

CAPÍTULO 2

Materiais e Métodos

2.1 Objetos de estudo

2.1.1 Porfirinas meso-tetrasulfonatofenil (TPPS₄) e meso-tetrametilpiridil (TMPyP)

Diversos derivados de porfirina têm sido sintetizados e testados para uso no tratamento de tumores pela PDT. Dentre eles, TPPS₄ e TMPyP (Figura 2.1), apresentam características promissoras.

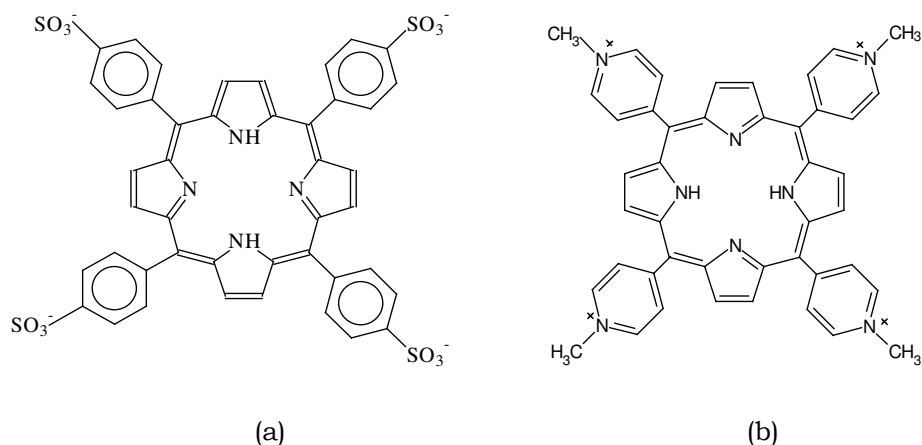


Figura 2.1) Estrutura das porfirinas (a) TPPS₄ e (b) TMPyP.

Ambas porfirinas são solúveis em água. A porfirina catiônica TMPyP tem recebido uma considerável atenção devido à sua alta afinidade por moléculas de DNA [12, 46, 79]. Foi também demonstrado que esta porfirina apresenta atividade anti-HIV [80].

A TPPS₄ é uma porfirina aniônica que na forma de base livre possui um alto coeficiente de absorção na região visível, uma notável fluorescência ($\Phi_F \approx 0.16$), alto rendimento quântico de formação do estado tripleto ($\Phi_T \approx 0.75$) [81, 82] e uma efetiva produção de oxigênio singleto ($\Phi_S \approx 0.6$) [83]. Foi demonstrado que esta

porfirina possui uma alta seletividade por tecidos tumorais em comparação a qualquer outra porfirina administrada numa dose equivalente [58]. TPPS₄ foi aplicada clinicamente em PDT em fase de teste e apresentou resultados promissores [84-86].

Sua composição pura e sua capacidade superior de se concentrar em tumores são propriedades que recomendam a utilização de TPPS₄ como modelo na avaliação das diversas etapas que envolvem o estudo de fotossensibilizadores em potencial para a terapia fotodinâmica em humanos.

2.1.2 Corantes cianínicos com dois cromóforos (BCDs)

Os BCDs (Figura 2.2) são corantes polimetíneos que possuem um heterociclo central entre duas cadeias de conjugação- π possuindo, portanto, dois cromóforos separados que interagem entre si. Este tipo da estrutura possibilita que os elétrons se movam dentro da cadeia com certa liberdade.

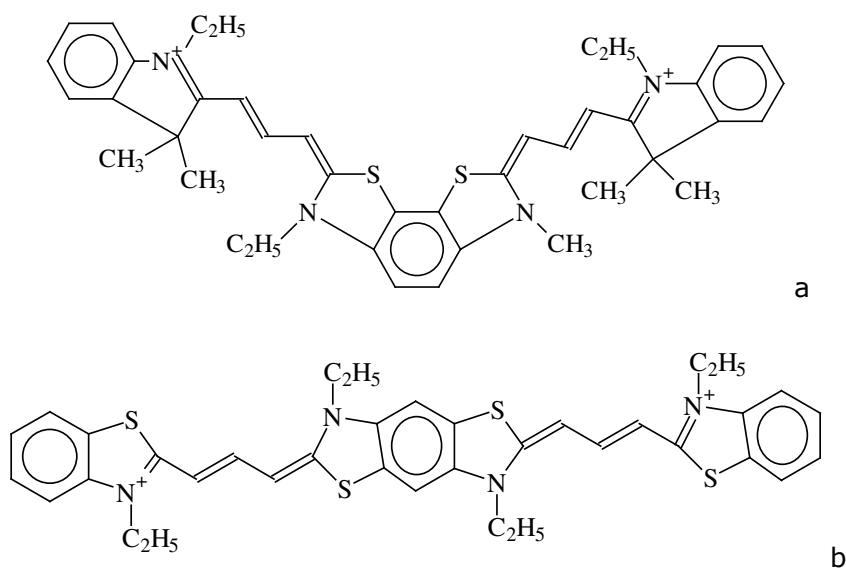


Figura 2.2) Estrutura molecular dos BCDs. (a) BCD 90° e (b) BCD 180°.

Eles exibem uma intensa absorção ($\epsilon > 10^5$) na região espectral entre 600 e 800 nm, um alto rendimento quântico do estado tripleto (>40%) [87, 88] e alta afinidade pelo DNA [89, 90]. A alta fotocitotoxicidade de várias cianinas, entre elas os BCDs,

contra o bacteriófago PM2 através da fotodestruição do DNA foi demonstrada [91]. Suas atrativas características fotofísicas estimulam o interesse do estudo da atividade fotodinâmica destes corantes em células tumorais tendo em vista avaliar a possível eficiência destes compostos no tratamento de câncer através da PDT.

2.2 Preparação das Amostras

2.2.1 Fotossensibilizadores: As porfirinas *meso*-tetrasulfonatofenil (TPPS₄) e *meso*-tetrametilpiridil (TMPyP) foram obtidas de *Porphyrin Products Inc.* e foram usadas sem purificação adicional. Os BCDs 90° e 180° foram sintetizados pelo Prof. Felix Mikhailenko no Instituto de Química Orgânica da Academia de Ciências da Ucrânia.

As soluções foram preparadas em água de qualidade Milli-Q. As mudanças do pH foram induzidas adicionando soluções concentradas de NaOH e HCl. As modificações da força iônica foram produzidas adicionando NaCl na forma seca.

As concentrações dos FS foram determinadas usando os valores dos coeficientes de absorção molar. Para TMPyP em toda região do pH $\epsilon^{425\text{nm}} = 2.26 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [79], para TPPS₄ no pH 7.0 $\epsilon^{515\text{nm}} = 1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon^{578\text{nm}} = 5.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{632\text{nm}} = 3.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e no pH 4.0 $\epsilon^{594\text{nm}} = 9.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon^{644\text{nm}} = 3.26 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (todos determinados neste trabalho). Para BCD 90° $\epsilon^{617\text{nm}} = 8.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e BCD 180° $\epsilon^{632\text{nm}} = 1.33 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, ambos em tampão fosfato em pH 6.8 [90].

