



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE COMPLEXOS
HIPOCRELINA B: LANTANÍDEOS PARA USO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA

DANIEL JOSÉ TOFFOLI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora: Dra. Lilia Coronato Courrol

São Paulo
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE COMPLEXOS
HIPOCRELINA B: LANTANÍDEOS PARA USO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA

DANIEL JOSÉ TOFFOLI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Materiais.

Orientadora: Dra. Lilia Coronato Courrol

São Paulo
2008

*Aos meus pais, que durante toda a vida
sofreram inúmeras privações para que eu
tivesse a oportunidade de chegar até aqui, a
minha singela dedicatória.*

AGRADECIMENTOS

Aproveito este pequeno espaço, em que posso abdicar à linguagem formal imposta por um trabalho científico, para agradecer às pessoas que ao longo deste período efetivamente me ajudaram com o andamento deste trabalho e merecem reconhecimento.

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida e por todas as oportunidades que sempre se fazem presentes.

À minha mãe, por toda a paciência nos meus momentos de mau-humor originados pelo presente trabalho. Não sei como teria conseguido sem ela.

Ao meu pai, pela confiança sempre depositada em mim.

À Dra. Lilia, pela oportunidade proporcionada, pela paciência e amizade.

À CAPES, pela bolsa concedida.

À Flávia, à Camila, à Luciane e à Andréa, por toda a ajuda no laboratório (e também pela distração nas horas vagas).

À Sra. Solange Eiko Mitani, pelos vários equipamentos, instrumentos e vidrarias emprestados, pelas preciosas dicas na execução de diversos procedimentos experimentais e, claro, pela extrema simpatia e cordialidade.

À Dra. Martha Simões Ribeiro, por ter me acolhido como um de seus alunos, concedendo-me total liberdade para usufruir de seu laboratório, e por proporcionar um ambiente agradável de trabalho.

Ao Renato e à Ilka, por toda ajuda, presteza, orientação e interesse.

À Dra. Cristina e à Dra. Helena Miho Shihomatsu, do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN, pela atenção e cordialidade e pelas explicações sobre alterações de pH.

Ao Dr. Ricardo Egul Samad, pelo uso do espectrômetro de fibra da Newport.

Ao Dr. Laércio Gomes, pelas medidas de emissão no infravermelho e pelas frutíferas discussões a respeito do trabalho.

Aos Drs. Maurício Baptista e Divinomar Severino, do Instituto de Química da USP, pelas medidas de emissão no infravermelho.

Ao Dr. Niklaus Ursus Wetter, pelo uso dos laser de Nd:YAG.

Ao agente Luís, à Dona Marta e à Nena, por terem me acolhido no CLA.

Ao Felipe, pelas medidas de absorção no infravermelho.

Ao Ivanildo, ao Eduardo, ao Horácio e ao Thiago, que propiciaram uma estada agradável no CLA.

Aos meus amigos Rogério, Patrícia, Daniel, Fábio e Déia, sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando. Sem dúvida foram extremamente importantes para que eu conseguisse sempre seguir em frente, apesar de todos os pesares.

E, por fim, à Prof^ª. Dra. Regina Maria Ricotta, sempre presente, mesmo distante, pelo apoio, pelos conselhos, pelo interesse e por toda a amizade ao longo destes anos.

Muito obrigado!

*“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma
pessoa de sucesso. O sucesso é consequência.”*

Albert Einstein

“Investir em conhecimentos sempre rende melhores juros.”

Benjamin Franklin

CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE COMPLEXOS HIPOCRELINA B: LANTANÍDEOS PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

DANIEL JOSÉ TOFFOLI

RESUMO

Um estudo das propriedades ópticas do cromóforo hipocrelina B (HB) e de seus complexos com os íons lantânio (La^{3+}), európio (Eu^{3+}) e térbio (Tb^{3+}) em soluções em etanol foi realizado. Tal pigmento enquadra-se como um promissor fotossensibilizador de segunda geração dadas suas ótimas propriedades, tais como rápido metabolismo *in vivo* e principalmente elevado rendimento quântico de geração de oxigênio singleto (Φ_{Δ}). O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a primeira consistiu do estudo espectroscópico dos complexos de hipocrelina B (HB) com os íons lantanídeos (Ln^{3+}), e a segunda, de testes de PDT *in vitro* em cultura do fungo *Candida albicans*. Na primeira etapa do trabalho, a melhor razão molar entre HB e Ln^{3+} foi verificada através do monitoramento do pico de absorção em maior comprimento de onda de cada um dos complexos. O maior deslocamento do pico de absorção da HB (de 589 nm para 614 nm) foi notado para os complexos com razão de 1 mol de HB para 2 mols de íon lantanídeo. Observou-se que a emissão da HB e de seus complexos ocorre desde cerca de 600 nm até 750 nm. Foi possível, com base nos espectros de absorção e de emissão, calcular os valores de níveis de energia da molécula e de seus complexos. Todos os fotossensibilizadores apresentaram como menor nível de energia valor superior a 0,98 eV, o que é um indício de sua capacidade de geração de oxigênio singleto. Foram determinadas as constantes de dimerização das amostras, de maneira a identificar sua tendência à formação de dímeros ou agregados de ordem superior, e os valores obtidos para a HB e seus complexos com lantânio, európio e térbio foram, respectivamente, de $4,7 \cdot 10^4$, $3,6 \cdot 10^5$, $2,1 \cdot 10^5$ e $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Todas as amostras mostraram-se estáveis perante a ação de luz de 532 nm de até 400 mW/cm^2 de intensidade pelo período de uma hora de irradiação. As capacidades de geração de oxigênio singleto das amostras foram determinadas tanto através do método espectroscópico direto (detecção da emissão do oxigênio singleto em torno de 1270 nm) quanto do método químico indireto (variações na absorção em 440 nm do composto RNO). Notou-se que para a HB o método direto indicou haver geração de oxigênio singleto, e o método químico revelou que esta espécie é gerada à taxa de $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; para HB: La^{3+} (1:1) obteve-se aumento de 32% na geração

de oxigênio singleto em relação à HB, e para HB:La³⁺ (1:2), determinou-se taxa de $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ pelo método indireto. Com base nos dados experimentais obtidos, verificou-se que o melhor dentre os complexos estudados foi o HB:La³⁺ (1:2), sendo este e seu precursor HB então aplicados em testes de PDT antimicrobiana *in vitro*, constituindo a segunda etapa do trabalho. A concentração de HB ideal para trabalho obtida foi de 10 μM . Notou-se eliminação total de microorganismos com apenas 30 segundos de irradiação com LED de 460 nm e intensidade de 333 mW/cm^2 tanto para o complexo como para o seu precursor. Porém, com excitação em 660 nm com esta mesma intensidade, apenas HB:La³⁺ (1:2) se mostrou efetivo, chegando ao efeito fotodinâmico total após 6 minutos de irradiação; a redução causada pela HB no mesmo intervalo de tempo foi bem menos pronunciada, o que comprova a eficiência do fotossensibilizador produzido.

SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF HYPOCRELLIN B: LANTHANIDE COMPLEXES FOR USE IN PHOTODYNAMIC THERAPY

DANIEL JOSÉ TOFFOLI

ABSTRACT

A study about the optical properties of the chromophore hypocrellin B (HB) and of its complexes with lanthanum (La^{3+}), europium (Eu^{3+}) and terbium (Tb^{3+}) ions in ethanol solutions was realized. This pigment is a potential second generation photosensitizer due to its great properties, as high *in vivo* metabolism and mainly high singlet oxygen generation quantum yield (Φ_{Δ}). The present work was carried out in two stages: the first one consisted of the spectroscopic study of the complexes of HB with lanthanide ions (Ln^{3+}); the second one, of *in vitro* PDT tests against *Candida albicans*. In the first stage of the work, the best molar ratio between HB and Ln^{3+} was verified by monitoring the complexes longer wavelength absorption peaks. The larger red-shift (from 589 nm to 614 nm) was noted for the complexes with 1 mol of HB for 2 moles of lanthanide ions. It was observed that HB and its complexes emit from about 600 nm up to 750 nm. It was possible, from the absorption and emission spectra, to calculate the values of energy levels for the molecule and its complexes. All photosensitizers showed for the lower energy level value higher than 0,98 eV, which can indicate that they are able to generate singlet oxygen. The dimerization constants of the samples were determined, for verifying their tendency for giving rise to dimmers or higher order aggregates. The obtained values of this parameter for HB and its complexes with lanthanum, europium and terbium were, respectively, $4,7 \cdot 10^4$, $3,6 \cdot 10^5$, $2,1 \cdot 10^5$ and $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. All the samples showed to be stable against the action of light of 532 nm with intensity up to 400 mW/cm^2 for the period of time of 1 hour. The capacities of generating singlet oxygen were determined by the direct (detection of the singlet oxygen emission around 1270 nm) and the indirect methods (changes in 440 nm absorption of RNO). The direct method indicated that HB can generate singlet oxygen, and the chemical method revealed that this specie is generated following a tax of $2,8 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; for HB: La^{3+} (1:1), it was obtained an enhancement of 32% on the singlet oxygen generation related to HB, and for HB: La^{3+} (1:2), the indirect method presented tax of $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Based n the experimental data, the best among the studied complexes was HB: La^{3+} (1:2). Thus, this and its precursor, HB, were applied in antimicrobial PDT *in vitro* tests, the second stage of this work. The ideal concentration of

