

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

Estudos da interação de Pontos Quânticos com Fotosensibilizadores de interesse em Fotoquimioterapia na presença de Sistemas Biomiméticos

André Luan dos Santos Pavanelli

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Biologia e Medicina.

Ribeirão Preto – SP

2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

Estudos da interação de Pontos Quânticos com Fotosensibilizadores de interesse em Fotoquimioterapia na presença de Sistemas Biomiméticos

André Luan dos Santos Pavanelli

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à Biologia e Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

Versão corrigida

Ribeirão Preto – SP

2022

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Pavanelli, André Luan dos Santos

Estudos da interação de Pontos Quânticos com Fotossensibilizadores de interesse em Fotoquimioterapia na presença de sistemas biomiméticos / André Luan dos Santos Pavanelli; orientador: Iouri Borissevitch — Ribeirão Preto, 2022.

151 p.: il.; 30 cm

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

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

Nome: PAVANELLI, André Luan dos Santos

Título: Estudos da interação de pontos quânticos com fotossensibilizadores de interesse em fotoquimioterapia na presença de sismetams biomiméticos.

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

Aprovado em ____/____/2022

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

*À minha esposa e à minha família, os pilares que
me mantêm em pé.*

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Iouri pela paciência e pelos ensinamentos ao longo de todos estes anos.

À minha esposa Janaina que me proibiu de desistir e que, pacientemente, ajudou a reconstruir o que estava em ruínas.

Às minhas avós Eunice e Júlia pelo amor e carinho.

À todos os meus familiares.

Ao meu irmão Paulo e aos meus amigos Ícaro e Guilherme pela amizade e por muitas vezes emprestarem o ouvido para me ouvir reclamar.

Aos colegas Danilo, Leonardo e Isamara pelos chás, conversas, discussões e lanches no GF.

Ao técnico Adriano pelas tantas vezes em que ajudou nos experimentos e pela prosa.

Ao Dr. Leandro Máximo e ao Prof. Roberto Santana por terem gentilmente fornecido os Pontos Quânticos utilizados neste trabalho.

Á prof. Galina pelas conversas e dicas.

À todos os colegas, professores e técnicos do Departamento de Física pela amizade e acolhimento durante tanto tempo.

Aos amigos do 6º DP de Campinas pelo apoio e incentivo.

À CAPES pela bolsa de doutorado.

Gostaria de agradecer imensamente a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Obrigado!

“Os caminhos que conduzem o homem ao saber são tão maravilhosos quanto o próprio saber.” — Johannes Kepler

RESUMO

PAVANELLI, A. L.S. **Estudos da interação de Pontos Quânticos com Fotossensibilizadores de interesse em Fotoquimioterapia na presença de sistemas biomiméticos.** 2022. 149 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Fotoquimioterapia (FQT) é uma modalidade não invasiva de tratamento de câncer e outras doenças que não possui efeitos colaterais negativos. O princípio da FQT é o uso de compostos fotoativos, chamados de Fotossensibilizadores (FS), excitados com luz visível. Um bom FS deve ser capaz de absorver a energia da luz incidida no local de tratamento e gerar espécies reativas que provocam a morte das células-alvos. Atualmente tem havido uma grande busca no aperfeiçoamento desta técnica e inclusive a possibilidade de uni-la à técnicas de Diagnóstico por Fluorescência (DF). Diante disto, uma das propostas é o uso dos semicondutores nanocristalinos conhecidos como Pontos Quânticos (PQs) em conjunto com os FS usuais a fim de aumentar a eficiência da técnica de tratamento e de diagnóstico. Desta forma, mostra-se importante o estudo da interação entre os Pontos Quânticos e as porfirinas, fotossensibilizadores já consagrados na clínica, na presença de diferentes estruturas que mimetizem o meio celular. Neste trabalho estudou-se a interação entre o Ponto Quântico de Telureto de Cádmio (CdTe) funcionalizado com ácido 3-Mercaptopropiônico (3-MPA) e as porfirinas *meso*-tetrametil piridil (TMPyP) e *meso*-tetrasulfatofenil (TPPS₄) na presença da proteína Albumina do Soro Bovino (ASB) e os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS), N-hexadecil-N,N, dimetil-3-3amônio-1-propano sulfonato (HPS), brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e 4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol (Triton X-100). Os resultados obtidos mostram que a presença de nanoestruturas altera a forma de interação entre porfirina e PQ, indicando que essas estruturas e suas características devem ser levadas em conta na aplicação desses sistemas em biologia e medicina. Também se verificou que a carga das nanoestruturas tem grande influência na interação porfirina-PQ podendo, em alguns casos, favorecer a formação do complexo de transferência de energia, de carga ou de próton ou dificultar a sua formação ou até mesmo impedir ou destruir complexos já formados.

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

ABSTRACT

PAVANELLI, A. L.S. **Studies of interaction of quantum dots with photosensitizers of interest in photochemotherapy in the presence of biomimetic systems.** 2022. 149 p. Thesis (PhD) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Photochemotherapy (PCT) is a non-invasive modality of cancer and other diseases treatment that shows no side effects. The principle of PCT is the use of a photoactive compound, called Photosensitizer (PS), which is excited with visible light. A good PS must be capable to absorb incident light at the local of treatment and produce reactive species that provoke the death of the target cells. Nowadays there is a big search for the improvement of this technique and combine it with the Diagnosis by Fluorescence (DF) technique. Thereby, one of the ideas is the use of nanocrystalline semiconductor, known as Quantum Dots (QDs), together with usual PS to improve the efficiency of the treatment and diagnosis technique. Thus, the study of interaction between QD and porphyrins, which are well-established clinical PS, in the presence of various structures that mimic the cellular interior is important. In this work, we study interaction between Cadmium Tellurete (CdTe) functionalized with 3-Mercaptopropionic Acid (MPA) and the meso-tetramethyl pyridyl (TMPyP) and meso-tetrakis sulfatofenyl (TPPS4) porphyrins in the presence of Bovine Serum Albumin (BSA) and various surfactants: Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), N-hexadecyl-N-N'-dimethyl-3-ammonio-1-propane-sulfonate (HPS), cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and 2-[4-(2,4,4-trimethylpentan-2-yl)phenoxy]ethanol (Triton X-100). The results show that the presence of a nanostructure changes the interaction mode between porphyrin and QD. This indicates that nanostructures and their characteristics should be considered when apply those systems in biology and medicine. We have verified, as well, that the nanostructure charge has a large influence in the QD-porphyrin interaction either supporting formation of complexes based on energy, charge or proton transport, hampering and even blocking their formation, or destroying complexes already formed.

Keywords: Quantum Dot, Porphyrin, Spectroscopic Characteristic, Interaction, Biomimetic systems.

LISTA DE ABREVIACÕES

3-MPA: Ácido 3-Mercaptopropiônico

ASB: Albumina do Soro Bovino

CdTe: Telureto de Cádmio

CMC Concentração Micelar Crítica

CTAB: Brometo de cetil trimetil amônio

DF: Diagnóstico por Fluorescência

FRET: *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência)

FS: Fotossensibilizador

HCl: Ácido Clorídrico

HPS: N-hexadecil-N,N, dimetil-3-amônio-1-propano sulfonato

INCA: Instituto Nacional do Câncer

NaOH: Hidróxido de Sódio

PET: *Photoinduced Electron Transfer* (Transferência de Elétron Fotoinduzida)

PQ: Ponto Quântico

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigênio)

SDS: Dodecilsulfato de sódio

TCSPC: *Time-Correlated Single Photon Counting* (Contagem de fótons únicos em correlação com o tempo)

TFD: Terapia Fotodinâmica

TMPyP: *Meso-tetrametil piridil porphyrin*

TPPS4: *Meso-tetrasulfatofenil porphyrin*

Triton X-100: 4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol

UV: Ultravioleta

Vis: Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da aplicação clínica da TFD para o tratamento de tumores sólidos adaptado de [12].	6
Figura 2. Esquema do diagrama de Jablonski adaptado de [43].	7
Figura 3. Diagrama dos níveis de energia das reações do Tipo I e do Tipo II observadas durante um tratamento em TFD retirado de [44].	8
Figura 4. Estrutura molecular base das porfirinas.	10
Figura 5. Representação ilustrativa da sobreposição dos espectros de absorção ótica do aceitador e do espectro de emissão do doador. Adaptado de [50].	16
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de transferência de energia de Dexter, adaptado de [49].	17
Figura 7. Esquema dos níveis de energia na PET, adaptado de [49].	18
Figura 8. Representação esquemática da membrana segundo o modelo de Singer-Nicholson, retirado de [52].	20
Figura 9. Representação esquemática da formação de micelas, adaptado de [53].	21
Figura 10. Estrutura molecular das porfirinas TMPyP (esquerda) e TPPS ₄ (direita)	24
Figura 11. a) Espectros normalizados de absorção ótica (linha preta) e de fluorescência (linha vermelha) de uma solução aquosa de TMPyP e b) curva de decaimento temporal da intensidade da fluorescência da solução de 1,6 μ M de TMPyP.	25
Figura 12. a) Espectros de absorção ótica e de fluorescência normalizados de uma solução aquosa de TPPS ₄ em pH 4,0 e 7,0 e b) Decaimentos temporais normalizados da intensidade de fluorescência da porfirina TPPS ₄ com os respectivos tempos de vida em pH 4,0 e 7,0	26

Figura 13. Representação esquemática simplificada do CdTe (direita) e estrutura química do ácido 3-Mercaptopropiônico, retirado de [32].	27
Figura 14. Estrutura química dos surfactantes a) SDS, b) CTAB, c) HPS e d) Triton X-100 em meio aquoso.	28
Figura 15. Representação esquemática simplificada de um equipamento de flash-fotólise.	29
Figura 16. Representação esquemática simplificada de um fluorímetro.	30
Figura 17. Esquema simplificado de um fluorímetro com resolução temporal do tipo TCSPC.	32
Figura 18. a) Espectros de absorção ótica da solução de 100 nM de CdTe-3-MPA em diferentes pHs e b) Absorbância em função do pH em $\lambda = 225$ nm.	36
Figura 19. Espectros normalizados de absorção ótica e de luminescência do PQ de CdTe-3-MPA.	37
Figura 20. Decaimento da intensidade normalizada do PQ de Cde-3-MPA em função do tempo com $\lambda_{exc} = 500$ nm e $\lambda_{em} = 600$ nm.	38
Figura 21. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência excitando em $\lambda_{exc} = 432$ nm da solução de 3,0 μ M de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações CdTe-3-MPA [32].	40
Figura 22. Ajuste da intensidade integral da fluorescência da TMPyP com adição de CdTe-3-MPA utilizando a equação de Stern-Volmer [32].	41
Figura 23. Decaimento temporal de fluorescência normalizado da solução de 3,0 μ M de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA, $\lambda_{exc} = 490$ nm e $\lambda_{em} = 650$ nm [32].	41
Figura 24. Contribuição da componente longa (1, preto) e da componente curta (2, vermelha) do decaimento da intensidade de luminescência da solução de 3,0 μ M de TMPyP em função da concentração de CdTe-3-MPA [32].	43

- Figura 25.** Espectros de a) absorção ótica de b) fluorescência da solução de $0,5 \mu\text{M}$ de CdTe-3-MPA em diferentes concentrações de TMPyP usando como linha base de absorção a solução de CdTe-3-MPA, $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ [32]..... 43
- Figura 26.** Razão entre a intensidade de fluorescência inicial do PQ na ausência de porfirina e na presença de diversas concentrações de TMPyP..... 44
- Figura 27.** Ajuste da intensidade integral de fluorescência da solução de $0,5 \mu\text{M}$ de CdTe-3-MPA pelo inverso da concentração utilizando a equação de Stern-Volmer modificada (equação (11)) [32]. 45
- Figura 28.** Espectros de espalhamento ressonante da luz da solução de $3,0 \mu\text{M}$ de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações do PQ de CdTe-3-MPA [32]. 46
- Figura 29.** Esquema gráfico do complexo tipo rede formado entre PQs CdTe-3-MPA e moléculas da porfirina TMPyP [73]. 47
- Figura 30.** a) Espectro diferencial do estado tripleto da TMPyP (preto) e do estado excitado do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA (vermelho) e b) curvas de decaimento na ausência de oxigênio do estado tripleto da TMPyP e do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA em seu estado excitado [32]. 47
- Figura 31.** Ajuste da equação (29) da constante de decaimento do estado tripleto em função da concentração de oxigênio presente no meio [32]. 49
- Figura 32.** Espectros de a) absorção ótica e b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 420 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS4 em pH 4,0 em função da concentração do PQ CdTe-3-MPA [62]..... 51
- Figura 33.** Decaimento temporal da intensidade de fluorescência de TPPS4 para diferentes concentrações de CdTe-3-MPA ($\lambda_{ex} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$). Inseto: Dependência das contribuições das componentes do tempo de vida curto (pontos pretos) e do tempo de vida longo (pontos vermelhos) do decaimento da intensidade de fluorescência da TPPS4 em função da concentração do PQ de CdTe-3-MPA [62]..... 52

- Figura 34.** Ajuste utilizando a equação de Stern-Volmer (equação (6)) da intensidade integral de fluorescência de TPPS₄ em função da concentração de CdTe-3-MPA [62]..... 53
- Figura 35.** a) Espectro de luminescência do PQ excitando em $\lambda = 350$ nm em pH 4,0 em função da concentração de TPPS₄ e b) deconvolução gaussiana da luminescência do PQ na ausência e na presença de 2,0 μ M de TPPS₄ [62]. 54
- Figura 36.** Ajuste da equação modificada de Stern-Volmer para a supressão das componentes da luminescência do PQ de CdTe-3MPA de menor comprimento de onda (pontos pretos) e de maior comprimento de onda (pontos vermelhos) na ausência e na presença da porfirina TPPS₄..... 55
- Figura 37.** Decaimento temporal da intensidade de fluorescência do CdTe-3-MPA em pH 4,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de TPPS₄ ($\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm).[62]. 55
- Figura 38.** Contribuições da componente de menor comprimento de onda (R_3) e de maior comprimento de onda (R_4) e da componente pré-exponencial do decaimento temporal da intensidade de luminescência do PQ de maior tempo de vida (R_5) e de menor tempo de vida (R_6) em pH 4,0 [62]. 56
- Figura 39.** a) Espectro de luminescência do PQ de CdTe-3-MPA em pH 7.0 para diferentes concentrações de TPPS₄; b) Deconvolução Gaussiana do espectro de luminescência do PQ de CdTe-3-MPA em pH 7.0, $\lambda_{ex} = 350$ nm [62]. 58
- Figura 40.** Curva de decaimento da intensidade de luminescência do PQ em pH 7,0, $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm. 59
- Figura 41.** a) Espectros de absorção ótica e de b) fluorescência da solução de 200 nM de CdTe-MPA, excitando em $\lambda = 450$ nm, adicionando ASB [63]. 62
- Figura 42.** Curvas de decaimento temporal da intensidade da luminescência da solução de 200 nM de CdTe-3-MPA ($\lambda_{exc} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 580$ nm) na presença de [ASB] = 0 e de [ASB] = 15 μ M. Inseto: Contribuição da componente de decaimento da intensidade de luminescência de maior tempo de vida (R_2) em função da concentração de ASB [63]. 63

- Figura 43.** Ajuste do crescimento da intensidade de luminescência da solução de 200 μM do PQ de CdTe-3-MPA com adição de BSA de acordo com a equação (32)..... 65
- Figura 44.** Espectros normalizados de absorvância ótica (linha contínua) e de fluorescência (linha pontilhada) da solução contendo complexo TMPyP...CdTe-3-MPA, produzidos a partir da adição de 1,6 μM de TMPyP e 150 nM de CdTe-3-MPA, na ausência (preto) e na presença (vermelho) de ASB. Inseto: Decaimento temporal normalizado da intensidade da luminescência do complexo na ausência (preto) e na presença (vermelho) de ASB 66
- Figura 45.** Espectros de a) absorção e de b) fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 445 \text{ nm}$) da solução de 5,0 μM de TMPyP na presença de 30 μM de ASB em diferentes concentrações de PQ. Inseto: intensidade integral de fluorescência em função da concentração de PQ [63]..... 66
- Figura 46.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$) de 1,6 μM de TPPS4 em pH 7,0 na ausência e na presença de 3 μM de ASB. 68
- Figura 47.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$) de 1,6 μM de TPPS4 na presença de 400 nM de CdTe-3-MPA em diferentes concentrações de ASB. Inseto: Ajuste da intensidade integral da fluorescência utilizando a equação (32) [63]. 69
- Figura 48.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência estática ($\lambda_{\text{exc}} = 417 \text{ nm}$) de 1,6 μM de TPPS4 e 380 nM de PQ em pH 4,0 na presença de diversas concentração de ASB. Inseto: Curvas de decaimento temporal do PQ com $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$ na ausência e na presença de 15 μM de ASB..... 70
- Figura 49.** Intensidade integral de fluorescência de ,6 μM de TPPS4 e de 380 nM de PQ na presença de ASB ajustada em acordo com a equação (32) [63]. 71
- Figura 50.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 430 \text{ nm}$) de 5,5 μM de TMPyP com diferentes concentrações de SDS. Inseto de a): Absorvância em $\lambda = 422 \text{ nm}$ em função da concentração de SDS e Inseto de b): Intensidade integral de fluorescência em função da concentração de SDS..... 73
- Figura 51.** Ajuste da intensidade integral da fluorescência da TMPyP devido à adição de SDS utilizando a equação (32). 74

- Figura 52.** Deconvolução gaussiana de espectros da fluorescência de TMPyP em a) solução homogênea e b) na presença de micelas de SDS..... 75
- Figura 53.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência de 5,5 μM de TMPyP com 15 mM de SDS na ausência e na presença de diversas concentrações de PQ. Inseto de a): espectros das bandas Q da TMPyP nas diferentes concentrações de PQ. 76
- Figura 54.** Deconvolução gaussiana do espectro da fluorescência do sistema TMPyP (5,5 μM) + SDS (15 mM) + PQ (410 nm) (a) e dependência da intensidade integral de componentes gaussianas de deconvolução em função de concentração de PQ. 76
- Figura 55.** Tratamento de dados da intensidade integral da componente $\lambda_5 = 585 \text{ nm}$ em função da concentração de PQ usando a equação (32)..... 77
- Figura 56.** Espectros de a) absorção ótica e de b) luminescência do complexo formado com 5,5 μM de TMPyP e 160 nM de CdTe-3-MPA na ausência e presença de diversas concentrações de SDS excitando em $\lambda = 432 \text{ nm}$. Insetos: 1a) espectros de absorção ótica entre 450 nm e 700 nm do complexo na ausência e na presença de diversas concentrações de SDS; 2a) absorbância em $\lambda = 450 \text{ nm}$ em função da concentração de SDS; inseto de b): espectros de luminescência normalizados na ausência (preto) e na presença de 20 mM de SDS (vermelho)..... 78
- Figura 57.** Deconvolução gaussiana do espectro de fluorescência de 5,5 μM de TMPyP com 160 nM de PQ na ausência (linha) e na presença de 20mM de SDS (pontilhado) excitando em $\lambda = 430 \text{ nm}$ 79
- Figura 58.** a) Curvas de decaimento temporal da intensidade da fluorescência de 5,5 μM de TMPyP com 160 nM de Cde-3-MPA na presença de diferentes concentrações de SDS e b) Curvas de decaimento temporal da intensidade da fluorescência da solução de TMPyP com CdTe-3-MPA para concentrações de SDS entre 0 e 10 mM e seus respectivos ajustes. Inseto: contribuições das componentes temporais das curvas de decaimento da intensidade da fluorescência R_i em função da concentração de SDS..... 80
- Figura 59.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 2 mM de CTAB em diferentes concentrações de CdTe-3-MPA. Inseto de a):

absorção ótica da região das bandas Q ($450 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$); inserto de b) intensidade integral de fluorescência em função da concentração de CdTe-3-MPA 82

Figura 60. Ajuste da intensidade integral da fluorescência da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP em função do inverso da concentração de CdTe-3-MPA utilizando a equação (32)). 84

Figura 61. a) Intensidade de fluorescência normalizada em função do tempo em $\lambda_{em} = 633 \text{ nm}$ da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 2mM de CTAB em diversas concentrações de PQ excitando em 432 nm , b) contribuição relativa dos tempos τ_1 (R_1 , preto) e τ_2 (R_2 , vermelho) do decaimento temporal da intensidade de fluorescência em função da concentração de PQ. 85

Figura 62. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência excitando em $\lambda = 432 \text{ nm}$ da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 180 nM de CdTe-3-MPA na presença de diversas concentrações de CTAB. Inserto de a) absorvância em 460 nm em função da concentração de CTAB. Inserto de b): Intensidade integral de fluorescência em função da concentração de CTAB. 86

Figura 63. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência estática ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP na presença de diferentes concentrações de TRITON X-100. Inserto de b) decaimento da intensidade de emissão da porfirina na presença de diferentes concentrações de Triton X-100 em $\lambda_{em} = 655 \text{ nm}$ em função do tempo. 87

Figura 64. Ajuste da integral da fluorescência da solução de TMPyP em diversas concentrações de Triton X-100 usando a equação (32). 88

Figura 65. Espectro de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com $0,5 \text{ mM}$ de Triton X-100 na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA. Inserto de a) espectros de absorção ótica das bandas Q da solução de porfirina com Triton X-100 em diferentes concentrações de PQ. Inserto de b) Intensidade integral de fluorescência da solução de TMPyP com Triton X-100 em função da concentração de PQ. 88

Figura 66. Ajuste da intensidade integral da fluorescência da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com $0,5 \text{ mM}$ de Triton X-100 em função da concentração de CdTe-3-MPA. 89

Figura 67. a) Decaimento temporal da intensidade de fluorescência normalizada ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com $0,5 \text{ mM}$ de Triton X-100 na ausência e na

presença de diversas concentrações do PQ de CdTe-3-MPA e b) Contribuição das componentes do decaimento temporal da intensidade de fluorescência com os tempos de vida τ_1 e τ_2 do decaimento temporal da intensidade de fluorescência em função da concentração de PQ na solução..... 90

Figura 68. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência da solução de 5,5 μM de TMPyP e 160 nM do PQ de Cde-3-MPA, excitando em $\lambda_{exc} = 432$ nm, na ausência e na presença de diversas concentrações do surfactante neutro Triton X-100. Inseto de a): espectros de absorção das bandas Q do complexo. Inseto de b): Intensidade integral da fluorescência corrigida em função da concentração de Triton X-100..... 91

Figura 69. Ajuste da intensidade integral de fluorescência da solução de 5,5 μM de TMPyP e 160 nM de Cde-3-MPA em função da concentração de Triton X-100 utilizando a equação (32)..... 92

Figura 70. a) Curvas de decaimento temporal da intensidade da luminescência ($\lambda_{exc} = 432$ nm $\lambda_{em} = 650$ nm) do complexo formado a partir de 5,5 μM de TMPyP e 160 nM de CdTe-3-MPA na ausência e na presença de diversas concentrações de Triton X-100 e b) Contribuição dos tempos de vida τ_1 e τ_2 do decaimento temporal da intensidade de fluorescência em função da concentração de Triton X-100..... 92

Figura 71. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência corrigida ($\lambda_{exc} = 432$ nm) da solução de 5,5 μM de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações de HPS. Inseto de a): Espectro de absorção ótica da região das bandas Q da porfirina na presença de diversas concentrações de HPS. Inseto de b) Intensidade integral de fluorescência corrigida em função da concentração de HPS. 94

Figura 72. Ajuste a intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP na ausência e na presença de diversas concentrações de HPS utilizando a equação (32). 95

Figura 73. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 432$ nm) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 10 mM de HPS na presença de diversas concentrações PQ. Inseto de a) espectros de absorção ótica das bandas Q. Inseto de b) Intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP com HPS em função da concentração de PQ. 95

- Figura 74.** Ajuste da intensidade integral de luminescência utilizando a equação (6) da solução de 5,5 μM de TMPyP na presença de 10 mM de HPS em função da concentração de PQ. 96
- Figura 75.** a) Curvas de decaimento temporal da intensidade de luminescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 10 mM de HPS na presença de diversas concentrações de Cde-3-MPA. b) Contribuições das componentes com tempo de vida τ_1 (R_1) e com tempo de vida τ_2 (R_2) em função da concentração de PQ. 97
- Figura 76.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 125 nM de PQ na presença de diferentes concentrações de HPS. Inseto de b): Intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP com PQ em função da concentração de HPS. 98
- Figura 77.** Ajuste da intensidade integral de luminescência utilizando a equação (32) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 125 nM de PQ em função da concentração de HPS. 99
- Figura 78.** a) Curvas de decaimento temporal de 5,5 μM de TMPyP com 125 nM de PQ na presença de diferentes concentrações de HPS e b) contribuição relativa do menor tempo de vida (R_1) e do maior tempo de vida (R_2) em função da concentração de HPS. 99
- Figura 79.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência da solução de 1,6 μM de TPPS₄ e 2,0 mM de CTAB em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de Cde-3-MPA. Inseto de b): Intensidade integral de fluorescência ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$) em função da concentração do PQ de CdTe-3-MPA. 102
- Figura 80.** Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de 1,6 μM de TPPS₄ com 2,0 mM de CTAB em pH 4,0 na ausência e na presença de 123 nM de CdTe-3-MPA. 103
- Figura 81.** Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$) da solução de 1,6 μM de TPPS₄ e 2,0 mM de CTAB em pH 7,0 na presença de diferentes concentrações de PQ. 103
- Figura 82.** Decaimento temporal da intensidade de luminescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de 1,6 μM de TPPS₄ e 2,0 mM de CTAB em pH 7,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de PQ. 104

Figura 83. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e de $5,0 \text{ mM}$ de Triton X-100 em pH 4,0 na presença de diversas concentrações de CdTe-3-MPA. Inseto de a) Espectros de absorção ótica das bandas Q da solução de TPPS_4 com Triton X-100 em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de PQ. Inseto de b) Intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP com Triton X-100 em função concentração de PQ 105

Figura 84. Decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $5,0 \text{ mM}$ Triton X-100 em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de PQ..... 106

Figura 85. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $2,0 \text{ mM}$ de Triton X-100 em pH 7,0 na presença de diversas concentrações de CdTe-3-MPA. Inseto de a): Espectros de absorção ótica da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $2,0 \text{ mM}$ de Triton X-100 em pH 7,0 na presença de diversas concentrações de PQ na região entre $\lambda = 490 \text{ nm}$ e $\lambda = 700 \text{ nm}$ (bandas Q da porfirina)..... 108

Figura 86. Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $2,0 \text{ mM}$ de Triton X-100 em pH 7,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de PQ..... 109

Figura 87. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $2,0 \text{ mM}$ de HPS em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de PQ. Inseto de a): Espectros de absorção ótica da região conhecida como bandas Q ($490 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$) da porfirina na presença de HPS na ausência e na presença de diversas concentrações de PQ. .. 110

Figura 88. Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $2,0 \text{ mM}$ de HPS em pH 4,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de PQ. 111

Figura 89. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $5,0 \text{ mM}$ de HPS em pH 7,0 na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA. Inseto de a): Espectros de absorção ótica da região conhecida como bandas Q ($490 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$) da porfirina com $5,0 \text{ mM}$ de HPS na presença de diversas concentrações de PQ. 112

Figura 90. *Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $5,0 \text{ mM}$ de HPS em $\text{pH } 7,0$ na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA 113*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** *Reações químicas que ocorrem envolvendo CdTe-3-MPA, TMPyP e ASB e as respectivas constantes de ligação [59].* 67
- Tabela 2.** *Tempos de vida τ_i de componentes das curvas da fluorescência do sistema TMPyP...CdTe-3-MPA formado a partir de 5,5 μM de TMPyP e 160 nM de CdTe-3-MPA e suas respectivas contribuições R_i em função da concentração de SDS no meio.* 81
- Tabela 3.** *Valores das constantes de ligação da formação do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA em função das nanoestruturas presentes no meio. $[\text{TMPyP}]_0 = 5,5 \mu\text{M}$.*..... 101
- Tabela 4.** *Relação dos valores de K obtidos nos sistemas estudados**.*..... 115

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIACÕES	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos Teóricos da TFD	5
1.2. Porfirinas	9
1.3. Pontos Quânticos	10
1.4. Supressão de Fluorescência	11
1.4.1. <i>Supressão Dinâmica</i>	11
1.4.2. <i>Supressão Estática</i>	13
1.4.3. <i>Supressão Estática e Dinâmica</i>	14
1.4.4. <i>Equação de Stern Volmer modificada</i>	14
1.5. Processos de Transferência de Energia	15
1.5.1. <i>Mecanismo de Förster</i>	15
1.5.2. <i>Mecanismo de Dexter</i>	17
1.6. Processos de Transferência de Carga	18
1.7. Detergentes e Micelas como Modelos Biomiméticos de Membrana	20
1.8. Albumina do Soro Bovino como Proteína Modelo	22
1.9. Objetivos	22
2. MATERIAIS E MÉTODOS	23
2.1. Objetos do Estudo	24
2.1.1. <i>Porfirinas</i>	24
2.1.2. <i>Pontos Quânticos</i>	26
2.1.3. <i>Modelos Biomiméticos</i>	27
2.2. Técnicas Experimentais	28
2.2.1. <i>Espectroscopia de absorção ótica</i>	28
2.2.2. <i>Flash-Fotólise</i>	28
2.2.3. <i>Espectroscopia de fluorescência estática</i>	30
2.2.4. <i>Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo</i>	31

2.2.5.	<i>Espalhamento ressonante da luz</i>	32
2.3.	Metodologia Experimental	33
3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
3.1.	Caracterização dos Pontos Quânticos	36
3.1.1.	<i>Efeito do pH nos espectros de absorção ótica dos PQs de CdTe-3-MPA</i>	36
3.1.2.	<i>Características espectrais e estruturais dos PQs de CdTe-3-MPA</i>	37
3.2.	Interação entre a porfirina TMPyP e CdTe-3-MPA	39
3.2.1.	<i>Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA</i>	39
3.2.2.	<i>Conclusões Parciais</i>	49
3.3.	Interação entre a porfirina TPPS₄ e o PQ CdTe-3-MPA	50
3.3.1.	<i>Efeitos do CdTe-3-MPA nas características espectrais da TPPS₄</i>	50
3.3.2.	<i>Efeitos da TPPS₄ nas características espectrais do CdTe-3-MPA</i>	53
3.3.3.	<i>Conclusões Parciais</i>	61
3.4.	Interação entre o PQ Cde-3-MPA, ASB e as porfirinas TMPyP e TPPS₄	62
3.4.1.	<i>Interação entre ASB e CdTe-3-MPA</i>	62
3.4.2.	<i>Efeitos da ASB na interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA</i>	65
3.4.3.	<i>Efeitos da ASB na interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA em pH 7,0</i>	68
3.4.4.	<i>Efeitos da ASB na interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA em pH 4,0</i>	69
3.4.5.	<i>Conclusões Parciais</i>	71
3.5.	Interação entre TMPyP, Cde-3-MPA e Surfactantes	72
3.5.1.	<i>Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA na presença de SDS</i>	73
3.5.2.	<i>Interação entre TMPyP e CddTe-3-MPA na presença de CTAB</i>	82
3.5.3.	<i>Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA na presença de Triton X-100</i>	86
3.5.4.	<i>Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA na presença de HPS</i>	94
3.5.5.	<i>Conclusões Parciais</i>	100
3.6.	Interação entre TPPS₄, CdTe-3-MPA e Surfactantes	101
3.6.1.	<i>Interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA na presença de CTAB</i>	101
3.6.2.	<i>Interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA na presença de Triton X-100</i>	105
3.6.3.	<i>Interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA na presença de HPS</i>	109
3.6.4.	<i>Conclusões Parciais</i>	113
4.	CONCLUSÕES	114
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1. INTRODUÇÃO

Câncer é a denominação dada a um grande conjunto de moléstias que afetam diversas partes do corpo humano e tem como principal característica o crescimento desordenado e descontrolado de tecidos doentes [1–3]. O último informativo do Instituto Nacional do Câncer (INCA) aponta que, no ano de 2019, cerca de 220 mil brasileiros perderam suas vidas em função de alguma neoplasia e, até aquele mesmo ano, o câncer estava entre as quatro maiores causas de morte prematura na maioria dos países [4]. A OMS estima que no ano de 2040 são previstas cerca de 16,3 milhões mortes decorrentes de câncer ao redor do globo [5].

As principais causas para o aumento da incidência de câncer no mundo são: o aumento da expectativa de vida da população, o aumento da própria população e a deterioração da situação ambiental ao redor do mundo. Além disto, fatores socioeconômicos de cada país impactam severamente na incidência de neoplasias [1].

Um fator altamente preocupante, quando se fala em câncer, é a formação de metástases. De maneira resumida, pode-se dizer que metástases são as células cancerosas que se soltam do tumor original e invadem tecidos de outros órgãos induzindo o crescimento de novos tumores em diferentes órgãos do corpo humano. Metástases são, em grande parte, resistentes aos tratamentos convencionais [6], o que dificulta as chances de cura e aumenta a mortalidade da doença.

Os fatores acima apontados estimulam a busca por métodos de tratamento e de diagnóstico que sejam cada vez mais eficazes e eficientes, menos invasivos e com efeitos colaterais mais brandos. Além disto, a possibilidade de um diagnóstico precoce aumenta consideravelmente a chance de cura da doença [1,2]. Há algumas décadas, vem sendo desenvolvido o uso de luz no tratamento de neoplasias.

A luz tem sido utilizada pela humanidade como forma de terapia de diversas doenças desde os primórdios das civilizações [6–8]. Entre 3000 e 4000 anos atrás, os egípcios já utilizavam luz, em conjunto com a aplicação de algumas ervas, para o tratamento de psoríase e de vitiligo [7,9,10]. Um dos primeiros estudos do uso da luz contra micro-organismos na medicina moderna foi realizado por Raab que em 1900 descreveu que corantes de acridina, em conjunto com luz visível e oxigênio molecular, causavam a morte de organismos unicelulares [6,7,10]. Em 1903, Niels R. Finsen recebe o Prêmio Nobel de Medicina pelo desenvolvimento de técnicas utilizando luz no tratamento de Lúpus [10]. Mais pesquisas nessa direção levaram a criação de um novo método de

tratamento de câncer através da fotoquimioterapia, em particular, na forma de Terapia Fotodinâmica.

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica de tratamento que pode ser aplicada para diversos tipos de doenças e que se utiliza de uma molécula sensível a luz, chamada de Fotossensibilizador (FS), luz visível em um comprimento de onda específico e oxigênio molecular [8,11,12]. A primeira aplicação desta técnica, em sua forma moderna, foi feita por Dougherty que, nos anos 70, utilizou fluoresceína como FS para tratar tumores [8,9] e desde então inúmeras pesquisas são lançadas todos os anos com novas moléculas de FS, novas formas de utilizar tal técnica e o uso em novas áreas [7,12,13], porém o grande enfoque da TFD é o tratamento de câncer. Desta forma a TFD tem sido amplamente utilizada como mais uma ferramenta para o tratamento de câncer, também podendo ser utilizada em conjunto com técnicas convencionais [14,15].

O diagnóstico precoce do câncer é um dos fatores determinantes para o sucesso do tratamento da doença [16–18]. Desta forma, existe uma grande demanda por novas técnicas que facilitem o diagnóstico, aumentem a eficiência e diminuam os custos de detecção de tumores e células com potencial cancerígeno. Neste sentido, vem sendo desenvolvido e gradativamente aplicado o Diagnóstico por Fluorescência (DF), conforme se observa em [10,19–21].

O DF é uma técnica de diagnóstico que utiliza luz visível e um FS que possua afinidade elevada para se ligar aos tecidos tumorais. Na técnica, o FS é aplicado e, após o intervalo de tempo necessário para que se acumule no tecido de interesse, a região sob controle é irradiada com luz visível. A luz irá estimular o FS e fará com que ele emita luz em comprimentos de onda diferentes dos utilizados na excitação, tornando capaz de distinguir, inclusive sem a necessidade de equipamentos técnicos, os tecidos doentes dos tecidos saudáveis [22–24].

A união das técnicas de diagnóstico e das técnicas de tratamento é a base para o que é chamado de medicina “teranóstica” que envolve a realização simultânea do diagnóstico e do tratamento da doença [25]. Assim, é importante a pesquisa e o desenvolvimento de FSs e sistemas de FSs que possam ser utilizados na medicina teranóstica.

As moléculas da classe das porfirinas são, até o presente momento, responsáveis pela maioria dos FS aplicados na TFD, com muitos estudos consolidados na área [7–10,26]. O que torna as porfirinas tão importante para a aplicação em TFD são suas características vantajosas, como: a

baixa toxicidade no escuro, o bom coeficiente de absorção molar no visível, a alta afinidade com tecidos biológicos e o bom rendimento quântico do estado excitado tripleto, a depender do tipo de porfirina [8,10,27].

Apesar destas características apresentadas, as porfirinas apresentam baixo coeficiente de absorção molar na região espectral de 600 nm até 800 nm (“janela terapêutica” – vide Seção 1.1), em que os tecidos biológico são relativamente transparentes e baixo rendimento quântico de fluorescência, o que diminui a eficiência para uso no DF, além de outros problemas pontuais.

Os problemas apresentados para o uso de porfirinas em TFD e DF, além das características intrínsecas do câncer e o aumento de incidência desta doença previsto para as próximas décadas, estimulam a busca por métodos de tratamento e diagnóstico cada vez mais eficazes, de simples aplicação e mais baratos, para serem disponibilizados para uso na medicina pública. Isto, por sua vez, estimula a busca de novas substâncias que sejam mais efetivas para estas aplicações.

Pontos Quânticos (PQs) são semicondutores nanocristalinos que possuem alto coeficiente de absorção molar em toda a região do espectro visível; espectro de emissão estreito, e intenso com a capacidade de alterar a posição do pico de emissão de acordo com o tamanho do PQ [28,29]. Entretanto, por se tratarem de moléculas inorgânicas, possuem alta toxicidade em sistemas biológicos e baixa dispersão na água [30]. Uma possibilidade para atenuar estes efeitos negativos dos PQs é a funcionalização de sua superfície. Isso pode, além de diminuir a toxicidade dos PQs e torna-los solúveis em água, aumentar afinidade específica com diversos tipos de tecidos, inclusive tumorais, permitindo que sejam usados como sonda fluorescente [31–33].

Existem diversos trabalhos propondo a união das características da porfirina com determinados PQs para aumentar a eficiência do tratamento de TFD e do DF [31,32,34,35]. Nestes trabalhos a proposta é utilizar o PQ como uma “antena” para captar energia da luz incidida em uma ampla região espectral e transferi-la à porfirina, que irá atuar na TFD de maneira mais eficiente. Além disto, pode-se aproveitar as características da emissão dos PQs para a realização do DF em conjunto com o tratamento.

Tão importante quanto determinar os mecanismos de interação entre PQ e porfirinas é conhecer como estes mecanismos irão atuar na presença de sistemas biológicos. Assim, antes de iniciar os estudos no meio biológico, seja “*in vitro*” ou “*in vivo*” é importante estudar as interações

físicas e químicas que ocorrem entre as moléculas de interesse em um meio que mimetize o ambiente biológico de maneira a facilitar a compreensão da natureza das interações na presença destes sistemas miméticos [14,36].

Uma forma de mimetizar a membrana celular é utilizar micelas de diversos tipos de surfactantes. Tal método vem sendo usado há bastante tempo com diversos resultados importantes no campo da interação entre FS e micelas com diferentes características [37–40].

Além da interação com as membranas celulares, um interesse especial atrai a atenção para o estudo da interação de FS com proteínas, especialmente albuminas de soro. O papel principal das albuminas é se ligar a vários tipos de compostos e transportá-los com o fluxo de sangue dentro do organismo [41]. Outro ponto importante a se destacar é que as albuminas possuem elevada afinidade por tecidos tumorais. Estas características abrem uma perspectiva para utilizá-las como possíveis carreadores de drogas em TFD e DF [41,42]. Isto estimula o interesse de estudar a ligação de diversos FS com albuminas e os efeitos desta interação nas características de FS.

Este trabalho buscou estudar os efeitos dos sistemas biomiméticos: Albumina de Soro Bovino (ASB), escolhida pelo seu custo relativamente baixo e pela facilidade em se obter, e micelas, formadas com surfactantes com diversos estados de carga, nas características fotofísicas da porfirina catiônica *Meso*-Tetrametil Piridil (TMPyP) e da porfirina aniônica *Meso*-Tetrasulfatofenil (TPPS₄), na presença de PQs de Telureto de Cádmio (CdTe) funcionalizado com o ácido 3-Mercapopropiônico (3-MPA) e de complexos porfirina...PQ, assim como no processo de formação destes complexos.

A escolha deste PQ em específico se deu, principalmente, pela facilidade de obtenção (vide Secção 2.1.2).

Os estudos foram realizados através de técnicas espectroscópicas de absorção ótica e de fluorescência de modo contínuo e com resolução temporal. O alvo principal do estudo foi de avaliar as perspectivas de usar estes sistemas na TFD e no DF.

1.1. Aspectos Teóricos da TFD

A TFD é uma modalidade de tratamento utilizada contra diversas doenças, entre elas o câncer, e envolve a aplicação de uma molécula/fármaco fotoativo (chamado de FS), luz visível e

oxigênio molecular [8]. Nesta técnica o FS é aplicado no paciente de forma tópica ou sistêmica e após o tempo necessário para que o FS se acumule no tecido alvo aplica-se luz visível diretamente no local a ser tratado. A luz será absorvida pelo FS e irá gerar espécies em estado excitado. A molécula de FS, nestes estados excitados, em contato com o oxigênio molecular, geram espécies ativas de oxigênio molecular (do inglês: *Reactive Oxygen Species*, ROS) que são altamente reativas e irão atacar os tecidos biológicos de interesse, conforme esquema apresentado na Figura 1.

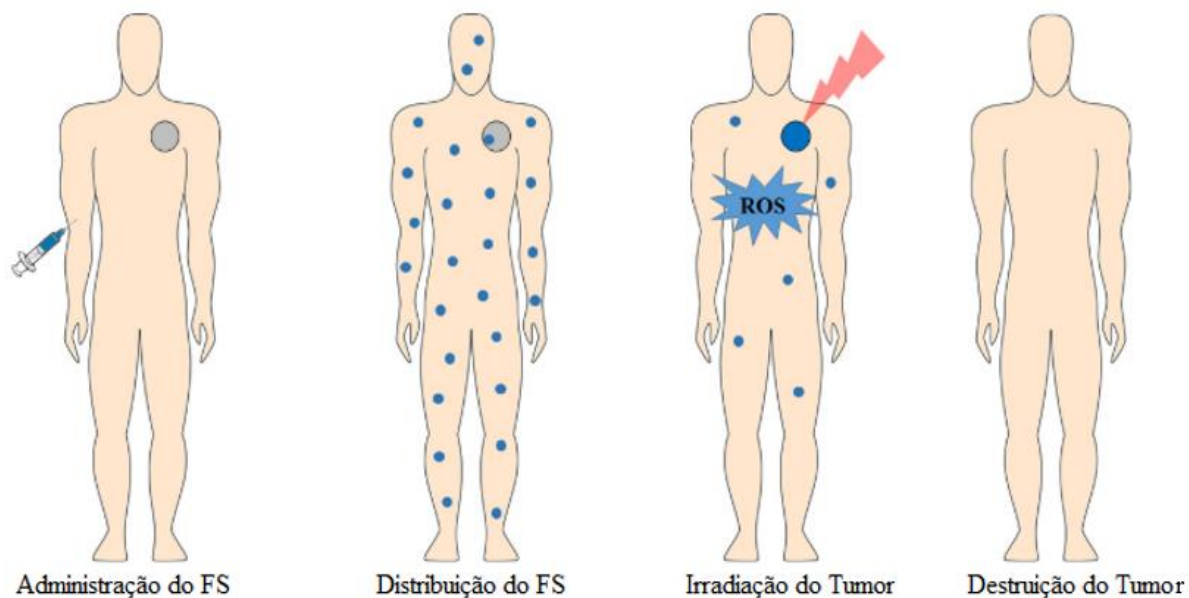


Figura 1. Representação da aplicação clínica da TFD para o tratamento de tumores sólidos adaptado de [12].

O FS tem como principal função captar a energia proveniente da luz e transferi-la ao oxigênio molecular presente no meio para gerar espécies ativas. Para ser aplicado em TFD, o FS deve ser compatível com o tecido biológico, possuir baixa toxicidade no organismo quando no escuro, ter alto rendimento quântico dos estados excitados, principalmente do estado tripleto, baixa agregação em doses suficientes ao tratamento e alto coeficiente de absorção molar na região espectral conhecida como janela fototerapêutica [11,12,24].

Janela fototerapêutica é a região espectral da luz visível utilizada para TFD e abrange os comprimentos de onda de 600 nm a 800 nm. O limite inferior é devido à baixa penetrabilidade da luz no tecido biológico para luz com comprimentos de onda menores que 600 nm, sendo grande parte da energia desta faixa do espectro absorvida pelas camadas iniciais da pele [11]. Já o limite superior está relacionado à energia necessária que deve ser transferida para o oxigênio molecular para que possa gerar espécies ativas de oxigênio singleto.