Nos estudos em soluções aquosas homogêneas a variação de pH para as soluções de TPPS₄ variou entre 3.0 < pH < 10.0 e as concentrações de porfirina utilizadas variaram entre 5 e 30 μM . A concentração de NaCl variou de 0.08 a 0.6 M. Para a TMPyP as concentrações utilizadas variaram entre 6.5 e 30 μM e a concentração de NaCl variou de 0.08 a 1.8 M. Para ambos BCDs as concentrações variaram entre 0.1 a 16 μM .

O pH foi controlado através do pH-metro Analyser pH 300. Todas as medidas foram feitas em temperatura de $\pm 24^\circ\text{C}$.

2.2.2 Soluções de tensoativos: CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), SDS (dodecil sulfato de sódio) e HPS (N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato) foram obtidos de "Sigma Chemical Co". As soluções dos tensoativos foram preparadas em água Milli-Q.

2.2.3 Células ghost de eritrócitos: As células "ghost" foram obtidas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química – FFCLRP – USP, através do método padronizado descrito em [76]. Os experimentos com as frações de membrana foram realizados em tampão fosfato, pH 6.85 e 4.0.

2.3 Experimentos com cultura de células

Soluções estoques dos fotossensibilizadores (5mg/ml) foram preparadas em solução salina tamponada – PBS (porfirinas) e em etanol (BCDs) e as diluições foram realizadas em DMEM (Meio de Dulbecco modificado).

2.3.1 Condições para o crescimento da cultura de células HT29: As células de adenocarcinoma coloretal humano (HT29) adquiriram confluência em DMEM com vermelho de fenol suplementado com 10% SFB (Soro Fetal Bovino), glutamina (1%) e antibióticos (1%). Todos os reagentes foram obtidos da Bio-Media (França). As células foram subculturadas através de dispersão usando tripsina, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min, contadas e semeadas (10^5 cels/ml).

2.3.2 Internalização celular. Citometria de Fluxo: A ligação dos FS em células HT29 foi avaliada usando um scanner sensível à fluorescência celular (FACSCalibur Becton Dickinson), equipado com um laser de argônio com excitação em 488 nm. As células foram incubadas com 6 μ M de FS no escuro durante um período entre 30 minutos e 24 horas e então lavadas e resuspendidas em PBS. As suspensões de células

foram iluminadas e o sinal de fluorescência dos FS foi detectado usando um filtro 670 nm passa-alta. As análises foram realizadas usando o programa CellQuest. Um mínimo de 10^4 células por amostra foi analisado.

2.3.3 Determinação da localização intracelular dos FS. Microscopia de Imagem

por Fluorescência: os experimentos foram realizados com um microscópio epifluorescente Nikon (Optiphot-2) equipado com uma bobina Nipkow (Technical Instruments, modelo K2SBIO) que permite trabalhar em modo confocal. As células foram semeadas em placas de Petri numa concentração de 1.5×10^5 cel/ml; 2ml e deixadas para crescer durante 24 h em uma estufa (5% CO₂, 37 °C, atmosfera úmida) (Jouan, França). No dia do experimento, o meio de cultura foi retirado e soluções contendo os FS numa concentração de 6 µM foram adicionadas. Após o período de incubação definido, a solução contendo FS foi substituída por DMEM sem vermelho de fenol e então as células foram vistas com uma objetiva x63 imersa em DMEM. As imagens de fluorescência foram detectadas por uma câmera CCD (RTEA 1317 K1CCD, Princeton Instruments). Foi utilizada Rodamina 123 (5µM) como marcador específico de mitocôndrias (Molecular Probe Inc.). Conjuntos de filtros (BP425; FT450; LP600) foram utilizados para excitar TMPyP e TPPS₄; Rodamina (BP546, FT590, LP600) para BCD 180° e FITC (BP 450, FT510, LP520) para Rodamina e BCD 90°.

2.3.4 Testes de fotocitotoxicidade: para cada experimento as células foram subculturadas através de dispersão usando tripsina, centrifugadas a 1000 rpm, contadas, semeadas em 96 poços de uma placa numa concentração de 10^5 cels/ml (0.2 ml/poço) e deixadas para crescer durante 24 h em uma estufa (5% CO₂, 37 °C, atmosfera úmida) (Jouan, França). No dia do experimento, o meio de cultura foi removido e 100 µl dos fotossensibilizadores em DMEM numa concentração final entre 0.5 µM e 8 µM foram adicionados em cada poço. As células foram incubadas e então as

soluções de FS foram removidas antes de ser adicionado meio de cultura completo. As irradiações foram realizadas em 514 nm com um laser de argônio (Spectra Physics-2020) em condições estéreis. A luz foi transmitida por uma fibra ótica (diâmetro do núcleo 200µm, A.N. 0.22) equipada com um difusor (Medlight, Suíça) de modo a obter uma distribuição de luz uniforme em toda a placa (diâmetro da mancha de luz 130 mm). A potência foi calibrada com um energímetro (Spectra Physics-407) e os tempos de irradiação foram ajustados de modo a obter doses de 0.5, 1, 2, 5 e 10 J/cm². Os controles foram os seguintes: 12 poços contendo células tratadas com FS sem serem expostas à luz, 12 poços contendo células sem FS e sem serem expostas à luz, 12 poços contendo células sem FS e expostas à luz.

A viabilidade celular foi medida após 24h através da determinação da atividade mitocondrial utilizando o teste MTT (brometo de 3,-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazólico) de acordo com o método descrito por Mosmann [92]. No momento da contagem, 100 µl de uma solução de DMEM-MTT (0.5mg/ml) foram adicionados em cada poço e substituídos por 200 µl de DMSO 3h depois. As densidades óticas das microplacas foram determinadas em 570 nm usando o Labsystem[®]. Os resultados apresentados são as médias ± desvio padrão de 16 poços individuais.

2.3.5 Extração celular: As células tratadas em placas de Petri (1.5x10⁶ cels/ml) foram lavadas duas vezes com PBS e então removidas utilizando um rodo para células. Foram adicionados 2ml de acetato de etila em cada suspensão de células após sonicação. A solução resultante foi deixada 30 min com constante agitação e então centrifugada a 1600 rpm durante 10 min. O sobrenadante foi removido e a concentração do FS foi determinada espectrofotometricamente. A quantificação de proteína foi realizada através do método colorimétrico padrão [93], utilizando o teste Comassie Plus 23236.

2.3.6 Determinação dos coeficientes de partição dos FS: As propriedades lipofílicas e hidrofílicas foram caracterizadas pelo coeficiente de partição dos FS entre dois solventes não miscíveis, 2-octanol e água, de acordo com Kessel e colaboradores [94]. As concentrações dos FS em octanol e em fase aquosa foram determinadas através de medidas de absorção UV-Vis usando uma curva padrão.

2.4 MÉTODOS – PRINCÍPIOS BÁSICOS

Neste estudo foram empregados os seguintes métodos experimentais: espectroscopia de absorção ótica, fluorescência estática, espalhamento de luz ressonante, flash-fotólise, fluorescência com resolução temporal, detecção de fosforescência no infravermelho, microscopia de imagem por fluorescência e microespectrofluorimetria. Para determinar a c.m.c dos tensoativos foram feitas medidas de tensão superficial utilizando o método do anel.