HB was 10 μM . With only 30 seconds of irradiation with LED in 460 nm and with 333 mW/cm^2 of intensity, it was observed lethal effect for all the microorganisms, with both HB and its complex. However, with excitation at 660 nm at the same intensity, only HB:La³⁺ (1:2) was effective, reaching total photodynamic effect after 6 minutes of irradiation; the reduction caused by HB in the same time interval was lower, which proves the effectiveness of the produced photosensitizer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática do princípio que norteia a Terapia Fotodinâmica (PDT). O efeito terapêutico (necrose e/ou apoptose causadas pela ação de ERO formadas) somente se pronunciará caso haja ação conjunta de luz de comprimento de onda adequado, de um cromóforo (fotossensibilizador) e de oxigênio em seu estado fundamental (3O_2 ou $^3\Sigma_g^-$). _____ 4
- Figura 2.** Região do espectro eletromagnético correspondente à janela terapêutica (de 600 a 800 nm). ____ 6
- Figura 3.** Diagrama de Jablonski (ou diagrama de níveis de energia) ilustrando os processos fotoquímicos sofridos pelos fotossensibilizadores, em que A corresponde à absorção, F e P, à fluorescência e à fosforescência, respectivamente (ambos processos de decaimento radiativos), e CI e CIS, à conversão interna e ao cruzamento intersistemas, respectivamente (ambos processos de decaimento não radiativos). _____ 7
- Figura 4.** Estruturas moleculares de: (a) hipocrelina A ($C_{30}H_{26}O_{10}$), e (b) hipocrelina B ($C_{30}H_{24}O_9$). ____ 15
- Figura 5.** Estrutura molecular do grupo perileno. _____ 15
- Figura 6.** Representação esquemática simplificada da distribuição dos níveis de energia da molécula de oxigênio, em que se observam seu estado fundamental, e os dois primeiros estados excitados. _ 19
- Figura 7.** (a) Curva de energia potencial de uma molécula em função da distância internuclear R para cinco estados eletrônicos. No detalhe à direita (b), representa-se a variação de vários níveis de energia rotacionais para cada nível vibracional, e a variação destes para um mesmo nível eletrônico. 26
- Figura 8.** Espectrofotômetro Olis Cary-17 D, da Varian, do Laboratório de Espectroscopia de Absorção Óptica do Centro de Lases e Aplicações do IPEN. _____ 31
- Figura 9.** Configuração experimental para tomada de espectros de emissão feita com espectrômetro de fibra da Newport Instruments, modelo OSM-400-UV/VIS. _____ 32
- Figura 10.** Espectrofluorímetro Jobim Yvon Fluorolog 3 utilizado para tomada dos espectros de emissão. 32
- Figura 11.** a) Representação esquemática do aparato experimental baseado na técnica de lock-in empregado para a tomada de espectros de emissão no Laboratório de Espectroscopia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN. b) Fotografia do referido arranjo. _____ 33
- Figura 12.** Detalhe em que é mostrada a excitação em 532 nm (à direita) e a emissão da amostra na região do vermelho (à esquerda). _____ 35
- Figura 13.** Espectrofotômetro Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation. _____ 35
- Figura 14.** Espectros de absorção óptica da HB e de seus complexos em diferentes razões molares: (a) $HB:La^{3+}$, (b) $HB:Eu^{3+}$ e (c) $HB:Tb^{3+}$. _____ 39
- Figura 15.** Soluções em etanol de HB, $HB:La^{3+}$ (1:2), $HB:Eu^{3+}$ (1:2) e $HB:Tb^{3+}$ (1:2), da esquerda para a direita, com concentração de HB igual a 70 μM . _____ 40
- Figura 16.** Densidade óptica em 630 nm (comprimento de onda em que a HB apresenta absorção quase nula) em função da razão entre íons lantanídeos e moléculas de HB para (a) $HB:La^{3+}$, (b) $HB:Eu^{3+}$ e (c) $HB:Tb^{3+}$, evidenciando em todos os casos que a melhor proporção entre moléculas de HB e íons lantanídeos é de 1:2. _____ 40

- Figura 17.** Comparação entre as densidades ópticas da HB e de seus complexos nas melhores razões molares (1:2). Todas as amostras apresentam a mesma concentração de HB, de 70 μM . _____ 41
- Figura 18.** Variações nos espectros de absorção óptica de HB etanol devidas a aumentos no pH do meio. 42
- Figura 19.** Variações nos espectros de absorção óptica de HB:La³⁺ (1:2) em etanol devidas a aumentos no pH do meio. _____ 43
- Figura 20.** Fotografia em que se identificam os precipitados formados após o aumento do caráter básico da solução de HB:La³⁺. _____ 43
- Figura 21.** Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = \lambda_l$ (Tabela 6)) de: (a) HB:La³⁺, (b) HB:Eu³⁺ e (c) HB:Tb³⁺. _____ 45
- Figura 22.** Fotografia da hipocrelina B (HB) acondicionada em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm excitada em 461 nm (azul) por uma lâmpada de xenônio de 300 W. Pode-se notar a intensa emissão vermelha da HB. _____ 45
- Figura 23.** Alteração no comprimento de onda de excitação das amostras não influencia no comprimento de onda de emissão. Em (a), HB, e em (b), HB:La³⁺ (1:2). _____ 46
- Figura 24.** Influência da posição do feixe de excitação nos espectros de emissão da (a) HB e (b) seus complexos (apenas o complexo com európio é mostrado pois os demais seguem o mesmo comportamento). Para a HB não se nota diferença; para os complexos, a excitação no centro altera o espectro em relação à HB, o que indica haver auto-absorção da HB. _____ 47
- Figura 25.** (a) Espectro de absorção da HB em diferentes concentrações; (b) relação linear entre absorvância (para o comprimento de onda de 461 nm, máximo de absorção da HB) e concentração, não evidenciando a presença de agregados. _____ 49
- Figura 26.** (a) Espectros de emissão das amostras com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) quebra na relação linear entre a intensidade de emissão e a concentração das amostras a partir da concentração de 100 μM de HB. _____ 50
- Figura 27.** Gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D da HB em etanol. _____ 51
- Figura 28.** (a) Espectros de emissão das amostras de HB:La³⁺ (1:2) com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D . _____ 51
- Figura 29.** (a) Espectros de emissão das amostras de HB:Eu³⁺ (1:2) com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D . _____ 52
- Figura 30.** (a) Espectros de emissão das amostras de HB:Tb³⁺ (1:2) com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D . _____ 52
- Figura 31.** Variação das intensidades de emissão de (a) HB:La³⁺ (1:2), (b) HB:Eu³⁺ (1:2) e (c) HB:Tb³⁺ (1:2) em função da concentração de HB em solução. _____ 53

- Figura 32.** Representação esquemática do processo de fotobranqueamento. _____ 54
- Figura 33.** Análise do fotobranqueamento da HB e seus complexos com Ln^{3+} , todos com $[\text{HB}] = 10 \mu\text{M}$, sob excitação com laser de Nd:YAG ($\lambda = 532 \text{ nm}$) de intensidade 142 mW/cm^2 . _____ 56
- Figura 34.** Análise do fotobranqueamento da HB e seus complexos com Ln^{3+} , todos com $[\text{HB}] = 10 \mu\text{M}$, sob excitação com laser de Nd:YAG ($\lambda = 532 \text{ nm}$) de intensidade 400 mW/cm^2 . _____ 57
- Figura 35.** Espectros de absorção no infravermelho das amostras de: (a) HB. (b) HB:La^{3+} , (c) HB:Eu^{3+} e (d) HB:Tb^{3+} . Nos detalhes estão evidenciados os comprimentos de onda discordantes entre a HB pura e seus complexos. _____ 58
- Figura 36.** Possível estrutura para os complexos HB:Ln^{3+} , em que M corresponde ao íon lantanídeo. ____ 59
- Figura 37.** Espectros de emissão das amostras de HB e seus complexos na razão molar 1:1 na região de luminescência do oxigênio singleto (1270 nm), sob excitação em 532 nm , ponderados pelas respectivas absorbâncias neste mesmo comprimento de onda. _____ 60
- Figura 38.** Absorção em 440 nm em função do tempo de irradiação com LED (460 nm) de 430 mW para (a) HB e (b) HB:La^{3+} (1:2). _____ 62
- Figura 39.** Confronto entre a capacidade de geração de oxigênio singleto (representada pela inclinação da reta do gráfico $\Delta\text{D.O.}$ vs. tempo de irradiação) de HB e de seu complexo com lantânio em razão molar 1:2. _____ 63
- Figura 40.** Efeito da concentração do fotossensibilizador na inativação da *Candida albicans* por PDT com HB:La^{3+} (1:2). Identifica-se efeito apenas com concentração de fotossensibilizador de $10 \mu\text{M}$. 64
- Figura 41.** Representação do comportamento da fração sobrevivente de *Candida albicans*. PDT por intervalo de tempo de apenas 30 segundos já foi suficiente para que houvesse esterilização. ____ 65
- Figura 42.** Gráfico comparativo do comportamento das frações sobreviventes de *C. albicans* para PDT realizada com HB:La^{3+} a $10 \mu\text{M}$ e com HB a $10 \mu\text{M}$ ($\lambda = 660 \text{ nm}$ e $\lambda = 470 \text{ nm}$). _____ 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Mecanismos de atuação dos fotossensibilizadores</i> _____	10
Tabela 2. <i>Comparação entre os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto das hipocrelinas e de outros fotossensibilizadores da mesma família (região sombreada) com outros fotossensibilizadores conhecidos.</i> _____	16
Tabela 3. <i>Representação esquemática dos elétrons de valência dos diferentes estados energéticos da molécula de oxigênio.</i> _____	19
Tabela 4. <i>Preparação dos complexos HB:Ln³⁺.</i> _____	30
Tabela 5. <i>Parâmetros de irradiação.</i> _____	37
Tabela 6. <i>Picos de absorção da HB e dos complexos HB:Ln³⁺ nas melhores razões molares (1:2).</i> _____	41
Tabela 7. <i>Valores correspondentes a níveis de energia da molécula de HB e de seus complexos com íons lantanídeos.</i> _____	47
Tabela 8. <i>Valores calculados para as constantes de dimerização K_D.</i> _____	52
Tabela 9. <i>Valores calculados para os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto Φ_{Δ}.</i> _____	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

PDT	<i>Photodynamic therapy</i> (terapia fotodinâmica)
HB	Hipocrelina B
La³⁺	Íon lantânio
Eu³⁺	Íon európio
Tb³⁺	Íon térbio
Ln³⁺	Íon lantanídeo
¹Δ_g ou ¹O₂	1º estado excitado do oxigênio, conhecido como oxigênio singleto
³Σ_g⁻ ou ³O₂	Oxigênio em seu estado fundamental (triplete)
¹Σ_g⁺	2º estado excitado do oxigênio (também singleto)
OH^{·-}	Radical hidroxila
O₂^{·-}	Radical superóxido
ERO	Espécie(s) reativa(s) de oxigênio
S₀	Estado fundamental
S_n	n-ésimo estado excitado singleto
T_n	n-ésimo estado excitado triplete
h	Constante de Planck
ν	Freqüência
λ	Comprimento de onda
D.O.	Densidade óptica
I	Intensidade de emissão
Φ_Δ	Rendimento quântico de geração de oxigênio singleto
η_L	Eficiência de luminescência do oxigênio singleto
K_D	Constante de equilíbrio de dimerização, ou simplesmente constante de dimerização
LH	Ácido graxo, em que L se refere ao lipídio
RNO	p-nitrosodimetilanilina
L-H	L-histidina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>