Na Figura 2 está apresentado o Diagrama de Jablonski para um FS típico. Ao absorver o fóton de energia hc/λ , o FS é promovido do estado fundamental singlete (S_0) para algum dos estados superiores (S_1, S_2, \dots, S_n), dependendo da energia do fóton absorvida. Caso a transição tenha ocorrida para algum dos estados S_n ($n > 1$) a molécula então libera energia na forma de conversão interna (calor) até chegar no primeiro estado excitado singlete – S_1 .

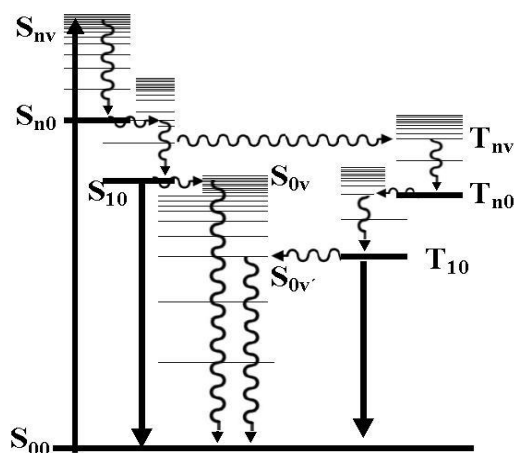


Figura 2. Esquema do diagrama de Jablonski adaptado de [43].

A partir do primeiro estado excitado – S_1 – existem três caminhos possíveis a dispersão da energia acumulada. O primeiro deles é a possibilidade da molécula dispersar sua energia em forma de calor – chamado de Conversão Interna – em que não há emissão de fóton e nem a transferência de energia. Este meio de dispersão de energia é, para a TFD tradicional, considerado uma perda.

Outro meio de dispersão de energia do FS é através da emissão de um fóton – chamado de fluorescência. Neste caso, o FS libera um fóton de comprimento de onda λ e energia $hc/\lambda = E(S_1) - E(S_0)$. Esta forma de dispersão de energia é útil para o DF. É de se ressaltar que quanto maior o rendimento quântico da emissão de fluorescência, menor o rendimento quântico da conversão ao estado tripleto, necessário para a formação de espécies reativas de oxigênio.

Por fim, o FS pode sofrer um processo de cruzamento intersistemas, perdendo uma fração de sua energia e acessando o estado excitado tripleto T_1 . Devido às regras de seleção, o estado T_1 possui tempo de vida da ordem de milisegundos, que é maior que aquele observado no estado S_1 , que é da ordem de nanosegundos.

De maneira resumida, pode-se dizer que a partir dos estados excitados singlete e tripleto do FS existem quatro possibilidades de dissipação da energia de excitação: (1) o decaimento para o

estado fundamental pelo processo de cruzamento intersistemas; (2) o decaimento para o estado fundamental através da emissão de um fóton (fosforescência); (3) a transferência de energia (ou carga) para o substrato orgânico (reações Tipo I) ou (4) a transferência de energia para o oxigênio molecular que se encontra no estado fundamental tripleto.

O acesso do FS ao estado tripleto é fundamental para a TFD, pois, devido ao seu maior tempo de vida, comparado com aquele do estado excitado singleto, as reações do Tipo I e do Tipo II da TFD ocorrem principalmente no estado tripleto [11,12].

O principal objetivo da TFD é destruir células patológicas ou outras de interesse. Isto ocorre através de dois processos diferentes, nomeados como reações do Tipo I e reações do Tipo II, apresentadas em um esquema simplificado na Figura 3.

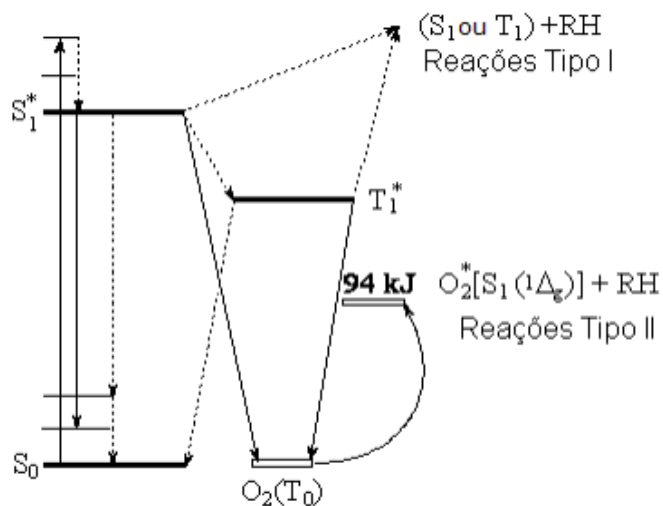


Figura 3. Diagrama dos níveis de energia das reações do Tipo I e do Tipo II observadas durante um tratamento em TFD retirado de [44].

As reações do Tipo I ocorrem quando o FS em seu estado excitado, singleto ou tripleto, transfere carga diretamente ao substrato biológico – conforme visto no diagrama da Figura 3. Este substrato ionizado é bastante reativo e tende a se ligar com as estruturas das células de seu entorno, podendo atacar estruturas celulares vitais e gerar morte celular. Além disto, estão abarcadas nas reações Tipo I a captura de um elétron do oxigênio molecular por parte do FS ionizado, gerando radical superóxido. Neste estado, o oxigênio molecular é muito reativo, sendo capaz de ligar-se a estruturas celulares importantes e causar morte celular. As reações do Tipo I são mais comuns em

meios que contém pouco oxigênio molecular, sendo extremamente útil no ataque a células tumorais em estado de hipóxia, em que o ambiente é pouco oxigenado [6,11,12].

As reações do Tipo II são responsáveis pela maior parte das mortes celulares durante o tratamento de TFD convencional [11,12]. Nestas reações o FS, que se encontra em seu estado excitado tripleto, transfere energia para o oxigênio molecular (estado fundamental tripleto) – conforme apresentado na Figura 3. Este oxigênio, ao receber a energia do FS, vai para o estado excitado singleto. O oxigênio singleto é altamente reativo e possui grande afinidade por cadeias duplas de carbono o que faz com que ataque estruturas orgânicas essenciais para o funcionamento da célula como a membrana, a mitocôndria e o núcleo celular. Além disto, o oxigênio singleto possui tempo de vida entre 0,2 μ s e 5 μ s em meio aquoso, o que faz com que tenha um raio de ação da ordem de 10 nm a depender do coeficiente de difusão no meio. Essas reações entre oxigênio e estruturas celulares prejudicam o funcionamento da célula alvo e podem levar a morte celular via necrose ou via apoptose [6,11,12].

1.2. Porphirinas

Porfirina é o nome dado a um conjunto de moléculas que possuem como característica comum a presença de um anel porfirínico com quatro átomos de nitrogênio em seu interior (Figura 4). Esta estrutura é a precursora de moléculas que possuem papel essencial no funcionamento dos organismos vivos, como o grupo heme, os citocromos e as clorofilas.

A estrutura de anel com a presença de um cromóforo tetrapirrólico conjugado faz com que as porfirinas tenham alto coeficiente de absorção molar na região espectral do visível, o que pode ser facilmente observado graças a intensa coloração apresentada nas soluções aquosas contendo a molécula. Estas características fazem com que as porfirinas tenham importante aplicação na fotomedicina sendo o principal grupo de moléculas utilizado como FS em TFD [7,10,45].

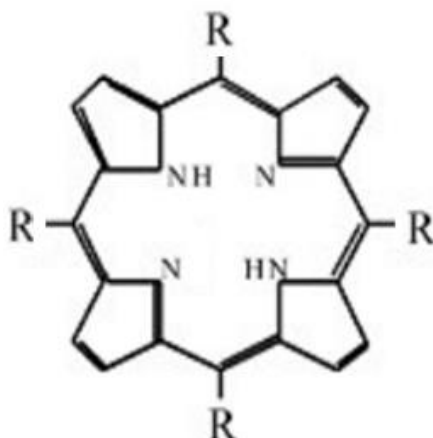


Figura 4. *Estrutura molecular base das porfirinas.*

A estrutura mostrada na Figura 4 terá diferentes nomenclaturas e diferentes características físicas a depender dos grupos colaterais (R) que determinarão a posição espectral do máximo de absorção e de emissão, rendimento quântico de fluorescência, rendimento quântico do estado tripleto, entre outros.

1.3. Pontos Quânticos

Pontos Quânticos (PQs) são semicondutores nanocristalinos em que o par elétron-buraco (éxciton) está confinado em um espaço tridimensional bem definido. Neste tipo de estrutura, o confinamento possui comprimento menor que o raio de Bohr para o éxciton ($\approx 2 - 20$ nm) [30].

Em função das características físicas do forte confinamento quântico do éxciton, os PQs possuem amplo espectro de absorção molar e intenso e estreito espectro de emissão luminescente.

A emissão luminescente acontece quando um fóton com energia suficiente para promover um elétron da camada de valência para a camada de condução é absorvido pelo semicondutor criando um éxciton (par elétron-buraco). Devido ao forte confinamento quântico, o éxciton fica confinado até ser aniquilado e decair emitindo um fóton de luminescência. O tempo necessário para a aniquilação do éxciton bem como a energia liberada na forma de fóton são altamente dependentes do tamanho do PQ, isto faz com que seja possível alterar a posição do espectro de emissão apenas variando o tamanho da nanopartículas. Para PQs maiores o espectro de emissão tende ao vermelho e para PQs menores o pico de luminescência tende ao azul. Os PQs podem possuir uma ou duas estruturas (núcleo ou núcleo e casca) [30,46,47].

Em geral, PQs não dispersão na água e possuem alta toxicidade, porém existe a possibilidade de funcionalizar a sua superfície, tornando o PQ disperso em água, reduzindo a toxicidade e podendo criar afinidade com estruturas biológicas determinadas. A funcionalização possibilita o uso dos PQs em diversas aplicações medicinais como no diagnóstico de diferentes tipos de cânceres, tratamento de doenças, carreador de fármacos, etc [30,34,48].

1.4. Supressão de Fluorescência

É definido como supressão de fluorescência todo e qualquer processo em que a presença de uma molécula, chamada de supressor, causa a diminuição da intensidade de fluorescência de um ou mais fluoróforos no meio [49].

A supressão da fluorescência é um efeito importante e muito estudado, pois é uma grande fonte de informação a respeito de como os sistemas estão interagindo entre si.

Vários são os processos capazes de suprimir a fluorescência de uma amostra, entre eles: (i) transferência de energia do fluoróforo para o supressor por ressonância ou devido à colisão entre eles; (ii) transferência de carga entre fluoróforo e supressor; (iii) reações do estado excitado do fluoróforo com o supressor acompanhadas por rearranjo da estrutura molecular; (iv) o aumento da probabilidade de processos não radiativos de dissipação da energia de excitação dos fluoróforos devido aos efeitos de átomo pesado ou de paramagnetismo do supressor, etc [49,50].

1.4.1. Supressão Dinâmica

A supressão dinâmica, também chamada de supressão colisional, ocorre quando há colisão entre fluoróforo e supressor. Durante a colisão o supressor absorve parte ou toda energia do fluoróforo evitando que esta energia seja dissipada por processos radiativos.

Para que a supressão dinâmica da fluorescência ocorra é necessário que a colisão entre fluoróforo e supressor ocorra antes da emissão do fóton, isto exige colisões com espaço de tempo entre si da ordem de nanossegundos. Isto implica duas condições importantes para este tipo de supressão: (1) a difusão das moléculas no meio e (2) a concentração do supressor deve ser alta o suficiente para favorecer o processo colisional em detrimento do processo radiativo.

A supressão colisional da fluorescência pode ser descrita quantitativamente pela equação de Stern-Volmer, equação (1):

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

Em que I_0 e I são, respectivamente, a intensidade de fluorescência do fluoróforo na ausência do supressor e na presença da concentração $[Q]$ de supressor e K_D é a constante de supressão de Stern-Volmer.

Para processos dinâmicos esta constante pode ser escrita como:

$$K_D = k_q \tau_0 \quad (2)$$

Em que k_q é a constante de supressão bimolecular e τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor.

Outra forma de escrever a equação de Stern-Volmer para a supressão colisional é levando em conta os tempos de vida na ausência (τ_0) e na presença do supressor (τ), conforme mostrado na equação (3):

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + k_q \tau_0 [Q] \quad (3)$$

A constante de supressão bimolecular (k_q) é um importante parâmetro e traz informações a respeito da eficiência da supressão e da acessibilidade dos supressores aos fluoróforos.

A eficiência da supressão (f_Q) pode ser escrita como sendo:

$$f_Q = \frac{k_0}{k_q} \quad (4)$$

Em que k_0 é a constante controlada por difusão bimolecular e leva em conta as características de difusão e do raio de colisão das moléculas (equação (5)):

$$k_0 = 4\pi RDN \quad (5)$$

Em que R é o raio de colisão, D é a soma dos coeficientes de difusão do fluoróforo e do supressor ($D = D_f + D_s$), obtida através da equação de Stokes-Einstein, e N é o número de Avogadro dividido por 1000 ($N = \frac{N_A}{1000}$).

Quando a eficiência de supressão $f_Q = 1$ significa que toda colisão entre fluoróforo e supressor efetivamente causará a supressão do fluoróforo. Em [49] o autor informa que os maiores valores possíveis para k_q em meio aquoso são próximos a $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

1.4.2. *Supressão Estática*

Diferente da supressão dinâmica, na qual a diminuição da intensidade de fluorescência do fluoróforo está associada à diminuição do tempo de vida do estado excitado singlete (S_1), na supressão estática a diminuição da intensidade de fluorescência acontece devido à diminuição da fração de moléculas de fluoróforo que podem emitir fluorescência, desta forma, neste caso, não é observada a diminuição do tempo de vida do estado S_1 .

A supressão estática de fluorescência é resultado da formação de um complexo entre fluoróforo e supressor no estado fundamental. Este complexo, ao absorver um fóton retorna ao estado fundamental sem a emissão de fótons devido à fluorescência.

A equação de Stern-Volmer para a supressão estática é dada pela equação (6):

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (6)$$

Em que K_{SV} é a constante de Stern-Volmer. Esta constante é associada a taxa de formação de complexo, de forma que:



A equação (6) e a equação (1) são idênticas, desta forma, não é possível determinar, apenas com base nas medidas de intensidade de fluorescência, se a supressão está ocorrendo por processo estático ou dinâmico. A medida dos tempos de vida de fluorescência pode dirimir esta dúvida. Além disto, processos dinâmicos de supressão não causam mudanças no perfil espectral de absorção do fluoróforo ao contrário dos processos estáticos em que a formação do complexo muda a estrutura eletrônica do sistema o que causa alterações nos perfis de absorção da amostra.

1.4.3. Supressão Estática e Dinâmica

Existe ainda a possibilidade de que os dois mecanismos de supressão ocorram simultaneamente. Quando isto ocorre não é possível observar a dependência linear de I_0/I com a concentração do supressor $[Q]$. A razão das intensidades é dada por:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_D[Q])(1 + K_{SV}[Q]) \quad (8)$$

$$\frac{I_0}{I} = 1 + (K_D + K_{SV})[Q] + K_D K_{SV}[Q]^2 \quad (9)$$

Desta forma, é possível determinar as constantes de supressão de cada processo ao ajustar a parábola, conforme a equação (9).

1.4.4. Equação de Stern Volmer modificada

Quando o grupo responsável pela fluorescência – fluoróforo – está incluso na estrutura de uma molécula maior, por exemplo, o grupo Triptofano na estrutura da albumina, não será cada contato do supressor com esta molécula grande que produzirá supressão da fluorescência. Neste caso, a supressão somente se realiza quando o supressor aparece próximo ao fluoróforo. Isto faz com que a relação I_0/I não seja linear e diretamente proporcional à concentração do supressor, visto que o aumento de concentração do mesmo não irá suprimir os fluoróforos na mesma proporção.

Na solução coabitam duas populações de fluoróforo: as que são acessíveis ao supressor (I_A) e as que não são acessíveis ao supressor (I_{NA}). A fração dos fluoróforos acessíveis ao supressor (f), também chamado de fator de acessibilidade, é dada pela razão entre a população acessível a supressor e a população não acessível (equação (10)):

$$f = \frac{I_A}{I_0} = \frac{I_A}{I_A + I_{NA}} \quad (10)$$

Com o tratamento matemático adequado, detalhado em [49], é possível determinar a constante de Stern-Volmer e a fração dos fluoróforos acessíveis ao sistema a partir da relação linear entre $I_0/(I_0 - I)$ e $1/[Q]$, conforme mostra a equação (11).

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

Em que a intersecção da curva com o eixo das ordenadas fornece o valor de $1/f$ e o coeficiente linear fornece o valor de $1/fK_{SV}$.

1.5. Processos de Transferência de Energia

Existem dois tipos de processos de transferência de energia: os processos radiativos e os processos não radiativos [49,50].

Os processos radiativos são aqueles em que a molécula aceitadora absorve um fóton emitido pela molécula doadora. Assim, para que este processo ocorra é necessário que o espectro de emissão do doador esteja sobreposto ao espectro de absorção do aceitador.

Os processos de transferência de energia não radiativos são divididos em dois: o processo de transferência de energia de longo alcance, conhecido como Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência descrito por Förster, e o processo de transferência de energia de curto alcance, conhecido também como Mecanismo de Transferência de Energia de Dexter [49].

1.5.1. Mecanismo de Förster ou Transferência de Energia de Longo Alcance

O processo de Transferência de Energia por Ressonância de Fluorescência (do inglês, *Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET*) acontece entre um doador (D), que se encontra no estado excitado, e um aceitador (A), que se encontra no estado fundamental. A principal diferença do processo de *FRET* em relação ao processo de transferência de energia de Dexter é que o *FRET* ocorre em distâncias mais longas, entre 2 nm a 20 nm entre o núcleo de um átomo e o outro, enquanto que o processo de Dexter ocorre para distâncias menores que 1 nm.

Segundo *Lakowicz* [49], o processo de *FRET* é um fenômeno eletrodinâmico que pode ser explicado utilizando a física clássica. A molécula doadora, que se encontra no estado eletrônico excitado, retorna ao estado fundamental após transferir a energia excedente para a molécula aceitadora através de uma interação dipolo-dipolo (para distâncias mais curtas também pode haver interação dipolo-quadrupolo e quadrupolo-quadrupolo). A energia liberada pela molécula doadora deve ser a mesma necessária para promover a molécula aceitadora do estado fundamental para o estado excitado, assim o espectro de emissão do doador deve sobrepor-se ao espectro de absorção ótica do aceitador (Figura 5).

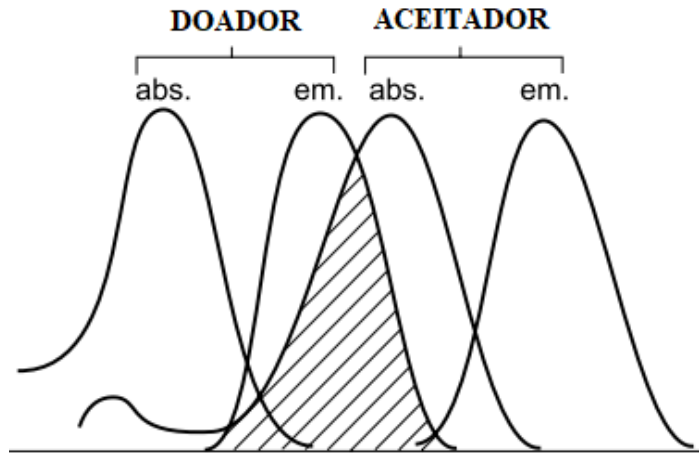


Figura 5. Representação ilustrativa da sobreposição dos espectros de absorção óptica do aceitador e do espectro de emissão do doador. Adaptado de [50]

Utilizando a interação dipolo-dipolo da eletrodinâmica clássica e trabalhando a interação entre as moléculas como um acoplamento muito fraco, Förster foi capaz de calcular a taxa de transferência de energia entre a molécula doadora e a aceitadora [51], conforme equação (12):

$$k_T = \frac{1}{\tau_D} \left[\frac{R_0}{r} \right]^6 \quad (12)$$

Em que k_T é a taxa de transferência de energia através do processo FRET entre o doador e o aceitador, r é a distância entre aceitador e doador, τ_D é o tempo de vida de fluorescência do doador na ausência do aceitador e R_0 é o raio de Förster, que é a distância na qual a taxa de transferência de energia através deste mecanismo é igual a taxa de perda energia por outros meios $k_T = k$.

O raio de Förster pode ser determinado através das características físicas do doador e do aceitador (equação 13):

$$R_0 = \left[\frac{9000 \ln(10) \kappa^2 \Phi_D^0}{128 \pi^5 N_A \eta^4} \int_0^\infty I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \right]^{\frac{1}{6}} \quad (13)$$

Em que κ é o fator de orientação relativa entre os dipolos do doador e do aceitador de energia, Φ_D^0 é o rendimento quântico de fluorescência do doador na ausência do aceitador, η é o coeficiente de refração do meio, N_A é o número de Avogadro, $I_D(\lambda)$ é o espectro de emissão do doador normalizado e $\varepsilon_A(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar do aceitador.

É possível perceber, pelas equações (12) e (13), que a eficiência do processo de transferência de energia via FRET é fortemente dependente do inverso da distância entre doador e aceitador ($\propto 1/r^6$).

A eficiência do processo (Φ_T) é calculada como a taxa de transferência de energia via FRET dividida pela taxa de transferência de energia por outros meios do doador:

$$\Phi_T = \frac{k_T}{k_D + k_T} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (14)$$

Devido à forte dependência da eficiência deste processo com a distância entre as moléculas, este mecanismo é muito utilizado para medir distâncias intermoleculares médias.

1.5.2. Mecanismo de Dexter ou Transferência de Energia de Curto Alcance

Enquanto que o mecanismo de FRET é comum para distâncias da ordem de 2 nm a 20 nm, o processo de transferência de energia de Dexter acontece para distâncias da ordem de 1 nm [49,50].

O mecanismo de transferência de energia de Dexter ocorre quando a nuvem eletrônica do doador está sobreposta à nuvem eletrônica do aceitador. O doador encontra-se no nível eletrônico excitado e, ao sobrepor a nuvem eletrônica do aceitador, ocorre algo parecido com uma “troca”, onde o elétron que se encontra no estado excitado vai para a estrutura eletrônica da molécula aceitadora e um elétron do estado fundamental do aceitador vai para a estrutura eletrônica da molécula doadora, conforme representação esquemática na Figura 6.

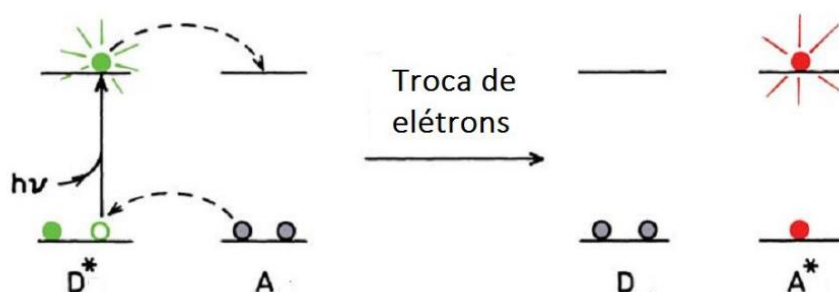


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de transferência de energia de Dexter, adaptado de [49].

Diferente do processo de transferência de energia via FRET, o mecanismo de Dexter é um efeito puramente quântico, não havendo análogos clássicos para a sua explicação [49].

A taxa de transferência de energia pelo mecanismo de Dexter é descrita pela equação (15), retirada de [50]:

$$k_T^D = \frac{2\pi}{h} K J' e^{-\frac{r}{L}} \quad (15)$$

Em que K é uma constante empírica, $J' = \int I_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) d\lambda$, L é o raio de Bohr médio e r é a distância entre doador e aceitador.

1.6. Processos de Transferência de Carga

Segundo *Lakowics* [49], processos de transferência de carga também podem ser uma das causas de supressão da luminescência de uma molécula.

Um destes processos de transferência de carga é a transferência de elétron fotoinduzida (*photoinduced electron transfer, PET*). Ao receber um fóton, a molécula doadora (D) promove um de seus elétrons para o estado excitado, conforme mostrado no diagrama da Figura 7. Este elétron, em contato com a nuvem eletrônica da molécula aceitadora, pode ser “incorporado” pela molécula aceitadora.

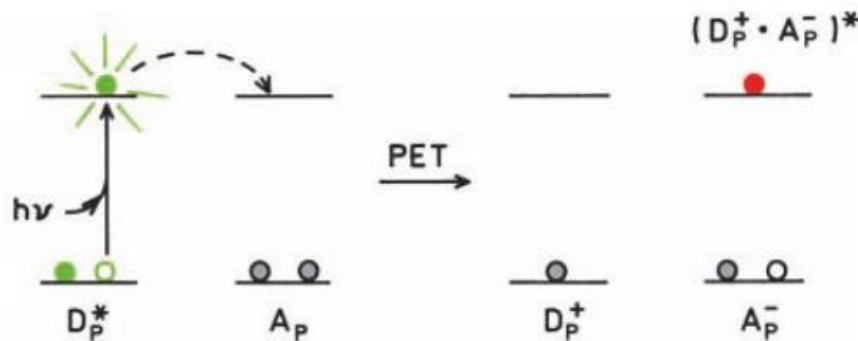


Figura 7. Esquema dos níveis de energia na PET, adaptado de [49].

Esta transferência irá gerar um radical com carga positiva (o doador) e um radical com carga negativa no estado excitado (o aceitador):



Importante ressaltar que este efeito, assim como o mecanismo de transferência de energia de Dexter, ocorre apenas quando há sobreposição das nuvens eletrônicas, o que limita significativamente o alcance deste processo (≈ 1 nm). Também cabe ressaltar que esta transferência de carga pode ocorrer no sentido contrário, ou seja, o doador está no estado fundamental e o aceitador está no estado excitado:



Outra forma de transferência de carga descrita na literatura é através da formação de um complexo em que o elétron da molécula doadora é “parcialmente” transferido. Este processo não necessita que haja energia luminosa envolvida. A formação de complexo pode ser descrita como:



Vale recordar que quando o complexo dispersa energia por meios não radiativos tem-se a supressão estática.

A energia do estado de transferência de carga é dada pela equação (19):

$$E_T = E_D - E_R - E_C - \alpha \left(\frac{\varepsilon - 1}{2\varepsilon + 1} - \frac{n^2 - 1}{4n^2 + 2} \right) \quad (19)$$

Em que E_T é a energia do estado de transferência de carga, E_D é a energia de ionização da molécula doadora, E_R é a energia de afinidade eletrônica da molécula aceitadora, E_C é a energia coulombiana de estabilização do complexo, α é uma constante empírica, ε a constante dielétrica do meio e n é o índice de refração do meio de formação do complexo.

Uma forma particular de formação de complexo de transferência de carga é através da formação dos denominados exciplexos.

Os exciplexos são complexos excitados formados a partir da colisão entre a molécula doadora e a molécula aceitadora, sendo que uma delas está no estado excitado. Desta colisão é formado um complexo no estado excitado, ou exciplexos (equações (20) e (21)):



1.7. Detergentes e Micelas como Modelos Biomiméticos de Membrana

Muitos dos compostos que possuem atividade biológica tem sua interação mediada pela membrana celular. A membrana celular é um sistema biológico presente em todos os organismos vivos, unicelulares ou multicelulares, possui alto nível de organização e é responsável pelo trânsito de materiais entre o meio intracelular e o meio extracelular.

A membrana celular é composta pela bicamada de lipídios que separa o meio intracelular do meio extracelular e diversas proteínas responsáveis por fazer a seleção do que transita através da membrana estão incorporadas a esta dupla camada. Apesar da membrana ter aspecto fluído e grandes alterações na sua estrutura ao longo do tempo, convencionou-se apresentar a membrana de acordo com o modelo estático de Singer-Nicholson, conforme Figura 8.

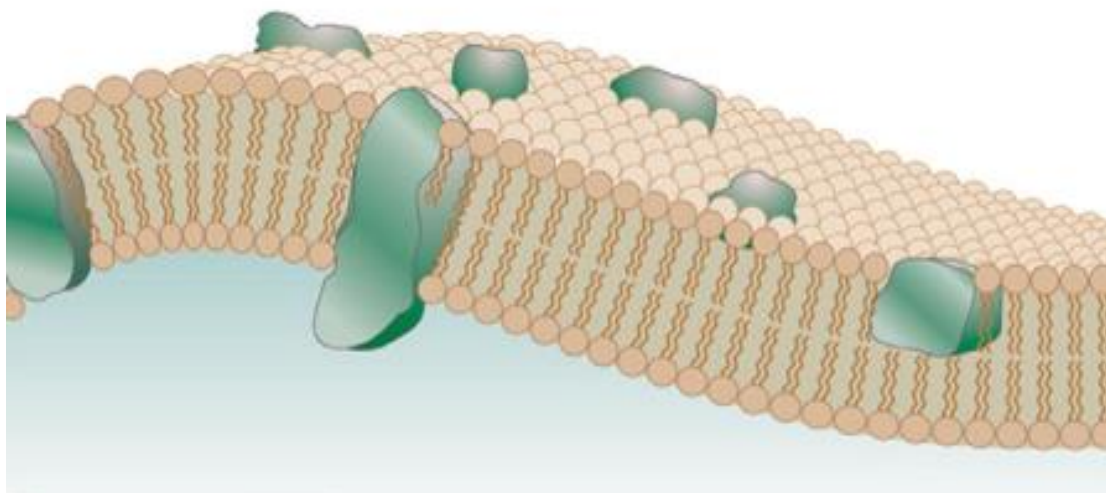


Figura 8. Representação esquemática da membrana segundo o modelo de Singer-Nicholson, retirado de [52]

A bicamada lipídica faz com que haja distintas regiões na fronteira da célula. O interior da bicamada é formado pelas caudas hidrofóbicas dos lipídios, o que faz com que não haja moléculas de água no interior da bicamada. A região externa da bicamada, tanto para o meio extracelular, quanto para o meio intracelular, é composta por uma região de gradiente da constante dielétrica que parte de um baixo valor na membrana até o valor da constante dielétrica da água (ou do meio plasmático) [52,53].

Por ser a membrana celular a principal responsável pela interação das células com o meio exterior, conhecer como estas moléculas interagem com a membrana celular e os seus componentes é de fundamental importância no estudo de fármacos e de compostos para aplicações biológicas.

Entretanto, sistemas vivos possuem grande complexidade e o estudo para avaliar a interação de compostos em organismos vivos é demasiado dificultoso para uma abordagem inicial. Assim, não é incomum o uso de modelos que simplifiquem os sistemas de modo a ser possível estudar, de forma mais simples, as interações e os efeitos que no meio biológico ocorrem simultaneamente.

Uma maneira de simplificar o estudo da interação de possíveis FS com a membrana plasmática é o uso de micelas de algum surfactante como forma de mimetizar a membrana celular. Micelas são agregados moleculares estáveis com conformação esférica e formadas a partir de moléculas anfifílicas [54].

Moléculas anfifílicas, ou surfactantes, possuem cabeça polar e uma calda apolar. Em contato com a água, ou meio polar, os surfactantes tendem a se agregar de modo a “blindar” a região apolar. Em baixas concentrações, os surfactantes formam pequenos grupos agregados. Ao atingir a concentração conhecida como Concentração Micelar Crítica (CMC) o surfactante passa a formar agregados micelares (Figura 9).

É importante ressaltar que os agregados não são estáticos e que são comuns as trocas de surfactantes dos agregados com os monômeros presentes no meio.

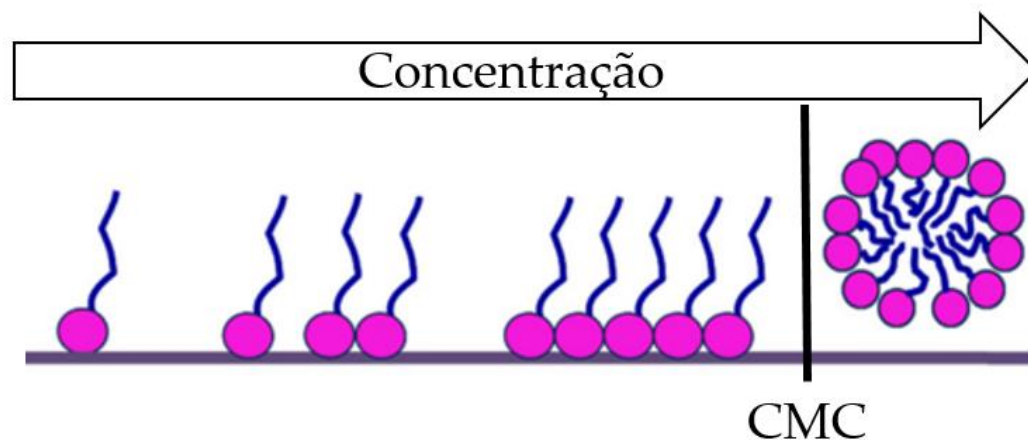


Figura 9. Representação esquemática da formação de micelas, adaptado de [53].

As micelas, assim como as bicamadas lipídicas presente nas membranas celulares, possuem três regiões dielétricas distintas: (1) o meio interno, altamente hidrofóbico, que possui baixa constante dielétrica; (2) um gradiente de transição próximo a superfície polar voltada para o meio externo e (3) o meio externo em si. Estas características fazem com que seja possível o estudo da interação de pequenas moléculas com o meio que possui diferentes constante dielétricas, uma superfície polar e um meio hidrofóbico, semelhante ao ambiente apresentado na membrana celular.

1.8. Albumina do Soro Bovino como Proteína Modelo

A Albumina é uma importante proteína presente no plasma sanguíneo de animais e é responsável por carrear pela corrente sanguínea diferentes tipos de compostos que estão presentes, naturalmente ou que surjam no organismo [41]. Ainda, existem publicações que apontam que as albuminas possuem elevada afinidade por tecidos tumorais malignos [55,56].

Por ser uma proteína muito abundante no corpo humano e ter grande influência na distribuição de moléculas farmacológicas, o estudo da interação entre a referida molécula e possíveis agentes terapêuticos é de fundamental importância.

A Albumina do Soro Bovino (ASB) possui estrutura similar à Albumina do Soro Humano (ASH), porém o custo de sua produção é muito menor, sendo um modelo importante e muito utilizado para estudos prévios. A ASB tem peso molecular de 66,5 kg/mol e apresenta em sua estrutura dois resíduos de Triptofano, o que garante emissão fluorescente ao ser excitada. O seu pico de absorção óptica é em $\lambda = 279 \text{ nm}$ ($\epsilon_{279 \text{ nm}} = 4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e de emissão é em 346 nm. Importante ressaltar que em água, à temperatura de 25°C, o ponto isoelétrico da ASB é em pH = 4,7, de maneira que em pH 7,0 a proteína se encontra negativamente carregada [57].

1.9. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi investigar a interação das porfirinas *meso*-tetrasulfatofenil (TPPS₄), aniônica, e *meso*-tetrametil piridil (TMPyP), catiônica, com o PQ formado pelo núcleo CdTe e funcionalizado com ácido 3-mercaptopropiônico (3-MPA), em meio aquoso, na presença e na ausência de sistemas nano-organizados que mimetizem estruturas biológicas, a saber: a proteína ASB e os seguintes surfactantes: N-hexadecil-N,N, dimetil-3-3amônio-1-propano sulfonato (HPS), zwitteriônico; dodecil sulfato de sódio (SDS), aniônico; brometo de cetil trimetil amônio (CTAB), catiônico; e 4-(1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol (Triton X-100), neutro, em diferentes concentrações, utilizando técnicas espectroscópicas UV-Vis a fim de averiguar a influência causada pela presença das nanoestruturas na interação entre PQ e porfirina. O alvo deste estudo foi avaliar as perspectivas de usar os complexos “porfirina...PQ” na fotobiologia e fotomedicina, principalmente na TFD e no DF.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Objetos do Estudo

2.1.1. Porfirinas

As porfirinas alvo do estudo desta tese são as sintéticas e solúveis em água *meso*-tetrametil piridil (TMPyP) e a *meso*-tetrasulfatofenil (TPPS₄) as quais as estruturas estão apresentadas na Figura 10.

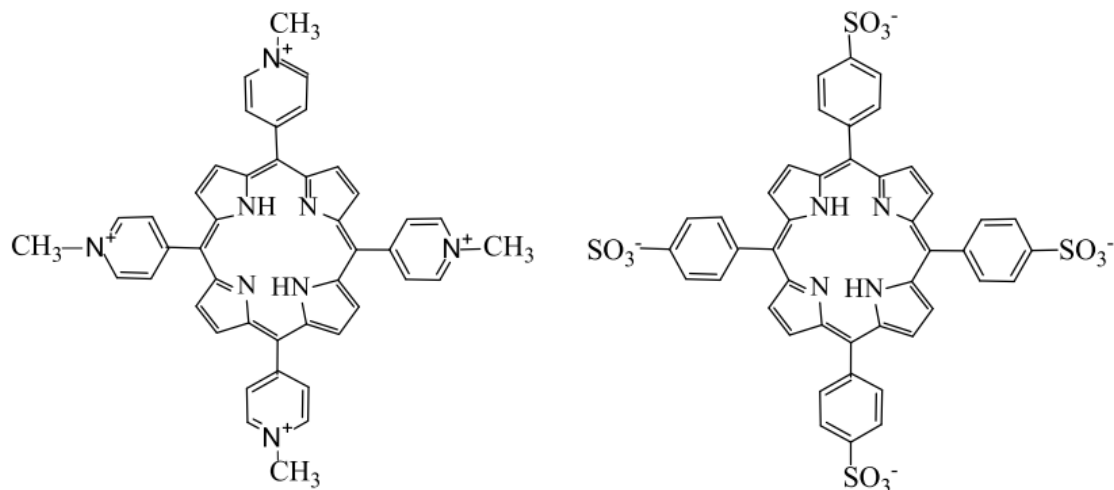


Figura 10. Estrutura molecular das porfirinas TMPyP (esquerda) e TPPS₄ (direita)

A porfirina TMPyP possui quatro grupos metilpiridil colaterais (Figura 10 - esquerda). De pH 2,0 até pH 11,0, carga líquida dessa porfirina é +4 e dentro deste range não são observadas alterações nas suas características espectroscópicas. Em soluções aquosas, o pico de absorção ótica mais intenso se localiza em $\lambda = 422$ nm (banda de Soret) e o máximo de emissão fluorescente em $\lambda = 665$ nm (Figura 11a). O decaimento temporal da fluorescência apresenta curva de decaimento monoexponencial com tempo de vida médio de $\tau = 4,8$ ns (Figura 11b).

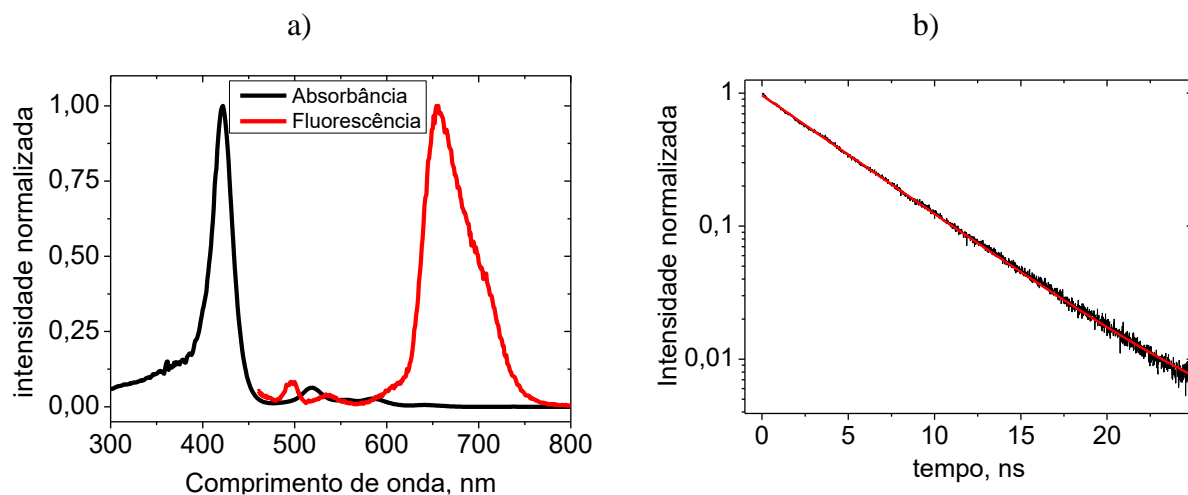


Figura 11. a) Espectros normalizados de absorção ótica (linha preta) e de fluorescência (linha vermelha) de uma solução aquosa de TMPyP e b) curva de decaimento temporal da intensidade da fluorescência da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TMPyP.

A porfirina TPPS₄ possui quatro grupos colaterais sulfonato (Figura 10 - direita) carregados negativamente. O ponto de pKa dessa porfirina é em pH 4,8 de forma que em meio de pH maiores a porfirina se encontra em sua forma desprotonada, com carga líquida -4, e em meio de pH menores que 4,8 a porfirina está em sua forma biprotonada, com carga líquida -2. Isso implica que as características espectroscópicas da TPPS₄ dependem fortemente do pH (Figura 12a,b). Em pH 4,0 (forma biprotonada) o pico de absorção encontra-se em 435 nm, o de fluorescência em 665 nm e o tempo de vida médio do decaimento temporal da fluorescência é de $(4,1 \pm 0,1)$ ns. Em pH 7,0 (forma desprotonada) a porfirina apresenta pico de absorção em 411 nm, pico de emissão em 642 nm e tempo de vida médio do decaimento temporal da fluorescência de $(9,6 \pm 0,1)$ ns.

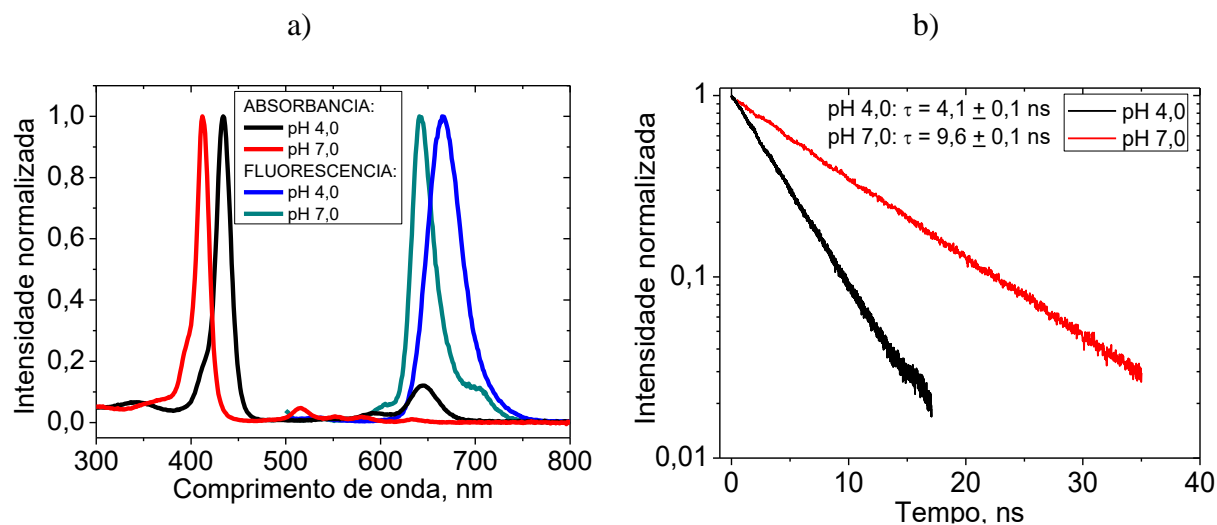


Figura 12. a) Espectros de absorção ótica e de fluorescência normalizados de uma solução aquosa de TPPS₄ em pH 4,0 e 7,0 e b) Decaimentos temporais normalizados da intensidade de fluorescência da porfirina TPPS₄ com os respectivos tempos de vida em pH 4,0 e 7,0

Ambas as porfirinas utilizadas neste trabalho foram obtidas da empresa *Midcentury Chemicals* e utilizadas sem nenhum processo de purificação adicional. As soluções estoques foram preparadas em água mili-Q enquanto as amostras experimentais foram todas preparadas em tampão fosfato de pH 6,8 inicial e força iônica 7,5 mM.

2.1.2. Pontos Quânticos

O PQ utilizado neste trabalho foi o CdTe-3-MPA. Este PQ possui um núcleo formado com de Telureto de Cádmio (CdTe) e não apresenta casca (*shell*). A superfície do PQ foi funcionalizada utilizando o ácido 3-Mercaptopropiônico (3-MPA) como agente encapsulador para torna-lo solúvel em água (Figura 13).

Os PQs de CdTe são estudados há algum tempo em aplicações biológicas [35,58,59].