2.4.1. Espectroscopia de absorção ótica

Quando a luz incide sobre um meio homogêneo, uma porção da luz incidente (I_0) é refletida e espalhada (I_r), uma outra é absorvida (I_a) pelo meio e a restante é transmitida (I_t):

$$I_0 = I_r + I_a + I_t \quad (2.1)$$

O espectro de absorção é usualmente apresentado como absorbância *versus* comprimento de onda (λ). Dois parâmetros são usados para caracterizar este espectro: a posição do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) e sua intensidade. A intensidade é representada pelo coeficiente de absorção molar (ϵ), que é dado pela Lei de Lambert – Beer [52],

$$A = \log (I_0 / I_t) = \epsilon c L \quad (2.2)$$

em que A é a absorbância; ϵ é o coeficiente de absorção molar ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); c é a concentração (M) e L é o caminho ótico (cm).

Neste trabalho, os espectros de absorção foram registrados usando o espectrofotômetro Beckman DU 640.

2.4.2. Espectroscopia de fluorescência

Quando a molécula absorve um fóton de luz, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Este pode ser o estado excitado de menor energia (por exemplo, S_1) ou de maior energia (S_2 , S_3). A transição é mais provável entre os níveis que têm o spin igual. Por exemplo, se o estado fundamental é singleto (S_0), a transição ao estado excitado singleto S_1 , S_2 , ..., S_n é mais provável do que a transição aos estados que têm o valor de spin diferente (T_1 , T_2 , etc.).

Uma molécula excitada pode perder sua energia e voltar para o estado fundamental emitindo um fóton [95]. Se isso acontece entre os níveis de mesmo estado de spin, o processo é chamado fluorescência e se o estado do spin é diferente, o processo se chama fosforescência (Figura 2.3).

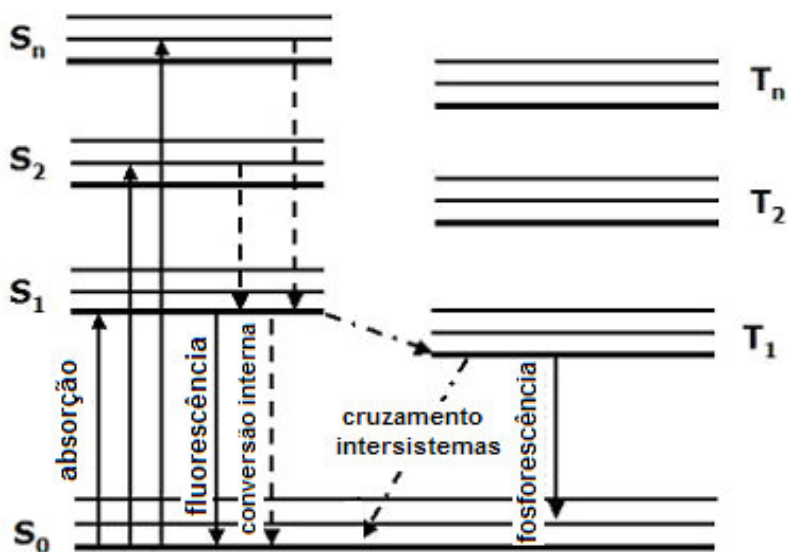


Figura 2.3) Diagrama de Jablonski.

As características principais da fluorescência e da fosforescência são: espectro de emissão, espectro de excitação, tempo de vida e rendimento quântico.

Além da emissão do fóton, que se chama processo radiativo, a energia do estado excitado pode ser dissipada (transferida para o ambiente) através dos processos monomoleculares não radiativos de conversão interna (CI) e de cruzamento intersistemas (CIS). A diferença entre estes processos é que CI ocorre entre níveis de energia com mesmo estado de spin ($S_1 \rightarrow S_0$) ou dentro do mesmo estado, reduzindo a energia vibracional da molécula, enquanto CIS ocorre entre níveis de energia com estados de spin diferentes, $S_1 \rightarrow T_1$ ou $T_1 \rightarrow S_0$, por exemplo. Cada processo é caracterizado por uma constante: k_{rad} - constante do processo radiativo; k_{ci} - constante de conversão interna e k_{cis} - constante de cruzamento intersistemas. Neste caso, a diminuição da concentração de moléculas excitadas pode ser dada por:

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -(k_{rad} + k_{ci} + k_{cis})[A^*] \quad (2.3)$$

A solução desta equação nos leva a

$$[A^*] = [A_0^*]e^{(-t/\tau)} \quad (2.4)$$

em que $[A_0^*]$ é a concentração do estado excitado no momento $t = 0$ e $\tau = 1/(k_{rad} + k_{ci} + k_{cis})$ é o tempo de vida do estado excitado.

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) é definido como sendo a razão entre o número de fótons emitidos pelo número total de fótons absorvidos. Uma vez considerados os processos não radiativos que competem com a fluorescência, podemos definir a fração que representa a desexcitação através da fluorescência como

$$\phi_f = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{ci} + k_{cis}} \quad (2.5)$$

O rendimento quântico também pode ser expresso através do tempo de vida de fluorescência da seguinte maneira:

$$\tau_r = \frac{1}{k_{fl}} \quad (2.6)$$

e

$$\tau_{fl} = \frac{1}{k_{fl} + k_{ci} + k_{cis}} \quad (2.7)$$

em que τ_{fl} é o tempo de vida real da fluorescência e τ_r o tempo de vida radiativo (tempo de vida que o estado excitado deveria ter na ausência dos processos não-radiativos).

Logo, o rendimento quântico é dado por:

$$\varphi_{fl} = \frac{\tau_{fl}}{\tau_r} \quad (2.8)$$

Visto que a probabilidade de emissão está relacionada à probabilidade de absorção, o tempo de vida radiativo τ_r , pode ser relacionado com o coeficiente de absorção molar (ε_{max}) do composto. Assim, a equação:

$$\frac{1}{\tau_r} \approx 10^4 \varepsilon_{max} \quad (2.9)$$

pode ser utilizada para obter o valor aproximado de τ_r .

Por outro lado,

$$\varphi_{fl} = \frac{I_{fl}}{I_{abs}} \quad (2.10)$$

em que I_{fl} é a intensidade total da fluorescência, que pode ser calculada como a integral do espectro de fluorescência, e I_{abs} é a intensidade de luz absorvida pela amostra.

Visto que as constantes dos processos não radiativos dependem da interação da molécula com o ambiente, o tempo de vida da fluorescência pode fornecer informações sobre essa interação. Devido à existência dos processos não-radiativos que competem com a emissão de fluorescência, o rendimento quântico é sempre menor que 1 ($\varphi_{fl} < 1$).

Os espectros e os rendimentos quânticos de fluorescência foram medidos com o fluorímetro Hitachi FL4500. Os tempos de vida de fluorescência foram medidos no aparelho descrito na página 45.

2.4.2.1 Supressão colisional ou dinâmica dos estados excitados.

A presença de alguns tipos de moléculas, chamadas supressores, surge como mais um canal de perda de energia do estado excitado. Esse efeito se chama supressão. Existem dois tipos de supressão: estática e dinâmica.