SUMÁRIO

1. MOTIVAÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. INTRODUÇÃO TEÓRICA	4
3.1. TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)	4
3.1.1. Conceitos Gerais	4
3.1.2. Mecanismos Tipo I e II da PDT	7
3.1.3. Histórico	10
3.1.4. PDT Antimicrobiana	11
3.2. FOTOSSENSIBILIZADORES	13
3.2.1. Propriedades de um Fotossensibilizador Ideal	13
3.2.2. Hipocrelina A e Hipocrelina B	14
3.3. OXIGÊNIO SINGLETO ($^1\text{O}_2$ OU $^1\Delta_g$)	18
3.3.1. Os Estados Excitados do Oxigênio	18
3.3.2. Ação das Espécies Reativas de Oxigênio no Organismo	20
3.3.3. Detecção de Oxigênio Singleto	21
3.4. ESPECTROSCOPIA	22
3.4.1. Definição	22
3.4.2. Descrição da Mecânica Quântica	23
3.5. FOTOQUÍMICA	27
3.5.1. Leis da Fotoquímica	27
3.5.2. Considerações Cinéticas	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. MATERIAIS	30
4.2. MÉTODOS	30
4.2.1. Preparação das Amostras	30
4.2.2. Medidas de Absorção Óptica	31
4.2.3. Variações de pH	31
4.2.4. Medidas de Emissão Óptica	31
4.2.5. Determinação das Constantes de Dimerização K_D	34
4.2.6. Análise do Fotobranqueamento	34
4.2.7. Medidas de Absorção no Infravermelho	34
4.2.8. Estimativa do Rendimento Quântico de Geração de Oxigênio Singleto Φ_Δ pelo Método Espectroscópico Direto: Luminescência em 1270 nm	35
4.2.9. Estimativa da Taxa de Produção de Oxigênio Singleto, pelo Método Indireto: Degradação Secundária do RNO	36
4.2.10. Terapia fotodinâmica antimicrobiana - Testes <i>in vitro</i>	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. PRIMEIRA ETAPA: CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS COMPLEXOS HB:Ln^{3+}	38
5.1.1. Melhores razões molares para os complexos HB:Ln^{3+}	38

5.1.2. <i>Variação de pH</i>	42
5.1.3. <i>Medidas de Emissão no Visível</i>	44
5.1.4. <i>Cálculo de Níveis de Energia</i>	47
5.1.5. <i>Determinação das Constantes de Dimerização K_D</i>	48
5.1.6. <i>Análise do Fotobranqueamento</i>	54
5.1.7. <i>Medidas de Absorção no Infravermelho</i>	57
5.1.8. <i>Estimativa do Rendimento Quântico de Geração de Oxigênio Singleto Φ_Δ pelo Método Espectroscópico Direto: Luminescência em 1270 nm</i>	59
5.1.9. <i>Estimativa da Taxa de Produção de Oxigênio Singleto, pelo Método Indireto: Degradação Secundária do RNO</i>	61
5.2. SEGUNDA ETAPA: TESTES IN VITRO EM CULTURA DE CÉLULAS	63
5.2.1. <i>Influência da concentração do fotossensibilizador no efeito fotodinâmico</i>	64
5.2.2. <i>Efeito fotodinâmico antimicrobiano</i>	65
6. CONCLUSÕES	68
7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	71
APÊNDICES	73
APÊNDICE A	
Estados Singleto e Tripleto	74
APÊNDICE B	
Teoria do Orbital Molecular para a Molécula de Oxigênio	76
APÊNDICE C	
Fundamentos de Espectroscopia Óptica e seus Arranjos Experimentais	78
APÊNDICE D	
Interações Bimoleculares Envolvendo Estados Excitados	82
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1. MOTIVAÇÃO

A procura por novos agentes fotossensibilizadores – a chamada segunda geração de fármacos para terapia fotodinâmica (PDT) – vem se intensificando, principalmente nas últimas duas décadas. Afinal, mesmo com alguns medicamentos já aprovados pela FDA/EUA (*Food and Drug Administration*) e em uso clínico atualmente (como Photofrin[®], Levulan[®] Kerastick e Visudyne[®]), pesquisadores ainda não encontraram um fármaco que seja capaz de utilizar todo o potencial desta relativamente nova técnica de tratamento de infecções microbianas e de males que induzem crescimento anormal de tecidos. Pequenos valores de absorvidade molar na região da janela terapêutica, alta tendência à agregação, dificuldades na determinação exata da composição e baixa eficiência quântica de geração de espécies reativas de oxigênio, entre outros, são fatores que restringem a utilização da maioria destas drogas.

Dentro deste contexto, pigmentos do tipo perileno com a presença de grupos quinona, como a hipocrelina A (HA) e a hipocrelina B (HB), destacam-se enquanto potenciais fármacos desta nova geração, graças a suas bandas de absorção que cobrem toda a região do visível do espectro eletromagnético e a suas elevadas capacidades de gerar oxigênio singleto, que se acredita ser o grande responsável pelos efeitos do tratamento (indução de necrose e/ou apoptose) nos tecidos-alvos. Infelizmente, tais cromóforos apresentam o inconveniente de não absorverem eficientemente luz com comprimento de onda de grande penetração nos tecidos biológicos (de cerca de 600 até aproximadamente 800 nm, a janela terapêutica) – o que limita seu uso para lesões de pequena profundidade – além de serem praticamente insolúveis em água – fato este que restringe sua aplicação clínica.

Pela formação de complexos de HB com íons metálicos, como alumínio ou rutênio, por exemplo, foi observado um aumento na absorbância para comprimentos de onda pertencentes à região do vermelho do espectro; porém, deu-se significativa redução na geração de oxigênio singleto (J. Zhou et. al. *Synthesis and characterization of the monomer ruthenium complex of hypocrellin B*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 15. p. 3067-3070, 2005; J. Ma et. al. *The aluminium (III) complex of hypocrellin B as a PDT photosensitizer*. *New J. Chem.*, v. 25, p. 847-852, 2001). Pesquisadores identificaram que a adição de íons de lantânio à HA induz modificações tais em suas propriedades que propiciam aumento de sua solubilidade em água e de seu rendimento quântico de geração de oxigênio singleto, além de deslocarem sua banda de absorção para comprimentos de onda pertencentes à janela terapêutica (J. Zhou, et. al. *Effect of chelation to lanthanum ions on the photodynamic properties of hypocrellin A*. *J. Phys.*

Chem. B, v. 109, p. 19529-19535, 2005). Desta forma, por se tratar de um pigmento homólogo (HB difere de HA apenas pela ausência de um grupamento hidroxila), espera-se que a HB, quando em complexo com íons lantanídeos, apresente mudanças comportamentais semelhantes às relatadas para estes complexos de HA, acarretando melhorias em suas propriedades fotodinâmicas e permitindo o desenvolvimento de um novo e eficaz agente fotossensibilizador.

2. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é caracterizar, por meio de espectroscopia óptica, o fotossensibilizador de segunda geração hipocrelina B (HB) e seus complexos formados com os íons lantanídeos lantânio (La^{3+}), európio (Eu^{3+}) e térbio (Tb^{3+}), através da determinação de parâmetros tais como comprimentos de onda de absorção e emissão, energias de estados excitados, constantes de dimerização, tendência ao fotobranqueamento e capacidade de geração de oxigênio singleto.

Através da análise destes dados, pretende-se identificar, dentre os complexos formados, aquele que apresenta melhores propriedades fotodinâmicas e que, conseqüentemente, enquadra-se como um potencial agente fotossensibilizador de segunda geração para uso em terapia fotodinâmica (PDT).

Além disso, também é objetivo deste trabalho realizar ensaios de PDT antimicrobiana *in vitro* para o melhor fotossensibilizador dentre os estudados, de forma a verificar a correlação de suas propriedades ópticas com sua eficiência na prática.

3. INTRODUÇÃO TEÓRICA

3.1. TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)

3.1.1. Conceitos Gerais

A Terapia Fotodinâmica, mais conhecida pela sigla PDT, do termo inglês *Photodynamic Therapy*, constitui-se de uma modalidade de tratamento para males que envolvem o crescimento descontrolado de tecidos, como degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide, restenose, micoses fúngicas, infecções bacterianas, arteriosclerose e câncer, bem como para infecções virais¹⁻⁷. Tal técnica se destaca por seu princípio de funcionamento relativamente simples, que envolve a ação conjunta de um cromóforo (pigmento que absorve luz com certa eficiência, denominado agente fotossensibilizador), radiação eletromagnética de comprimento de onda adequado e oxigênio em seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$ ou $^3\Sigma_g^-$), como mostrado esquematicamente na **Figura 1**. É importante notar que nenhum destes entes causa danos ao tecido/organismo por si só; porém, quando em conjunto, podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) – radicais livres/íons radicais e/ou oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$ ou $^1\Delta_g$) –, induzindo assim a morte celular via necrose (por inviabilização direta do tecido ou por danos causados à sua vasculatura) e/ou apoptose (processo de morte celular programada)^{1-5,8-11}.

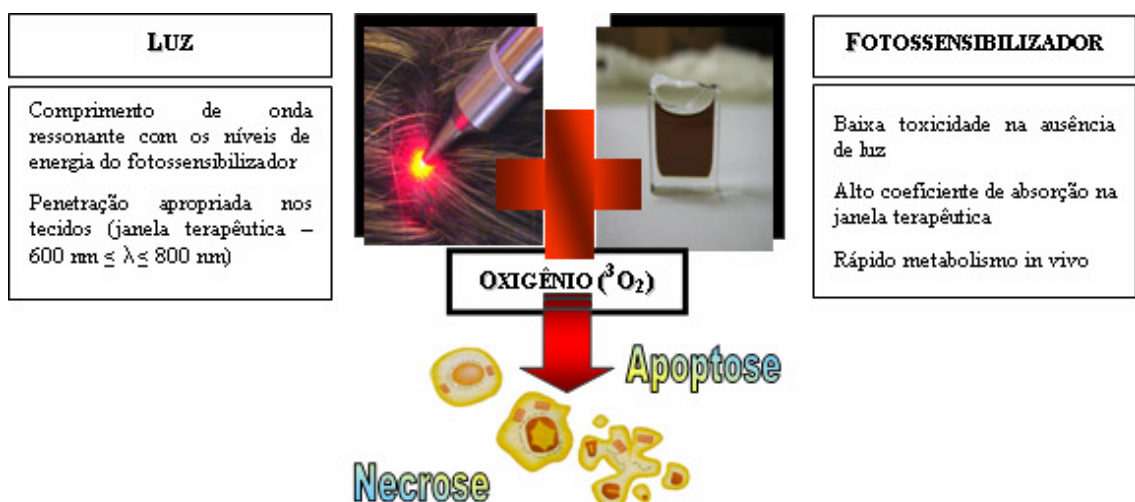


Figura 1. Representação esquemática do princípio que norteia a Terapia Fotodinâmica (PDT). O efeito terapêutico (necrose e/ou apoptose causadas pela ação de ERO formadas) somente se pronunciará caso haja ação conjunta de luz de comprimento de onda adequado, de um cromóforo (fotossensibilizador) e de oxigênio em seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$ ou $^3\Sigma_g^-$).

Outro motivo que evidencia a PDT perante outras técnicas de tratamento deve-se à sua grande seletividade, que se origina basicamente de dois fatores: a existência de uma afinidade entre o fotossensibilizador e o tecido-alvo e a restrição da iluminação apenas aos tecidos doentes/infectados⁴ (mais detalhes no item 3.2.1).

