

## 2

### Princípios gerais

#### 2.1

##### Processos fotofísicos em moléculas

Vários livros descrevem com maior ou menor profundidade os processos fotofísicos em moléculas (Turro N, 2009, Lakowicz, 1983). Aqui, nos basearemos principalmente no livro “Molecular fluorescence” (Valeur 2001) para introduzir alguns conceitos de absorção e fluorescência. A luz tem natureza dual, onda-partícula, e no seu comportamento como partícula (fóton) a energia  $E$  do fóton é dada pela expressão de Planck:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (2.1)$$

onde  $h$  é a constante de Planck,  $c$  a velocidade da luz,  $\lambda$  o comprimento de onda e  $\nu$  a frequência. Quando uma onda eletromagnética interage com uma molécula, ela pode ser espalhada (sua direção de propagação muda) ou pode ser absorvida (sua energia é transferida à molécula). A probabilidade relativa da ocorrência de cada processo é uma propriedade específica da molécula encontrada. Se a energia eletromagnética da luz é absorvida, a molécula passa a um estado excitado. Uma molécula ou parte de uma molécula que pode ser excitada por absorção é chamada de cromóforo.

Muitos dos processos físico-químicos que acontecem no mundo microscópico das moléculas só são explicados com base na mecânica quântica. Ela nos dá informações sobre os estados de energia que uma molécula pode ocupar e os mecanismos pelos quais uma molécula pode mudar de um estado de energia a outro. O estado de uma molécula ou sistema quântico é descrito por meio de uma função de onda  $\psi$  que é, em geral, função das coordenadas espaciais e dos spins dos elétrons e núcleos, e dos campos externos. Está relacionada com a probabilidade de encontrar o sistema numa posição, spin, etc. Esta função de onda nos dá uma distribuição de probabilidade ( $|\Psi|^2$  é a densidade de probabilidade).

A mecânica quântica mostra que uma molécula só pode ter energias num conjunto discreto de valores. Estas quantidades são chamadas níveis de energia da molécula. Os níveis de energia principais são determinados pelas possíveis distribuições espaciais dos elétrons e são chamados **níveis eletrônicos de energia** (Fig. 2.1); esses níveis são desdobrados em **níveis vibracionais**, que indicam os vários modos de vibração da molécula. Há ainda subdivisões menores chamadas de **níveis rotacionais**. O nível de mais baixa energia é chamado de estado fundamental e nele as energias eletrônica e dos movimentos internos têm seus valores mínimos. Os outros estados de energia da molécula são chamados de estados excitados.

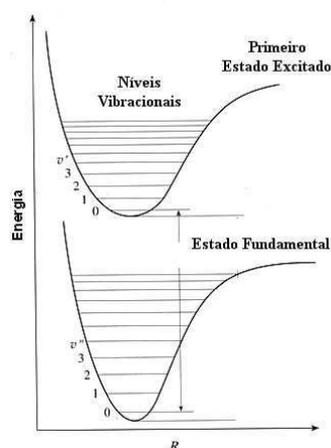


Figura 2.1. Diagrama de níveis de energia mostrando o estado fundamental e o primeiro estado excitado. Os níveis vibracionais são mostrados como linhas horizontais mais finas (www.chemkeys.com).

Geralmente as moléculas se encontram em seu estado fundamental e, ao serem irradiadas, podem ser excitadas até outro nível energético quando a energia da radiação incidente corresponde exatamente à diferença de energia entre os dois níveis. Podemos excitar a molécula submetendo-a, por exemplo, a um campo externo o campo elétrico da radiação incidente, que interage com as partículas carregadas da molécula. O potencial elétrico externo é capaz de ocasionar uma probabilidade de transição entre os estados da molécula. Esta pode ser descrita em função do operador dipolo elétrico da molécula (que descreve a distribuição de carga de uma molécula) e da amplitude do campo elétrico oscilante da luz. A probabilidade de transição é proporcional ao momento de dipolo de transição, descrevendo a habilidade da luz em distorcer uma molécula obrigando-a a fazer uma transição para outro estado.

## 2.2

### Absorção óptica UV-Visível (eletrônica)

A absorção de fótons com frequências na faixa do ultravioleta e visível por moléculas é tradicionalmente denominada absorção eletrônica, pois provoca transições eletrônicas, consistindo na promoção de um elétron desde um orbital no estado fundamental até um orbital excitado não ocupado. Existem vários tipos de orbitais moleculares. O orbital tipo  $\sigma$  pode ser formado por combinações de orbitais atômicos tipo  $s$ , ou de um orbital atômico  $s$  e um  $p$  tendo um eixo colinear de simetria. A ligação formada por esta via é chamada ligação tipo  $\sigma$ . Um orbital  $\pi$  é formado por dois orbitais atômicos  $p$  sobrepostos lateralmente.

Uma molécula pode também ter elétrons não ligantes localizados em heteroátomos tais como oxigênio ou nitrogênio. Os orbitais moleculares correspondentes são chamados orbitais  $n$ . A promoção de um elétron não ligante a um orbital antiligante é possível e é denotada de transição  $n \rightarrow \pi^*$ . A energia destas transições eletrônicas está geralmente na seguinte ordem:

$$n \rightarrow \pi^* < \pi \rightarrow \pi^* < n \rightarrow \sigma^* < \sigma \rightarrow p^* < \sigma \rightarrow \sigma^*.$$

Podemos ver, como exemplo, na Figura 2.2 os níveis de energia e as transições possíveis.

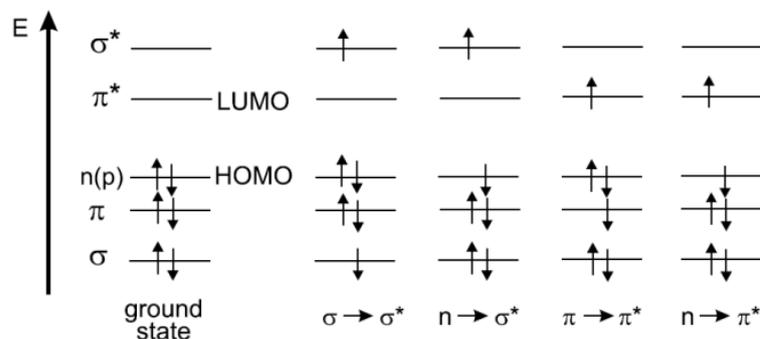


Figura 2.2. Níveis de energia dos orbitais moleculares (HOMO: Highest Occupied Molecular Orbitals; LUMO: Lowest Unoccupied Molecular orbitals) e possíveis transições eletrônicas.

Em espectroscopia de absorção e fluorescência, consideram-se dois tipos de orbitais: HOMO (Highest Occupied Molecular Orbitals) e o LUMO (Lowest Unoccupied Molecular orbitals). Ambos referem-se ao estado fundamental da molécula. Na Figura 2.2, o HOMO está no orbital  $n$  e o LUMO no orbital  $\pi^*$ . Quando um dos dois elétrons de spins opostos (que pertencem a um orbital molecular de uma molécula no estado fundamental) é promovido a um orbital

molecular de maior energia, seu spin está, em princípio, inalterado, pelo que o número quântico total de spin ( $S = \sum s_i$ , com  $s_i = +1/2$  ou  $-1/2$ ) permanece igual a zero. Devido a que a multiplicidade dos estados fundamental e excitado ( $M=2S+1$ ) são iguais a 1, são chamados estado singleto (designado como  $S_0$  o estado fundamental e  $S_1, S_2, \dots$  para os estados excitados) como é mostrado na Figura 2.3

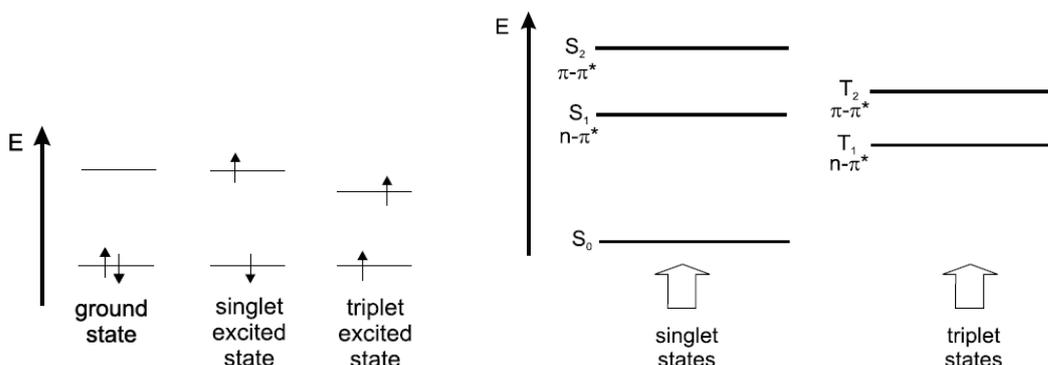


Figura 2.3. Estado fundamental e excitado singleto e tripleto.

A transição correspondente é chamada de transição singleto-singlete. Uma molécula no estado excitado singleto pode sofrer conversões dentro de um estado onde o elétron promovido tem seu spin trocado. Devido a que tem dois elétrons com spins paralelos, o número quântico total de spin é 1 e a multiplicidade é 3. Tal estado é chamado de tripleto porque corresponde a três estados de igual energia. De acordo com a regra de Hund, o estado tripleto tem mais baixa energia que o estado singleto da mesma configuração.

### 2.2.1 Lei de Beer- Lambert

A eficiência de absorção de luz de um comprimento de onda  $\lambda$  por um meio é caracterizado pela absorvância  $A(\lambda)$  e a transmitância  $T(\lambda)$  definida como:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = -\log T(\lambda) \quad (2.2)$$

Onde  $I_{\lambda}^0$  e  $I_{\lambda}$  são a intensidade de luz do campo entrante e saliente no meio absorvente, respectivamente. Em alguns casos, a absorvância da amostra segue a Lei de Beer-Lambert:

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}} = \varepsilon(\lambda)lc \quad (2.3)$$

onde  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar ( $\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ),  $c$  a concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ ) da espécie absorvente e  $I$  é a distância que a luz atravessa pelo meio absorvente (cm).

Quando não existe dependência linear da absorção com a concentração, isto pode ser devido à formação de agregados em altas concentrações ou devido à presença de outras espécies absorventes.