A supressão estática ocorre devido à formação de um complexo entre a molécula no seu estado fundamental e o supressor.

A supressão colisional ou dinâmica é aquela que ocorre devido às colisões entre a molécula excitada e os supressores. Neste caso, o supressor precisa colidir com a molécula durante o tempo de vida do estado excitado (é um processo dependente do tempo). Após o contato, a molécula retorna ao estado fundamental.

Neste caso, a mudança da concentração de moléculas no estado excitado é

$$\frac{d[A^*]}{dt} = -\sum k_m [A^*] - k_q [Q]A^* = -(\sum k_m + k_q [Q])A^* = -(k_0 + k_q [Q])A^* \quad (2.11)$$

em que $k_0 = \sum k_m$ é a soma das constantes dos processos monomoleculares de perda da energia de excitação, k_q é a constante bimolecular de supressão e $[Q]$ é a concentração do supressor. A solução desta equação nos leva a

$$[A^*] = [A_0^*] e^{(-t/\tau_q)} \quad (2.12)$$

em que $\tau_q = 1/(k_0 + k_q [Q]) < \tau_0 = 1/\sum k_m$. Pode-se ver que a supressão diminui o tempo de vida do estado excitado e esta diminuição aumenta quando $[Q]$ aumenta.

Visto que para a supressão colisional é necessário o contato entre a molécula excitada e o supressor, a constante k_q deveria depender do seu movimento, que por sua vez depende das características do meio (viscosidade, por exemplo). O valor máximo que k_q pode atingir refere-se ao quanto cada colisão entre a molécula excitada e o supressor reduz a energia de excitação. Neste caso, a supressão está limitada pela difusão das moléculas presentes na solução.

2.4.3 Espalhamento de Luz Ressonante (RLS)

Estudos recentes tem mostrado que RLS (do termo inglês *resonance light scattering*) é uma valiosa técnica para detecção e caracterização de agregados de cromóforos [45, 96-101]. Esse método baseia-se no fenômeno do aumento de espalhamento da luz próximo à região de absorção ótica da amostra. Como resultado, RLS é uma técnica sensível e seletiva no monitoramento de agregados e mostra ser muito promissora na determinação do seu tamanho e forma.

Quando a energia eletromagnética passa no interior de uma amostra ela é parcialmente espalhada. O espalhamento aparece pela interação entre o campo elétrico da onda e os elétrons e núcleos das moléculas. Na teoria clássica a onda eletromagnética produz oscilações dos elétrons da molécula que por sua vez emitem energia em todas as direções.

A intensidade da luz espalhada de uma solução na ausência de absorção ótica é determinada pela equação de Rayleigh:

$$I_{esp} = \left(\frac{AI_{at}n_0^4CV^2}{\lambda^4} \right) \left(\frac{n^2 - n_0^2}{n^2 + n_0^2} \right) (1 + \cos^2 \theta) = \frac{B}{\lambda^4} \quad (2.13)$$

em que A e B são coeficientes de proporcionalidade; I_{at} é a intensidade da luz de ativação; I_{esp} é a intensidade da luz espalhada; n_0 é o índice de refração do meio; n é o índice de refração da partícula; C é a concentração das partículas; V é o volume da partícula e $\lambda = \lambda_{at} = \lambda_{esp}$ é o comprimento de onda. Se a solução não absorve na região espectral estudada, o espectro de espalhamento será descrito através dessa equação.

Formalmente, no caso de solução homogênea:

$$n = n_0; \quad I_{esp} = 0 \quad (2.14)$$

Se existem variações do n (solução heterogênea):

$$n \neq n_0; \quad I_{esp} \neq 0 \quad (2.15)$$

Porém, nas soluções homogêneas sempre existem flutuações da densidade pelo movimento térmico das moléculas e por isso sempre aparecem variações locais do n_0 que produzem o espalhamento.

Na presença da absorção ótica dois efeitos aparecem:

1. a diminuição de intensidade da energia ativadora e espalhada pela absorção ótica da solução;
2. um aumento na intensidade da luz espalhada como o resultado do aumento do índice de refração do meio espalhador nesta região se o comprimento de onda da luz espalhada está perto do comprimento de onda do máximo de absorção da molécula.

O índice de refração da partícula pode ser escrito como:

$$n^2 = \frac{1 + K(\lambda_{\max}^2 \lambda^2)}{\lambda^2 - \lambda_{\max}^2} \quad (2.16)$$

em que K é um coeficiente de proporção; λ_{\max} é o comprimento de onda do máximo de absorção e λ é o comprimento de onda da luz espalhada. Quando $\lambda_{\text{esp}} \rightarrow \lambda_{\text{max}}$, $n^2 \rightarrow \infty$

$$(n^2 - n_0^2) / (n^2 + n_0^2) \rightarrow 1 \quad (2.17)$$

e então, $I_{\text{esp}} \rightarrow I_{\text{max}}$.

Esse efeito se chama *espalhamento por ressonância da luz*. Usualmente esse efeito é mascarado pela absorção, mas quando o número de agregados é grande, esse efeito pode ser muito forte.

Tendo em vista que a intensidade de espalhamento é diretamente proporcional à concentração e ao quadrado do volume das partículas espalhadoras, pode-se concluir que para os agregados a intensidade de espalhamento deve ser proporcional ao número de agregação (n_{ag}). Deste modo,

$$I_{RLS} = K V_{ag}^2 C_{ag} = K C_{ag} V^2 n_{ag}^2 = K (C/n) V^2 n_{ag}^2 = K C V^2 n_{ag} = K_1 C n_{ag} \quad (2.18)$$

em que K e K_1 são coeficientes de proporcionalidade, n_{ag} é o número médio de agregação, C_{ag} é a concentração de agregados, C é a concentração de monômeros, V é o volume do monômero e $V_{ag} = (V n_{ag})$ é o volume médio de agregados. Deste modo, a técnica de RLS pode ser usada como um teste para avaliar a formação de agregados bem como o número médio de agregação.

Um problema sério é a correção dos espectros experimentais de RLS. O método de correção dos espectros de espalhamento é apresentado em detalhes em [45].

Em todas as nossas medidas de RLS foi utilizado o ângulo de espalhamento fixo em 90°. As medidas de RLS foram realizadas no fluorímetro Hitachi FL4500, utilizando o modo sincronizado entre os monocromadores de excitação e emissão (mantendo a diferença do comprimento de onda como 0 nm) na região entre 350 e 800 nm.

2.4.4 Espectroscopia de Flash-Fotólise

Pelo método de flash-fotólise a amostra é excitada por curtos pulsos de luz ou por uma seqüência de pulsos, enquanto as mudanças temporais das suas propriedades são monitoradas [102]. Nesse método, geralmente lâmpadas de pulso ou lasers são utilizados como fontes de excitação. É necessária uma alta intensidade de luz, ou seja, um grande número de fótons (10^{16} - 10^{18} fótons), a fim de produzir durante um tempo curto uma grande população de moléculas excitadas.

A espectroscopia de flash-fotólise possibilita determinar espectros, tempos de vida, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de produtos com curtos tempos de vida induzidos pela luz, tais como estados excitados eletrônicos, por exemplo.