O protocolo padrão da PDT baseia-se na administração intravenosa ou tópica do fotossensibilizador diluído, seguida de um intervalo de tempo necessário para acumulação específica deste no tecido-alvo e da ulterior irradiação deste último com luz visível. Tem-se, então, a promoção eletrônica do fotossensibilizador, que em seguida pode atuar em reações de transferência de energia ou de elétrons ao oxigênio ou ao substrato, originando assim ERO que ocasionam a morte celular^{2,3}.

O fotossensibilizador, como o próprio nome indica, tem o papel de tornar outra substância sensível à presença de luz. Em outras palavras, agente fotossensibilizador é o nome dado ao fármaco que se encarrega de absorver energia luminosa e ceder esta energia para outras moléculas presentes no meio, assim sensibilizando-as. O fotossensibilizador tem, portanto, papel fundamental na ação fotodinâmica, visto que se torna tóxico ao tecido apenas após a exposição à radiação de comprimento de onda adequado.

A radiação eletromagnética empregada deve atender a determinados parâmetros para que possa tornar eficiente o tratamento por PDT. Primeiramente, como comentado anteriormente, seu comprimento de onda deve estar compreendido em uma região do espectro eletromagnético que seja ressonante à banda de absorção do cromóforo empregado, permitindo eficiente excitação do mesmo e, por conseguinte, maior rendimento de geração de espécies reativas no tecido. Além disso, tendo-se em vista a aplicação clínica da PDT, deve-se optar por radiação pertencente à área que se estende desde cerca de 600 nm (vermelho) até aproximadamente 800 nm (infravermelho) – região conhecida pelo nome de janela terapêutica² (**Figura 2**) –, em que sua penetração nos tecidos biológicos atinge um máximo. Afinal, abaixo desta faixa de comprimentos de onda tem-se absorção da luz por parte da hemoglobina (picos em 425, 544 e 577 nm) e de demais proteínas do organismo (sem mencionar a maior influência do espalhamento da luz); acima do valor máximo, os fótons podem não ter energia suficiente para participar de reações fotoquímicas, bem como passa a se tornar substancial a absorção da radiação por moléculas de água^{4,12}.

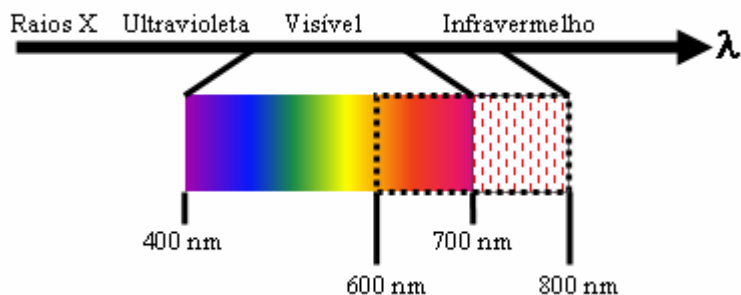


Figura 2. Região do espectro eletromagnético correspondente à janela terapêutica (de 600 a 800 nm).

Com base nestes dados, a princípio seria possível o emprego de qualquer fonte luminosa para o tratamento por PDT, desde que esta atendesse aos requisitos da janela terapêutica (e proporcionasse, evidentemente, uma dose suficiente). Logo, lâmpadas de arco de xenônio equipadas com filtros para eliminar comprimentos de onda pequenos já foram utilizadas em PDT. Todavia, apesar de seu baixo custo e de sua simplicidade, suas intensidades eram baixas e seu uso ficava limitado a locais diretamente acessíveis, dada a impossibilidade de se utilizarem guias para dentro do organismo. Lasers tornaram-se, então, fontes padrão para aplicações em PDT, por seu caráter monocromático, sua alta potência de saída e a facilidade no acoplamento a fibras ópticas (entrega endoscópica de luz). Os lasers mais comumente usados em PDT são os lasers de corante sintonizáveis, devido à sua variedade de comprimentos de onda. Porém, o alto custo destas fontes restringe sua utilização. O avanço mais recente diz respeito ao uso de lasers de diodo, que emitem na região de absorção de muitos fotossensibilizadores usados atualmente e que reúnem as vantagens das duas fontes citadas anteriormente. Além disso, estes lasers cobrem uma ampla variedade de comprimentos de onda a custos satisfatórios, são portáteis e vêm sendo amplamente empregados em diversos casos clínicos¹³. Há ainda a possibilidade do uso de LEDs, visto que estes atualmente estão disponíveis em vários comprimentos de onda e apresentam potências relativamente elevadas, o que, somado ao seu relativo baixo custo, fazem destes uma ótima opção.

A presença de oxigênio em seu estado fundamental ($^3\text{O}_2$ ou $^3\Sigma_g^-$) é primordial para a PDT, uma vez que é por intermédio deste que são originados radicais livres (como radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$) e hidroxila ($\text{OH}^{\cdot -}$)) e/ou oxigênio singleto¹⁴⁻¹⁶ após sua interação com o fotossensibilizador em seu estado excitado. Tais substâncias (as espécies reativas de oxigênio) são capazes de induzir reações em cadeia com os componentes das células, bem como oxidar uma ampla variedade de biomoléculas, devido ao seu elevado potencial transmembrana¹¹. Desta forma, as espécies reativas de oxigênio formadas provocam a morte tecidual.

3.1.2. Mecanismos Tipo I e II da PDT

Os processos que levam a estas interações entre fotossensibilizador e oxigênio fundamental podem ser mais facilmente compreendidos através da análise do diagrama de níveis de energia da molécula do fotossensibilizador, também conhecido por diagrama de Jablonski¹² (**Figura 3**):

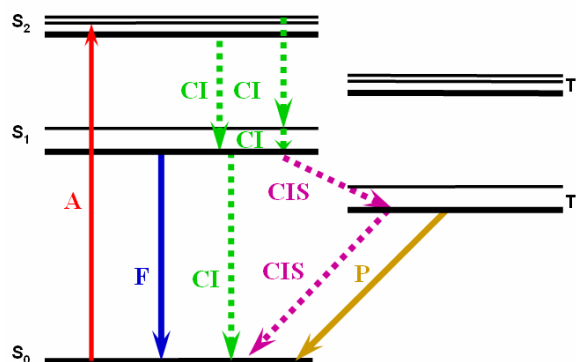


Figura 3. Diagrama de Jablonski (ou diagrama de níveis de energia) ilustrando os processos fotoquímicos sofridos pelos fotossensibilizadores, em que **A** corresponde à absorção, **F** e **P**, à fluorescência e à fosforescência, respectivamente (ambos processos de decaimento radiativos), e **CI** e **CIS**, à conversão interna e ao cruzamento intersistemas, respectivamente (ambos processos de decaimento não radiativos).

Considerando-se a absorção de um fóton por uma molécula e sua conseqüente promoção a um estado eletrônico excitado, as seguintes equações representam os processos pelos quais esta pode passar até ser desativada e retornar assim ao estado fundamental (os denominados processos de decaimento unimolecular):

- Fluorescência (F) $S_1 \xrightarrow{k_f} S_0 + h\nu$ (1)
- Conversão Interna (CI) $S_1 \xrightarrow{k_{CI}} S_0$ (2)
- Fotorreação do Singleto (RS) $S_1 \xrightarrow{k_{RS}} \text{fotoproduto}$ (3)
- Cruzamento Intersistemas (CIS) $S_1 \xrightarrow{k_{CIS}} T_1$ (4)
- Fosforescência (P) $T_1 \xrightarrow{k_p} S_0 + h\nu'$ (5)
- Cruzamento Intersistemas (CIS) $T_1 \xrightarrow{k_{CIS}} S_0$ (6)
- Fotorreação do Tripleto (RT) $T_1 \xrightarrow{k_{RT}} \text{fotoproduto}$ (7)

A incidência de luz com energia ressonante àquela de um dos níveis de energia do agente fotossensibilizador promove este a um nível excitado de energia, usualmente um estado singleto (**S_n**), visto que as regras de seleção de spin proíbem estritamente transições entre estados de diferentes multiplicidades; o elétron é então promovido a um orbital molecular antiligante¹⁷. Pela proximidade entre os níveis de energia de ordem

superior, a molécula excitada tende a perder esta energia adquirida através de processos de decaimento não radiativos, como conversões internas (**CI** – processo físico, que envolve a transformação de luz em calor), em detrimento à luminescência (processo radiativo, mais lento que a **CI** entre níveis com pequenos valores de diferença energética). Atingindo o estado excitado singlete mais baixo (**S₁**), a molécula pode sofrer uma transição radiativa – a fluorescência, equação **(1)** –, emitindo um fóton com energia $h\nu$ correspondente a diferença energética entre **S₁** e **S₀**. Outra possibilidade envolve a devolução da energia adquirida por meio de relaxações vibracionais – processo **(2)**. A probabilidade de decaimento radiativo a partir de **S₁** é muito maior que a probabilidade de decaimento não radiativo deste nível até **S₀**. Isso implica dizer que, nessas condições, $k_f \gg k_{CI}$. Esta consideração está de acordo com a feita anteriormente, de que o decaimento de **S_n** a **S₁** se dá por meio não radiativo, pois quanto menor a diferença de energia entre níveis, há favorecimento de transformação de energia em calor. A Lei do *Gap* de Energia mostrada a seguir evidencia este fato:

$$\log k_{nr} \propto -\Delta E \quad (8)$$

onde o índice **nr** representa quaisquer transições não radiativas.

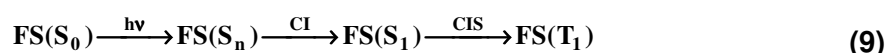
Há ainda a possibilidade de que a molécula excitada reaja com alguma outra molécula presente no meio, como mostrado por **(3)**.

Por fim, a molécula em **S₁** pode sofrer um decaimento não radiativo em que seu spin é alterado, assim atingindo um estado de multiplicidade tripleto via cruzamento intersistemas **(4)**. Tal processo seria em princípio proibido por spin; por este motivo, o tempo de vida do estado tripleto é muito mais elevado que o do estado singlete. Porém, mesmo com a proibição por spin, esta transição acaba por acontecer pois tal proibição é relaxada graças ao acoplamento spin-órbita, que mescla estados de diferentes multiplicidades. Isso acontece pela combinação entre o momento magnético associado ao spin e o momento magnético gerado pelo movimento orbital do elétron, que é responsável por tornar os estados da molécula não totalmente puros de spin, aumentando a probabilidade da transição.

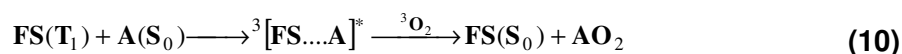
Ademais, processos semelhantes aos já descritos para a molécula em **S₁** podem acontecer quando o estado inicial é o **T₁**: decaimento radiativo ou não radiativo ao estado fundamental e reação com alguma molécula do meio (**(5)**, **(6)** e **(7)**, respectivamente). Vale ressaltar que em **(5)** o fóton emitido também preenche o critério de conservação de energia, e que as equações **(2)**, **(3)**, **(4)**, **(6)** e **(7)** correspondem a

transições não radiativas em que o estado inicial converge isoenergeticamente ao estado final seguindo-se rápida liberação de calor ao meio (relaxação vibracional).