O coeficiente de absorção molar,  $\varepsilon(\lambda)$ , expressa a habilidade da molécula para absorver luz num solvente dado. Na teoria clássica, a absorção molecular de luz pode ser descrita considerando a molécula como um dipolo oscilante, o qual permite introduzir a quantidade chamada força de oscilador, a qual é diretamente relacionada à integral da banda de absorção da seguinte maneira:

$$f = 2303 \frac{mc_0^2}{N_a \pi e^2 n} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} = \frac{4,32 \times 10^{-9}}{n} \int \varepsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu} \quad (2.4)$$

Onde  $m$  e  $e$  são a massa do elétron e a carga elementar, respectivamente,  $c_0$  é a velocidade da luz,  $n$  o índice de refração e  $\bar{\nu}$  é o número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). A probabilidade de transição para uma dada absorção pode estar relacionada à intensidade de absorção através do força de oscilador  $f$ . Em outras palavras, a força de oscilador pode ser tomada como sendo uma medida da probabilidade de transição.

Para a transição  $n \rightarrow \pi^*$ , os valores de  $\varepsilon$  estão na ordem de poucas centenas ou menos e os valores de  $f$  não são maiores que  $10^{-3}$ . Para a transição  $\pi \rightarrow \pi^*$ , os valores de  $\varepsilon$  e  $f$  são, em princípio, bem maiores (exceto para transições proibidas e simétricas):  $f$  é próximo a 1 para alguns compostos, o que corresponde a valores de  $\varepsilon$  da ordem de  $10^5$ .

## 2.3

### Processos de desexcitação

Quando o fotossensibilizante absorve um fóton de luz, a molécula é promovida do estado eletrônico fundamental a um estado eletrônico excitado e logo retorna para seu estado fundamental mediante vários mecanismos, descritos na Fig. 2.4, a seguir (Valeur, 2001; Gilbert et al., 1991):

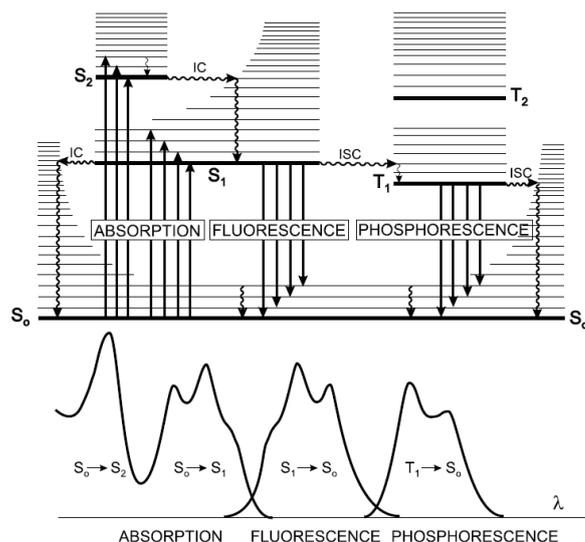


Figura 2.4. Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustração das posições relativas dos espectros de absorção, fluorescência e fosforescência.

### Processos não radiativos

As moléculas no estado excitado entregam o excesso de energia como calor por dois tipos diferentes de processos:

#### Conversão Interna (IC)

O processo de conversão interna é uma transição não radiativa entre dois estados eletrônicos da mesma multiplicidade de spin. Em solução, este processo é seguido por relaxação vibracional até o nível vibracional mais baixo do estado eletrônico final. O excesso de energia vibracional pode ser de fato transferido ao solvente durante colisões das moléculas excitadas com as moléculas do solvente.

#### Cruzamento intersistemas (ISC)

O cruzamento intersistemas é uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos pertencentes a estados eletrônicos de diferentes multiplicidades.

O cruzamento entre sistemas de diferentes multiplicidades é proibido, em princípio, mas o acoplamento spin-orbita pode ser grande o suficiente para fazer isto possível. A probabilidade de cruzamento intersistemas depende dos estados singlete e tripleto envolvidos. Se a transição  $S_0 \rightarrow S_1$  é do tipo  $n \rightarrow \pi^*$ , por exemplo, o cruzamento intersistemas é frequentemente eficiente.

## Processos radiativos

As moléculas em estado excitado podem entregar seu excesso de energia como radiação eletromagnética em dois tipos de processos:

### Fluorescência

A fluorescência é a emissão de fótons acompanhados pela relaxação  $S_1 \rightarrow S_0$ . A emissão de fluorescência ocorre desde  $S_1$  e, por tanto suas características (exceto polarização) não dependem do comprimento de onda de excitação (desde que, é claro, só exista uma espécie no estado fundamental).

A transição 0-0 é usualmente a mesma da absorção e fluorescência. Contudo, o espectro de fluorescência é localizado em comprimentos de onda mais altos (menor energia) que o espectro de absorção, devido à perda de energia em estados excitados pela relaxação vibracional (Figura 2.5).

Em acordo com a regra de Stokes, o comprimento de onda de uma emissão fluorescente deve ser sempre maior que a de absorção. De qualquer maneira, na maioria dos casos, o espectro de absorção se sobrepõe parcialmente ao espectro de fluorescência, devido a que uma fração de luz é emitida em comprimento de onda mais curto que a luz absorvida. Tal observação parece, à primeira vista, estar em contradição com o princípio de conservação de energia. Contudo, tal ‘defeito de energia’ é compensado pelo fato de que, à temperatura ambiente, uma pequena fração de moléculas está num nível vibracional mais alto que o nível 0 (distribuição entre os níveis de energia cumprindo a lei de Boltzmann), tanto no estado fundamental como no estado excitado. À baixa temperatura, este afastamento da lei de Stokes deve desaparecer.

Em geral, as diferenças entre os níveis vibracionais são similares no estado fundamental e no estado excitado, de modo que o espectro de fluorescência muitas vezes se assemelha à primeira banda de absorção, espelhada (regra da “imagem espelho”) (Fig. 2.5). O gap (expresso em número de onda) entre o máximo da primeira banda de absorção e o máximo da fluorescência é o chamado deslocamento de Stokes.

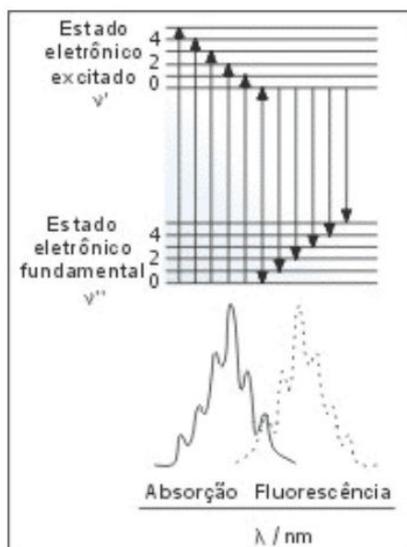


Figura 2.5. A imagem especular dos espectros de absorção e de fluorescência e as respectivas transições (www.chemkey.com).

### Fosforescência

Em solução, à temperatura ambiente, a desexcitação não radiativa do estado tripleto  $T_1$  é predominante sobre a desexcitação radiativa chamada fosforescência. De fato, a transição  $T_1 \rightarrow S_0$  é proibida (mas pode ser observada pelo acoplamento spin-orbita), e a taxa radiativa é muito baixa. Durante um processo tão lento, o número de colisões com as moléculas do solvente favorecem o cruzamento intersistema e a relaxação vibracional em  $S_0$ . Pelo contrário, a baixas temperaturas e/ou num meio rígido, a fosforescência pode ser observada. O tempo de vida do estado tripleto pode, sob estas condições, ser longo o suficiente para se observar fosforescência numa escala de tempo de segundos, ou até minutos.

O espectro de fosforescência é localizado em comprimentos de onda mais altos que o espectro de fluorescência (Fig. 2.4) porque a energia do nível vibracional mais baixo do estado tripleto  $T_1$  é mais baixa que a do singlete  $S_1$ .

## 2.4

### Interações intermoleculares e formação de agregados

Um agregado pode ser considerado como um aglomerado de algumas partículas ou moléculas, que se juntam sem ligações químicas. É caracterizado pela sua estrutura espacial (posição relativa de partículas dentro do agregado) e pelo número de agregação (número médio de partículas no agregado). O tamanho

destes sistemas complexos pode variar de poucos nanômetros (micelas) a vários micrômetros ou mais (filmes finos, membranas). O mecanismo de formação de agregados moleculares baseia-se na ação de forças intermoleculares tais como eletrostáticas, interação  $\pi$ - $\pi$ , pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e o efeito hidrofóbico. Estas interações são relativamente fracas quando comparadas às ligações covalentes. Entretanto, a modulação dessas interações pode, de alguma maneira, influenciar as características do agregado, modificando seu número de agregação e/ou sua estrutura espacial (Borissevich et al., 1998).

A formação de agregado é um processo comum para os compostos com sistema de conjugação  $\pi$ . Considerando os efeitos que exercem influência na formação de agregado temos (Lang et al., 2004):

**Interação eletrostática:** os íons moleculares carregados sofrem uma repulsão, cuja energia é a energia coulombiana

$$W_Q = \frac{Q^2}{4\pi\epsilon r} \quad (2.5)$$

onde  $Q$  é a carga do monômero,  $\epsilon$  é a constante dielétrica do meio e  $r$  é a distância entre os monômeros.

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

$$W_k = \frac{\mu^4}{3(4\pi\epsilon_0)^2 kT r^6} \quad (2.6)$$

onde  $\mu$  é o momento de dipolo do monômero,  $k$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura em Kelvin.

Existe ainda outra força atrativa entre moléculas ou átomos conhecida como “força de London” ou “força de dispersão de van der Waals”. A origem dessa força é a interação entre dipolo flutuante e dipolo induzido, que cada partícula induz na outra. A energia dessa interação é dada por:

$$W_L = -\frac{3}{4} \frac{h\nu\alpha^2}{(4\pi\epsilon_0)^2 r^6} \quad (2.7)$$

onde  $h$  é a constante de Planck,  $\nu$  é a frequência de absorção eletrônica e  $\alpha$  é a polarizabilidade elétrica da molécula.

A interação eletrostática repulsiva é de longo alcance ( $1/r^2$ ), as outras duas forças atrativas ( $1/r^6$ ), são mais eficientes em distâncias curtas. Para distâncias muito curtas entre as moléculas, mais uma interação repulsiva se destaca, a repulsão eletrostática causada pela superposição de orbitais eletrônicos das moléculas. Essa interação repulsiva é proporcional a ( $1/r^{12}$ ). A energia potencial de interação total pode, então, ser representada pelo potencial de Lennard-Jones mais a energia de repulsão eletrostática, no caso de moléculas carregadas, que é de longo alcance. Logo, para se associar e atingir o mínimo da energia potencial, as moléculas carregadas devem ultrapassar uma barreira de potencial, que existe devido a essa repulsão eletrostática.