As características mais importantes do equipamento de flash-fotólise são: a duração (τ_p), a energia (U_p) e a região espectral do pulso da luz de excitação, as quais podem ser escolhidas em função das características do sistema a ser estudado. Para as soluções líquidas homogêneas os valores de τ_p mais comuns estão na região de 10^{-3}

até 10^{-9} s, pois esses valores caracterizam os tempos de vida de estados excitados eletrônicos mais baixos (S_1 e T_1), fotoisômeros, radicais livres, etc. Porém, este tempo pode ser alterado quando, por exemplo, ocorre a formação de um complexo entre um fotossensibilizador e um sistema microheterogêneo. Esta situação é comum para fotossensibilizadores em soluções de polímeros (líquidas e sólidas) e especialmente para sistemas biológicos.

O tempo de vida relativamente longo do estado tripleto T_1 aumenta a probabilidade de sua reação com outros componentes do sistema se comparado com o estado S_1 . A Figura 2.4 mostra através de um diagrama como ocorre a absorção $T_1 \rightarrow T_n$.

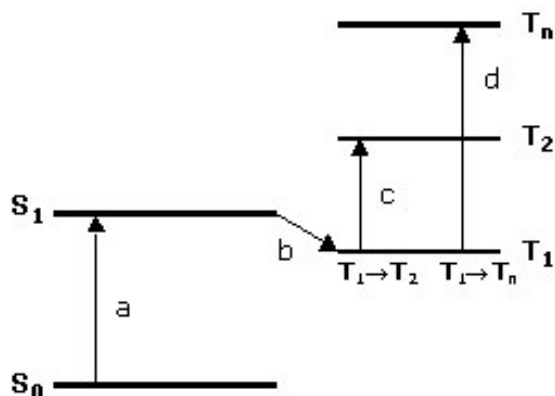
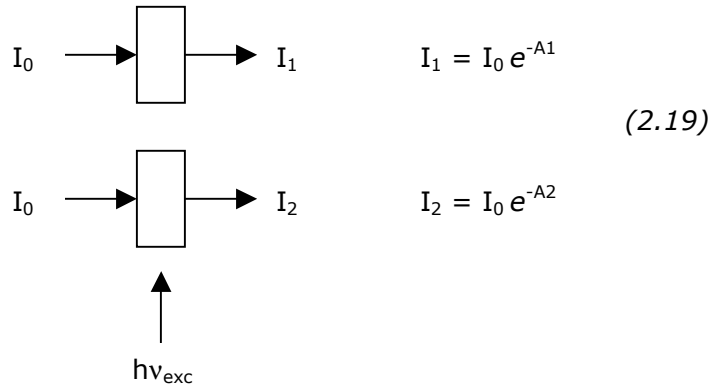


Figura 2.4) Diagrama de estado mostrando o caminho que leva a absorção tripleto-tripletto (T-T). A absorção (a) é seguida por cruzamento intersistemas (b) para popular T_1 . Em seguida, após a absorção de um fóton, podem ocorrer as transições $T_1 \rightarrow T_2$ (c) e $T_1 \rightarrow T_n$ (d).

Uma vez que o espectro de absorção do estado tripleto é estabelecido, a cinética de decaimento de T_1 pode ser medida através das medidas de absorção. A determinação da variação da absorção no comprimento de onda de análise pode ser obtida da seguinte forma:



em que I_0 é a intensidade da luz ao atingir a amostra, I_1 é a intensidade da luz transmitida pela amostra antes do pulso fotolisante, quando a absorção da amostra é A_1 e I_2 é a intensidade da luz transmitida pela amostra após o pulso fotolisante, quando a absorção da amostra é A_2 .

Deste modo, podemos escrever,

$$\frac{I_2}{I_1} = e^{-(A_2 - A_1)} = e^{-\Delta A} \quad (2.20)$$

Se apresentarmos I_2 como $I_1 - \Delta I$ podemos escrever,

$$\frac{I_1}{I_1 - \Delta I} = e^{\Delta A} \quad (2.21)$$

$$\Delta A = \log \frac{I_1}{I_1 - \Delta I} \quad (2.22)$$

ΔA pode ser relacionada com a concentração da porfirina da seguinte forma:

$$A_1 = \epsilon_{SS} C_0 \quad (2.23)$$

$$A_2 = \epsilon_{SS} (C_0 - C_T) + \epsilon_{TT} C_T = \epsilon_{SS} C_0 + (\epsilon_{TT} - \epsilon_{SS}) C_T \quad (2.24)$$

$$\Delta A = A_2 - A_1 = (\epsilon_{TT} - \epsilon_{SS}) C_T = \text{const} \times C_T \quad (2.25)$$

$$C_T = C_T(t)$$

$$\Delta A = \text{const} \times C_T(t) \quad (2.26)$$

em que ϵ_{S-S} e ϵ_{T-T} são os coeficientes de absorção molar singleto-singleto e tripleto-tripletto respectivamente; C_0 é a concentração inicial de moléculas no estado fundamental e C_T é a concentração de moléculas no estado excitado tripleto.

A representação esquemática do aparelho de flash-fotólise, com análise através do registro de absorção ótica, é apresentada na Figura 2.5:

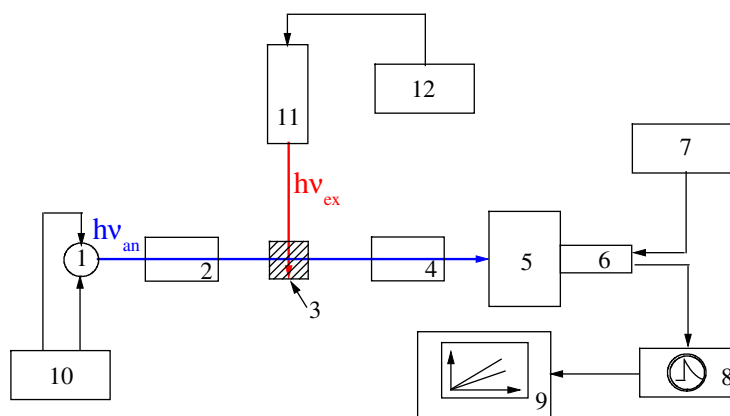


Figura 2.5) (1). Fonte de luz de análise (lâmpada ou laser) ; (2) e (4) Sistemas óticos; (3) Amostra; (5) Monocromador; (6) Fotomultiplicadora; (7) Fonte de alta tensão; (8) Registrador (Osciloscópio digital); (9) Analisador (Computador); (10) Fonte de corrente; (11) Fonte de pulsos de luz de excitação (Laser); (12) Fonte da potência para pulsos de excitação.

Neste trabalho, o estado tripleto foi produzido por curtos pulsos de luz do segundo harmônico (532 nm) do laser Nd:YAG SL400, Spectrum Laser System, (duração do pulso: 10 ns). Os perfis de decaimento do tripleto foram monitorados pela absorção tripleto-tripletto ($T_{1 \rightarrow T_n}$) em $\lambda=470$ nm. Para os estudos do efeito do oxigênio as amostras foram deaeradas borbulhando-se nitrogênio na solução durante cinco minutos.

