônicas e óticas dos agregados moleculares são diferentes daquelas dos seus monômeros constituintes. A formação e posição dos níveis energéticos e, conseqüentemente, a formação dos espectros de absorção dos agregados têm sido explicadas pela teoria dos excitons [12] e segue a mesma discussão que foi feita para os monômeros interagentes de BCD. Da mesma forma que para os BCD os níveis de energia dos agregados dependem da orientação relativa entre os dipolos dos monômeros, assim as intensidades relativas e as posições das bandas dos espectros de absorção dependem do ângulo entre os dipolos das moléculas, que formam os agregados, e podem ser calculadas pelas equações dadas nesta seção.

A característica principal dos agregados J é que estes exibem uma banda de absorção ótica deslocada para o vermelho em relação a banda de absorção do monômero. O espectro de absorção do agregado H consiste em uma banda deslocada para o azul em relação a absorção do monômero.

3 *Objetivo*

O objetivo deste trabalho, tendo em vista a possível aplicação dos corantes ciânicos com dois cromóforos como fotossensibilizadores em PDT, foi estudar:

- Os espectros de absorção ótica e de fluorescência bem como as características energéticas e cinéticas dos seus estados excitados, singlete e tripleto, em função da sua estrutura espacial e das características do ambiente (natureza e composição dos solventes, força iônica) e da presença de estruturas microorganizados, tais como micelas e DNA.
- Dinâmica da sua fototransformação em soluções aquosas em função da sua estrutura, da sua concentração e da presença do oxigênio.

Para melhor entendimento da formação dos espectros dos BCD e dos mecanismos da sua fototransformação os resultados experimentais foram analisados em comparação com resultados de cálculos quânticos semiempíricos, onde foram calculados os níveis da energia dos orbitais HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) dos BCD, a distribuição eletrônica nestes estados e suas estruturas espaciais mais prováveis.

3.1 Objeto de Estudo

Neste projeto foram estudado 4 isômeros de corantes ciânicos com dois cromóforos que se diferenciam pelo ângulo entre os cromóforos. Em $pH = 7,0$ estes possuem carga líquida +2 devido a presença de átomos de nitrogênio na sua estrutura. As estruturas estão apresentadas nas figuras 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4.

Figura 3.1: Estrutura do BCD 180.

Figura 3.2: Estrutura do BCD 150.

Figura 3.3: Estrutura do BCD 120.

Figura 3.4: Estrutura do BCD 90.

4 *Métodos Experimentais*

De um modo geral este capítulo foi baseado nas referências [12–14, 31].

4.1 Caracterização do Estado Singlete

4.1.1 Absorção Ótica

O método de absorção ótica é um dos principais testes experimentais para iniciar o estudo de uma amostra desconhecida. Este método caracteriza em qual região do espectro UV - visível - infravermelho próximo (190nm a 1100nm) a amostra absorve a radiação, e com qual intensidade isto acontece. Os espectros de absorção dos compostos mudam a posição, intensidade e perfil das bandas de absorção em função das características do meio, tais como: constante dielétrica, pH, capacidade de formar ligações hidrogênio, etc. Por isto, este é um poderoso método para estudar a estrutura das moléculas e os efeitos do ambiente nas suas características. Também é muito útil no estudo da interação das moléculas com sistemas microorganizados como membranas celulares e biopolímeros, entre outros. Através dos dados de absorção ótica é possível estudar a dinâmica de vários processos, bem como calcular parâmetros relevantes da molécula nestes processos.

A absorção ótica de um composto ocorre quando a molécula absorve um fóton e passa de um estado de menor energia para outro com maior. Esta absorção acontece somente quando obedece a condição:

$$h\nu = E_f - E_i \quad (4.1)$$

em que $h\nu$ é a energia do fóton, E_f e E_i são as energias do estado final e do inicial da molécula. O espectro de absorção ótica é então uma medida da intensidade da energia luminosa absorvida pelo composto, $I_{abs}(\lambda)$, em função da energia dos fótons incidentes. Esta medida pode ser relatada como função do comprimento de onda λ ou da frequência ν .

Seguindo a lei de Lamber-Beer:

$$I_{abs}(\lambda) = I_0 \left(1 - 10^{-A(\lambda)} \right) \quad (4.2)$$

em que I_0 é a intensidade da luz incidente e $A(\lambda)$ a absorbância da molécula. Esta última pode ser escrita como:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) Cl \quad (4.3)$$

Sendo $\varepsilon(\lambda)$ o coeficiente de absorção molar do composto, C é sua concentração e l o caminho que a luz percorre dentro do objeto. A função $\varepsilon(\lambda)$ é característica para cada molécula, e uma vez determinada esta pode ser usada para calcular a concentração das soluções pelo método de absorção ótica.

Quando uma solução é composta por diferentes moléculas absorvedoras as quais mantêm suas propriedades individuais (não reagem entre si), a absorção de cada composto ou espécie ocorre separadamente, portanto pode-se escrever a absorbância total das moléculas como a soma das absorbâncias individuais $A_n(\lambda)$ dos n tipos de moléculas diferentes para o mesmo λ :

$$I_{abs}(\lambda) = I_0 \left(1 - 10^{-[A_1(\lambda)+A_2(\lambda)+\dots+A_n(\lambda)]} \right) \quad (4.4)$$

Quando os $\varepsilon_n(\lambda)$ são conhecidos, a análise de $I_{abs}(\lambda)$ permite determinar a concentração de cada tipo de molécula, e se fizer esta análise em função do tempo pode-se obter informações sobre a dinâmica de transformação das moléculas individualmente.

4.1.2 Fluorescência Estática

A fluorescência é um processo em que a molécula perde o excesso de energia pela emissão de um fóton. A transição eletrônica nesse caso ocorre entre estados de mesma multiplicidade de spin (seção 2.1.2). Para a maioria das moléculas orgânicas, devido aos processos de inter-conversão e relaxação vibracional, a fluorescência acontece pela transição do elétron do mais baixo estado vibracional do primeiro estado excitado S_1 para o fundamental S_0 , o que significa que para estes casos o espectro de fluorescência não depende do comprimento de onda da excitação. Tipicamente o máximo do espectro de fluorescência tem menor energia em relação ao de absorção ótica. A este deslocamento espectral dá-se o nome de deslocamento de Stokes.

O mecanismo de fluorescência compete com outros mecanismos de perda de energia, e esta competição determina o rendimento quântico de fluorescência de um composto. O rendimento

quântico de fluorescência ϕ_{fl} pode ser obtido pela razão do número de fótons emitidos n_{em} pelos absorvidos n_{abs} :

$$\phi_{fl} = \frac{n_{em}}{n_{abs}} \quad (4.5)$$

O número de fótons emitidos pode ser obtido experimentalmente pela integração do espectro de fluorescência, resultando em:

$$\phi_{fl} = \frac{B_1 \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) d\lambda}{B_2 I_0 (1 - 10^{-A(\lambda)})} \quad (4.6)$$

Em que B_1 e B_2 são coeficientes que levam em conta as características dos aparelhos. Para evitar a necessidade de determinar estas constantes, ϕ_{fl} pode ser medido pela razão entre uma amostra conhecida (padrão) pelo composto que se deseja determinar. Se o padrão e a amostra têm espectros da fluorescência na mesma região, e o padrão e a amostra estão excitados no mesmo comprimento de onda, os coeficientes B em ambos os casos são iguais a equação torna-se:

$$\phi_{fluo} = \frac{(1 - 10^{-A^P(\lambda)}) \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I^A(\lambda) d\lambda}{(1 - 10^{-A^A(\lambda)}) \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I^P(\lambda) d\lambda} * \phi_{fluo}^P \quad (4.7)$$

Os índices A e P se referem a amostra e padrão, respectivamente.

4.1.3 Tempo de Vida de Fluorescência

O decaimento temporal da intensidade da fluorescência da uma espécie excitada segue a forma exponencial:

$$I_{fl} = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (4.8)$$

em que τ é o tempo de vida do estado excitado S_1 dessa espécie cuja valor é o inverso da soma das constantes de desativação deste estado:

$$\tau = \frac{1}{k_{fl} + k_{IC} + k_{ISC1}} \quad (4.9)$$

Em que a constante radiativa k_{flu} e as não radiativas k_{IC} e k_{ISC1} , são as constantes de perda de energia por fluorescência, conversão interna e por cruzamento intersistêmico do estado S_1 para o estado T_1 .

O rendimento quântico de fluorescência pode ser obtido pela equação:

$$\phi_{flu} = \frac{k_{flu}}{k_{flu} + k_{IC} + k_{ISC1}} = \tau k_{flu} \quad (4.10)$$

Pode-se observar que as constantes não radiativas k_{IC} e k_{ISC1} diminuem enquanto τ_S e ϕ_{fl} aumentam. Dentre os fatores que podem diminuir os valores de k_{IC} e k_{ISC1} a interação com ambiente é uma das principais. Por isto, além do conhecimento dos valores de τ_S e ϕ_{fl} ter sua importância própria para caracterizar uma molécula, a determinação destes valores em função da estrutura do ambiente pode dar informações sobre a interação da molécula com ambiente.

Neste trabalho para determinar τ_S utilizamos dois métodos: *Single Photon Counting* e o método resolvido na frequência.

No primeiro método a amostra é excitada com luz pulsada, com largura do pulso menor que o tempo de vida do estado S_1 , de modo que uma rampa de tensão é acionada quando a excitação é feita e desativada quando o fóton fluorescente é recebido pelo sistema de detecção. Assim a amplitude da rampa é proporcional a distância entre os momentos de excitação e de recebimento do fóton de fluorescência. Portanto a fluorescência obtida $F(t)$ é função do pulso de luz $G(t)$ de excitação convoluída com a fluorescência $f(t)$ da molécula:

$$F(t) = \int_0^t G(t') f(t-t') dt' \quad (4.11)$$

O tempo de vida é extraído do ajuste dos dados e da posterior deconvolução.

A probabilidade de receber o fóton é maior quando maior a intensidade da fluorescência. Repetindo a excitação várias vezes obtém-se uma diagrama de intensidade da fluorescência pelo tempo. Os tempos típicos de fluorescência são da ordem de nanosegundos, sendo que a largura do pulso de excitação deve estar na faixa de pico a femtosegundos.

Caso haja na solução uma mistura de diferentes espécies fluorescentes com tempos de decaimentos dos estados excitados diferentes, o perfil de decaimento então será a soma de mono-exponenciais respectivas a cada espécie. Deste modo é possível identificar a presença de várias espécies com tempos de vida diferentes no decaimento total.

Para determinar τ_S pelo método de single photon counting utilizamos um aparelho da Spec-

tra Physics que é composto pela laser Ti:safira Tsunami 3950, bombeado por um laser de estado sólido Millenia X também da Spectra Physics. Os pulsos apresentam largura temporal de $5ps$ e foram aplicados a uma taxa de repetição de $8MHz$. O laser passa por um cristal de LBO (dobrador de frequências) que gera um feixe a $465nm$ e em seguida é direcionado para a amostra. Os fótons provenientes da emissão são detectados por um espectrofotômetro da Edinburgh F900 com uma configuração em formato de L. O comprimento de onda foi selecionado por um monocromador. A largura a meia altura da função de resposta do instrumento foi tipicamente de $60ps$. Medidas de decaimento da fluorescência foram realizadas usando uma resolução temporal de $24ps$ por canal. O *software* da *Edinburgh Instruments* foi empregado para analisar as curvas individuais de decaimento. A adequação do ajuste do decaimento foi analisada pela inspeção das curvas de peso residual e por parâmetros estatísticos como o chi-quadrado.

Outro método usado foi o resolvido na frequência [32]. Este método consiste em excitar a amostra com luz modulada na frequência e na amplitude e depois medir a diferença de fase e de modulação entre a luz de excitação e emissão. Deste modo podemos escrever a equação para o número de moléculas excitadas (x) que emitem fluorescência pelo tempo:

$$\frac{dx}{dt} = -Kx + E(t) \quad (4.12)$$

em que $K = \frac{1}{\tau}$ é a constante de decaimento da molécula e $E(t)$ a luz de excitação:

$$E(t) = E_0 [1 + M_E \sin \omega t] \quad (4.13)$$

M_E é a modulação da luz e E_0 a amplitude e ω a frequência do campo. A emissão $F(t)$ é proporcional a x e pode ser escrita como:

$$F(t) = F_0 [1 + M_F \sin(\omega t + \phi)] \quad (4.14)$$

Em que M_F é a modulação e F_0 a amplitude e ϕ a fase da luz. Como $F(t)$ é proporcional a x , e fazendo a derivação, pode-se escrever a equação 4.12 em função de $F(t)$:

$$F_0 M_F \omega (\cos \omega t \cos \phi + \sin \omega t \sin \phi) = -K F_0 [1 + M_F (\sin \omega t \cos \phi - \cos \omega t \sin \phi) + E_0 (1 + M_E \sin \omega t)] \quad (4.15)$$

Como a equação 4.15 deve ser válida independente de t , o termo constante deve ser zero bem como os termos de $\cos \omega t$ e $\sin \omega t$, o que resulta em:

$$\frac{F_0}{E_0} = \frac{1}{K} \quad (4.16)$$

E da anulação dos coeficientes dos cossenos:

$$F_0 M_F \omega \cos \phi = -K F_0 M_F \sin \phi \quad (4.17)$$

Que resulta na primeira relação básica da fluorescência resolvida na frequência:

$$\tan \phi = \frac{\omega}{K} = \tau \omega \quad (4.18)$$

O ângulo ϕ é a diferença de fase entre a emissão e excitação. Da anulação dos coeficientes dos senos obtém-se:

$$F_0 M_F \omega \sin \phi = -K F_0 M_F \cos \phi + E_0 M_E \quad (4.19)$$

Multiplicando ambos os lados por $\cos \phi$ e usando as equações 4.17 e 4.18, obtém-se a segunda relação básica:

$$\cos \phi = \frac{M_F}{M_E} \quad (4.20)$$

Em que a razão $\frac{M_F}{M_E}$ é chamada de modulação da emissão de fluorescência.

Quando há mais de um tempo de vida a equação envolvendo as frações de cada espécie emissora fica:

$$\tan \phi = \frac{\sum f_i M_i \sin \Phi_i}{\sum f_i M_i \cos \Phi_i} \quad (4.21)$$

$$M^2 = (\sum f_i M_i \sin \Phi_i)^2 + (\sum f_i M_i \cos \Phi_i)^2 \quad (4.22)$$

E o experimento resulta num gráfico (figura 4.1) da fase e modulação em função da frequência, e é feito varrendo várias frequências (neste caso de 3MHz a 470MHz) da luz e fazendo o ajuste dos pontos com o uso de um algoritmo especialmente desenvolvido para isto [32]. O ajuste dos dados pode ser feito usando funções de distribuição com lorentziana e gaussiana, entre outras, ou função discreta.

Neste trabalho foi utilizado o fluorômetro K2 da empresa ISS, e como fonte de luz foi utilizada a linha de luz síncrotron VUVF (Ultra-Violeta/Visível) do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS).

Figura 4.1: Exemplo de ajuste dos dados experimentais obtidos pelo método de fluorescência resolvida na frequência. Excitação 470nm , tempo de vida $4,0\text{ns}$ e $\chi^2 = 0,85$.

4.2 Caracterização do Estado Tripleto

A grande maioria das moléculas na natureza tem no estado fundamental a multiplicidade de spin singleto ($2S + 1 = 1$). Por isto os equipamentos convencionais de absorção ótica medem espectros $S - S$. Entretanto o estado tripleto possui um papel importante em vários processos. Em particular, o oxigênio singleto se forma através da transferência da energia do estado tripleto do fotossensibilizador para molécula de oxigênio (seção 2.2). Por esta razão o estudo das características do estado tripleto como: espectros de absorção, tempos de vida, rendimentos quânticos etc. é de grande importância. Para estudar as características do estado T_1 é necessário populá-lo através do cruzamento intersistêmico do estado S_1 (seção 2.1.2).

4.2.1 Método de Flash-Fotólise.

A população do estado tripleto pode ser conseguida com o uso de uma fonte que emite pulsos curtos e intensos da luz (laser, por exemplo). Posteriormente se analisa as mudanças estáticas e/ou temporais de absorção dos estados $T - T$ em função de algum parâmetro como presença de biomoléculas, efeito de solventes, força iônica, etc. Este método é denominado de flash-fotólise.

Com um pulso intenso de excitação consegue-se popular um grande número de moléculas no estado S_1 num tempo algumas vezes mais longo do que o tempo de vida do estado S_1 ($\simeq ns$) e mais curto do que o tempo de vida do estado T_1 ($\simeq \mu s$). Parte das moléculas excitadas irão do estado S_1 para estado T_1 e outras voltam para estado fundamental S_0 . Estas últimas podem

ser excitadas novamente na duração do mesmo pulso, levando mais moléculas para o estado T_1 . Pois como o tempo de pulso é mais curto que o tempo de vida do estado T_1 , este estado não decai durante o pulso de excitação e cada vez mais moléculas passam para este estado. Assim, aumentando a energia e duração do pulso, que deve ser muito mais curto do que o tempo de vida do estado T_1 , podemos chegar na fase de saturação quando praticamente todas moléculas estão no estado T_1 .

Quando o estado T_1 já está parcialmente populado pode-se usar um sistema de análise de absorção ótica normal em ângulo reto em relação ao feixe de excitação promovendo a absorção $T - T$. Geralmente para monitorar o espectro de absorção $T - T$ o monocromador da luz de análise é fixado num dado comprimento de onda. Muitas vezes o espectro $S - S$ superpõe-se com o espectro $T - T$, neste caso a absorbância da molécula será dada pela equação:

$$A = A_{SS} + A_{TT} = \epsilon_S C_S + \epsilon_T C_T \quad (4.23)$$

em que A_{S-S} e A_{T-T} são as absorbâncias das moléculas no estado S_0 e T_1 , ϵ_S e ϵ_T são coeficientes de absorção molar do estado S_0 e T_1 e C_S , C_T são as concentrações das moléculas nos estados S_0 e T_1 , respectivamente. Lembrando que $C_S + C_T = C_0$ (C_0 é a concentração do composto). Desta forma pode-se reescrever a equação 4.23:

$$A = \epsilon_S C_0 + (\epsilon_T - \epsilon_S) C_T = A_0 + (\epsilon_T - \epsilon_S) C_T \quad (4.24)$$

em que A_0 é a absorbância da molécula no comprimento de onda de análise antes de excitação. Repetindo o mesmo procedimento em vários comprimentos de onda pode-se obter ponto a ponto o espectro diferencial $A(\lambda)$, no intervalo desejado.

Na equação 4.24 têm-se dois parâmetros não definidos: C_T e ϵ_T . Por isto, para conseguir o espectro $T - T$ real ($\epsilon_T = \epsilon_T(\lambda)$) é necessário obter o valor de C_T definido, isto se faz quando é atingido a fase de saturação onde $C_T = C_0$. Neste caso $\epsilon_T = \frac{A(\lambda)}{C_0}$. Da equação 4.24 nota-se que A é proporcional a C_T . Assim, analisando a dependência de A com o tempo obtém-se a dependência temporal da população do estado T_1 e calcula-se o tempo de vida τ_T deste estado.

O rendimento quântico de formação do estado tripleto ϕ_T é definido como o número de moléculas que sofreram ISC e passaram para estado T_1 (n_T) sobre número de moléculas que absorveram luz (n_{abs}):

$$\phi_T = \frac{n_T}{n_S} = \frac{B_1 \left(1 - 10^{-A_T(\lambda)}\right) I_T(\lambda)}{B_2 \left(1 - 10^{-A_S(\lambda)}\right) I_S(\lambda)} \approx \frac{B_1 A_T I_T(\lambda)}{B_2 A_S I_S(\lambda)} \quad (4.25)$$

Em que I_S e I_T são as intensidades da luz incidente nos comprimentos de onda de excitação e

de observação, respectivamente. A_S é a absorbância da molécula no comprimento de onda de excitação antes de excitação, e A_T é a absorbância do estado T_1 no comprimento de onda de análise imediatamente depois do pulso de excitação. Os coeficientes B_1 e B_2 são os que levam em conta as características do equipamento.

Uma das maneiras para obter o ϕ_T é usar o método de flash-fotólise variando a energia do pulso incidente e medindo a absorção $T - T$ até a fase de saturação. Desta forma obtém-se uma relação entre a absorção diferencial e a energia do pulso de excitação E e calcula-se a constante angular $tg\alpha$ através do ajuste linear:

$$A_T(E) = (tg\alpha)E \quad (4.26)$$

Para evitar os problemas com a necessidade determinar os coeficientes B_1 e B_2 é útil usar o método com uma amostra padrão. Neste método realizamos as medidas de $A_T(E)$ para uma solução padrão (p) e para a amostra que se quer medir (x) ajustando A_S do padrão e da amostra iguais e aplicando as equações 4.25 e 4.26 obtém-se ϕ_T como:

$$\phi_T^x = \frac{tg\alpha^x}{tg\alpha^p} \phi_T^p \quad (4.27)$$

O ϕ_T também pode ser obtido pela relação das constantes dos processos monomoleculares:

$$\phi_T = \frac{k_{ISC1}}{k_{flu} + k_{IC} + k_{ISC1} + \sum K_{Sqi}[Q_i]} = \tau_{S1} k_{ISC1} \quad (4.28)$$

em que K_{Sqi} são taxas de supressão do estado S_1 pelos supressores Q_i . Assim, quando ϕ_T e τ_{S1} forem determinados pode-se calcular k_{ISC1} .