Alguns estudos tem demonstrado a toxicidade do PQ de CdTe *in vitro* e *in vivo*, porém algumas soluções que contribuem para a diminuição do toxicidade do nanosemicondutor foram apresentadas, como por exemplo a funcionalização e a diminuição da dose aplicada [60,61].

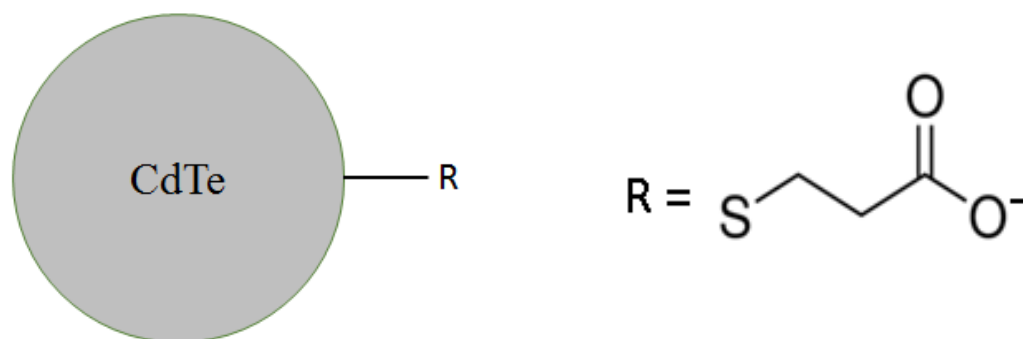


Figura 13. Representação esquemática simplificada do CdTe (direita) e estrutura química do ácido 3-Mercaptopropiônico, retirado de [32].

Os PQs utilizados neste trabalho foram integralmente fornecidos pelo Grupo de Bioatividade de Compostos de Coordenação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, produzidos pelo Dr. Leandro N. C. Máximo sob a supervisão do Prof. Dr. Roberto Santana da Silva. Os métodos de síntese utilizados para a produção das nanopartículas se encontram descritos em [32,62,63].

As principais características estruturais do PQ de CdTe-3-MPA como o diâmetro médio das partículas e as principais características espectroscópicas, bem como os efeitos do pH nessas características estão descritos na Seção 3.1.2 desta Tese.

2.1.3. Modelos Biomiméticos

A proteína ASB utilizada como modelo de proteína nos estudos foi adquirida da *Sigma Aldrich*. A solução estoque de ASB foi preparada em água mili-Q com pH 6,8 e temperatura ambiente. A proteína foi utilizada sem qualquer processo de purificação adicional. A concentração da solução estoque de ASB foi determinada através de análises no espectrofotômetro, em $\lambda = 279$ nm, utilizando o coeficiente de absorção molar $\epsilon = 4,38 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Como modelos miméticos de membranas foram utilizadas micelas formadas a partir de quatro surfactantes diferentes. Além do estudo do efeito das micelas formadas, foi estudada a interação do surfactante com os sistemas porfirina, PQ e porfirina...PQ.

Os surfactantes utilizados foram: N-hexadecil-N,N, dimetil-3-3amônio-1-propano sulfonato (HPS); dodecil sulfato de sódio (SDS); brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e 4-1,1,3,3-tetrametilbutilfenil-polietileno glicol (Triton X-100), todos adquiridos da *Sigma Chemical*

Co. As soluções estoques foram preparadas em água mili-Q, pH 6,8 e temperatura ambiente. A estrutura química dos surfactantes utilizados neste trabalho estão apresentadas na Figura 14.

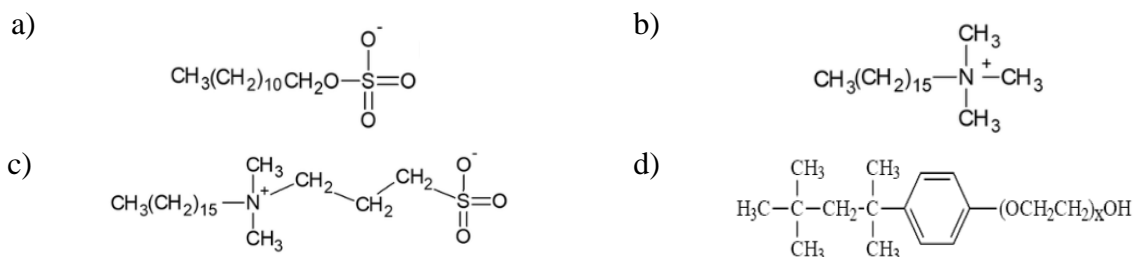


Figura 14. Estrutura química dos surfactantes a) SDS, b) CTAB, c) HPS e d) Triton X-100 em meio aquoso.

2.2. Técnicas Experimentais

2.2.1. Espectroscopia de absorção ótica

A espectroscopia de absorção ótica é uma técnica espectroscópica utilizada para determinar o perfil do espectro de absorção de uma amostra. Os princípios do método de análise de absorção ótica são bem conhecidos e estão baseados na Lei Beer-Lambert – equação (22) [49,50].

$$A(\lambda) = \log \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} = \varepsilon(\lambda)lC \quad (22)$$

Em que $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar para aquela molécula no comprimento de onda λ , l é o caminho ótico e C é a concentração da amostra.

Neste trabalho foram utilizados os espectrofotômetros *Beckman Coulter 640 DU* e *Ultraspec 2100 pro*.

2.2.2. Flash-Fotólise

Além dos compostos estáveis, também estudamos as características espectroscópicas e temporais de transientes com tempo de vida curto tais como os estados tripleto das porfirinas e dos seus complexos com PQ. Para esta pesquisa utilizamos a técnica de *flash-fotólise*.

A técnica de *flash-fotólise* consiste em excitar a amostra com um curto pulso luminoso que irá popular o estado excitado da molécula. Esta excitação irá gerar uma mudança no perfil de absorção da amostra e esta mudança será detectada utilizando uma fonte de luz contínua, um

monocromador e um detector (fotomultiplicadora) que irão registrar as mudanças na absorção em função do tempo decorrido após o pulso luminoso (Figura 15).

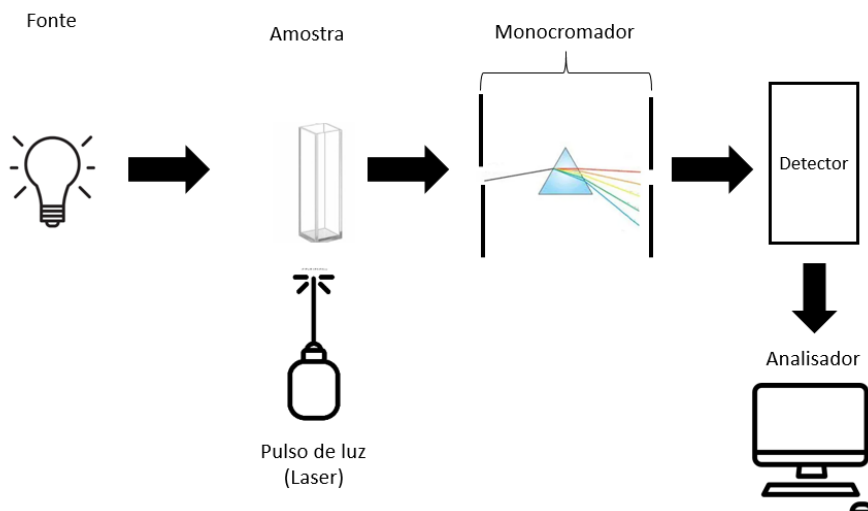


Figura 15. Representação esquemática simplificada de um equipamento de flash-fotólise.

A diferença entre a absorbância antes ($A_1(\lambda)$) e depois ($A_2(\lambda)$) do pulso luminoso fornece a absorção do estado transiente $\Delta A(\lambda)$ de forma que:

$$\Delta A(\lambda) = A_1(\lambda) - A_2(\lambda) = (\varepsilon_1(\lambda) - \varepsilon_2(\lambda))C_{transiente} \quad (23)$$

Em que $\varepsilon_1(\lambda)$ e $\varepsilon_2(\lambda)$ são os coeficientes de absorção molar do estado fundamental e do estado excitado respectivamente. Como os coeficientes de absorção molar são constantes ao longo do tempo a absorbância do transiente depende apenas da concentração do estado excitado, que varia com o tempo, sendo possível observar o tempo de vida e decaimento da espécie transiente.

Para a excitação das amostras foi utilizado um pulso de $\lambda = 532$ nm, com 5 ns de duração e 25 mJ de energia obtido a partir do segundo harmônico de um laser de Nd:Yag da *Quantel*. Os espectros foram monitorados na região dos 400 nm até 800 nm utilizando uma lâmpada de Xenônio a 75 W, um monocromador da *Scientech Inc.*, modelo 9030, e uma fotomultiplicadora *Hamamatsu R928* para a detecção.

2.2.3. Espectroscopia estática de luminescência

A luminescência emitida das moléculas a partir dos seus estados eletrônicos excitados pode ser dividida em dois tipos: fluorescência e fosforescência [49]. O primeiro deles é a emissão de um fóton pela molécula que ocorre devido ao retorno da molécula do estado excitado singleto para o seu estado fundamental e possui tempo de vida da ordem de nanosegundos. O segundo é a emissão de luz a partir do retorno do elétron do estado excitado tripleto para o estado fundamental e apresenta tempo de vida da ordem de milisegundos.

O espectro de fluorescência estático é a obtenção da intensidade luminescente emitida por uma amostra para cada comprimento de onda após a excitação da amostra e é obtido por um fluorímetro. Nesta técnica, é utilizado uma fonte de luz branca que atravessa um monocromador em que é escolhido um comprimento de onda de excitação. A detecção é feita em um ângulo de 90° para evitar efeitos de espalhamento. A luz emitida pela amostra passa por outro monocromador e é detectada por sensores e registrada – vide Figura 16. Este processo é feito fixando-se o comprimento de onda da luz de excitação e promovendo a varredura espectral pelo detector ao longo do espectro luminoso.

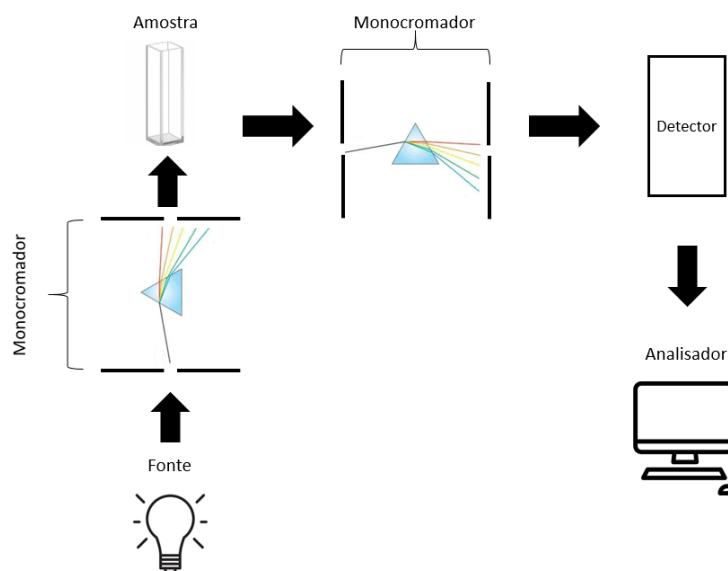


Figura 16. Representação esquemática simplificada de um fluorímetro.

Neste trabalho os espectros de fluorescência estáticos foram obtidos através de um aparelho espectrômetro *Hitachi 7000*.

2.2.4. Espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo

A técnica de fluorescência com resolução temporal vem cobrir a lacuna deixada pelas técnicas estáticas convencionais no estudo da evolução temporal dos estados excitados. Inicialmente, um curto pulso de luz é incidido sobre a amostra fazendo com que várias moléculas na solução vão ao estado excitado. Estas moléculas, no estado excitado, podem retornar ao estado fundamental por meio da emissão de um fóton – processos radiativos – ou através de processos não radiativos, conforme já detalhado no Diagrama de Jablonski (Figura 2). O detector é posicionado com um ângulo de 90° em relação a fonte de excitação e irá detectar a intensidade de emissão da luz pela amostra em função do tempo após o término do pulso de luz.

O decaimento temporal mais comum para emissões de fluoróforos é o monoexponencial. Neste caso a intensidade de fluorescência $I(t)$ varia com o tempo da seguinte forma:

$$I(t) = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (24)$$

Em que I_0 é a intensidade de emissão imediatamente após o pulso de luz de excitação e τ é o tempo de vida médio de fluorescência de todos os fluoróforos do mesmo tipo [49].

Quando mais de um fluoróforo está presente na amostra, o decaimento apresenta um conjunto de decaimentos exponenciais. Cada um com seu próprio tempo de vida. Os fatores pré-exponenciais (amplitudes das componentes monoexponenciais) informam a contribuição do fluoróforo para a intensidade de emissão total da amostra.

A técnica utilizada para realização das medidas de fluorescência com resolução temporal foi a “contagem de fótons únicos em correlação com o tempo” (do inglês, *Time-Correlated Single Photon Counting* – TCSPC).

Em síntese, a técnica TCSPC consiste no uso de um pulso rápido de laser o qual é dividido por um semi-espelho em dois feixes. Um dos feixes incidirá sobre uma fotomultiplicadora e o outro incidirá diretamente sobre a amostra. O feixe incidido sobre a fotomultiplicadora dispara uma rampa de tensão linear com o tempo. Ao detectar o primeiro fóton emitido pela amostra em uma segunda fotomultiplicadora a rampa linear de tensão para e é registrado a tensão no momento da detecção em um dos canais do analisador de amplitudes. Cada canal está relacionado a uma tensão

e conseqüentemente a um intervalo de tempo. Ao fim, os dados são colocados em um histograma que irá refletir o perfil de decaimento temporal da amostra [49,50]. Um esquema simplificado do equipamento utilizado nesta técnica está apresentado na Figura 17 abaixo.

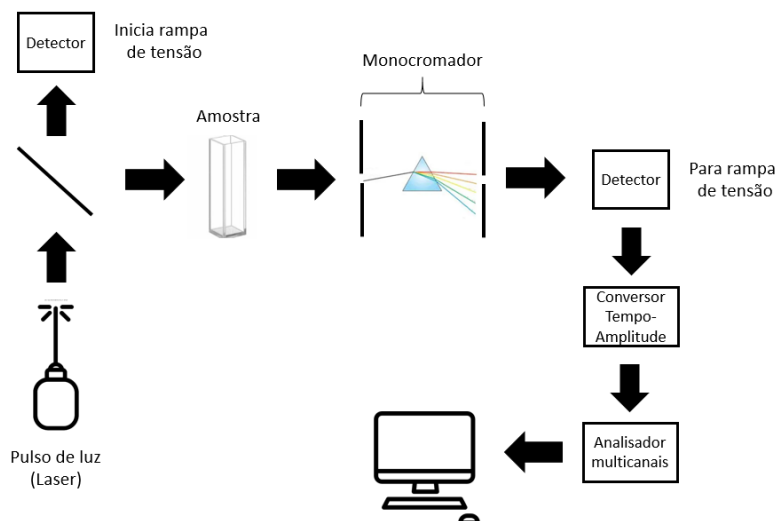


Figura 17. Esquema simplificado de um fluorímetro com resolução temporal do tipo TCSPC.

Para a realização dos experimentos com a técnica TCSPC foi utilizado como fonte de excitação o laser de Titânio-Safira *Tsunami* 3950 bombeado pelo laser de estado sólido *Millena Xs* ambos os aparelhos fabricados pela *Spectra Physics*. Os pulsos utilizados continham 5 ps de largura à meia altura e 8,0 MHz de frequência de repetição e foram controlados por um selecionador de pulso *pulse picker* 3980 também fornecido pela *Spectra Physics*. As medidas foram feitas utilizando o espectrômetro L9000 da *Edinburgh* em um ajuste em “L” em relação à fonte. Para a detecção utilizou-se a fotomultiplicadora *Hamamatsu R3809U*. O tempo médio de resposta do aparato experimental foi de 100 ps.

2.2.5. Espalhamento ressonante da luz

Quando a luz incidente está próximo da região espectral de absorção ótica do sistema, a intensidade de luz espalhada por ele cresce drasticamente (efeito de espalhamento ressonante da luz [64]). Este espalhamento é maior para partículas espalhadoras maiores. Desta forma, o espalhamento ressonante da luz é uma técnica capaz de fornecer informações qualitativas sobre a formação de agregados e complexos [64,65].

Os espectros de espalhamento ressonante da luz foram monitorados através do espectrômetro *Hitachi* FL4500, o qual o esquema simplificado está mostrado na Figura 16. Para as medidas efetuadas neste trabalho, foram utilizados, de modo sincronizados, os monocromadores de excitação e de emissão de modo que foi realizada uma varredura da região de 200 nm até 700 nm para cada amostra analisada.

2.3. Metodologia Experimental

Todas as amostras foram preparadas em tampão fosfato com força iônica 7,5 mM e pH 6,8 preparado a partir da diluição de 2,5 mM de NaH_2PO_4 e de 5,0 mM de NaHPO_2 em água mili-Q. As medidas que envolviam mudança de pH foram realizadas utilizando o mesmo tampão fosfato e para alterar o pH foram utilizadas soluções de HCl e de NaOH.

As soluções estoques de TMPyP, TPPS₄, CdTe-3-MPA, ASB, SDS, HPS, CTAB e Triton X-100 foram preparadas em água mili-Q.

O estudo do efeito do pH na solução de PQ foi feito conforme descrito em Seção própria (vide Seção 3.1.1).

Os experimentos envolvendo TMPyP foram feitos em pH 6,8 e realizados em três etapas distintas. Inicialmente, estudou-se a interação da TMPyP com o PQ. Isto foi feito de duas formas distintas: primeiro monitorou-se as mudanças espectrais de uma solução de TMPyP titulada com uma solução de CdTe-3-MPA e em seguida avaliou-se as características espectrais da solução em que se fixou uma concentração de CdTe-3-MPA e esta solução foi titulada com TMPyP. Estudou-se também as mudanças nos estados transientes e o espalhamento ressonante da luz desse sistema.

O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado no estudo da interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA, com a diferença que, neste caso, os experimentos foram feitos em pH 4,0 e 7,0.

A interação do PQ com a ASB foi avaliada fixando uma concentração de PQ e titulando esta solução com ASB enquanto eram monitoradas as características espectrais da solução.

Os estudos envolvendo as porfirinas consistiu no preparo de uma solução contendo concentração fixa de porfirina e de ASB e esta solução foi titulada com PQ em que os espectros de absorção e de fluorescência eram monitorados. Em seguida a amostra foi preparada fixando a

concentração de PQ e de porfirina e a solução foi titulada com ASB. O mesmo procedimento foi utilizado com a porfirina TMPyP e com a porfirina TPPS₄ em pH 4,0 e 7,0.

Por fim, os estudos com os surfactantes seguiram a mesma metodologia acima descrita para todos os surfactantes e as duas porfirinas. Fixou-se uma concentração de porfirina e de surfactante e a solução foi titulada com PQ enquanto as mudanças espectrais eram monitoradas. Em seguida, preparou-se uma solução contendo porfirina e PQ e titulou-se com surfactante. O procedimento se repetiu para TMPyP e para TPPS₄, esta última em pH 4,0 e 7,0.

Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente de (24 ± 1) °C.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Caracterização dos Pontos Quânticos

3.1.1. Efeito do pH nos espectros de absorção ótica dos PQs de CdTe-3-MPA

O estudo do efeito do pH nas características espectroscópicas do PQ de CdTe-3-MPA foi realizado em solução tampão fosfato com pH inicial de 6,8. Utilizando-se de alíquotas de HCl e de NaOH para diminuir ou aumentar o pH da solução. Essa variação foi monitorada com o auxílio de um pHmetro. As medidas espectrais foram realizadas no intervalo entre pH 2,0 e pH 9,0.

O experimento foi realizado em diversas concentrações de PQ para que fosse avaliada a influência da concentração na protonação e desprotonação do CdTe-3-MPA. Os resultados estão mostrados na Figura 18a e b.

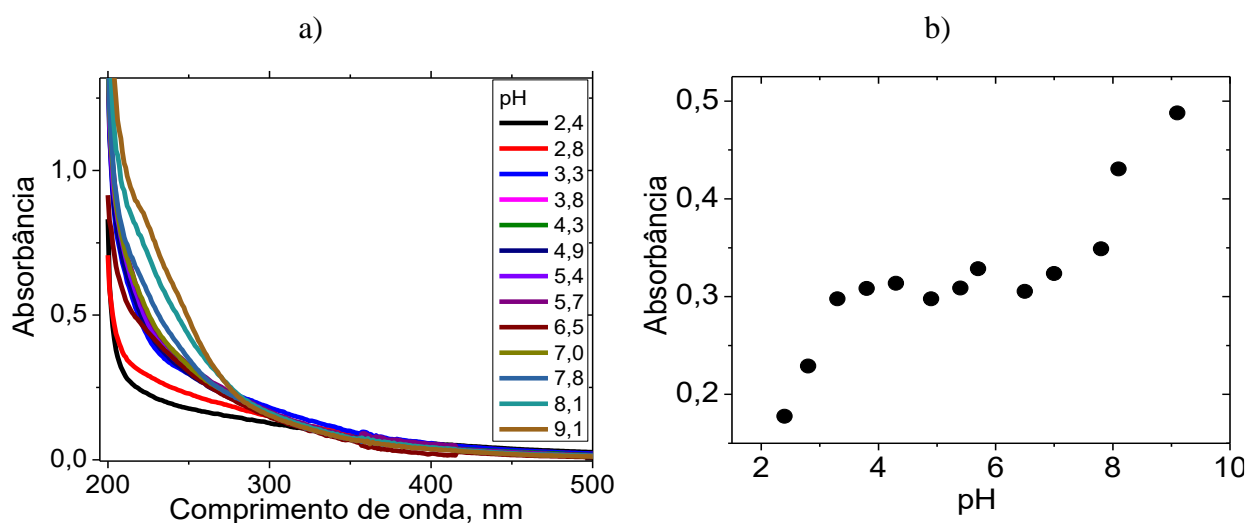


Figura 18. a) Espectros de absorção ótica da solução de 100 nM de CdTe-3-MPA em diferentes pHs e b) Absorbância em função do pH em $\lambda = 225$ nm.

Analisando os valores da absorbância do PQ em $\lambda = 255$ nm (Figura 18b), percebe-se que há um aumento linear da absorção ótica quando o pH varia de 2,0 até 4,0. De acordo com [66] esta mudança está associada com a desprotonação do grupo funcional 3-MPA do PQ que, para valores de pH baixos, encontram-se na forma protonada e apresenta carga total nula. Baseando-se nos dados da Figura 18b podemos considerar o ponto de pKa em $\text{pH} < 4,0$. Entretanto, de acordo com [67] o ponto de pKa do grupo 3-MPA é em $\text{pH} 4,34$. A diferença observada está, provavelmente, associada ao efeito do núcleo de CdTe nas características do grupo funcional.

Prosseguindo na análise da Figura 18b, observa-se um platô no pico de absorção ótica entre os pHs 4,0 e 7,5.

Em pH 7,5 o grupo OH da molécula de MPA tende a sofrer desprotonação causando maior aumento na intensidade da absorção ótica da solução de PQ.

Os dados apresentados garantem que no intervalo de pH 4,0 até 7,5, os quais todos os experimentos foram realizados, o estado de protonação do Cde-3-MPA é constante.

3.1.2. Características espectrais e estruturais dos PQs de CdTe-3-MPA

Os estudos das características do PQ de CdTe-3-MPA foram realizados em pH 6,8.

O diâmetro médio (D) e o coeficiente de absorção molar (ϵ) foram obtidos através do cálculo empírico (equações (x) e (y)) que utiliza do comprimento de onda do pico de absorção ótica característico do PQ (λ) [68].

$$D = (9,8127 \times 10^{-7})\lambda^3 - (1,7147 \times 10^{-3})\lambda^2 + (1,0064)\lambda - 194,84 \quad (25)$$

$$\epsilon = 10043 \times D^{2,12} \quad (26)$$

Os espectros de absorção ótica e de luminescência normalizados do PQ de Cde-3-MPA estão mostrados na Figura 19.

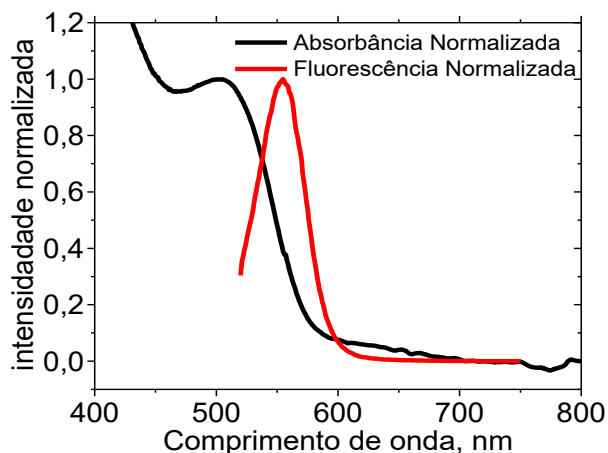


Figura 19. Espectros normalizados de absorção ótica e de luminescência do PQ de CdTe-3-MPA.

Observa-se que o pico de absorção ótica se encontra em $\lambda = 505$ nm. Assim, utilizando as equações (25) e (26) o diâmetro médio das partículas é $D = 2,5$ nm e o coeficiente de absorção molar é $\varepsilon = 7,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Os valores encontrados pelas equações (25) e (26) de D e de ε foram utilizados para a determinação, de maneira indireta, da concentração do PQ nas soluções utilizadas nos experimentos.

O espectro de emissão do CdTe-3-MPA abrange desde os comprimentos de onda entre 500 nm e 600 nm com pico de emissão em 555 nm (Figura 19).

Analisando o decaimento temporal da intensidade de luminescência do CdTe-3-MPA foi obtida curva biexponencial apresentada na Figura 20.

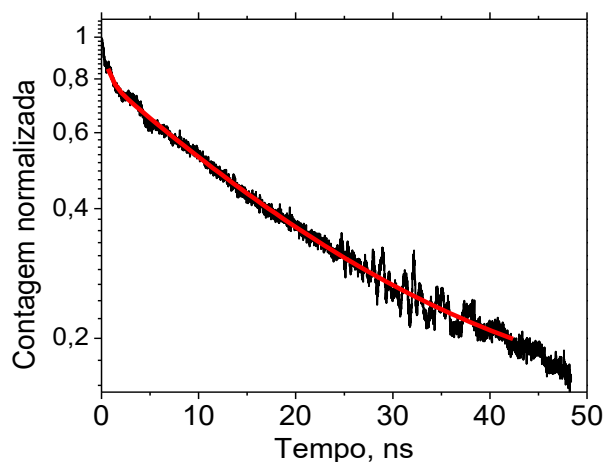


Figura 20. Decaimento da intensidade normalizada do PQ de Cde-3-MPA em função do tempo com $\lambda_{exc} = 500$ nm e $\lambda_{em} = 600$ nm.

Foi realizado o ajuste do decaimento da luminescência do PQ conforme a equação (27):

$$I = I_1 e^{-t/\tau_1} + I_2 e^{-t/\tau_2} \quad (27)$$

Em que I é a intensidade de luminescência, $I_1 = (0,20 \pm 0,01)$ e $I_2 = (0,80 \pm 0,01)$ são as amplitudes das componentes e $\tau_1 = (0,63 \pm 0,02)$ ns e $\tau_2 = (18,8 \pm 0,1)$ ns são os tempos de vida das respectivas componentes.

A existência de diversas componentes de decaimento da luminescência do PQ está associada à presença de diversos elementos estruturais da nanopartícula, tais como: o núcleo e a camada de funcionalização.

O tempo de vida mais curto está associado com a aniquilação do par elétron-buraco no interior do núcleo da nanopartícula e o tempo de vida mais longo é devido à aniquilação do par elétron-buraco na camada de funcionalização [69,70]. O tempo de vida τ_1 é associado ao núcleo do PQ enquanto que o tempo τ_2 é associado a sua camada de funcionalização.

3.2. Interação entre a porfirina TMPyP e CdTe-3-MPA

3.2.1. Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA

Os resultados envolvendo a interação entre TMPyP e o PQ de CdTe-3-MPA que serão apresentados a seguir se encontram publicados em [32] e foram obtidos durante o trabalho de mestrado [71]. Estes resultados foram aqui inseridos para complementar os dados obtidos durante o desenvolvimento do trabalho de doutorado e auxiliar na compreensão e no desenvolvimento lógico do trabalho visto ser este a continuação daquele.

A adição de CdTe-3-MPA na solução de TMPyP provoca mudanças significativas nos espectros de absorção ótica e de fluorescência da porfirina (Figura 21a,b). A amplitude do pico de Soret da absorção ótica ($\lambda = 422$ nm) da solução de TMPyP tem sua intensidade reduzida conforme se aumenta a concentração do PQ no meio. Além disso, é possível notar o surgimento de uma nova banda de absorção em $\lambda = 455$ nm.

Outro ponto a se destacar é o aparecimento de um ponto isobéstico em $\lambda = 437$ nm, demonstrando que coexistem duas espécies em equilíbrio, sendo este equilíbrio entre a porfirina TMPyP em sua forma livre e uma nova espécie formada a partir da interação entre a porfirina e o PQ. A nova espécie é associada a formação do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA.

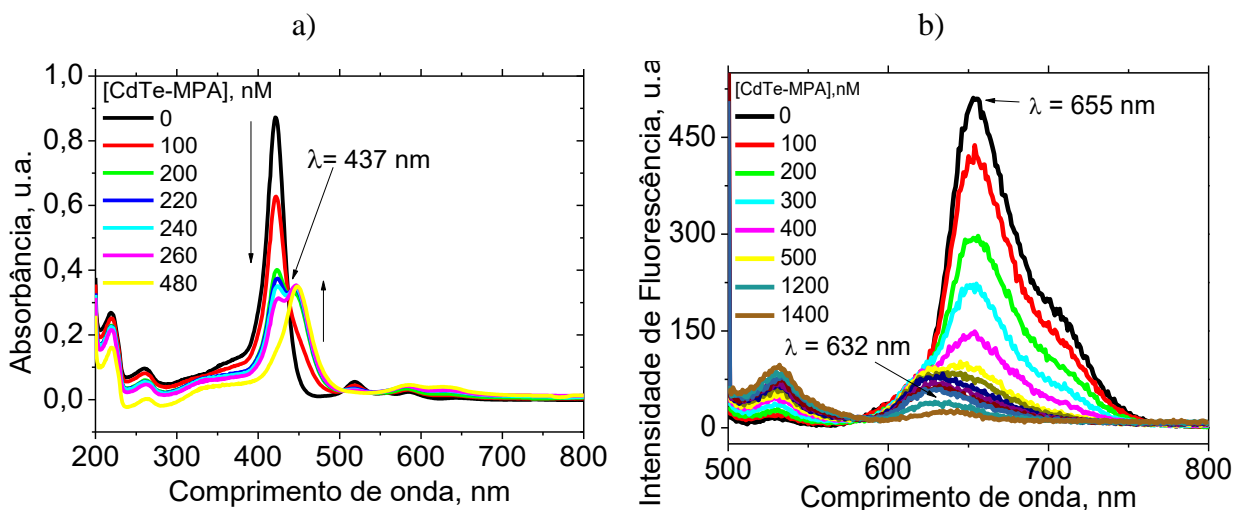


Figura 21. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência excitando em $\lambda_{exc} = 432$ nm da solução de $3,0 \mu\text{M}$ de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações CdTe-3-MPA [32].

Há na literatura trabalhos que demonstram a formação do complexo de transferência de carga envolvendo CdTe funcionalizado com ácido TGA, que tem carga negativa, e a porfirina TMPyP [35]. Os resultados mostrados na Figura 21a,b, juntamente com o já conhecido na literatura, além de toda a discussão já apresentada na Dissertação de Mestrado [71], permitem inferir que o pico de absorção surgido em 455 nm está associado à formação de um complexo de transferência de carga TMPyP...CdTe-3-MPA.

O espectro de fluorescência tem o pico de emissão deslocado de 655 nm para 632 nm e, além do deslocamento, há também a supressão da fluorescência, indicando que este novo pico de emissão atribuído a fluorescência do complexo possui menor intensidade de luminescência quando comparado ao PQ.

A constante de Stern-Volmer da supressão da fluorescência da TMPyP causada pela adição de PQ foi calculada a partir do ajuste da intensidade integral de fluorescência em função da concentração de CdTe-3-MPA utilizando a equação (6), Figura 22. Foi feito o uso da intensidade integral da fluorescência na análise dos experimentos para diminuir os erros experimentais.

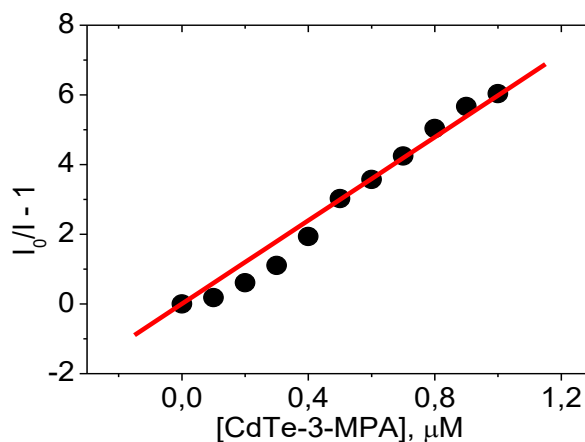


Figura 22. Ajuste da intensidade integral da fluorescência da TMPyP com adição de CdTe-3-MPA utilizando a equação de Stern-Volmer [32].

A constante de Stern-Volmer calculada foi $K_{SV} = (6,0 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Avaliou-se ainda o decaimento temporal da fluorescência da TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA (Figura 23).

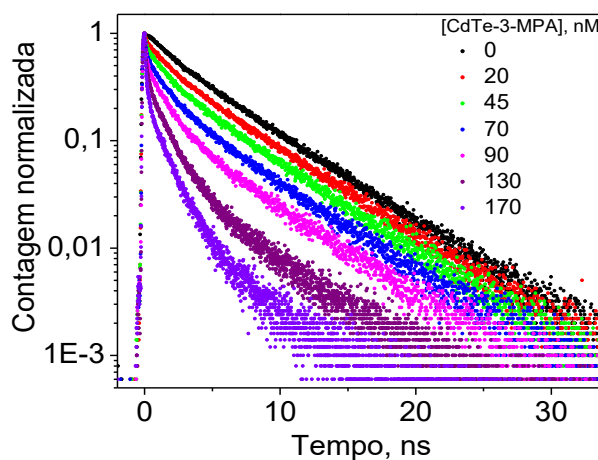


Figura 23. Decaimento temporal de fluorescência normalizado da solução de $3,0 \mu\text{M}$ de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA, $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$ [32].

Inicialmente, a curva obedece ao decaimento monoexponencial. A presença do PQ na solução a torna biexponencial.

Os tempos de vida das componentes de decaimento não apresentam dependência com a concentração de PQ no meio.

Os tempos de vida obtidos foram $\tau_1 = (5,3 \pm 0,2)$ ns e $\tau_2 = (1,6 \pm 0,2)$ ns. O tempo de vida τ_1 está associado com a TMPyP em sua forma pura, conforme já determinado em [72]. O tempo de vida τ_2 , por sua vez, não está associado a TMPyP e nem aos tempos de vida observados no decaimento do PQ de CdTe-3-MPA, apresentados na Seção 3.1.2. Desta forma, associa-se este tempo de vida ao complexo de transferência de carga TMPyP...CdTe-3-MPA, indicando que este possui características espectrais próprias.

Como os tempos de vida da fluorescência das soluções estudadas não dependem da concentração de PQ, para analisar as contribuições e os efeitos causados pela formação de complexo no perfil de emissão da amostra foi utilizada a razão entre os valores das amplitudes de cada componente em relação a soma das amplitudes das componentes, conforme equação (28):

$$R_i = \frac{I_i}{I_1 + I_2 + \dots + I_n}, i = 1, 2, \dots, n \quad (28)$$

Em que R_i é a contribuição da componente i , I_i é a amplitude da componente i e n é o número total de componentes.

Calculando todos os valores de R_1 e R_2 e comparando em função da concentração de PQ é possível notar que as componentes tem comportamentos opostos em relação à adição de CdTe-3-MPA (Figura 24). Isso reforça a ideia de que o aumento da concentração de PQ no meio consome a porfirina livre para formar o complexo TMPyP...CdTe-3-MPA. Outro ponto que reforça a ideia da formação do complexo é justamente o fato de que os tempos de vida das componentes temporais não sofreram modificações significantes com a adição do CdTe-3-MPA na solução, o que demonstra que a supressão da fluorescência observada na Figura 21a acontece de forma estática.

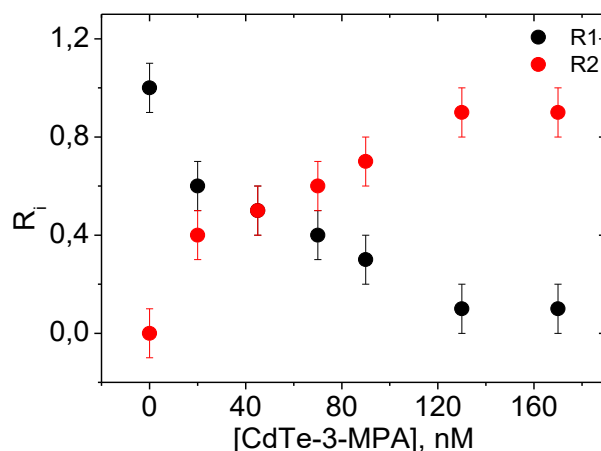


Figura 24. Contribuição da componente longa (1, preto) e da componente curta (2, vermelha) do decaimento da intensidade de luminescência da solução de 3,0 μM de TMPyP em função da concentração de CdTe-3-MPA [32].

Da mesma forma que a adição de CdTe-3-MPA na solução de TMPyP gera o surgimento de um novo pico de absorção, além da supressão da fluorescência, tem-se que quando se adiciona TMPyP à solução contendo CdTe-3-MPA é induzido a formação de um novo pico de absorção com pico em 455 nm, conforme observa-se na Figura 25a.

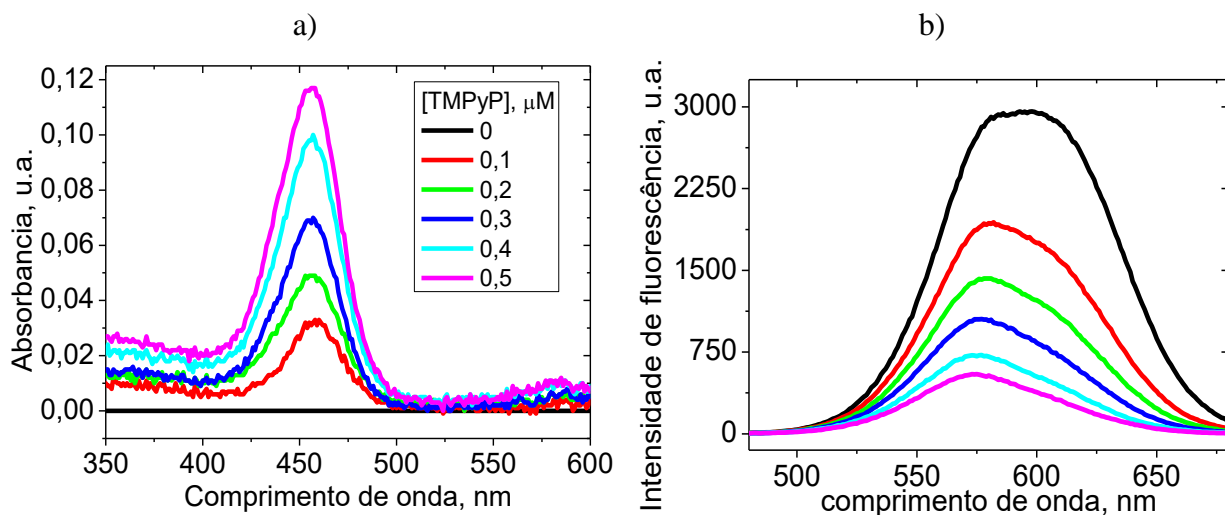


Figura 25. Espectros de a) absorção óptica de b) fluorescência da solução de 0,5 μM de CdTe-3-MPA em diferentes concentrações de TMPyP usando como linha base de absorção a solução de CdTe-3-MPA, $\lambda_{exc} = 490 \text{ nm}$ [32].

Na Figura 21a, o novo pico de absorção é observado em $\lambda = 455 \text{ nm}$. Este é exatamente o mesmo valor que está observado na Figura 25a. Essa coincidência indica que o pico observado na

Figura 25a também está associado a formação do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA, sendo este comprimento de onda ($\lambda = 455 \text{ nm}$) o pico de absorção do complexo.

A luminescência do sistema (Figura 25b) apresenta diminuição em sua intensidade com a adição da porfirina. Fazendo a razão entre a intensidade integral da luminescência na ausência de porfirina e a intensidade na presença de TMPyP, em função da concentração (Figura 26), é possível observar que não há relação linear entre essas grandezas, não sendo possível a aplicação da equação de Stern-Volmer (equação (6)).

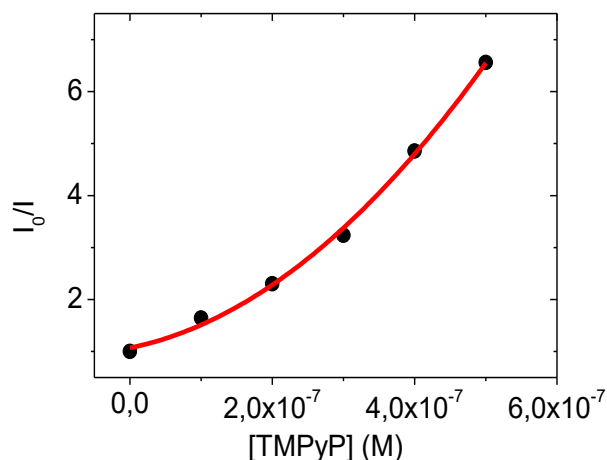


Figura 26. Razão entre a intensidade de fluorescência inicial do PQ na ausência de porfirina e na presença de diversas concentrações de TMPyP.

Nos casos em que a supressão da fluorescência não se lineariza é possível utilizar a equação de Stern-Volmer modificada, mostrada na equação (11).

Lembrando que f é a fração de fluoróforo acessível ao supressor, $[Q]$ é a concentração de supressor, K_{SV} é a constante de Stern-Volmer. Ajustando as intensidades obtidas na Figura 25b.

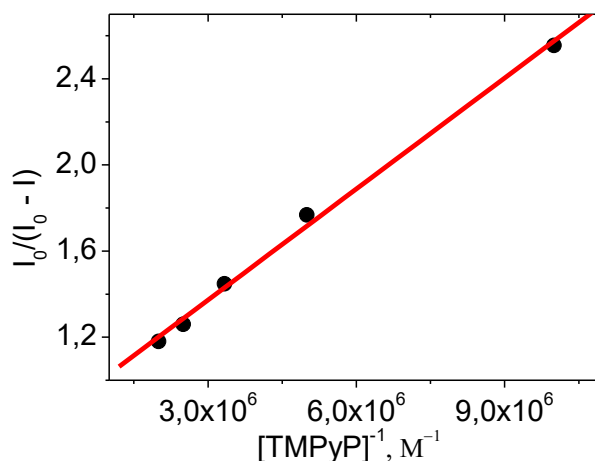


Figura 27. Ajuste da intensidade integral de fluorescência da solução de $0,5 \mu\text{M}$ de cdTe-3-MPA pelo inverso da concentração utilizando a equação de Stern-Volmer modificada (equação (11)) [32].

Os valores obtidos a partir do ajuste mostrado na Figura 27 foram de $f = 1,17 \pm 0,05$ e $K_{SV} = (5,0 \pm 0,3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Conforme discutido em [32,69,71,73], os valores de f comumente se encontram entre 0 e 1, porém existe a possibilidade do valor de f ser maior que 1. Isso ocorre quando há mais de um fluoróforo acessível para cada supressor. O valor de K_{SV} é compatível com o valor obtido para a taxa de formação de complexo calculada quando se adiciona PQ na solução de TMPyP.

Tanto a adição de CdTe-3-MPA na solução de TMPyP, quanto a adição de TMPyP na solução de CdTe-3-MPA causam aumento da intensidade do espalhamento ressonante das soluções analisadas (Figura 28). Isso indica que o tamanho das partículas que estão espalhando luz está aumentando, conforme se aumenta a concentração de PQ ou de porfirina no meio [64,65].