2.4.5 Fluorescência com resolução temporal

Uma modificação do método de flash-fotólise mais sensível que absorção baseia-se no registro da fluorescência do fotossensibilizador.

A análise detalhada dos dados de fluorescência bem como conhecimento do número de espécies emissoras é muito importante na interpretação das propriedades fluorescentes associadas a cada espécie e na extração de informações sobre sua correlação com a estrutura e a dinâmica do sistema.

O tempo de vida de fluorescência de um composto usualmente representa o tempo médio em que a molécula permanece no estado excitado, antes de retornar ao estado fundamental. Tal informação também pode ser usada na obtenção de detalhes do comportamento do fotossensibilizador acerca de suas interações com o meio em que se encontra. Freqüentemente os decaimentos do tempo de vida de fluorescência em sistemas complexos são ajustados por uma soma de exponenciais [95]:

$$F(t) = \sum_i \alpha_i e^{-t/\tau_i} \quad (2.27)$$

em que α_i é um fator pré-exponencial que representa a contribuição fracional para o decaimento temporalmente resolvido da componente com tempo de vida τ_i .

Um dos métodos de medida do decaimento da fluorescência chamado “*single photon counting*” baseia-se na contagem de um único fóton de emissão após cada pulso de excitação. A amostra é excitada por um pulso de luz que é correlacionado temporalmente com os fótons emitidos pela amostra.

No sistema de análise, o feixe de luz é dividido em duas partes. Uma parte é coletada por um fotodiodo/*trigger* ultra rápido, ligado a um conversor tempo-amplitude (CTA). A função do *trigger* é produzir um sinal de *start* que aciona a rampa de voltagem do CTA.

A outra parte do feixe de excitação passa através de uma cubeta de quartzo (1x1cm), onde a amostra se encontra. A luz que sai da amostra passa por um filtro, utilizado para evitar a luz espalhada. Em seguida somente um fóton de toda a fluorescência induzida pelo pulso é coletado numa fotomultiplicadora. Ao receber um fóton, a fotomultiplicadora produz um pulso de tensão que passa para o CTA como sinal de *stop*, parando a rampa de voltagem. Assim, a amplitude do sinal produzido pelo CTA é proporcional ao tempo entre os sinais de *start* e *stop*.

Este sinal chega a um analisador multicanal (AMC) que o coleta num canal dependente da sua amplitude. Somando sobre os diversos pulsos, o AMC constrói um

histograma de contagens em função de canais temporais. O sistema é ajustado de tal forma que a cada 100 pulsos de excitação o sistema de análise recebe somente um fóton de fluorescência. O experimento continua até que sejam coletadas aproximadamente 10000 contagens no canal do pico. O histograma dos tempos da chegada do fóton representa o perfil de decaimento da fluorescência da amostra.

Uma grande vantagem na utilização deste método é a possibilidade de medir emissões de fluorescência (ou de fosforescência) de intensidades extremamente baixas. A Figura 2.6 apresenta um esquema genérico de um espectrofluorímetro com resolução temporal.

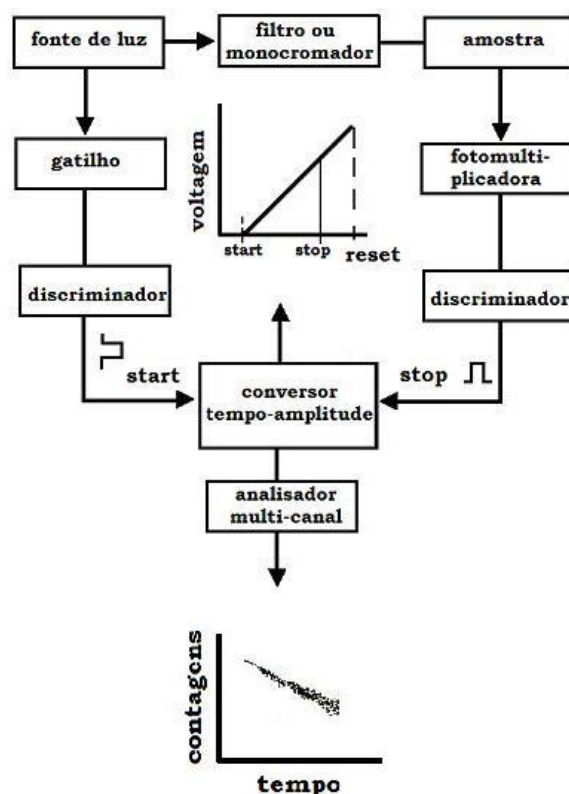


Figura 2.6) Diagrama esquemático do fluorímetro com resolução temporal. Modificado de [95].

O sistema utilizado para excitação consiste na utilização de um conjunto de lasers: no início do processo, um laser de diodos, com dois feixes emitindo em 809 nm, cada qual com 24 W de potência, bombeia um laser de estado sólido (Nd:YVO₄ - Millenia Xs - Spectra Physics) que emite em 1064 nm. Em seguida o feixe passa por

um cristal dobrador de frequências e o feixe final, com potência máxima de 10 W e comprimento de onda igual a 532 nm, bombeia um laser de titânio-safira (Tsunami - Spectra Physics). O cristal de titânio-safira gera pulsos de laser (com largura de 5 ps) em uma banda que vai de 840 até 1080 nm, com frequência máxima de repetição dos pulsos igual a 82 MHz. Um filtro bi-refringente seleciona o comprimento de onda desejado para o feixe de saída. Passando por um sistema selecionador de frequências, esses pulsos de laser podem ter sua frequência dividida em até 8000 vezes, permitindo a operação na faixa de frequências entre 0,01 e 8MHz, que são mais adequadas ao método de contagem de fótons únicos.

Após o selecionador de pulsos, o feixe passa por um gerador de segundos e terceiros harmônicos, cujos comprimentos de onda do feixe na saída estão na faixa utilizada para excitação de nossas amostras, 450-460 nm. O sinal detectado como pulso de excitação, chamado IRF (*instrument response function*), possui largura total a meia altura igual a 60 ps.

2.4.6 Detecção de fosforescência no infravermelho com resolução temporal

A produção de oxigênio singleto foi observada através de medidas do decaimento da sua fosforescência em 1270 nm, que surge da transição radiativa do seu estado excitado singleto ao seu estado fundamental tripleto ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$).

A emissão de fosforescência emitida pelo 1O_2 é de baixa intensidade, visto que transição S \rightarrow T é proibida. Por este motivo, usamos a técnica de contagem de fóton único, utilizando o espectrômetro Edimburg F900 modificado para medir 1O_2 , que utiliza um laser Nd:YAG como sistema de excitação. A resolução temporal deste sistema é da ordem de 5 ns.

2.4.7 Microespectrofluorimetria confocal

Este método está baseado na utilização da espectroscopia de fluorescência associada a um microscópio de fluorescência confocal, ajustados de modo a permitir a realização de medidas da intensidade de fluorescência da área citoplasmática de uma única célula viva, após a sua incubação com o fotossensibilizador. O microespectrofluorímetro confocal utilizado (Figura 2.7) foi desenvolvido pelo LPBC – *Laboratório de Físico-Química Biomolecular e Celular da Universidade Pierre e Marie Curie, Paris, França*.