**Ligação de hidrogênio:** essa ligação se forma entre átomos eletronegativos de uma molécula e o átomo de hidrogênio de outra. Para se formar, os monômeros devem se aproximar para que as nuvens eletrônicas dos átomos que participam dessa ligação se sobreponham. Esta interação é eficiente em distâncias curtas e pode produzir um poço de potencial mais profundo, favorecendo a estabilização do agregado.

**Interação hidrofóbica:** quando moléculas hidrofóbicas, que interagem fracamente com moléculas de água, são introduzidas numa solução aquosa, elas quebram as pontes de hidrogênio entre as moléculas de água, alterando a sua estrutura. Esse processo é acompanhado pelo aumento da energia livre da solução. A tendência das moléculas hidrofóbicas é, então, promover a associação das regiões não polares de duas moléculas, fazendo com que o número de pontes de hidrogênio quebradas diminua e, conseqüentemente, o aumento da energia livre se torne relativamente menor.

Essa interação atrativa tem seu papel na formação de membranas biológicas, micelas, vesículas, etc. Dependendo do tamanho e da hidrofobicidade das moléculas, essa interação pode ser considerada tanto de longo quanto de curto alcance.

**Formação de complexos  $\pi$ - $\pi$ :** as moléculas com sistemas de conjugação  $\pi$  são capazes de formar complexos através da sobreposição de suas nuvens de elétrons  $\pi$ . Esse tipo de ligação é eficiente somente em distâncias curtas como no caso das pontes de hidrogênio.

## 2.5

### Efeito da interação entre cromóforos na absorção

#### 2.5.1 Formação de dímeros

Além dos efeitos da microvizinhança nos cromóforos (efeitos do solvente, pH, presença de surfactantes) existe a interação eletrônica entre cromóforos quando se encontram suficientemente juntos (Cantor e Schimmel, 1998). Para tomar em conta este último fenômeno, considera-se um dímero contendo dois cromóforos idênticos. Supõe-se que os cromóforos monoméricos têm só dois estados eletrônicos (0 e  $a$ ) e uma única banda de absorção da transição desde 0 até  $a$ . A intensidade de absorção do monômero é dada pelo momento de dipolo de transição  $|\langle \phi_0 | \mu | \phi_a \rangle|^2$ .

Examinando um dímero com dois cromóforos monoméricos, observam-se duas bandas de absorção, uma deslocada a uma frequência  $\Delta\nu$  acima da banda do monômero e a outra deslocada da mesma frequência abaixo (Fig. 2.6). A intensidade das duas bandas não é necessariamente igual. Esta observação será explicada nas seções seguintes.

Cantor e Schimmel (1998) fazem considerações sobre a função de onda de dímeros formados por monômeros que não interagem e concluem que o espectro de absorção tem a mesma frequência e intensidade que a de monômeros livres.

Agora vamos descrever fisicamente a interação de dois monômeros formando um dímero (Cantor e Schimmel, 1998). Vamos supor que os monômeros estão suficientemente juntos para interagir eletronicamente tipo  $\pi$ - $\pi$ . Mas a interação é suficientemente fraca para que cada monômero retenha sua identidade, ou seja, os elétrons ainda são localizados em um ou outro monômero, mas cada monômero é perturbado pelo campo elétrico do outro.

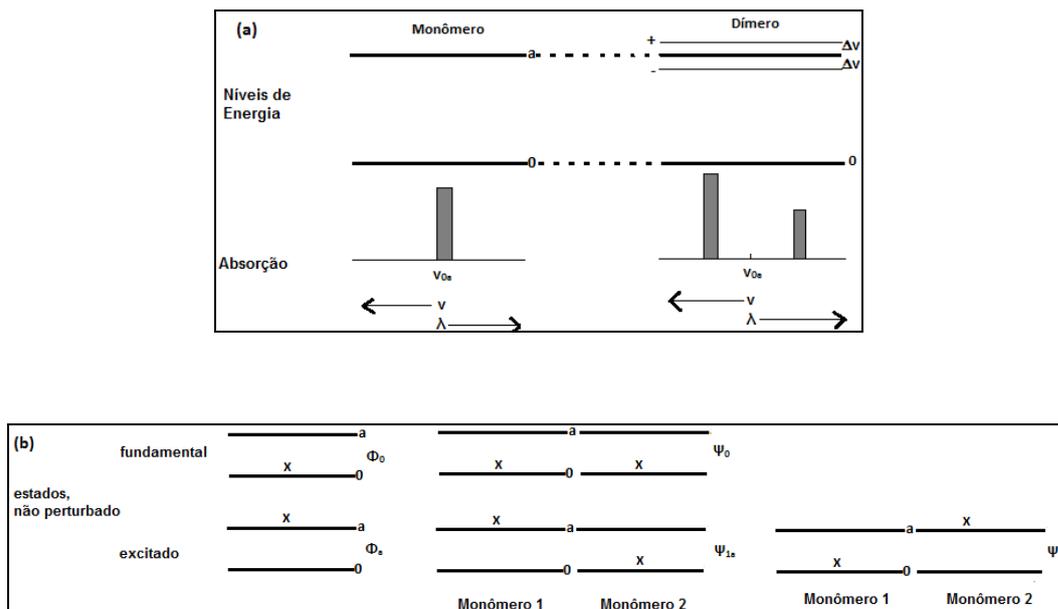


Figura 2.6. Níveis de energia, estados e espectro de absorção de um único monômero e um dímero de dois cromóforos idênticos. (a) O estado excitado do monômero está desdobrado em dois estados por interações eletrônicas. A intensidade de absorção da transição dos dois estados geralmente não são as mesmas. (b) Estados e funções de onda esperados para o monômero e para o dímero no qual não existe interação monômero-monômero. (Cantor e Schimmel, 1998)

Devido a que os monômeros não têm carga, a única interação elétrica que eles sofrem é a interação dipolo-dipolo. Desta maneira o Hamiltoniano do dímero será:

$$H = H_1 + H_2 + V \quad (2.8)$$

onde  $H_1$  e  $H_2$  são os operadores Hamiltonianos do monômeros 1 e 2, respectivamente, e  $V$  é o operador que descreve a interação dipolo- dipolo:

$$V = (\mu_1 \cdot \mu_2) R_{12}^{-3} - 3(\mu_1 \cdot R_{12})(R_{12} \cdot \mu_2) R_{12}^{-5} \quad (2.9)$$

onde  $\mu_1$  e  $\mu_2$  são os operadores dipolo do monômero 1 e 2 respectivamente. e  $R_{12}$  é a distância entre os dois monômeros. Para encontrar as energias dos estados eletrônicos para os dímeros, deve-se resolver a equação de Schrodinger usando a Hamiltoniana da Equação 2.9. Seguindo os critérios da mecânica quântica apenas duas funções de onda satisfazem a equação. Desta maneira, as frequências de absorção podem ser descritas como:

$$\begin{aligned} \nu_+ &= \nu_{0a} + V_{12} / h \\ \nu_- &= \nu_{0a} - V_{12} / h \end{aligned} \quad (2.10)$$

onde  $\nu_{0a}$  é a frequência de absorção dos monômeros (Fig. 2.6 a) e  $V_{12}$  é a energia potencial de interação entre os monômeros 1 e 2 e  $h$  é a constante de Planck.

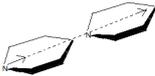
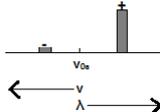
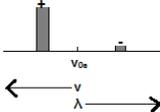
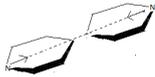
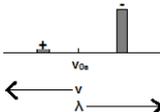
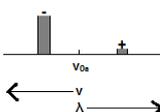
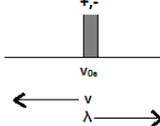
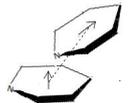
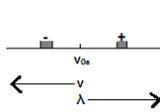
As intensidades das duas transições em  $\nu_+$  e  $\nu_-$  são avaliadas usando o momento de dipolo de transição:

$$D_{0,A^\pm} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos \theta \quad (2.11)$$

com  $\left| \langle \phi_{10} | \mu | \phi_{1a} \rangle \right| \approx 1$  e  $\left| \langle \phi_{20} | \mu | \phi_{2a} \rangle \right| \approx 2$ , onde  $\theta$  é o ângulo entre os momentos de dipolo de transição envolvidos nas absorções eletrônicas individuais do monômero 1 e monômero 2. A Eq. 2.11 mostra que a intensidade relativa das duas bandas de absorção depende da geometria do dímero. Na Tabela 2.1, analisa-se o espectro do dímero com base das equações 2.10 e 2.11.

Tabela 1. Energia de interação do monômero, potenciais de interação monômero-monômero, espectro esquemático para seis possíveis geometrias da piridina.

(Modificado de Cantor e Schimmel, 1998)

Ângulo entre momentos de dipolo de transição ( $\theta$ )	Magnitude do dipolo do dímero ( $D_{0,A^\pm}$ )	$(V_{12})$	Estrutura	Espectro
$0^\circ$	$D_{0,A^+} = 2D_{0a}$	$< 0$ (atrativa) $-2D_{0a} / R_{12}^3$		
$0^\circ$	$D_{0,A^+} = 0$	$> 0$ (repulsiva) $D_{0a} / R_{12}^3$		
$180^\circ$	$D_{0,A^+} = 0$	$> 0$ (repulsiva) $2D_{0a} / R_{12}^3$		
$180^\circ$	$D_{0,A^-} = 2D_{0a}$	$< 0$ (atrativa) $-D_{0a} / R_{12}^3$		
$90^\circ$ (empilhado)	$D_{0,A^\pm} = D_{0a}$	$= 0$ Espectro idêntico a monômero		
$90^\circ$ (mesmo plano)	$D_{0,A^\pm} = D_{0a}$	$< 0$ (atrativa) $-4,2D_{0a} / R_{12}^3$		

## 2.5.2 Hipocromismo

Se os cromóforos estão próximos uns dos outros, ocorrem fortes interações seja entre suas nuvens eletrônicas ou entre suas cargas ou grupos polares. Esta

interação resulta na redistribuição da densidade eletrônica e é observada no espectro de absorção, na alteração da sua intensidade (força de oscilador) onde a intensidade de uma banda decresce e de outra aumenta ou, em alguns casos, novas bandas aparecem (Cantor e Schimmel, 1998). A força de oscilador total deve ser conservada. Quando a energia de interação é suficientemente alta (maior que 40 kJ mol<sup>-1</sup>), as interações moleculares podem conduzir a um hipocromismo e distorção do espectro de absorção. Contudo, no caso de interações ‘fracas’ (4 kJ mol<sup>-1</sup> ou menos) o espectro UV-visível não muda significativamente (Vekshin, 2002).