Na presença de supressores Q_i a velocidade da desativação do estado tripleto é:

$$\frac{d[T]}{dt} = -[T] (k_{fos} + k_{ISC2} + \sum K_{Tqi}[Q_i]) \quad (4.29)$$

em que k_{ISC2} é a taxa de transição $T_1 \rightarrow S_0$, k_{fos} é a taxa de fosforescência, K_{Tqi} são taxas de supressão do estado T_1 pelos supressores Q_i e $[Q_i]$ são as concentrações desses supressores.

Quando $[Q_i] \gg [T]$ a dependência temporal de $[T]$ pode ser apresentada como:

$$[T] = [T]_0 e^{-t(k_{fos} + k_{ISC2} + \sum K_{Tqi}[Q_i])} \quad (4.30)$$

E o tempo de vida do estado tripleto τ_T pode ser obtido do ajuste da equação 4.30 como:

$$\tau_T = \frac{1}{k_{fos} + k_{ISC2} + \sum K_{Tqi}[Q_i]} \quad (4.31)$$

Para realizar a medida de τ_T a largura do pulso da excitação tem de ser muito menor que os tempos de vida típicos dos estados tripletos (μs). Neste trabalho foi utilizado um aparelho de flash-fotólise *Spectron Laser System* SL400 fazendo a excitação através do segundo harmônico do laser Nd:YAG com largura do pulso de $10ns$.

4.2.2 Fosforescência

A fosforescência é a emissão de um fóton devido a transição da molécula entre dois estados que possuem estado de spin diferentes (por exemplo, entre estados T_1 e S_0). O processo é proibido devido a mudança de spin e por este motivo o tempo de vida da duração da fosforescência é longo ($> \mu s$) comparado ao de fluorescência ($\sim ns$).

A análise do espectro de fosforescência fornece a energia do estado T_1 . Entretanto, em solução na temperatura ambiente ($25^\circ C$) na maioria dos casos os processos não radiativos competem efetivamente com a fosforescência. Por esta razão para obter o espectro de fosforescência faz-se experimentos a temperatura de $77K$ (nitrogênio líquido) e normalmente usam-se solventes que formem vidro nesta temperatura. Deste modo diminuem-se os processos não radiativos e bimoleculares. A fosforescência pode ser medida em fluorímetros estáticos ou temporalmente com a técnica de flash-fotólise. Neste trabalho foi utilizado o fluorímetro SPEX Fluorog 111.

4.2.3 Calorimetria Fotoacústica Resolvida no Tempo (PAC)

Além de método de flash-fotólise para estudos de estado tripleto utilizamos neste trabalho outro método denominado de Calorimetria Fotoacústica Resolvida no Tempo. Este capítulo foi baseado nas referências [33–35].

A calorimetria fotoacústica resolvida no tempo está baseada na detecção de uma onda acústica gerada no meio pela perda de energia não radiativa do composto ϕ_{nr} depositado durante o tempo τ_n correspondente aos tempos de decaimento dos processos não radiativos da molécula. Estas frações produzem calor e perturbam o meio produzindo uma onda de pressão que será detectada por um microfone. A equação que descreve o movimento de uma onda acústica num meio é:

$$\nabla^2 \Psi(\vec{r}, t) - \frac{1}{v^2} \frac{d^2 \Psi(\vec{r}, t)}{dt^2} = -4\pi h(\vec{r}, t) \quad (4.32)$$

Sendo v a velocidade do som neste meio, que é assumido como sendo não dispersivo e linear. A solução desta equação é dada pela função de Green $g(\vec{r}, \vec{r}', t, t')$ para uma fonte arbitrária $h(\vec{r}, t)$ que produz a onda. Para o caso específico em que a onda é produzida por um decaimento não radiativo de um único transiente com tempo de vida τ , a amplitude da onda no detector $\Psi(\vec{r}_0, t)$ é dado por:

$$\Psi(\vec{r}_0, t) = \frac{e^{-\frac{t}{\tau}}}{\tau} \theta(t'') \frac{1}{4\pi r_0} \int \int d\vec{r} dt' h(\vec{r}, t') \quad (4.33)$$

Em que $\theta(t'')$ é a função degrau de Heaviside. Esta função descreve a amplitude a qual a onda atingirá o detector que a transformará em sinal elétrico. O detector pode ser considerado como sendo um oscilador amortecido, cuja função tem uma frequência característica γ e tempo de relaxamento $t_0 \gg \frac{1}{\gamma}$.

$$g(t, t'') = A \sin(\gamma(t - t'')) e^{-\frac{(t - t'')}{t_0}} \quad (4.34)$$

O sinal do detector para a amplitude de onda que o atinge é dado pela convolução da resposta do detector com a função $\Psi(\vec{r}_0, t)$:

$$V(t) = g(t, t'') * \Psi(\vec{r}_0, t) \quad (4.35)$$

Experimentalmente pode-se obter a onda característica do detector usando uma amostra de referência $T(t)$, a qual deve ter como característica um tempo de decaimento que seja no mínimo 10 vezes a frequência de oscilação do microfone (transdutor) para ser instantâneo comparado ao transdutor. Como exemplo para um detector de $15MHz$ de frequência, pode-se ter uma referência com tempo de vida menor que $6,0ns$.

A função da fonte de calor deve conter o conjunto de parâmetros de ajuste ϕ e τ , que representam as frações de energia depositadas no meio e os tempos de vida de cada decaimento respectivamente.

$$H(t) = \phi_1 e^{-k_1 t} + \phi_2 \frac{k_1 k_2}{(k_2 - k_1)} \left(e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t} \right) + \dots + \phi_n \frac{\prod_1^n k_n}{\left(k_n - \sum_2^n k_{(n-1)} \right)} \left(e^{-k_1 t} - \sum_2^n e^{-k_n t} \right) \quad (4.36)$$

Em que $k = \frac{1}{\tau}$. Deste modo os parâmetros ϕ e τ podem ser encontrados fazendo-se o ajuste da onda experimental $E(t)$ com a onda obtida pela convolução da onda $T(t)$ com a função $H(t)$.

$$E(t) = T(t) * H(t) \quad (4.37)$$

Este procedimento é feito através de métodos iterativos implementados computacionalmente.

Para processos que envolvam apenas um decaimento (caso de uma solução sem oxigênio, por exemplo) a fração de energia pode ser obtida simplesmente pela razão das ondas experimentais $E(t)$ e $T(t)$, visto que as constantes de decaimento não radiativas (*IC*) são praticamente as mesmas para a amostra e para o padrão, e o tempo de vida o estado tripleto é tão longo ($\sim \mu s$) que não causa mudanças no processo de convolução.

Uma vez obtida estas frações pode-se obter os rendimentos quânticos de formação do estado tripleto e formação de oxigênio singlete pela equação de conservação de energia:

$$h\nu = E_{flu} + \phi_1 h\nu + \phi_2 h\nu + \phi_3 h\nu \quad (4.38)$$

A energia do fóton incidente é igual a energia perdida por fluorescência mais a fração de energia não radiativa (ϕ_1) perdida nos processos de conversão interssistêmica (*ISC*), transferência de energia para um supressor (ϕ_2) e perda de energia do supressor (ϕ_3). Na ausência de um supressor e usando as equações 4.39, 4.40 e 4.41 obtém-se a equação 4.42 para determinar o ϕ_T com a obtenção através da PAC da fração de energia ϕ_1 perdida no processo de *ISC*. Os parâmetros E_S , E_T , E_{flumax} e ΔE_R são respectivamente a energia do estado singlete, do tripleto, a energia do máximo de fluorescência e a diferença entre a energia do singlete e o máximo de fluorescência.

$$\phi_{flu} + \phi_{IC} + \phi_T = 1 \quad (4.39)$$

$$\triangle E_R = E_S - E_{flumax} \quad (4.40)$$

$$E_{hv}\phi_1 = E_{hv} - E_S + (E_S - E_T)\phi_T + E_S\phi_{IC} + \triangle E_R\phi_{flu} \quad (4.41)$$

$$E_T\phi_T = (1 - \phi_1) - E_{flumax}\phi_{flu} \quad (4.42)$$

Na presença do supressor a equação para ϕ_T fica:

$$E_T\phi_T = E_{hv}\phi_2 \quad (4.43)$$

E para o caso em que o supressor é o O_2 , a determinação do rendimento quântico de formação do oxigênio singlete fica:

$$E_{hv}\phi_2 = (E_T - E_\triangle)\phi_T f_\triangle^T + E_T\phi_T \quad (4.44)$$

$$E_{hv}\phi_3 = E_\triangle\phi_T f_\triangle^T \quad (4.45)$$

$$\phi_\triangle = \phi_T f_\triangle^T = \frac{(E_T\phi_T - E_{hv}\phi_2)}{E_\triangle} \quad (4.46)$$

em que f_{Δ}^T é a taxa de supressão do oxigênio e E_{Δ} a energia do estado singleto do oxigênio.

Desta forma com um único experimento pode-se determinar quantidades como rendimentos quânticos de tripleto e formação de oxigênio singleto e seus respectivos tempos de vida.

4.2.4 Rendimento Quântico e Tempo de Vida do Oxigênio Singleto

O estado excitado do oxigênio molecular chamado oxigênio singleto ($^1\Delta_g$) tem um papel importante nos vários processos químicos e biológicos. Em particular o oxigênio singleto é a principal espécie reativa no mecanismo Tipo II da PDT.

O estado $^1\Delta_g$ emite a fosforescência na região espectral infravermelho com o máximo característico em $1270nm$. Um dos métodos amplamente usados para determinar o rendimento quântico e o tempo de vida do estado $^1\Delta_g$ é medir sua fosforescência. Nas fotoreações o estado $^1\Delta_g$ geralmente se forma devido a transferência da energia entre o estado T_1 de um fotossensibilizador para uma molécula de oxigênio.

A concentração do fotossensibilizador pelo tempo no estado tripleto é dada por:

$$[T] = [T]_0 e^{-(k_0 + k_q[O_2])t} \quad (4.47)$$

em que k_0 é a constante de decaimento do tripleto na ausência do O_2 e k_q é a constante de supressão do tripleto $[T]$ do fotossensibilizador pelo oxigênio molecular que contém duas partes:

$$k_q = k_{q\Delta} + k_{q1} \quad (4.48)$$

em que $k_{q\Delta}$ é a constante da transferência da energia do tripleto para oxigênio molecular com a formação do $^1\Delta_g$, e k_{q1} a constante da supressão do tripleto pelo oxigênio através de outros mecanismos, como por exemplo a formação do radical ânion superóxido $O_2^{\bullet-}$.

Neste caso a dependência da concentração do $^1\Delta_g$ do tempo é dada pela equação:

$$\frac{d[^1\Delta_g]}{dt} = k_{q\Delta}[T][O_2] - k_1[O_2][^1\Delta_g] \quad (4.49)$$

em que k_1 é a constante de decaimento de $^1\Delta_g$.

A concentração de O_2 em água é da ordem de milimolar, e a ordem de concentração dos fotossensibilizadores geralmente é da ordem de micromolar, portanto pode-se considerar $[O_2]$ constante. Desta forma a concentração de $^1\Delta_g$ em função do tempo é dada pela equação:

$$[{}^1\Delta_g] = \frac{k_{q\Delta}[T][O_2]}{k_{1O_2} - (k_0 + k_q[O_2])} \left\{ e^{-t(k_0 + k_q[O_2])} - e^{-tk_{1O_2}} \right\} \quad (4.50)$$

A primeira exponencial está associada com a formação de ${}^1\Delta_g$ devido a transferência da energia do tripleto para o oxigênio molecular, e a segunda reflete o decaimento de ${}^1\Delta_g$ pela emissão da fosforescência.

A intensidade do máximo do espectro de fosforescência de ${}^1\Delta_g$ (I_{1O_2}) é proporcional à sua concentração:

$$I_{1O_2} = K[{}^1\Delta_g] \quad (4.51)$$

em que K é um coeficiente que leva em conta as características de equipamento.

$$I_{1O_2} = K \frac{k_{q\Delta}[T][O_2]}{k_{1O_2} - (k_0 + k_q[O_2])} \left\{ e^{-t(k_0 + k_q[O_2])} - e^{-tk_{1O_2}} \right\} \quad (4.52)$$

Excitando o fotossensibilizador através de um pulso da luz curto e intenso obtém-se uma curva , e realizando o ajuste calcula-se os tempos de acumulação e de decaimento de ${}^1\Delta_g$. Do mesmo experimento obtém-se o rendimento quântico de formação de ${}^1\Delta_g$:

$$\phi_{1O_2} = \frac{\int I_{1O_2}}{I_{abs}} \quad (4.53)$$

em que I_{abs} é a intensidade da luz absorvida pela amostra.

Aplicando o método com uma amostra padrão pode ser obtido como:

$$\phi_{1O_2} = \frac{(1 - 10^{-A^P}) \int I_{1O_2}^A}{(1 - 10^{-A^A}) \int I_{1O_2}^P} \phi_{1O_2}^P \quad (4.54)$$

em que os índices A e P referem-se a amostra e padrão respectivamente.

Neste trabalho para determinar características temporais e rendimento quântico do oxigênio singleto utilizamos o equipamento modificado Edinburgh F900. Utilizou-se como padrão a porfirina $TPPS_4$ em solução aquosa em $pH = 7,0$ ($\phi_{1O_2} = 0,62$ [36]).

4.3 Anisotropia de Fluorescência

As moléculas estão em constante movimento em solução, o que resulta na orientação randômica dos seus dipolos de transição. A absorção da luz pelas moléculas é dada pelo operador momento de transição que é dado em termos do operador momento de dipolo. Quando a luz polarizada incide sobre a solução, preferencialmente as moléculas que tiverem com o momento de dipolo na direção de polarização da luz irão absorver, portanto a absorção deixa de ser randomizada. As moléculas que absorveram luz numa certa polarização irão emitir em outra devido à reorientação do seu dipolo pelo seu movimento rotacional durante o tempo de vida de excitação. A relação entre a polarização da luz de excitação com a polarização da luz de fluorescência dá a anisotropia (r), que é uma característica que representa a mobilidade das moléculas numa amostra.

A medida de anisotropia ocorre da seguinte forma: uma luz com polarização vertical excita a molécula, a fluorescência passa por outro polarizador e será registrada a intensidade da fluorescência quando este polarizador está orientado em direção paralelo ($I_{\parallel}$) ou perpendicular ($I_{\perp}$) em relação o polarizador de excitação. A anisotropia é definida como:

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \quad (4.55)$$

Classicamente a fluorescência pode ser interpretada como a radiação emitida por dipolos oscilantes. Desta forma tem-se que a intensidade de radiação emitida por um dipolo é proporcional ao quadrado do componente do seu vetor projetado no eixo de observação. Experimentalmente a intensidade de radiação é proporcional ao quadrado da projeção do campo elétrico do dipolo sobre o eixo de transmissão do polarizador. Esta projeção é dada por:

$$I_{\parallel} = \cos^2 \theta \quad (4.56)$$

$$I_{\perp} = \frac{1}{2} \sin^2 \theta \quad (4.57)$$

e substituindo na equação da anisotropia obtém-se:

$$r = \frac{3 \langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} \quad (4.58)$$

Portanto a anisotropia é determinada pelo valor médio do cosseno ao quadrado, em que θ é o

ângulo entre a polarização da luz emitida e absorvida.

A excitação com luz polarizada produz uma distribuição simétrica de moléculas excitadas com máximo em torno da direção de polarização. Assim a função de distribuição de moléculas excitadas pelo ângulo θ entre a direção de polarização e o momento de transição é:

$$f(\theta) = \cos^2\theta \sin\theta d\theta \quad (4.59)$$

A distribuição de probabilidade dada por esta equação determina o máximo de moléculas que absorverão luz para esta polarização. Sendo a anisotropia função da média do cosseno ao quadrado, então o cálculo desta média permite o cálculo da anisotropia.

$$\left\langle \cos^2\theta = \frac{\int_0^{\frac{\pi}{2}} \cos^2\theta f(\theta) d\theta}{\int_0^{\frac{\pi}{2}} f(\theta) d\theta} \right\rangle \quad (4.60)$$

Assim, para absorção e emissão colineares o valor máximo da média pode ser obtido substituindo a equação 4.59 na equação 4.60 que resulta em $\langle \cos^2\theta \rangle = \frac{3}{5}$. Substituindo este resultado na equação 4.58 tem-se que o valor máximo de anisotropia é $r = 0,4$.

Moléculas que possuem um valor de anisotropia próximo de 0,4 estão praticamente paradas, e moléculas com valor de anisotropia perto de zero desorientam-se rapidamente na amostra. Os meios com maior viscosidade aumentam os valores de anisotropia, pois a mobilidade das moléculas nestes meios diminui. A anisotropia de fluorescência de uma molécula pequena aumenta quando ela se liga com um sistema grande (micela, molécula de polímero, por exemplo). Por isto a anisotropia pode indicar se ocorre esta ligação.

Neste trabalho utilizamos a técnica de anisotropia da fluorescência nos estudos da interação dos BCD com DNA. A anisotropia da fluorescência foi medida utilizando espectrofluorímetros Aminco.

4.4 Dicroísmo Circular

Um composto é considerado opticamente ativo quando este apresenta os fenômenos de birrefringência circular (BC) e dicroísmo circular (CD). O primeiro corresponde à diferentes índices de refração, n_d e n_e , e o segundo para diferentes coeficientes de absorção molar, ϵ_d e ϵ_e , do composto para luz incidente polarizada à direita e esquerda respectivamente.

Dicroísmo circular é uma medida que relata sobre a orientação preferencial dos momentos

de dipolo de transição e momentos magnéticos das moléculas para absorver luz. Este experimento consiste em incidir na amostra luz linearmente polarizada, que depois de passar por uma amostra opticamente ativa passa a ser elipticamente polarizada, e medir a diferença de intensidade de absorção para cada polarização da luz, a esquerda e direita, em função do comprimento de onda.

A onda linearmente polarizada pode ser apresentada como combinação de duas ondas circularmente polarizadas, à esquerda e direita. No caso da BC, quando uma luz linearmente polarizada atravessa uma amostra opticamente ativa, para suas componentes circulares direita e esquerda, aparece uma diferença das fases devida a diferença entre os índices de refração e, consequentemente, entre as velocidades da luz no meio. Finalmente o plano de polarização da luz ao passar pela amostra é rodado de um ângulo α . Já no caso do CD apenas as componentes da luz circularmente polarizada na direção do dipolo de absorção da molécula são absorvidas o que, no caso de moléculas que possuem atividade ótica, resulta na diminuição da amplitude de uma das componentes em relação a outra, tornando a luz transmitida elipticamente polarizada. A elipticidade θ , e a birrefringência têm unidades de graus.

A BC é função do comprimento de onda da luz e pode ser escrita matematicamente como:

$$\alpha = 1800 [n_e(\lambda) - n_d(\lambda)] \quad (4.61)$$

A dependência espectral de α é chamada de *natural optical rotatory dispersion* (ORD), e o aparelho que mede esta quantidade de espectropolarímetro.

O CD também é função do comprimento de onda da luz incidente e é determinado usando o espectropolarímetro. Uma das técnicas usadas para produzir luz circularmente polarizada é usar um modulador, que pelo efeito piezo-mecânico, modula circularmente a direção de polarização do feixe monocromático de luz entre as direções de polarização esquerda e direita. Também pode-se incidir luz linearmente polarizada na amostra sendo que a diferença entre ϵ_d e ϵ_l vai alterar a modulação da luz inicial tornando esta elíptica, sendo as componentes circulares detectadas e registradas. A elipticidade então é escrita como:

$$\theta = 2,303 \frac{(\epsilon_e - \epsilon_d) Cl}{4\pi} \quad (4.62)$$

a diferença de $3,0 \times 10^{-2}$ entre os ϵ corresponde a um grau na elipticidade.

Os experimentos de dicroísmo circular informam sobre mudanças nas estruturas das moléculas, pois a atividade ótica está ligada com a simetria dos átomos nas moléculas. Varias

biomolécula, como DNA e proteínas, possuem atividade óptica que permite estudar as variações na sua estrutura pelo método de dicroísmo circular.