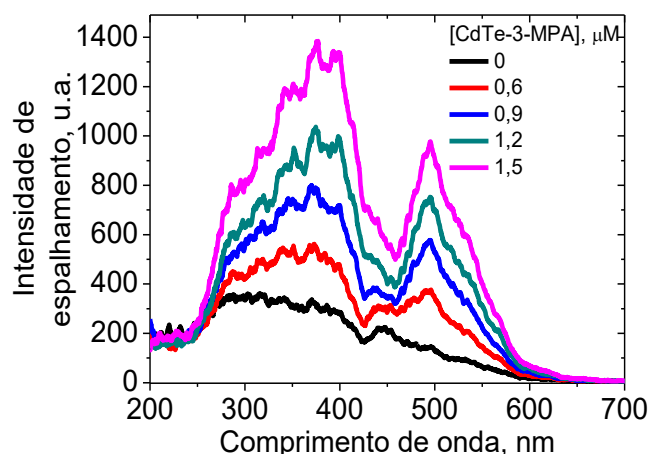


Figura 28. Espectros de espalhamento ressonante da luz da solução de $3,0 \mu\text{M}$ de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações do PQ de CdTe-3-MPA [32].

Os dados indicam que cada molécula de TMPyP está suprimindo a luminescência de diversas moléculas de PQ, formando o complexo. Porém, ao observar a curva obtida através do ajuste da intensidade integral de fluorescência utilizando a equação de Stern-Volmer modificada (Figura 27) é possível notar que o ajuste permanece linear, mesmo quando as concentrações de TMPyP são iguais ou muito maiores que as concentrações de CdTe-3-MPA. Esta linearidade indica que a suposição de que cada porfirina produz complexo com diversos PQs esteja incorreta. A nossa proposta é que está havendo a formação de um complexo envolvendo diversos PQs e moléculas de porfirinas através da formação de uma rede em que as porfirinas estão ligadas às moléculas funcionalizantes dos PQs. A Figura 29 apresenta um esquema simplificado de como seria o complexo do tipo rede formado entre as nanopartículas de CdTe-3-MPA e a porfirina TMPyP.

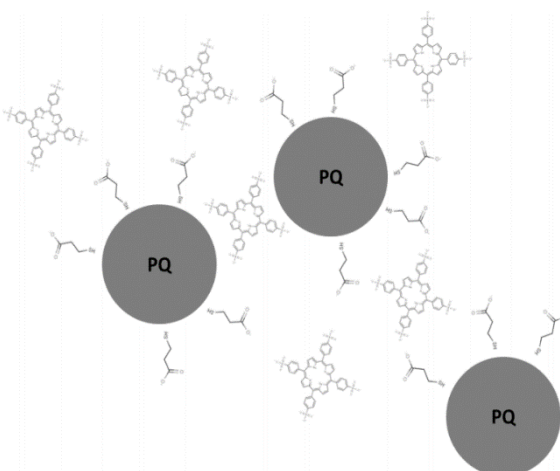


Figura 29. Esquema gráfico do complexo tipo rede formado entre PQs CdTe-3-MPA e moléculas da porfirina TMPyP [73].

É bem conhecido da literatura que ao se irradiar a solução de TMPyP com pulsos curtos de luz há a formação de estados excitados tripletos da molécula [43,72,74]. Estes estados tripletos da TMPyP possuem um espectro diferencial de absorção em relação ao espectro da porfirina em seu estado fundamental. Este espectro foi aferido utilizando a técnica conhecida como *flash-fotólise* (vide Seção 2.2.2) conforme visto na Figura 30a.

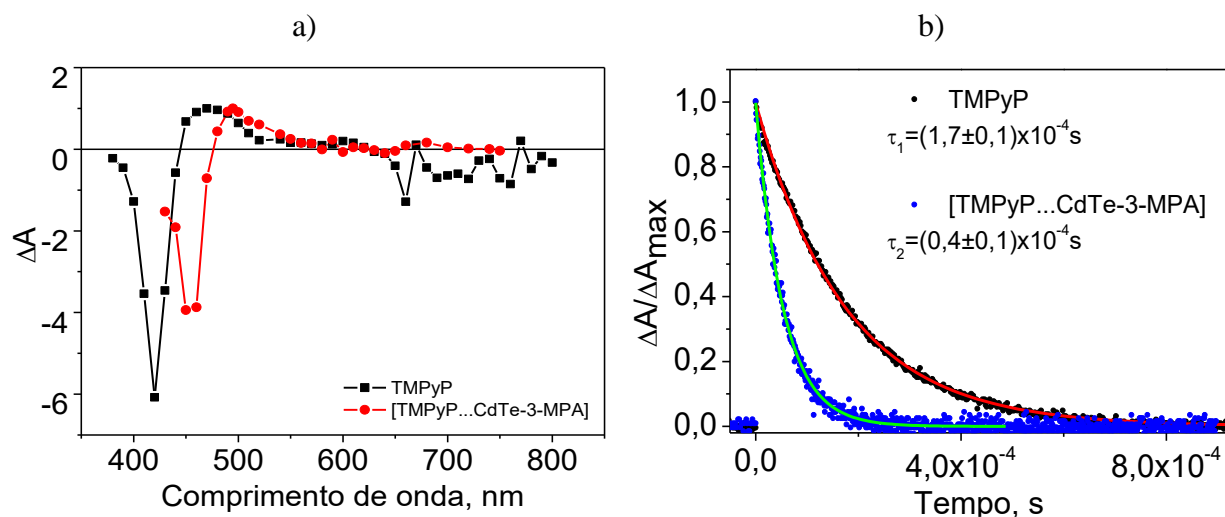


Figura 30. a) Espectro diferencial do estado tripleto da TMPyP (preto) e do estado excitado do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA (vermelho) e b) curvas de decaimento na ausência de oxigênio do estado tripleto da TMPyP e do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA em seu estado excitado [32].

Na Figura 30a é possível observar o espectro diferencial do estado excitado da porfirina TMPyP (linha preta) e o espectro diferencial de absorção do estado excitado da solução contendo 0,7 μM de TMPyP e 700 nM de CdTe-3-MPA.

A concentração de PQ utilizada é suficiente para garantir que toda a porfirina fora consumida e transformada em complexo TMPyP...CdTe-3-MPA.

Observa-se, ainda, que o espectro do diferencial da absorção do complexo é deslocado para o vermelho em relação ao espectro do diferencial da TMPyP.

O decaimento temporal do estado tripleto da TMPyP apresenta a forma monoexponencial ($f(t) = f_0 e^{-t/\tau}$) e, ajustando os dados da Figura 30b obtém-se o valor da constante de decaimento temporal $\tau_1 = (170 \pm 10) \mu\text{s}$. A presença do oxigênio molecular causa uma grande diminuição no tempo de vida do estado tripleto da porfirina. Isso acontece devido à transferência de energia entre a porfirina no estado excitado tripleto e o oxigênio molecular.

A constante de supressão bimolecular, k_q , do estado tripleto da porfirina em função da supressão causada pelo oxigênio molecular é determinada utilizando a equação (29).

$$k = k_0 + k_q [O_2] \quad (29)$$

Em que k_0 é a constante de decaimento do estado tripleto na ausência do oxigênio molecular, k é a constante de decaimento do estado tripleto na presença de oxigênio e $[O_2]$ é a concentração de oxigênio. O valor calculado $k_{q1} = (2,2 \pm 0,2) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Figura 31) é muito próximo ao valor característico para o processo ocorrendo na água que está controlado pela difusão [43].

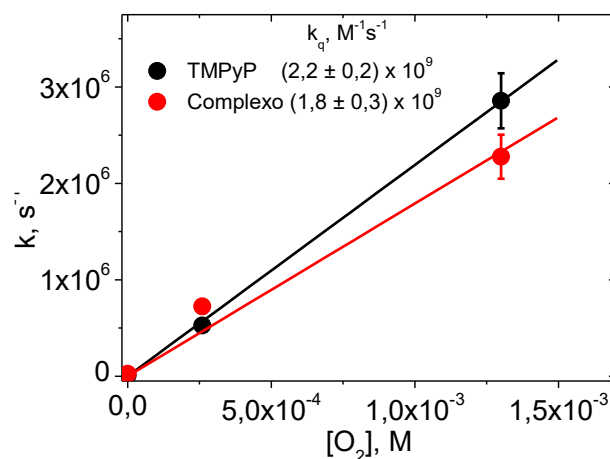


Figura 31. Ajuste da equação (29) da constante de decaimento do estado tripleto em função da concentração de oxigênio presente no meio [32].

Na ausência de oxigênio, a curva de decaimento do estado excitado do complexo é monoexponencial. Apresenta tempo de vida do estado tripleto de 40 μ s. O valor de k_{q2} causado pela supressão desse estado pelo oxigênio é de $k_{q2} = (1,8 \pm 0,6) \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, que é um valor muito próximo ao observado para a supressão do estado tripleto da TMPyP via colisão. Esses resultados implicam que a supressão aparece via colisão entre o complexo em seu estado excitado e as moléculas de oxigênio molecular e pode ser associado a um complexo de transferência de energia ao oxigênio.

3.2.2. Conclusões Parciais

É possível finalizar esta seção apontando que a interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA em solução aquosa se manifesta através da formação de um novo produto, o qual tem características espectrais próprias. Este produto é associado a um complexo de transferência de carga entre a porfirina e o PQ e se forma entre o grupo negativamente carregado do ácido 3-MPA, grupo que funcionaliza o PQ de CdTe, e o grupo metilpiridil da porfirina, que tem carga positiva. Este complexo, quando submetido a irradiação de curtos pulsos de luz, gera estado excitado tripleto e pode ser suprimido pelo oxigênio molecular devido à transferência de energia entre o complexo em seu estado excitado e o oxigênio molecular.

3.3. Interação entre a porfirina TPPS₄ e o PQ CdTe-3-MPA

Os resultados apresentados nesta seção se encontram publicados em [62] e foram obtidos parcialmente durante o trabalho de mestrado [71] e o restante durante as pesquisas que deram origem a esta Tese.

Conforme já descrito na Seção 2.1.1, a porfirina TPPS₄ pode ser desprotonada, mono ou biprotonada a depender do pH do meio (os pontos de pK_a de mono e de biprotonação são muito próximos de pH 4,8). A protonação reduz a carga líquida da forma desprotonada da TPPS₄ de -4 para -2, além de gerar mudanças nas características espectrais de absorção e de fluorescência da porfirina – Figura 12.

Já foi observado em estudos prévios [65] que a presença de íons em pH 4,0 pode provocar a formação de agregados de TPPS₄. A dinâmica de agregação depende da concentração de íons, sendo mais lenta (até horas), quando esta concentração é baixa. A formação de agregado pode interferir diretamente na interação entre PQ – TPPS₄. Por isso, para este estudo, foi utilizada a solução com força iônica baixa (7,5 mM), para que o processo de agregação fosse mais lento e não interferisse nos resultados da interação entre porfirina e PQ. Além disso, a agregação da TPPS₄ produz algumas mudanças espectrais muito específicas, conforme observado em [65,75]. Assim sendo, neste estudo o efeito da agregação da porfirina foi considerado desprezível em relação aos efeitos estudados da interação.

3.3.1. Efeitos do CdTe-3-MPA nas características espectrais da TPPS₄

A adição de PQ na solução de TPPS₄, em pH 4,0, quando a porfirina se encontra na sua forma biprotonada, causa mudanças drásticas nos espectros de absorção e de fluorescência da porfirina – Figura 32a,b.

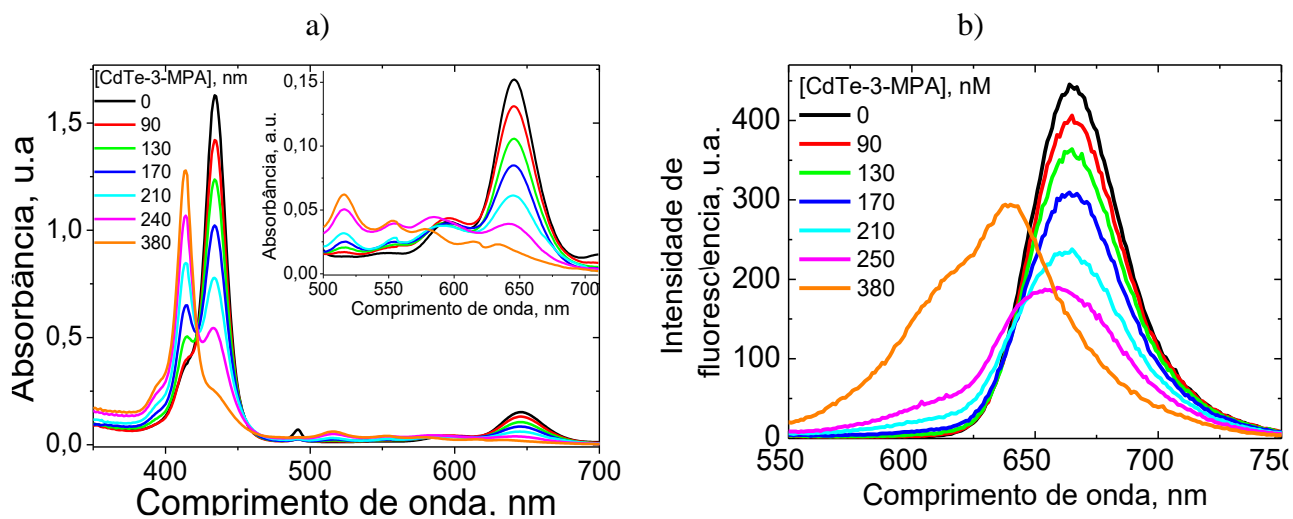


Figura 32. Espectros de a) absorção ótica e b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 420 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ em pH 4,0 em função da concentração do PQ CdTe-3-MPA [62].

Para soluções com $[\text{CdTe-MPA}] > 350 \text{ nM}$, as mudanças espectrais já estavam saturadas e não havia mais qualquer resquício da solução em sua forma biprotonada inicial. O que se observa é que o espectro final de absorção e de fluorescência estão com a aparência mais próxima do espectro observado em pH 7,0, característico para forma da porfirina desprotonada (Figura 12a).

O tempo de vida da fluorescência observado para a porfirina em sua forma pura, em pH 4,0, (forma biprotonada) foi de $\tau = (3,6 \pm 0,2) \text{ ns}$. Na presença do PQ, uma nova componente surge, tornando o decaimento biexponencial – equação (27). Os tempos de vida observados são $\tau_1 = (3,6 \pm 0,2) \text{ ns}$ e $\tau_2 = (10 \pm 1) \text{ ns}$. O primeiro tempo de vida é o tempo característico da fluorescência da solução de porfirina em pH 4,0. Já o tempo de vida mais longo é associado ao característico da porfirina TPPS₄ em sua forma desprotonada, conforme já discutido em [76].

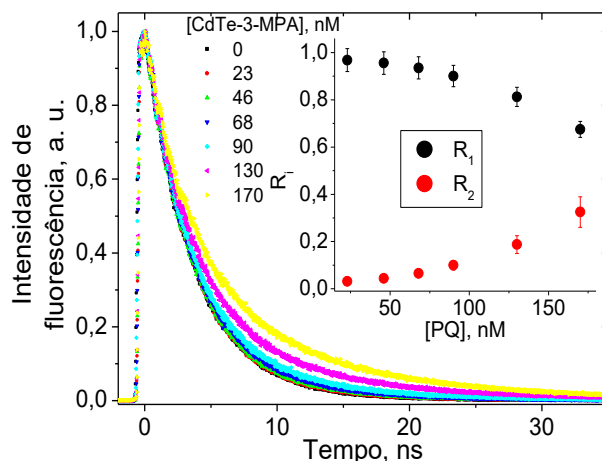


Figura 33. Decaimento temporal da intensidade de fluorescência de TPPS₄ para diferentes concentrações de CdTe-3-MPA ($\lambda_{ex} = 420 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$). Inseto: Dependência das contribuições das componentes do tempo de vida curto (pontos pretos) e do tempo de vida longo (pontos vermelhos) do decaimento da intensidade de fluorescência da TPPS₄ em função da concentração do PQ de CdTe-3-MPA [62].

É possível observar na Figura 33 e seu inserto que a contribuição da componente de menor tempo de vida da fluorescência cai enquanto a componente relativa ao maior tempo de vida aumenta para maiores concentrações do PQ.

Esses efeitos, quando olhados em conjunto, mostram que o PQ de CdTe-3-MPA induz a desprotonação da porfirina TPPS₄ em meio ácido, pH 4,0. Isso pode ser associado ao fato de que o ponto de pKa dos grupos 3-MPA que funcionalizam este PQ é de pH 4,34 [67]. Em pH 4,0 alguns desses grupos não estão protonados e serão ligados com as moléculas biprotonadas de TPPS₄ “capturam” os seus prótons. Efeito similar foi observado na interação entre a TPPS₄ em sua forma biprotonada e nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) [77].

Utilizando as mudanças da intensidade da luminescência do sistema em função da concentração do PQ (Figura 32b), foi determinada a constante de ligação da porfirina com o PQ através do ajuste da equação de Stern-Volmer – equação (6). O resultado obtido está mostrado na Figura 34 em que foi calculado um valor de $K_{sv} = (2,4 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

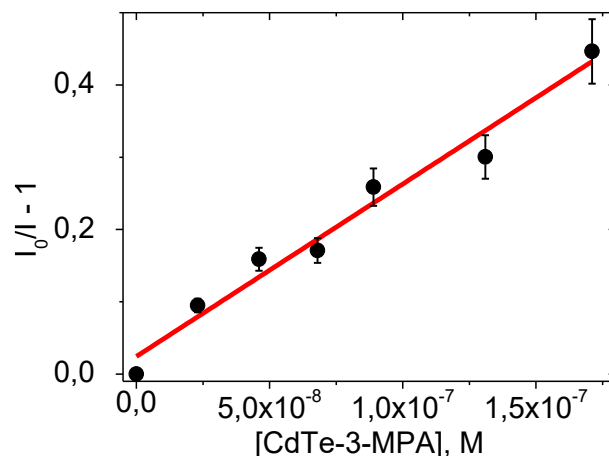


Figura 34. Ajuste utilizando a equação de Stern-Volmer (equação (6)) da intensidade integral de fluorescência de TPPS₄ em função da concentração de CdTe-3-MPA [62].

A constante de supressão bimolecular é calculada fazendo-se K_{SV}/τ_1 , assim, utilizando os valores já encontrados acima:

$$k_q = \frac{2,4 \times 10^6 M^{-1}}{3,6 \times 10^{-9} s} = 0,67 \times 10^{14} M^{-1} s^{-1} \quad (30)$$

O valor encontrado para a constante de supressão bimolecular é quatro ordens de grandeza maior que a constante característica dos processos controlados pela difusão na água, corroborando para o fato de que o PQ não reduz o tempo de vida τ_1 das espécies e que a interação com o PQ é realizada via mecanismo estático, formando um complexo entre essas duas espécies. Neste caso, K_{SV} pode ser considerada a constante de ligação entre a TPPS₄ e o PQ de CdTe-3-MPA.

Foram realizados experimentos com a TPPS₄ em pH 7,0 onde a porfirina fica em sua forma desprotonada. Porém estes mostram que a adição de PQ na solução de TPPS₄ não apresenta nenhuma modificação relevante nos espectros de absorção ou de fluorescência da solução.

3.3.2. Efeitos da TPPS₄ nas características espectrais do CdTe-3-MPA

A adição de TPPS₄ na solução de CdTe-3-MPA não produz qualquer modificação nos espectros de absorção do PQ em ambos os pHs estudados. Os espectros de luminescência do PQ por sua vez são afetados pela introdução da porfirina no meio.

Em pH 4,0, a adição de porfirina diminui a intensidade da luminescência da solução e modifica o perfil do espectro de luminescência observado conforme observado na Figura 35a.

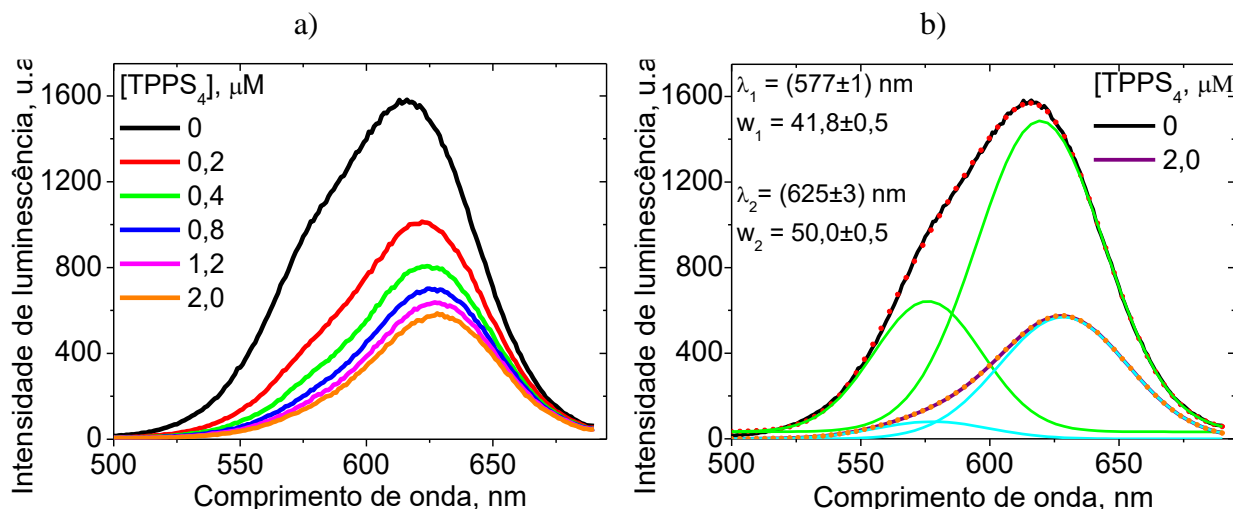


Figura 35. a) Espectro de luminescência do PQ excitando em $\lambda = 350 \text{ nm}$ em pH 4,0 em função da concentração de TPPS₄ e b) deconvolução gaussiana da luminescência do PQ na ausência e na presença de 2,0 μM de TPPS₄ [62].

Fazendo a deconvolução em curvas gaussianas dos espectros de luminescência se observa a presença de duas componentes gaussianas cujos perfis não dependem da concentração da TPPS₄ no meio (Figura 35b). É possível perceber que a adição de TPPS₄ no meio, além de diminuir a intensidade total da luminescência, diminui a intensidade da componente de menor comprimento de onda ($\lambda_1 = (577 \pm 1) \text{ nm}$) em relação a de maior comprimento de onda ($\lambda_2 = (625 \pm 3) \text{ nm}$).

Utilizando a equação de Stern-Volmer modificada para a intensidade integral calculou-se a constante de Stern-Volmer e o fator de acessibilidade para cada componente, conforme Figura 36.

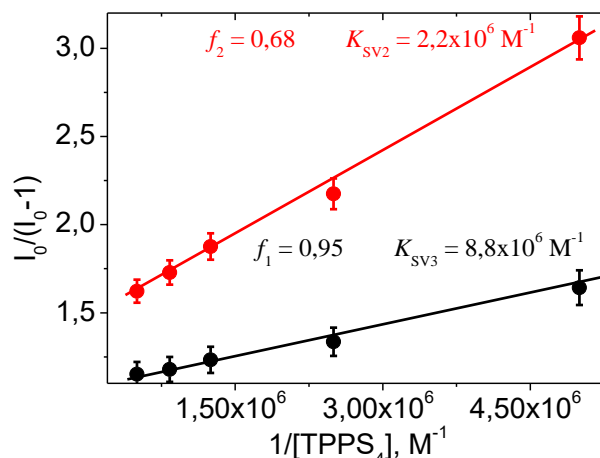


Figura 36. Ajuste da equação modificada de Stern-Volmer para a supressão das componentes da luminescência do PQ de CdTe-3MPA de menor comprimento de onda (pontos pretos) e de maior comprimento de onda (pontos vermelhos) na ausência e na presença da porfirina TPPS₄.

Observando a Figura 36 é possível perceber que os ajustes se encaixam de forma linear tanto para a componente de maior comprimento de onda (vermelho), quanto para a componente de menor comprimento de onda (preto). Os ajustes mostram que o valor da constante de Stern-Volmer e o respectivo fator de acessibilidade para a componente de menor comprimento de onda é de $K_{SV1} = (8,8 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $f_1 = 0,95 \pm 0,06$ e para componente de maior comprimento de onda $K_{SV2} = (2,2 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $f_2 = 0,68 \pm 0,04$. Nesse pH (= 4,0) também foram analisados os efeitos da adição da porfirina no tempo de vida da luminescência da solução de PQ (Figura 37)

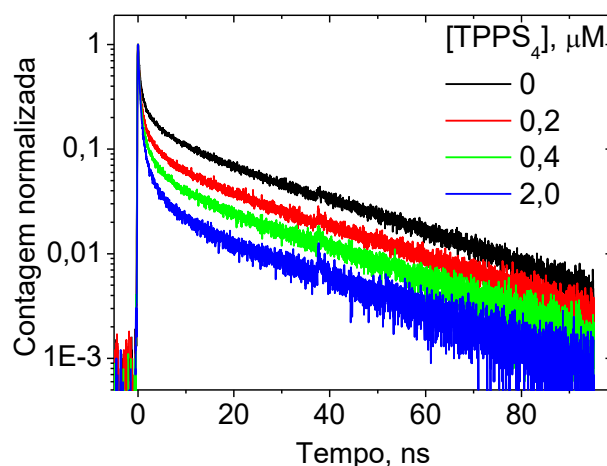


Figura 37. Decaimento temporal da intensidade de fluorescência do CdTe-3MPA em pH 4,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de TPPS₄ ($\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$). [62].

Através da Figura 37 foi possível ajustar o decaimento temporal da intensidade de luminescência do PQ utilizando uma função com três componentes exponenciais. Os tempos de decaimentos temporais calculados foram $\tau_1 = (0,44 \pm 0,04)$ ns, $\tau_2 = (27 \pm 5)$ ns e $\tau_3 = (2,9 \pm 0,7)$ ns.

A contribuição da componente τ_3 é muito baixa em comparação com as outras componentes (aproximadamente 10 vezes menor que a primeira e 2 vezes menor que a segunda). Além disto, o valor deste tempo é bastante próximo ao valor do tempo de vida da fluorescência forma biprotonada da porfirina TPPS₄. Por isso, associamos esta componente à presença de algumas espécies de TPPS₄ biprotonadas livres no meio.

As componentes 1 e 2 são associadas com a luminescência do PQ, pois o CdTe-3-MPA possui apenas duas regiões: o núcleo do PQ composto por CdTe e a superfície funcionalizada com 3-MPA. A presença dos dois decaimentos (τ_1 e τ_2) é explicada graças a esta forma estrutural deste PQ.

A adição de TPPS₄ na solução de PQ diminui o tempo de vida τ_1 , de 0,44 ns para 0,33 ns, porém mantém inalterado o valor do tempo de vida τ_2 em 27 ns.

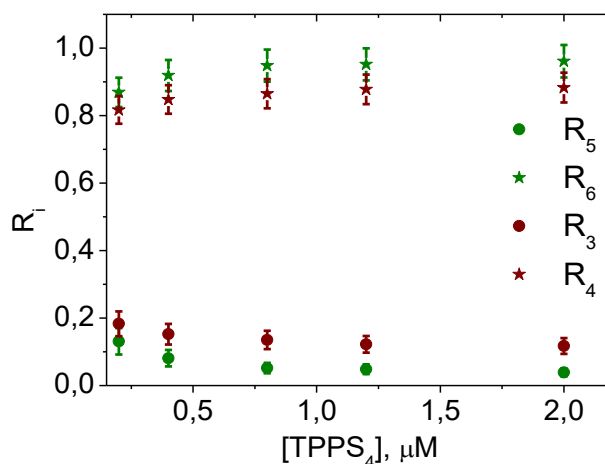


Figura 38. Contribuições da componente de menor comprimento de onda (R_3) e de maior comprimento de onda (R_4) e da componente pré-exponencial do decaimento temporal da intensidade de luminescência do PQ de maior tempo de vida (R_5) e de menor tempo de vida (R_6) em pH 4,0 [62].

Na Figura 38, R_3 e R_4 são as componentes de menor e de maior comprimento de onda dos espectros de luminescência do PQ com adição de TPPS₄, respectivamente, enquanto que R_5 e R_6 são as contribuições das componentes de maior e de menor tempo de vida.

É possível observar a semelhança entre as contribuições das componentes temporais e das componentes gaussianas de intensidades de luminescência em função da concentração de porfirina. Isto indica que a componente de decaimento temporal mais curto está associada a luminescência da componente espectral de maior comprimento de onda e o mesmo vale entre a componente temporal de maior tempo de vida e a componente espectral de menor comprimento de onda.

A componente luminescente de maior comprimento de onda e menor tempo de vida é associada à recombinação do par elétron-buraco na região externa do PQ e a componente de menor comprimento de onda e maior tempo de vida é associada à recombinação do par elétron-buraco na camada de funcionalização do PQ [32,69].

Outro fator que corrobora com a afirmação acima são os valores obtidos para as constantes de supressão (K_{SV}) e fatores de acessibilidade (f) que são, respectivamente, 4 e 1,4 vezes superiores para a componente mais longa em relação a componente mais curta indicando que a componente mais longa e de menor comprimento de onda está associada a uma região mais acessível ao supressor, ou seja, a região superior do PQ.

As razões entre as constantes de supressão dos comprimentos de onda curto e longo do PQ em função da presença de TPPS₄ (K_{SV1} e K_{SV2}) e a constante de supressão da fluorescência da TPPS₄ em função da adição de PQ (K_{SV}) são, respectivamente, $K_{SV1}/K_{SV} = 3,7$ e $K_{SV2}/K_{SV} = 0,9$. Isso significa que cada molécula de porfirina ligada ao PQ pode estimular a recombinação de três a quatro pares de elétrons-buracos na superfície externa do PQ, enquanto que no núcleo será estimulado apenas uma dessas recombinações.

Os experimentos em pH 7,0 mostram que a adição de TPPS₄ na solução de PQ não é capaz de gerar mudanças no espectro de absorção do PQ, porém é observada uma redução da intensidade do espectro de fluorescência do PQ, apesar de não haver mudanças no perfil deste espectro, conforme é observado na Figura 39a.

Utilizando a equação de Stern-Volmer modificada para tratar os dados da Figura 39a, foram obtidos os seguintes valores para a supressão da luminescência do PQ em função do aumento de concentração da TPPS₄: $K_{SV3} = (2,5 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e $f_3 = 0,37 \pm 0,03$.

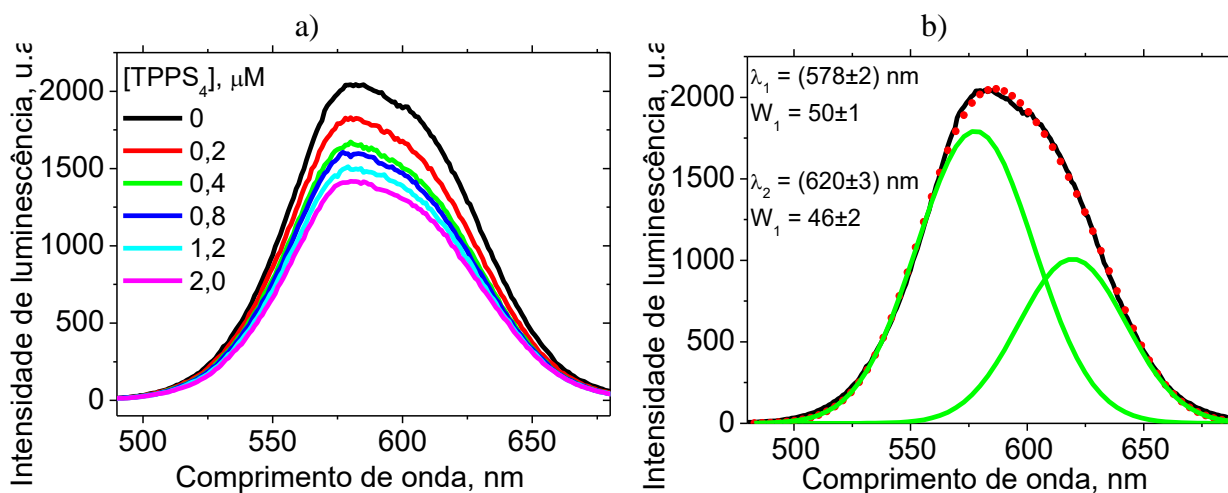


Figura 39. a) Espectro de luminescência do PQ de CdTe-3-MPA em pH 7,0 para diferentes concentrações de TPPS₄; b) Deconvolução Gaussiana do espectro de luminescência do PQ de CdTe-3-MPA em pH 7,0, $\lambda_{ex} = 350 \text{ nm}$ [62].

Foi realizada a deconvolução em gaussianas para estes espectros de fluorescência em pH 7,0 (Figura 39b). A deconvolução aponta que o espectro de luminescência é composto por duas componentes contendo dois picos de emissão em comprimentos de onda distintos, sendo a mais curta em $\lambda_1 = (578 \pm 2) \text{ nm}$ e a mais longa em $\lambda_2 = (620 \pm 3) \text{ nm}$, conforme é possível constatar na Figura 39b. Esses valores são muito próximos aos obtidos para a luminescência do PQ em pH 4,0 (Figura 35b), entretanto, neste caso a componente de menor comprimento de onda é predominante em relação à componente de maior comprimento de onda. Provavelmente, a componente de menor comprimento de onda é suprimida por prótons quando em pH 4,0, visto que neste pH a concentração de prótons no meio é da ordem de 10^3 vezes maior que em pH 7,0. Além disso, em pH 4,0, os efeitos de supressão desta componente pela presença de moléculas de TPPS₄ protonadas podem estar associados à transferência de prótons entre a porfirina e o PQ, conforme observada nas mudanças espectrais da porfirina na Figura 35.

A Figura 40 mostra a curva de decaimento temporal da luminescência do PQ em pH 7,0. É possível observar que o ajuste utilizando três componentes exponenciais se mostrou mais adequado

para a análise deste decaimento. Os tempos de vida encontrados pelo ajuste foram $\tau_1 = (0,35 \pm 0,07)$ ns, $\tau_2 = (22 \pm 3)$ ns e $\tau_3 = (8,6 \pm 0,6)$ ns. Estes valores de tempos de decaimento, bem como suas respectivas componentes pré-exponenciais, não sofreram qualquer alteração quando da adição de porfirina TPPS₄ na solução, independentemente da concentração de porfirina.

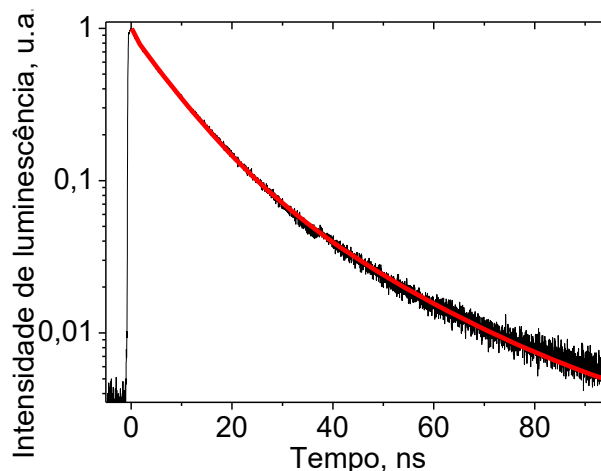


Figura 40. Curva de decaimento da intensidade de luminescência do PQ em pH 7,0, $\lambda_{ex} = 350$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm.

O primeiro e o segundo tempo de vida são próximos aos tempos de vida observados para o PQ em pH 4,0, enquanto que o terceiro tempo de decaimento é próximo ao da fluorescência da porfirina em pH 7,0. Esse resultado corrobora para a hipótese de que a terceira componente aparece como um resquício da fluorescência da TPPS₄ seja em pH 4,0 ou em pH 7,0.

A diminuição da intensidade da luminescência do PQ com a maior concentração de porfirina mostra que há uma interação entre estas espécies em pH 7,0. A comparação das constantes de ligação obtidas a partir da supressão de fluorescência da TPPS₄ pelo PQ (K_{SV}) e as constantes de ligação obtidas a partir da componente de maior comprimento de onda da luminescência do PQ (K_{SV2}) em função da concentração de TPPS₄ em pH 4,0, com a constante de ligação obtida através da supressão da luminescência do PQ pela porfirina em pH 7,0 (K_{SV3}), mostra que esses valores são praticamente os mesmos, porém a constante de supressão para a componente de menor comprimento de onda em pH 4,0 (K_{SV1}) é da ordem de 3,5 vezes maior que a constante K_{SV3} . A constante K_{SV1} está associada com a transferência de prótons entre os grupos funcionais 3-MPA do PQ de CdTe e a porfirina TPPS₄.

Baseando-se nas análises das características espectrais da TPPS₄ e do PQ de CdTe-3-MPA, é possível concluir que, em pH 4,0, a interação entre a porfirina e PQ ocorre via transferência de prótons entre a molécula de TPPS₄ e os grupos funcionais do PQ, isso se dá através do aumento do nível de protonação dos grupos 3-MPA e a supressão da luminescência da componente de menor comprimento de onda.

Apesar do exposto, apenas a transferência de prótons não justifica a supressão da componente de comprimento de onda mais longo em pH 4,0, que está associada ao núcleo do PQ. Também não explica a supressão da luminescência do PQ em pH 7,0, pois a porfirina encontra-se desprotonada. Na tentativa de explicar os fenômenos acima descritos, sugere-se que exista um mecanismo de supressão alternativo como, por exemplo, a transferência de energia entre o núcleo do PQ e a molécula de TPPS₄.

Há na literatura estudos que mostram que PQs são capazes de transferir energia para seus supressores através do processo de FRET [77]. A distância entre doador e aceitador do processo de transferência de energia pode ser calculado através da equação (31):

$$r = R_0 \sqrt[6]{\frac{\tau_0}{\tau}} \quad (31)$$

Em que τ_0 e τ são, respectivamente, os tempos de decaimento da luminescência na ausência e na presença do aceitador e R_0 é a distância característica de FRET para aquele par doador-aceitador e pode ser calculada através da equação (10) apresentada na Seção 1.5.1.

Para o cálculo, foram utilizados os valores obtidos experimentalmente para o pH 4,0 de τ , τ_0 , ϕ_d , $I_d(\lambda)$ e $\epsilon_a(\lambda)$. Assim, o resultado obtido para a distância entre doador e aceitador foi de $r = (1,3 \pm 0,2)$ nm. Este valor é semelhante ao valor do raio do PQ (1,25 nm) utilizado neste experimento e demonstrado nas sessões acima através da equação (25). As coincidências destes valores reforça a hipótese de que as moléculas de TPPS₄ estão se ligando a superfície do PQ. Esta ligação com a superfície é necessária não somente para a transferência de energia, como também para a transferência de prótons entre PQ e porfirina.

Em pH 7,0 não foi possível realizar análise semelhante a efetuada em pH 4,0, pois a componente de menor tempo de vida da luminescência do PQ neste pH é muito pequena quando

comparada com a mesma componente no pH mais ácido, assim as mudanças nos valores são muito sutis, da ordem de grandeza do desvio experimental, inviabilizando uma análise fidedigna.

Também é interessante observar que a constante de ligação K_{SV} em pH 4,0, quando a porfirina tem carga líquida -2 e o PQ tem carga neutra, é idêntica à constante K_{SV3} obtida em pH 7,0 quando a porfirina está com carga -4 e o PQ está carregado negativamente. Esperava-se que a constante de ligação no pH neutro fosse menor que a constante de ligação obtida no meio mais ácido devido à repulsão eletrostática ser maior neste do que naquele, porém isso não ocorreu. Uma forma de tentar explicar o resultado é que, em pH 4,0, a energia transferida do PQ para a TPPS₄ acaba por compensar parcialmente a perda de fluorescência da porfirina produzida pela transferência de prótons, de forma que o valor obtido de K_{SV} acaba por ser mensurado como um valor menor do que seu valor verdadeiro.

3.3.3. Conclusões Parciais

Os experimentos com TPPS₄ e CdTe-3-MPA mostraram que por trás da transferência de energia entre a PQ e porfirina existe a transferência de prótons que ocorre da porfirina para o PQ. Esse processo se manifesta através das mudanças nos espectros de absorção das amostras, na redução da intensidade dos espectros de fluorescência, na diminuição dos tempos de vida da fluorescência da porfirina e nas mudanças observadas na luminescência do PQ.

O fator de acessibilidade em pH 4,0, em que a porfirina encontra-se biprotonada e com carga -2 e o PQ encontra-se parcialmente protonado, mostrou-se maior quando comparado com os valores obtidos em pH 7,0, em que a porfirina possui carga -4 e PQ com carga líquida negativa, assim fica claro a importância da interação eletrostática na interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA. Ainda assim, foram encontradas constantes de ligação de valores similares para os dois pHs e isto pode estar associado ao fato que, em pH 4,0, a transferência de energia do PQ para a TPPS₄ atenua a diminuição da fluorescência da porfirina produzida pela transferência de prótons para o PQ de forma que a constante de ligação aferida é menor que a constante de ligação real.

Também analisamos a luminescência do PQ de CdTe-3-MPA em que foi constatado que esta possui duas componentes, cada componente com seu pico de emissão e tempo de decaimento próprio. Estas componentes estão relacionadas com a aniquilação do par elétron-buraco no núcleo

e na superfície funcionalizada. Nesse caso, o fator de acessibilidade é da ordem de 1,4 vezes maior para o pico de menor comprimento de onda e a componente de maior tempo de vida, estas componentes estão relacionadas com a superfície funcionalizada, em relação à componente de maior comprimento de onda e de menor tempo de vida, que são relacionadas a aniquilação do éxciton no núcleo do PQ.

3.4. Interação entre o PQ Cde-3-MPA, ASB e as porfirinas TMPyP e TPPS₄

O estudo da interação do PQ de CdTe-MPA com a Albumina do Soro Bovino (ASB) foi realizado utilizando-se como meio o tampão fosfato de pH 7,0. Em pH 4,0 não foram observados efeitos significantes na interação entre PQ e ASB nas concentrações utilizadas.

Os resultados a seguir encontram-se publicados em [63].

3.4.1. Interação entre ASB e CdTe-3-MPA

Os espectros de absorção e de luminescência, estática e com resolução temporal, foram monitorados da solução de 200 nM do PQ de CdTe-3-MPA titulada com ASB (Figura 41a,b e Figura 42).

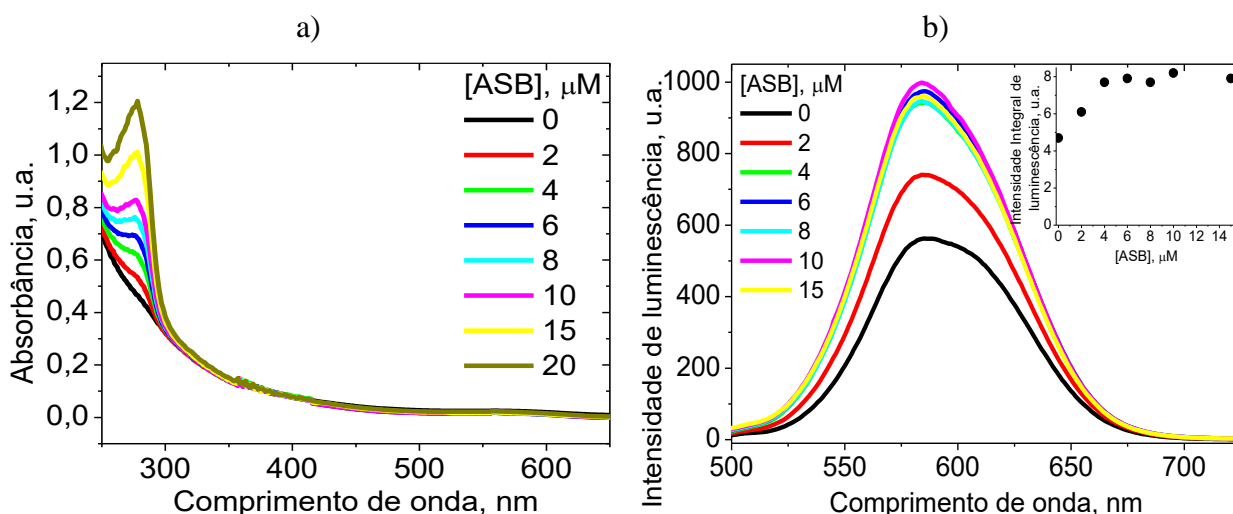


Figura 41. a) Espectros de absorção ótica e de b) fluorescência da solução de 200 nM de CdTe-MPA, excitando em $\lambda = 450$ nm, adicionando ASB [63].

A ASB possui pico de absorção em $\lambda = 279$ nm e seu pico de emissão tem máximo em $\lambda = 380$ nm, quando excitado em seu pico de absorção. A solução de CdTe-3-MPA com a adição de ASB apresenta grande estabilidade, não sendo observada precipitação em intervalos de 24 horas. A adição de ASB na solução de PQ não traz alteração no perfil de absorção do PQ (Figura 41a), entretanto é observado um aumento significativo na luminescência do PQ, conforme aumenta-se a concentração de ASB (Figura 41b e inserto).

O perfil de decaimento temporal da intensidade de luminescência do PQ quando excitado em $\lambda = 480$ nm na ausência e na presença de diferentes concentrações de ASB foi ajustado utilizando uma função de decaimento biexponencial.