O hipocromismo é definido como algum decréscimo no coeficiente de absorção em relação ao espectro da solução original de cromóforos. Isto é um uso específico do termo e é diferente do decréscimo na absorbância vista como uma diminuição proporcional à concentração do cromóforo (Lei de Bier-Lambert). O efeito hipocrômico em biomoléculas cromóforas, como a clorofila e o DNA, é bem conhecido (Vekshin, 1989). O hipocromismo é observado numa ampla diversidade de sistemas: corantes agregados, microcristais, polímeros, proteínas, ácidos nucleicos, cloroplastos, etc. (Weissbluth, 1971).

Observações iniciais do efeito hipocrômico de biomoléculas surgiram na década de 1950 e 1960, sendo tratado como um comportamento da densidade óptica devido ao empilhamento de polinucleotídeos (Tinoco, 1960).

Weissbluth (1971) fez um review dos estudos realizados em relação à teoria do hipocromismo e juntou-os nas seguintes categorias: (a) teoria clássica ou semiclássica, (b) teoria de perturbação independente do tempo ou modelo de éxciton e, finalmente, (c) a teoria de perturbação dependente do tempo incluindo a função resposta, susceptibilidade generalizada e métodos de teoria de campos. Para descrever cada categoria, Weissbluth considera um dímero que consiste de duas moléculas fracamente acopladas e são iluminadas por luz contendo componentes espectrais com suas bandas de absorção. Cada molécula é sujeita a um campo que consiste de dois componentes: um produzido pela luz incidente e outro pelas moléculas vizinhas. Assim o campo local com o qual cada molécula interage pode diferir e, desta maneira, o espectro de absorção do dímero tem que diferir do espectro de moléculas que não interagem.

Daremos uma breve descrição do **modelo clássico**, já que este é equivalente em suas características essenciais aos tratamentos da mecânica quântica e chega

aos mesmos resultados. Considera-se um dímero constituído por dois monômeros, num arranjo face-face ou face-cauda. O objetivo desta aproximação é calcular a polarizabilidade do dímero em termos de polarizabilidade dos monômeros individuais. Relaciona-se a força do oscilador no dímero à força do oscilador dos monômeros. Um modelo de duas bandas, com frequências  $\omega_1$  e  $\omega_2$ , para o monômero é capaz de explicar o hipocromismo de uma delas e hiperromismo da outra, quando o dímero é formado. Considerando-se que as duas bandas têm a mesma força do oscilador  $f$ , as forças de oscilador do dímero são dadas por:

$$\begin{aligned} f_{1d} &= 2f \left[ 1 - \frac{(e^2/m)f V_{ab}}{\omega_2^2 - \omega_1^2} \right] \\ f_{2d} &= 2f \left[ 1 - \frac{(e^2/m)f V_{ab}}{\omega_1^2 - \omega_2^2} \right] \end{aligned} \quad (2.13)$$

onde  $e$  é a carga elementar,  $V_{ab}$  é a energia de interação de dois dipolos situados nas posições  $a$  e  $b$  e com direções paralelas entre si,  $m$  é a massa do elétron. Se  $\omega_1 < \omega_2$  e  $V_{ab}$  é positivo (como num arranjo face a face), a força de oscilador  $f_{1d}$  da frequência menor é reduzida e a força de oscilador da frequência maior  $f_{2d}$  incrementa. Conclui-se que existe um hipocromismo na banda  $\omega_1^d$  do dímero e como compensação, um hiperromismo em  $\omega_2^d$ . Encontrou-se também que a banda de baixa frequência do dímero  $\omega_1^d$  permanece da ordem de  $\omega_1$  e  $\omega_2$ , mas a de alta frequência, que sofre hiperromismo, pode se deslocar muito e sair da faixa de detecção.

## 2.6

### Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (PDT, da sigla em inglês) é uma modalidade de tratamento contra alguns tipos de câncer baseada na administração de um fotossensibilizante, o qual é preferencialmente absorvido e retido pelo tecido tumoral, seguida por irradiação local da lesão com luz visível em um apropriado comprimento de onda. A combinação destes dois elementos, na presença de oxigênio, gera espécies citotóxicas tais como oxigênio singlete, permitindo a destruição do tecido tratado. Comparada com tratamentos padrão, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a PDT oferece vantagens como destruição eficiente e seletiva do tecido tumoral sem afetar o tecido saudável. A aplicação da

PDT é muito ampla e se estende para vários tipos de câncer. Segundo a British Association of Dermatologists (Morton, 2002), a terapia fotodinâmica tópica é eficaz nos tratamentos de vários tipos de câncer de pele e está sob avaliação em outras dermatoses. Também é usada numa variedade de tratamentos de doenças cardiovasculares, dermatológicas, oftálmicas e infecciosas (Levy et al., 1996; Dougherty et al., 2002; Fayter et al., 2010)

### 2.6.1 Mecanismo de ação

Quando a droga fotossensível e a luz são combinadas em concentração e dose apropriadas, a PDT apresenta três fases: excitação das moléculas da droga, geração do oxigênio tóxico e morte celular (Fig.2.7).

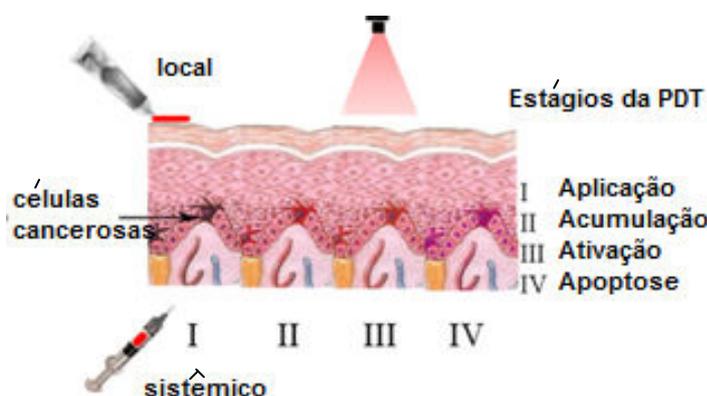
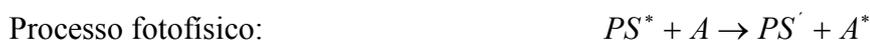


Figura 2.7. Principais estágios da terapia fotodinâmica. O fotossensibilizante (na seringa ou tubo) é aplicado localmente ou sistemicamente (estágio I), acumula-se nos tumores (estágio II) e é então ativado por iluminação externa (estágio III). Isso induz o dano ou a morte celular.

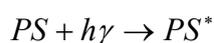
As moléculas em estado excitado podem sofrer reações fotofísicas ou fotoquímicas. A fotosensibilização é o processo mediante o qual uma alteração fotofísica ou fotoquímica acontece em uma molécula (A) como resultado de uma absorção inicial de radiação por parte de outra molécula denominada fotossensibilizante (PS) (Braslavsky et al. 1996). Isto pode ser representada esquematicamente assim:



Quando moléculas de oxigênio estão envolvidas na fotossensibilização, tais processos são chamados de “ação fotodinâmica” e dois diferentes mecanismos são possíveis:

### Mecanismo tipo I

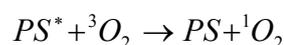
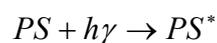
O fotossensibilizante, no seu estado excitado singlete ou tripleto, reage com um substrato via (a) transferência de elétrons ou (b) subtração de hidrogênio para produzir radicais livres, que reagirão com oxigênio para formar radicais peróxidos (Fig. 2.8) e, desta maneira, começar uma reação em cadeia.



Substâncias com estruturas facilmente oxidáveis (como fenóis e aminas) ou redutíveis (como quinonas), em meios polares e anaeróbicos, favorecem o mecanismo tipo I (Bonnet, 1995). Este mecanismo também é favorecido pelo uso de fotossensibilizantes, que absorvem na região espectral do ultravioleta, devido a estados tripletos apresentarem energias relativamente altas, facilitando as reações de transferência de hidrogênio e por consequência a formação de radicais livres (Braun, 1991). Os processos de transferência de elétrons são claramente aumentados, quando fotossensibilizantes são excitados a estados singlete/tripletos de altas energias, em razão do aumento do caráter doador de elétrons do fotossensibilizante (Oschner, 1997).

### Mecanismo tipo II

Neste processo, o fotossensibilizante em seu estado excitado, comumente estado tripleto, transfere energia ao oxigênio molecular no estado fundamental (Fig. 2.8), permitindo que o fotossensibilizante retorne ao seu estado fundamental e obtendo a espécie reativa, o oxigênio singlete ( ${}^1O_2$ ), que irá interagir com substratos ricos em elétrons tais como alquenos, anéis aromáticos, aminas e tioéteres (Foote et al., 1995).



O mecanismo de transferência de energia aparenta ser mais eficiente (constantes cinéticas por volta de  $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) quando comparado às reações de

transferência de carga (mecanismo tipo I), com constantes de velocidade usualmente abaixo de  $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  (Foote, 1976). Esta transferência de energia dos estados tripletos de ftalocianinas para o oxigênio, em soluções aquosas, é muito rápida (entre  $2 \times 10^9$  a  $6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ). Conseqüentemente é esperado que a transferência de energia para outros compostos, que possam competir com o oxigênio, seja menos importante e, então, o mecanismo dominante é o tipo II (Bonnet R. 1995).

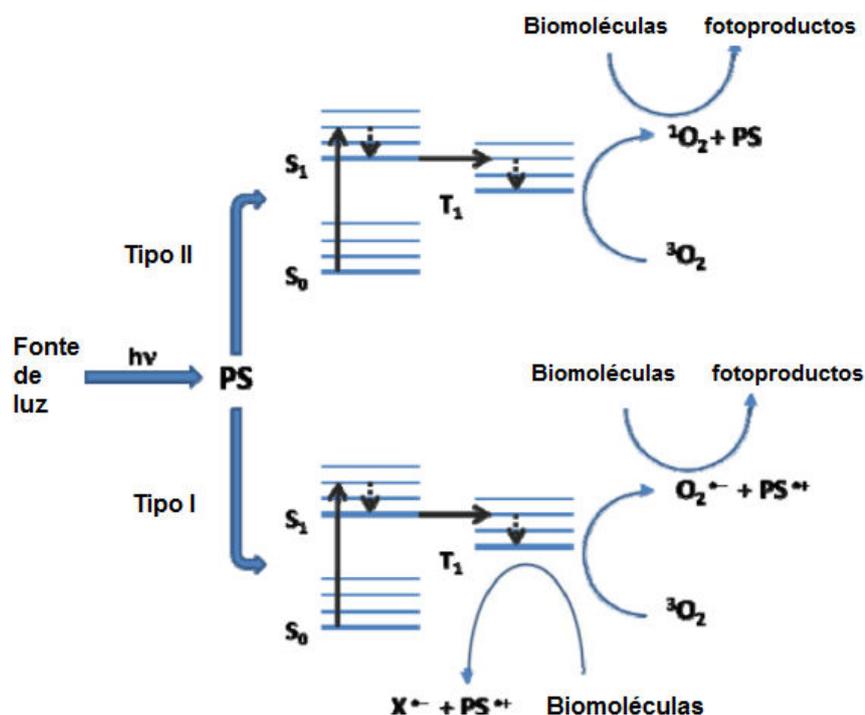


Figura 2.8. Mecanismos de geração de ROS por combinação de luz, fotosensibilizante e oxigênio molecular. O estado fundamental do fotosensibilizante ( $S_0$ ) é irradiado com luz visível excitando-o ( $S_1$ ).  $S_1$  pode passar para um estado excitado do fotosensibilizante ( $T_1$ ), gerando radicais (mecanismo tipo I) e/ ou oxigênio singleto (mecanismo tipo II)

O tempo de vida das espécies de oxigênio singleto é menor que  $3.5 \mu\text{s}$ , que podem difundir-se apenas cerca de  $0,01$  a  $0,02 \mu\text{m}$  durante este período. Desta maneira, a ação inicial do dano é limitada ao sítio de concentração da droga (Thompson et al., 2001).