Alguns compostos não apresentam atividade ótica quando puros em solução, mas quando estes interagem com biomoléculas estes compostos adquirem atividade ótica. O aparecimento do sinal de CD propicia o estudo de como as substâncias se ligam com biomoléculas como o DNA, por exemplo, podendo estudar onde ocorrem as ligações pelo espectro do composto e do próprio DNA. Também é possível, dependendo da estrutura da molécula, determinar a formação de agregados e a formação de complexos na solução, obtendo informações sobre a geometria destes e formação de espécies dependente da concentração dos compostos.

Neste trabalho utilizamos a técnica de Dicroísmo Circular nos estudos da interação dos BCD com DNA. Os espectros de CD foram monitorados utilizando espectropolarímetro Jasco J-810.

4.5 Métodos Computacionais

4.5.1 Análise Geométrica e Absorção S - S

Para se obter as estruturas que minimizam a superfície de energia potencial, bem como as frequências e intensidades das transições eletrônicas $S - S$ dos BCD, foram usadas implementações computacionais de métodos baseados na equação de Schrödinger. Os métodos utilizados são baseados no princípio variacional e são resolvidos iterativamente.

$$H\Psi(R, r) = E\Psi(R, r) \quad (4.63)$$

$$H = T_e + T_n + V_{e-e} + V_{e-n} + V_{n-n}$$

Sendo T_e e T_n os operadores de energia cinética dos elétrons e núcleos, e V_{e-e} , V_{e-n} e V_{n-n} os operadores que determinam as energias potenciais de interação elétron-elétron, elétron-núcleo e núcleo-núcleo, respectivamente. A função de onda $\Psi(R, r)$ depende das coordenadas nucleares (R) e dos elétrons (r).

A aproximação formulada por Born e Oppenheimer está baseada no fato que os núcleos são muito mais pesados que os elétrons e por esta razão suas coordenadas permanecem inalteradas frente ao movimento dos elétrons. Assim o potencial de interação núcleo-núcleo pode ser considerado constante e a função de onda molecular pode ser separada em uma parte eletrô-

nica e outra referente ao movimento nuclear [37, 38]. Considerando esta aproximação pode-se escrever a função de onda como um produto de duas funções:

$$\Psi(R, r) = \psi(r) \phi(R) \quad (4.64)$$

Em que $\psi(r)$ é a função de onda eletrônica que depende parametricamente das coordenadas nucleares e $\phi(R)$ uma função dependente apenas das coordenadas nucleares. A função satisfaz a equação de onda da seguinte forma:

$$\left\{ -\frac{1}{2} \sum_e \nabla_e^2 + V_{e-e} + V_{e-n} + V_{n-n} \right\} \psi(r) = U(R) \psi(r) \quad (4.65)$$

com operador energia cinética $T = \nabla_e^2$. Para cada distribuição nuclear, $U(R)$ é parte de um conjunto de auto-valores para diferentes estados eletrônicos.

A equação 4.65 não possui solução exata devido ao potencial V_{e-e} . Desta forma uma solução aproximada foi proposta por Hartree e posteriormente complementada por Fock e Slater. Esta aproximação consiste em se aproximar a função de onda como um produto de funções de onda monoelétrônicas, a aproximação orbital, considerando que sobre um elétron age um potencial médio produzido pelos outros elétrons do sistema. A falha desta aproximação está no fato de que as soluções das equações de Hartree não são anti-simétricas com a permutação de elétrons. Esta falha foi resolvida por Fock e Slater sugerindo a inclusão do princípio de exclusão de Pauli nestas equações. A inclusão deste princípio foi feita impondo-se que a função de onda eletrônica seja anti-simétrica em relação à troca de dois elétrons. Usando o determinante de Slater para escrever as funções de onda e garantir que são anti-simétricas em relação à troca de dois elétrons, aplica-se o princípio variacional à função de onda para se determinar autoconsistentemente a função de onda e a energia total [39, 40].

O método de Hartree-Fock só fornece soluções numéricas para a estrutura eletrônica molecular. A obtenção de soluções analíticas foi possível com o uso de funções de base, como proposto por Roothaan [41].

Para se reduzir o tempo de cálculo sem se perder a precisão dos resultados, várias aproximações foram efetuadas resultando nos métodos semi-empíricos. Estes se baseiam em diferentes aproximações, como: *Zero Differential Overlap Aproximation* (ZDO), *Complete Neglect of Differential Overlap* (CNDO), *Intermediate Neglect of Differential Diatomic Overlap* (INDO), e

diferentes parametrizações. Um desses métodos é o INDO 1/*S*, muito usado para o estudo de espectros eletrônicos de moléculas orgânicas. Este método é comumente denominado ZINDO.

Um dos programas que implementam os métodos citados acima é o Gaussian98 [42], o qual foi usado para os cálculos dos BCD. Neste método desenha-se a estrutura inicial para a molécula e o programa faz os cálculos de energia de conformação e compara com a anterior até convergir para um valor com a menor energia possível.

5 *Material e Métodos*

Os BCD foram sintetizados pelo Prof. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciências da Ucrânia na forma de sais de cloreto ($BCDCl_2^-$).

Neste trabalho foram estudados quatro isômeros de BCD com ângulos de 180, 150, 120 e 90 entre os cromóforos, com peso molecular de $653g/mol$. Todos os experimentos em água foram realizados em $pH = 6,9$ utilizando solução de tampão fosfato preparada com $5mM NaH_2PO_4 + 2,5mM Na_2HPO_4$ em água purificada com o sistema Milli-Q. As soluções estoque foram preparadas em etanol em altas concentrações e diluídas nos solventes de modo que a percentagem de etanol fosse no máximo de 5%. As concentrações dos BCD foram obtidas utilizando o coeficiente de absorção molar determinados previamente [9] e neste trabalho.

Foram utilizados 3 tensoativos: sulfato de sódio (SDS) carregado negativamente, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) carregado positivamente e 1- α -Lisofosfatidilcolina (LPC) (16 carbonos) que forma um dipolo com carga total zero (zwitteriônico). Estes foram preparados em soluções estoque aquosas e posteriormente adicionados em alíquotas de modo a causar o mínimo efeito de diluição possível.

As moléculas de DNA usadas nos experimentos são de timo de bezerro (*Calf Thymus*), e foram obtidas da empresa *Worthington Biochemical Co.* (USA). As soluções estoque de DNA foram preparadas dissolvendo $10mg$ de DNA em $1ml$ de tampão fosfato, sendo feita a preparação com um dia de antecedência e armazenadas na temperatura de $4^\circ C$. As concentrações de DNA foram determinadas pelo método de absorção ótica através do coeficiente de absorção molar $\epsilon_{260nm} = 1,32 * 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ (determinado em pares de bases) [43].

O rendimento quântico de fluorescência foi determinado usando como padrão a porfirina meso-tetrakis(4-N-metil-piridina) TMPyP base livre em solução aquosa com $pH = 6,9$ ($\phi_{fl} = 5,0\%$ [44]). O rendimento quântico de formação de oxigênio singlete foi determinado usando como padrão a porfirina (Tetrasulfonatofenil porfirina) $TPPS_4$ que possui rendimento de 62% em tampão fosfato $7,5mM$ e $pH = 6,9$ [36].

As análises dos espectros foram feitas com o uso do programa comercial Origin®.

Todos os experimentos, exceto o experimento de fosforescência, foram realizados à temperatura ambiente de 25°C . A fosforescência foi medida à temperatura de 77K (nitrogênio líquido).

6 *Estado da Arte dos BCD*

Alguns aspectos das características energéticas dos BCD já foram estudadas. Entre estes estudos estão os efeitos da força iônica, interação com DNA e características energéticas do estado tripleto [9, 10, 45, 46], bem como aspectos teóricos das transições eletrônicas [22] e cálculos computacionais [47]. Neste capítulo é apresentada uma revisão dos principais resultados obtidos e já publicados sobre os BCD.

Os espectros de absorção óptica dos BCD e sua dependência com o ângulo entre os cromóforos, como também o modelo teórico da formação desses espectros [22] já foram discutidos neste trabalho. Recentemente foi publicado um trabalho [47], em que os espectros de BCD foram analisados através de cálculos semiempíricos utilizando cálculos das energias das transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $S_0 \rightarrow S'_1$ através dos métodos AM1 e Hartree-Fock, bem como as probabilidades de cada uma. Neste trabalho não foram analisados os possíveis isômeros, nem foi feita uma análise profunda das densidades eletrônicas envolvidas no processo de transição. Esta discussão é tema desta tese.

Os BCD são bem solúveis em solventes que possuem polaridade média como etanol, metanol ou acetonitrila, e menos solúveis em água. Os perfis dos espectros de absorção óptica dos BCD em álcoois não dependem das concentrações do BCD, já em tampão PBS 7,5mM o perfil do espectro modifica-se quando a concentração do composto aumenta devido a formação de agregados de BCD. Nestas condições o tipo de agregado formado é do tipo H, o qual é caracterizado pelo aparecimento de uma banda deslocada para o azul (550nm). A interação responsável pela formação dos agregados H é a formação de complexos- π , que necessita que ocorra a sobreposição das nuvens de elétrons- π das moléculas (seção 2.4, figura 2.10). Em tampão PBS na presença de sal os agregados H se desfazem dando origem aos agregados J, os quais têm como característica o deslocamento espectral para o vermelho (690nm, figura 6.1-a). Acredita-se que isto acontece porque os íons do sal se ligam as moléculas de BCD formando uma barreira impedindo o contato entre as nuvens de elétrons- π das moléculas o que diminui a probabilidade de formação de complexos- π (Figura 2.10). Por outro lado a ligação com íons diminui a repulsão eletrostática entre as moléculas de BCD e favorece a formação de agregados,

neste caso dos agregados J.

Na interação com DNA ocorre a formação de três espécies em equilíbrio na solução. A primeira espécie se associa com os monômeros de BCD, a segunda com os agregados de BCD ligados com DNA que ocorrem quando $[DNA]/[BCD] < 1$. Na terceira com adição de mais DNA estes agregados se desfazem formando a espécie monômero de BCD ligado ao DNA. A figura 6.1-b ilustra estes processos. Estas espécies estão em equilíbrio e seu conteúdo depende da razão $[DNA]/[BCD]$:

Em que $BCD^n DNA$ representa os agregados de BCD no DNA e $nBCDDNA$ representa os monômeros de BCD ligados ao DNA. Na presença de DNA e sal os processos ocorrem de maneira parecida, porém necessita-se uma concentração maior de DNA para atingir os mesmos resultados sem sal. Isto se deve ao fato de que os íons ocupam os sítios mais eletronegativos do DNA diminuindo o potencial de interação entre estes e os BCD.

Figura 6.1: a) Espectros de absorção do BCD180 em função da força iônica. b) Espectros de absorção com as três espécies do BCD180 formadas na presença de DNA.

O experimento usando a técnica de dicroísmo circular mostrou que os BCD não possuem atividade ótica em solução homogênea e na presença de sal. Já na presença de DNA aparece

atividade ótica tanto dos agregados de BCD no DNA quanto dos monômeros de BCD ligados ao DNA. A interação com BCD não afeta o espectro de dicroísmo circular do DNA. Baseado neste fato foi constatado que os BCD se ligam na superfície do DNA e não se intercalam entre suas bases.

As características da fluorescência foram estudadas previamente apenas para o BCD 180. O rendimento quântico desta (ϕ_{flu}) em tampão PBS é de 1,8% e diminui com a formação de agregados H. Com o aumento da força iônica ocorre o aparecimento de uma banda de fluorescência deslocada para o vermelho em relação ao monômero de BCD, que associamos com a fluorescência dos agregados J com $\phi_{flu} = 5,0\%$. Na presença de DNA o ϕ_{flu} aumenta cerca de 20 vezes atingindo 44% na espécie monômero de BCD ligado ao DNA [10]. As características de fluorescência dos outros BCD são objetos de estudo deste trabalho.

Resultados preliminares da fotocitotoxicidade dos BCD também foram obtidos, mostrando que estes possuem alta fotocitotoxicidade em algumas linhagens de células humanas cancerosas e saudáveis.

7 *Resultados e Discussão*

7.1 Resultados Computacionais

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos cálculos computacionais de otimização de estruturas, níveis de energia, distribuição eletrônica, posições dos máximos e as intensidades das linhas de transição dos BCD. A descrição dos métodos usados está apresentada na seção 4.5.

7.1.1 Geometria dos BCD

As estruturas dos BCD foram construídas com o uso do programa Gaussview. Foram propostas estruturas iniciais trans- (T) e cis- (C) para um cromóforo que, no caso dos BCD pela combinação de dois cromóforos, possui três conformações possíveis: trans-trans (TT), trans-cis (TC) e cis-cis (CC). Partindo destas estruturas a otimização de cada uma foi feita inicialmente pelo método AM1. Este método, apesar de simples, é útil no sentido de se ter uma primeira aproximação da geometria antes da aplicação de métodos mais precisos. Após a obtenção da primeira otimização aplicou-se o modelo $HF/3-21G$ para a otimização final. O tamanho das moléculas de BCD é um fator limitante do uso dos métodos computacionais e por consequência este foi o único método possível de ser aplicado, sendo que a tentativa de utilizar outros métodos mais sofisticados não foi bem sucedida. A figura 7.1 mostra as estruturas espaciais dos BCD obtidas após a otimização de geometria.

A tabela 7.1 mostra a energia final da estrutura otimizada para cada BCD nas várias conformações.

Isômero	BCD180	BCD150	BCD120	BCD90
TT	-2616,7285	-2616,7228	-2616,6264	-2616,7228
TC	-2616,7120	-2616,6974	-2616,6865	-2616,6988
CC	-2616,6864	-2616,6706	-2616,6720	-2616,6788

Tabela 7.1: Energia em hartree dos isômeros de BCD.

Tomando a diferença de energia ΔE de cada configuração foi possível calcular a probabili-

Figura 7.1: Isômeros de BCD, da esquerda para a direita: BCD180, BCD150, BCD120 e BCD90. De cima para baixo: estrutura TT, TC e CC.

dade P_i de ocorrência de cada isômero na faixa de temperatura entre 0 a 100° usando a distribuição de Boltzmann. Seguindo esta distribuição a probabilidade $P(E)$ de uma dada configuração é definida por:

$$P(E) = \frac{e^{-\beta E}}{\sum e^{-\beta E_i}} \quad (7.1)$$

Em que $\beta = \frac{1}{k_B T}$. Logo a fração n de moléculas num dado estado pode ser obtida pelo número total N de moléculas multiplicado pela probabilidade:

$$n = NP(E) \quad (7.2)$$

Tomando a razão entre a fração de moléculas em cada conformação têm-se:

$$\frac{n_i}{n_j} = e^{-\beta \Delta E} \quad (7.3)$$

Em que j e i indicam as conformações TT, TC ou CC. E finalmente considerando todas as configurações, ou seja:

$$n_{TT} + n_{TC} + n_{CC} = 1 \quad (7.4)$$

Assim, pode-se calcular a percentagem de cada conformação, usando $K_B = 1,98 \cdot 10^{-3} \text{ kcal/mol}$ e a conversão da energia $1 \text{ hartree} = 627,51 \text{ kcal/mol}$. Para os BCD com 180, 150 e 90 graus entre os cromóforos a configuração TT é a de menor energia e a probabilidade de encontrá-la a

temperatura ambiente é de 99,9%. O BCD120 apresentou as configurações TT e TC com energias mínimas muito próximas, e o cálculo indica que há um equilíbrio destas duas configurações com percentagens de 53% para configuração TT e 47% para TC. A tabela 7.2 mostra os valores das energias relativas entre as configurações que foram usadas no cálculo das probabilidades.

Conformação	BCD180	BCD150	BCD120	BCD90
TT-TC	10,35	15,94	0,06	15,06
TT-CC	21,33	32,76	9,04	27,61

Tabela 7.2: Diferença da energia entre as conformações dos BCD em *kcal/mol*.

Assim, as configurações a serem consideradas nas próximas análises são as TT para todos os BCD, exceto para o BCD120 que além desta considera-se a TC. A figura 7.2 mostra uma vista lateral das moléculas de BCD otimizadas, sendo considerada a configuração TT para o BCD120 nesta análise.

Figura 7.2: Vista lateral da geometria das estruturas otimizadas dos BCD.

Da figura 7.2 vê-se que a planaridade da estrutura principal das moléculas de BCD depende da posição dos grupos laterais etila e do ângulo entre os cromóforos. Observa-se que a maior distorção espacial ocorreu para o BCD120 e 90, os quais possuem grupos etila na estrutura principal em posições próximas aos dos grupos laterais. O BCD com 180 graus entre os cromóforos apresenta a maior planaridade do que os outros BCD. A configuração TT do BCD120 adota uma estrutura aproximadamente helicoidal. O ângulo entre os cromóforos foi calculado a partir dos dados experimentais usando a equação:

$$r = \frac{\lambda_1 \varepsilon_1}{\lambda_2 \varepsilon_2} \quad \cos \theta = \frac{r - 1}{r + 1} \quad (7.5)$$

Os resultados apresentados na tabela 7.3, com exceção do BCD 180, concordam com os previstos pela teoria. O BCD180 deve sofrer maior efeito do solvente pela sua estrutura ser mais flexível, por isto o ângulo em etanol difere significativamente do obtido computacionalmente.

Outro resultado importante da otimização geométrica é a obtenção dos comprimentos de

Ângulo	BCD180	BCD150	BCD120	BCD90
Computacional	180,0	147,6	126,7	90,3
Experimental (Et)	158,0	149,6	122,3	94,0

Tabela 7.3: Ângulos entre os cromóforos dos BCD calculados a partir das estruturas obtidas computacionalmente e experimentalmente, através da equação 7.5.

ligação. Na figura 7.3 pode-se observar que nos heterociclos centrais os comprimentos de ligação entre os átomos de carbono e enxofre variam entre 1,80 a 1,83, já as distâncias C-N variam entre 1,35 (que é característica para uma ligação dupla) a 1,44 (que é típica de uma ligação simples) sendo que o maior comprimento dessa ligação ocorre no BCD 90. Isto mostra que para o BCD 90 a ligação C-N é simples, o que significa a perda de conjugação- π . Os comprimentos das ligações C-C do anel central de seis membros possuem valores típicos de duplas ligações parciais (ordem de ligação 1,5) e não possuem grande variação, à exceção do BCD 90. Neste composto ocorre uma alternância maior entre as ligações com uma ligação relativamente longa de 1,41 e outra relativamente curta de 1,34, indicando uma separação das ligações duplas e simples nesta última e a conseqüente perda de conjugação- π neste anel, como é observado também no anel central do fenantreno [48]. Assim, podemos concluir que a estrutura do heterociclo central do BCD90 admite menor grau da conjugação- π entre os cromóforos quando comparado aos outros BCD.

Figura 7.3: Comprimentos das ligações entre os átomos dos heterociclos centrais dos BCD.

7.1.2 Absorção Ótica

Após a determinação das configurações mais prováveis dos BCD foram feitas as análises das transições das moléculas entre o estado fundamental e os excitados, considerando as confi-

gurações TT para o cálculo e, além desta, TC no caso do BCD120. Para este cálculo foi usado o método ZINDO.

O orbital molecular ocupado de maior energia é denominado de *HOMO* (*Highest Occupied Molecular Orbital*), e o orbital molecular livre (virtual) de menor energia é *LUMO* (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Os orbitais ocupados que possuem sucessivamente menor energia que *HOMO* são *HOMO* – 1, *HOMO* – 2, etc. Os livres que possuem sucessivamente a energia maior que *LUMO* são *LUMO* + 1, *LUMO* + 2, etc.

Através do método ZINDO foi demonstrado que a transição entre um estado fundamental e um excitado inclui vários orbitais ocupados e não ocupados. As maiores contribuições são dadas pelas excitações de um elétron dos *HOMO*, *HOMO* – 1 e *HOMO* – 2 para os *LUMO*, *LUMO* + 1 e *LUMO* + 2. Com base na estrutura e nas funções de onda de cada molécula estas transições foram associadas com transições $\pi^* \leftarrow \pi$. Esta probabilidade é dada pela força de oscilador da transição. A tabela 7.4 traz a contribuição de cada orbital numa dada transição.