Ao se lidar com PDT, o comportamento da molécula em seu estado T_1 é de fundamental importância, pois é a partir deste estado que se originam as chamadas reações de tipo I (transferência de elétrons) e de tipo II (transferência de energia) que levam à formação de fotoprodutos citotóxicos e, conseqüentemente, ao efeito esperado da PDT¹⁸. Os processos físico-químicos que levam a molécula do fotossensibilizador (**FS**) ao estado tripleto estão representados na equação (9).

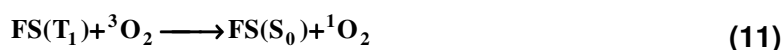


onde **h** é a constante de Planck e **v**, a freqüência da radiação. No mecanismo tipo I, reações de transferência de elétrons ocorrem entre o fotossensibilizador e o substrato (o meio biológico, o solvente ou ainda outra molécula de fotossensibilizador), como mostra a equação (10), e radicais livres e íons radicais são então formados.



Nas equações acima, **A** representa a molécula que será oxidada e **AO₂**, o produto da oxidação. O termo entre colchetes na equação (10) refere-se ao excímero (dímero excitado) formado pela interação entre o estado tripleto do fotossensibilizador e a molécula a ser oxidada no estado fundamental.

Quando há transferência de energia do estado T_1 do fotossensibilizador ao oxigênio em seu estado fundamental (que também é um estado tripleto^{14,15} – vide **Apêndices A e B**) – o denominado mecanismo tipo II –, verifica-se formação de oxigênio singleto (1O_2 ou ${}^1\Delta_g$), como mostrado pela equação (11).



Devido à multiplicidade singleto do oxigênio em seu estado excitado, não há proibições por spin para reações deste com a maioria das moléculas orgânicas¹⁴ – que são singleto em seu estado fundamental – como mostrado em (12).



A **Tabela 1** resume os eventos comentados:

Tabela 1. *Mecanismos de atuação dos fotossensibilizadores*

	Mecanismo Tipo I	Mecanismo Tipo II
Interação	Substrato / Meio	Oxigênio Fundamental ($^3\Sigma_g^-$)
Tipo de Reação	Transferência de elétrons	Transferência de energia
Produtos	Radicais	Oxigênio Singleto (1O_2 ou $^1\Delta_g$)

Ambos os mecanismos da PDT levam ao estresse oxidativo, o que origina lesões biológicas no tecido-alvo. Como seus produtos são espécies altamente reativas, seus coeficientes de difusão não alcançam valores muito elevados, o que acaba por reforçar a seletividade da PDT¹¹. Obviamente, a complexidade dos sistemas biológicos afeta as resposta *in vivo* da terapia⁴. Enzimas específicas podem reagir com as espécies reativas formadas, assim minimizando os efeitos deletérios da técnica¹⁹; contudo, o oxigênio singleto não é diretamente afetado por nenhuma enzima²⁰. Desta forma, a eficiência de um tratamento por PDT é em grande parte atribuída a um maior rendimento quântico de geração de oxigênio singleto associado ao fotossensibilizador².

3.1.3. Histórico

Apesar de estudos acerca de novos fotossensibilizadores e suas aplicações clínicas estarem em progresso em várias partes do mundo atualmente²¹⁻²³, tendo ganhado força principalmente nas últimas duas décadas, o conceito que deu origem à hoje chamada terapia fotodinâmica não é nada novo.

Há relatos que mostram que cerca de 4000 anos atrás os povos egípcios associavam a ingestão de certas plantas com a exposição à luz solar para tratamento de doenças como o vitiligo^{8,24}. Todavia, apenas muitos anos depois, em meados do século XX, esta técnica passou a ser amplamente estudada.

Em 1900, Raab reintroduziu o conceito de PDT, relatando a morte do organismo unicelular *Paramecia* sob a ação de corantes e luz solar². No ano seguinte, Finsen²⁵ apontou que a radiação solar poderia ser utilizada na cura de tuberculose cutânea (*Lupus vulgaris*). Em 1903, Jesionck e Tappeiner^{2,8} realizaram o tratamento de um câncer de pele através da ação conjunta de um corante e radiação eletromagnética. Dez anos mais tarde, Meyer-Betz⁸ procedeu com a auto-ingestão de 20 mg do que acreditava ser

hematoporfirina pura, tendo sofrido de fotossensibilidade cutânea por vários meses. No ano de 1924, Policard² iniciou um estudo com porfirinas com o objetivo de induzir efeitos citotóxicos em tumores malignos. Já no início da década de 50 deu-se o início da chamada primeira geração de drogas para PDT, com o estudo de compostos hematoporfínicos por Schwartz². A década seguinte foi considerada o marco do uso da PDT contra doenças neoplásicas, uma vez que Lipson²⁶ obteve êxito no tratamento de um câncer de mama. Na década de 70, Dougherty²⁷ trouxe o efetivo reconhecimento da PDT como técnica de tratamento de câncer pelo desenvolvimento do Photofrin II[®], uma mistura de derivados hematoporfínicos. Alguns anos depois, em meados dos anos 90, a empresa QLT Inc. aperfeiçoou o preparado de Dougherty, assim dando origem ao Photofrin[®], primeiro medicamento aprovado pela FDA/EUA (*Food and Drug Administration*) para uso clínico como fotossensibilizador, em 22 de dezembro de 1998²⁸. Outros países em que seu uso também foi aprovado são Brasil, Canadá, França, Alemanha, Holanda e Japão².

A chamada segunda geração de drogas fotossensibilizadoras veio à tona em decorrência de alguns inconvenientes apresentados pelos compostos hematoporfínicos em geral, sendo os principais deles a dificuldade em se determinar exatamente sua composição e a sua fotossensibilidade muito prolongada (que pode se estender a algumas semanas). Desta maneira, nos anos subseqüentes, mais dois medicamentos foram aprovados para uso clínico em PDT, Levulan[®] Kerastick (hidroclorato do ácido aminolevulínico – ALA HCl) e Visudyne[®] (composto chamado BPDMA, uma clorina)².

Contudo, ainda não se obteve um único composto capaz de reunir em si todas as características desejadas a um fármaco para aplicação em PDT. Pesquisas em várias partes do mundo estão sendo desenvolvidas, e inúmeros candidatos a fotossensibilizador estão sendo testados com o intuito de se encontrar aquele que mais se aproxime de uma droga ideal, assim podendo ampliar os horizontes de aplicação desta inovadora técnica.

3.1.4. PDT Antimicrobiana

A terapia antimicrobiana constitui-se de um campo de pesquisa desafiador, dado que os microorganismos em geral são capazes de evoluir e criar resistência a medicamentos²⁹. Fármacos outrora utilizados com sucesso com o tempo tornam-se incapazes de eliminar bactérias, vírus ou fungos, e o nicho disponível de drogas se vai esvaindo, demandando portanto pesquisa nesta área. Em outras palavras, emerge a necessidade de desenvolvimento de uma técnica de tratamento que não seja afetada pelas mutações que trazem resistência antimicrobiana.

Dentro deste contexto, a PDT desperta interesse particular, principalmente no que se refere ao tratamento de infecções locais. Bactérias, fungos e vírus tratados com fotossensibilizadores foram eficientemente exterminados por luz visível³⁰⁻³². Trabalhos mostram o envolvimento da mitocôndria nos processos de morte celular por PDT de muitos tipos de células, incluindo organismos unicelulares³³. As contribuições da PDT para melhorar a quimioterapia de infecções localizadas podem incluir redução no tempo de tratamento, diminuição da ocorrência de efeitos colaterais observados quando da administração sistêmica de antibióticos e, em muitos casos, redução nos custos do tratamento³⁰. Desta forma, a PDT pode se constituir de uma alternativa terapêutica para países em desenvolvimento, visto que em geral os fotossensibilizadores têm um custo muito pequeno em comparação com os novos antibióticos sistêmicos.

O fotossensibilizador, que deve ter alto grau de seletividade ao alvo antimicrobiano, pode ser aplicado topicamente, sendo a área em tratamento então iluminada. O processo deve resultar em mínimo dano possível ao tecido hospedeiro.

Pesquisas em PDT antimicrobiana incluem também estudos das ações do sistema imunológico dos pacientes em reação aos fotoprocessos advindos da iluminação. Vale ressaltar que, enquanto a PDT aplicada a tumores busca a eliminação do tecido-alvo, a PDT em infecções locais busca modular funções celulares.

A candidíase, causada pelo fungo *Candida albicans*, em particular, é uma infecção comum em indivíduos com imunossupressão, como portadores do vírus do HIV e pacientes que receberam transplantes, por exemplo. Caso não seja bem controlada, pode causar sérios problemas ao paciente. A *C. albicans* é o patógeno que representa 60% de todos os casos isolados em amostras clínicas e, atualmente, sua resistência a agentes antimicóticos começou a aparecer^{34,35}.

A fotoinativação de microorganismos é um desafio em PDT antimicrobiana devido à relativa baixa susceptibilidade dessas células a agentes oxidantes. Por outro lado, esta técnica representa uma esperança substancial contra as espécies resistentes às drogas comumente utilizadas³⁶. Embora estudos proclamem que a PDT será capaz de eliminar até mesmo os microorganismos mais resistentes^{32,37}, tal afirmação ainda é prematura, e estudos mais abrangentes se fazem necessários. Porém, é inegável sua potencialidade.

3.2. FOTOSSENSIBILIZADORES

3.2.1. *Propriedades de um Fotossensibilizador Ideal*

A busca por novos agentes fotossensibilizadores vem ganhando maiores proporções nos últimos anos, dada a necessidade de melhoria nas propriedades dos compostos atualmente em uso clínico em PDT. Inúmeras substâncias, desde extratos de plantas até complexos macrociclos sintéticos, vêm sendo estudados. Dentre estas substâncias, destacam-se as hipocrelinas e a hipericina³⁸ (membros da família de compostos tipo perileno com presença de grupos quinona), as clorinas^{39,40} e as ftalocianinas⁴¹. Cada composto apresenta suas vantagens e desvantagens em relação aos demais; cabe uma reflexão crítica e fundamentada acerca dos prós e contras de cada potencial fármaco para se optar entre um ou outro agente fotossensibilizador, de acordo com cada aplicação.

De uma forma geral, um candidato a agente fotossensibilizador deve atender a alguns requisitos básicos⁴². Em primeiro lugar, procura-se um composto quimicamente puro, de composição perfeitamente conhecida, que apresente toxicidade nula ou praticamente nula quando não exposto à radiação, de forma que as etapas de sua elaboração possam ser bem definidas e que sua administração, intravenosa ou tópica, não seja prejudicial ao paciente.