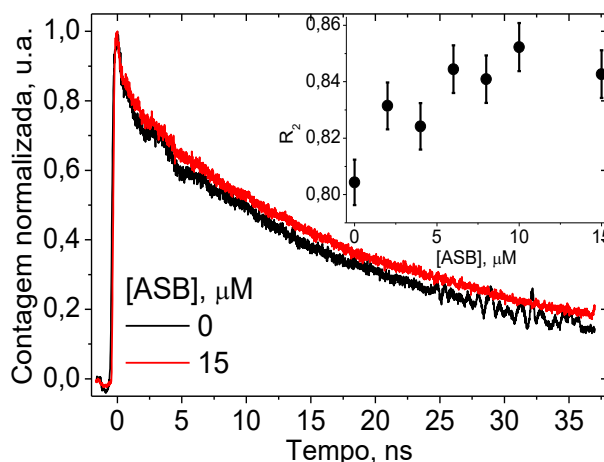


Figura 42. *Curvas de decaimento temporal da intensidade da luminescência da solução de 200 nM de CdTe-3-MPA ($\lambda_{exc} = 490$ nm, $\lambda_{em} = 580$ nm) na presença de $[ASB] = 0$ e de $[ASB] = 15$ μ M. Inseto: Contribuição da componente de decaimento da intensidade de luminescência de maior tempo de vida (R_2) em função da concentração de ASB [63].*

Os tempos de vida do decaimento temporal da fluorescência da solução estudada foram calculados em $\tau_1 = (0,9 \pm 0,1)$ ns e $\tau_2 = (20 \pm 1)$ ns. É possível observar através da Figura 42 que os tempos τ_1 e τ_2 , bem como suas amplitudes, sofrem pequenas modificações com a adição da ASB. Para analisar esta variação foi utilizado o fator R_2 , calculado utilizando a equação (28) com $i = 2$. No inserto da Figura 42 estão mostrados os valores de R_2 em função da concentração de proteína. É possível observar que este resultado coincide com o observado ao analisar o crescimento da

intensidade integral da luminescência do PQ em função da concentração de ASB, conforme mostrado no inserto da Figura 41b.

Este resultado leva a conclusão de que o aumento na intensidade da luminescência do PQ pode estar associada ao aumento da contribuição da componente de maior tempo de vida da luminescência do PQ. Em contrapartida há uma diminuição na contribuição da componente de tempo de vida mais curto.

Conforme já discutido, a componente temporal de maior tempo de vida está diretamente relacionada as interações que ocorrem na superfície do PQ de CdTe-3-MPA, enquanto que a componente de tempo de vida mais curto está associada às interações ocorridas no núcleo do PQ. Assim, chega-se à hipótese de que o aumento na intensidade da luminescência do PQ conforme aumenta-se a concentração da proteína ocorre devido à interação entre a ASB e a superfície do PQ, mais especificadamente o seu grupo funcional 3-MPA.

É possível calcular a constante de ligação de sistemas em que a fluorescência aumenta utilizando-se a equação (32) abaixo:

$$\frac{1}{I-I_{min}} = \frac{1}{I_{max}-I_{min}} + \frac{1}{(I_{max}-I_{min})K} \frac{1}{[C]} \quad (32)$$

Em que I , I_{min} e I_{max} são as intensidades integrais da luminescência da solução de PQ contendo a concentração $[C]$ de ASB, do PQ puro e da solução após a saturação com ASB, respectivamente, e K é a constante de ligação, que para o sistema estudado foi de $K = (1,2 \pm 0,1) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (Figura 43).

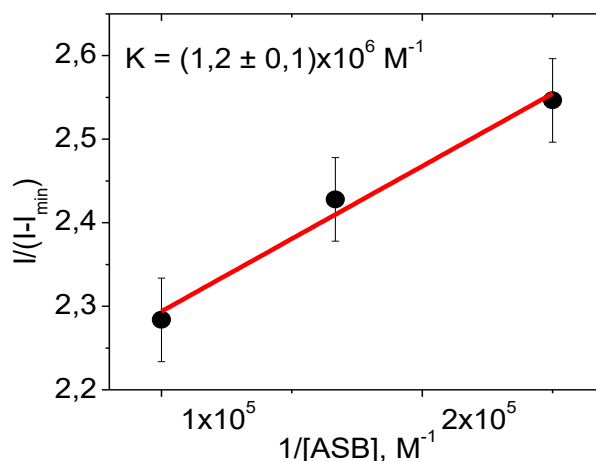


Figura 43. Ajuste do crescimento da intensidade de luminescência da solução de 200 μM do PQ de CdTe-3-MPA com adição de BSA de acordo com a equação (32).

A ausência de interação entre PQ e ASB, em pH 4,0, pode ser atribuída à repulsão eletrostática entre essas duas espécies no meio ácido. Conforme já demonstrado em [41], o ponto isoelétrico da ASB acontece em pH 4,7. Também já foi discutido que o ponto de pK_a do PQ de CdTe-3-MPA ocorre em pH 4,34. Dessa forma, em pH 4,0, tem-se que ambas as espécies estão com carga total positiva, reduzindo a probabilidade de uma ligação entre elas e fazendo com que uma eventual constante de ligação fosse muito inferior à calculada para o pH 7,0.

3.4.2. Efeitos da ASB na interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA

Conforme já discutido em sessões anteriores desta tese, a interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA é caracterizada pela formação de um complexo de transferência de carga entre os grupos funcionais 3-MPA do PQ, que possuem carga negativa, e os grupos metilpiridil da TMPyP, de carga positiva. O complexo possui picos de absorção ótica em $\lambda = 455$ nm, 585 nm e 629 nm, e o pico de emissão em $\lambda_{em} = 632$ nm (Figura 21a,b). A adição de ASB nesse complexo não produz qualquer alteração nos espectros de absorção e nem nos de fluorescência, assim como não se observou mudanças nos tempos de decaimento do complexo, calculado como uma curva monoexponencial com tempo de vida de $\tau = (5,3 \pm 0,2)$ ns, conforme observado na Figura 44 e inserto.

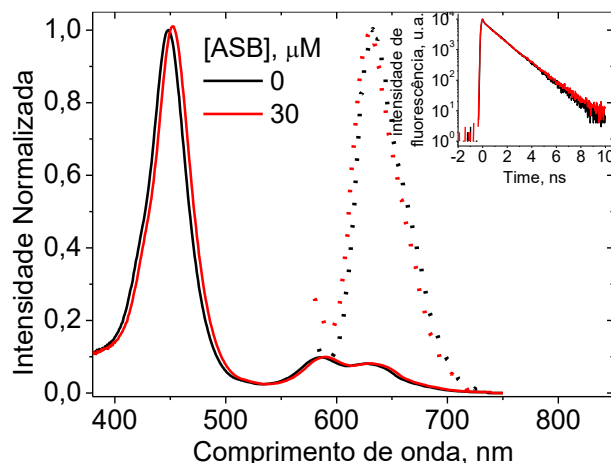


Figura 44. Espectros normalizados de absorvância ótica (linha contínua) e de fluorescência (linha pontilhada) da solução contendo complexo TMPyP...CdTe-3-MPA, produzidos a partir da adição de 1,6 μM de TMPyP e 150 nM de CdTe-3-MPA, na ausência (preto) e na presença (vermelho) de ASB. Inseto: Decaimento temporal normalizado da intensidade da luminescência do complexo na ausência (preto) e na presença (vermelho) de ASB

Também foram realizados experimentos em que PQ foi adicionado na solução contendo TMPyP e ASB. A interação entre TMPyP e ASB, já está demonstrada em [64,78]. Essas espécies, quando em conjunto, formam um complexo caracterizado pelo espectro de absorção ótica com pico em $\lambda = 425$ nm e três picos na região das bandas Q (Figura 45a) e pelo espectro de fluorescência com pico de emissão em $\lambda = 629$ nm (Figura 45b). A constante de ligação dada na literatura é de $K_{\text{TMPyP-ASB}} = 7,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ [78].

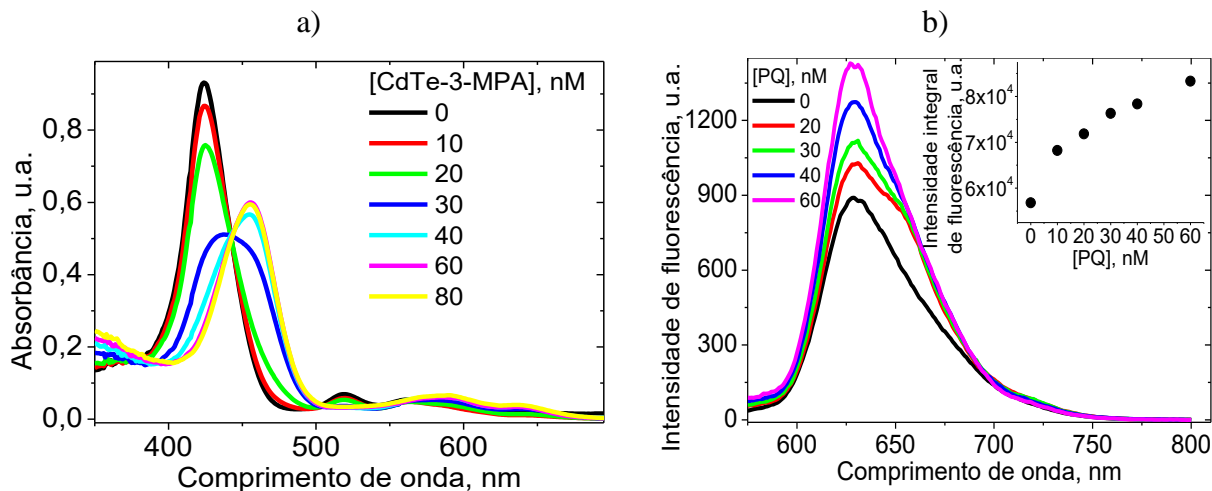


Figura 45. Espectros de a) absorção e de b) fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 445$ nm) da solução de 5,0 μM de TMPyP na presença de 30 μM de ASB em diferentes concentrações de PQ. Inseto: intensidade integral de fluorescência em função da concentração de PQ [63].

A adição do PQ de CdTe-3-MPA na solução contendo porfirina e ASB causa redução do pico de absorção, com máximo em $\lambda = 425$ nm, e produz a formação de um novo pico de absorção em $\lambda = 455$ nm. Este novo pico de absorção observado coincide com o pico de absorção do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA. Também se observa que a adição do PQ induz o aumento da intensidade da luminescência. Esses resultados indicam que está ocorrendo a formação do complexo entre a porfirina e PQ na presença da ASB. Utilizando a equação (32), calculou-se a constante de ligação $K_{\text{TMPyP-PQ+ASB}} = (10 \pm 3) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$. O valor obtido para a formação do complexo é bastante próximo ao obtido na ausência de ASB.

A adição de ASB na solução não causa a destruição do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA que está formado e também não tem a capacidade de reduzir a probabilidade de formação deste complexo. Este efeito pode ser explicado devido ao fato de que a taxa de formação de complexo entre o PQ e a porfirina é aproximadamente dez vezes maior que a taxa de formação de complexo entre a porfirina e a ASB e cinco vezes maior que a constante de ligação entre o PQ e a ASB.

Tabela 1. Constantes de ligação da formação do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA na ausência e na presença de ASB e do complexo ASB...TMPyP [63].

Reação	$K \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
$\text{CdTe} - 3 - \text{MPA} + \text{TMPyP} \Leftrightarrow \text{CdTe} - 3 - \text{MPA} \dots \text{TMPyP}$	$6,0 \pm 0,5$
$\text{ASB} + \text{TMPyP} \Leftrightarrow \text{ASB} \dots \text{TMPyP}$	0,73*
$\text{CdTe} - 3 - \text{MPA} + \text{ASB} \Leftrightarrow \text{CdTe} - 3 - \text{MPA} \dots \text{ASB}$	$1,2 \pm 0,1$

*valor obtido em [78].

Conforme já discutido, a ASB possui ponto isoelétrico em pH 4,7, isto implica que em pH 7,0 a sua carga encontra-se negativa. Assim, a atração eletrostática deveria estimular a ligação entre a proteína e a porfirina TMPyP, que tem carga líquida positiva. Porém, conforme se observou, a interação envolvendo porfirina e PQ é mais forte e predomina sobre a interação com a proteína. Uma hipótese para que a interação PQ com TMPyP seja predominante é que está formando um complexo de transferência de carga entre essas duas espécies e este complexo é estável. Por fim, não foi observado qualquer mudança espectral que pudesse ser relacionada a uma eventual ligação do complexo CdTe-3-MPA...TMPyP e a ASB.

3.4.3. Efeitos da ASB na interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA em pH 7,0

A interação entre ASB e TPPS₄ já foi estudada em [78]. Nesse artigo, os autores reportam que a adição de ASB à solução de TPPS₄ em pH 7,0 induz o deslocamento da banda de Soret da porfirina de $\lambda = 412$ nm para $\lambda = 422$ nm e o pico de fluorescência também é deslocado indo de $\lambda = 645$ nm para $\lambda = 654$ nm acompanhado de um aumento na intensidade de fluorescência no sistema (Figura 46).

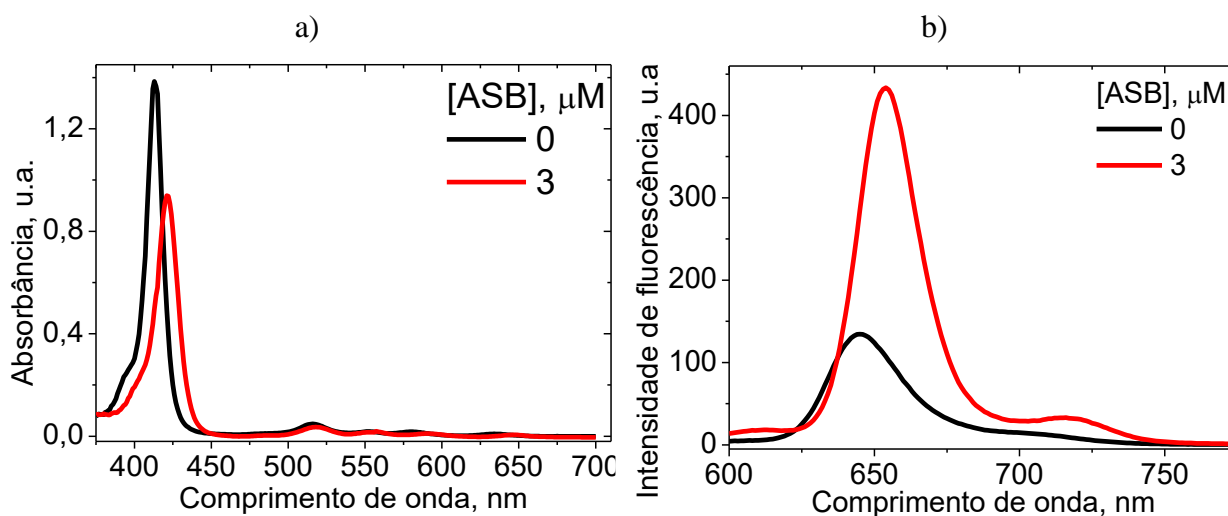


Figura 46. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 417$ nm) de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ em pH 7,0 na ausência e na presença de $3 \mu\text{M}$ de ASB.

A adição de ASB na solução de TPPS₄...PQ desloca o pico de absorção de $\lambda = 412$ nm para $\lambda = 422$ nm e causa o surgimento de uma nova banda de absorção com máximo em $\lambda = 436$ nm (Figura 47a). A emissão do complexo aumenta com a adição de ASB, assim como se observa a formação de um novo pico de emissão em $\lambda = 650$ nm (Figura 47b).

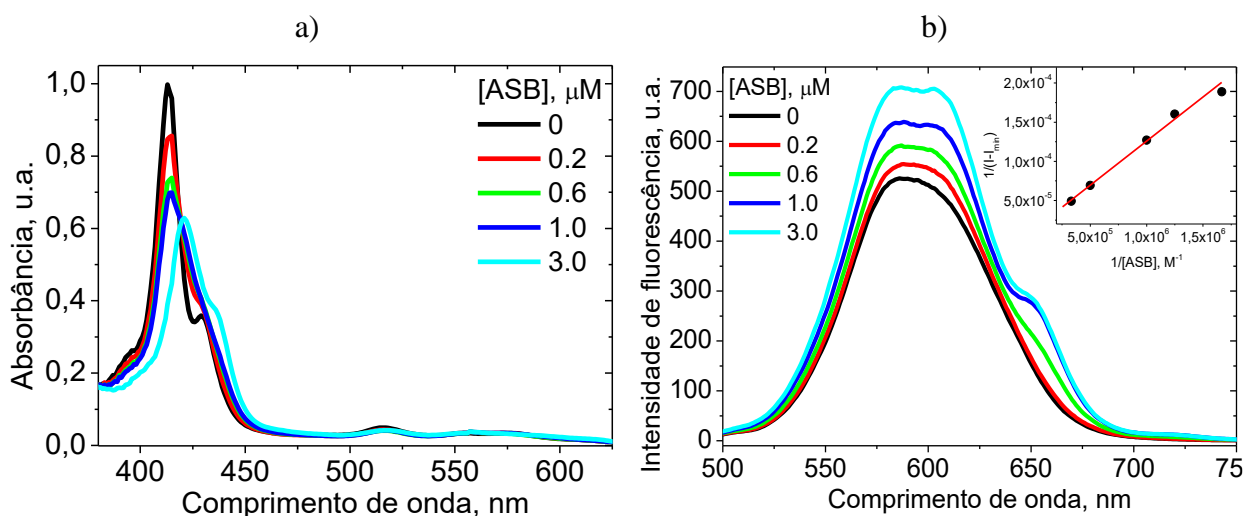


Figura 47. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 420 \text{ nm}$) de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ na presença de 400 nM de CdTe-3-MPA em diferentes concentrações de ASB. Inseto: Ajuste da intensidade integral da fluorescência utilizando a equação (32) [63].

Os novos picos espectrais observados não são coincidentes com nenhum dos picos da TPPS₄ ou do PQ de CdTe-3-MPA em sua forma pura ou do complexo formado entre estes. Dessa forma, acredita-se que estes novos picos de emissão estão relacionados a formação de um novo complexo TPPS₄...CdTe-3-MPA...ASB.

Utilizando a equação (32) para as intensidades integrais da fluorescência do sistema, foi calculada a constante de formação desta nova espécie, sendo $K = (6,5 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

A adição de PQ na solução de TPPS₄ + ASB não foi capaz de induzir alterações nos perfis espectrais de absorção e de fluorescência da solução. Fica claro que a ligação entre TPPS₄ e ASB em pH 7,0 inibe a formação do complexo TPPS₄...CdTe-3-MPA e conseqüentemente impede a formação do complexo misto de TPPS₄... CdTe-3-MPA...ASB.

3.4.4. Efeitos da ASB na interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA em pH 4,0

Conforme discutido anteriormente, em pH 4,0 a interação entre a porfirina TPPS₄ e o PQ CdTe-3-MPA ocorre via dois mecanismos distintos: transferência de prótons da porfirina para o PQ e transferência de energia do PQ para a porfirina, sendo o mecanismo de transferência de

prótons predominante e o responsável pelas mudanças nas características espectrais da porfirina, conforme já mostrado na Figura 32.

A adição de ASB na solução de TPPS₄, em pH 4,0, induz a desprotonação da porfirina causando mudanças nas características espectrais e levando-as a possuir características espectrais iguais às observadas nos experimentos envolvendo ASB e a TPPS₄ em forma desprotonada: o pico da banda de Soret em $\lambda = 422$ nm, o pico de fluorescência em $\lambda = 654$ nm e o tempo de vida da fluorescência de $\tau = 10,8$ ns. A constante de ligação calculada para o sistema TPPS₄...ASB foi $K = 1,5 \times 10^8$ M⁻¹.

O experimento também foi realizado adicionando ASB na solução contendo o complexo TPPS₄...CdTe-3-MPA. É possível observar na Figura 48a que a proteína causa uma mudança no perfil do espectro de absorção do complexo, bem como diminui a sua intensidade. Já o espectro de luminescência do complexo sofreu mudanças em seu perfil espectral devido à adição de ASB (Figura 48b), porém há aumento da intensidade de luminescência.

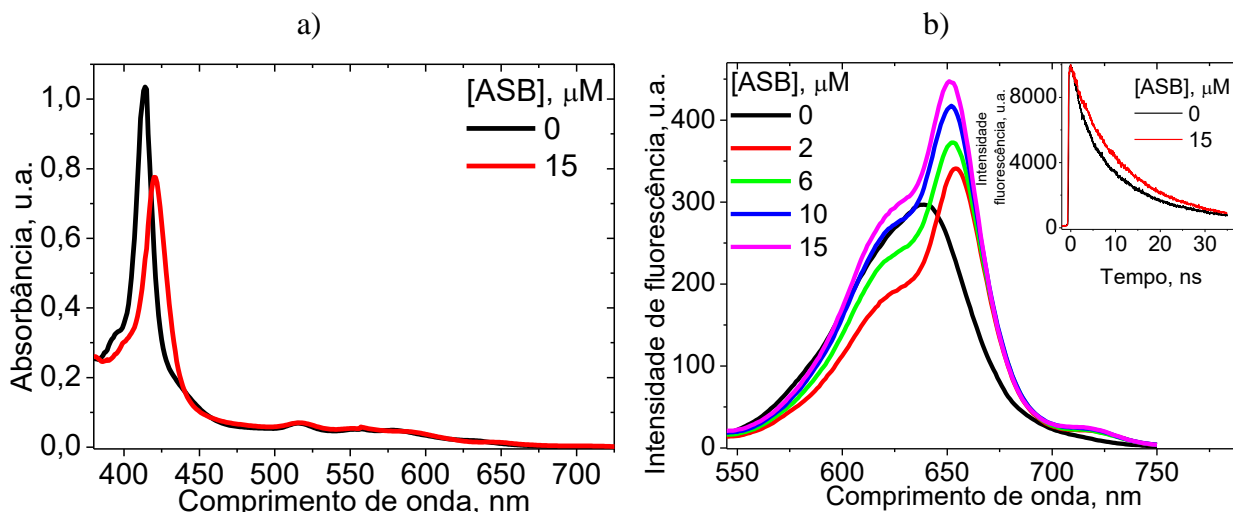


Figura 48. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência estática ($\lambda_{exc} = 417$ nm) de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ e 380 nM de PQ em pH 4,0 na presença de diversas concentração de ASB. Inseto: Curvas de decaimento temporal do PQ com $\lambda_{exc} = 420$ nm e $\lambda_{em} = 650$ nm na ausência e na presença de $15 \mu\text{M}$ de ASB.

Os espectros de absorção e de luminescência do complexo após a adição da ASB coincidem com os espectros observados quando da interação entre TPPS₄ e ASB (Figura 46). A intensidade do espectro de luminescência e o respectivo tempo de vida da luminescência do sistema aumentam

com a adição de ASB (Figura 48b e inserto). Este resultado indica que a adição de ASB destrói o complexo TPPS₄...CdTe-3-MPA para formar o complexo TPPS₄...ASB. Esta afirmação é corroborada pelo valor obtido na constante de ligação através do ajuste da fluorescência utilizando a equação (32) (Figura 49) obtendo-se a constante de ligação $K = (1,2 \pm 0,2) \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$. Este valor é cerca de cem vezes maior que a constante de ligação obtida para a interação entre da TPPS₄ com ASB na ausência do PQ.

O resultado mostra que a presença do PQ aumenta a probabilidade de ocorrer a ligação entre a porfirina e a proteína.

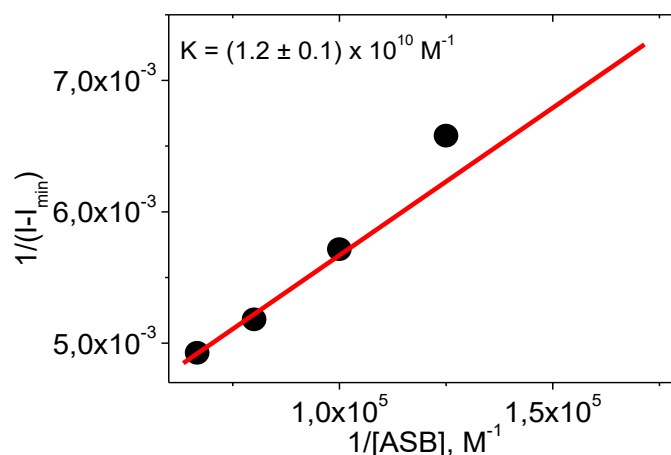


Figura 49. Intensidade integral de fluorescência de $6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ e de 380 nM de PQ na presença de ASB ajustada em acordo com a equação (32) [63].

Quando PQ é adicionado à solução de TPPS₄ contendo ASB não é observada nenhuma alteração nas características espectrais da solução, isso reforça a hipótese de que quando a TPPS₄ se encontra ligada a ASB não é observada ligação da porfirina com o PQ, pois há um bloqueio por parte da proteína ASB.

3.4.5. Conclusões Parciais

As características da porfirina, em especial a sua carga, são fundamentais para determinar de que forma a interação entre a porfirina e a proteína ASB se manifestará.

O estudo utilizando a TMPyP, que possui carga líquida +4 e forma um complexo de transferência de carga com o PQ de CdTe-3-MPA, mostrou que a ASB não é capaz de destruir o complexo já formado ou impedir que este se forme, pelo contrário estimula a sua formação, apresentando um sistema bastante promissor para uso em TFD.

Os estudos envolvendo a TPPS₄ mostraram que, em pH 7,0, quando a porfirina está em sua forma desprotonada e possui carga -4, é formado um complexo de transferência de energia com o PQ de CdTe-3-MPA e a adição da proteína ASB induz a formação de um complexo misto da forma TPPS₄...CdTe-3-MPA...ASB

Já no caso em que a porfirina encontra-se biprotonada, ou seja, em pH 4,0 e com carga -2, em que na presença do PQ há a formação de um complexo de transferência de energia e de prótons, a adição da proteína ASB induz a destruição do complexo para formar a espécie TPPS₄...ASB e também inibe que a porfirina forme complexo com o PQ. Além disto, a presença do complexo TPPS₄...PQ aumenta a probabilidade de ligação da porfirina com a ASB.

Neste estudo foi feita uma investigação preliminar dos efeitos da albumina sobre o complexo formado entre porfirina e PQ. Porém, para determinar melhor os mecanismos que induzem os efeitos observados é necessário estudos mais detalhados envolvendo outras técnicas experimentais além das espectroscópicas aqui utilizadas. Entretanto, para o propósito deste estudo a respeito da interação do complexo porfirina-PQ com ASB os resultados apresentados podem ser importantes para a aplicação do sistema estudado em aplicações teranósticas.

3.5. Interação entre TMPyP, Cde-3-MPA e Surfactantes

As interações entre a porfirina TMPyP, o PQ de CdTe-3-MPA e surfactantes (SDS (carga negativa), CTAB (carga positiva), HPS (zwitteriônico) e Triton X-100 (neutra)) foram estudadas com o intuito de analisar os efeitos dos diferentes tipos de carga, tanto na interação entre a porfirina e o PQ durante a formação de complexo, quanto na presença do complexo já formado. Todos os experimentos foram realizados em pH 6,8 visto, em que a carga da porfirina +4 não apresenta mudanças no intervalo de pH 2,0 até 9,0.

3.5.1. Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA na presença de SDS

A interação entre TMPyP e SDS foi estudada ao fixar a concentração de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP. A adição de SDS na solução de porfirina faz com que, inicialmente, a absorção e a intensidade de fluorescência da porfirina sofram queda em sua intensidade seguidas por um aumento na sua intensidade e posterior saturação (Figura 50a,b e insertos). Também é observado um deslocamento do pico de absorção de 422 nm para 425 nm e o pico de emissão é deslocado de 655 nm para 660 nm , porém neste caso o pico de emissão retorna ao comprimento de emissão $\lambda = 655 \text{ nm}$ quando a concentração de SDS supera $12,5 \text{ mM}$.

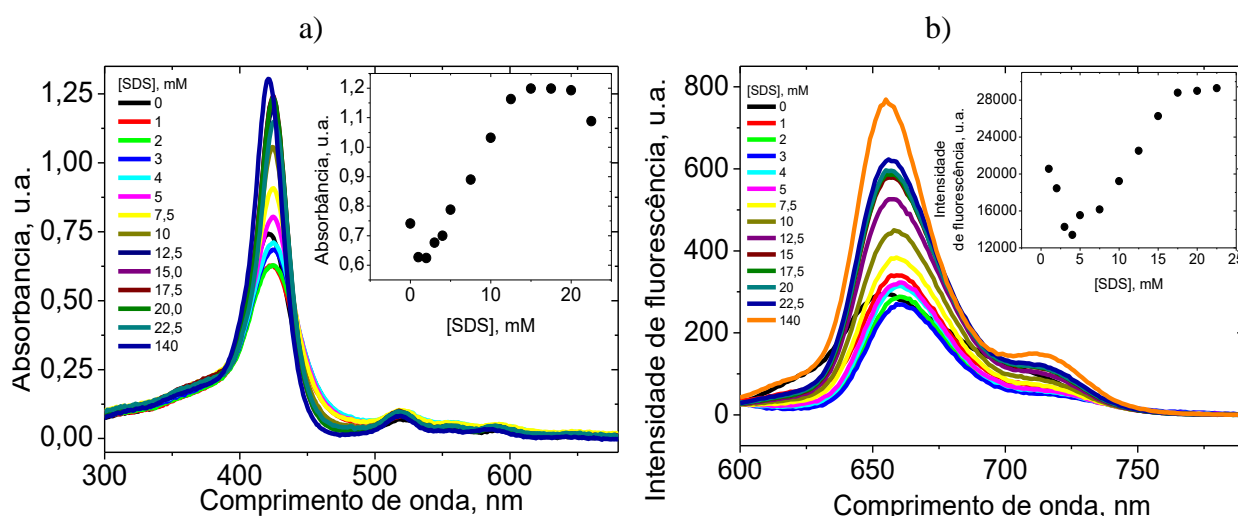


Figura 50. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$) de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com diferentes concentrações de SDS. Inseto de a): Absorbância em $\lambda = 422 \text{ nm}$ em função da concentração de SDS e Inseto de b): Intensidade integral de fluorescência em função da concentração de SDS.

A queda inicial da absorbância e da fluorescência da porfirina acontece devido ao aumento de sua agregação, estimulada pela ligação com as moléculas de surfactante que possuem uma carga negativa, diminuindo a repulsão eletrostática tanto entre as moléculas de porfirina, como entre as moléculas de surfactante. Isto resulta na formação de agregados mistos $n\text{TMPyP} + m\text{SDS}$. Com o aumento da concentração de surfactante, as moléculas agregadas de porfirina se separam entre várias “pré-micelas” mSDS de surfactante. Por isso, a partir de $[\text{SDS}] > 2 \text{ mM}$, a intensidade de fluorescência e de absorção da porfirina começa a aumentar. Efeito semelhante foi observado em [79] para a interação da porfirina TPPS_4 com o surfactante CTAB e em [80] para a interação de

corantes cianicos com DNA. O processo tem sua saturação a partir de $[\text{SDS}] \geq 12,0 \text{ mM}$, quando se formam as micelas de SDS.

Devido à complexidade do processo de interação entre porfirina e surfactante, a determinação da constante de interação entre eles se torna bem problemática. Somente é possível avaliar uma constante formal aproximada da sua interação. Esta constante foi calculada usando a equação (32) (Figura 51)[81].

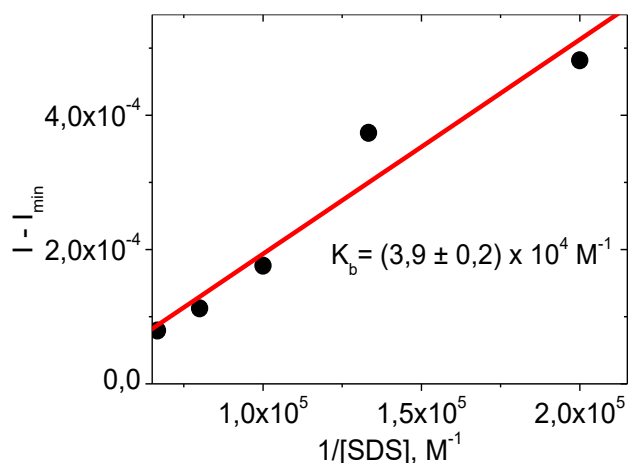


Figura 51. Ajuste da intensidade integral da fluorescência da TMPyP devido à adição de SDS utilizando a equação (32).

O valor encontrado de $K_{\text{TMPyP-SDS}} = (3,9 \pm 0,2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

A análise da deconvolução gaussiana do espectro de fluorescência da TMPyP mostrou que na ausência de SDS o espectro de fluorescência está composto por três componentes com máximos localizados em $\lambda_1 = (610 \pm 5) \text{ nm}$, $\lambda_2 = (655 \pm 2) \text{ nm}$ e $\lambda_3 = (680 \pm 5) \text{ nm}$ (Figura 52a). Na presença de micelas de SDS, surge uma nova componente com pico $\lambda_4 = (711 \pm 2) \text{ nm}$ acompanhada com o deslocamento dos máximos da primeira componente para $\lambda_1 = (622 \pm 5) \text{ nm}$ e da terceira componente para $\lambda_3 = (670 \pm 5) \text{ nm}$ (Figura 52b).

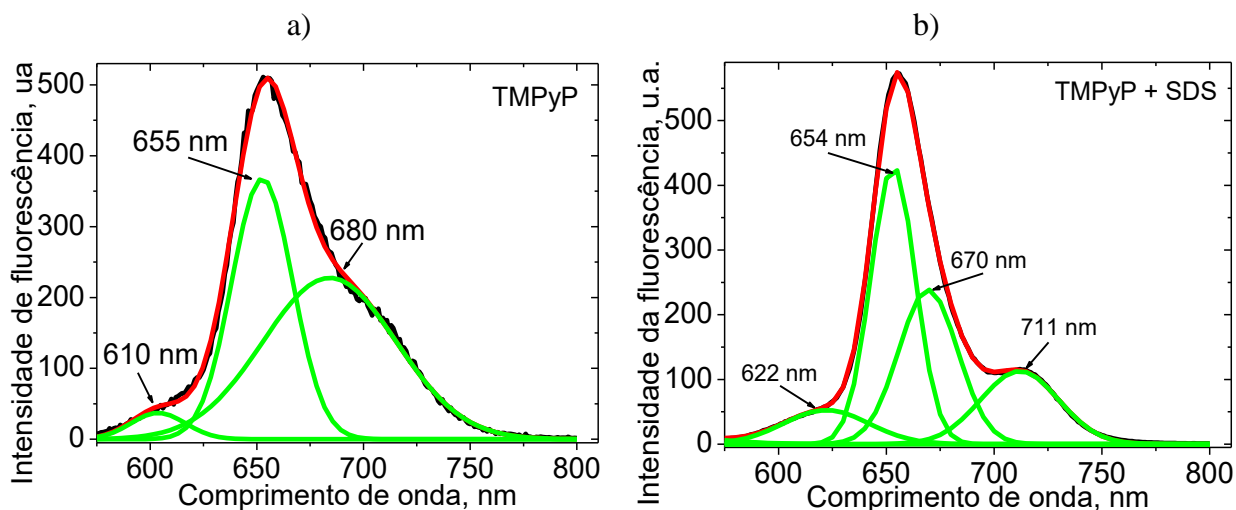


Figura 52. Deconvolução gaussiana de espectros da fluorescência de TMPyP em a) solução homogênea e b) na presença de micelas de SDS.

Prosseguindo os estudos da interação envolvendo micelas de SDS preparou-se uma solução contendo $[TMPyP] = 5 \text{ mM}$ e $[SDS] = 15 \text{ mM}$. A concentração de SDS foi escolhida por ser consideravelmente superior àquela em que o processo satura, garantindo a formação de micelas. Em seguida, adicionou-se PQ à solução e foram obtidos os espectros de absorção e de luminescência para diferentes concentrações do PQ.

Observando os espectros de absorção das soluções de TMPyP + SDS (micelas) com diferentes concentrações de PQ (Figura 53a) é possível perceber que o perfil do espectro não sofre qualquer alteração com a adição de PQ, porém apresentam queda substancial na intensidade, tanto da banda de Soret ($\lambda = 425 \text{ nm}$), quanto das bandas Q (inserto da Figura 53a). O volume máximo adicionado à solução durante o experimento foi equivalente a 4% do volume total da amostra, de modo que se pode descartar efeitos de diluição, pois a intensidade da banda de Soret perdeu cerca de 30% de sua intensidade de absorção com a adição de PQ.

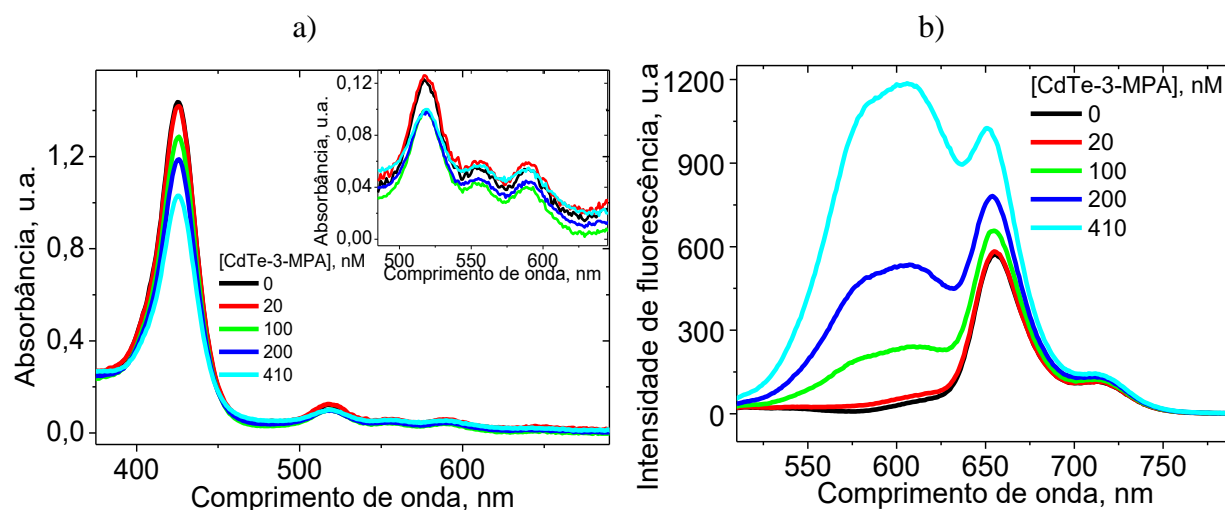


Figura 53. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 15 mM de SDS na ausência e na presença de diversas concentrações de PQ. Inseto de a): espectros das bandas Q da TMPyP nas diferentes concentrações de PQ.

Os espectros da fluorescência do sistema TMPyP + SDS (micelas) com diferentes concentrações de CdTe-3-MPA apresentam aumento em sua intensidade total e a mudança do seu perfil espectral. A deconvolução em componentes gaussianas dos espectros de fluorescência mostrou que a adição de PQ na solução induz a formação de uma nova componente com máximo em $\lambda_5 = (585 \pm 2) \text{ nm}$ cuja intensidade cresce com o aumento da concentração do PQ e finalmente se torna mais intensa que as outras componentes (Figura 54a,b).

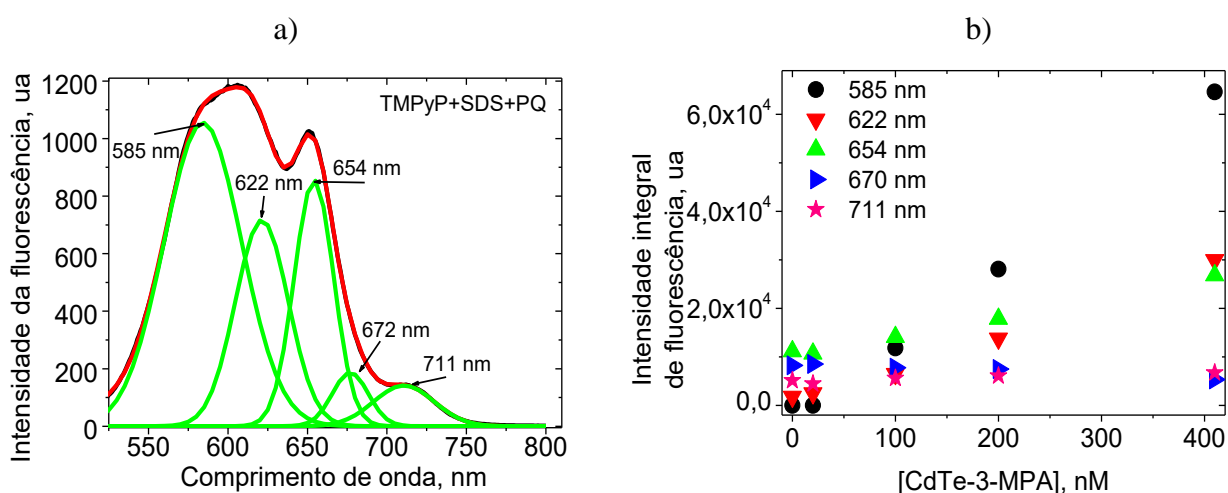


Figura 54. Deconvolução gaussiana do espectro da fluorescência do sistema TMPyP ($5,5 \mu\text{M}$) + SDS (15 mM) + PQ (410 nM) (a) e dependência da intensidade integral de componentes gaussianas de deconvolução em função de concentração de PQ.

Além da formação desta nova componente, também se nota que com o aumento da concentração de PQ, aumenta-se a intensidade das componentes de $\lambda_1 = (622 \pm 5)$ nm e $\lambda_2 = (654 \pm 2)$ nm, enquanto que as intensidades das componentes $\lambda_3 = (670 \pm 5)$ nm e $\lambda_4 = (711 \pm 5)$ nm continuam praticamente inalteradas. A componente de emissão, com pico em $\lambda_5 = (585 \pm 2)$ nm, surge e começa crescer a partir de concentrações $[\text{CdTe-3-MPA}] > 20$ nM.

O pico de emissão, observado anteriormente para o sistema TMPyP...Cde-3-MPA (Figura 25), é considerado como o pico da fluorescência do complexo com transferência de carga entre PQ e porfirina em meio aquoso e localiza-se em $\lambda = 632$ nm [32]. Associamos a componente $\lambda_5 = (585 \pm 2)$ nm com a fluorescência do complexo de transferência de carga entre PQ e porfirina ligada às moléculas de SDS. Tratando os dados da intensidade desta componente em função da concentração de PQ, de acordo com a equação (32), encontrou-se uma constante de formação para este complexo (Figura 55)

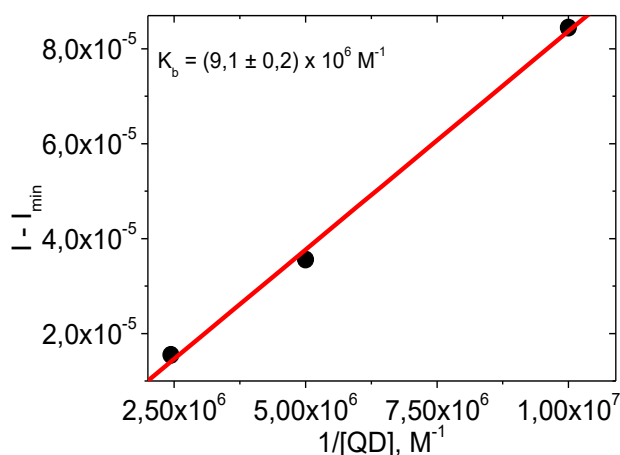


Figura 55. Tratamento de dados da intensidade integral da componente $\lambda_5 = 585$ nm em função da concentração de PQ usando a equação (32).

É possível observar que a constante de formação de complexo $K_b = (9,1 \pm 0,2) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, obtida na presença de SDS, indica que as micelas de SDS dificultam a formação do complexo, provavelmente devido á repulsão eletrostática entre moléculas SDS e PQ.

A seguir, foram analisados os efeitos da adição de SDS ao complexo [TMPyP...CdTe-3-MPA] já formado.

Foi preparada uma solução com $[TMPyP] = 5,5 \mu\text{M}$ e $[\text{CdTe-3-MPA}] = 160 \text{ nM}$, concentrações utilizadas para criar o complexo de transferência de carga. Ao observar a total formação do complexo, estudou-se os efeitos nas características espectrais do complexo em diferentes concentrações de SDS.

A absorção ótica da solução, apresentada na Figura 56a, mostra que a adição de SDS em uma solução contendo o complexo TMPyP...CdTe-3-MPA induz um grande aumento da absorbância da solução, seguido por uma diminuição da absorção em função da concentração de SDS no meio (inserto 2 da Figura 56a), além de estreitamento da banda de absorção e deslocamento do seu máximo de 450 nm até 445 nm. Efeitos semelhantes foram observados para as bandas de absorção na região Q (inserto 1 da Figura 56a).