	Transição $S'_1 \leftarrow S_0$	Transição $S''_1 \leftarrow S_0$
<i>BCD180</i>	$\lambda = 458,02nm$ $f = 2,8$	
	<i>LUMO</i> + 2 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 2 (1,1%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (14,3%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (31,7%)	
<i>BCD150</i>	$\lambda = 445,5nm$ $f = 2,4$	$\lambda = 410,5nm$ $f = 0,2$
	<i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (17,6%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (28,5%)	<i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (28,0%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (18,4%)
<i>BCD120_{TT}</i>	$\lambda = 450,3nm$ $f = 2,1$	$\lambda = 415,3nm$ $f = 0,6$
	<i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (20,0%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (2,1%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (3,7%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (20,9%)	<i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (7,4%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (13,4%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (15,9%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (10,3%)
<i>BCD120_{TC}</i>	$\lambda = 445,39nm$ $f = 2,1$	$\lambda = 415,39nm$ $f = 0,6$
	<i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (8,97%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (8,67%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (23,94%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (4,59%)	<i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (3,17%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (21,07%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (10,89%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (9,68%)
<i>BCD90</i>	$\lambda = 459,32nm$ $f = 1,3$	$\lambda = 410,80nm$ $f = 1,5$
	<i>LUMO</i> + 2 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 2 (1,03%) <i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> – 1 (14,91%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (31,23%)	<i>LUMO</i> + 1 $\leftarrow$ <i>HOMO</i> (18,63%) <i>LUMO</i> $\leftarrow$ <i>HOMO</i> + 1 (27,78%)

Tabela 7.4: Participação dos orbitais nas transições $S'_1 \leftarrow S_0$ e $S''_1 \leftarrow S_0$ dos BCD.

Os resultados desta análise indicam que para as bandas de absorção de menor energia (transição $S'_1 \leftarrow S_0$) a força de oscilador diminui com a diminuição do ângulo entre os cromóforos e para as bandas de maior energia ($S''_1 \leftarrow S_0$) a força de oscilador aumenta quando este ângulo

diminui. Um fato interessante é que as estruturas TT e TC do BCD120 possuem posições das bandas de absorção ótica e força de oscilador bem semelhantes, somente a banda de menor energia da estrutura TT possui um pequeno deslocamento para comprimentos de onda maiores se comparado ao TC. Partindo dos resultados calculados os espectros de absorção foram então simulados utilizando funções gaussianas com meia altura de $10nm$ e centrada em torno dos comprimentos de onda obtidos em cada transição. Como resultado da simulação obtiveram-se espectros computacionais de absorção ótica que seguem a probabilidade de transição dependente do ângulo como mostrado dos cálculos teóricos (figura 7.4).

Figura 7.4: Espectros de absorção dos BCD obtidos por: a) cálculos computacionais, b) experimentalmente em etanol.

Como já mostrado, a distância entre os máximos das bandas de absorção dos BCD (*splitting*) é determinada por dois fatores: tunelamento dos elétrons entre os cromóforos pelo heterociclo central e pela interação dipolo-dipolo entre os cromóforos. A probabilidade de tunelamento deve ser maior para os BCD que possuem maior grau de conjugação- π entre os cromóforos. A interação dipolo-dipolo aumenta com $\frac{1}{R^6}$ quando diminui a distância entre os cromóforos e diminui quando os cromóforos do corante possuem densidades eletrônicas diferentes (não simétricas). Para uma análise mais aprofundada foram calculadas através do método ZINDO as funções da onda relacionadas com os orbitais *HOMO*, *HOMO* - 1 e *HOMO* - 2 (orbitais π) para os *LUMO*, *LUMO* + 1 e *LUMO* + 2 (orbitais π^*), que possuem maior contribuição nas transições $S'_1 \leftarrow S_0$ e $S''_1 \leftarrow S_0$. As representações dessas funções de onda são mostradas nas figuras 7.5, 7.6, 7.7, 7.8 e 7.9.

Como já mostrado, o BCD180 tem estrutura planar e possui uma forte conjugação- π entre os cromóforos. Por isso o BCD180 tem maior *splitting* devido ao tunelamento. O BCD150 tem a estrutura menos planar que BCD180 o que diminui a conjugação- π entre seus cromóforos. Por outro lado, a distância entre os cromóforos do BCD150 não difere muito do BCD180, por

isto a interação dipolo-dipolo para estes dois deve ser semelhante. Finalmente o *splitting* dos níveis energéticos do BCD150 deve ser menor que o do BCD180, como de fato pode ser visto na figura 7.4.

As funções de onda dos orbitais dos BCD180, 150 e 90 são antissimétricas com relação a um plano perpendicular ao anel de seis membros e perpendicular também aos anéis de cinco membros. Diferente disto as funções de onda dos orbitais do BCD120, tanto da estrutura TT quando da TC, não possuem simetria. Isto significa que o BCD120 tem estrutura com densidades eletrônicas diferentes nos dois cromóforos. Com base no modelo de Förster a interação dipolo-dipolo entre os cromóforos neste BCD deve ser menor que em outros, conseqüentemente o *splitting* deve ser menor entre as bandas de absorção. Esta afirmação está em concordância com os resultados obtidos.

Figura 7.5: Esquema de orbitais e transições entre estes para o BCD180.

Como foi mostrado acima o heterociclo central do BCD90 é caracterizado pela quebra de conjugação- π entre os cromóforos. Por isto o BCD90 deveria ter menor *splitting* devido menor probabilidade do tunelamento. Mas a interação dipolo-dipolo entre os cromóforos para BCD90 é maior que para outros BCD, pois ele possui menor distância entre os cromóforos. Finalmente o BCD90 tem *splitting* próximo do BCD180 mostrando a predominância da interação dipolo-dipolo neste caso.

As características dos espectros calculados correspondem aos espectros obtidos experimentalmente em etanol (figura 7.4). Vê-se que as intensidades das bandas de absorção dos espectros calculados e os obtidos experimentalmente possuem dependência semelhante com o ângulo entre os cromóforos. Entretanto os espectros experimentais são deslocados para uma região de

Figura 7.6: Esquema de orbitais e transições entre estes para o BCD150.

BCD120: $\lambda = 450,3\text{nm}$, $f = 2,1267$

Figura 7.7: Esquema de orbitais e transições entre estes para conformação TT do BCD120.

Figura 7.8: Esquema de orbitais e transições entre estes para conformação CT do BCD120.

Figura 7.9: Esquema de orbitais e transições entre estes para o BCD90.

menor energia quando comparados com os teóricos. Além disso, nos espectros experimentais ocorrem bandas vibracionais as quais não estão presentes nos teóricos. Estas diferenças aparecem devido a diversas razões. Entre estas as mais importantes são os efeitos do ambiente como a polarizabilidade do solvente e a formação de ligações hidrogênio, pois no caso computacional o meio usado é o vácuo. Outra limitação do método é que não se pode incluir uma “caixa de água” como no caso do cálculo dinâmico (métodos clássicos) para simular a estruturação das moléculas de solvente em torno da molécula em estudo e as interações entre estas.

7.2 Efeito dos Solventes

Os estudos dos efeitos dos solventes sobre os BCD foram realizados para os BCD 180, BCD 150 e BCD90.

Para esclarecer o efeito da solvatação nos espectros dos BCD foram escolhidos solventes capazes formar ligações hidrogênio (próticos), caracterizados por diferentes constantes dielétricas: água ($\xi = 80,0$), metanol ($\xi = 32,6$), etanol ($\xi = 24,3$) e isopropanol ($\xi = 18,3$). E visando entender o efeito da formação das ligações hidrogênio os dados obtidos em metanol foram comparados com os obtidos em acetonitrila que possui constante dielétrica próxima do metanol ($\xi = 36,2$) mas não forma ligações hidrogênio (aprótico).

7.2.1 Coeficiente de Absorção Molar e Análise Espectral

Os coeficientes de absorção molar dos BCD foram determinados em todos os solventes estudados em concentrações de BCD menores que $2,5\mu M$. Nesta região de concentração não houve mudança no perfil dos espectros de absorção óptica dos BCD em função da sua concentração. Baseado nestes resultados considera-se que em concentrações $< 2,5\mu M$ os BCD são monômeros, e nestas condições foram calculados os coeficientes de absorção molar (tabela 7.5).

Solvente	BCD180	BCD150	BCD90
	$\epsilon(M^{-1}cm^{-1})$		
Água	$1,33 \pm 0,13$	$1,35 \pm 0,14$	$0,88 \pm 0,09$
Acetonitrila	$3,05 \pm 0,30$	$1,58 \pm 0,16$	$1,00 \pm 0,10$
Metanol	$3,20 \pm 0,32$	$1,46 \pm 0,15$	$1,43 \pm 0,14$
Etanol	$2,90 \pm 0,29$	$1,30 \pm 0,13$	$1,17 \pm 0,12$
Isopropanol	$2,86 \pm 0,29$	$1,34 \pm 0,13$	$1,21 \pm 0,12$

Tabela 7.5: Coeficiente de absorção molar para as bandas de menor energia dos BCD em diferentes solventes.

A relação entre as intensidades das bandas de absorção óptica dos BCD obtida nos diferentes

solventes foi a mesma dos cálculos computacionais, mostrando que os ângulos entre os cromóforos dos BCD não variam muito com o solvente. As mudanças espectrais dos BCD observadas em diferentes solventes se deram pelas mudanças nos coeficientes de absorção molar e pelo deslocamento dos máximos das bandas de absorção, sem mudanças significativas nos perfis espectrais (figura 7.10).

Figura 7.10: Espectros de absorção dos BCD nos solventes estudados.

Os coeficientes de absorção molar nos solventes orgânicos atingem o máximo em metanol e acetonitrila, os solventes que possuem maior constante dielétrica. Entretanto, em água os coeficientes de absorção molar são menores do que nos solventes orgânicos, isto pode ser associado com a especificidade estrutural da água. Os solventes com maior constante dielétrica produzem um deslocamento espectral para comprimentos de onda menores na sequência: água < acetonitrila = metanol < etanol = isopropanol (tabela 7.6). Comparando-se os espectros em acetonitrila e metanol; etanol e isopropanol, não ocorreu deslocamento. Este comportamento representa um efeito contrário ao previsto para solvatação não específica dos sistemas com conjugação- π [13].

Destes resultados pode-se concluir que a solvatação específica, ou seja, a capacidade do solvente formar ligações hidrogênio, influencia no deslocamento espectral dos BCD. Entretanto, as posições dos picos de absorção em acetonitrila e metanol, que possuem constantes dielétricas muito próximas, são praticamente iguais mostrando que neste caso a capacidade de formar ligação hidrogênio não afetou no deslocamento dos espectros. Porém, na água que possui alta constante dielétrica, esperava-se um deslocamento espectral para energias menores, mas observou-se o deslocamento contrário. Estes resultados foram observados para os três BCD e

Solvente	ξ	$\lambda(nm)/\nu(cm^{-1})$		
		BCD180	BCD150	BCD90
Água	80,0	$632nm \pm / 15820 \pm 30$	$623nm \pm / 16050 \pm 30$	$617nm \pm / 16210 \pm 30$
Acetonitrila	36,2	$634nm \pm / 15770 \pm 30$	$625nm \pm / 16000 \pm 30$	$619nm \pm / 16160 \pm 30$
Metanol	32,6	$634nm \pm / 15770 \pm 30$	$626nm \pm / 15970 \pm 30$	$620nm \pm / 16130 \pm 30$
Etanol	24,3	$638nm \pm / 15670 \pm 30$	$629nm \pm / 15900 \pm 30$	$623nm \pm / 16051 \pm 30$
Isopropanol	18,3	$638nm \pm / 15670 \pm 30$	$630nm \pm / 15870 \pm 30$	$623nm \pm / 16051 \pm 30$

Tabela 7.6: Posições dos máximos de absorção dos BCD em função das constantes dielétricas dos solventes.

mostram que o efeito dos solventes nas características espectrais dos BCD é complexo. Na tentativa de esclarecer este efeito foram feitos estudos dos espectros dos BCD em mistura de água + solvente, variando o conteúdo do solvente na mistura de 0 até 100%.

Em água a banda dos agregados aparece para todos os BCD em torno de $550nm$, e partindo disto o efeito da mistura de água + solvente foi feita avaliando-se a razão entre a absorbância da posição do pico dos agregados H e do pico principal (mais intenso) dos BCD em cada mistura.

$$r = \frac{A_{550}}{A_{mon}} \quad (7.6)$$

A razão de estudar essa dependência é seguinte: a intensidade de pico A_{mon} caracteriza a absorção dos monômeros do corante e o pico A_{550} é a superposição da absorção do monômero e do agregado do corante. Quando o corante se agrega o pico A_{mon} diminui e o pico A_{550} diminui pela diminuição da concentração de monômero e aumenta pelo aumento da concentração de agregados. Por isto a razão entre as intensidades dos picos do monômero e do agregado pode caracterizar a formação dos agregados.

$$r = \frac{\epsilon_m^{550}C_m + \epsilon_a C_a}{\epsilon_m C_m} = \frac{\epsilon_m^{550}}{\epsilon_m} + \frac{\epsilon_a C_a}{\epsilon_m C_m} \quad (7.7)$$

ϵ_m e ϵ_m^{550} são os coeficientes de absorção molar dos monômeros do corante nos picos *mon* e em $550nm$, ϵ_a é o coeficiente de absorção molar dos agregados de corante, e são as concentrações dos monômeros e dos agregados de corante.

Como já discutido anteriormente, a razão $\frac{\epsilon_m^{550}}{\epsilon_m}$ nas soluções não aquosas não depende do tipo de solvente e pode ser considerada como uma constante K_1 . A razão $\frac{\epsilon_a}{\epsilon_m}$ também é constante e será designada por K_2 . Assim pode-se escrever:

$$r = K_1 + K_2 C_r \quad (7.8)$$

em que C_r é a razão entre as concentrações de agregados e monômeros do corante $\frac{C_a}{C_m}$.

Figura 7.11: Espectro de absorção ótica do BCD180 em diferentes percentagens de água em etanol.

Figura 7.12: Razão entre as absorbâncias das bandas dos agregados e dos picos dos monômeros dos BCD em função da percentagem de água nos solvente.

Foi observado que a mistura de solvente com água induz a diminuição do fator r devido à desagregação do corante. No início a dependência de r com a porcentagem do solvente (PO) é praticamente linear.

$$r = K_4 - K_3 PO \quad (7.9)$$

Comparando esta última com a equação 7.8 resulta em:

$$C_r = \frac{C_a}{C_m} = -\frac{K_3}{K_2} PO + \frac{K_4 - K_1}{K_2} \quad (7.10)$$

ou seja, a razão da concentração dos agregados e monômeros de corantes depende linearmente da porcentagem do solvente em água.

Pode-se observar que a inclinação inicial das curvas depende da concentração do corante e do tipo de solvente. Para comparar os resultados de modo quantitativo criou-se o parâmetro Ω .

$$\Omega = \frac{dr}{dPO} = K_2 \frac{dC_r}{dPO} = -K_3 \quad (7.11)$$

Este parâmetro caracteriza a “rapidez” da desagregação em função de conteúdo de solvente. Infelizmente não é possível considerar que a constante K_2 não depende da natureza do solvente. Por isso a comparação dos valores de Ω em diferentes solventes tem caráter somente qualitativo.

BCD (μM)	$\Omega \times 10^3$
0,9	$7,1 \pm 0,6$
1,7	$8,1 \pm 0,7$
1,9	$13,0 \pm 1,0$
2,0	$16,0 \pm 1,0$

Tabela 7.7: Dependência do fator Ω em função da concentração do BCD180 em etanol.

Pelos dados obtidos para o BCD180 (tabela 7.7) pode-se observar que a “rapidez” da desagregação aumenta com o aumento da concentração do corante. A Mesma dependência foi observada para outros BCD. Este resultado é surpreendente, pois o mais lógico era esperar que a estabilidade dos agregados fosse maior quando maior a concentração do corante. Entretanto, o resultado obtido mostra que a adição do solvente desestabiliza mais efetivamente os agregados maiores.

Solvente	ξ	BCD180 $\Omega \times 10^3$	BCD90 $\Omega \times 10^3$
Acetonitrila	36,2	$9,7 \pm 0,7$	$1,1 \pm 0,3$
Metanol	32,6	$9,1 \pm 0,6$	$1,5 \pm 0,3$
Etanol	24,3	$8,1 \pm 0,7$	$2,5 \pm 0,5$
Isopropanol	18,3	$4,3 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,7$

Tabela 7.8: Dependência do fator Ω da natureza do solvente para BCD180 e BCD90, ambos na concentração de $1,7\mu M$.

Os resultados apresentados na tabela 7.8 mostram que existe uma correlação entre Ω e a constante dielétrica ξ do solvente. Entretanto, se para o BCD180 Ω é maior quando ξ é maior, para o BCD90 a dependência é contrária. Além disto, se for comparado o fator Ω dos BCD nas mesmas concentrações, pode-se ver que os agregados do BCD180 desagregam mais facilmente do que os do BCD90. Isto pode significar que:

1. Os agregados de BCD90 são mais estáveis em água do que os de BCD180 devido ao

maior efeito hidrofóbico no caso do BCD90.

2. O BCD90 tem maior afinidade com solventes menos polares (isopropanol), enquanto que a afinidade do BCD180 é maior com solventes mais polares (acetonitrila, metanol).

Esta consideração está em concordância com os resultados obtidos pela Dra. Lucimara P. F. Aggarwal, que determinou o grau de lipofilicidade BCD180 e BCD90 através da análise da razão entre a quantidade do fotossensibilizador em octanol $[C]_0$ e em fase aquosa $[C]_a$ (coeficiente de partição, CP). Os resultados estão apresentados na Tabela 7.9. O BCD90 apresentou o maior coeficiente de partição, que indica que este composto é mais hidrofóbico que o BCD180.

Corante	$CP = \frac{[C]_0}{[C]_a}$
BCD90	0,64
BCD180	0,09

Tabela 7.9: Coeficientes de partição (CP) dos BCD em mistura de água+octanol.

Depois de atingir uma percentagem crítica (PO_{cr}) de solvente o fator r chega num patamar, o que mostra que ocorreu a desagregação completa do corante. Apesar de não ocorrer mudanças do fator r acima da PO_{cr} , um fenômeno interessante ocorre com a intensidade de absorção dos BCD. Já nas primeiras adições do solvente a intensidade de absorção do espectro dos BCD aumenta até atingir um máximo por volta dos 50% e permanecendo estável até aproximadamente 70% de solvente. Pois neste intervalo de conteúdo do solvente os corantes não estão agregados e este aumento provavelmente é devido a mudança da constante dielétrica efetiva do ambiente, que produz um aumento no coeficiente de absorção molar do corante (figura 7.11).

7.2.2 Fluorescência

Como no caso da absorção ótica, quando a constante dielétrica do solvente aumenta ocorre o deslocamento dos máximos dos espectros de emissão dos corantes mantendo o deslocamento de Stokes aproximadamente constante (Tabela 7.10). Não houve variação significativa do deslocamento $\Delta\nu_{ST}$ para os BCD nos diferentes solvente.

Os perfis dos espectros de fluorescência dos BCD são independentes do comprimento de onda de excitação e os espectros de excitação correspondem aos de absorção, o que significa que a fluorescência é emitida somente por uma espécie: o monômero do corante. Com a adição de água nos solventes ocorre o deslocamento dos espectros de fluorescência dos BCD para região de menores comprimentos de onda, como mostrado na figura 7.13 para o BCD 150 e na

Solvente	ξ	BCD180		BCD150		BCD90	
		$\nu_{max}(cm^{-1})$	$\Delta\nu_{ST}$	$\nu_{max}(cm^{-1})$	$\Delta\nu_{ST}$	$\nu_{max}(cm^{-1})$	$\Delta\nu_{ST}$
Água	80,0	15456 ± 30	367 ± 60	15674 ± 30	377 ± 30	15847 ± 30	360 ± 60
Acetonitrila	36,2	15408 ± 30	362 ± 60	15630 ± 30	370 ± 30	15773 ± 30	387 ± 60
Metanol	32,6	15408 ± 30	362 ± 60	15630 ± 30	340 ± 30	15773 ± 30	387 ± 60
Etanol	24,3	15314 ± 30	356 ± 60	15527 ± 30	350 ± 30	15723 ± 30	328 ± 30
Isopropanol	18,3	15290 ± 30	380 ± 60	15530 ± 30	340 ± 30	15699 ± 30	352 ± 30

Tabela 7.10: Posição dos máximos dos espectros da fluorescência ν_{max} e o deslocamentos de Stokes $\Delta\nu_{ST}$ dos BCD em diferentes solventes

Figura 7.13: Espectro de fluorescência do BCD 150 nos diferentes solventes e com percentagens de água variando de 10% em 10%, de 0% (mais intenso) a 100% de água.

tabela 7.10 para todos os BCD. Além disto, a adição de água induz a diminuição da intensidade de fluorescência até esta atingir um valor mínimo para 100% de água.

Os rendimentos quânticos dos BCD nos solventes e mistura com água foram calculados. Os resultados estão na tabela 7.11. O maior ϕ foi obtido para o isopropanol, tomando valores de 17 a 22% para todos os BCD, e o menor para a água com valores de 0,2 a 1,8%. Entre os BCD o ϕ nos solventes puros segue a seguinte ordem: $BCD180 > BCD150 \simeq BCD90$, para todos os solventes.