Além disso, o cromóforo deve ser preferencialmente retido no tecido-alvo, como citado anteriormente. Em aplicações intravenosas, sabe-se que o fotossensibilizador distribui-se por todas as células do corpo, com exceção do sistema nervoso central. Porém, há a particularidade de os tecidos neoplásicos reterem o fotossensibilizador por mais tempo que os demais tecidos. Foi verificado que esta seletividade aumenta com o caráter lipofílico do fotossensibilizador, o que está em concordância com o fato de as células neoplásicas apresentarem um número consideravelmente elevado de receptores para lipoproteínas de baixa densidade, LDL^{2,43,44} (devido à sua elevada atividade celular que, por conseguinte, demanda exageradamente colesterol). Além disso, uma segunda hipótese levantada para esta seletividade diz respeito ao pH dos tecidos neoplásicos, que é mais ácido que dos tecidos saudáveis (5,5 contra 7,0, respectivamente). Sob estas condições, o fotossensibilizador apresenta maior afinidade pelo tecido, ficando assim essencialmente retido nos tumores⁴⁵.

Outro fator extremamente importante diz respeito à alta farmacocinética do fotossensibilizador (que se reflete em acumulação preferencial em pouco tempo após a injeção e em sua rápida eliminação do organismo). Também se espera um grande valor para o tempo de vida do primeiro estado excitado tripleto (T_1) do fotossensibilizador – o que permitiria tempo suficiente para que as reações de transferência de elétrons e/ou de

transferência de energia ocorressem – e um alto coeficiente de absorção em comprimentos de onda que se estendem desde 600 até 800 nm (janela terapêutica – maior penetração da luz nos tecidos)³.

A agregação do fotossensibilizador é também um importante fator a ser considerado, haja vista que esta torna mais difícil a transferência de energia do fotossensibilizador no estado T_1 para o oxigênio em seu estado fundamental, ocasionando uma diminuição na eficiência fotodinâmica do cromóforo⁴⁶⁻⁴⁸. Logo, conclui-se que o controle de temperatura e umidade do meio em que se encontra o pigmento é deveras importante, dado que estes fatores podem influenciar na agregação^{9,10}.

Um item de vital importância, responsável por conduzir o fotossensibilizador dos centros de pesquisas até as clínicas, é o fotobranqueamento (também conhecido pelos termos fotodegradação ou *photobleaching*, do inglês)⁴⁹⁻⁵¹, que está relacionado com mudanças irreversíveis nas propriedades dos cromóforos após exposição à luz. Tais mudanças são devidas a fotoreações do fotossensibilizador com as espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas no substrato. A ação destas ERO pode inviabilizar a absorção de luz por parte do fotossensibilizador e, conseqüentemente, a geração de mais espécies reativas⁵². Logo, é fundamental que se determinem condições ideais de iluminação e de armazenamento para as substâncias fotoativas, a fim de que sua integridade e sua capacidade fotodinâmica sejam mantidas.

Além de todos estes fatores, a capacidade de o fotossensibilizador gerar espécies reativas de oxigênio, em particular oxigênio singleto, é uma questão de importância proeminente. Afinal, acredita-se ser o $^1\Delta_g$ o maior responsável pelo efeito fotodinâmico (vide item 3.3).

Fatores como simplicidade de formulação, alta estabilidade, facilidade de obtenção em escala industrial, baixo custo e reprodutibilidade do processo de obtenção também devem ser levados em consideração no desenvolvimento de um novo fármaco^{9,10}.

A obtenção de todas estas propriedades favoráveis em um único composto é na realidade deveras complicada; portanto, é preciso que seja feita uma análise custo-benefício ao se julgar se uma etapa de processamento (e a conseqüente melhoria nas propriedades do fármaco) se justifica pelos custos envolvidos em tal processo, bem como para determinar o fotossensibilizador a ser empregado em cada caso específico.

3.2.2. Hipocrelina A e Hipocrelina B

Novos tipos de fotossensibilizadores não-porfirínicos, como a hipocrelina A⁵³⁻⁵⁶ (HA) e a hipocrelina B⁵⁷⁻⁶⁰ (HB), vêm atraindo a atenção de pesquisadores no mundo

todo. As estruturas moleculares destes cromóforos do tipo perileno com a presença de grupos quinona são mostradas na **Figura 4**:

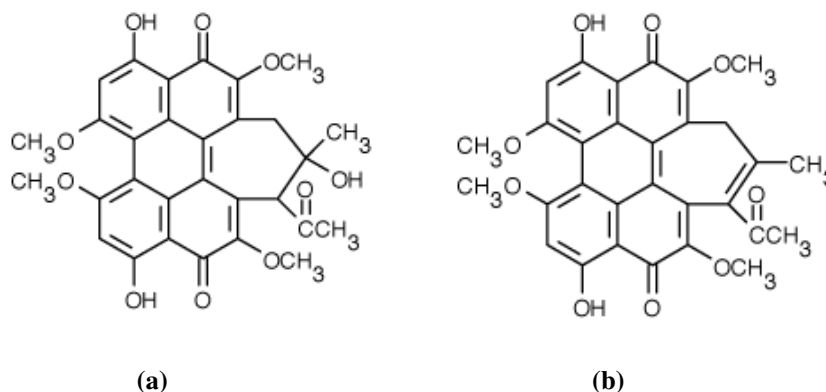


Figura 4. Estruturas moleculares de: (a) *hipocrelina A* ($C_{30}H_{26}O_{10}$) e (b) *hipocrelina B* ($C_{30}H_{24}O_9$).

Hipocrelinas são compostos químicos do tipo *perylene quinonoid*, ou seja, possuem a estrutura de um composto como o perileno e também contam com a presença de grupos quinona. Isso significa dizer que as hipocrelinas são formadas por uma estrutura principal de um hidrocarboneto aromático policíclico com fórmula $C_{20}H_{12}$ (o perileno):

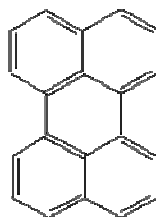


Figura 5. Estrutura molecular do grupo perileno.

e por grupamentos do tipo quinona ligados ao redor desta estrutura principal. Quinona é o nome dado à classe de compostos que contêm anéis de hidrocarbonetos com duas partes cetona em quaisquer posições. Podem ser substituídos em qualquer posição, exceto nestes grupos cetona. Cetonas, por sua vez, são compostos orgânicos caracterizados pela presença do grupamento $-C=O$ (carbonila) ligado a dois radicais orgânicos R e R'. Apresentam fórmula geral $R-C(=O)-R'$.

As hipocrelinas têm seu nome derivado de *Hypocrella bambusae*, um fungo parasita do bambu *Sinarundinaria sp.*, cuja ocorrência natural em países do continente asiático como China e Sri Lanka é abundante. A hipocrelina constitui até 4% destes fungos. Outro fungo, o *Shiraia bambusicola*, também contém este cromóforo. Além das hipocrelinas, outros pigmentos do tipo perileno com presença de grupos quinona são isolados de outras fontes microbianas, como cercosporina e hipericina^{38,58}.

As hipocrelinas têm uma longa trajetória como agentes medicinais populares, particularmente na Ásia, tendo sido utilizadas por séculos em tratamento de doenças de pele^{61,62}. Há registros que evidenciam sua aplicação até mesmo em casos de artrite reumatóide e doenças gástricas. As hipocrelinas ainda apresentam atividade bactericida, antiviral e outras atividades fisiológicas, e vêm sendo tidas como promissores fotossensibilizadores⁶³⁻⁶⁵, visto que apresentam forte efeito fotodinâmico.

Mei e Luo⁶⁶ reportaram o primeiro caso em que se deu administração oral de hipocrelina. Como resultado, notou-se um estado de sensibilidade da pele à luz visível. Duas décadas depois, identificou-se que o efeito fotossensibilizante da hipocrelina ocorria apenas em ambientes ricos em oxigênio, o que leva à conclusão de que este é um processo fotodinâmico⁶⁷. Abriu-se então a possibilidade de uso da hipocrelina enquanto agente fotossensibilizador.

Suas principais vantagens em relação aos compostos porfirínicos amplamente empregados em PDT são sua fácil preparação, simples purificação, baixa tendência à agregação e, principalmente, rápido metabolismo *in vivo* (alta farmacocinética), que são aliados a um elevado rendimento quântico de geração de oxigênio singleto (**Tabela 2**) e a uma ampla banda de absorção no visível, que cobre comprimentos de onda desde cerca de 400 até aproximadamente 600 nm. Além disso, merece destaque sua baixa toxicidade, visto que estes produtos naturais foram utilizados na medicina popular chinesa por vários séculos^{38,54,68,69}.

Tabela 2. Comparação entre os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singleto das hipocrelinas e de outros fotossensibilizadores da mesma família (região sombreada) com outros fotossensibilizadores conhecidos.

Fotossensibilizador	Φ_{Δ}
Hipocrelina A	0,83 ⁶⁸
Hipocrelina A: La ³⁺	0,90 ⁶⁸
Hipocrelina B	0,76 ⁷⁴
Cercosporina	0,81 ³⁸
Hipericina	0,43 ³⁸
Azul de Metileno	0,52 ⁷⁰
Photofrin [®]	0,85 ⁷¹

É conhecido⁵³ o fato de a hipocrelina acumular-se preferencialmente em alguns tipos de tecidos neoplásicos, assim produzindo um alto efeito fotodinâmico. Experimentos em animais mostram que a concentração máxima de hipocrelina A em um tecido tumoral é alcançada na sexta hora após a administração. As mitocôndrias de tumores são os

alvos principais da fotossensibilização com hipocrelina A⁵⁸. Dong. et. al.⁷² observaram que tal fotossensibilização retarda a síntese de proteínas, de RNA e de DNA em células cancerosas. Também relataram que, embora a hipocrelina seja fototóxica, não se observa toxicidade na ausência de luz. Além disso, ela é eliminada rapidamente do organismo, em menos de 24 horas, o que contribui com a diminuição de efeitos colaterais. Quanto ao seu metabolismo, a hipocrelina se distribui pelo corpo inteiro, com exceção do sistema nervoso central. Maiores investigações das propriedades das hipocrelinas *in vivo* ainda se fazem necessárias.

Do ponto de vista das aplicações clínicas, ainda são necessárias melhorias no que diz respeito à solubilidade em água e à intensidade de absorção na janela terapêutica para que estes compostos apresentem eficácia fotodinâmica ideal^{38,68}. Para tanto, fazem-se necessárias modificações estruturais⁷¹⁻⁷³ ou formação de complexos com íons metálicos^{68,74-77}.

Hu e colaboradores⁸⁰ formaram um derivado sulfonado da HA que apresentou melhoria nas deficiências deste corante, sem comprometer a capacidade de geração de espécies reativas de maneira significativa.