## 2.6.2 Oxigênio singleto

Apesar de ter sido descoberto no ano de 1924, o oxigênio singleto molecular só veio a ser alvo de estudo depois do ano de 1963 quando Khan e Kasha interpretaram a quimioluminescência da reação do peróxido de hipoclorito causada

pela liberação do oxigênio singleto. Desde então, as propriedades físicas, químicas e biológicas da forma energeticamente rica do oxigênio singleto tem ganhado atenção. Em particular, a produção de oxigênio singleto tem aplicação numa ampla gama de áreas desde fotoxidação, danos em DNA, PDT até ciência de polímeros (DeRosa, 2002).

Os três estados eletronicamente excitados imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental são de oxigênio singleto. Segundo a teoria de orbital molecular, a configuração eletrônica do oxigênio no estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados  $\pi_x^* \pi_y^*$  (Fig. 2.9 a). Estes elétrons tendem a possuir o mesmo spin de forma a produzir multiplicidade máxima e, desta maneira, um estado de mais baixa energia. Esta é uma razão pela qual o estado fundamental do oxigênio é um estado tripleto.

Os estados que possuem energia intermediária ( $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$ , Fig. 2.9 b) são os responsáveis pela reatividade química do oxigênio singleto. A simetria dessas moléculas, diferente do estado fundamental, confere-lhes um considerável tempo de vida quando comparado com a forma de mais alta energia ( $^1\Sigma_g^+$ ) (Fig. 2.9 b), que possui a mesma simetria do estado fundamental. Os estados  $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$  são degenerados (Fig. 2.9 a) e possuem uma distribuição eletrônica onde os elétrons que ocupam um dos orbitais antiligantes  $\pi^*$  se encontram em um dos planos mutuamente perpendiculares. Por serem degenerados, os estados  $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$  são, por conveniência, representados como sendo o estado  $^1\Delta_g$  (DeRosa et al., 2002).

O orbital molecular vazio no estado  $^1\Delta_g$  garante ao oxigênio singleto um caráter eletrofílico, favorecendo sua participação em reações químicas, principalmente, no caso em que os substratos possuem sítios ricos em elétrons (Machado, 2000).

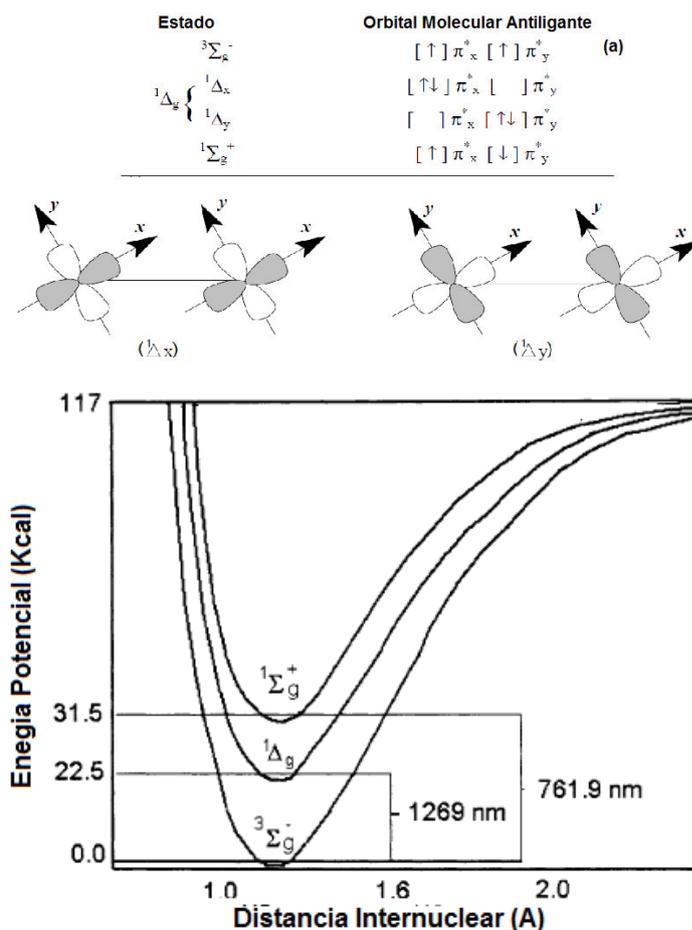


Figura 2.9. (a) Representação dos estados singleto e tripleto do oxigênio molecular (Machado, 2000) (b) Curvas da energia potencial dos três estados eletrônicos mais baixos do oxigênio molecular (DeRosa et al., 2002).

A diferença de simetria entre os estados fundamental e excitados afeta o tempo de vida dessas moléculas. O  $^1\Sigma_g^+$  possui tempos de vida muito menores que o apresentado pelas formas  $^1\Delta_g$ , devido a que tem a mesma simetria da molécula no estado fundamental, que, na fase gasosa, são de 7-12 s e 45 min, respectivamente (Arnold et al., 1968), e em solução são de  $10^{-11}$ -  $10^{-9}$  e de  $10^{-6}$ -  $10^{-3}$  para o  $^1\Sigma_g^+$  e  $^1\Delta_g$ , respectivamente (Merkel et al., 1972). Tendo isso em vista, o estado  $^1\Delta_g$  é quem apresenta maior importância em reações químicas e é para esse estado que se aplica o termo “oxigênio singleto” e a designação “ $^1O_2$ ”.

A desativação do  $^1O_2$  na maioria dos solventes é ocasionada por processos colisionais, onde há conversão de energia eletrônica do  $^1O_2$  em energia vibracional da molécula do solvente, devido ao acoplamento dos modos vibracionais dos ligantes terminais das moléculas dos solventes com as transições eletrônicas e

vibrônicas do  $^1\text{O}_2$ . O tempo de vida do  $^1\text{O}_2$  em água é cerca de 2-  $3\mu\text{s}$  (Machado, 2000). Nos sistemas biológicos o  $^1\text{O}_2$  apresenta tempo de vida extremamente baixo, inferior a 250 ns, difundindo-se menos do que  $0,1\mu\text{m}$  no meio celular. Como o diâmetro das células humanas varia entre 10 a  $100\mu\text{m}$ , o local primário de geração do  $^1\text{O}_2$  na célula determina que estrutura subcelular pode sofrer a ação do oxigênio singlete (Machado, 2000; Oschse, 1997).

## 2.7

### Fotossensibilizantes

#### 2.7.1

##### Histórico

A observação de tecido fotossensibilizado fotoquimicamente foi feita por Raab em 1900, que notou que a exposição de paramécios à eosina (corante fluorescente) numa região muito iluminada provocava sua morte. Nos anos 60, os médicos da Clínica Mayo notaram que a administração de hematoporfirina, HP, a pacientes com câncer provocava pontos fluorescentes nos tumores torácicos quando iluminados com luz ultravioleta. No mesmo ano Lipson et al. (1961) sintetizaram derivados de hematoporfirina (HPD, Photofrin I) e nos anos 70 conseguiu-se desenvolver o entendimento do mecanismo citotóxico do PDT. Hoje, o Photofrin II, um HPD purificado, é o fotossensibilizante aprovado pela Food and Drug Administration, FDA, para tratamento do câncer de rim, no Canadá, e de estados iniciais de câncer de pulmão e avançados de esôfago na Holanda e no Japão. Hoje em dia têm sido feitos estudos de PDT em inúmeros países, incluindo o Brasil.

Os fotossensibilizantes chamados de primeira geração mostraram vários problemas. Estes problemas incentivaram a investigação de novas moléculas chamadas de segunda geração tais como porfirinas derivadas, ftalocianinas, naftalocianinas e clorinas (Banzo, 1990).

As propriedades físico-químicas dos fotossensibilizantes são muito importantes para a eficiência da sensibilização. A pureza química, capacidade de localização específica, curto intervalo de tempo entre a administração e a acumulação máxima no tecido tumoral, rápido clearance do tecido normal,

ativação em comprimento de onda com ótima penetração no tecido (650 a 800 nm), alta eficiência quântica para gerar oxigênio singlete e baixa toxicidade. O gráfico da Fig. 2.10 apresenta a janela ótica de penetração da luz em tecidos.

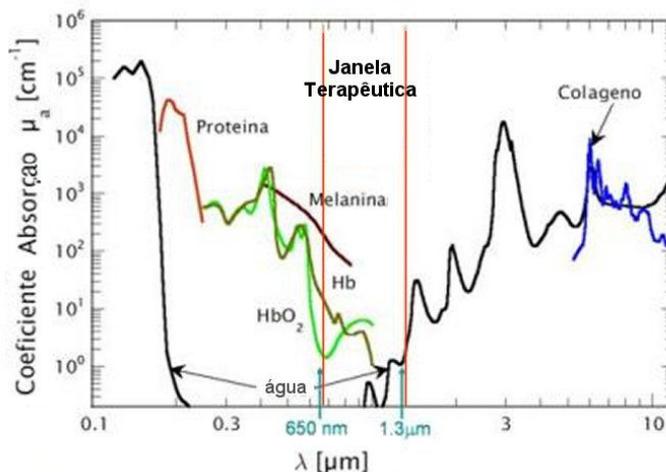


Figura 2.10. Absorção óptica de vários componentes de tecidos, melanina, hemoglobina, água, colágeno, em função do comprimento de onda. Nota-se que entre 650 e 1300 nm tem-se a janela ótica.