Na figura 7.14 está mostrada a dependência normalizada do ϕ com a percentagem dos solventes mostrando que, para o mesmo solvente, os BCD apresentam aproximadamente o mesmo perfil, indicando que não há efeito do ângulo dos isômeros neste parâmetro. Se comparados os diferentes solventes a dependência do ϕ muda e pode-se notar que este ocorre com um perfil de

	Água	Acetonitrila	Metanol	Etanol	Isopropanol
BCD180	$1,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,3$	$5,2 \pm 0,5$	$16,8 \pm 1,7$	$22,0 \pm 2,2$
BCD150	$1,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,7$	$20,0 \pm 2,0$
BCD90	$0,2 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$5,9 \pm 0,6$	$17,2 \pm 1,7$

Tabela 7.11: Valores dos rendimentos quânticos da fluorescência dos BCD em solventes puros.

dois componentes: 1) o crescimento lento, que aparece em menores percentagens do solvente e 2) o crescimento rápido até atingir o valor do ϕ em solvente puro.

Figura 7.14: Variação dos rendimentos quânticos de fluorescência para os três BCD estudados em função da percentagem de solvente.

7.2.3 Tempo de Vida de Fluorescência

As medidas dos tempos de vida de fluorescência dos BCD foram feitas em todos os solventes puros e com percentagens de água até 15%. Os resultados obtidos mostram que os tempos de vida dos BCD variam entre 1,0ns a 0,01ns conforme o solvente e a percentagem de água. Em soluções com mistura de água, o aumento da percentagem desta na mistura diminui o tempo de vida dos BCD em todos os solventes estudados. Os experimentos de tempo de vida de fluorescência foram feitos para o BCD180 e BCD90 usando a técnica no domínio na frequência, em que os tempos são obtidos de modo indireto através do ajuste dos dados. Os dados apresentados

nas tabelas 7.12 e 7.13 foram feitos utilizando como ajuste um ou dois tempos de vida discretos (D) e/ou distribuição lorentziana (L).

Solvente	BCD	τ_1	f_1	τ_2	w	χ^2	Dist.
aq	180	0,01	0,01		0,41	9,9	L
		0,09	0,62	0,67		8,8	D
	90	0,05				8,6	D
ac100%	180	0,03			0,29	65,4	L
		0,16	0,94	2,18		71,3	D
	90	0,07			0,05	3,1	L
ac95%	180	0,01	0,81	1,35		11,7	D
	90	< 0,01			0,09	3,3	L
		< 0,01	0,74	0,28		2,3	D
ac90%	180	0,02				15,7	D
	90	< 0,01			0,08	15,7	L
		< 0,01	0,83	0,40		1,4	D
ac85%	180	0,06	0,95	4,7		37,4	D
	90	< 0,01			0,06	32,1	L
		< 0,01	0,89	0,54		7,9	D
met100%	180	0,17				15,5	D
	90	0,02			0,13	4,3	L
		< 0,01	0,56	0,24		3,3	D
met95%	180	0,07	0,86	0,86		14,5	D
	90	0,04			0,11	3,8	L
		0,01	0,56	0,21		3,4	D
met90%	180	0,05	0,92	1,01		19,6	D
	90	0,03			0,12	5,5	L
		0,02	0,61	0,24		4,8	D
met85%	180	0,01	0,83	0,8		2,43	D
	90	< 0,01			0,13	5,0	L
		< 0,01	< 0,58	0,26		3,4	D

Tabela 7.12: Tempos de vida dos BCD em solventes puros e misturados com água (Discretos (D) e/ou lorentziano (L)).

Em água pura para o BCD 180 foram encontrados dois tempos de vida discretos: um curto de 0,09ns com fração de 62% das moléculas de BCD e outro longo 0,67ns com 38% da fração, ou na distribuição lorentziana um tempo curto de 0,01ns com largura de 0,41ns. Este resultado mostra que em água o BCD180 apresenta uma mistura de moléculas com diferentes decaimentos. Entretanto, devido ao rendimento quântico em água ser muito baixo e o tempo de vida curto este resultado é mais qualitativo e serve apenas como comparação com outros solventes. O BCD90 em água pura apresentou um bom ajuste com apenas um tempo de vida discreto de 0,05ns, portanto não houve indícios de misturas de espécies com diferentes tempos de vida. Apesar dos tempos curtos dos dois BCD serem próximos os resultados apontam que a estrutura do BCD90 deve ser menos susceptível a diferentes modos de solvatação, já a molécula do

Solvente	BCD	τ_1	f_1	τ_2	w	χ^2	Dist.
et100%	180	0,48			0,08	14,6	L
		0,26			0,07	9,3	L
et95%	180	0,35			0,13	31,5	L
	90	0,20			0,06	2,1	L
		0,24	0,82	0,06		2,1	D
et90%	180	0,30			0,09	19,3	L
	90	0,12			0,18	12,5	L
		0,05	0,54	0,34		9,5	D
et85%	180	0,25				9,81	D
	90	< 0,01			0,21	17,4	L
		0,01	0,55	0,35		13,3	D
iso100%	180	1,12			0,27	18,1	L
	90	0,82				8,6	D
iso95%	180	0,65			0,36	28,9	L
	90	0,44				11,4	D
iso90%	180	0,45			0,42	8,81	L
	90	0,32			0,07	9,1	L
		0,34	0,92	< 0,01		7,2	D
iso85%	180	0,23			0,46	11,7	L
	90	0,27			0,1	8,9	L
		0,32	0,87	< 0,01		6,9	D

Tabela 7.13: Tempos de vida dos BCD em solventes puros e misturados com água (Discretos (D) e/ou lorentziano (L)).

BCD180 pela sua estrutura linear deve produzir solvatações e conformações moleculares diferentes em água. Em etanol os dois BCD tiveram um bom ajuste com a distribuição lorentziana, e o tempo de vida obtido para o BCD90 foi menor que o do BCD180. Em metanol ocorreu o contrário, o BCD 180 teve um bom ajuste discreto e o 90 apresentou dois tempos de vida, ou um tempo com uma distribuição, porém o tempo de vida curto do BCD90 foi novamente menor que o obtido para o 180. Em acetonitrila foi registrado o menor tempo de vida para os BCD e, em oposição, em isopropanol os BCD tiveram o maior tempo de vida: 1,12ns para o BCD180 e 0,82ns para o BCD90.

Com a mistura de água nos solventes o resultado geral para ambos BCD foi a diminuição dos tempos de vida com a percentagem de água e o aparecimento ou aumento de frações relativas com diferentes tempos de vidas discretos, ou aumento da largura da lorentziana.

Discussão geral dos resultados

Várias causas podem estar relacionadas com as mudanças espectrais dos BCD pela mudança do ambiente, mas de maneira geral os efeitos nas características energéticas e espectrais dos BCD

estão relacionadas com características macroscópicas elétricas como a polaridade e polarizabilidade dos solventes, e as microscópicas como a capacidade de formar ligações de hidrogênio. Entretanto, a análise do deslocamento de Stokes em função das características dos solventes mostrou que os efeitos referentes as características macroscópicas dos solventes, seguindo a teoria de Lippert bem como a formação das ligações de hidrogênio, são desprezíveis no caso dos BCD e deve existir outro mecanismo do efeito do ambiente que influenciam as características espectrais e energéticas. Neste ponto de vista o deslocamento espectral pode estar relacionado a mudanças estéricas dos BCD como a torção das cadeias de conjugação- π e a mudança de ângulo entre os cromóforos. Neste sentido foi calculado o ângulo das moléculas de BCD nos solventes e no vácuo por simulação computacional (capítulo 4.5). Os resultados (Tabela 7.14) indicam que a interação com os solventes altera a estrutura dos BCD e causa mudanças nos ângulos entre os cromóforos. Deste ponto de vista as características dos solventes podem influenciar, ou na formação preferencial de uma estrutura espacial do corante mais energeticamente estável ou, contrariamente permitir a existência de várias estruturas isoméricas cujos níveis energéticos são próximos.

	BCD180	BCD150	BCD120	BCD90
Água	150,3°	144,7°	123,9°	94,4°
Acetonitrila	161,8°	144,5°	121,9°	84,2°
Metanol	158,9°	146,7°	120,7°	99,9°
Etanol	158,0°	149,6°	122,3°	94,0°
Isopropanol	158,5°	144,2°	137,5°	98,9°
Computacional	180,0°	147,6°	126,7°	90,3°

Tabela 7.14: Ângulos dos BCD calculados através da equação 7.5 nos vários solventes e computacionalmente.

Estas mudanças estéricas afetam a interação dipolo-dipolo entre os cromóforos e o efeito túnel pelo heterociclo central, e assim causam mudanças no espectro de absorção ótica. Além disto, o aumento da constante dielétrica do ambiente deve diminuir a interação dipolo-dipolo entre os cromóforos, diminuindo o *splitting* dos níveis energéticos do corante aumentando a energia do nível mais baixo e deslocando a banda de absorção mais longa para região de menores comprimentos de onda.

Outro efeito do ambiente se manifesta na dinâmica da desativação da excitação eletrônica de BCD que se reflete em mudanças dos rendimentos quânticos de fluorescência ϕ_{fl} e tempos de vida do estado $S_1^*(\tau_{S1})$ dos corantes. É conhecido que a formação dos agregados H diminui o rendimento quântico da fluorescência e os tempos de vida dos estados excitados. A análise dos espectros de absorção mostrou que nas soluções aquosas os agregados de formam a partir de concentrações $\approx 1\mu M$. Por este motivo considerando apenas efeitos dos solventes e não

agregação, nós analisamos inicialmente os efeitos só em solventes orgânicos.

Pode-se observar da tabela 7.15 que τ_{S1} e ϕ_{fl} diminuem quando aumenta a constante dielétrica do solvente ξ . Entretanto, em acetonitrila cujo ξ é praticamente igual ao do metanol, os BCD possuem ϕ_{fl} significativamente menor.

Solvente	ξ	Viscosidade (<i>mpoa</i>)	BCD180 $\tau(ns)$	BCD180 ϕ	BCD90 $\tau(ns)$	BCD90 ϕ
Água	80,0	10,10	0,09	$1,8 \pm 0,2$	0,05	$0,2 \pm 0,1$
Acetonitrila	36,2	3,45	0,16(94%)	$3,0 \pm 0,3$	0,07	$0,5 \pm 0,1$
Metanol	32,6	5,45	0,17	$5,2 \pm 0,5$	0,24(44%)	$2,0 \pm 0,2$
Etanol	24,3	10,80	0,48	$16,8 \pm 1,6$	0,26	$5,9 \pm 0,6$
Isopropanol	18,3	17,70	1,12	$22,0 \pm 2,2$	0,82	$17,2 \pm 1,7$

Tabela 7.15: Tempo de vida e rendimento quântico de fluorescência dos BCD nos vários solventes em função da viscosidade e constante dielétrica.

A diminuição de τ_{S1} e ϕ_{fl} se associa com o aumento das taxas de processos não radiativos da desativação da excitação, que acontece quando aumenta a densidade dos níveis vibracionais e rotacionais do estado fundamental e dos excitados, que ocorre pelo aumento da mobilidade relativa das partes da molécula. É conhecido que a cadeia de conjugação- π dos corantes ciânicos é flexível e por isto estes possuem, em solventes de baixa viscosidade, valores de τ_{S1} e ϕ_{fl} relativamente pequenos. Entretanto, em solventes viscosos (glicerina, altos álcoois etc.) τ_{S1} e ϕ_{fl} aumentam dramaticamente, pois o aumento da viscosidade do solvente diminui a mobilidade das moléculas.

Pode-se ver (tabela 7.15) que para os BCD existe uma correlação entre as viscosidades dos solventes orgânicos e valores τ_{S1} e ϕ_{fl} . Como já comentado, o efeito da adição de água nos solventes orgânicos ocorre em duas fases: um decaimento rápido dos τ_{S1} e ϕ_{fl} na presença de pequenas percentagens da água, quando os espectros de absorção não mostram a presença dos agregados dos corantes, e um decaimento lento do ϕ_{fl} quando aparece o pico característico dos agregados.

Nós associamos a primeira fase com a destruição da estrutura das camadas de solvatação das moléculas de corantes pelo solvente, isto devido a presença de moléculas de água que produz a diminuição da microviscosidade do meio ao redor das moléculas de corante e conseqüentemente aumenta a mobilidade das moléculas solvatadas. A segunda fase nós associamos com a agregação dos corantes estimulada pela presença de grande percentagem de água.

7.3 Interação com Tensoativos

Neste capítulo são apresentados resultados da interação dos BCD com tensoativos carregados positivamente, negativamente e zwitteriônicos. O estudo foi feito sugerindo que as micelas podem ser consideradas como modelos de membrana biológica e os resultados obtidos podem ser úteis para esclarecimento dos mecanismos de interação dos BCD com as membrana.

7.3.1 Interação dos BCD com LPC

O LPC (*Lisophosphatidylcholin*) é um tensoativo zwitteriônico, análogo do fosfolípido *Phosphatidylcholin*, que é de maior conteúdo na estrutura da membrana celular. O LPC possui CMC na faixa entre $6,1\mu M$ a $8,0\mu M$ [49]. As concentrações de LPC usadas nestes experimentos estão muito acima da CMC, portanto considera-se que as micelas de LPC já estão formadas. A adição de LPC na solução com BCD induz mudanças dos espectros de absorção como mostrado nas figuras 7.15 e 7.16.

Figura 7.15: Espectros de absorção ótica das espécies de BCD formadas em solução em função da concentração de LPC. Lado esquerdo $[BCD180] = 11,8\mu M$ e lado direito $[BCD150] = 5,3\mu M$.

Para os BCD, a adição de LPC produz o deslocamento do espectro para região vermelha. Além do deslocamento, para os BCD180, BCD150 e BCD90 foi observado o aumento da intensidade dos espectros quando aumenta a concentração do LPC. Estas mudanças indicam que na presença das micelas as moléculas de corantes aparecem numa ambiente menos polar do que na água. Este ambiente induz o aumento do coeficiente de absorção molar do corante e desloca seus espectros para região de maiores comprimentos de onda (seção 2.3). Assim, podemos concluir que os BCD se ligam com as micelas de LPC ficando na parte menos polar da micela.

Para todos os BCD, no conjunto dos espectros obtidos variando a concentração do LPC,

Figura 7.16: Espectros de absorção ótica das espécies de BCD formadas em solução em função da concentração de LPC. Lado esquerdo $[BCD120] = 12,2\mu M$ e lado direito $[BCD90] = 7,5\mu M$.

aparecem os pontos isobésticos, mostrando que na solução estão presentes somente duas espécies em equilíbrio que consideramos como monômeros livres do corante e seus monômeros ligados com micelas LPC. A figura 7.17 mostra um exemplo da dependência do conteúdo relativo de espécies da concentração de LPC para BCD180. A diminuição de uma espécie e aumento da outra seguem funções monoexponenciais. Estas funções se cruzam no ponto em que ocorre 50% de cada espécie (indicado na figura).

Figura 7.17: Conteúdo relativo de espécies de BCD em função da concentração de LPC.

A fluorescência dos BCD na presença de LPC também confirma a presença de duas espécies. Com a adição de LPC ocorre um grande aumento na intensidade de fluorescência e o deslocamento para maiores comprimentos de onda. A figura 7.18 ilustra este perfil de mudança do espectro de fluorescência para o BCD 90, em que na ausência de LPC tem-se o espectro

centrado em 630nm , e com o aumento da concentração de LPC ocorre o deslocamento espectral para 644nm e o aumento de intensidade.

Figura 7.18: Espectros da fluorescência do $[\text{BCD90}] = 2,5\text{ }\mu\text{M}$ em função da concentração de LPC, $\text{exc} = 610\text{nm}$.

As mudanças ocorridas com a fluorescência indicam que os processos não radiativos de perda de energia diminuem quando os BCD se ligam com micelas. Este resultado sugere fortemente que a ligação dos BCD com micela de LPC produz o sistema $\text{BCD} + \text{LPC}_{\text{mic}}$ mais “rígido” quando comparado com $\text{BCD} + \text{gua}$. Além disto, semelhante aos espectros de absorção óptica, o deslocamento dos espectros de fluorescência para região de maiores comprimentos de onda indica que houve mudanças no microambiente em torno dos BCD. Considerando as mudanças espectrais na absorção e emissão, atribui-se a espécie formada pela interação dos BCD com LPC ao monômero de BCD ligado a micela de LPC. A equação de equilíbrio químico abaixo descreve esta interação:

em que $(\text{BCD} + \text{LPC}_{\text{mic}})$ indica o complexo formado entre a molécula do corante e a micela.

A constante de formação desse complexo (constante de ligação) é dada pela equação:

$$K = \frac{[\text{BCD} \dots \text{LPC}_{\text{mic}}]}{[\text{BCD}][\text{LPC}_{\text{mic}}]} \quad (7.12)$$

em que $[\text{BCD}]$ e $[\text{LPC}_{\text{mic}}]$ são as concentrações do monômero do corante livre e das micelas do LPC. Quando $[\text{BCD} \dots \text{LPC}_{\text{mic}}] = [\text{BCD}]$ e considerando que a ligação de uma molécula do

corante com a micela não afeta a ligação de outras moléculas com mesma micela pode-se determinar constante de equilíbrio:

$$K = \frac{1}{[LPC_{mic}]} \quad (7.13)$$

em que $[LPC_{mic}]$ é a concentração das micelas, calculada como $\frac{[LPC]_0}{n}$, sendo $[LPC]_0$ a concentração inicial de tensoativos de LPC e n o número de agregação das micelas LPC, que é $\simeq 100$. As constantes de ligação estão na Tabela 7.16.

Corante	$K * 10^6 M^{-1}$
BCD180	1,24
BCD150	1,64
BCD120	1,02
BCD90	1,52

Tabela 7.16: Valores das constantes de ligação dos BCD com micelas de LPC.

Os valores de K são praticamente os mesmos para todos BCD. Este mostra que não há influência do ângulo entre os cromóforos do BCD na interação com LPC.

7.3.2 Interação dos BCD com SDS

O SDS é um tensoativo carregado negativamente e sua CMC está na faixa entre 7,0 a 10,0mM. O número de agregação para SDS é de 62 [50]. As figuras 7.19 e 7.20 mostram as mudanças espectrais de absorção ótica e fluorescência dos BCD causadas pela interação com SDS.

Observa-se das figuras que em concentrações baixas de SDS ocorre a diminuição das bandas dos BCD e uma mudança completa no perfil de absorção ótica e a fluorescência praticamente desaparece. Com o aumento da concentração de SDS as bandas de absorção ótica crescem e o perfil espectral se torna semelhante daquele, que foi observado para espectros dos BCD ligados com micelas LPC, porém deslocado ainda mais para a região vermelha. Na fluorescência também ocorre o aumento da intensidade e o deslocamento espectral para maiores comprimentos de onda. Estas mudanças confirmam a forte interação dos BCD com micelas SDS.

As mudanças dos espectros de absorção ótica na presença de baixas concentrações de SDS são semelhantes aquelas, que foram observados anteriormente na presença do NaCl em soluções aquosas dos BCD e foram associados com a formação dos agregados H e J dos corantes [9] [10]. Assim, podemos associar estas mudanças com a agregação dos BCD estimulada pela interação com SDS com predominância dos agregados H, pois a agregação H gera uma banda deslocada

para o azul que foi muito mais pronunciada em todos os BCD do que a banda deslocada para o vermelho, que é característico para agregados J. O decaimento da intensidade de fluorescência está em concordância com esta sugestão, pois os agregados dos corantes possuem o rendimento quântico de fluorescências menor do que os monômeros e além do mais não foi observada a fluorescência característica para agregados J dos BCD. Não foi possível saber se na primeira fase as micelas SDS já estavam formadas, pois mesmo que a CMC ainda não tivesse sido alcançada, alguns trabalhos mostram que na presença de alguns fotossensibilizadores a CMC diminui sensivelmente (até 3 ordens de grandeza). Acredita-se que isto é válido para interação SDS com BCD. Pelo menos na última etapa acredita-se que as micelas de SDS já estejam formadas, pois mesmo para os BCD em que a última espécie não atingiu o valor de CMC do SDS (BCD120 e BCD90), o perfil dos espectros mostra que o microambiente deve ser igual para todos os BCD, e portanto as micelas já devem estar formadas.

Figura 7.19: Espectros de absorção ótica e de fluorescência das espécies dos BCD formadas na presença de SDS. Absorção ótica $[BCD180] = 4,9\mu M$ (alto a esquerda), $[BCD150] = 4,8\mu M$ (baixo a esquerda) e fluorescência $[BCD180] = 0,8\mu M$ $exc = 610nm$ (alto a direita), $[BCD150] = 0,3\mu M$ $exc = 610nm$ (baixo a direita).

Figura 7.20: Espectros de absorção ótica e de fluorescência das espécies dos BCD formadas na presença de SDS. Absorção ótica $[BCD120] = 2,1\mu M$ (alto a esquerda), $[BCD90] = 1,1\mu M$ (baixo a esquerda) e fluorescência $[BCD120] = 0,8\mu M$ $exc = 575nm$ (alto a direita), $[BCD90] = 0,7\mu M$ $exc = 600nm$ (baixo a direita).