Hu et. al.⁸¹ realizaram um estudo acerca dos processos fotoquímicos que ocorrem em soluções homogêneas de dois derivados da HB, a HB mono-substituída e a HB di-substituída por ácido mercaptoacético. Irradiação em 532 nm de soluções saturadas com oxigênio destes derivados formam oxigênio singleto, ânion radical superóxido e peróxido de hidrogênio; contudo, os valores de rendimento quântico de geração de oxigênio singleto são cerca de 3,5 vezes menores que para a HB pura.

Ma et. al.⁸² foram além e estudaram complexos formados com íons metálicos de um derivado brominado de HB. Notou-se melhora significativa na solubilidade em água e na absorção na região da janela terapêutica em relação à HB pura; além disso, foi notada elevada capacidade de indução de efeitos fotodinâmicos através do mecanismo tipo I; no entanto, a ocorrência de mecanismo tipo II diminuiu consideravelmente.

Quanto a testes *in vitro* e *in vivo* realizados com as hipocrelinas, Zhou et. al.⁷⁶ identificaram danos no DNA após PDT com o complexo de rutênio da hipocrelina B. Xu. e colaboradores⁸³ efetuaram o tratamento de um câncer no pâncreas com derivados de hipocrelina A e de hipocrelina B, observando significativa diminuição no tamanho do mesmo, e Chin et. al.⁵⁷ identificaram ser na vasculatura a ação da HB em um câncer de bexiga.

Estes e outros trabalhos mostraram que os complexos são de muito mais simples preparo que os derivados⁶⁸. Estudos^{76,77} demonstram que complexos hipocrelina:metal apresentam boa solubilidade em água e grande absorção no vermelho; todavia, há a inconveniência de haver diminuição na geração de oxigênio singleto. Este

fato não é interessante, dado que o oxigênio singleto é o maior responsável pela morte celular nos processos de PDT.

Dados experimentais^{68,78,84} evidenciam que o rendimento quântico de geração de oxigênio singleto em soluções de HA:La³⁺ é maior que da hipocrelina A pura, que por sua vez apresenta maior rendimento que os complexos HA:metal. Com base nestes dados, e pela carência de estudos sobre complexos de hipocrelina B com íons lantanídeos, buscou-se investigar neste trabalho as propriedades ópticas de tais complexos sob o ponto de vista de aplicações fotodinâmicas.

3.3. OXIGÊNIO SINGLETO ($^1\text{O}_2$ OU $^1\Delta_g$)

3.3.1. Os Estados Excitados do Oxigênio

O oxigênio singleto corresponde a uma espécie excitada do oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$ ou $^3\Sigma_g^-$), sendo uma das substâncias mais ativas envolvida em reações químicas e bioquímicas¹⁴⁻¹⁶. Seu precursor, $^3\Sigma_g^-$, ao contrário da maioria dos compostos naturais, tem em seu estado fundamental multiplicidade tripleto, com dois elétrons desemparelhados distribuídos nos orbitais ocupados de maior energia (vide **Apêndices A e B**). Logo, reações de compostos orgânicos com o oxigênio são cineticamente inibidas – tratam-se de reações entre moléculas com diferentes multiplicidades^{14,85} –, ocorrendo apenas após aquecimento ou na presença de catalisadores.

Na verdade, o oxigênio possui três estados eletronicamente excitados conhecidos por oxigênio singleto. Dois destes estados, $^1\Delta_x$ e $^1\Delta_y$, residem a 94 kJ/mol (= 7900 cm⁻¹ = 23 kcal/mol = 0,98 eV) acima do estado fundamental – logo, são estados ditos degenerados (estados diferentes com a mesma energia), sendo convenientemente representados por $^1\Delta_g$. O terceiro estado, mais energético, é o $^1\Sigma_g^+$, cuja energia de excitação perfaz 157 kJ/mol (= 13200 cm⁻¹ = 37,5 kcal/mol = 1,63 eV) acima do estado fundamental^{3,86}.

O estado excitado de energia mais elevada, $^1\Sigma_g^+$, possui dois elétrons emparelhados ocupando dois diferentes orbitais moleculares – portanto também é um singleto (**Tabela 3**). Este estado sofre desativação não radiativa muito rapidamente⁸⁷ (dada a pequena diferença de energia entre este e o estado $^1\Delta_g$) e apresenta, portanto, tempo de vida muito curto. Assim, sua passagem para o estado metaestável (de grande tempo de vida) $^1\Delta_g$ ocorre quase que instantaneamente via colisões com outras moléculas. Logo, o $^1\Sigma_g^+$ não é quimicamente reativo⁸⁶.

Tabela 3. Representação esquemática dos elétrons de valência dos diferentes estados energéticos da molécula de oxigênio.

ESTADO	OCUPAÇÃO DOS ORBITAIS EXTERNOS	ENERGIA (eV) [*]
Fundamental, $^3\Sigma_g^-$	[↑] [↑]	0
1º excitado, $^1\Delta_g$	[↑↓] []	0,98
2º excitado, $^1\Sigma_g^+$	[↑] [↓]	1,63

*relativa ao estado fundamental

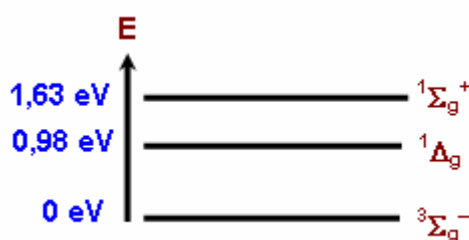


Figura 6. Representação esquemática simplificada da distribuição dos níveis de energia da molécula de oxigênio, em que se observam seu estado fundamental, e os dois primeiros estados excitados.

Já o estado $^1\Delta_g$, comumente populado por transferência de energia eletrônica a partir de fotossensibilizadores excitados, apresenta dois elétrons emparelhados em um mesmo orbital molecular^{2,3,86}. Constitui-se de uma espécie metaestável, uma vez que regras de seleção⁸⁵ proíbem estritamente seu decaimento ao estado fundamental (pois isto envolveria mudança na multiplicidade); logo, o tempo de vida desta molécula isolada costuma apresentar grande valor (muito embora isto dependa da natureza do solvente em que se encontra^{14,86-89}). Sua multiplicidade (igual à da maioria das moléculas orgânicas) faz do $^1\Delta_g$ uma espécie quimicamente muito reativa. Além disso, a presença de um orbital molecular vazio confere a esta molécula caráter eletrofílico, o que contribui com sua alta reatividade para com um grande número de substratos biológicos (especialmente para com sítios de alta densidade eletrônica, como colesterol, triptofano, guanina, cadeias laterais de aminoácidos contendo estruturas aromáticas e enxofre, ligações duplas de esteróides e lipídios insaturados)⁸⁶. Como tais estruturas são os principais constituintes das membranas biológicas, tem-se alteração na permeabilidade celular após o tratamento por PDT, o que leva à interrupção de processos biológicos e ao efeito desejado.

3.3.2. Ação das Espécies Reativas de Oxigênio no Organismo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) após a incidência de luz de comprimento de onda adequado no agente fotossensibilizador induz efeitos deletérios ao tecido-alvo, efeitos estes oriundos de reações destas ERO com substratos biológicos – este é o princípio básico da PDT.

Pelo mecanismo tipo I são geradas espécies com elétrons desemparelhados, os radicais livres, que apresentam alta reatividade no sentido de adquirir o(s) elétron(s) em falta. Os principais radicais são a hidroxila e o superóxido, formados a partir do oxigênio conforme mostrado pelas reações a seguir:

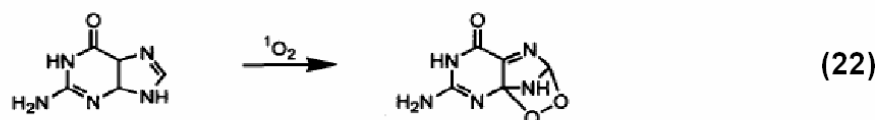
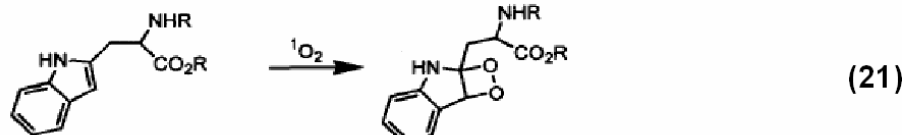
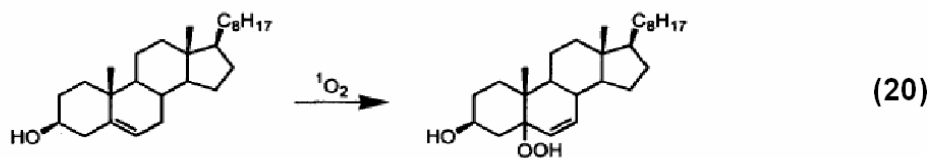


A membrana é o constituinte celular mais atingido por estas ERO em decorrência da denominada peroxidação lipídica⁹³, que consiste da reação da camada lipídica formadora da membrana com os radicais gerados. Em uma etapa inicial, há o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo (**LH**, com **L** representando o lipídio) da membrana celular pela hidroxila, como mostrado em **(15)**, originando radical lipídico (**L'**). Este radical, por sua vez, interage com o oxigênio, formando o chamado radical peroxila (**LOO'**) **(16)**. Este seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente radical lipídico **(17)**. Ocorre, portanto, uma série de reações em cadeia que levam à degradação do ácido graxo; o término de tais reações se dá quando os radicais produzidos nas etapas anteriores (**L'** e **LOO'**) propagam-se até destruírem a si próprios **((18) e (19))**.



O oxigênio singleto formado através do mecanismo tipo II da PDT tem sua reatividade originária de um orbital molecular vazio e de sua multiplicidade singleto, como comentado anteriormente. Ele pode reagir com biomoléculas como colesterol

(constituente das membranas), triptofano (um aminoácido) e bases nitrogenadas (formadoras do DNA), como mostrado pelas equações (20), (21) e (22), respectivamente.



O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo mesmo ou incorporados através da alimentação⁹³. Para todos os radicais livres formados durante a ação fotodinâmica, como radical hidroxila (OH^\cdot) e radical superóxido (O_2^\cdot), há um correspondente antioxidante produzido pelo organismo¹⁹. Contudo, o ${}^1\Delta_g$ não é afetado diretamente por nenhuma enzima produzida pelo organismo²⁰, o que corrobora sua ação determinante na eficácia de um tratamento por PDT.