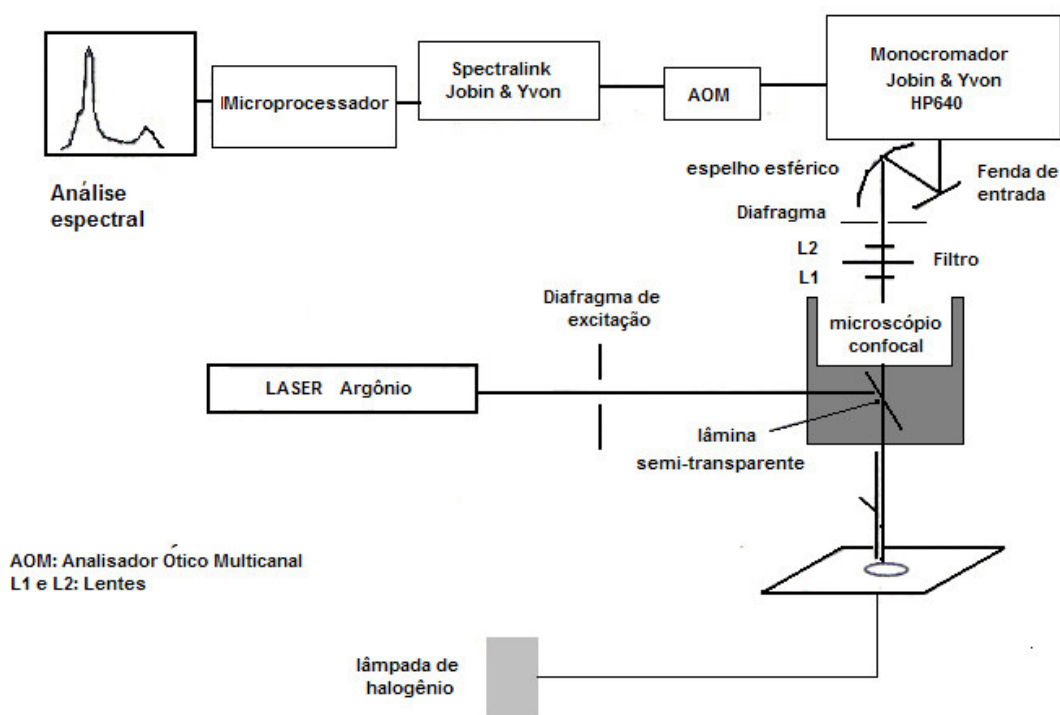


Figura 2.7) Representação esquemática do microespectrofluorímetro confocal.

O microespectrofluorímetro é constituído de um microscópio a epifluorescência Zeiss UMSP 80 (Oberkochen, Alemanha) equipado com uma ótica em quartzo e acoplado opticamente a um espectrógrafo (Jobin, Yvon HR640, França). O diafragma colocado no trajeto de análise determina o volume de análise e, portanto o carácter confocal do aparelho. Ele permite interceptar os raios luminosos oriundos dos planos

(z_1) situados fora do plano focal (z_0) (Figura 2.8). O seu diâmetro pode variar de 80 a 630 μm de diâmetro e desta forma, o volume analisado será proporcional ao diâmetro do diafragma utilizado.

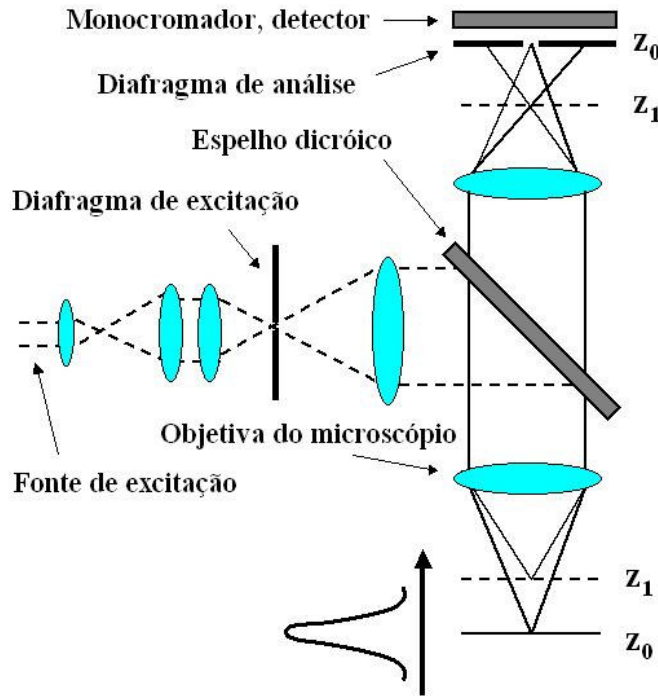


Figura 2.8) Esquema do plano focal do microespectrofluorímetro.

A excitação é realizada através de um laser de argônio ionizado (Spectra Physics, modelo 2020). A potência de excitação foi reduzida através de filtros neutros (da ordem de 0,6 μW nestes experimentos) e um filtro passa-alta (MTOJ560) foi colocado no caminho da emissão.

O feixe de excitação foi focalizado dentro da célula numa área correspondente a $1\mu\text{m}^2$ utilizando uma objetiva x63 Zeiss plan Neofluar (NA 1.25), imersa diretamente na solução de DMEM. O volume celular analisado foi em torno de $10\mu\text{m}^3$, menor que o volume celular porém grande o suficiente para tomar em conta a heterogeneidade da distribuição do FS dentro da célula. O detector é um analisador óptico multicanal (AOM IRY 1024 GB, Princeton Instruments). Os dados foram coletados em um

microprocessador utilizando o programa "Enhanced Prism". Os espectros de fluorescência foram registrados na região entre 520 e 780 com um tempo de acumulação de 2 segundos.

2.4.8 Microscopia Confocal de Imagem por Fluorescência

No microscópio comum ao focar um plano da célula ou tecido, desfocam-se os outros planos, sobrepondo-se à imagem nítida proveniente do plano focado as imagens desfocadas de outros planos. Por este motivo, as imagens de fluorescência das células contendo fotossensibilizadores foram realizadas por um microscópio epifluorescente Nikon (Optiphot-2) equipado com uma bobina Nipkow (Technical Instruments, modelo K2SBIO) que permite trabalhar em modo confocal. Esta bobina permite a observação de apenas um determinado plano da célula, eliminando, portanto, imagens provenientes de planos desfocados.

A Figura 2.9 mostra a representação esquemática do microscópio de fluorescência confocal.