Às mudanças dos espectros observadas quando a concentração de SDS aumenta atribui-se a desagregação dos corantes devido ao aumento de concentração das micelas, e os espectros finais associou-se aos monômeros dos BCD ligados com micelas.

Com estes resultados pode-se assegurar a presença de três espécies em solução em equilíbrio. A Figura 7.21 apresenta um exemplo da dependência do conteúdo relativo dessas espécies da concentração de SDS para o BCD150. A análise dessa dependência mostra que para todos os BCD essas espécies pressentem em solução duas a duas, ou seja, como equilíbrio monômeros livres $\leftrightarrow$ agregados até agregação completa e só depois aparecem os monômeros ligados com micelas no equilíbrio agregados $\leftrightarrow$ monômeros ligados. Com base nestas considerações considera-se o seguinte esquema da interação dos BCD com micelas de SDS:

Figura 7.21: Conteúdo relativo de espécies em função da [SDS] para o BCD150.

Primeira etapa (agregação dos BCD)

Segunda etapa (desagregação dos BCD)

A agregação dos BCD acontece imediatamente depois da primeira edição de SDS. Este não permite determinar a constante de ligação dos BCD com micelas SDS, como este foi feito para micelas LPC.

Na tabela 7.17 são mostrados os valores das razões $\frac{[SDS]}{[BCD]}$ quando o conteúdo dos agregados (espécie 2) e monômeros ligados para micelas (espécie 3) atingem os máximos.

Para a espécie BCD^nSDS os valores da razão $\frac{[SDS]}{[BCD]}$ são próximos para os BCD150, BCD120 e BCD90, e estes diferem mais de 10 vezes do valor do BCD 180. Este resultado mostra a influência direta do ângulo entre os cromóforos na formação da espécie 2, e que a estrutura planar do BCD180 é responsável pela grande diferença do número de moléculas de SDS necessárias para formar a espécie 2 em relação aos outros BCD. Para a última espécie o número médio de moléculas de SDS é de $652,5 \pm 156,2$, e o número de micelas por molécula de BCD (segundo o número de micelas do SDS em água, 60) é em média $10,8 \pm 2,6$ micela por molécula de BCD. Este número foi calculado como a média dos valores da razão $\frac{[SDS]}{[BCD]}$ da espécie 3 $nBCDSDS$ para os 4 BCD.

$\frac{[SDS]}{[BCD]}$	Espécie 2	Espécie 3
<i>BCD</i> 180	$164,5 \pm 8,9$	$461,2 \pm 46,1$
<i>BCD</i> 150	$12,5 \pm 1,3$	$693,4 \pm 69,3$
<i>BCD</i> 120	$19,0 \pm 1,9$	$619,1 \pm 61,9$
<i>BCD</i> 90	$7,3 \pm 0,7$	$836,4 \pm 83,6$

Tabela 7.17: Valores da razão $\frac{[SDS]}{[BCD]}$ necessárias para a formação das as espécies de BCD.

7.3.3 Interação dos BCD com CTAB

O CTAB é carregado positivamente. A sua adição nas soluções dos BCD não produz nenhuma mudança nos espectros de absorção óptica e da fluorescência dos corantes.

Discussão Geral

Os resultados obtidos mostram que a interação eletrostática exerce um papel fundamental na interação entre moléculas de corantes e de tensoativos. Assim, para tensoativo SDS, que é carregado negativamente, a interação com os BCD, que possuem a carga líquida +2, a interação é extremamente forte. Mais do que isto, a interação com SDS estimula a agregação dos BCD, provavelmente devido a diminuição da repulsão eletrostática entre as moléculas de BCD ligados com micelas negativas de SDS.

Devido a repulsão eletrostática entre as moléculas dos BCD e as de CTAB, carregadas positivamente, a interação entre os BCD e CTAB é desprezível. Entretanto, em caso do tensoativo zwitteriônico LPC, a interação dos BCD com micelas LPC é caracterizada pelas constantes de ligação bastante altas. Esta interação pode ser, em princípio, devido de dois fenômenos: interação entre dipolo da cabeça polar das moléculas de LPC e dipolo induzido da molécula de BCD e/ou efeito hidrofóbico que estimula a localização das moléculas de BCD numa parte da micela, que possui a polaridade (constante dielétrica) mais adequada para os BCD.

7.4 Interação com DNA

Muitos aspectos da interação dos BCD com DNA já foram estudados em trabalhos anteriores [9, 10, 22, 45, 46]. Neste capítulo são apresentados dados novos obtidos através dos métodos de absorção ótica, fluorescência (estática e temporal), flash-fotólise, bem como o cálculo dos rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete os quais complementam os resultados obtidos anteriormente. Na seção 6 foi apresentada alguns resultados da interação dos BCD com

DNA. Apresenta-se aqui alguns destes resultados mais detalhadamente obtidos através da absorção ótica e dicroísmo circular, para dar seqüência na discussão dos resultados obtidos neste trabalho.

Os experimentos da interação dos BCD com o DNA foram realizados partindo da solução pura de BCD com a adição gradativa de DNA, até os espectros atingirem um ponto de saturação onde não ocorreram mais mudanças. Os espectros do BCD180 são usados como exemplos desta interação e foram divididos em dois gráficos seguindo a saturação das mudanças pela concentração de DNA (figura 7.22).

Figura 7.22: (Esquerdo) Primeira fase das mudanças dos espectros de absorção ótica em função da [DNA]. (Direito) Segunda fase das mudanças dos espectros de absorção ótica em função da [DNA]. $BCD180 = 4,51 \mu M$.

Nas figuras 7.22 e 7.23 pode-se ver que em baixas concentrações de DNA ocorre a diminuição da intensidade da banda do monômero do BCD180 ($632nm$), com o aparecimento das bandas dos agregados tipo H ($592nm$) e J ($690nm$). Numa determinada faixa de concentrações de DNA a absorção dos agregados atinge um patamar, mostrando que neste momento existem apenas a espécies agregadas $H + J$. Com o aumento da concentração de DNA ocorre o aparecimento de novas bandas até atingir a saturação, e desaparece completamente a banda dos agregados não ocorrendo mais mudanças nos espectros. A forma dos últimos espectros é igual à dos monômeros, apenas deslocado para comprimentos de onda maiores. A análise deste comportamento aponta para a formação de um complexo do corante monômero com o DNA.

Numa análise geral das mudanças dos espectros pelo aumento da concentração de DNA, pode-se entender que ocorre um processo em que aparecem três espécies diferentes na solução dependentes da concentração de DNA sendo que, em determinadas concentrações, é possível

Figura 7.23: (Direita) Mudanças de absorção nas bandas do BCD180 em função do [DNA]. (Esquerda) Razão de absorção óptica das bandas do BCD180 em função do [DNA]. $\text{BCD180} = 4,51\mu\text{M}$.

obter cada espécie pura (figura 7.23). A primeira espécie é a monomérica, em que apenas moléculas livres de BCD estão presentes, a segunda é formada por agregados ($H + J$) de BCD no DNA e a terceira são monômeros de BCD ligados no DNA. Este modelo já foi descrito na literatura para uma classe de porfirinas [19]. Para comprovar a ligação dos BCD com DNA foram feitos experimentos de dicroísmo circular (CD), os quais estão exemplificados para o BCD150.

Os BCD não possuem sinal de CD em soluções homogêneas. Na figura 7.24 a análise dos espectros de CD mostra que para todos os BCD a adição de DNA induz ao aparecimento do sinal de dicroísmo na região espectral onde os BCD possuem absorção óptica. A dependência do sinal pela concentração de DNA para todos os corantes pode ser dividida em duas fases, sendo que as características dessas fases dependem da estrutura do corante. Na primeira fase aparece o sinal de CD que aumenta com a concentração de [DNA] até atingir um máximo caracterizando a formação dos agregados de BCD no DNA. Com o aumento na concentração de DNA a intensidade desse sinal começa a diminuir e aparece outro sinal de CD com um perfil completamente diferente. Este resultado não ocorreu desta forma para o BCD180, em que a última espécie, monômero de BCD ligado ao DNA, não apresentou sinal de dicroísmo. Isto se deve a alta simetria da molécula do BCD180. Assim, a formação das 3 espécies de BCD na presença de DNA também foi comprovado pelo experimento de CD.

Pode-se concluir que o sinal de CD aparece devido à ligação tanto dos agregados quanto dos monômeros de BCD no DNA, e que os BCD se ligam na superfície do DNA, pois em todos

Figura 7.24: (Direita) Espectros de DC em função da concentração de DNA, $[BCD]_{150} = 3,7\mu M$. (Esquerda) Variação do máximo dos espectros de DC pela concentração de DNA para $\lambda = 649nm$.

os experimentos foi monitorado o sinal característico do DNA e este permaneceu inalterado na presença dos BCD.

7.4.1 Constantes de Ligação BCD-DNA

A interação dos BCD com DNA, parte já relatada em trabalhos anteriores, segue a mesma formação de espécies obtidas com a interação entre BCD e SDS. Porém a constante de ligação dos BCD com DNA não foi determinada nestes trabalhos. O problema na determinação desta constante é evitar o processo de agregação dos BCD de modo que seja possível resolver as equações de equilíbrio químico. A maneira proposta para resolver isto foi diminuir ao máximo a concentração de BCD, fazendo com que não ocorresse a formação de agregados. Para isto é necessário aumentar o caminho ótico para executar as medidas dos espectros de absorção, de modo que a absorbância das soluções permaneça na faixa da confiança do espectrofotômetro. Para isto foram usadas 3 cubetas enfileiradas de 5cm cada, perfazendo um total de 15cm de caminho ótico. Assim foi possível trabalhar com concentrações de BCD da ordem de $10^{-8}M$.

A figura 7.25 mostra as mudanças espectrais de absorção ótica e a percentagem relativa de espécies do BCD150 em função da concentração de DNA. Com a adição de DNA ocorre a diminuição da banda em 623nm e o aparecimento de uma banda em 638nm, até que, com o aumento da concentração de DNA, a banda em 623nm desapareça. A análise deste processo mostrou que

Figura 7.25: (Esquerda) Espectros de absorção do $[BCD150] = 0,02\mu M$ em função da $[DNA]$. (Direita) Conteúdo relativo de espécies de BCD em função da $[DNA]$.

	BCD180	BCD150	BCD120	BCD90
$k \times 10^7 (M^{-1})$	$4,71 \pm 1,06$	$5,41 \pm 1,63$	$2,17 \pm 0,99$	$5,33 \pm 0,82$

Tabela 7.18: Valores das constantes de ligação dos BCD com DNA.

apenas duas espécies estão em equilíbrio na solução nestas concentrações conforme mostrado na figura 7.25. O mesmo resultado foi obtido para os outros BCD.

Como o processo de agregação foi evitado a equação de equilíbrio pôde ser escrita como:

E fazendo a análise do conteúdo relativo de espécies, obtém-se assim um perfil de mudança espectral em função da $[DNA]$ com duas espécies. Desta forma, usando a percentagem de 50% em que $[BCDDNA] = [BCD]$, pode-se calcular a constante k dada pela equação 7.14:

$$k = \frac{1}{[DNA]} \quad (7.14)$$

Os valores da constante de ligação K mostram uma forte interação entre o BCD e DNA, que é cerca de 1 ordem maior do que o obtido para a interação com LPC. Este resultado já era esperado, uma vez que os radicais fosfato conferem ao DNA uma carga líquida negativa.

7.4.2 Espectros e Rendimento Quântico de Fluorescência

Assim como obtido com a absorção ótica, os espectros de fluorescência também mostram o equilíbrio de três espécies em solução em função da concentração de DNA (figura 7.26). Inicialmente, na ausência de DNA, o rendimento quântico de fluorescência é baixo para todos os BCD, e seus valores são: $BCD180 = 1,8\%$, $BCD150 = 1,0\%$, $BCD120 = 0,3\%$ e $BCD90 = 0,2\%$.

Figura 7.26: Espectros de fluorescência das espécies de BCD em função da [DNA]. BCD180 (em cima a esquerda), BCD150 (em cima direita), BCD120 (em baixo esquerda) e BCD90 (em baixo a direita).

Com a adição de uma pequena quantidade de DNA para corantes BCD180, BCD150 e BCD90 os espectros de fluorescência são deslocados para o vermelho e tem sua intensidade aumentada, sendo que os rendimentos quânticos neste ponto valem: $BCD180 = 5,0\%$, $BCD150 = 1,5\%$ e $BCD90 = 0,9\%$. Para o BCD120 estes efeitos não foram observados. Com a adição de mais DNA ocorre o deslocamento para o azul e a intensidade de fluorescência aumenta e atinge os rendimentos quânticos: $BCD180 = 44,0\%$, $BCD150 = 39,0\%$, $BCD120 = 21,5\%$ e $BCD90 = 24,8\%$.

Pode-se observar que o ϕ_{fl} aumenta mais de 20 vezes, dependendo do ângulo entre os cromóforos, na concentração mais alta de DNA. Segundo o modelo proposto para explicar os dados de absorção ótica em função do DNA, considera-se que na presença do DNA na solução existem três espécies em equilíbrio: monômeros livres de BCD, agregados de BCD ligados com DNA (BCD^nDNA) e monômero de BCD ligado ao DNA ($BCDDNA$). Atribui-se o deslocamento para o vermelho dos espectros da fluorescência, observado nas primeiras adições de DNA a formação dos agregados J de BCD ligados ao DNA, sendo que estes possuem maior rendimento quântico do que os monômeros livres de BCD em solução aquosa. A espécie

formada com o aumento da concentração de DNA e que sofre um deslocamento para o azul atribuímos à monômeros de BCD ligados ao DNA que aparecem devido a desagregação dos agregados J.

O aumento do rendimento quântico de fluorescência é devido o aumento da imobilidade das moléculas de BCD quando ligadas ao DNA.

7.4.3 Anisotropia Estática de Fluorescência

Para verificar o efeito da interação do DNA na mobilidade das moléculas de BCD foi feito o experimento de anisotropia de fluorescência estática para todos os BCD, exceto para o BCD120. Em solução aquosa sem DNA, o rendimento quântico da fluorescência das moléculas de BCD é muito baixo não possibilitando obter os valores da anisotropia na ausência do DNA. Para razões de $\frac{[DNA]}{[BCD]} < 10$ os valores de anisotropia variam de 0,17 para o BCD180, 0,13 para o BCD90 até 0,10 para o BCD150. Para $\frac{[DNA]}{[BCD]} > 10$ a anisotropia aumenta até atingir valores em torno de 0,33 para todos os BCD como mostrado na figura 7.27.

Figura 7.27: Anisotropia de fluorescência dos BCD em função da razão $\frac{[DNA]}{[BCD]}$. $BCD180 - exc = 643nm$, $BCD150 - exc = 635nm$ e $BCD90 - exc = 629nm$.

Da figura 7.27 vê-se que a anisotropia dos BCD em função de $\frac{[DNA]}{[BCD]}$ depende do ângulo entre os cromóforos. Inversamente que o BCD 180 possui o valor inicial de anisotropia maior que a do BCD90, os ambos possuem a dependência semelhante da razão $\frac{[DNA]}{[BCD]}$. O BCD150 tem um perfil mais lento de aumento da anisotropia com o DNA que poderia ser explicado como menor afinidade do BCD150 com DNA. Esta sugestão está em conflito com o fato que a constante da ligação do BCD150 com DNA é maior do que as do BCD180 e BCD90, mesmo como foi obser-

vado em caso das micelas. Isto pode significar que o BCD150 mais hidrofóbico que BCD180 e BCD90 e seus agregados em água são mais estáveis que diminui a probabilidade da desagregação e torna a dependência da anisotropia da fluorescência do BCD150 da concentração do DNA mais lenta não devido a menor afinidade do BCD150 com DNA mas devido a maior estabilidade dos seus agregados.

7.4.4 Tempo de Vida de Fluorescência

Seguindo o modelo proposto para a interação dos BCD com DNA foi analisado o tempo de vida de fluorescência dos BCD em função da razão $\frac{[DNA]}{[BCD]}$. Esta análise foi feita considerando dois modelos para análise: com dois tempos de vida e com um tempo seguindo uma distribuição lorentziana de tempos de vida. Os dados foram obtidos até o ponto em que não ocorreram mais mudanças nos tempos em função do DNA (tabela 7.19). Na figura 7.28 estão os dados obtidos para o BCD180 na razão $\frac{[DNA]}{[BCD]} = 2,36$ com o respectivo ajuste.

Figura 7.28: Tempo de vida de fluorescência do BCD180 obtido através da razão da modulação e da diferença de fase em função da frequência de modulação. Ajuste obtido para a razão $\frac{[DNA]}{[BCD]} = 2,36$ considerando uma distribuição lorentziana.

O BCD180 e o BCD150 tiveram tempos de vida próximos para razões de $\frac{[DNA]}{[BCD]}$ parecidas. Na ausência de DNA foi obtido dois tempos de vida para BCD180 um curto de $0,09ns$ com a fração de 62% e outro longo de $0,67ns$ com 38%. Para o BCD 150 foi obtido apenas um tempo de vida de $0,05ns$. Já na proporção de aproximadamente duas moléculas de DNA para uma de BCD o tempo de vida dos BCD180 e 150 aumenta cerca de uma ordem de grandeza, e este

aumento atinge um máximo na razão em torno de 150 atingindo tempos de $0,91ns$ e $1,10ns$ para o BCD180 e BCD150 respectivamente. Já na primeira adição de DNA a percentagem das frações dos tempos longos era maior que 80%. Diferente dos BCD180 e BCD150, os BCD90 e BCD120 apresentam dois tempos de vida final, atingindo os tempos $1,94ns$ com $f = 77\%$ e $0,45ns$ com $f = 23\%$ para BCD90 e $2,72ns$ com $f = 84\%$ e $0,21ns$ com $f = 16\%$ para BCD120, respectivamente.

$\frac{[DNA]}{[BCD]_{180}}$	$\tau_1(ns)$	f_1	$\tau_2(ns)$	w	$\frac{[DNA]}{[BCD]_{150}}$	$\tau_1(ns)$	f_1	$\tau_2(ns)$	w
2,36	0,71 0,84	0,88	< 0,01	0,49	1,49	0,59 0,70	0,87	0,09	0,35
4,72	0,76 0,86	0,91	< 0,01	0,40	2,98	0,61 0,77	0,85	0,07	0,48
9,43	0,80 0,87	0,92	< 0,01	0,33	5,95	0,77 0,79	0,96	0,01	0,12
18,7	0,84 0,88	0,94	< 0,01	0,19	11,90	0,89 0,90	0,97	< 0,01	0,15
35,85	0,87 0,90	0,95	< 0,01	0,19	23,81	0,97 0,95	0,97	0,01	0,17
126,41	0,89 0,91	0,96	< 0,01	0,19	53,57	1,06 1,04	0,97	0,01	0,17
279,24	0,89 0,91	0,96	< 0,01	0,15	153,57	1,08 1,10	0,97	0,01	0,19
$\frac{[DNA]}{[BCD]_{120}}$	$\tau_1(ns)$	f_1	$\tau_2(ns)$	w	$\frac{[DNA]}{[BCD]_{90}}$	$\tau_1(ns)$	f_1	$\tau_2(ns)$	w
1,08	0,14 0,26	0,50	0,07	0,11	1,49	0,52 0,58	0,89	< 0,01	0,16
2,17	0,03 0,90	0,91	0,11	0,23	2,98	0,65 0,81	0,84	0,09	0,37
4,33	< 0,01 1,29	0,42	0,14	0,23	5,95	0,89 1,66	0,63	0,38	1,12
8,66	< 0,01 1,96	0,59	0,20	1,89	11,90	1,00 1,77	0,66	0,40	1,19
17,33	0,73 2,31	0,71	0,29	2,55	23,81	1,15 1,88	0,71	0,40	1,31
38,99	1,36 2,54	0,80	0,22	2,64	53,57	1,24 1,95	0,72	0,43	1,30
111,78	1,73 2,69	0,84	0,19	2,64	153,57	1,39 1,93	0,77	0,45	1,12

Tabela 7.19: Tempo de vida de fluorescência dos BCD em função da razão $\frac{[BCD]}{[DNA]}$. Ajustes feitos considerando dois tempos de vida discretos e um tempo seguindo uma distribuição lorentziana.

Os resultados obtidos mostram dois efeitos importantes. O primeiro corrobora o modelo usado para explicar a interação dos BCD com DNA obtidos de outros experimentos, pois o aumento do tempo de vida da fluorescência dos BCD deve acontecer pelo aumento da imo-

bilidade externa e interna da molécula quando ligada ao DNA. Assim uma componente curta cuja percentagem diminui quando concentração do DNA aumenta, se associa com a fluorescência dos monômeros livres dos BCD e a componente longa, cuja percentagem aumenta com o aumento de $[DNA]$, é da fluorescência dos monômeros ligados com DNA. Por outro lado foi observado que os BCD120 e BCD90 possuem duas componentes longos quando ligados com DNA. Isto pode ser associado com a ligação desses dois corantes com dois tipos de sítios de ligação diferentes do DNA que produzem imobilidade diferente dessas moléculas.