Devido a que na maioria dos casos a administração do fotossensibilizante no organismo é feita sistemicamente e que o sangue possui como maior constituinte a água, os fotossensibilizantes aquo-solúveis seriam bons candidatos. Entretanto, o fotossensibilizante deve possuir afinidade aos meios hidrofóbicos, a fim de ser capaz de penetrar na célula após atravessar a membrana lipídica. Portanto, moléculas anfífilicas, cuja polaridade possa ser alterada pela adição de cadeias laterais, são candidatos ideais para aplicação em PDT. Uma destas estratégias é a incorporação do fotossensibilizante no interior de sistemas micelares para serem transportados até o tecido prejudicado e logo ser liberado dentro da membrana celular.

Atualmente, são usados agentes precursores endógenos de fotossensibilizantes, como o ácido  $\delta$ -aminolevulínico ALA, precursor metabólico da Protoporfirina IX (PpIX). A PpIX, pelo fato de ser um composto endógeno, apresenta menor grau de toxicidade para o organismo e tem alta afinidade por células tumorais (Thompson et al., 2001; Blume et al., 2007; Harth et al., 1998; Itin et al., 2004). Também estão em estudo uma ampla gama de porfirinas,

ftalocianinas e clorinas como a  $H_2TMPyP^{4+}$ ,  $H_2TPPS^{4-}$ ,  $ZnPc$ ,  $AlPc$ , entre outros, obtendo-se resultados promissores.

### 2.7.2

#### Ftalocianinas

As ftalocianinas são complexos macrocíclicos conjugados, simétricos e aromáticos com um sistema de 18 elétrons  $\pi$  (Stillman, 1993). O macrociclo central das ftalocianinas é constituído por uma unidade cíclica tetrapirrólica onde suas subunidades pirrólicas são unidas por átomos de nitrogênio. A conjugação do macrociclo é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas, resultando em uma forte banda de absorção na região do vermelho do espectro visível. As ftalocianinas têm elevada massa molecular e podem conter no interior de seu macrociclo diferentes metais, principalmente, diamagnéticos. Os metais, ainda podem conter grupos ligantes (Rodrigues et al., 2008). As ftalocianinas não metálicas (Fig. 2.11 B) são planares e exibem uma simetria  $D_{2h}$  enquanto que as metaloftalocianinas exibem simetria  $D_{4h}$ . As ftalocianinas são de natureza similar às porfirinas (Fig. 2.11 A), mas têm conjugação estendida gerada pelos anéis benzênicos, portanto, têm maior estabilidade química e térmica (Sehlotho, 2007).

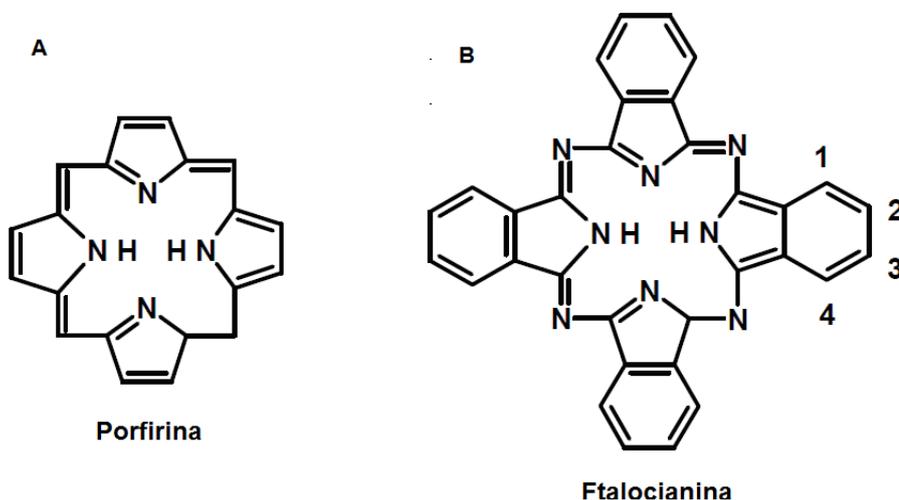


Figura 2.11. Estrutura das moléculas de (A) porfirina e (B) ftalocianina.

O interesse no emprego de metaloftalocianinas em PDT deve-se a que algumas dessas ftalocianinas são eficientes fotossensibilizantes. Isso acontece porque absorvem luz na região entre 650 e 700 nm (janela fototerapêutica), apresentando um coeficiente de absorvidade molar alto  $\epsilon_{670} \approx 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ . A

característica mais importante é que as ftalocianinas são estáveis, não-tóxicas, apresentam elevada seletividade e boa penetrabilidade nas membranas celulares tendendo a se localizar na região interna do tumor (Marques, 2002), além de baixa toxicidade *in vitro* (Gomer, 1991).

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas (Rodrigues, 2008) são fortemente dependentes do íon metálico central. A complexação das ftalocianinas com íons metálicos diamagnéticos, tais como  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Ga^{3+}$  dá origem a compostos com alto rendimento quântico do estado excitado tripleto ( $\Phi_T > 0.4$ ) e com tempos de vida longos (Idowu et al., 2007; Idowu et al., 2008). Entre as ftalocianinas, as de zinco e cloro-alumínio são as que apresentam as propriedades fotofísicas mais favoráveis para aplicações em PDT. Por exemplo, os estados singletos com tempo de vida relativamente longo (3-8 ns) e os estados tripletos são produzidos com alto rendimento quântico (Nunes et al., 2004)

Moléculas de ftalocianinas sofrem auto-oxidação via ataque de  $^1O_2$  gerado por elas mesmas. Esse efeito tem sido reportado principalmente para ftalocianinas contendo anéis piridínicos ligados ao macrociclo (Jonesa et al., 1994). Tem-se observado que moléculas de metaloftalocianinas contendo grupos derivados de moléculas biológicas nas posições periféricas são mais facilmente degradadas, comparadas com outros complexos de metaloporfirinas octosubstituídas (Hamblin et al., 1994).

As propriedades das ftalocianinas podem ser modificadas por substituintes (Stillman, 1989; Seotsanyana-Mokhosi et al., 2001). Por exemplo, a anfifilicidade (de la Torre et al., 1999) pode ser obtida por substituições no anel com grupos hidrofílicos e hidrofóbicos onde estas substituições eliminam agregação entre ftalocianinas (Maree et al., 2002). Substituições axiais e no anel criam impedimento estérico, portanto quanto mais volumosos os ligantes, mais pronunciado o efeito. As substituições abrem caminho para construir estruturas complexas tais como conjugados porfirina-ftalocianina (Zhao et al., 2005). Substituintes podem também ligar-se a dímero tipo sanduíche, polímeros ou longas cadeias de ftalocianinas. A simetria das ftalocianinas pode ser alterada por substituições devido a perturbações geométricas (Day et al., 1998).

## Caracterização espectroscópica das ftalocianinas

As ftalocianinas mostram soluções com cor forte, dependendo dos solventes, metal central e substituinte no anel. Como tínhamos comentado, as ftalocianinas exibem forte absorção no vermelho ( $\epsilon_{670} \approx 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ ) e a posição dos picos varia dependendo da natureza da ftalocianina. O principal pico de absorção é ao redor dos 670 nm (banda Q) e é produzido pelas transições  $n-\pi^*$  (Figura 2.12). Desdobramentos vibracionais são observados na banda Q, devido a transições vibracionais. Têm-se também transições  $\pi-\pi^*$  na região do azul, aumentando a banda B (Ough et al., 1994). Uma banda B é observada ao redor de 350 nm devido à superposição das bandas  $B_1$  e  $B_2$ . Observa-se também uma banda ao redor dos 500 nm para alguns metais de transição; sendo atribuída à transferência de carga do metal até o ligante, ou do ligante até o metal (Fan et al., 1979). São observadas bandas adicionais (N e L) com maior energia que a banda B. Isto é observado em solventes transparentes tais como diclorometano (Nyokong et al., 1987).

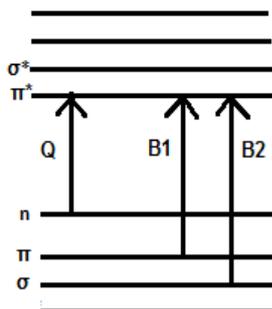


Figura 2.12. Orbitais Moleculares envolvidos nas principais transições por absorção. (Modificado de Ough et al., 1994).

Os metais e a substituição no anel alteram as posições dos níveis de energia do mais alto orbital molecular ocupado (HOMO) ou mais baixo orbital molecular desocupado (LUMO) resultando em diferentes cores e posições dos picos de absorção (Kasuga et al., 2002; Kumar et al., 2001). Ftalocianinas sem metal exibem uma banda Q dividida, enquanto que metalo ftalocianinas têm um só pico (Figura 2.13). Isto acontece devido ao fato que o nível de energia (LUMO) de ftalocianinas sem metal é não degenerado (Stillman et al., 2002). O metal faz com que o nível de energia  $e_g$  seja degenerado, desta maneira acontece uma única

transição eletrônica desde o nível n (HOMO), (Gouterman et al., 1961), resultando num aumento de simetria de  $D_{2h}$  para  $D_{4h}$ .

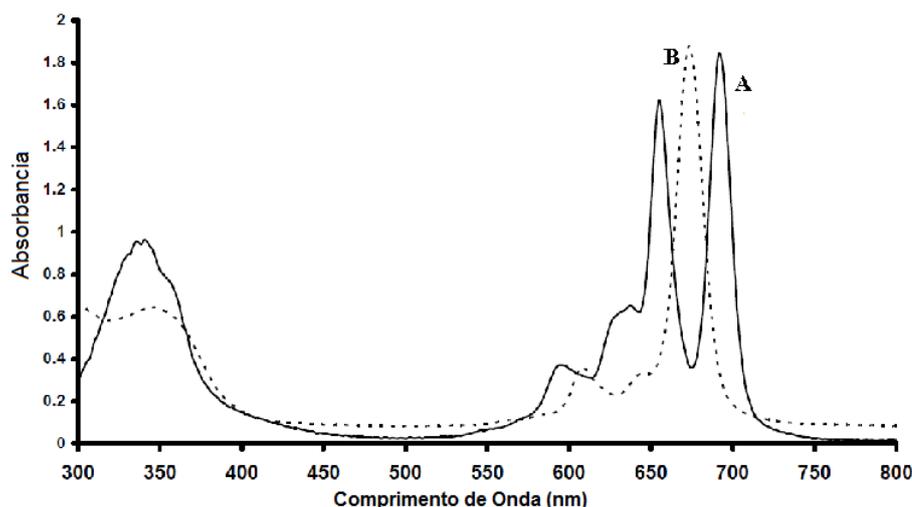


Figura 2.13. Espectro de absorção de (A) ftalocianina sem metal e (B) metalo ftalocianina

Tem sido reportado o deslocamento da banda Q para o vermelho quando se coloca o metal no meio do anel (Ogunsipe et al., 2004). Os substituintes no anel (Zhao et al., 2005) ou axiais (Maree et al., 2001) modificam a energia do gap HOMO-LUMO e causam deslocamentos batocrômicos ou hipsocrômicos. Substituições não periféricas resultam num grande deslocamento ao vermelho da banda Q comparado com a substituição periférica (Cook, 2002).