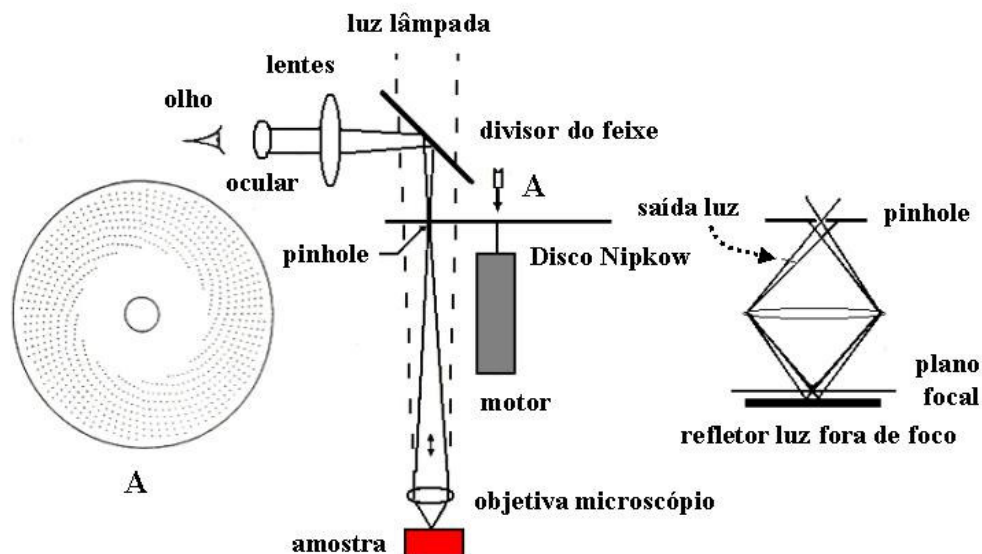


Figura 2.9) Esquema de funcionamento do microscópio de fluorescência confocal utilizado.

A imagem é formada apenas pelas estruturas que se encontram no plano de varredura, sem que os componentes celulares situados em outros planos contribuam para a formação da imagem. Não somente a imagem é mais nítida bem como a célula pode ser "cortada" óticamente em vários planos.

Neste trabalho, as células a serem analisadas foram colocadas em placas de Petri de 30 mm de diâmetro (10^5 cel/ml; 2 ml). Após o período de incubação com o fotossensibilizador as células foram vistas com uma objetiva x63 imersa em DMEM. As imagens de fluorescência foram detectadas por uma câmera CCD (RTEA 1317 K1CCD, Princeton Instruments).

2.4.9 Tensão superficial: Determinação da concentração micelar crítica

A formação das micelas se inicia a partir de uma determinada concentração de tensoativo, chamada concentração micelar crítica (c.m.c).

Existe uma diferença entre pré-agregados micelares e micela propriamente dita. Esta diferença se baseia no fato de que as micelas são agregados com estrutura bem definida e número de agregação conhecido enquanto que os agregados pré-micelares podem assumir qualquer forma e número de agregação [67-69].

A c.m.c dos tensoativos pode ser alterada pelo pH, força iônica e presença de outras substâncias. Portanto, se o composto em estudo altera a c.m.c, os resultados do estudo da sua interação com o tensoativo podem estar comprometidos, pois não saberemos se o composto está interagindo com micelas, com agregados ou mesmo com monômeros de tensoativos.

A c.m.c pode ser determinada por vários métodos, tais como tensão superficial, condutividade, espalhamento da luz e fluorescência. Em todas as técnicas, observa-se através de gráficos uma acentuada mudança do sistema quando se inicia a formação de micelas. Neste estudo utilizamos medidas de tensão superficial.

O modelo de Gibbs relaciona a variação da tensão superficial em função da concentração do tensoativo e, desta maneira, podemos avaliar as mudanças da c.m.c através de medidas da tensão superficial da solução. Uma curva típica de tensão superficial em função do logaritmo da concentração da espécie anfifílica apresenta duas regiões distintas conforme mostra a Figura 2.10.

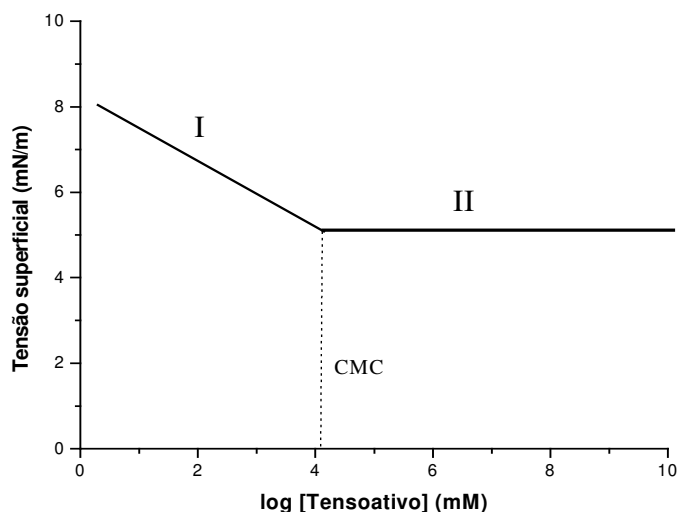


Figura 2.10) Variação da tensão superficial em função do logaritmo da concentração de tensoativo.

A primeira região obedece à isoterma de adsorção de Gibbs. Na segunda, devido a micelização, a tensão superficial permanece aproximadamente constante, quando se tem o equilíbrio entre moléculas isoladas e micelas. A determinação da concentração micelar crítica usando medidas de tensão superficial é feita através da interpolação dos dois segmentos de reta traçados usando-se os pontos experimentais obtidos na região I e II respectivamente.

Na isoterma de adsorção de Gibbs, equação 2.28 [103], algumas aproximações foram feitas, entre elas, o coeficiente de atividade foi tomado como sendo igual a um, ou seja admite-se que a solução seja tratada como ideal:

$$\Gamma = -\frac{1}{RT} \frac{d\gamma}{d \ln c} \quad (2.28)$$

em que Γ é a concentração de excesso superficial, c é a concentração do tensoativo, γ corresponde à tensão superficial.

Método do anel nas medidas de tensão superficial

O método do anel consiste em mergulhar um anel, usualmente de platina, suspenso pelo braço de uma balança, na solução em estudo. O anel é então retirado da solução com velocidade constante. Quando o anel ultrapassa a superfície líquida, é observada a formação de um menisco, o qual é responsável por uma força contrária ao movimento do anel. Esta força corresponde à tensão superficial da solução agindo em todo o perímetro do mesmo e que será detectado pela balança:

$$W_{tot} = W_{anel} + 4\pi R\gamma \quad (2.29)$$

em que R é o diâmetro do anel, W_{tot} é a força de atração total exercida no sistema anel-menisco, W_{anel} é a força peso do anel e γ é a tensão superficial.

Neste trabalho, a tensão superficial foi medida em água e em solução aquosa de TPPS₄ função da concentração do tensoativo. As soluções estoque dos tensoativos (0.1 e 0.01M) foram preparadas na véspera da realização do experimento. A concentração da porfirina TPPS₄ utilizada foi 10 μ M. As alíquotas de tensoativo foram adicionadas com o auxílio de micropipetas na superfície da solução. O intervalo entre as medidas variou entre 2-30 min e 2-60 min após a adição de CTAB na ausência e na presença da porfirina, respectivamente. A temperatura foi mantida constante em 24 \pm 1 °C. As medidas foram feitas no Tensiômetro Sigma-70, utilizando o método do anel.

Nota: Uma grande parte dos experimentos de determinação da c.m.c e sua análise, foi realizada em colaboração com a aluna Marina Aparecida Pires do DFM/FFCLRP/USP, como parte do seu trabalho de Iniciação Científica.