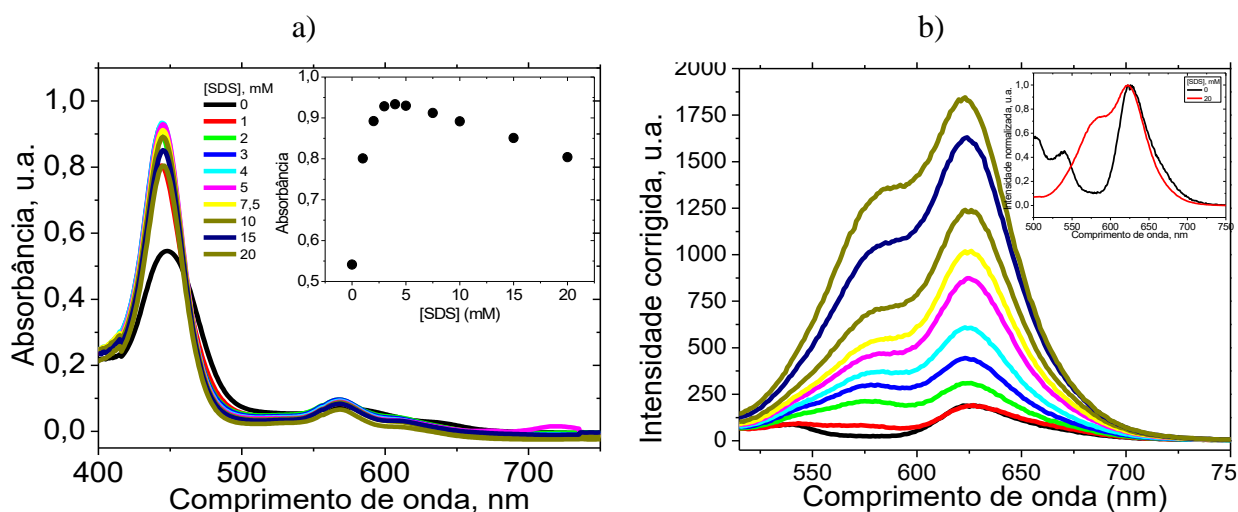


Figura 56. Espectros de a) absorção ótica e de b) luminescência do complexo formado com $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP e 160 nM de CdTe-3-MPA na ausência e presença de diversas concentrações de SDS excitando em $\lambda = 432 \text{ nm}$. Insetos: 1a) espectros de absorção ótica entre 450 nm e 700 nm do complexo na ausência e na presença de diversas concentrações de SDS; 2a) absorbância em $\lambda = 450 \text{ nm}$ em função da concentração de SDS; inserto de b): espectros de luminescência normalizados na ausência (preto) e na presença de 20 mM de SDS (vermelho).

À medida que se adiciona SDS à solução contendo o complexo TMPyP...CdTe-3-MPA é observado que o espectro de fluorescência, que inicialmente apresenta apenas um pico de emissão localizado em 625 nm , apresenta grande aumento da intensidade de luminescência e a formação de uma nova banda de luminescência localizada em $\lambda = 585 \text{ nm}$.

É possível observar uma pequena discrepância da posição do pico da luminescência do complexo TMPyP...Cde-3-MPA na ausência de SDS, obtida nessa sessão ($\lambda = 625$ nm), ao se comparar com o valor obtido anteriormente ($\lambda = 632$ nm). Esta variação pode ser atribuída às características de síntese do PQ, visto que o método de síntese empregado para a confecção do CdTe-3-MPA gera PQs com alta dispersão de tamanhos dentro de uma mesma solução, porém em torno de uma média, calculada conforme a equação (25) [68].

O inserto da Figura 56b apresenta as curvas normalizadas da emissão do complexo na ausência de SDS (preto) e na presença de 20 mM de SDS (vermelho). Fica claro que a presença de SDS gera um novo pico de emissão em 585 nm e este pico tem praticamente o mesmo comprimento de onda do pico chamado como banda 1 na Figura 54. Isto foi confirmado usando a deconvolução gaussiana dos espectros.

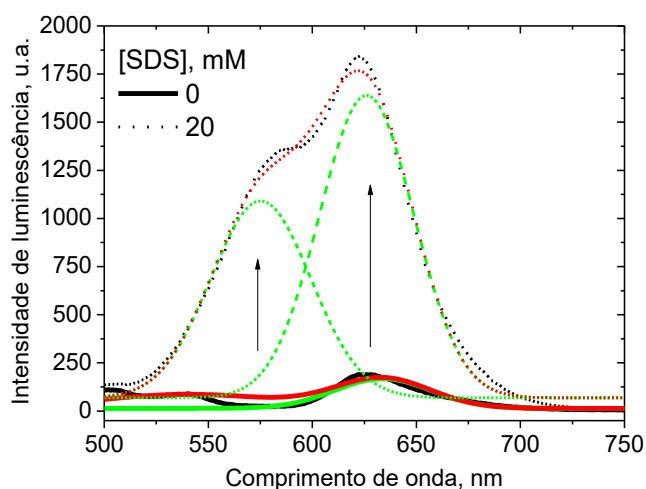


Figura 57. Deconvolução gaussiana do espectro de fluorescência de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 160 nM de PQ na ausência (linha) e na presença de 20 mM de SDS (pontilhado) excitando em $\lambda = 430 \text{ nm}$.

A Figura 57 mostra, através da deconvolução gaussiana dos espectros de emissão do complexo na presença (linha pontilhada) e na ausência (linha contínua) de SDS, o surgimento de uma nova banda de emissão em $\lambda_1 = (585 \pm 10) \text{ nm}$ e o aumento da banda em $\lambda_2 = (625 \pm 5) \text{ nm}$ com a adição de SDS à solução. Além disso, adição do SDS na solução de complexo também altera as curvas de decaimento da intensidade da fluorescência (Figura 58a, b).

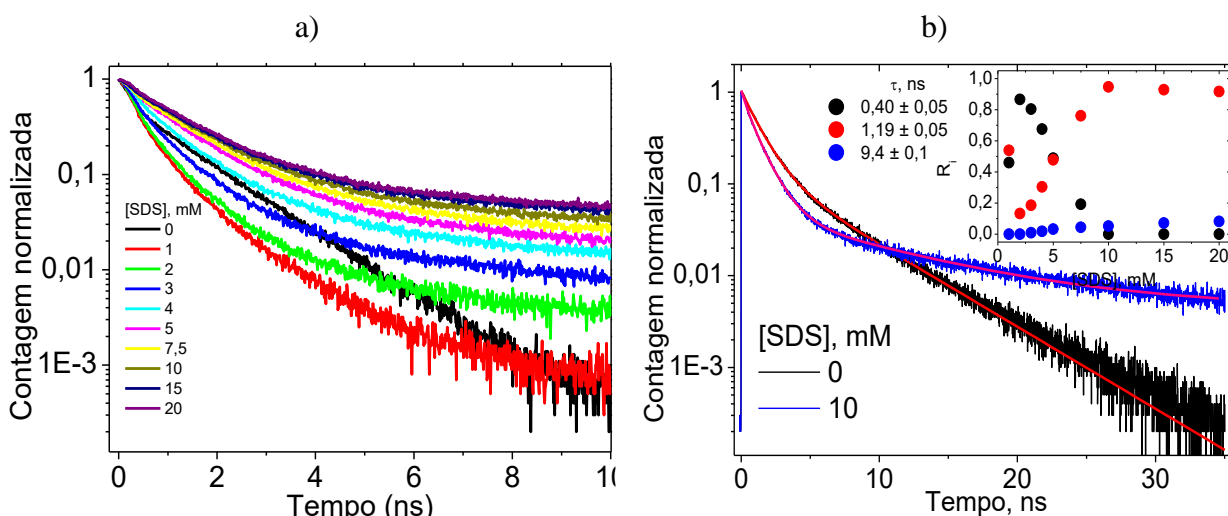


Figura 58. a) Curvas de decaimento temporal da intensidade da fluorescência de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 160 nM de Cde-3-MPA na presença de diferentes concentrações de SDS e b) Curvas de decaimento temporal da intensidade da fluorescência da solução de TMPyP com CdTe-3-MPA para concentrações de SDS entre 0 e 10 mM e seus respectivos ajustes. Inseto: contribuições das componentes temporais das curvas de decaimento da intensidade da fluorescência R_i em função da concentração de SDS.

Na ausência de SDS a curva de decaimento é biexponencial, sendo composta de duas componentes monoexponenciais com tempos de vida $\tau_1 = (1,2 \pm 0,1) \text{ ns}$ e $\tau_2 = (4,9 \pm 0,2) \text{ ns}$ (Figura 58b, Tabela 2).

Como já mencionado anteriormente, τ_1 está associado com a fluorescência do complexo TMPyP...PQ, enquanto que τ_2 está relacionado com a fluorescência de monômeros de porfirina que estão em equilíbrio com complexo.

Logo na primeira adição de SDS, em concentração de 1 mM, o perfil da curva de decaimento se torna triexponencial (Figura 58b, Tabela 2) com os tempos de vida das componentes de $\tau_1 = (1,19 \pm 0,05) \text{ ns}$, $\tau_2 = (0,40 \pm 0,05) \text{ ns}$ e $\tau_3 = (9,4 \pm 0,1) \text{ ns}$.

A análise das contribuições das componentes R_i mostrou que quando $[\text{SDS}] \leq 2 \text{ mM}$ a contribuição da primeira componente do tempo de vida diminui e a da segunda aumenta. Já em $[\text{SDS}] < 2 \text{ mM}$ a contribuição da primeira componente começa a crescer, enquanto que a da segunda diminui. Ambos os processos saturam em $[\text{SDS}] = 10 \text{ mM}$.

Tabela 2. Tempos de vida τ_i das componentes temporais das curvas de decaimento da intensidade da fluorescência do sistema TMPyP...CdTe-3-MPA formado a partir de 5,5 μM de TMPyP e 160 nM de CdTe-3-MPA e suas respectivas contribuições R_i em função da concentração de SDS no meio.

[SDS], mM	τ_1 , ns	R_1	τ_2 , ns	R_2	τ_3 , ns	R_3
0	1.2	0.86	--	--	4.9	0.17
1	1.3	0.55	0.3	0.47	8.0	0,005
2	1.19	0.14	0.4	0.91	9.4	0,008
3	1.19	0.2	0.4	0.86	9.2	0.01
4	1.18	0.32	0.45	0.71	9.3	0.02
5	1.15	0.51	0.45	0.52	9.5	0.035
7,5	1.16	0.79	0.41	0.2	9.5	0.047
10	1.19	0.89	--	0	9.4	0.05
15	1.15	0.91	--	0	9.4	0.07
20	1.16	0.89	--	0	9.5	0.08

Associamos o tempo τ_1 com a fluorescência do complexo TMPyP...PQ, pois este tempo não apresenta alterações na presença ou na ausência de SDS.

Podemos concluir que os complexos formados, tanto livres quanto ligados com SDS, possuem tempo de vida de fluorescência bem próximos.

O tempo τ_2 foi associado aos agregados de complexo, formados pela interação com SDS em baixa concentração. Quando a concentração de SDS aumenta, os agregados de complexo, ligados a SDS se desagregam formando monômeros de complexos ligados com SDS. Os complexos TMPyP...PQ-SDS e TMPyP...PQ ficam em equilíbrio dinâmico. Por isto que o aumento da concentração de complexo TMPyP...PQ-SDS está acompanhado pelo aumento da concentração do complexo TMPyP...PQ.

Essas interações explicam porque o aumento da concentração de SDS causa aumento paralelo da banda com pico em $\lambda = 585$ nm, associada com a fluorescência do complexo TMPyP...PQ-SDS, e da banda com pico em $\lambda = 625$ nm, associada com a fluorescência do complexo TMPyP...PQ.

A natureza da componente de fraca contribuição, com tempo de vida $\tau_3 = (9,4 \pm 0,1)$ ns, que cresce com o aumento da concentração de SDS, ainda não está clara. Para elucidar esta natureza mais experimentos são necessários. O mais provável é que esta componente esteja associada à formação de agregados de complexos mistos TMPyP...PQ-SDS – TMPyP...PQ.

3.5.2. Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA na presença de CTAB

Preparou-se uma solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP em tampão fosfato de pH 6,8. Essa solução foi titulada com diversas concentrações de CTAB, no intervalo de 0 até $[\text{CTAB}] = 2 \text{ mM}$, e monitoradas as alterações espectrais da solução. A concentração foi escolhida por ser acima da CMC do surfactante CTAB na água, que é de $[\text{CTAB}] = 1 \text{ mM}$ [82].

Já é conhecido da literatura que a porfirina TMPyP em meio aquoso possui pouca interação com o surfactante de carga positiva CTAB devido à repulsão eletrostática que ocorre entre estas duas espécies, conforme demonstrado em [27,37]. Isto faz com que a presença de CTAB não altere as características espectrais da porfirina, de modo que não foram observadas mudanças significativas nos espectros de absorção ou de fluorescência da porfirina.

Em seguida, adicionou-se o PQ de CdTe-3-MPA à solução contendo $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP e 2 mM de CTAB e seus espectros foram monitorados e estão mostrados na Figura 59a,b.

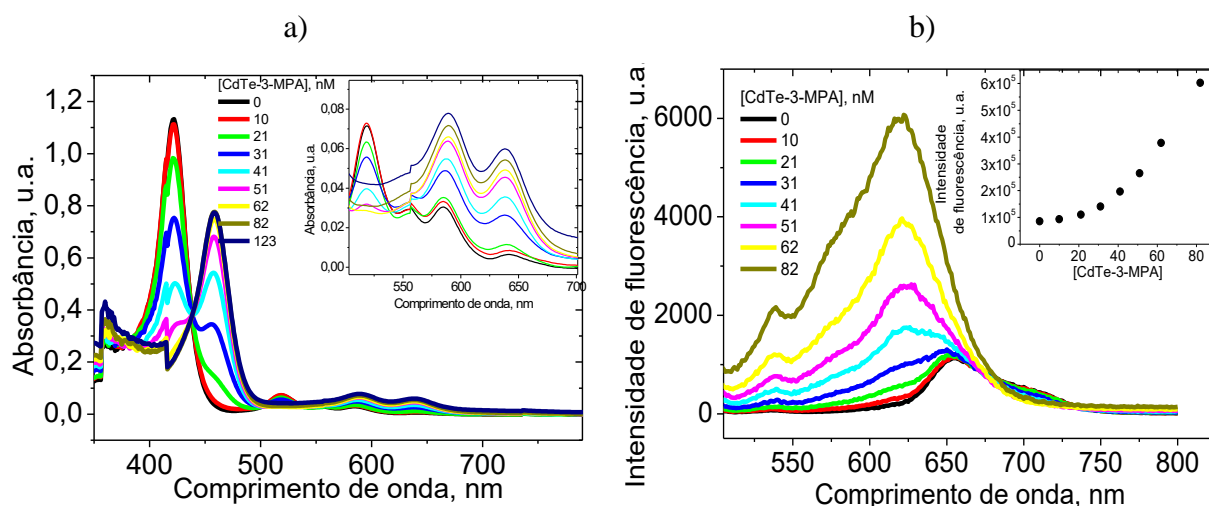


Figura 59. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 2 mM de CTAB em diferentes concentrações de CdTe-3-MPA. Inseto de a): absorção ótica da região das bandas Q ($450 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$); inseto de b) intensidade integral de fluorescência em função da concentração de CdTe-3-MPA

O perfil do espectro de absorção do sistema TMPyP + CTAB sofre uma mudança considerável com o aumento da concentração de PQ no meio. Além disso, a adição do PQ induz a formação de um novo pico de emissão em $\lambda_{em} = 460$ nm, a queda no pico de emissão da banda de Soret em $\lambda = 422$ nm (Figura 59a) e gera mudanças no perfil espectral do conjunto de picos das bandas Q da porfirina (inserto da Figura 59a).

É possível notar a presença de um ponto isobéstico, em $\lambda = 437$ nm, entre os espectros de absorção na presença de diferentes concentrações de PQ, o que indica a presença de duas espécies, a saber: TMPyP e complexo de transferência de carga TMPyP...CdTe-3-MPA.

Os espectros de absorção se comportam de forma similar ao observado no sistema TMPyP...PQ em meio aquoso, detalhado na Seção 3.2. Os espectros de fluorescência da solução de TMPyP com CTAB na presença de diferentes concentrações de PQ (Figura 59b) apontam que o pico de emissão da porfirina em 655 nm é deslocado para 624 nm. Além disso, a intensidade integral de fluorescência do sistema aumenta consideravelmente na presença do PQ de CdTe-3-MPA.

A mudança do perfil do espectro da emissão é semelhante ao comportamento observado na ausência do surfactante, pois o deslocamento do pico de emissão em meio aquoso é de 655 nm para 632 nm. Entretanto, na ausência de CTAB foi observada a diminuição da intensidade da emissão, quando que na presença de CTAB observamos seu aumento.

Analisando a intensidade integral da fluorescência, utilizando a equação (32), é observado que a taxa de formação de complexo para o sistema TMPyP...CdTe-3-MPA na presença de CTAB é de $k = (1,9 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (Figura 60).

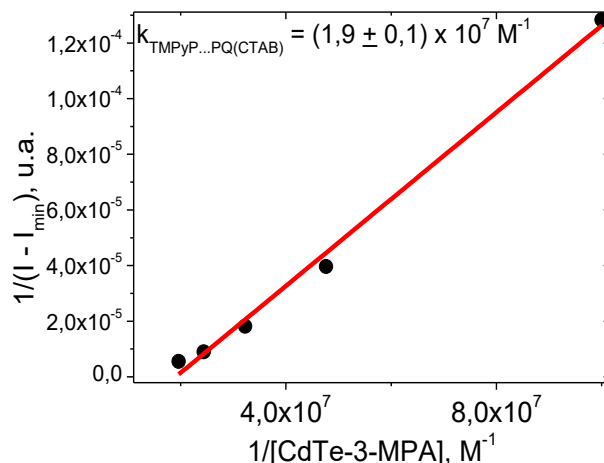


Figura 60. Ajuste da intensidade integral da fluorescência da solução de $5,5 \mu M$ de TMPyP em função do inverso da concentração de CdTe-3-MPA utilizando a equação (32)).

Ao comparar o valor da constante de formação de complexo k na ausência ($k = (6,0 \pm 0,5) \times 10^6 M^{-1}$) e na presença de CTAB ($k = (1,9 \pm 0,1) \times 10^7 M^{-1}$) nota-se que a constante na ausência do surfactante é 3,2 vezes menor do que em sua presença.

Os tempos de vida de fluorescência da solução de $5,5 \mu M$ de TMPyP e 2 mM de CTAB na presença de diversas concentrações de PQ estão mostrados na Figura 61a. Na ausência de PQ, a solução apresenta apenas um tempo de vida (monoexponencial) de $\tau_1 = (4,5 \pm 0,2)$ ns associado à amplitude I_1 . A adição de PQ não altera este tempo de vida, mas faz com o decaimento se torne biexponencial, surgindo um novo tempo de vida de $\tau_2 = (0,74 \pm 0,3)$ ns associado à amplitude I_2 . A dependência do conteúdo destas componentes I_1 e I_2 calculados de acordo com a equação (28) em função da concentração de CdTe-3-MPA estão mostradas na Figura 61b.

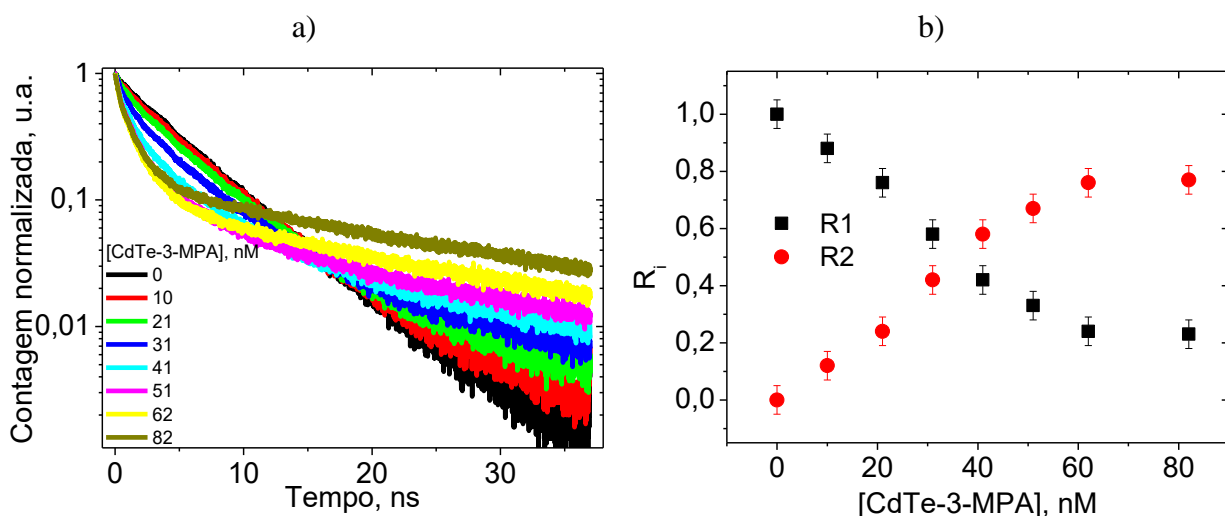


Figura 61. a) Intensidade de fluorescência normalizada em função do tempo em $\lambda_{em} = 633$ nm da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 2mM de CTAB em diversas concentrações de PQ excitando em 432 nm, b) contribuição relativa dos tempos τ_1 (R_1 , preto) e τ_2 (R_2 , vermelho) do decaimento temporal da intensidade de fluorescência em função da concentração de PQ.

O tempo de vida τ_1 está associado ao tempo de vida da fluorescência da porfirina na presença do surfactante CTAB, conforme demonstrado em [72]. Desta forma, associamos o tempo de vida τ_2 ao complexo TMPyP...CdTe-3-MPA. Este tempo é diferente daquele que foi observado na ausência de CTAB ($\tau_2 = (1,6 \pm 0,2)$ ns). Assim, podemos associar esta componente com o complexo TMPyP...CdTe-3-MPA ligado ao CTAB.

A Figura 61b mostra a evolução de cada componente temporal. É possível perceber que a adição de PQ à solução faz com que diminua a contribuição do tempo de vida relacionado à fluorescência da porfirina e aumente a contribuição do tempo de vida associado ao complexo de transferência de carga, indicando que a porfirina está sendo consumida para a formação do complexo (reforçado pelo surgimento do ponto isobéstico mostrado na Figura 59a).

Estes resultados apontam que a presença de CTAB não impede ou dificulta a formação do complexo, pelo contrário, aumenta a interação entre TMPyP e o PQ.

Prosseguindo nos estudos dos efeitos do CTAB na interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA, estudou-se como a adição de CTAB altera as características espectrais do complexo formado entre a porfirina TMPyP e o PQ de CdTe-3-MPA

A absorvância do complexo (Figura 62a), que tem máximo em $\lambda = 460$ nm, não sofre qualquer alteração em seu perfil espectral com a adição de CTAB. Por outro lado, é perceptível um aumento inicial da absorvância no pico de absorção do complexo até $[\text{CTAB}] = 0,25$ mM seguido por uma queda da absorção para maiores concentrações de surfactante.

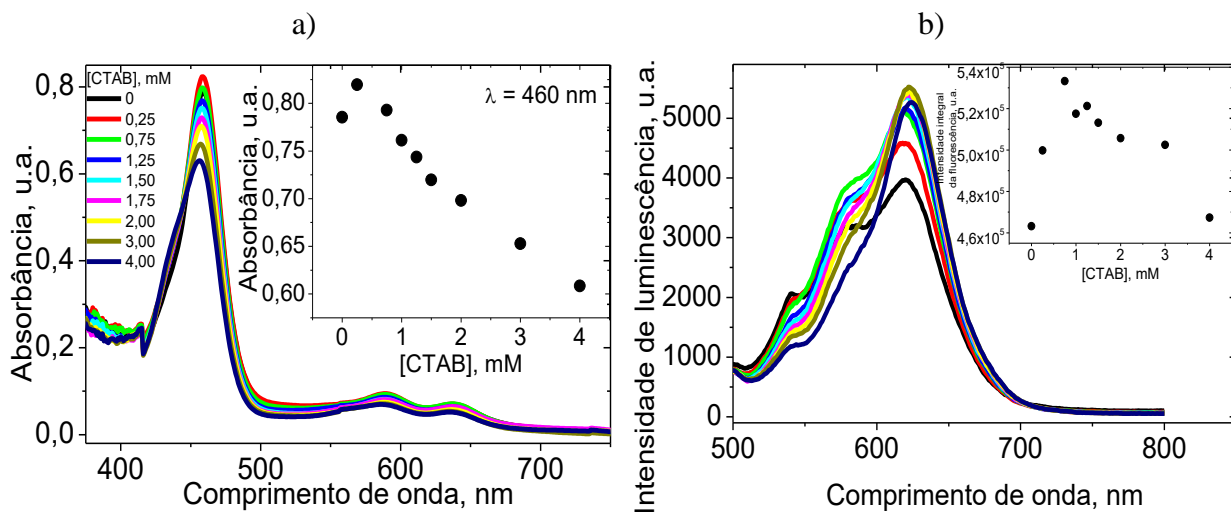


Figura 62. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência excitando em $\lambda = 432$ nm da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 180 nM de CdTe-3-MPA na presença de diversas concentrações de CTAB. Inseto de a) absorvância em 460 nm em função da concentração de CTAB. Inseto de b): Intensidade integral de fluorescência em função da concentração de CTAB.

O espectro de fluorescência do sistema da Figura 62b apresenta comportamento semelhante ao observado na absorção, ou seja, pouca mudança no perfil espectral e a intensidade aumenta com maior a concentração de CTAB até $[\text{CTAB}] = 0,75$ mM apresentando queda na intensidade para maiores concentrações do surfactante.

3.5.3. Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA na presença de Triton X-100

Esta seção e a próxima tratarão a respeito da interação entre a TMPyP e o PQ de CdTe-3-MPA na presença de surfactantes com carga líquida neutra. Especificamente nesta, serão mostrados os dados relativos aos experimentos envolvendo o surfactante Triton X-100, que não possui carga líquida e nem polos carregados.

Foi preparada uma solução de 5,5 μM de TMPyP em pH 6,8. Nessa solução foi adicionado alíquotas do surfactante neutro Triton X-100 e monitorado os espectros de absorção e de fluorescência, conforme Figura 63a, b.

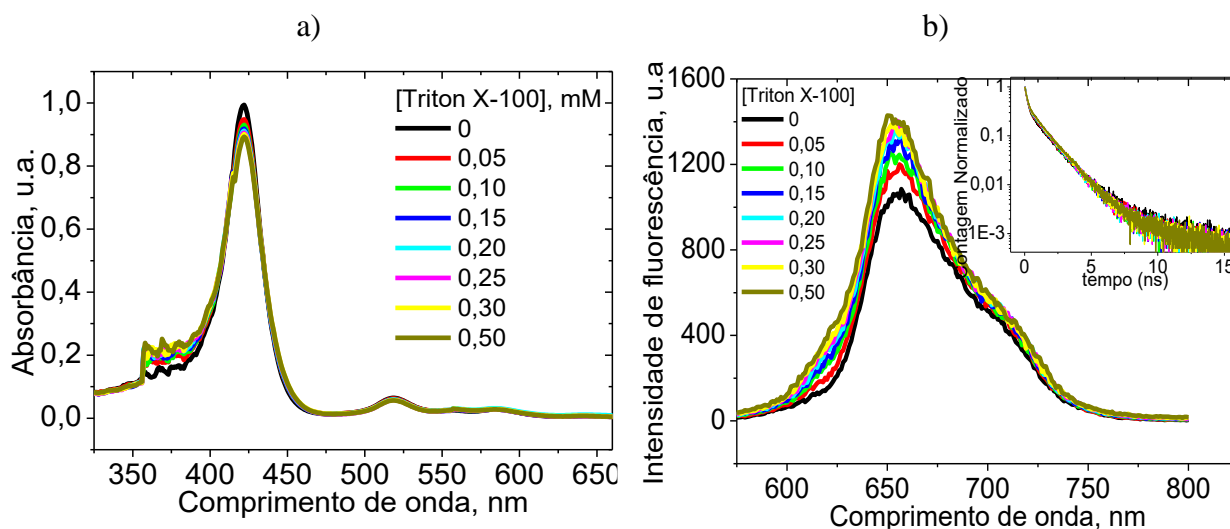


Figura 63. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência estática ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de 5,5 μM de TMPyP na presença de diferentes concentrações de TRITON X-100. Inseto de b) decaimento da intensidade de emissão da porfirina na presença de diferentes concentrações de Triton X-100 em $\lambda_{em} = 655 \text{ nm}$ em função do tempo.

Os espectros de absorção e de fluorescência da porfirina, bem como o perfil de decaimento temporal da intensidade de fluorescência não sofreram alterações significantes com a adição do surfactante não aniônico Triton X-100. A curva de decaimento temporal permanece com perfil monoexponencial e possui tempo de vida $\tau = (4,6 \pm 0,1) \text{ ns}$, que corresponde ao tempo de vida característico da TMPyP.

O espectro de fluorescência sofre aumento de intensidade com a adição do surfactante. Utilizando a equação (32), o ajuste da Figura 64 fornece uma constante de ligação $k = (5,0 \pm 0,5) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$. Entretanto, devido ao baixo valor dessa constante não podemos confirmá-lo como significativo, concluindo somente que a interação entre TMPyP e Triton X-100 é fraca.

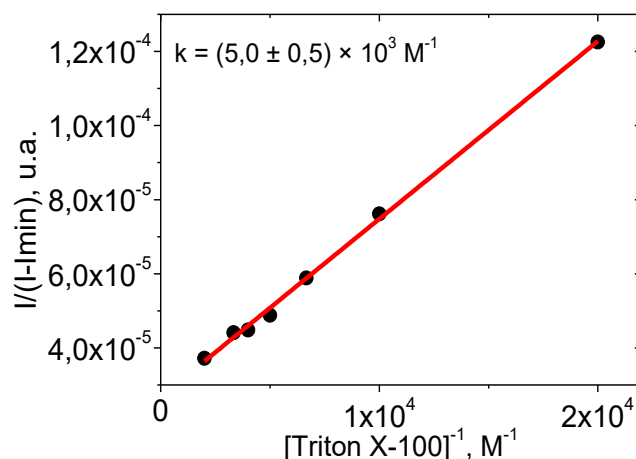


Figura 64. Ajuste da integral da fluorescência da solução de TMPyP em diversas concentrações de Triton X-100 usando a equação (32).

A concentração micelar crítica (CMC) do Triton X-100 em solução aquosa na presença da TMPyP é dada na literatura como 0,22 mM [72,83]. Assim, foi preparada uma solução de 5,5 μM de TMPyP com 0,5 mM de Triton X-100 e esta amostra foi titulada com o PQ de CdTe-3-MPA enquanto os espectros de absorção e de fluorescência eram monitorados.

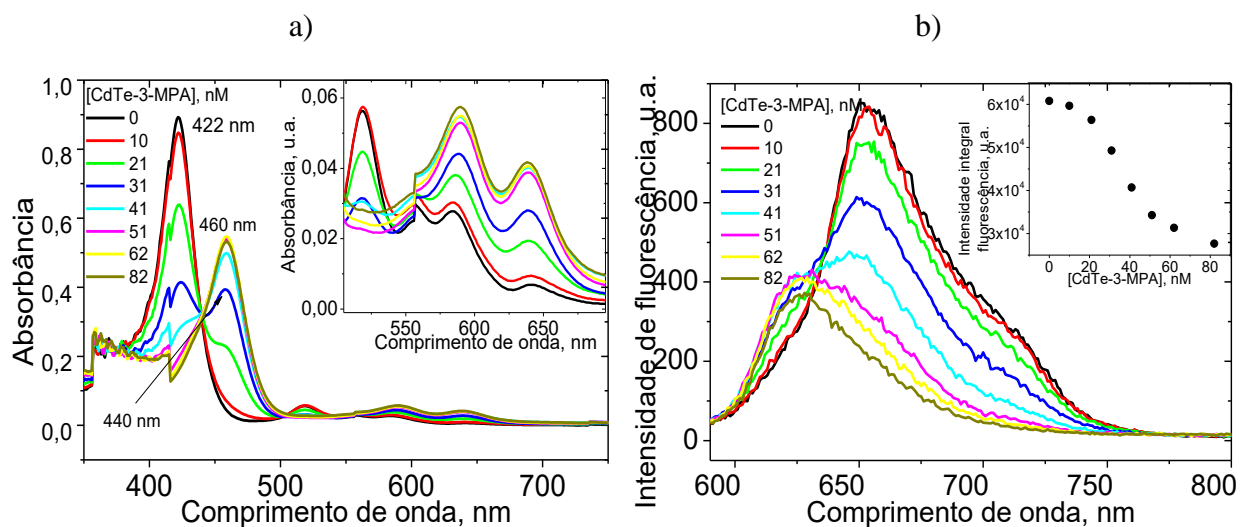


Figura 65. Espectro de a) absorção óptica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 0,5 mM de Triton X-100 na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA. Inserto de a) espectros de absorção óptica das bandas Q da solução de porfirina com Triton X-100 em diferentes concentrações de PQ. Inserto de b) Intensidade integral de fluorescência da solução de TMPyP com Triton X-100 em função da concentração de PQ.

A absorção ótica da TMPyP na presença de Triton X-100, enquanto se adiciona o PQ de CdTe-3-MPA (Figura 65a), apresenta comportamento semelhante ao observado na ausência do surfactante (Figura 21a). O pico da banda de Soret é deslocado de $\lambda = 422$ nm para $\lambda = 460$ nm e é observado um ponto isobéstico entre os espectros em $\lambda = 440$ nm. Isto indica que a presença do surfactante neutro não causa nenhuma mudança significativa nos espectros de absorção ótica do sistema TMPyP...PQ.

Os espectros de fluorescência (Figura 65b) apresentam uma mudança de perfil com o pico de emissão sendo deslocado de $\lambda = 650$ nm para $\lambda = 625$ nm, semelhante ao deslocamento observado na ausência do surfactante (Figura 21b) em que foi observado que o pico de emissão é deslocado de $\lambda = 655$ nm para $\lambda = 632$ nm. A intensidade integral da fluorescência apresenta uma diminuição com a adição de PQ.

A intensidade integral de fluorescência foi ajustada utilizando a equação (11), conforme Figura 66.

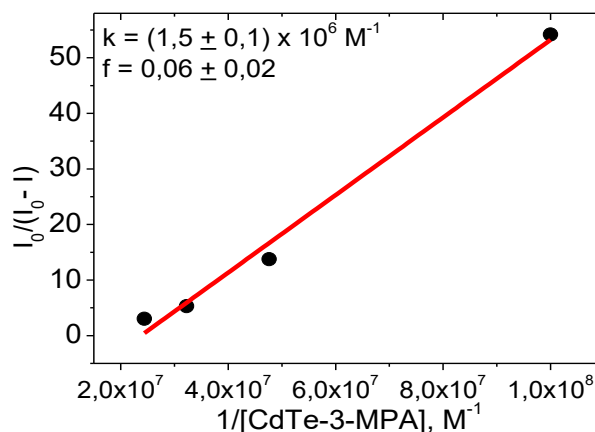


Figura 66. Ajuste da intensidade integral da fluorescência da solução de $5,5 \mu M$ de TMPyP com $0,5 mM$ de Triton X-100 em função da concentração de CdTe-3-MPA.

A constante de ligação da TMPyP com o PQ na presença do Triton X-100 é de $K_{SV} = (1,5 \pm 0,1) \times 10^6 M^{-1}$ e possui fator de acessibilidade de $f = (0,06 \pm 0,02)$. Esse valor da constante de ligação é quatro vezes menor do que a constante obtida na ausência do surfactante ($K_{SV} = (6,0 \pm 0,5) \times 10^6 M^{-1}$). O fator de acessibilidade é, aproximadamente, 20 vezes menor que na ausência de surfactante.

O decaimento temporal da intensidade de fluorescência solução em função da concentração de PQ, mostrado na Figura 67a, apresenta comportamento muito semelhante ao observado na ausência do Triton X-100 (Figura 23).

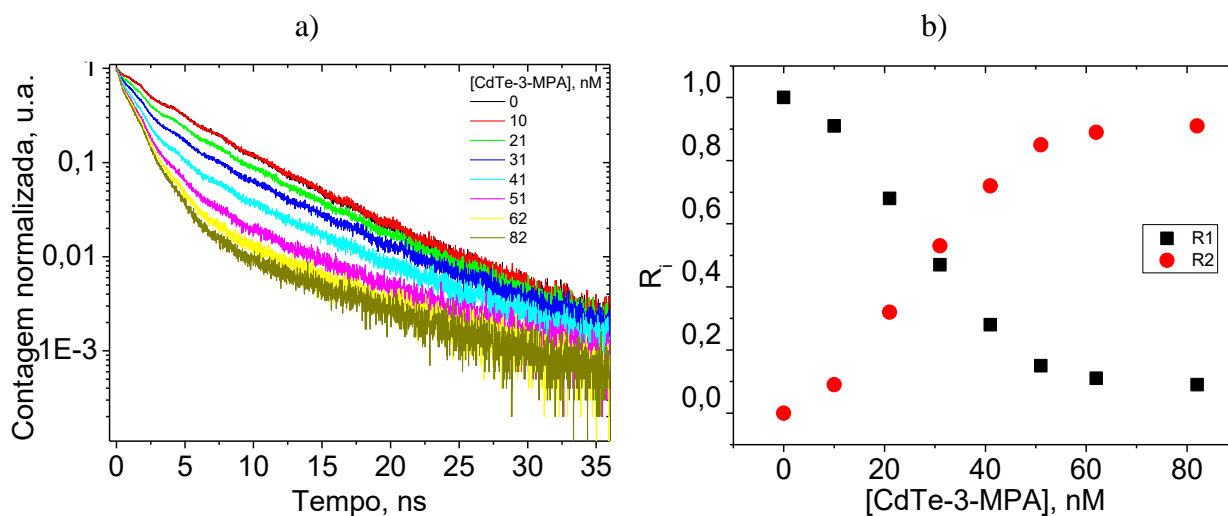


Figura 67. a) Decaimento temporal da intensidade de fluorescência normalizada ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com $0,5 \text{ mM}$ de Triton X-100 na ausência e na presença de diversas concentrações do PQ de CdTe-3-MPA e b) Contribuição das componentes do decaimento temporal da intensidade de fluorescência com os tempos de vida τ_1 e τ_2 do decaimento temporal da intensidade de fluorescência em função da concentração de PQ na solução.

Observa-se na Figura 67a que na ausência de PQ a fluorescência da solução de TMPyP com Triton X-100 apresenta decaimento monoexponencial com tempo de vida $\tau_1 = (4,5 \pm 0,1) \text{ ns}$.

A adição de PQ faz com que surja uma segunda componente com tempo de vida $\tau_2 = (1,2 \pm 0,1) \text{ ns}$ e estes tempos de vida não dependem da concentração de PQ (Figura 67b). Além disso, os tempos de vida obtidos neste experimento são muito próximos dos tempos de vida obtidos na ausência do surfactante neutro ($\tau_1 = (5,3 \pm 0,2) \text{ ns}$ e $\tau_2 = (1,6 \pm 0,2) \text{ ns}$).

Pode-se concluir que a presença de Triton X-100 não influencia nas características do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA. Entretanto, independentemente da fraca interação entre TMPyP e Triton X-100, sua presença diminui tanto a probabilidade de formação de complexo TMPyP...PQ, quanto a acessibilidade do PQ para a TMPyP.

Para analisar os efeitos que a inserção do surfactante aniônico Triton X-100 causa no complexo já formado foi preparada uma solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP e 160 nM de CdTe-3-MPA

em pH 6,8. Esta solução foi titulada com Triton X-100 e suas características espectrais foram monitoradas, conforme mostrado na Figura 68a, b.

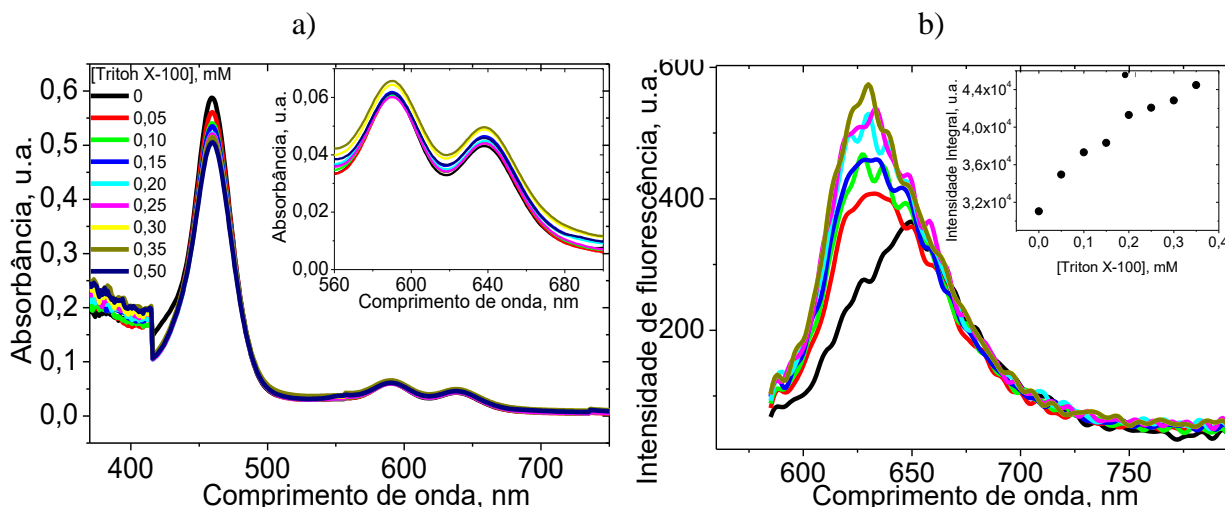


Figura 68. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP e 160 nM do PQ de Cde-3-MPA, excitando em $\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$, na ausência e na presença de diversas concentrações do surfactante neutro Triton X-100. Inseto de a): espectros de absorção das bandas Q do complexo. Inseto de b): Intensidade integral da fluorescência corrigida em função da concentração de Triton X-100.

Os espectros de absorção ótica (Figura 68a) mostram que a adição de Triton X-100 não causa qualquer alteração no perfil espectral do complexo já formado, mantendo o pico de absorção em $\lambda = 460 \text{ nm}$ independentemente da concentração do surfactante. As bandas Q, mostradas no inserto, também não sofreram qualquer alteração no perfil. Há queda de intensidade no espectro de absorção, sendo que, na presença de $0,50 \text{ mM}$ de Triton X-100, a intensidade em $\lambda = 460 \text{ nm}$ é de 14% em relação ao espectro na ausência de Triton X-100. Dessa forma esta queda de intensidade da absorção é atribuída a efeitos de diluição.

Os espectros de fluorescência (Figura 68b) foram corrigidos pela intensidade de absorção e mostram que a adição de Triton X-100 ao complexo aumenta fracamente sua fluorescência com o pico 630 nm (inserto da Figura 68b). Para a obtenção da constante de interação K foi utilizada a equação (32).

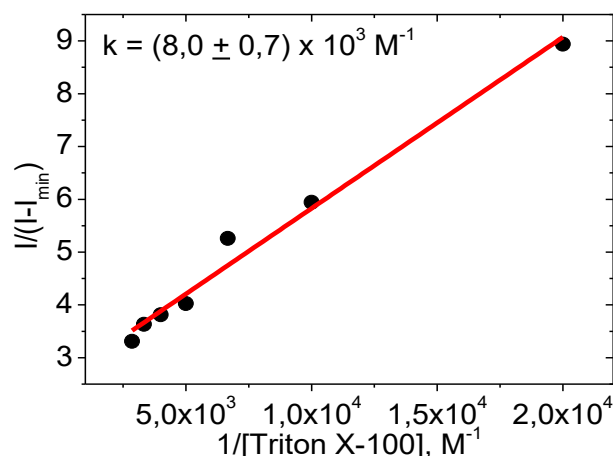


Figura 69. Ajuste da intensidade integral de fluorescência da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP e 160 nM de Cde-3-MPA em função da concentração de Triton X-100 utilizando a equação (32).

A Figura 69 mostra que a constante de ligação encontrada para a interação da fluorescência do complexo com o surfactante Triton X-100 foi $k = (8 \pm 1) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$

Os experimentos de espectroscopia de fluorescência com resolução temporal mostram as características de decaimento da intensidade da luminescência do complexo na ausência e na presença de Triton X-100, conforme é possível observar na Figura 70a.