A protonação dos nitrogênios que unem os grupos isoindol para formar a ftalocianina tem sido reportada por Ogunsipe et al. (2004), resultando em perda da simetria. Um número ímpar de protonação resulta em simetria  $D_{2h}$ , portanto, uma banda Q dividida. Um número par de protonação exibe uma simetria  $D_{4h}$ , portanto uma só banda Q. Quando unicamente dois nitrogênios são protonados, se obtém uma simetria  $D_{4h}$  no caso em que os átomos de hidrogênio adotam a configuração cis (grupos similares do mesmo lado da molécula). Se a protonação é não simétrica, ou seja, trans (grupos similares em lados opostos), a simetria é  $C_{4v}$  (molécula não planar), portanto a banda Q é dividida. Na verdade, a falta de simetria desloca a banda Q para comprimentos de onda mais longos (Beeby et al., 2001).

A natureza do solvente afeta o espectro UV/Vis das ftalocianinas (Law et al., 1997). Os solventes conjugados e aromáticos provocam um deslocamento da banda Q ao vermelho (Kobayashi et al., 1999). Solventes tais como clorofórmio oxidam o anel das ftalocianinas conduzindo a uma diminuição da intensidade da

banda Q, um aparecimento de um pico largo de transferência de carga ao redor dos 500 nm e a mudança de cor para roxo (Ough et al., 1991). A decomposição de solventes como DMSO (Fronczek et al., 2001) forma vários ligantes ao interagir com a ftalocianina, os quais produzem múltiplas bandas Q. Devido ao aumento da polaridade do solvente, os picos associados às transições  $n-\pi^*$  das ftalocianinas sofrem deslocamento ao azul, enquanto os associados a transições  $\pi-\pi^*$  deslocam-se ao vermelho (Calvert et al., 1966). Além disso, os solventes com alto índice de refração, como 1-cloronaftaleno, reduzem o gap de energia que existe entre HOMO e LUMO, causando, portanto, um deslocamento ao vermelho (Ogunsipe et al., 2003).

## 2.8

### Sistema de transporte de drogas

Devido à natureza hidrofóbica de alguns fotossensibilizantes, é indispensável encontrar sistemas de entrega do fotossensibilizante ao alvo. O sistema ideal de transporte de drogas tem que ser capaz de produzir acúmulo seletivo do fotossensibilizante no tecido neoplásico e de liberar as concentrações adequadas no sítio alvo, com pouca ou nenhuma absorção pelo tecido não tumoral. O transportador tem que ser capaz de proteger e incorporar o fotossensibilizante de natureza hidrofóbica sem perda ou alteração da sua atividade no meio aquoso, conservando sua forma monomérica, sendo este um fator determinístico que pode impedir a eficácia da droga in vivo, diminuir sua biodisponibilidade e limitar sua capacidade de absorver a luz. O sistema tem que ser capaz de biodegradar-se e ter pouca imunogenicidade.

#### 2.8.1

##### Classificação dos transportadores de droga

Konan et al. (2002) classificam o processo de distribuição de drogas em ativo ou passivo, de acordo com a presença ou ausência de alvo molecular na sua superfície. O processo ativo usa receptores do tecido alvo ou antígenos para entregar especificamente o fotossensibilizante ao tecido tumoral. O processo passivo implica na aplicação parenteral e distribuição passiva, como através de

lipossomas, dispersões de óleos ou micelas, partículas poliméricas e conjugados hidrofílicos de polímero-fotossensibilizante.

### Sistemas de distribuição ativa

Para proporcionar liberação seletiva do fotossensibilizante no tecido tumoral estudam-se associações fotossensibilizantes-alvo, incluindo conjugados que contêm fotossensibilizantes e um segmento específico do receptor-alvo. Vantagens desta aproximação: alta afinidade do segmento específico pelo receptor ou antígeno na superfície celular do alvo, aumento da eficiência e seletividade por sua localização específica, e baixa dose efetiva dos fotossensibilizantes. O conjugado é biodegradável e, portanto, não é tóxico nem provoca imunogenicidade. Nesse caso estão as lipoproteínas e os anticorpos associados a sistemas passivos (Figura 2.14).

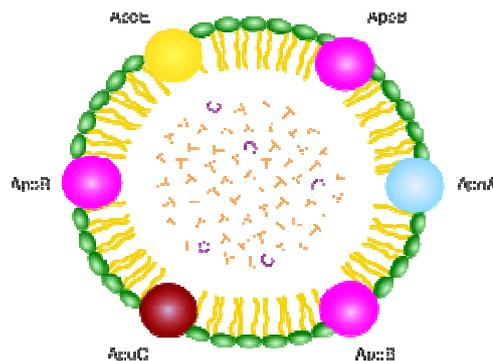


Figura 2.14. Estrutura das lipoproteínas: ApoA, ApoB, ApoC, ApoE (apolipoproteínas); T triacilglicerol, um tipo de lipídio, formado por uma molécula de glicerol, que tem três ácidos graxos esterificados, saturados ou insaturados; C (colesterol); verde (fosfolípidios).

### Veículos de distribuição passiva

Lipossomas, óleos dispersores ou micelas, partículas poliméricas e conjugados hidrofílicos de polímeros-fotossensibilizantes são considerados transportadores passivos porque seguem um modelo de distribuição natural (difusão passiva e processos de fagocitose). A acumulação seletiva no tecido alvo é devida ao efeito de retenção do tecido tumoral.

## Lipossomas

São vesículas de fosfolipídios e colesterol unilamelares ou multilamelares, as quais permitem incorporar drogas hidrofílicas e hidrofóbicas em sua matriz. A Figura 2.15 mostra um esquema da estrutura de um lipossoma unilamelar que pode ser utilizado para transporte de diversos fármacos e biomoléculas.

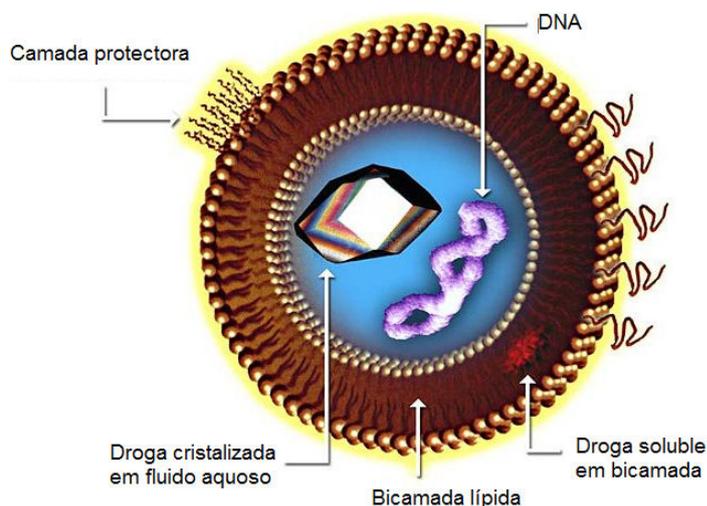


Figura 2.15. Lipossomas e transporte de fármacos.

Um dos objetivos de incorporar fotossensibilizantes aos lipossomas é manter o estado monomérico das moléculas, para se ter um aumento do consumo de oxigênio, já que as espécies monoméricas são eficientemente mais fotossensibilizadas que as agregadas.

Derycke e de Witte (2004), fizeram um review sob as diferentes estratégias que têm sido desenvolvidas para transportar fotossensibilizante ao alvo mediante lipossomas. Eles concluem que estes veículos possibilitam a melhora substancial da eficiência da PDT e permitem maior segurança na utilização dos fotossensibilizantes. Canete et al. (1998) mostraram que a encapsulação da meso-tetrafenilporfirina em lipossoma permitiu a monomerização do fotossensibilizante o qual foi capaz de gerar oxigênio singleto e provocar a fotoxidação de células de carcinoma humano da linhagem HeLa. Sadzuka et al. (2006) mostraram que existe um aumento na retenção tumoral do Photofrin® encapsulado em lipossomas Stealth®, além de um aumento no rendimento quântico de oxigênio singleto. Vários trabalhos (Nunes et al. 2004; Garcia et al., 2011) estudaram a ZnPc encapsulada em lipossomas e sugeriram que pode ser administrada para PDT.

## Detergentes ou surfactantes e micelas

Detergentes são moléculas anfífilas com regiões hidrofóbicas e hidrofílicas que podem autoassociar-se formando uma variedade de estruturas, tais como micelas esféricas ou cilíndricas, vesículas, lipossomas, microtúbulos, microemulsões, etc. O tamanho dessas varia de 0,1 nm a 1 µm. A associação das moléculas de surfactantes ocorre por interação de natureza entrópica, denominada interação hidrofóbica.

Alguns compostos anfífilos são chamados de surfactantes porque alteram as propriedades superficiais do solvente. A formação das micelas, micelização, começa a partir de uma concentração mínima chamada concentração micelar crítica, CMC (Fig. 2.16).

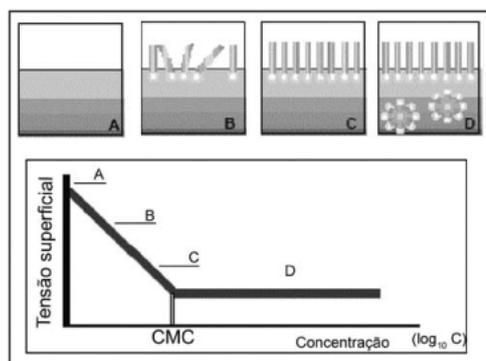


Figura 2.16. Distribuição do surfactante numa solução aquosa, efeito na tensão superficial e formação de micelas.

## Conjugados hidrofílicos polímero-fotossensibilizante

Possibilidades interessantes foram abertas com o aumento da hidrofílicidade dos fotossensibilizantes por meio da coordenação de polímeros apropriados catiônicos, aniônicos e neutros, HPMA, poli-L-lisina, polietileno glicol (PEG) e poli (vinil álcool) (PVAL).