7.4.5 Tempo de Vida e Absorção Tripleto-Tripleto

O espectro de absorção, rendimento quântico e o tempo de vida da transição tripleto-triplete foram obtidos pela técnica de flash-fotólise e uma parte pela PAC. Para isto foi usado um laser de NiYag com excitação em $532nm$. No caso da PAC foi usado também um laser de NiYag acoplado a um OPO e usado a excitação em $600nm$. Parte destes experimentos foi feito no Instituto de Física Química da Academia de Ciência da Rússia em Moscou (IFQRu), e parte na Universidade de Coimbra em Portugal.

Foram obtidos os espectros em água, na presença de DNA e em etanol. A figura 7.29 mostra os espectros diferenciais de absorção $T - T$ para os quatro BCD na presença de DNA, na razão de $\frac{[DNA]}{[BCD]}$ em que ocorre apenas a espécie BCDDNA. As bandas $T - T$ ocorrem entre $500nm$ e $550nm$ e acima de $650nm$. O perfil das bandas $T - T$ varia pouco com o ângulo dos BCD, com exceção do BCD120 que tem uma banda em $625nm$.

Figura 7.29: Espectro diferenciais de absorção $T - T$ dos BCD na presença de DNA e oxigênio.

A energia do estado T1 dos BCD foi obtida usando supressores com energia conhecida, os

resultados estão na tabela 7.20. As energias do estado T_1 dos BCD tem valores de energia de 11800 a 12900 cm^{-1} , e como a energia do estado singlete do oxigênio ($^1\Delta_g$) é de 7874,0 cm^{-1} (0,96 eV), então a transferência de energia entre o estado tripleto dos BCD para formar o estado singlete do oxigênio é favorável.

	BCD180	BCD150	BCD120	BCD90
$E_T(cm^{-1})$	11800 ± 200	12200 ± 200	12900 ± 400	12400 ± 300

Tabela 7.20: Energia do estado tripleto dos BCD em propanol.

Também foram obtidos os espectros de fosforescência dos BCD. Estes experimentos foram feitos a temperatura de 77 graus Kelvin (nitrogênio líquido), utilizando como solvente a mistura IodetoMetil/Etanol/Metanol na proporção de 1 : 16 : 4. A baixa temperatura, bem como a presença de núcleos pesados no solvente (Iodo), são necessários para aumentar o rendimento de fosforescência, pois em geral à temperatura ambiente em soluções líquidas a fosforescência dos corantes é nula devido a alta eficiência dos processos não radiativos da desativação do estado tripleto. A fosforescência foi medida com diferentes tempos de retardo entre a excitação e a detecção do sinal. Este tempo de retardo é necessário para eliminar o sinal de fluorescência dos compostos, que no caso dos BCD é da ordem de ns.

O perfil de tempo de vida dos estados tripletos, com e sem oxigênio, também foi obtido. Os decaimentos para todos os BCD seguem um perfil monoexponencial, o que indica a presença em solução de apenas uma espécie no estado tripleto. Em etanol na presença de oxigênio os tempos são da ordem de décimos de microsegundos e não variam com o ângulo entre os cromóforos, já em água na presença de DNA estes tempos aumentam cerca de uma ordem de grandeza. Na ausência de oxigênio o tempo de vida do estado tripleto aumenta cerca de três ordens em etanol e duas ordens com DNA, tomando valores próximos para ambos os casos. A figura 7.31 mostra o perfil de decaimento na presença de DNA para o BCD90 com oxigênio sem oxigênio. Os resultados para todos os BCD estão dados na tabela 7.21.

	<i>ETOH</i> O_2	<i>ETOH</i> N_2	$\frac{[DNA]}{[BCD]} > 200$ O_2	$\frac{[DNA]}{[BCD]} > 200$ N_2
BCD180	$0,30 \pm 0,02$	$290,00 \pm 50,00$	$5,34 \pm 0,19$	$120,00 \pm 80,00$
BCD150	$0,20 \pm 0,02$	$140,00 \pm 3,12$	$9,45 \pm 0,58$	$213,33 \pm 30,00$
BCD120	$0,28 \pm 0,02$	————	$5,32 \pm 0,60$	$250,00 \pm 7,26$
BCD90	$0,26 \pm 0,02$	$505,00 \pm 50,00$	$8,77 \pm 0,47$	$270,00 \pm 110,00$

Tabela 7.21: Tempos de vida do estado tripleto dos BCD em etanol na razão $\frac{[DNA]}{[BCD]} > 200$. Na presença e ausência de oxigênio.

O tempo de vida T-T depende fortemente da presença de oxigênio e é difícil padronizar a retirada do oxigênio em experimentos diferentes, por isto os dados da tabela 7.21 com DNA que

Figura 7.30: Fosforescência dos BCD medida com dois tempos de retardo a temperatura de 77 graus Kelvin (nitrogênio líquido), utilizando como solvente a mistura IodetoMetil/Etanol/Metanol na proporção de 1 : 16 : 4.

foram obtidos na Universidade de Coimbra possuem tempos, na ausência parcial de oxigênio, menores dos dados da figura 7.32 obtidos na IFQRu e Moscow. Os valores de tempo de vida na ausência de oxigênio da figura 7.32 mostram que o tempo de vida aumenta com o aumento da concentração de DNA para todos os BCD. Associamos este aumento com a diminuição dos processos não radiativos da desativação do estado tripleto de BCD devido o aumento da rigidez da molécula quando ligada com DNA, como foi observado no estudo da fluorescência dos BCD.

Entretanto, no caso da fluorescência foram observados dois componentes do decaimento, associados com a fluorescência dos monômeros livres e ligados com DNA. Mas em caso do tripleto está observado o aumento contínuo do tempo de vida do tripleto quando aumenta a concentração do DNA. A análise feita em [19] mostrou que o aumento contínuo do tempo de vida do estado excitado em função da concentração de um sistema microorganizado (microsistema, DNA) é observado quando o tempo de decaimento do estado excitado (τ_{ex}) é comparável ou maior dos tempos característicos de associação ($\tau_a = \frac{1}{K_a[DNA]}$) e dissociação ($\tau_{dis} = \frac{1}{K_{dis}}$) da molécula excitada com este microsistema, pois neste caso a molécula excitada pode durante o tempo de vida do estado excitado se ligar e desligar varias vezes do microsistema. O tempo de vida do estado excitado neste caso tem um valor efetivo, que aumenta quando aumenta a con-

Figura 7.31: Decaimento da absorção do estado tripleto do BCD90 na presença de DNA: esquerda com O₂ e direita sem O₂.

centração do microssistema, pois o estado ligado se torna predominante e finalmente, quando o microsistema está em excesso o tempo de vida do estado excitado se torna igual o da forma ligada da molécula excitada. Quando $\tau_{ex} \ll \tau_a, \tau_{dis}$, τ_{ex} observado não depende da concentração do microsistema, pois durante este tempo curto a molécula excitada permanece ligada ou desligada. Assim, para estado singleto S^* cuja $\tau_{ex} < 10^{-8}s$, observamos dois tempos de vida (um para monômeros livres e outro para os ligados) que não dependem de [DNA], quando que para estado T^* ($\tau_{ex} < 10^{-5}s$) observamos um tempo de decaimento efetivo, que aumenta junto com aumento da concentração do DNA.

Figura 7.32: Constante de decaimento do estado tripleto na ausência de oxigênio para os BCD em função da razão $\frac{[DNA]}{[BCD]}$.

Nas soluções contendo oxigênio ocorre uma diferença de uma ordem de grandeza entre os tempos de vida em etanol e DNA. Esta diferença pode ocorrer porque na ligação com DNA as

moléculas de BCD ficam mais protegidas da supressão pelo oxigênio molecular, o que resulta num tempo de vida maior. Esta hipótese se torna mais forte quando o oxigênio é retirado da solução, pois na ausência de oxigênio molecular os tempos de vida do tripleto, em etanol e na presença de DNA, são de mesma ordem de grandeza.

7.4.6 Rendimento Quântico de Formação do Estado Tripleto

Nos experimentos de flash-fotólise em água e na presença de DNA foram utilizadas cubetas de 20cm para conseguir um bom sinal de absorção $T - T$. Em água na ausência de DNA a intensidade de absorção $T - T$ é baixo. Com a adição de DNA até aproximadamente a razão de $\frac{[DNA]}{[BCD]} < 5$ esta intensidade cai praticamente para zero. Aumentando esta razão a intensidade começa a aumentar até atingir um máximo cerca de 40 vezes maior que a intensidade na ausência de DNA. Associamos decaimento inicial da intensidade do sinal do tripleto com a agregação de BCD estimulada pela interação com DNA e seu crescimento posterior com a desagregação e aparecimento dos monômeros ligados de BCD. Baseado nisto pode-se concluir, em concordância com as observações anteriores obtidas com outras técnicas (figura 7.33), que em solução na presença de DNA aparecem 3 espécies de BCD: monômeros livres, agregados de BCD no superfície do DNA e monômeros de BCD, ligados com DNA.

Figura 7.33: Intensidade máxima da absorção T-T em função da razão $\frac{[DNA]}{[BCD]}$.

Para o BCD180 foi detectada também a formação na presença do DNA do estado tripleto dos agregados J. A intensidade $T - T$ atingiu uma intensidade máxima na razão $\frac{[DNA]}{[BCD]} \approx 10$ e diminui logo após com o aumento da concentração de DNA. No caso dos agregados J então a

formação do estado tripleto tem um máximo de intensidade aproximadamente para a mesma razão em que ocorre o mínimo de intensidade dos tripletos dos monômeros de BCD.

Figura 7.34: Absorção T-T para os agregados e monômeros do BCD180 em função da razão $\frac{[DNA]}{[BCD]}$.

Os rendimentos quânticos de formação do estado tripleto para os BCD foram medidos em propanol na ausência de oxigênio. Estes valores estão na tabela 7.22. O BCD180 e BCD150 apresentaram valores próximos em torno de 21%, já os BCD120 e BCD90 tiveram valores cerca de 4 a 5 vezes menores. Esta diferença ocorre provavelmente pela diferença de geometria dos BCD ocasionado um aumento nos processos não radiativos no BCD120 e BCD90 em relação aos outros BCD.

	$K_{fos}(s^{-1})$	$\phi(\%)$
BCD180	62 ± 6	22 ± 4
BCD150	50 ± 5	20 ± 4
BCD120	13 ± 2	4 ± 1
BCD90	20 ± 2	7 ± 2

Tabela 7.22: Tempos de vida de fosforescência e rendimentos quânticos do estado tripleto dos BCD em propanol.

Rendimento quântico do tripleto obtido através da PAC

Para o cálculo dos rendimentos quânticos através da PAC é necessário conhecer os máximos de fluorescência com seus respectivos rendimentos quânticos, a energia do estado T_1 e a energia de excitação. A medida da PAC se dá usando uma substância padrão e assim obteve-se as

frações ϕ de energia não radiativa depositadas no meio. Assim através da equação 7.15 calcula-se o ϕ_T .

$$E_T \phi_T = (1 - \phi_1) - E_{flu} \phi_{flu} \quad (7.15)$$

Uma vez obtido o ϕ_T calcula-se o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete ϕ_Δ através da equação 7.16.

$$\phi_\Delta = \frac{(E_T \phi_T - E_{hv} \phi_2)}{E_\Delta} \quad (7.16)$$

A figura 7.35 mostra um dos resultados obtidos para os BCD em etanol.

Figura 7.35: Exemplo do espectro fotoacústico obtido com o experimento da PAC

Os experimentos de PAC foram feitos em etanol usando laser Ni:Yag seguido de um OPO para obter um comprimento de onda de excitação de $600nm$ e microfone de $10MHz$. Como padrão foi usada a porfirina TPPMn que decai completamente por processos não radiativos. Primeiramente as medidas foram feitas na ausência de oxigênio para determinar o rendimento quântico de formação do estado tripleto e posteriormente com oxigênio para determinar o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete. Em água não foi possível fazer os experimentos. Outro problema foi a célula fotoacústica que por ser difícil de limpar não possibilitou

fazer experimentos com DNA. As figuras 7.36 e 7.37 mostram análise gaussiana dos espectros de fluorescência usados para o cálculo dos rendimentos. Para os dois BCDs 180 e 90 foi obtido $\phi_T = 0,34$ e $\phi_{\Delta} = 0,30$.

Figura 7.36: Ajuste gaussiano dos espectros de fluorescência do BCD180 usado no cálculo de ϕ_T através da PAC. $E_{ex} = 16666,7\text{cm}^{-1}$, $E_{fl1} = 15325,7\text{cm}^{-1}$, $E_{fl2} = 14336,9\text{cm}^{-1}$, $E_{fos} = 11800,0\text{cm}^{-1}$, $\phi_1 = 0,51$ e $\phi_2 = 0,10$.

Figura 7.37: Ajuste gaussiano dos espectros de fluorescência do BCD90 usado no cálculo de ϕ_T através da PAC. $E_{ex} = 16666,7\text{cm}^{-1}$, $E_{fl1} = 15668,8\text{cm}^{-1}$, $E_{fl2} = 14678,5\text{cm}^{-1}$, $E_{fos} = 12400,0\text{cm}^{-1}$, $\phi_1 = 0,69$ e $\phi_2 = 0,11$.

Estes resultados para o rendimento quântico do tripleto em etanol estão próximos aos obtidos pela técnica convencional em propanol dado na tabela 7.22.

7.4.7 Rendimento Quântico de Formação de Oxigênio Singlete

Os dados obtidos da análise do estado tripleto mostram que ocorre a supressão do estado tripleto dos BCD pelo oxigênio molecular, e portanto deve haver transferência de energia das moléculas de BCD para o oxigênio e a formação de oxigênio singlete. Para medir o rendimento

quântico de formação de oxigênio singlete (ϕ_{Δ}) foi utilizada a técnica de fosforescência resolvida no tempo (seção 4.2.4). Foram feitas medidas em água pura e na presença de DNA. O ϕ_{Δ} foi calculado usando como padrão a porfirina *TPPS*₄ ($\phi_{\Delta} = 62\%$).

Os ϕ_{Δ} foram menores que 1% para todos os BCD. Os rendimentos na presença de DNA foram ligeiramente maiores do que em água pura, sendo a maior diferença observada para o BCD 180 em que obteve-se 0,5% em água pura e 1% na presença de DNA. O menor rendimento obtido foi para o BCD120 em que os valores foram de 0,1% e 0,2% na presença de DNA.

O ajuste das cinéticas de fosforescência do oxigênio singlete mostrou que os tempos da acumulação do oxigênio singlete ($\approx 2\mu s$ na ausência e $\approx 5\mu s$ na presença do DNA) são praticamente iguais para todos BCD. Os tempos de decaimento com e sem DNA foram também praticamente iguais com mostrado na tabela 7.23 (Apenas o BCD180 teve uma pequena diferença), e mais que uma ordem de grandeza menores do que foi observado para a porfirina *TPPS*₄.

Figura 7.38: Espectros do decaimento da fosforescência do oxigênio singlete. Comparação do decaimento para o BCD180 em água e na presença de DNA.

Os resultados mostram que a influência da geometria dos BCD na formação do oxigênio singlete quando na ausência tanto na presença do DNA é fraca. Os valores extremamente baixos do rendimento quântico e dos tempos de decaimento do oxigênio singlete nos leva à hipótese que logo após da sua formação devido a transferência da energia do tripleto de BCD o oxigênio

	$t(\mu s)$	Área	Abs_{532}	ϕ_{Δ}
$TPPS_4$	2,24	$2,8 * 10^{-3}$	0,14	0,62 [36]
$BCD180_{aq}$	0,07	$4,4 * 10^{-5}$	0,30	0,005
$BCD180_{DNA}$	0,11	$6,8 * 10^{-5}$	0,23	0,01
$BCD150_{aq}$	0,05	$2,9 * 10^{-5}$	0,11	0,008
$BCD150_{DNA}$	0,05	$3,5 * 10^{-5}$	0,12	0,009
$BCD120_{aq}$	0,04	$4,1 * 10^{-6}$	0,10	0,001
$BCD120_{DNA}$	0,03	$6,5 * 10^{-6}$	0,11	0,002
$BCD90_{aq}$	0,05	$2,6 * 10^{-5}$	0,13	0,006
$BCD90_{aq}$	0,06	$3,1 * 10^{-5}$	0,17	0,006

Tabela 7.23: Tempos de vida e rendimentos quântico de formação do oxigênio singlete em água e na presença de DNA.

singlete ataca as molécula de BCD destruindo seus cromóforos. Esta hipótese foi confirmada no estudo da fotodecomposição dos BCD na presença e na ausência do oxigênio molecular. Os resultados deste estudo são apresentados na sessão 7.5.

7.5 Fotodecomposição

A fotodecomposição dos BCD foi estudada em função da concentração dos BCD e da presença de oxigênio. Como fonte de irradiação foi utilizada um projetor de *slides* contendo uma lâmpada halógena com potência de 250W. A intensidade luminosa na posição da amostra foi de $16,0mW/cm^2$. A irradiação foi realizada com uso dos filtros com faixas de transmitância $\lambda > 600nm$ na irradiação dos BCD e $\lambda > 450nm$ na irradiação dos fotoprodutos.

Para todos os BCD sob irradiação foi observado o decaimento dos seus espectros de absorção (Figura 7.5) até o desaparecimento completo, indicando a fototransformação do corante. Simultaneamente com o decaimento da absorção dos BCD foi observado o aparecimento de uma nova banda de absorção com máximo no mesmo comprimento de onda de $552nm$. Esta banda foi atribuída ao fotoproduto. O fato desta banda ser a mesma para todos os BCD indica que este fotoproduto possui a mesma estrutura de cromóforo. A irradiação do fotoproduto também causou a diminuição de sua absorção até o desaparecimento completo desta banda em toda a região espectral de $\lambda > 400nm$ indicando a fotodecomposição do cromóforo do fotoproduto.

Foi observado que tanto o decaimento da absorção do monômero quanto o do fotoproduto de BCD em função do tempo da irradiação possui dependência monoexponencial (figura 7.40).

$$A = A_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (7.17)$$

Figura 7.39: Espectros de absorção do BCD180 em função do tempo de irradiação. Fotodecomposição com surgimento de nova banda em 552nm (lado esquerdo). Fotodecomposição da banda em 552nm (lado direito).

em que:

$$A = \varepsilon Cl \quad (7.18)$$

sendo ε o coeficiente de absorção molar do composto, C sua concentração e $l = 1\text{ cm}$ é o caminho ótico da amostra, podemos escrever:

$$\varepsilon Cl = \varepsilon C_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (7.19)$$

em que C_0 é a concentração inicial da amostra, assim obtém-se:

$$C = C_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (7.20)$$

Derivando esta equação em relação ao tempo, obtemos a velocidade V do decaimento da concentração em unidades de $M^{-1} s^{-1}$:

$$V = \frac{d[C]}{dt} = -\frac{[C]_0}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (7.21)$$

Assim, a velocidade inicial da fototransformação (no momento $t = 0$) é dada por:

$$V_0 = -\frac{[C]_0}{\tau} \quad (7.22)$$

A razão entre a velocidade inicial de fototransformação do corante em relação à concentração inicial do mesmo pode ser escrita da seguinte forma:

$$\frac{V_0}{[C]_0} = \frac{1}{\tau} = K \quad (7.23)$$

em que k é a constante de da velocidade de fototransformação, que depende somente das condições da irradiação e não depende da concentração do composto.

Figura 7.40: Decaimento de absorvância do BCD180 sob irradiação na ausência de oxigênio.

Isto leva a conclusão de que o esquema da fototransformação do BCD e do fotoproduto pode ser apresentada na forma:

em que FP_1 é o produto de fototransformação de BCD (fotoproduto 1), e FP_2 é o produto de fototransformação do fotoproduto 1 (fotoproduto 2), k_1 e k_2 são as constantes monomoleculares de fototransformação. Neste caso tem-se:

$$\frac{d[C^*]}{dt} = -k_i[C^*] \quad (7.24)$$

e

$$[C^*] = [C^*]_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (7.25)$$

Usando as equações 7.20 e 7.25 foram calculadas as constantes de fotodecomposição k para os BCD e fotoprodutos em várias concentrações na presença e na ausência do oxigênio (Tabela 7.24). Os resultados mostram que k depende da concentração inicial de BCD e de fotoproduto 1. Este resultado não concorda com a equação 7.23. Isto pode ser explicado pela formação de agregados de BCD e de fotoproduto, que é maior quanto maior for a concentração do composto, fazendo com que a solução de BCD e do fotoproduto seja formada por uma mistura de agregados e monômeros. Neste caso o esquema da fototransformação para o BCD tem a forma:

e para o fotoproduto:

A fotoexcitação dos agregados não produz a fototransformação do composto devido a alta desativação dos seus estados excitados pelos processos não radiativos, como foi mostrado anteriormente. Neste caso os agregados servem como fontes adicionais dos compostos, afetando nos valores efetivas da k . Esta sua influência é maior quanto maior a concentração do composto e conseqüentemente maior a concentração das moléculas agregadas.