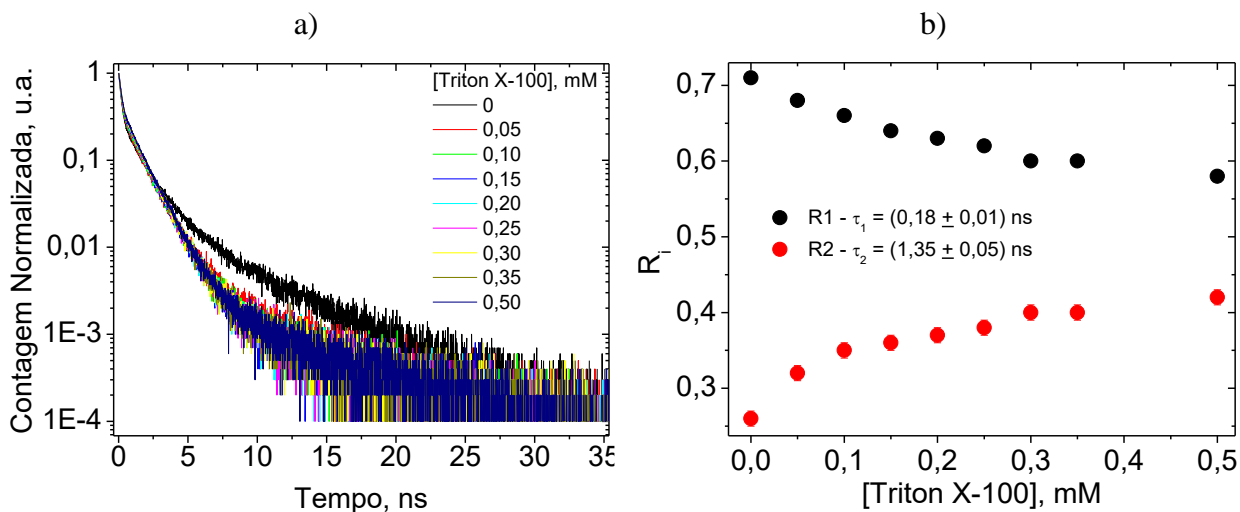


Figura 70. a) Curvas de decaimento temporal da intensidade da luminescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$ $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) do complexo formado a partir de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP e 160 nM de CdTe-3-MPA na ausência e na presença de diversas concentrações de Triton X-100 e b) Contribuição dos tempos de vida τ_1 e τ_2 do decaimento temporal da intensidade de fluorescência em função da concentração de Triton X-100.

A partir da Figura 70a foram realizados os ajustes utilizando curvas exponenciais. Tanto na ausência quanto na presença do surfactante, o perfil de decaimento da luminescência foi ajustado com uma curva tri exponencial. Entretanto, a componente mais longa possuía a amplitude desprezível (menos de 1% da contribuição na curva), que não depende da concentração do surfactante. Por este motivo associamos este componente com presença de uma pequena impureza nas amostras ou com um problema de equipamento.

Os tempos de vida das duas componentes mantiveram-se constante para todos as concentrações de Triton X-100, sendo $\tau_1 = (0,18 \pm 0,01)$ ns e $\tau_2 = (1,35 \pm 0,05)$ ns.

As contribuições R_1 e R_2 da primeira e da segunda componentes, calculados através da equação (28) estão mostrados na Figura 70b. Observa-se que o aumento da concentração de Triton X-100 produz a diminuição do fator relacionado a contribuição da componente de menor tempo de vida ($\tau_1 = (0,18 \pm 0,01)$ ns) e o aumento do fator relacionado a contribuição da componente de maior tempo de vida ($\tau_2 = (1,35 \pm 0,05)$ ns).

Conforme já discutido anteriormente neste trabalho, o tempo de vida τ_1 é associado à emissão do núcleo do PQ enquanto que o tempo de vida τ_2 está associado ao tempo de vida do complexo. Desta forma, a presença de Triton X-100 produz uma diminuição na contribuição da luminescência do núcleo de CdTe do PQ em relação à luminescência do complexo. Esse fato coincide com o resultado observado da diminuição da acessibilidade da superfície do PQ pelas moléculas de TMPyP. Isto resulta no aumento da luminescência de PQ associada com a superfície do PQ, que está menos suprimida pela TMPyP.

Podemos concluir que devido à ausência de carga do surfactante Triton-100 a interação eletrostática não pode contribuir na sua interação com a porfirina TMPyP, com o PQ CdTe-3-MPA e com seus complexos. Assim, a interação fraca observada deve ser associada com outros tipos de interações, tais como exemplo, as interações hidrofóbicas. Entretanto, para esclarecer a natureza dessa interação é preciso estudos mais detalhados.

3.5.4. Interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA na presença de HPS

Seguindo o padrão experimental apresentado até aqui, passou-se ao estudo dos efeitos do surfactante zwitteriônico HPS na solução de TMPyP, seguida pela interação do PQ com a solução de TMPyP na presença do detergente e da sua interação com o complexo TMPyP...PQ.

A solução de 5,5 μM de TMPyP foi titulada com o surfactante HPS e seus espectros de absorção e de fluorescência foram monitorados – Figura 71a,b.

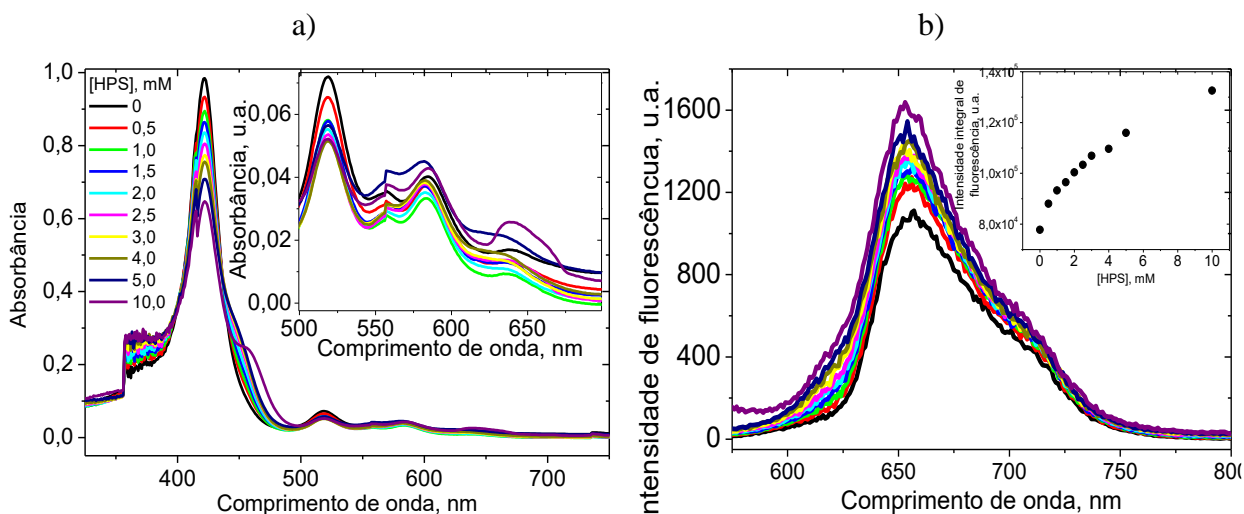


Figura 71. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência corrigida ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de 5,5 μM de TMPyP na ausência e na presença de diferentes concentrações de HPS. Inseto de a): Espectro de absorção ótica da região das bandas Q da porfirina na presença de diversas concentrações de HPS. Inseto de b) Intensidade integral de fluorescência corrigida em função da concentração de HPS.

A adição de HPS causa uma redução significativa na intensidade da banda de Soret ($\lambda = 422 \text{ nm}$) do espectro de absorção ótica da porfirina, porém não causa nenhuma alteração no perfil do espectro. Na concentração $[\text{HPS}] = 10 \text{ mM}$ é possível observar a formação de um novo pico em $\lambda = 455 \text{ nm}$.

A fluorescência da solução apresenta aumento da intensidade com a adição de HPS (inseto da Figura 71b). O perfil do espectro de luminescência não sofre qualquer alteração.

Utilizando a equação (32) foi realizado o ajuste e calculado o valor da constante de formação para este sistema (Figura 72) e a constante obtida para a interação entre TMPyP e HPS calculada em $k = (5,2 \pm 0,3) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

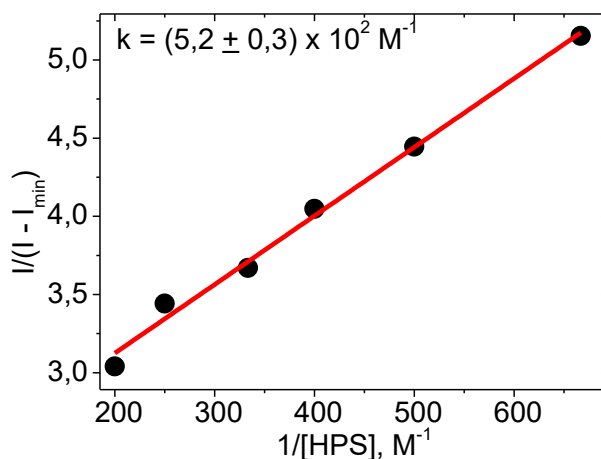


Figura 72. Ajuste a intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP na ausência e na presença de diversas concentrações de HPS utilizando a equação (32).

A concentração micelar crítica (CMC) do HPS na presença da porfirina é dada na literatura como 0,06 mM de CTAB [84]. Assim, foi preparada uma solução de 5,5 μM de TMPyP com 10,0 mM de HPS e esta amostra foi titulada com o PQ de CdTe-3-MPA enquanto os espectros de absorção de fluorescência eram monitorados. Os resultados estão mostrados na Figura 73a,b.

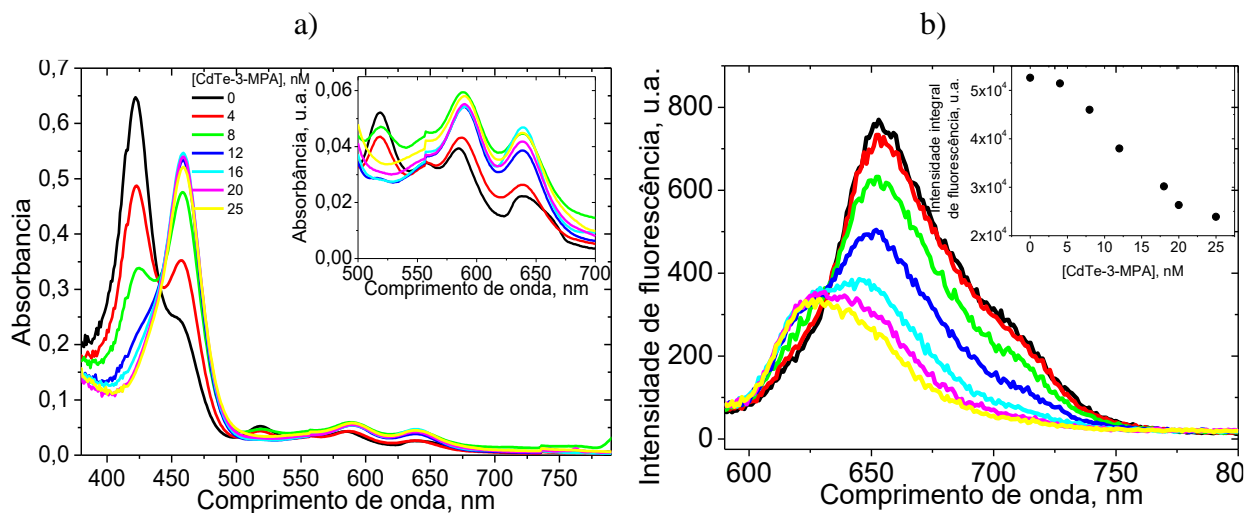


Figura 73. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 432 \text{ nm}$) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 10 mM de HPS na presença de diversas concentrações PQ. Inserto de a) espectros de absorção ótica das bandas Q. Inserto de b) Intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP com HPS em função da concentração de PQ.

Os espectros de absorção (Figura 73a) mostram que a adição do PQ de CdTe-3-MPA na solução de TMPyP na presença de micelas de HPS causa o deslocamento do pico de absorção ótica da banda de Soret de $\lambda = 422$ nm para $\lambda = 460$ nm. Também é possível observar a formação de um ponto isobéstico em $\lambda = 440$ nm, o que indica que há duas espécies que se consomem. Os espectros de absorção também apresentam mudanças nas bandas Q.

Os espectros de luminescência (Figura 73b) apresentam um deslocamento do pico do espectro de luminescência de $\lambda = 650$ nm para $\lambda = 630$ nm. Além disto, observa-se supressão da intensidade total de luminescência, conforme aumenta-se a concentração de PQ no meio (inserto da Figura 73b).

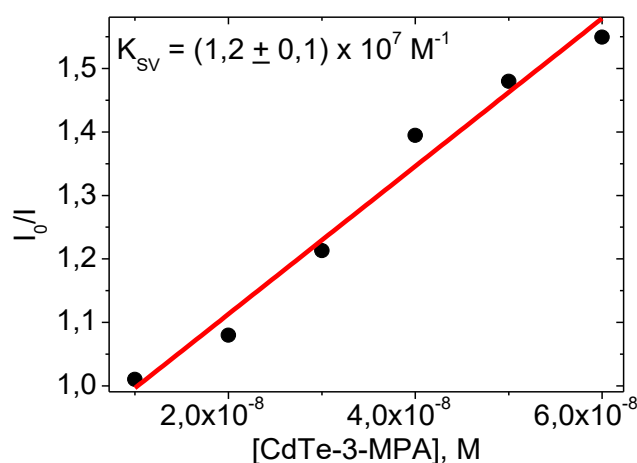


Figura 74. Ajuste da intensidade integral de luminescência utilizando a equação (6) da solução de 5,5 μ M de TMPyP na presença de 10 mM de HPS em função da concentração de PQ.

A Figura 74 mostra o ajuste com a equação de Stern-Volmer (equação (6)) da intensidade de luminescência da solução de TMPyP na presença de HPS em função da concentração do PQ de CdTe-3-MPA, que neste caso está atuando como supressor da luminescência do sistema. Foi obtido o valor da constante de Stern-Volmer de $K_{SV} = (1,2 \pm 0,1) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Na ausência de HPS este valor foi de $K_{SV} = (6,0 \pm 0,5) \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, ou seja, metade do valor obtido na presença de HPS.

Analisando as curvas de decaimento da intensidade da luminescência do sistema TMPyP + HPS, na ausência e na presença de diferentes concentrações do PQ de dTe-3-MPA (Figura 75a), é possível perceber que inicialmente, em $[\text{CdTe-3-MPA}] = 0 \text{ M}$, a curva de decaimento temporal se mostra monoexponencial, com tempo de vida de $\tau = (4,7 \pm 0,1) \text{ ns}$. A

adição do PQ na solução faz com que a curva de decaimento temporal da luminescência se torne biexponencial e permanece com os tempos de vida inalterados em $\tau_1 = (1,0 \pm 0,1)$ ns e $\tau_2 = (4,9 \pm 0,2)$ ns, porém a contribuição do tempo de vida mais curto para a luminescência do sistema aumenta, enquanto que a contribuição do tempo de vida mais longo diminui, conforme Figura 75b.

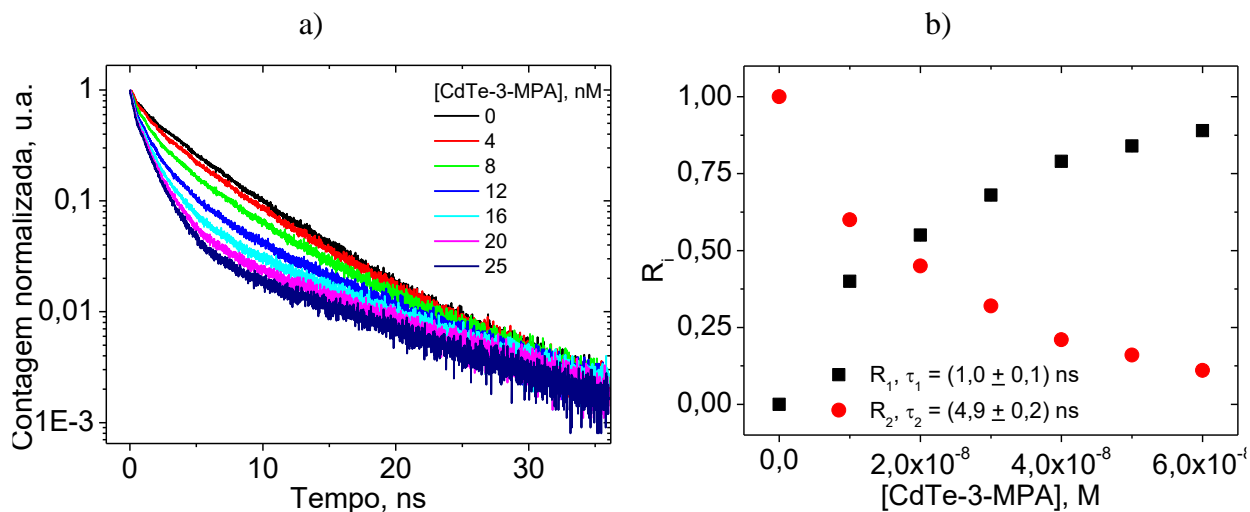


Figura 75. a) Curvas de decaimento temporal da intensidade de luminescência ($\lambda_{exc} = 432$ nm e $\lambda_{em} = 650$ nm) da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 10 mM de HPS na presença de diversas concentrações de CdTe-3-MPA. b) Contribuições das componentes com tempo de vida τ_1 (R_1) e com tempo de vida τ_2 (R_2) em função da concentração de PQ.

Estes valores obtidos para os tempos de vida são muito próximos dos observados na ausência do surfactante ($\tau_1 = (5,3 \pm 0,2)$ ns e $\tau_2 = (1,6 \pm 0,2)$ ns). O tempo de vida mais longo (aqui chamado de τ_1) é compatível com o tempo de vida da porfirina, enquanto que o tempo de vida mais curto (aqui chamado de τ_2) é associado ao tempo de vida do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA. Desta forma, a Figura 75b, juntamente com a Figura 73a, corrobora a hipótese de que a porfirina está sendo consumida para a formação de complexo, assim como ocorre na ausência do surfactante zwitteriônico, mostrando que este surfactante não somente não impede a formação do complexo, mas, pelo contrário, estimula esta interação.

Para concluir este estudo da interação da TMPyP com o PQ de CdTe-3-MPA na presença do surfactante zwitteriônico HPS passou-se a avaliação dos efeitos da adição de tal detergente na solução contendo o complexo TMPyP...PQ.

Para garantir a total formação de complexo TMPyP...PQ foi preparada uma solução contendo $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 125 nM de CdTe-3-MPA. Esta solução foi titulada com HPS e suas características espectrais foram monitoradas.

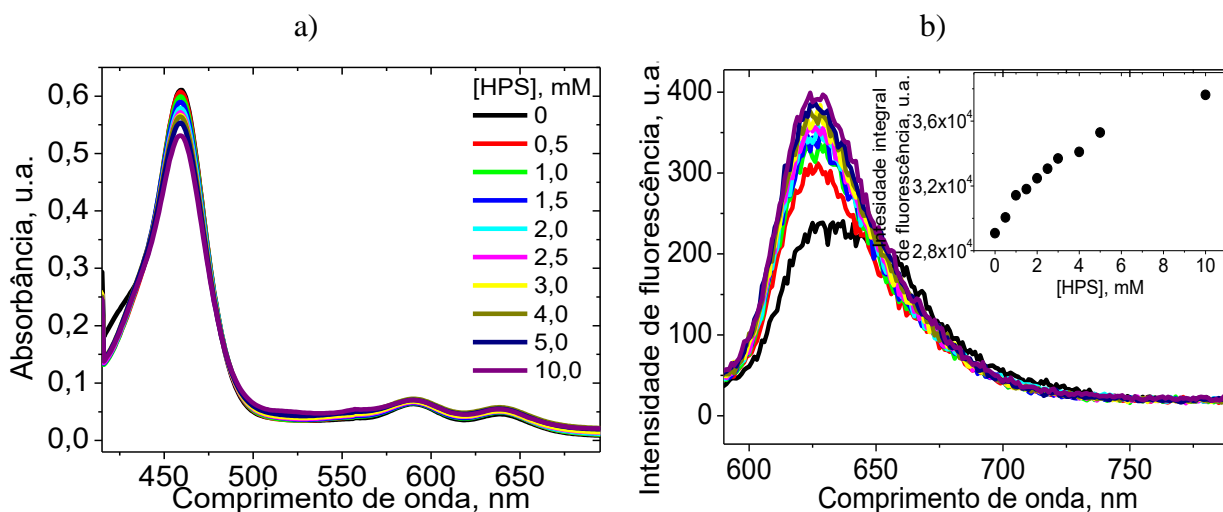


Figura 76. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{ex} = 432 \text{ nm}$) da solução de $5,5 \mu\text{M}$ de TMPyP com 125 nM de PQ na presença de diferentes concentrações de HPS. Inseto de b): Intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP com PQ em função da concentração de HPS.

A adição de HPS na solução contendo o complexo TMPyP...CdTe-3-MPA não causou alterações nos perfis espectrais de absorção ou de fluorescência do complexo, conforme observado na Figura 76a,b.

O espectro de fluorescência sofre um acentuado aumento em sua intensidade devido à presença de HPS, inseto da Figura 76b. Utilizando a equação (32) foi possível obter a constante de ligação entre o complexo e o surfactante zwitteriônico (Figura 77).

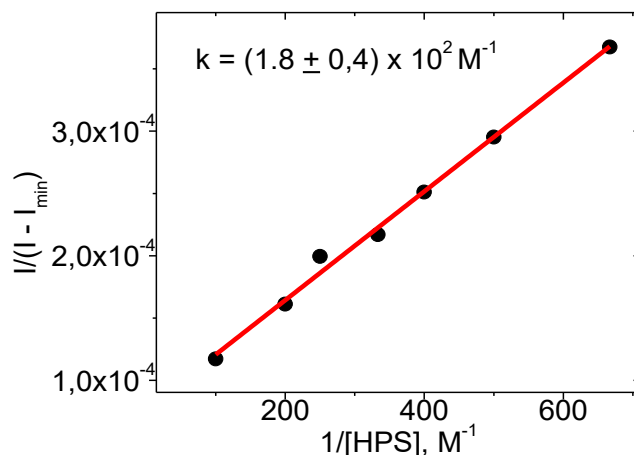


Figura 77. Ajuste da intensidade integral de luminescência utilizando a equação (32) da solução de 5,5 μM de TMPyP com 125 nM de PQ em função da concentração de HPS

O ajuste forneceu uma constante de ligação associada ao sistema TMPyP...CdTe-3-MPA com HPS de $k = (1,8 \pm 0,4) \times 10^2 \text{ M}^{-1}$.

Em seguida analisou-se os efeitos do surfactante no decaimento temporal da luminescência do complexo.

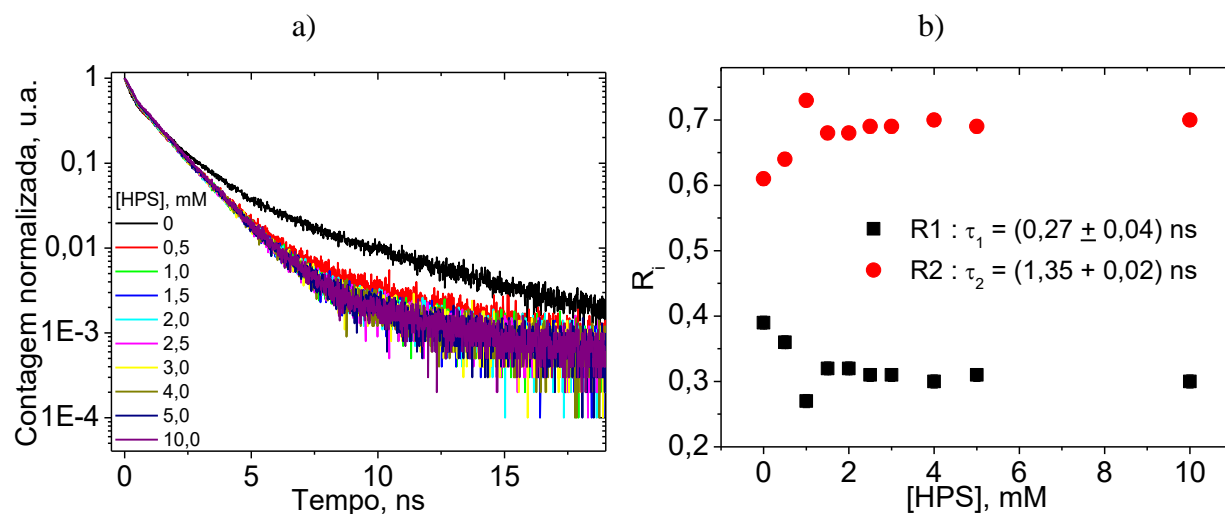


Figura 78. a) Curvas de decaimento temporal de 5,5 μM de TMPyP com 125 nM de PQ na presença de diferentes concentrações de HPS e b) contribuição relativa do menor tempo de vida (R_1) e do maior tempo de vida (R_2) em função da concentração de HPS.

As curvas de decaimento temporal (Figura 78a) mostram que a inserção de HPS na solução contendo complexo TMPyP...CdTe-3-MPA não causa mudança nos tempos de vida da amostra, mantendo-se sempre biexponencial e com os valores de tempo de vida $\tau_1 = (0,27 \pm 0,04)$ ns e $\tau_2 = (1,35 \pm 0,02)$ ns, independentemente da concentração de HPS.

Analisando o comportamento das contribuições dessas componentes (Figura 78b) é possível perceber que a adição de HPS causa diminuição da contribuição de τ_1 (associada ao núcleo do PQ) e aumento da contribuição de τ_2 (associada ao complexo MPyP...CdTe-3-MPA) até [HPS] = 1,0 mM, os valores de R_1 e R_2 permanecem constantes após esta concentração de HPS, indicando que a presença de HPS no meio favorece a emissão do complexo em detrimento da emissão do núcleo do PQ.

De maneira geral pode-se dizer que a presença do surfactante HPS facilita a formação do complexo, que está confirmada pelo aumento do valor da constante Stern-Volmer que dobra na presença do detergente. Entretanto, não afeta as características espectrais e dinâmicas do complexo TMPyP...PQ.

3.5.5. Conclusões Parciais

Os resultados apresentados no estudo da interação entre TMPyP e PQ de CdTe-3-MPA na presença de surfactantes de diferentes características (Tabela 3) mostram, de forma geral, que os surfactantes não impedem a formação do complexo de transferência de carga entre TMPyP e PQ.

Por outro lado, surfactantes que possuem carga, tanto negativa, como positiva, como o SDS e o CTAB, aumentaram a taxa de formação do complexo, sendo que a taxa aumentou em 1,5 vezes na presença de SDS e três vezes na presença de CTAB em relação ao meio aquoso. Isto indica que a carga positiva pode estimular duas vezes mais a formação de complexo em relação ao surfactante de carga negativa.

Na presença do surfactante zwitteriônico a constante K de formação do complexo TMPyP...PQ é duas vezes maior que na ausência de surfactantes. Este resultado indica que a carga dos polos do surfactante está influenciando no sistema de modo a favorecer a formação de complexo.

Na presença do surfactante Triton X-100, que não possui cargas, a taxa de formação de complexo caiu cerca de 4 vezes e o fator de acessibilidade foi 20 vezes menor em comparação com a ausência do surfactante. Estes valores indicam que a interação fraca, na ausência de interação eletrostática, causa a diminuição na taxa de formação do complexo e torna mais difícil a acessibilidade do PQ à porfirina.

Tabela 3. Valores obtidos para a constante de ligação da formação do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA em função das nanoestruturas presentes no meio. $[TMPyP]_0 = 5,5 \mu M$.

Nanoestruturas	$k_{sv} \times 10^6 M^{-1}$
-	$6,0 \pm 0,5$
SDS	$9,1 \pm 0,2$
CTAB	19 ± 1
Triton X-100	$1,5 \pm 0,1$
HPS	12 ± 1

3.6. Interação entre TPPS₄, CdTe-3-MPA e Surfactantes

Foram estudadas as interações entre TPPS₄ e PQ de CdTe-3-MPA na presença de surfactantes de diferentes estruturas, a saber: CTAB, de carga positiva, Triton X-100, que não possui carga, e o HPS que é zwitteriônico. O estudo foi realizado em dois pHs, 4,0 e 7,0, isto se fez necessário por causa dos diferentes estados de carga da porfirina (biprotonada e desprotonada). Anotação: todos três componentes: TPPS₄, ponto quântico CdTe-3-MPA e surfactante SDS, possuem a carga negativa, a interação entre eles deve ser fraca devido a repulsão eletrostática. Por este motivo decidimos por não fazer os estudos da interação entre TPPS₄ e QP na presença de SDS.

3.6.1. Interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA na presença de CTAB

Os efeitos da interação entre a porfirina TPPS₄ e o surfactante catiônico CTAB, tanto em pH 4,0, quanto em 7,0, estão apresentados de forma detalhada em [39]. No estudo os autores apontam que quando a TPPS₄ se liga ao CTAB o ponto de pKa da porfirina é deslocado de 5,0 para

2,5, de modo que nos dois pHs estudados, quando ligada ao CTAB, a porfirina sempre se encontra na forma desprotonada. Os autores também relatam que as características fotofísicas da TPPS₄ são pouco afetadas pelo CTAB quando a porfirina se encontra em estado não protonada.

i. Em pH 4,0

Foi preparada uma solução de 1,6 μM de TPPS₄ e 2,0 mM de CTAB em tampão fosfato e utilizou-se HCl para reduzir o pH do tampão até pH 4,0. Essa solução foi titulada com CTAB e as características espectroscópicas foram monitoradas. Os resultados estão apresentados na Figura 79.

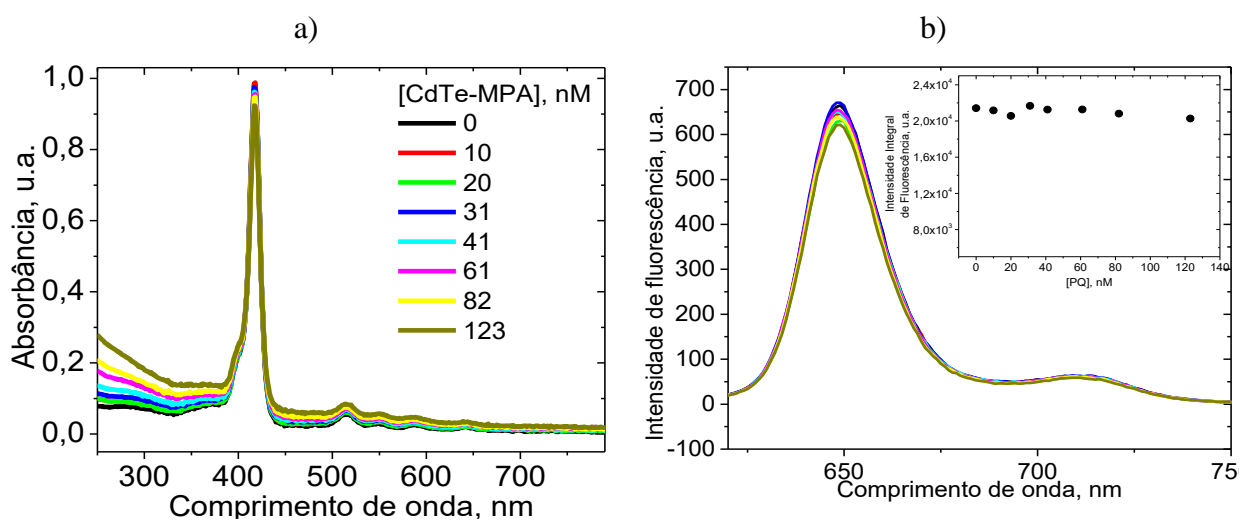


Figura 79. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência da solução de 1,6 μM de TPPS₄ e 2,0 mM de CTAB em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de Cde-3-MPA. Inseto de b): Intensidade integral de fluorescência ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$) em função da concentração do PQ de CdTe-3-MPA

Na Figura 79a observamos que o espectro de absorção ótica condiz com o espectro da porfirina TPPS₄ em sua forma desprotonada, com o pico da banda de Soret localizado em $\lambda = 417 \text{ nm}$ e que a adição de PQ não causa nenhuma alteração relevante, apresentando apenas uma ligeira queda, da ordem de 6% da intensidade do espectro na ausência de PQ, a qual atribuímos aos efeitos de diluição da amostra.

O mesmo pode se dizer do espectro de fluorescência (Figura 79b). O inseto da Figura 79b mostra que a adição de PQ não causa nenhuma alteração relevante no perfil espectral da porfirina na presença do surfactante CTAB.

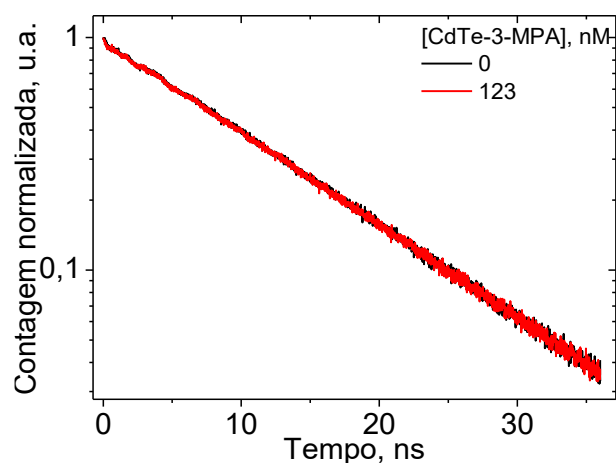


Figura 80. Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 com $2,0 \text{ mM}$ de CTAB em $\text{pH } 4,0$ na ausência e na presença de 123 nM de CdTe-3-MPA.

A Figura 80 mostra que a inserção do PQ na solução não altera as características do decaimento temporal da fluorescência da solução, mantendo-se uma curva monoexponencial com tempo de vida $\tau = (11,3 \pm 0,1) \text{ ns}$.

i. Em pH 7,0

O método imposto no experimento acima foi repetido, porém desta vez foi preparado em tampão fosfato de $\text{pH } 7,0$.

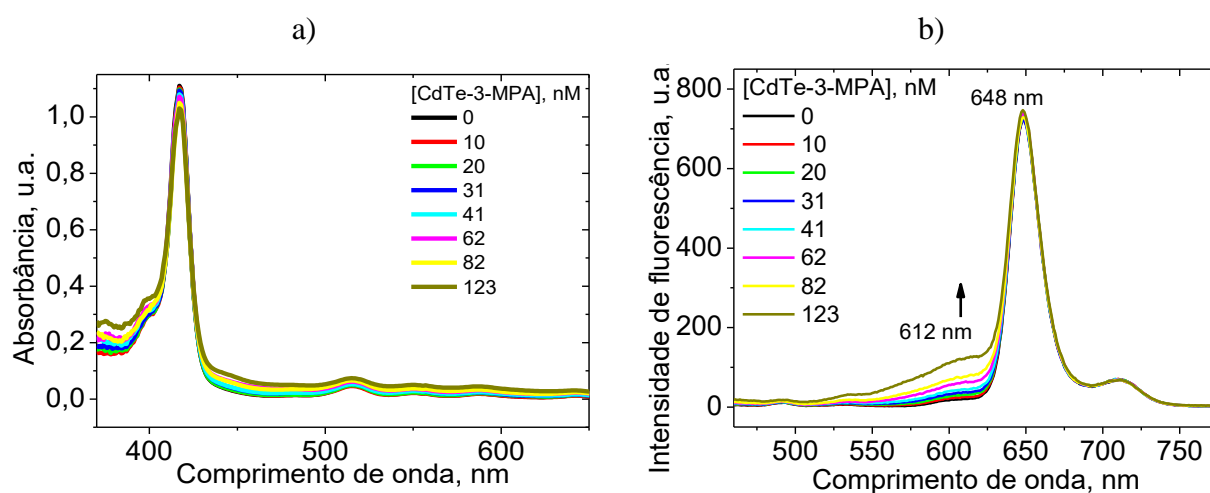


Figura 81. Espectros de a) absorção óptica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 425 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $2,0 \text{ mM}$ de CTAB em $\text{pH } 7,0$ na presença de diferentes concentrações de PQ.

Os espectros de absorção da Figura 81a mostram que adição de PQ na solução de TPPS₄ e CTAB em pH 7,0 não causa nenhuma mudança no perfil do espectro de absorção da solução. O pico de absorção em $\lambda = 417$ nm apresentou uma queda de 7%. Esta queda é associada aos efeitos de diluição da preparação da amostra.

Os espectros de fluorescência (Figura 81b) apontam que o sistema apresenta três picos de emissão e cada um tem seu comportamento próprio. Em $\lambda_2 = (648 \pm 2)$ nm e $\lambda_3 = (710 \pm 1)$ nm não foram observadas nenhuma mudança significativa, porém na região espectral entre 500 nm e 650 nm observa-se um aumento da intensidade de luminescência do sistema com a adição de PQ ao meio. Esse aumento está associado com a luminescência de PQ.

Conforme já discutido na seção 3.3, o sistema TPPS₄ e PQ não formam complexo entre si em pH 7,0.

Analisando os decaimentos temporais da solução para diferentes concentrações de PQ, é possível perceber que a adição de CdTe-3-MPA não causa mudanças significativas no tempo de vida da fluorescência da solução, mantendo-se em uma forma monoexponencial com tempo de vida $\tau = (10,9 \pm 0,2)$ ns, que é compatível com o tempo de vida da porfirina TPPS₄ em pH 7,0. (Figura 82).

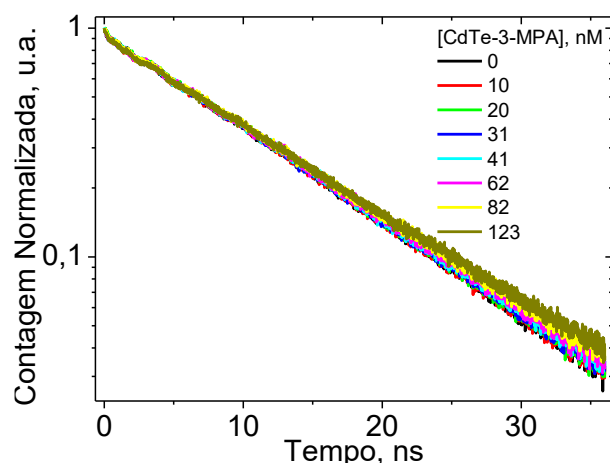


Figura 82. Decaimento temporal da intensidade de luminescência ($\lambda_{exc} = 422$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ e $2,0$ mM de CTAB em pH 7,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de PQ.

Baseando-se nestes resultados e em acordo com trabalhos anteriores [37,62] podemos concluir que na presença de CTAB tanto em pH 4,0 como em pH 7,0 a porfirina TPPS₄ está em sua forma desprotonada que não interage com PQ CdTe-3-MPA.

3.6.2. Interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA na presença de Triton X-100

O estudo da interação entre TPPS₄ e o PQ de CdTe-3-MPA na presença de micelas de Triton X-100 também foi realizado em dois pHs: 4,0 e 7,0. O método experimental foi o mesmo para ambos os pHs. Foi preparada uma solução contendo 1,6 μM de TPPS₄ e 5,0 mM (para pH 4,0) ou de 2,0 mM (para pH 7,0) de Triton X-100 e em seguida adicionado PQ, as características espectrais foram monitoradas para as diferentes concentrações de PQ.

i. Em pH 4,0

Na ausência de PQ e na presença de Triton X-100 o máximo da banda de Soret de TPPS₄ está localizada em $\lambda = 420$ nm (Figura 83a), que não coincide com aquela em tampão em pH 4,0 ou pH 7,0. Isso mostra que existe a interação entre porfirina e Triton X-100.

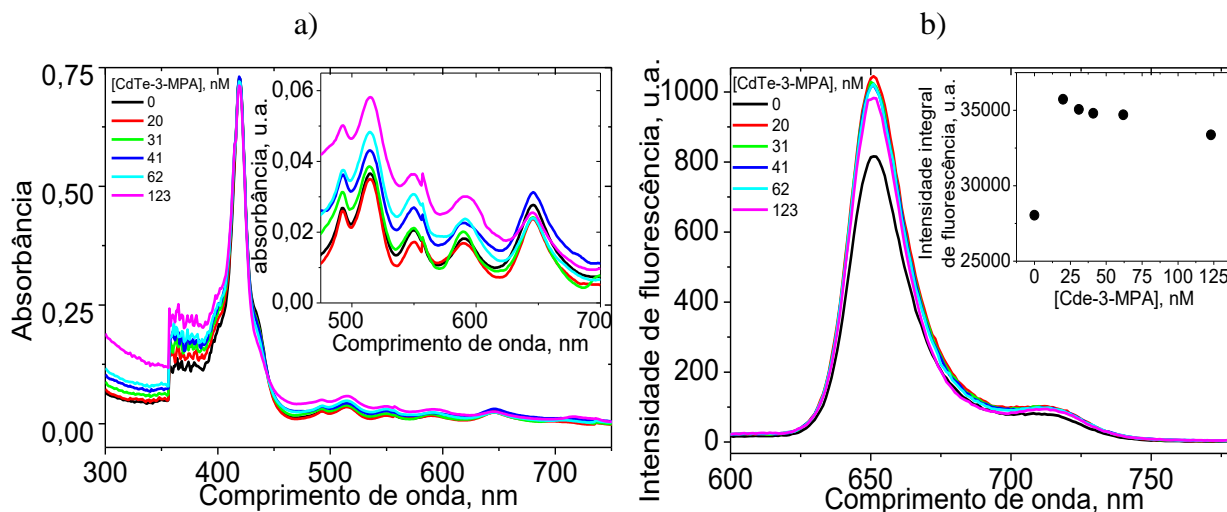


Figura 83. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422$ nm) da solução de 1,6 μM de TPPS₄ e de 5,0 mM de Triton X-100 em pH 4,0 na presença de diversas concentrações de CdTe-3-MPA.

Inserto de a) Espectros de absorção ótica das bandas Q da solução de TPPS₄ com Triton X-100 em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de PQ. Inserto de b) Intensidade integral da fluorescência da solução de TMPyP com Triton X-100 em função concentração de PQ

Os espectros de absorção ótica não apresentaram mudanças significativas na banda de Soret ($\lambda = 420$ nm) com a adição do PQ.

Já na região espectral das bandas Q (região entre $\lambda = 470$ nm até $\lambda = 700$ nm) observou-se um fraco aumento da intensidade com a adição do PQ (inserto da Figura 83a), porém, tanto as bandas Q, quanto a banda de Soret não sofreram alterações no perfil espectral de absorção ótica.

A fluorescência da solução contendo porfirina e surfactante não apresentaram mudanças nos perfis espectrais de fluorescência com o aumento da concentração de PQ no meio, porém ao adicionar 20 nM de CdTe-3-MPA observa-se que a intensidade total do espectro de emissão aumenta substancialmente, seguida por um platô para concentrações de PQ entre 20 nM e 60 nM e para concentrações mais altas ($[PQ] \geq 120$ nM) há queda da intensidade (Figura 83b).

Analisando as características temporais da fluorescência da solução se observa que o perfil de decaimento temporal da fluorescência da amostra não sofre alterações significativas com a adição de PQ (Figura 84).

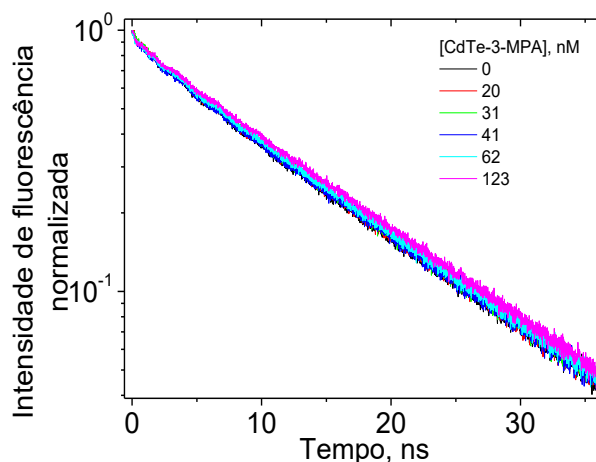


Figura 84. Decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 422$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ e $5,0$ mM Triton X-100 em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de PQ.

Foi utilizado o ajuste biexponencial nas curvas de decaimento temporal da Figura 84 para obter os tempos de vida das componentes e as suas respectivas contribuições. Os tempos de vida observados foram $\tau_1 = (2,7 \pm 0,6)$ ns e $\tau_2 = (12,1 \pm 0,4)$ ns e as contribuições das componentes foram, respectivamente, $R_1 = (0,12 \pm 0,04)$ e $R_2 = (0,88 \pm 0,04)$.

Os valores dos tempos de vida de fluorescência observados são característicos da porfirina em pH 4,0 e pH 7,0, respectivamente. Este resultado aponta para a existência de duas formas da porfirina na amostra e em equilíbrio: a porfirina na forma protonada e na forma desprotonada. Entretanto a concentração da forma protonada é 7 vezes menor que da desprotonada. Isto significa que na presença de Triton X-100, em pH 4,0, a maior parte da porfirina está ligada ao surfactante e desprotonada.