Alguns fotossensibilizantes têm sido encapsulados em micelas poliméricas as quais se diferenciam das micelas convencionais por sua baixa concentração micelar crítica (em torno de  $10^{-7}$  mol/L) comparada às micelas convencionais (em torno de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  mol/L) (Sibata 2004, Nishiyama et al., 2009). Sibata et al. (2004) mostraram que as propriedades fotofísicas da ZnPc não foram modificadas quando o fármaco foi encapsulado em micelas de longa duração LTCM (PEG-5000-estearoil fosfatidil-etanolamina DSPE) sugerindo que o fotossensibilizante

pode ser administrado por este sistema carreador. Vior et al. (2011) comprovaram que o uso de nanoemulsões de isopropyl myristate e Tween 80® , no transporte de tetrakis-(1-adamantilsulfanyl) ftalocianinato de zinco (II), uma ftalocianina lipofílica, permite uma alta eficiência quântica de oxigênio singlete. Nishiyama et al. (2006) encapsularam dendrímeros aniônicos de meso-tetrafenilporfirina de zinco (sendo as unidades dendríticas constituídas por polibenzil éter e grupos carboxílicos periféricos) em micelas poliméricas catiônicas de PEG-Poli(L-lisina) e mostraram que a eficiência fotodinâmica do fotossensibilizante sobre células de carcinoma de pulmão aumentaram em 280 vezes, devido à geração do oxigênio singlete dentro das micelas poliméricas e a ausência de agregados dendríticos. Embora os resultados acima sejam interessantes, estudos in vivo mostraram que micelas poliméricas causaram uma pequena regressão tumoral, e aumentaram o acúmulo de fármacos em tecidos saudáveis (Taillefer et al., 2001).

#### Partículas poliméricas e não poliméricas (nanopartículas)

Chatterjee et al. (2008) trocaram a classificação estrutural dos transportadores de drogas de Konan et al. por uma classificação funcional. Funcionalmente, as nanopartículas dividem-se em ativas e passivas, estas últimas participando da excitação do fotossensibilizante.

As portadoras ativas são classificadas pelo seu mecanismo de ativação. Exemplos são os quantum dots, nanopartículas fotossensibilizantes, que transferem energia diretamente ao oxigênio ao redor dela; e partículas que absorvem luz de baixa energia e geram emissões de alta energia por processos de dois fótons, ativando os fotossensibilizantes associados.

As portadoras passivas podem subdividir-se pela composição do material: **Nanopartículas biodegradáveis** poliméricas (alternativa dos lipossomas). A principal vantagem é a alta quantidade de droga que se pode colocar dentro das partículas. Permitem a distribuição específica mediante a incorporação, nos polímeros, de uma região sítio-específica. A modificação da superfície com certos polímeros (PEG, PLGA ou PEO) pode aumentar o tempo de circulação no corpo. Alguns fotossensibilizantes encapsulados em nanoesferas poliméricas vêm mostrando excelentes resultados em PDT. A meso-tetrahidroxifenilporfirina encapsulada em nanopartículas do polímero do ácido lático-co-glicólico (PLGA) foi mais eficiente em reduzir a viabilidade de células cancerígenas da linhagem

EMT6 (Konan et al., 2003). Pesquisas in vivo realizadas por Vargas et al. (2004) em modelos de membranas corioalantóides de embriões de aves mostraram que a meso-tetrahidroxifenilporfirina, quando encapsulada em nanopartículas de PLGA, foi mais eficiente em causar um efeito tóxico.

**Nanopartículas não-poliméricas** como cerâmicas e metais. Elas não são biodegradáveis e por isso não são usadas tradicionalmente em distribuição de drogas. Mas como em PDT os fotossensibilizantes também não são destruídos, sendo tóxicos somente quando irradiados, é possível usar partículas não biodegradáveis em sua distribuição. Numa interessante aplicação, uma partícula de cerâmica com um núcleo magnético foi seletivamente colocada num tecido tumoral. Exposição a um campo DC resultou em magnetocitólise (rompimento da célula). Os autores sugeriram combinar a fototoxicidade do fotossensibilizador, distribuído na capa cerâmica, com a propriedade de magnetocitólise (Roy et al., 2003). Nanopartículas de ouro contendo em sua superfície moléculas de ZnPc ligadas ao mercaptoalquil éter apresentaram elevado rendimento quântico de oxigênio singleto em razão da sua associação com o agente de transferência de fase que apresenta em sua estrutura um átomo de bromo (efeito do átomo pesado) (Hone et al., 2002).

Num review feito por Ji et al. (2010), sobre aplicação de nanotubos de carbono em diagnóstico e tratamento de câncer, indicam-se múltiplas aplicações que se têm feito com estes materiais. Entre estas, a funcionalização e o uso como sistemas de entrega de fármacos são analisados e é feita uma comparação com técnicas tradicionais concluindo-se que a eficiência dos tratamentos melhora com a utilização dos nanotubos.

## 2.9

### **Interação de surfactantes com fotossensibilizantes**

A associação de fotossensibilizantes com surfactantes tem sido amplamente estudada. A incorporação do fotossensibilizante em estruturas formadas por surfactantes, tais como o catiônico SDS, o aniônico CTAB, e os não iônicos como Tween<sup>®</sup> 20 e Tween<sup>®</sup> 80; influenciam drasticamente seu estado de agregação e suas características espectroscópicas. Tem-se mostrado que os mecanismos de interação dependem de contribuições eletrostáticas e hidrofóbicas (Maiti et al.,

1998; Gandini et al., 1999), sendo que estas interações dependem da cabeça polar do surfactante e do pH do meio (Santiago et al., 2008), assim como da carga elétrica e da hidrofobicidade de grupos do fotossensibilizante. A estrutura de agregados fotossensibilizantes-surfactantes depende da concentração do surfactante. Mesmo em baixas concentrações, surfactantes iônicos podem formar agregados premicelares com fotossensibilizantes. Acima da CMC, as micelas são usualmente consideradas como um meio para solubilizar os agregados premicelares. Gandini et al. (1999) utilizaram surfactantes para fazer um estudo da natureza da interação de alguns fotossensibilizantes com membranas, utilizando para isto absorção ótica e fluorescência.

Tem-se mostrado que alguns polímeros podem melhorar as propriedades terapêuticas de diferentes fotossensibilizantes (Rhyner et al., 2008; Solovieva et al., 2009). Algumas substâncias usadas como transportadoras de drogas, como polímeros anfífilos, servem para solubilizar fotossensibilizantes por complexação, além de mudar sua distribuição no tecido e aumentar sua biodisponibilidade. A adição de anticorpos aos polímeros resulta na acumulação seletiva da droga nas células tumorais. Uma grande quantidade de polímeros biologicamente compatíveis, como a grande família de poli(óxidos de alquilenos), é de particular importância devido à grande variedade de propriedades destes polímeros, e sua simples disponibilidade e síntese. Os blocos poliméricos de óxido de etileno, EO, e óxido de propileno, PO, (Pluronic<sup>®</sup> ou Poloxamers<sup>®</sup>) estão sendo usados em farmácia e medicina como imunoadjuvantes e em emulsões biologicamente compatíveis. Tem sido mostrado que os Pluronic favorecem o transporte de fármaco através de membranas para dentro das células tumorais. É evidente que a penetração do fotossensibilizante através das membranas aumenta a eficiência da geração do oxigênio singleto nas células.

Os Pluronic (PEO-PPO-PEO) são caracterizados pela sua estrutura anfífila e são capazes de se agregar em solução aquosa e formar micelas; nesse caso, o centro hidrofóbico da micela está composto de unidades de PO e a superfície hidrofílica inclui as duas cadeias de unidades de EO (Figura 2.17).

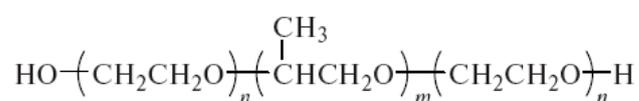


Figura 2.17. Estrutura dos Pluronic

Os pluronic diferem nas suas propriedades hidrofílicas devido à relação entre os blocos do óxido de etileno e o óxido de propileno. Os nomes dos Pluronic consistem de uma letra definindo a aparência do polímero puro (F—flocos, P—pasta ou L—líquido) e dois ou três dígitos. O primeiro ou os dois primeiros dígitos correspondem ao grau de polimerização do bloco hidrofóbico PPO dividido por cinco, e o último dígito corresponde a um décimo da porcentagem em peso de EO no copolímero (Solovieva A. B. et al., 2009). Por exemplo, PF--68 vem em flocos, tem 30 unidades de PO (óxido de propileno) e 80% em peso de EO (óxido de etileno). Devido a sua baixa concentração micelar crítica, CMC, e sua toxicidade relativamente baixa, os Pluronic são candidatos adequados como nanocontêineres micelares para entrega controlada de droga.

Tem-se mostrado que os Pluronic solubilizam eficientemente porfirinas insolúveis na água, derivados da protoporfirina IX (Solovieva et al., 2006), porfirinas hidrofílicas (Zhientaev et al., 2009) e hidrofóbicas (figura 2.18), as quais são eficientes fotossensibilizantes na geração de oxigênio singlete. O complexo porfirina-pluronic produz foto-oxidação do triptofano, através da geração de oxigênio singlete, sendo esta reação usada para estimar a eficiência do fotossensibilizante na geração do oxigênio singlete na fase aquosa (Solovieva et al., 2006). O grau de solubilização da porfirina pelo polímero anfifílico foi determinado pelos espectros de absorção UV-VIS da porfirina fotossensibilizante em solução aquosa das micelas de Pluronic. A eficiência da porfirina como fotossensibilizante foi determinada seguindo a foto-oxidação de triptofano. A cinética do processo pode ser observada pelo decrescimento do espectro de absorção UV do triptofano (Solovieva et al., 2006), ou por sua fluorescência (Zhientaev et al., 2009) ( $\lambda_{\text{abs}}=280\text{nm}$ ,  $\lambda_{\text{fl}}=360\text{nm}$ ).

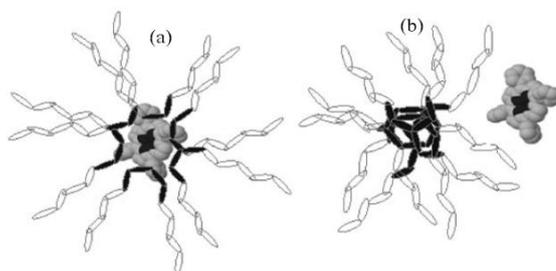


Figura 2.18. Micelas de Pluronic com a localização de porfirinas (Zhientaev T. M. et al., 2009): (a) Porfirina insolúvel em água localizada no centro hidrofóbico micelar. (b) Porfirina hidrofílica localiza-se na superfície hidrofílica micelar.