Esta hipótese esta em concordância com o fato que em baixas concentrações iniciais os valores de k se diferem menos do que em as altas (Tabela 7.24). A geometria dos BCD também

A_0	$BCD180$ ($\lambda = 620nm$)		$Fotoproducto$ ($\lambda = 552nm$)	
	com O_2	sem O_2	com O_2	sem O_2
0,10(0,7 μM)	$3,66 * 10^{-3}$	$7,25 * 10^{-4}$	$4,11 * 10^{-3}$	$5,25 * 10^{-4}$
0,25(1,9 μM)	$2,61 * 10^{-3}$	$4,88 * 10^{-4}$	$1,16 * 10^{-3}$	$2,78 * 10^{-4}$
0,50(3,8 μM)	$2,33 * 10^{-3}$	$4,65 * 10^{-4}$	$1,02 * 10^{-3}$	$1,98 * 10^{-4}$
1,00(7,6 μM)	$2,21 * 10^{-3}$	$3,51 * 10^{-4}$	$8,66 * 10^{-4}$	$1,66 * 10^{-4}$
1,50(11,4 μM)	$9,71 * 10^{-4}$	$3,32 * 10^{-4}$	$2,61 * 10^{-4}$	$1,56 * 10^{-4}$

Tabela 7.24: Valores do k da fotofecomposição para o BCD e seu fotoproduto em função da concentração inicial e presença de oxigênio.

influencia na velocidade de fotodecomposição dos BCD, sendo que a velocidade de fotodecomposição para o BCD90 foi menor em relação aos outros BCD como mostrado na tabela. A presença de oxigênio molecular aumenta dramaticamente a velocidade de fotodecomposição quando de BCD tanto de fotoproduto, o que mostra que oxigênio está envolvido no processo de fototransformação dos ambos. Tanto para o BCD quanto para o fotoproduto a diminuição da concentração de oxigênio molecular reduz a velocidade de fotodecomposição, e provavelmente se fosse possível retirar todo o oxigênio da solução a fotodecomposição não ocorreria. No mínimo as participações das fotodecomposições diretas de BCD e de fotoproduto são de uma ordem de grandeza menor que pela reação com oxigênio. Neste caso os esquemas de fototransformação devem ser modificadas como

Levando em consideração que a concentração do oxigênio $[O_2]$ em solução aquosa é muito maior que as concentrações iniciais de BCD e de fotoproduto podemos considerar $[O_2] = constante$ e $(k_i + k_j[O_2]) = k_{ieff}$ constante efetiva de fototransformação.

$$[C^*] = [C^*]_0 e^{k_{ieff}t} \quad (7.26)$$

Na realidade os produtos de fototransformação obtidos pela transformação direta e pela reação com oxigênio devem ser diferentes, mas os fatos que os espectros de FP_1 tanto em concentrações baixas quanto em altas de oxigênio são iguais e a cinética de fototransformação do FP_1 é monoexponencial, permitindo concluir que, pelo menos, o fotoproduto FP_1 é único. Este resultado é mais um argumento de que o processo de fototransformação do BCD se realiza somente pela reação do seu estado excitado com oxigênio.

Como já foi mostrado acima, a fotoexcitação de BCD produz seu estado excitado tripleto cuja energia se transfere parcialmente para oxigênio molecular formando seu estado excitado singleto. É conhecido que oxigênio singleto ataca com alta eficiência as ligações duplas dos compostos orgânicos [51]. Podemos assumir que o oxigênio singleto, formado devido a transferência da energia do estado tripleto de BCD ataca as ligações duplas do seu cromóforo des-

truindo o sistema de conjugação- π e modificando assim o espectro de absorção do corante. Esta suposição está em concordância com o fato que o tempo de decaimento do oxigênio singleto na presença de BCD muito mais curto do que foi observado em soluções aquosas na presença de porfirinas, que não sofrem a fototransformação. Na próxima seção é apresentado um modelo teórico, baseado nesta suposição, que explica as mudanças espectrais de BCD devido da sua reação com oxigênio.

7.5.1 Modelo Teórico de Fototransformação do BCD

Quando os BCD são irradiados ocorre o desaparecimento das bandas principais e o surgimento de uma banda com energia maior. Este processo indica que ocorre a quebra de um dos cromóforos do BCD, fazendo com que some a interação entre os cromóforos do corante e a molécula de BCD passe a absorver com apenas um cromóforo. A hipótese mais comum para este processo é a de que a quebra do cromóforo ocorra pelo ataque às ligações duplas dos BCD pelo oxigênio singleto formado pela própria molécula. Seguindo esta linha de raciocínio foram feitas simulações computacionais da molécula do BCD180 com a molécula de oxigênio ligada à cadeia de conjugação- π do cromóforo e ao anel central do corante, e simulado seu espectro de absorção ótica com a análise de orbitais (figuras 7.41 e 7.42).

Figura 7.41: Densidade orbital segundo o modelo de fotodecomposição com a ligação da molécula de oxigênio A) na parte mais externa e B) na parte mais interna do cromóforo.

Figura 7.42: Densidade orbital segundo o modelo de fotodecomposição com a ligação da molécula de oxigênio no anel central.

Na figura 7.41 são mostradas as funções de onda eletrônicas nas transições para diferentes posições de ligação do oxigênio. Na figura 7.41-A o oxigênio está ligado na porção mais externa da cadeia lateral de conjugação- π , enquanto na figura 7.41-B na porção mais interna próxima ao anel central. Em ambas a transição eletrônica correspondente é a de apenas um cromóforo como pode-se ver pela função de onda, mostrando que o cromóforo onde o oxigênio singlete se liga, segundo o modelo, perde a conjugação- π e conseqüentemente perde o papel de cromóforo.

Na figura 7.42 o oxigênio foi ligado no anel central do corante. Com esta ligação ocorre uma mudança brusca na geometria do BCD 180, fazendo com que este deixe de ser plano e passe a ter uma angulação do anel central. Esta mudança da geometria causa uma proximidade dos dois cromóforos que causa o aparecimento de duas bandas e transição eletrônicas, com energias menores em relação a banda mais intensa do BCD 180. Os espectros de absorção ótica destas transições são mostradas nos gráficos abaixo.

Figura 7.43: Espectros de absorção computacionais para o BCD180 com o oxigênio molecular ligado em 3 partes do cromóforo: cadeia lateral mais externa e mais interna e no anel central.

Através da comparação dos espectros do cálculo computacional com os experimentais, pode-se inferir que o oxigênio singleto se liga nas cadeias de conjugação- π laterais e não no anel central. Estes resultados podem ser estendidos aos outros BCD estudados, uma vez que os resultados experimentais mostram o mesmo efeito para todos. Finalmente podemos concluir que o oxigênio singleto destrói o cromóforo de BCD tirando a *splitting* dos níveis da energia dos corantes e somente um cromóforo é responsável pela formação do espectro do corante. Pois todos os BCD possuem a mesma estrutura de um cromóforo e os espectros dos fotoprodutos FP_1 são iguais para todos BCD.

O processo de fotoexcitação do fotoproduto não foi ainda estudado detalhadamente mas pela analogia com os BCD podemos assumir que neste caso também temos a produção do oxigênio singleto que destrói o sistema de conjugação- π do seu cromóforo e acaba com as bandas de absorção na região visível.

8 *Conclusões*

Com base nos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Nas temperaturas $< 100^{\circ}\text{C}$ os estados fundamentais dos BCD180, BCD150 e BCD90 possuem 99% conformação trans-trans dos seus cromóforos, o BCD120 apresenta no intervalo 0 a 100°C aproximadamente metade das moléculas em configuração trans-trans e a outra em cis-trans. Isto significa que em temperaturas ambientais (20°C a 25°C) podemos considerar a presença dos BCD180, BCD150 e BCD90 em solução somente em uma conformação dos cromóforos, quanto que para o BCD120 duas conformações podem estar presentes.
- O perfil dos espectros de absorção dos BCD está determinado pela interação dipolo-dipolo entre os cromóforos e pelo tunelamento dos elétrons pelo heterociclo central que produzem o *splitting* dos níveis energéticos da molécula e o aparecimento de duas bandas de absorção, cujas intensidades relativas dependem do ângulo entre os cromóforos. Este fato foi demonstrado computacionalmente e experimentalmente neste trabalho e comparado com os trabalhos teóricos anteriores.
- Foi confirmado através de modelagem computacional que para as bandas de absorção de menor energia (transição $S_1' \rightarrow S_0$) a força de oscilador diminui com a diminuição do ângulo entre os cromóforos, e para as bandas de maior energia (transição $S_1'' \rightarrow S_0$) a força de oscilador aumenta quando este ângulo diminui.
- Os BCD possuem alta absorção ótica em todos os solventes ($\epsilon \approx 10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) na região entre 580 a 650nm. As características de absorção ótica e fluorescência mudam com o tipo de solvente, e tanto a constante dielétrica quanto a formação de ligação hidrogênio contribuem nesta mudança, porém o deslocamento de Stokes se mantém constante independente do solvente. O deslocamento das bandas de absorção dos corantes em diferentes solventes provavelmente é induzido pela mudança do ângulo entre os cromóforos quando muda o solvente.

- Nas soluções aquosas os BCD possuem alta probabilidade de formar os agregados tipo H. Pelo contrario, nos solventes orgânicos não houve formação de agregados, ocorrendo apenas quando conteúdo da água no solvente atinge cerca de 50%. Os rendimentos quânticos e os tempos de vida dos estados excitados singleto e tripleto nos solventes orgânicos aumentam quando diminui a constante dielétrica do solvente e quando aumenta sua viscosidade. O rendimento quântico e o tempo de vida de fluorescência são maiores nos solventes orgânicos do que em água, e diminuem com o a adição de água nos solventes. Esta influência da água é, provavelmente, devido a dois efeitos: diminuição da microviscosidade ao redor da molécula de BCD na presença de água e a agregação dos corantes estimulada pela água.
- Da interação dos BCD com DNA e micelas conclui-se que ao efeito da interação depende da carga dos sistemas, em que sistemas com carga negativa causam a formação de 3 espécies em solução: monômeros livres de BCD e agregados de BCD e seus monômeros ligados com sistema; em sistemas com carga neutra ocorre a formação de duas espécies: monômeros livres e monômeros ligados, não ocorrendo a formação de agregados; não foi observada a interação dos BCD com sistemas carregados positivamente.
- Os BCD possuem alta afinidade com sistemas microorganizados. As constantes de ligação dos BCD com micelas zwitteriônicas LPC são da ordem de $\approx 10^6 M^{-1}$ e com DNA da ordem $\approx 10^7 M^{-1}$.
- Os tempos de vida e rendimentos quânticos de fluorescência e do estado tripleto de BCD aumentam quando os BCD se ligam com DNA ou com micelas, provavelmente, devido o aumento da rigidez da molécula ligada em comparação com a livre e conseqüentemente a diminuição dos processos não radiativos de dissipação da energia de excitação.
- Sob irradiação luminosa os BCD formam o oxigênio singleto devido a transferência de energia do estado tripleto dos BCD para o oxigênio molecular, porém, o tempo de vida do oxigênio singleto é uma ordem de grandeza menor que é característico para soluções aquosas. Isto acontece, provavelmente, devido ao ataque das ligações duplas dos cromóforos de BCD pelo oxigênio singleto formado. Este ataque destrói as cadeias de conjugação- π dos cromóforos produzindo a perda de coloração dos corantes.

Conclusão geral:

Pelas conclusões citadas acima podemos confirmar que as características espectrais e energéticas dos BCD, tais como:

- alta absorção óptica na região espectral da janela terapêutica,
- alta afinidade com sistemas biológicos e modelos,
- altos rendimentos quânticos e longos tempos de vida na interação com sistemas biológicos e modelos,
- produção do oxigênio singleto,

são vantajosas para aplicação destes como fotossensibilizadores em fotoquimioterapia. Estes resultados motivam a continuidade dos estudos da fototoxicidade dos BCD em culturas de células e com animais experimentais como também planejar seus futuros testes clínicos.

Referências Bibliográficas

- [1] DOUGHERTY, T. J. et al. *Phototherapy of Human Tumors*. NY: Plenum Press, 1977. 435-466 p.
- [2] BONNETT, R. Photosensitizers of porphyrin and phtalocyanines series for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, v. 24, p. 19–33, 1995.
- [3] OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, v. 39, p. 1–18, 1997.
- [4] DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicine Chemistry*, v. 47, n. 16, 2004.
- [5] WEB OF SCIENCE, <http://portal02.isiknowledge.com>, acessado em 11 de 2006.
- [6] MOGHISSI, K. Photodiagnosis and photodynamic therapy: the birth of a journal. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 1, p. 1, 2004.
- [7] MANDYS, V. et al. Neurotoxicity of tetraphenyl porphinesulfonate (tpps4) and a hematoporphyrin derivative (photosan) in organotypic cultures of chick embryonic dorsal root ganglia. *Journal Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, v. 47, p. 197–201, 1998.
- [8] DIWU, Z.; LOWN, J. W. Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 63, n. 1, p. 1–35, 1994.
- [9] SCHABERLE, F. A. *Estudo das Características Espectroscópicas dos Corantes Ciânicos com dois Cromóforos na Interação com DNA: Efeitos da Força Iônica*. Dissertação (Dissertação de Mestrado) — Universidade de São Paulo, 2002.
- [10] SCHABERLE, F. A.; KUZ'MIN, V. A.; BORISSEVITCH, I. E. Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with dna. effect of ionic strength. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1621, n. 2, p. 183–91, 2003.
- [11] OLEINICK, N. L.; EVANS, H. H. The photobiology of photodynamic therapy: Cellular targets and mechanisms. *Radiation Research Society*, v. 150, p. 146–156, 1998.
- [12] KLESINGER, M.; MICHL, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. [S.l.]: VCH, 1995.
- [13] TURRO, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*'. [S.l.]: University Science Books, 1991.
- [14] CANTOR, C. R.; SCHIMMEL, P. R. *Biophysical Chemistry: Part II - Thecniques for the Study of Biological and Structure Function*. [S.l.]: W. H. Freeman & Co. Ltd, 1980.

- [15] AKHMANOV, S. A.; CHERNIAEVA, E. B. Modern problems of laser physics. In: _____. 3rd. ed. [S.l.]: Moscow, 1990. cap. Photodynamic Action of LASER Emission on Biomolecules and Cells. The Mechanisms of Photodynamic Action at the Molecular and Cell Levels.
- [16] CLENNAN, E. L. New mechanistic and synthetic aspects of singlet oxygen chemistry'. *Tetrahedron Report*, v. 547, p. 9151–9179, 2000.
- [17] DELAEY, E. et al. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes. *Journal Photochemistry Photobiology B: Biol*, v. 55, p. 27–36, 2000.
- [18] BORISSEVITCH, I. E. et al. Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. the role of albumin and porphyrin aggregation. *Journal of Luminescence*, v. 69, p. 65–76, 1996.
- [19] BORISSEVITCH, I. E.; GANDINI, S. C. Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-n-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to dna. *J Photochem Photobiol B*, v. 43, p. 112–120, 1998.
- [20] SHALHOUB, G. M. Visible spectra of conjugated dyes: Integrating quantum chemical concepts with experimental data. *Journal of Chemical Education*, v. 74, p. 1317–1319, 1997.
- [21] ARMITAGE, B. A. Cyanine dye-dna interaction: Intercalation, groove binding and aggregation. *Topics in Current*, v. 253, p. 55–76, 2005.
- [22] BORISSEVITCH, I. Influence of resonance interaction on absorption spectra of dyes with two chromophores. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*, v. 241, p. 743–746, 1978.
- [23] IBRAYEV, N. K. et al. Influence of interaction of chromophores, linked by the unconjugated chain, on the luminescence properties of biscyanine dyes. *Journal of Luminescence*, v. 90, p. 81–88, 2000.
- [24] ISRAELACHVILI, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*. [S.l.]: Academic Press, 1991.
- [25] DEWAR, J. S. A review of the pi-complex theory. *Bulletin de la Societe de Chimie de France*, v. 18, p. 71–79, 1951.
- [26] CHOWDHURY, A. et al. Characterization of chiral h and j aggregates of cyanine dyes formed by dna templating using stark and fluorescence spectroscopies. *Journal Physical Chemistry B*, v. 105, p. 12196–12201, 2001.
- [27] BORISSEVITCH, I. E. et al. Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin. *Analytica Chimica Acta*, v. 343, p. 281–286, 1997.
- [28] TANIELIAN, C.; WOLFF, C.; ESCH, M. Singlet oxygen production in water: aggregation and charge-transfer effects. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 100, p. 6555–6560, 1996.
- [29] JELLY, E. E. *Nature*, v. 138, p. 1009, 1936.
- [30] FLEISCHER, E. B. et al. Thermodynamic and kinetic properties of an iron-porphyrin system. *Journal American Chemical Society*, v. 88, p. 3162, 1971.

- [31] LAKOWIKZ, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. [S.l.]: Plenum Press, 1983.
- [32] JAMESON, D. M.; GRATTON, E.; HALL, R. D. The measurement and ananlysis of heterogeneous emission by multifrequency phase and modulation fluorometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, v. 20, p. 55–106, 1984.
- [33] ARNAUT, L. G. et al. Recent advnaces in photoacoustic calorimetry: Theoretical basis and improvements in experimental design. *Review Scientific Instrumentations*, v. 63, p. 5381–5389, 1992.
- [34] BRASLAVSKY, S. E.; HEIBEL, G. E. Time-resolved and photoacoustic methods applied to photoinduced processes in solution. *Chemical Reviews*, v. 92, p. 1381–1410, 1992.
- [35] ROTHBERG, L. J. et al. Pulsed laser photoacoustic calorimetry of metastable species. *Journal of American Chemical Society*, v. 105, p. 3464–3468, 1983.
- [36] AGGARWAL, L. P.; BAPTISTA, M.; BORISSEVITCH, I. E. Effects nacl upon tpps4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation. *J. Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, in press, 2006.
- [37] MCWEENY, R.; SUTCLIFFE, B. T. *Methods of Molecular Quantum Mechanics*. [S.l.]: London, Academic Press., 1969.
- [38] SZABO, A.; OSTLUND, N. S. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Eletronic Structure Theory*. [S.l.]: New York, Dover., 1996.
- [39] FOCK, V. Näherungsmethode zur lösung des quantunmechanischen mehrkörperproblems. *Z. Phys.*, v. 61, p. 126–148, 1930.
- [40] SLATER, J. C. Note on hartree's method. *Physics Review*, v. 35, p. 210–211, 1930.
- [41] Roothaan, C. C. J. New developments in molecular orbital theory. *Review Modern Physics*, v. 23, p. 69–89, 1951.
- [42] FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 98, Revision*. [S.l.], 1998.
- [43] PASTERNAK, R. F. et al. Porphyrin assemblies on dna as studied by resonance light-scattering technique. *Journal of American Chemical Society*, v. 15, p. 5393–5399, 1993.
- [44] PAOLI, V. M. de; BORISSEVITCH, I. E.; TEDESCO, A. C. Fluorescence lifetime and quantum yield of tmpyph2 associated with micelles and dna. *Journal of Alloys&Comp.*, in press, 2002.
- [45] BORISEVITCH, Y. E. et al. Triplet state of bis-cyanine dyes. *Proceedings of Academy of Science of the USSR*, v. 228, p. 448–451, 1976.
- [46] KUZMIN, V. et al. Effect of splitting the triplet levels of biscyanine dyes. *Proceedings of Academy of Science of the USSR*, v. 229, p. 616–619, 1976.
- [47] IBRAYEV, N. K. et al. Investigation of conformational and electron properties of biscyanine dyes. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, v. 427, p. 139–147, 2005.

- [48] KRYGOWYSKI, T. M. et al. Separation of energetic and geometric contributions to aromaticity. part vi. changes of the aromatic character of the rings in naphthalene, anthracene, phenanthrene and pyrene derivatives induced by the charged substituent CH_2^+ . *Tetrahedron*, v. 53, p. 11383–11398, 1997.
- [49] KUMAR, V. V.; BAUMANN, W. J. Lanthanide-induced phosphorus-31 nmr downfield chemical shifts of lysophosphatidylcholines are sensitive to lysophospholipid critical micelle concentration. *Biophysical Journal*, v. 59, p. 103–107, 1991.
- [50] NEUGEBAUER, J. *A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry*. 1998.
- [51] TANELIAN, C. et al. Mechanistics and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen. *Photochemistry and Photobiology*, v. 71, p. 12–19, 2000.