Podemos concluir que as micelas de Triton X-100 interagem com a porfirina TPPS₄ na sua forma protonada. A adição de PQ não causa alterações nas proporções das contribuições de fluorescência das espécies protonada e desprotonada visto que os valores das contribuições das componentes continuam inalterados com a adição de PQ à solução. Mais do que isto, a interação com o Triton X-100 diminui a probabilidade de formação de complexo de transferência e prótons entre o PQ e a porfirina.

ii. Em pH 7,0

Utilizando o mesmo método descrito no estudo da interação da TPPS₄ com PQ na presença de Triton X-100 em pH 4,0 foram realizados os experimentos em pH 7,0.

Foram obtidos os espectros de absorção e de fluorescência da solução contendo 1,6 µM de TPPS₄ e 2,0 mM de Triton X-100 em pH 7,0 na ausência e na presença de diversas concentrações de CdTe-3-MPA (Figura 85a,b).

O pico da banda de Soret no espectro de absorção da forma desprotonada TPPS₄ na presença de Triton X-100 sofre um deslocamento de 413 nm para 420 nm, mostrando que a porfirina está ligada com micelas de Triton X-100.

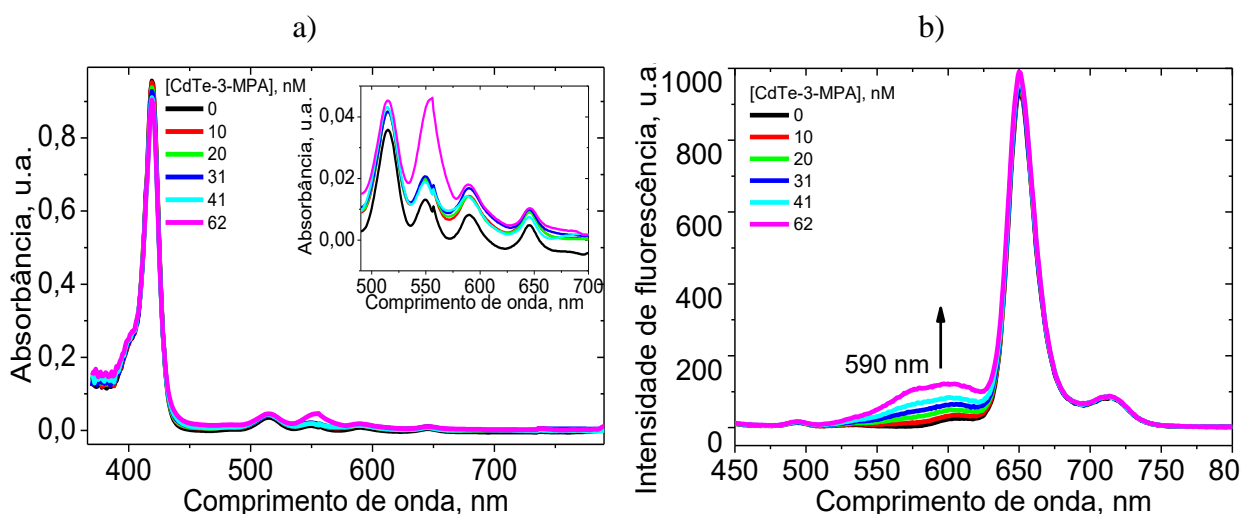


Figura 85. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422$ nm) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ e $2,0$ mM de Triton X-100 em pH 7,0 na presença de diversas concentrações de CdTe-3-MPA. Inseto de a): Espectros de absorção ótica da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ e $2,0$ mM de Triton X-100 em pH 7,0 na presença de diversas concentrações de PQ na região entre $\lambda = 490$ nm e $\lambda = 700$ nm (bandas Q da porfirina).

Os espectros de absorção ótica da solução (Figura 85a) não apresentam nenhuma mudança em seu perfil com a adição de PQ à solução. O pico da banda de Soret ($\lambda = 420$ nm) sofre uma queda de aproximadamente 6% do valor inicial da absorção e está atribuída aos efeitos de diluição da amostra causados pela adição da solução de PQ. Na região das bandas Q ($490 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$) observa-se aumento na intensidade da absorção (inseto da Figura 85a), que pode ser associado com o aumento do espalhamento devido à adição de PQ, entretanto esta aumento não é considerável, pois está na faixa de desvio da linha base do espectrofotômetro.

O espectro de luminescência (Figura 85b) mostra uma nova banda de emissão na região espectral de 500 nm até 650 nm que tem relação diretamente proporcional com a concentração de PQ no meio. Os picos de emissão localizados em $\lambda = 650$ nm e $\lambda = 680$ nm não sofrem qualquer alteração com a adição de PQ.

Foram obtidos os decaimentos temporais da fluorescência de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ com $2,0$ mM de Triton X-100 na ausência e na presença de diferentes concentrações de PQ em pH 7,0 (Figura 86). Ficou claro que a adição de PQ não altera o decaimento temporal da intensidade de fluorescência da porfirina na presença do surfactante, sendo que a curva de decaimento manteve-

se uma monoexponencial com tempo de vida $\tau = (12 \pm 0,1)$ ns, que é característico do tempo de vida da porfirina em pH 7,0.

Baseando-se nesses resultados, não podemos confirmar nenhum tipo de interação entre porfirina TPPS₄, micelas de Triton X-100 e PQ de CdTe-3-MPA em pH 7,0.

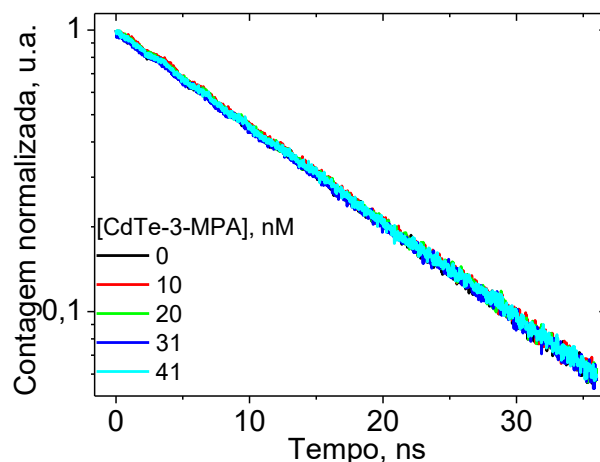


Figura 86. Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 422$ nm, $\lambda_{em} = 650$ nm) da solução de 1,6 μ M de TPPS₄ e 2,0 mM de Triton X-100 em pH 7,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de PQ.

3.6.3. Interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA na presença de HPS

Com o intuito de continuar avaliando a influência da estrutura do surfactante na interação entre a porfirina TPPS₄ e o PQ de CdTe-3-MPA, passou-se ao estudo desta interação na presença do surfactante zwitteriônico HPS.

A interação entre a porfirina TPPS₄ e o surfactante HPS já foi estudada nos pHs 3,0 e 7,5, conforme se observa em [79]. Neste artigo os autores sugerem que a porfirina se liga ao surfactante causando uma protonação parcial do grupo sulfonato da porfirina, estando as duas espécies em equilíbrio químico: monômeros de porfirina livre e os ligados ao surfactante.

Os estudos da interação TPPS₄ e PQ na presença de HPS foram feitos em pH 4,0 e 7,0. Para ambos os pHs foi preparada em solução tampão fosfato a solução de 1,6 μ M de TPPS₄ e 2,0 mM de HPS e adicionada alíquotas de PQ enquanto monitorava-se os espectros de absorção, de fluorescência estática e de fluorescência com resolução temporal.

i. Em pH 4,0

Os espectros de absorção ótica e de fluorescência estática da solução de 1,6 μM de TPPS₄ e 2,0 mM de HPS preparada em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de PQ de CdTe-3-MPA, variando de 0 até 82 nM, estão mostrados na Figura 87a,b.

O pico da banda de Soret no espectro de absorção, na presença de HPS, apresenta máximo em 418 nm. Este valor é compatível com a posição de máximo observado da porfirina desprotonada ligada ao surfactante Triton X-100. Isto indica que neste caso a porfirina também está ligada com micelas de HPS e que esta ligação causa a desprotonação da TPPS₄.

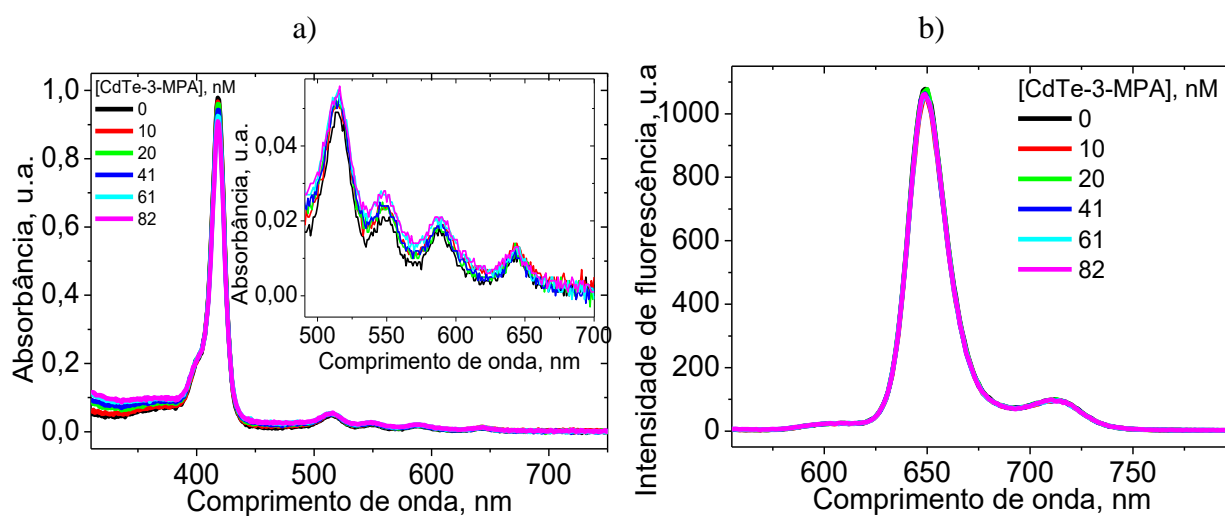


Figura 87. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$) da solução de 1,6 μM de TPPS₄ e 2,0 mM de HPS em pH 4,0 na presença de diferentes concentrações de PQ. Inseto de a): Espectros de absorção ótica da região conhecida como bandas Q ($490 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$) da porfirina na presença de HPS na ausência e na presença de diversas concentrações de PQ.

Os espectros de absorção (Figura 87a e seu inserto) mostram que a adição de PQ à solução, neste pH não causa nenhuma alteração relevante. É observado ainda que tanto na banda de Soret em $\lambda = 418 \text{ nm}$, quanto nas bandas Q, $\lambda = 515 \text{ nm}$, 549 nm , 588 nm e 645 nm , que a adição de PQ gerou, no máximo, uma queda destes picos equivalente a cerca de 7% em relação aos valores na ausência de PQ. Essas alterações ocorrem em função dos efeitos de diluição da amostra.

Os espectros de fluorescência (Figura 87b) não apresentam quaisquer alterações com a adição de PQ, mantendo os dois picos observados ($\lambda_{em} = 649 \text{ nm}$ e 712 nm) inalterados.

Também foram analisadas as curvas de decaimento temporal da luminescência do sistema em estudo, conforme Figura 88.

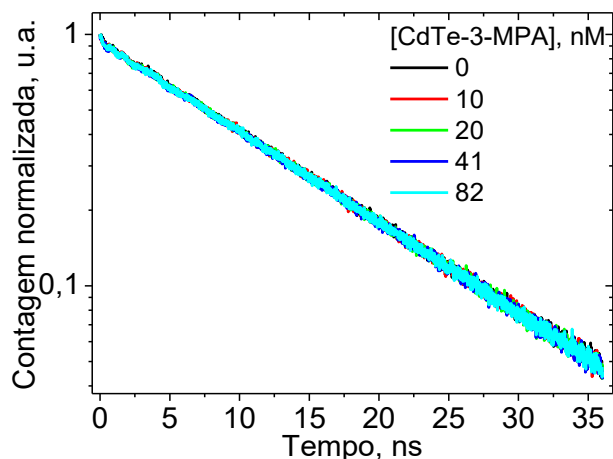


Figura 88. Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{exc} = 422 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 650 \text{ nm}$) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $2,0 \text{ mM}$ de HPS em pH 4,0 na ausência e na presença de diferentes concentrações de PQ.

A adição de PQ não foi capaz de alterar o perfil de decaimento temporal da fluorescência da solução de TPPS_4 com HPS em pH 4,0 que se manteve uma curva de decaimento monoexponencial com tempo de vida $\tau = (12,2 \pm 0,3) \text{ ns}$, independentemente da concentração de PQ. O tempo de vida observado é característico da porfirina em sua forma desprotonada.

ii. *Em pH 7,0*

Em pH 7,0 foram obtidos os espectros de absorção ótica e de fluorescência estática da solução contendo $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $5,0 \text{ mM}$ do surfactante HPS em pH 7,0 (Figura 89a,b).

O espectro de absorção da porfirina na presença de $5,0 \text{ mM}$ de HPS apresenta 5 picos de absorção muito distintos entre si. A posição do pico de Soret é $\lambda = 418 \text{ nm}$, mesmo como em pH 4,0, mostra a ligação da porfirina com HPS. A adição de PQ não causou deslocamento do pico de absorção, mantendo-se em 418 nm , porém apresentou uma pequena queda na presença de 123 nM de PQ, cerca de 9%, quando comparado com a sua intensidade na ausência de PQ e na presença de 123 nM de PQ.

Os picos em $\lambda = 515$ nm, 550 nm, 588 nm e 645 nm (bandas Q) apresentam comportamento semelhante ao observado para a banda de Soret. Não apresentam nenhum deslocamento, apenas uma pequena queda de intensidade da absorção ($\approx 8\%$) com a adição de PQ.

Atribuímos estas diminuições de intensidade nos espectros de absorção aos efeitos de diluição causados no preparo das amostras.

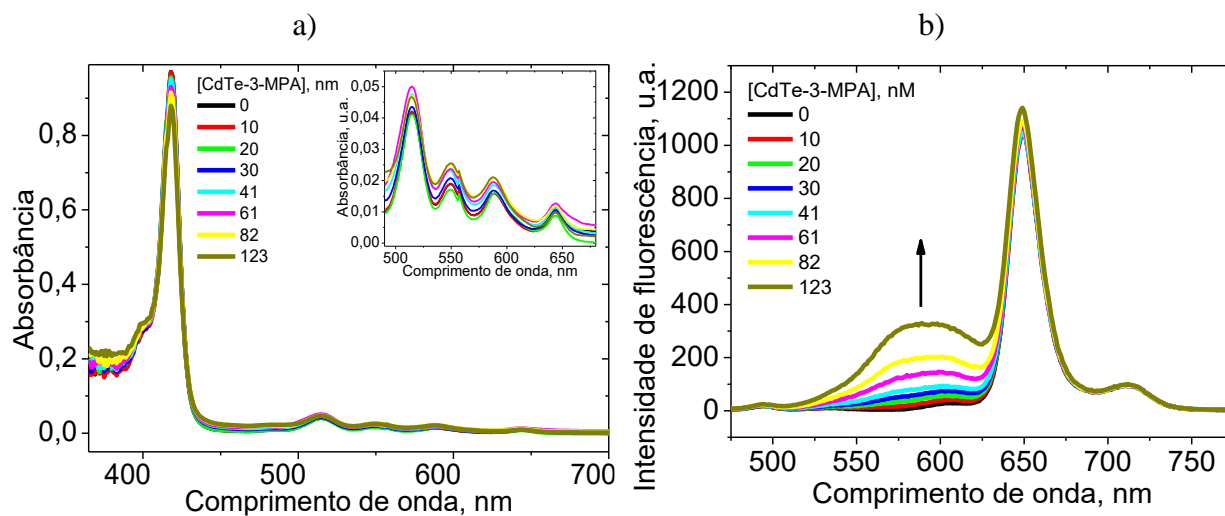


Figura 89. Espectros de a) absorção ótica e de b) fluorescência ($\lambda_{exc} = 422$ nm) da solução de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS_4 e $5,0$ mM de HPS em pH 7,0 na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA. Inseto de a): Espectros de absorção ótica da região conhecida como bandas Q ($490 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$) da porfirina com $5,0$ mM de HPS na presença de diversas concentrações de PQ.

Os espectros de fluorescência (Figura 89b) mostram que na ausência do PQ existem duas bandas de emissão bem definidas, uma em 650 nm e outra em 715 nm. Essas duas bandas, em pH 7,0, não sofrem alterações com a adição do PQ de CdTe-3-MPA, porém há o surgimento de uma nova banda de emissão, na região de 550 nm até 650 nm, associada com a luminescência do PQ.

Observando os decaimentos temporais (Figura 90) é possível perceber que a adição do PQ não causa alterações significativas no perfil de decaimento da amostra que se mantém uma monoexponencial com tempo de vida médio de $\tau = (12,2 \pm 0,1)$ ns. Este valor de tempo de vida é característico da porfirina TPPS_4 em sua forma desprotonada.

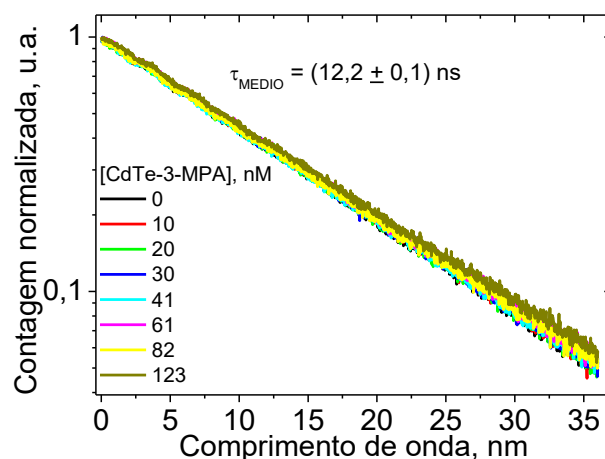


Figura 90. *Curvas de decaimento temporal da intensidade de fluorescência ($\lambda_{\text{exc}} = 422 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 650 \text{ nm}$) de $1,6 \mu\text{M}$ de TPPS₄ e $5,0 \text{ mM}$ de HPS em pH 7,0 na presença de diferentes concentrações de CdTe-3-MPA.*

3.6.4. Conclusões Parciais

Em todos os casos estudados, em pH 4,0, na presença do surfactante carregado CTAB, do neutro Triton X-100 e do zwitteriônico HPS, a porfirina TPPS₄ está em sua forma desprotonada e, nesta forma, não interage com o PQ de CdTe-3-MPA. O mesmo comportamento foi observado nos dados dos experimentos realizados em pH 7,0.

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho, estudou-se a interação das duas porfirinas, a porfirina *meso*-tetrametil piridil (TMPyP) com carga líquida +4 e a porfirina *meso*-tetrasulfatofenil (TPPS₄) com carga líquida -4 em pH 7,0 e -2,0 em pH 4,0 com o PQ de CdTe-3-MPA na presença de diferentes nanoestruturas que mimetizam as estruturas biológicas. A principal diferença entre as porfirinas usadas no estudo é a carga líquida em meio aquoso,

Os valores das constantes de formação de complexo da porfirina com PQ em função da estrutura do sistema biomimético estão compilados na Tabela 4.

Tabela 4. Relação dos valores de constantes de ligação K (M^{-1}) obtidos nos sistemas estudados**

SISTEMA	$K \times 10^6 M^{-1}$	f
TMPyP adicionando CdTe-3-MPA	$6,0 \pm 0,5$	-
CdTe-3-MPA adicionando TMPyP	$5,0 \pm 0,3$	$1,17 \pm 0,05$
TMPyP adicionando ASB	0,73*	-
CdTe-3-MPA adicionando ASB	$1,2 \pm 0,1$	-
TMPyP com ASB adicionando CdTe-3-MPA	10 ± 3	-
TMPyP adicionando SDS	$0,039 \pm 0,002$	-
TMPyP adicionando Triton X-100	$0,0050 \pm 0,0005$	-
TMPyP adicionando HPS	$0,00052 \pm 0,00003$	-
TMPyP com SDS adicionando CdTe-3-MPA	$9,1 \pm 0,2$	-
TMPyP com CTAB adicionando CdTe-3-MPA	19 ± 1	-
TMPyP com HPS adicionando CdTe-3-MPA	$12 \pm 0,1$	-
TMPyP com Triton X-100 adicionando CdTe-3-MPA	$1,5 \pm 0,1$	$0,006 \pm 0,02$
TPPS ₄ adicionando CdTe-3-MPA, pH 4,0	$2,4 \pm 0,2$	-
CdTe-3-MPA adicionando TPPS ₄ , pH 4,0	577 nm	$8,8 \pm 0,5$
	625 nm	$2,2 \pm 0,2$
CdTe-3-MPA adicionando TPPS ₄ , pH 7,0	$2,5 \pm 0,1$	$0,37 \pm 0,03$
TPPS ₄ adicionando ASB, pH 4,0	150	-
TPPS ₄ adicionando ASB, pH 7,0	3,2	-
TPPS ₄ com CdTe-3-MPA adicionando ASB, pH 4,0	12000	-
TPPS ₄ com CdTe-3-MPA adicionando ASB, pH 7,0,	$6,5 \pm 0,2$	-

*Obtido em [78]

**Devido aos fracos efeitos da interação nas características fotofísicas, as constantes de ligação não foram determinadas para os sistemas TMPyP adicionando CTAB, TPPS₄ adicionando CdTe-3-MPA em pH 7,0 e todos os sistemas envolvendo TPPS₄ com surfactante adicionando CdTe-3-MPA.

Com base nos dados apresentados ao longo da tese é possível concluir que:

- i. A porfirina TMPyP (carga líquida positiva) possui forte interação com o PQ de CdTe-3-MPA (carga líquida negativa), enquanto que a porfirina TPPS₄ apresenta uma interação muito fraca com o PQ em pH 7,0 (carga total da TPPS₄ é -4) e em pH 4,0 (carga total da TPPS₄ é -2) a interação é mais forte sendo, entretanto, menor quando comparado com a TMPyP. Isto mostra que o estado de carga dos componentes tem grande influência na interação com o PQ devido à interação eletrostática entre eles;
- ii. A interação entre TMPyP e CdTe-3-MPA gera um complexo de transferência de carga com características espectroscópicas distintas e que é capaz de gerar estado excitado tripleto;
- iii. O mecanismo de interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA se baseia na transferência de próton da porfirina para o PQ e a transferência de energia do PQ para a porfirina, sendo que em pH 4,0, em que a porfirina está biprotonada, o primeiro mecanismo é predominante;
- iv. O complexo TMPyP...CdTe-3-MPA é muito estável, mantendo-se íntegro na presença de todos os sistemas biomiméticos utilizados (proteína ASB, micelas de SDS, CTAB, HPS, Triton X-100);
- v. Em pH 7,0 foi observado que a adição de ASB em solução contendo TPPS₄ e CdTe-3-MPA induz a formação de um complexo misto da forma TPPS₄...CdTe-3-MPA...ASB e em pH 4,0 a adição de ASB induz a destruição do complexo TPPS₄...CdTe-3-MPA para formar a espécie TPPS₄...ASB.
- vi. A taxa de formação do complexo TMPyP...CdTe-3-MPA varia dependendo dos sistemas micelares presentes no meio, sendo maior na presença do surfactante CTAB (carga positiva) e menor na presença do surfactante Triton X-100 (carga neutra).
- vii. Em pH 7,0, não foi observada interação entre TPPS₄ e CdTe-3-MPA na presença dos surfactantes estudados;
- viii. Em pH 4,0, para todos os estudos envolvendo TPPS₄, CdTe-3-MPA e surfactante (CTAB, HPS e Triton X-100) a presença do surfactante gera a desprotonação da porfirina, impedindo assim a formação do complexo TPPS₄...CdTe-3-MPA.

De maneira geral apurou-se que a presença de nanoestruturas alteram a forma de interação entre as porfirinas e PQs e que isto deve ser considerado quando se trabalhar com sistemas

biológicos. Também se verificou que o estado de carga dos componentes, porfirina, PQ e das nanoestruturas presentes tem grande influência nas características físicas da interação porfirina-PQ, podendo em alguns casos favorecer a formação de complexo de transferência de energia e/ou de carga, dificultar a sua formação ou até mesmo impedir ou destruir complexos já formados.

Alguns pontos citados neste trabalho carecem de experimentos que aprofundem o conhecimento a respeito das interações estudadas. Os principais pontos a serem observados como perspectivas futuras seriam:

- A análise dos sistemas estudados utilizando outras técnicas experimentais como potencial zeta e dicroísmo circular;
- Eventual estudo do sistema TMPyP + CdTe-3-MPA + ASB na presença de micelas de diferentes cargas também se mostra importante para auxiliar no desenvolvimento de um possível sistema para tratamento em TFD;
- Estudos *in vitro* dos sistemas propostos com o intuito de avaliar a toxicidade do sistema e a sua efetividade em atacar células tumorais.

Os resultados obtidos podem ser importantes para elucidar os mecanismos de ação de complexos de porfirinas com PQs em sua aplicação na medicina e na biologia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- [2] E.B. Yahya, A.M. Alqadhi, Recent trends in cancer therapy: A review on the current state of gene delivery, *Life Sci.* 269 (2021) 119087. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119087>.
- [3] A. Kamb, A. Kamb, S. Wee, S. Wee, C. Lengauer, C. Lengauer, Why is cancer drug discovery so difficult?, *Nat. Rev. Drug Discov.* 6 (2007) 115–20. <https://doi.org/10.1038/nrd2155>.
- [4] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva., Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasi, Rio de Janeir, 2019. <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>.
- [5] B.F. Ferlay J, Laversanne M, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow, Lyon, France, 2020. https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?type=1&single_unit=500000 (accessed February 14, 2022).
- [6] A.F. Dos Santos, D.R.Q. De Almeida, L.F. Terra, M.S. Baptista, L. Labriola, Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review, *J. Cancer Metastasis Treat.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.20517/2394-4722.2018.83>.
- [7] E.D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brückner, Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Tetrahedron.* 54 (1998) 4151–4202. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(98)00015-5).
- [8] I.J.A.N.J. Macdonald, T.J. Dougherty, Basic principles of photodynamic therapy, *J. Porphyrins Phthalocyanines.* 05 (2001) 105–129. <https://doi.org/10.1002/jpp.328>.
- [9] D. Kessel, Photodynamic therapy: A brief history, *J. Clin. Med.* 8 (2019).

<https://doi.org/10.3390/jcm8101581>.

- [10] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, The history of photodetection and photodynamic therapy., *Photochem. Photobiol.* 74 (2001) 656–69.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11723793>.
- [11] M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours., *J. Photochem. Photobiol. B.* 39 (1997) 1–18.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9210318>.
- [12] J.H. Correia, J.A. Rodrigues, S. Pimenta, T. Dong, Z. Yang, Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions, *Pharmaceutics*. 13 (2021) 1–16. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>.
- [13] S.B. Brown, E. a Brown, I. Walker, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment., *Lancet Oncol.* 5 (2004) 497–508. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(04\)01529-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(04)01529-3).
- [14] G. Wan, B. Chen, L. Li, D. Wang, S. Shi, T. Zhang, Y. Wang, L. Zhang, Y. Wang, Nanoscaled red blood cells facilitate breast cancer treatment by combining photothermal/photodynamic therapy and chemotherapy, *Biomaterials*. 155 (2018) 25–40.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.002>.
- [15] J. Xu, J. Gao, Q. Wei, Combination of Photodynamic Therapy with Radiotherapy for Cancer Treatment, *J. Nanomater.* 2016 (2016). <https://doi.org/10.1155/2016/8507924>.
- [16] R.G. Roetzheim, N. Pal, C. Tennant, L. Voti, J.Z. Ayanian, A. Schwabe, J.P. Krischer, Effects of health insurance and race on early detection of cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* 91 (1999) 1409–1415. <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0033581147&partnerID=40&md5=b23a6a0a7dae619e3b82e8f8d0153dad>.
- [17] K.C. Chu, R.E. Tarone, L.G. Kessler, L. a Ries, B.F. Hankey, B. a Miller, B.K. Edwards, Recent trends in U.S. breast cancer incidence, survival, and mortality rates., *J. Natl. Cancer Inst.* 88 (1996) 1571–1579.
- [18] K.E. Rodrigues, B. de Camargo, Early diagnosis of childhood cancer: a team responsibility, *Rev. Assoc. Med. Bras.* 49 (2003) 29–34.

<https://doi.org/10.1590/S0104-42302003000100030>.

- [19] D. Jocham, F. Witjes, S. Wagner, B. Zeylemaker, J.V.A.N. Moorselaar, M. Grimm, R. Muschter, G. Popken, F.K. Onig, R.K.N. Uchel, K. Kurth, Improved Detection and Treatment of Bladder Cancer Using Hexaminolevulinate Imaging : a Prospective , Phase Iii Multicenter Study, *J Urol.* 174 (2005) 862–866.
<https://doi.org/10.1097/01.ju.0000169257.19841.2a>.
- [20] J. Vonk, J.G. de Wit, F.J. Voskuil, M.J.H. Witjes, Improving oral cavity cancer diagnosis and treatment with fluorescence molecular imaging, *Oral Dis.* 27 (2021) 21–26.
<https://doi.org/10.1111/odi.13308>.
- [21] J.H. Choi, T. Ha, M. Shin, S.N. Lee, J.W. Choi, Nanomaterial-based fluorescence resonance energy transfer (FRET) and metal-enhanced fluorescence (MEF) to detect nucleic acid in cancer diagnosis, *Biomedicines.* 9 (2021).
<https://doi.org/10.3390/biomedicines9080928>.
- [22] A. Juzeniene, Q. Peng, J. Moan, Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis, *Photochem. Photobiol. Sci.* 6 (2007) 1234–1245.
<https://doi.org/10.1039/b705461k>.
- [23] H. Wang, T. Nann, Springer Series on Fluorescence, 2011.
https://doi.org/10.1007/4243_2010_8.
- [24] K. Kalka, H. Merk, H. Mukhtar, Photodynamic therapy in dermatology., *J. Am. Acad. Dermatol.* 42 (2000) 389–413; quiz 414–6.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10688709>.
- [25] B. Spring, Z. Mai, P. Rai, S. Chang, T. Hasan, Theranostic nanocells for simultaneous imaging and photodynamic therapy of pancreatic cancer, in: D.H. Kessel (Ed.), 2010: p. 755104. <https://doi.org/10.1117/12.843725>.
- [26] K. Kalyanasundaram, Photochemistry of Polypyridine and Porphyrin Complexes, Academic Press, 1991. <https://books.google.com.br/books?id=91d2QgAACAAJ>.
- [27] V.M. De Paoli, S.H. De Paoli, I.E. Borissevitch, A.C. Tedesco, Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH2 associated with micelles and DNA, *J. Alloys Compd.* 344

- (2002) 27–31. [https://doi.org/10.1016/S0925-8388\(02\)00299-2](https://doi.org/10.1016/S0925-8388(02)00299-2).
- [28] C. Chuang, C. Burda, Contribution of Femtosecond Laser Spectroscopy to the Development of Advanced Optoelectronic Nanomaterials, *J. Phys. Chem. Lett.* 3 (2012) 1921–1927. <https://doi.org/10.1021/jz300299r>.
- [29] C. Burda, X. Chen, R. Narayanan, M.A. El-Sayed, Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1025–1102. <https://doi.org/10.1021/cr030063a>.
- [30] G.P.C. Drummen, Quantum Dots—From Synthesis to Applications in Biomedicine and Life Sciences, *Int. J. Mol. Sci.* 11 (2010) 154–163. <https://doi.org/10.3390/ijms11010154>.
- [31] P. Zuo, X. Lu, Z. Sun, Y. Guo, H. He, A review on syntheses, properties, characterization and bioanalytical applications of fluorescent carbon dots, *Microchim. Acta.* 183 (2016) 519–542. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1705-3>.
- [32] G.G. Parra, A.L.S. Pavanelli, L.P. Franco, L.N.C. Máximo, R.S. da Silva, I. Borissevitch, Interaction of CdTe-MPA quantum dots with meso-tetra methyl pyridyl porphyrin. Charge transfer complex formation, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 398 (2020) 112580. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112580>.
- [33] M.F. Frasco, N. Chaniotakis, Bioconjugated quantum dots as fluorescent probes for bioanalytical applications, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 229–240. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3033-0>.
- [34] K.J. McHugh, L. Jing, A.M. Behrens, S. Jayawardena, W. Tang, M. Gao, R. Langer, A. Jaklenec, Biocompatible Semiconductor Quantum Dots as Cancer Imaging Agents, *Adv. Mater.* 30 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1002/adma.201706356>.
- [35] M.A. Jhonsi, R. Renganathan, Investigations on the photoinduced interaction of water soluble thioglycolic acid (TGA) capped CdTe quantum dots with certain porphyrins, *J. Colloid Interface Sci.* 344 (2010) 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.01.022>.
- [36] M. Sheikhpour, L. Barani, A. Kasaeian, Biomimetics in drug delivery systems: A critical review, *J. Control. Release.* 253 (2017) 97–109. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.026>.

- [37] P.J. Goncalves, P.L. Franzen, D.S. Correa, L.M. Almeida, M. Takara, A.S. Ito, S.C. Zílio, I.E. Borissevitch, Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP), *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (2011) 1532–1539. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.05.012>.
- [38] É.R. Silva, A.L.S. Pavanelli, L.B. Mostaço, F.A. Schaberle, S.E. Galembeck, P.J. Gonçalves, R. Costa e Silva, L.P. Ferreira, T.D. Nekipelova, A.A. Kostyukov, A.S. Radchenko, A.A. Shtil, V.A. Kuzmin, I.E. Borissevitch, Phototransformation of cyanine dye with two chromophores. Effects of oxygen and dye concentration, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 349 (2017) 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.08.063>.
- [39] P.J. Gonçalves, L.P.F. Aggarwal, C.A. Marquezin, A.S. Ito, L. De Boni, N.M.B. Neto, J.J. Rodrigues, S.C. Zílio, I.E. Borissevitch, Effects of interaction with CTAB micelles on photophysical characteristics of meso-tetrakis(sulfonatophenyl) porphyrin, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 181 (2006) 378–384. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2005.12.023>.
- [40] P.S. Santiago, D. de S. Neto, S.C.M. Gandini, M. Tabak, On the localization of water-soluble porphyrins in micellar systems evaluated by static and time-resolved frequency-domain fluorescence techniques, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 65 (2008) 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.04.010>.
- [41] J. Peters, T., All about Albumin. In *Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, Academic Press, Cambridge, MA, USA, 1996.
- [42] F. Kratz, U. Beyer, Serum proteins as drug carriers of anticancer agents: A review, *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents.* 5 (1998) 281–299. <https://doi.org/10.3109/10717549809065759>.
- [43] N. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, University Science Books, Sausalito, California, 1991.
- [44] L.S. Murakami, Estudo da fotocitotoxicidade dos corantes cianicos com dois cromóforos em culturas de células neoplásicas, Tese Doutorado, Apresentada à Fac. Filos. Ciências e Let. Ribeirão Preto/USP. Área Conc. Física Apl. à Med. e Biol. (2009).

- [45] R. Bonnett, B.D. Djelal, P.A. Hamilton, G. Martinez, F. Wierrani, Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative study, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 53 (1999) 136–143. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(99\)00139-6](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(99)00139-6).
- [46] H. Zhang, D. Yee, C. Wang, Quantum dots for cancer diagnosis and therapy: biological and clinical perspectives, *Nanomedicine.* 3 (2008) 83–91. <https://doi.org/10.2217/17435889.3.1.83>.
- [47] A.P. Alivisatos, Semiconductor Cluster, Nanocrystals and QD, *Science* (80-.). 271 (1996) 933–937.
- [48] G. Luo, J. Long, B. Zhang, C. Liu, S. Ji, J. Xu, X. Yu, Q. Ni, Quantum dots in cancer therapy, *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 47–58. <https://doi.org/10.1517/17425247.2012.638624>.
- [49] J.R. Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition, Joseph R. Lakowicz, editor, 2006.
- [50] B. Valeur, Molecular Fluorescence, 2001. <https://doi.org/10.1002/3527600248>.
- [51] T. Förster, Energy migration and fluorescence, *J. Biomed. Opt.* 17 (2012) 011002. <https://doi.org/10.1117/1.jbo.17.1.011002>.
- [52] F.M. Goñi, The basic structure and dynamics of cell membranes: An update of the Singer-Nicolson model, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1838 (2014) 1467–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.01.006>.
- [53] M.L. Arsene, I. Răut, M. Călin, M.L. Jecu, M. Doni, A.M. Gurban, Versatility of reverse micelles: From biomimetic models to nano (bio)sensor design, *Processes.* 9 (2021) 1–43. <https://doi.org/10.3390/pr9020345>.
- [54] D.L. Nelson, M.M. Cox, Princípios de Bioquímica de Lehninger, 6^a, Porto Alegre, Brasil, 2014.
- [55] R. Bhaduri, S. Mukherjee, I. Mitra, S. Ghosh, U. Chatterji, S.R. Dodda, S.C. Moi, Anticancer activity and cell death mechanism of Pt(II) complexes: Their in vitro bio-

- transformation to Pt(II)-DNA adduct formation and BSA binding study by spectroscopic method, *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 262 (2021) 120096. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.120096>.
- [56] S. Mukherjee, I. Mitra, V.P. Reddy B., C. Fouzder, S. Mukherjee, S. Ghosh, U. Chatterji, S.C. Moi, Effect of Pt(II) complexes on cancer and normal cells compared to clinically used anticancer drugs: Cell cycle analysis, apoptosis and DNA/BSA binding study, *J. Mol. Liq.* 247 (2017) 126–140. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.09.104>.
- [57] K. Hirayama, S. Akashi, M. Furuya, K. ichi Fukuhara, Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and frit-FAB LC/MS, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 173 (1990) 639–646. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(05\)80083-X](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)80083-X).
- [58] D.O. Oluwole, T. Nyokong, Comparative photophysicochemical behavior of nanoconjugates of indium tetracarboxyphenoxy phthalocyanines covalently linked to CdTe/ZnSe/ZnO quantum dots, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 312 (2015) 34–44. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2015.07.009>.
- [59] M. Amitava, C. Kristyna, M. Vedran, K. Pavel, A. Vojtech, H. Zbyněk, K. Rene, PREPARATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NUCLEOBASE-CONJUGATED CdTe / ZnSe CORE / SHELL QUANTUM DOTS, (2015) 14–19.
- [60] J. Liu, R. Hu, J. Liu, B. Zhang, Y. Wang, X. Liu, W.-C. Law, L. Liu, L. Ye, K.-T. Yong, Cytotoxicity assessment of functionalized CdSe, CdTe and InP quantum dots in two human cancer cell models, *Mater. Sci. Eng. C.* 57 (2015) 222–231. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.044>.
- [61] J.G. Paithankar, S. Kushalan, N. S, S. Hegde, S. Kini, A. Sharma, Systematic toxicity assessment of CdTe quantum dots in *Drosophila melanogaster*, *Chemosphere.* 295 (2022) 133836. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133836>.
- [62] A.L.S. Pavanelli, L.N.C. Máximo, R.S. da Silva, I. Borissevitch, Interaction between TPPS4 porphyrin and CdTe-3-MPA quantum dot: Proton and energy transfer, *J. Lumin.* 237 (2021) 5–11. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2021.118213>.

- [63] A.L.S. Pavanelli, L.N.C. Máximo, R.S. da Silva, I.E. Borissevitch, Effect of serum albumin on porphyrin-quantum dot complex formation and characteristics. Spectroscopic analysis, *Nanomaterials*. 11 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.3390/nano11071674>.
- [64] I.E. Borissevitch, T.T. Tominaga, H. Imasato, M. Tabak, Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin, *Anal. Chim. Acta*. 343 (1997) 281–286. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00038-X).
- [65] L.P.F. Aggarwal, I.E. Borissevitch, On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 63 (2006) 227–233. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2005.05.009>.
- [66] B.R.C. Vale, K.O. Vieira, J.C.L. Sousa, J.L. Ferrari, M.A. Schiavon, Efeito da estrutura molecular de ligantes de superfície em pontos quânticos de CdTe dispersos em água, *Quim. Nova*. 38 (2015) 22–29. <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140292>.
- [67] *Industrial Hygiene and Toxicology*. Vol. II. 2nd rev. ed. Frank A. Patty Editor. John Wiley & Sons, Inc., 605 Third Ave., New York 16, N. Y., 1963. xxxi+1546pp. 15½×24cm. Price \$40.00., *J. Pharm. Sci.* 52 (1963) 916. <https://doi.org/10.1002/jps.2600520932>.
- [68] W.W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals, *Chem. Mater.* 15 (2003) 2854–2860. <https://doi.org/10.1021/cm034081k>.
- [69] I.E. Borissevitch, G.G. Parra, V.E. Zagidullin, E.P. Lukashev, P.P. Knox, V.Z. Paschenko, a. B. Rubin, Cooperative effects in CdSe/ZnS-PEGOH quantum dot luminescence quenching by a water soluble porphyrin, *J. Lumin.* 134 (2013) 83–87. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2012.09.008>.
- [70] I.E. Borissevitch, E.P. Lukashev, I.P. Oleinikov, A.L.S. Pavanelli, P.J. Gonçalves, P.P. Knox, Electrostatic interactions and covalent binding effects on the energy transfer between quantum dots and reaction centers of purple bacteria, *J. Lumin.* 207 (2019) 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2018.11.013>.
- [71] A.L. dos S. Pavanelli, I.E. Borissevitch, Estudos das fototransformações de

- fotossensibilizadores de interesse em fotoquimioterapia na presença de nanoestruturas, Universidade de São Paulo, 2016.
- [72] P.J. Gonalves, P.L. Franzen, D.S. Correa, L.M. Almeida, M. Takara, A.S. Ito, S.C. Zílio, I.E. Borissevitch, Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP), *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 79 (2011) 1532–1539. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2011.05.012>.
- [73] G.G. PARRA, I.E. Borissevitch, Interação de pontos quânticos com fotossensibilizadores orgânicos na presença de estruturas nano-organizadas, USP, 2015.
- [74] I.E. Borissevitch, S.C. Gandini, Photophysical studies of excited-state characteristics of meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl) porphyrin bound to DNA., *J. Photochem. Photobiol. B.* 43 (1998) 112–20. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00093-1](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00093-1).
- [75] L.P.F. Aggarwal, M.S. Baptista, I.E. Borissevitch, Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 186 (2007) 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2006.08.003>.
- [76] P.J. Gonçalves, L. De Boni, N.M.B. Neto, J.J. Rodrigues, S.C. Zílio, I.E. Borissevitch, Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra(sulfonatophenyl) porphyrin, *Chem. Phys. Lett.* 407 (2005) 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2005.03.100>.
- [77] L.N. Magno, F.C. Bezerra, L.E.S. Freire, R.A. Guerra, A.F. Bakuzis, P.J. Gonçalves, Use of Spectroscopic Techniques for Evaluating the Coupling of Porphyrins on Biocompatible Nanoparticles. A Potential System for Photodynamics, Theranostics, and Nanodrug Delivery Applications, *J. Phys. Chem. A.* 121 (2017) 1924–1931. <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.6b10314>.
- [78] I.E. Borissevitch, T.T. Tominaga, H. Imasato, M. Tabak, Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation, *J. Lumin.* 69 (1996) 65–76. [https://doi.org/10.1016/0022-2313\(96\)00037-3](https://doi.org/10.1016/0022-2313(96)00037-3).
- [79] S.C.M. Gandini, V.E. Yushmanov, I.E. Borissevitch, M. Tabak, Interaction of the tetra(4-

- sulfonatophenyl)porphyrin with ionic surfactants: Aggregation and location in micelles, *Langmuir*. 15 (1999) 6233–6243. <https://doi.org/10.1021/la990108w>.
- [80] A. Schaberle, V.A. Kuz, I.E. Borissevitch, Spectroscopic studies of the interaction of bichromophoric cyanine dyes with DNA . Effect of ionic strength, 1621 (2003) 183–191. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(03\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(03)00057-6).
- [81] M. Tabak, I.E. Borisevitch, Interaction of dipyrindamole with micelles of lysophosphatidylcholine and with bovine serum albumin: fluorescence studies, *BBA - Gen. Subj.* 1116 (1992) 241–249. [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(92\)90017-O](https://doi.org/10.1016/0304-4165(92)90017-O).
- [82] C.C. Ruiz, A photophysical study of micellization of cetyltrimethylammonium bromide in urea-water binary mixtures, *Mol. Phys.* 86 (1995) 535–546. <https://doi.org/10.1080/00268979509413628>.
- [83] P.S. Santiago, S.C.M. Gandini, L.M. Moreira, M. Tabak, Interaction of cationic water-soluble meso -tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrin (TMPyP) with ionic and nonionic micelles: aggregation and binding, *J. Porphyr. Phthalocyanines*. 12 (2008) 942–952. <https://doi.org/10.1142/S1088424608000327>.
- [84] L.E. Almeida, I.E. Borissevitch, V.E. Yushmanov, M. Tabak, Different micellar packing and hydrophobicity of the membrane probes TEMPO and TEMPOL influence their partition between aqueous and micellar phases rather than location in the micelle interior, *J. Colloid Interface Sci.* 203 (1998) 456–463. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5546>.