3.3.3. Detecção de Oxigênio Singleto

A detecção de oxigênio singleto é realizada, em sua forma mais simples, através de sua luminescência^{14,86,94}. Em matéria condensada, tais medidas são baseadas na verificação da presença de emissão no comprimento de onda de 1270 nm, referente ao decaimento radiativo do ${}^1\Delta_g$ (23), e na emissão dimol em 634 nm (24):



As intensidades relativamente fracas destes decaimentos requerem sistemas de detecção altamente sensíveis. Vale ressaltar que uma terceira rota de decaimento radiativo do oxigênio singleto (25), com pico em 762 nm e que se dá a partir do estado

excitado de mais alta energia do oxigênio, não é empregada na detecção desta espécie. Afinal, como visto, o estado $^1\Sigma_g^-$, tão logo quanto formado, decai para $^1\Delta_g$ de forma não radiativa, inviabilizando a detecção de sua luminescência.



Outros possíveis métodos de detecção englobam EPR (ressonância paramagnética eletrônica), calorimetria, fotoionização, espectroscopia de massa, o uso de sondas (*scavengers*), que podem, por exemplo, inibir uma reação dependente de oxigênio¹⁵, ou ainda métodos químicos que investigam a ação do $^1\Delta_g$ sobre outras substâncias. Para este último caso, é comum utilizar para detecção e quantificação do $^1\Delta_g$ produzido pelo fotossensibilizador o composto denominado p-nitrosodimetilanilina (**RNO**), que ao reagir com o $^1\Delta_g$ sofre degradação que pode ser identificada por perdas em sua absorvância no comprimento de onda de 440 nm. Maiores detalhes sobre esta técnica serão discutidos no item 4.2.9.

3.4. ESPECTROSCOPIA

3.4.1. Definição

A natureza dos sistemas atômicos e moleculares até os dias de hoje exerce seu fascínio sobre a humanidade, em parte pelo grande mistério que advém da dificuldade de compreensão de fenômenos em escala subatômica e de sua correlação com fenômenos macroscópicos. Uma ferramenta amplamente empregada na investigação do comportamento de sistemas deste tipo é a espectroscopia, que em linhas gerais pode ser definida como a ciência que estuda a interação entre a radiação e a matéria⁹²⁻⁹⁴. Esta ciência fornece dados experimentais – os espectros – que contêm inúmeras informações, tanto quantitativas quanto qualitativas, a respeito das espécies químicas que são alvo de estudo, como estrutura atômica, átomos presentes, concentrações de impurezas e seus sítios no material, níveis de energia, entre outros. Muito de nosso conhecimento atual acerca de física atômica e molecular, química e biologia molecular – estrutura da matéria em geral – é proveniente de investigações espectroscópicas⁹⁸.

Dadas as inúmeras aplicações da espectroscopia e sua importância enquanto poderosa ferramenta de investigação da estrutura microscópica da matéria, poder-se-ia supor ser esta uma ferramenta com fundamento conceitual simples e usual. No entanto, a interação luz-matéria é geralmente muito complicada, e uma análise profunda e correta

de todos os efeitos desta interação requer conhecimentos de mecânica quântica e fotoquímica.

A espectroscopia pode ser dividida basicamente em três áreas, de acordo com o tipo de fonte de excitação (fótons, elétrons ou íons). Para excitação realizada com fótons, particularmente da região que se estende do ultravioleta ao infravermelho – área abordada ao longo deste trabalho –, dá-se o nome de espectroscopia óptica.

Experimentalmente, a espectroscopia lida com a excitação da espécie a ser estudada e com a posterior análise de seu comportamento. Obtêm-se, então, espectros (termo derivado da palavra grega para “aparência”) que mostram um registro das intensidades das radiações absorvidas ou emitidas por um átomo ou molécula em relação à frequência, ao comprimento de onda ou ao número de onda da radiação⁹⁹.

3.4.2. Descrição da Mecânica Quântica

Informações podem ser extraídas dos espectros graças ao fenômeno da quantização das energias permitidas para os elétrons em átomos e moléculas – apenas certas energias podem ser absorvidas e/ou emitidas, o que reflete a discretização das energias dos sistemas microscópicos. Tal discretização foi proposta pela primeira vez por Max Planck em 1900. Ao estudar a radiação de corpos negros, Planck sugeriu que a energia das radiações está concentrada em pequenos “pacotes”, e que esta energia segue uma relação com a frequência da radiação emitida dada por:

$$E = h \cdot \nu \quad (26)$$

onde $h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ J.s ficou conhecida como a constante de Planck. A relação de Planck uniu as teorias ondulatória e corpuscular da radiação eletromagnética⁸⁸.

Sua teoria foi corroborada anos mais tarde, em 1905, por Einstein, que, ao estudar o efeito fotoelétrico, propôs que a luz não apenas se propaga como também interage na forma de pacotes de energia concentrados – os *quanta* de luz, ou fótons^{88,100}.

No estudo do espectro do átomo de hidrogênio, Bohr verificou que seria necessário introduzir uma variável discreta – o chamado número quântico principal – nos cálculos que conduziam aos valores de raios de órbitas e de energias permitidos ao elétron, para que então se justificasse seu espectro de raios. A partir de então, novas evidências experimentais tornavam cada vez mais evidente que partículas de sistemas microscópicos se comportavam de acordo com as leis de algum tipo de movimento ondulatório, e que as leis da chamada física clássica não mais poderiam ser estendidas até este limiar. Um procedimento mais geral para explicar o comportamento de partículas

de qualquer sistema microscópico foi então proposto, passando a ser conhecido como a teoria de Schrödinger da mecânica quântica. Esta teoria especifica quais as leis do movimento ondulatório que as partículas de qualquer sistema microscópico devem obedecer, sendo uma generalização que inclui a física de Newton como caso particular para sistemas em que a constante de Planck possa ser tomada como zero⁸⁸.

De acordo com a teoria de Schrödinger, os aspectos do comportamento de núcleos atômicos e de elétrons são governados por uma função de onda $\Psi(\mathbf{x},t)$ que contém toda a informação a respeito da dinâmica do sistema quântico^{88,101}. Esta função de onda é obtida a partir da resolução da equação de Schrödinger dependente do tempo caso se saiba qual a energia potencial $V(\mathbf{x},t)$ que atua sobre a partícula de massa m associada. A equação (27) mostra a equação de Schrödinger unidimensional dependente do tempo.

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{\partial^2 \Psi(\mathbf{x},t)}{\partial x^2} + V(\mathbf{x},t)\Psi(\mathbf{x},t) = i\hbar \frac{\partial \Psi(\mathbf{x},t)}{\partial t} \quad (27)$$

Sua solução geral para o caso de uma partícula livre é do tipo descrito pela equação (28):

$$\Psi(\mathbf{x},t) = (Ae^{-ikx} + Be^{+ikx}) e^{-i\frac{Et}{\hbar}} \quad (28)$$

em que A e B são constantes quaisquer, E é a energia do sistema e k é o número de onda.

A equação (27) representa a equação de onda da mecânica quântica cujas soluções $\Psi(\mathbf{x},t)$ nos fornecem as funções de onda que devem ser associadas ao movimento de uma partícula de massa m sob a influência de forças que são descritas pela função energia potencial $V(\mathbf{x},t)$. Fazendo-se o desenvolvimento matemático desta equação, encontram-se três equações que conduzem a três diferentes números quânticos (e não a apenas um como sugerido por Bohr), o que significa dizer que a equação só possui soluções aceitáveis para certos valores de energia total E . Isso significa que a energia do átomo é quantizada^{88,101}.

Ao se estender a teoria quântica para conjuntos de átomos – as moléculas –, a solução da equação de Schrödinger se torna gradativamente mais complicada. Isso ocorre pois, no caso de moléculas, além dos movimentos eletrônicos, outros dois tipos de movimento estão em jogo – rotação e vibração –, pois também possuem graus de liberdade os núcleos de cada átomo. Isso significa dizer que a energia de uma molécula é

dividida entre níveis energéticos eletrônicos, vibracionais e rotacionais, referentes respectivamente às transições de elétrons, aos movimentos relativos dos núcleos de cada átomo e aos movimentos de rotação da molécula como um todo^{102,103}. Como as energias referentes aos níveis de energia rotacionais (da ordem de 0,01 eV) são ínfimas em comparação àquelas dos níveis vibracionais (0,1 eV), e como se pode dizer o mesmo entre estes e os níveis eletrônicos (energias da ordem de eV), pode-se considerar, para fins espectroscópicos, com uma boa aproximação, que a energia total de uma molécula corresponde à soma destas diferentes energias em separado¹⁰⁴. Em outras palavras, cada um dos três tipos de energia é quantizado de modos diferentes e está associado a um conjunto de números quânticos específicos.

Para o movimento rotacional, a equação (27) nos leva a:

$$E = \frac{\hbar^2}{2I} \mathbf{r}(\mathbf{r} + 1) \quad (29)$$

onde I é o momento de inércia do sistema em rotação. Percebe-se que as energias rotacionais permitidas apenas assumem valores discretos, uma vez que \mathbf{r} , o número quântico rotacional, varia de +1 unidade a partir de zero. A diferença entre dois níveis energéticos pode ser deduzida de (29) como sendo da ordem de 10^{-4} eV. Tal patamar energético corresponde ao comprimento de onda da região do infravermelho (IR) longínquo ou de microondas, o que implica dizer que a excitação de um material com radiação de frequência desta magnitude seria suficiente apenas para excitar seus níveis rotacionais, puramente^{88,101}.

Analogamente, para níveis vibracionais, a equação de Schrödinger fornece:

$$E = \left(\mathbf{v} + \frac{1}{2} \right) \mathbf{h}\mathbf{v}_0 \quad (30)$$

sendo \mathbf{v} o número quântico vibracional e \mathbf{v}_0 a frequência de oscilação da teoria clássica, $\frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\mathbf{c}}{\mu}}$, com \mathbf{c} a constante de força restauradora e μ , a massa reduzida do sistema. Da equação acima, verifica-se que $\Delta E \sim 10^{-2}$ eV, o que implica que radiação da região do infravermelho do espectro eletromagnético é capaz de conduzir a excitações deste tipo. Segue-se daí que mudanças vibracionais produzem um espectro combinado de vibração-rotação, sendo que a transição vibracional determina a região do espectro a ser observada, ao passo que as transições rotacionais determinam a separação das linhas obtidas^{88,101} (Figura 7).

Ao se lidar com transições entre níveis eletrônicos, trata-se de radiação cuja frequência encontra-se entre a região do ultravioleta e do visível (da ordem de alguns eV); logo, como comentado anteriormente, a transição entre diferentes estados eletrônicos acarreta alterações nas configurações vibracionais e rotacionais associadas a estes dois níveis. Portanto, um número muito grande de transições é possível quando da excitação de moléculas com luz visível ou ultravioleta, o que origina bandas no espectro, que correspondem à sobreposição de todas estas transições possíveis. Para cada estado eletrônico, correspondente a uma certa configuração eletrônica, há uma dependência particular da energia da molécula com a distância internuclear. Tais fatos podem ser mais bem compreendidos pela análise da curva de energia potencial sentida pelo elétron em uma molécula (**Figura 7**):

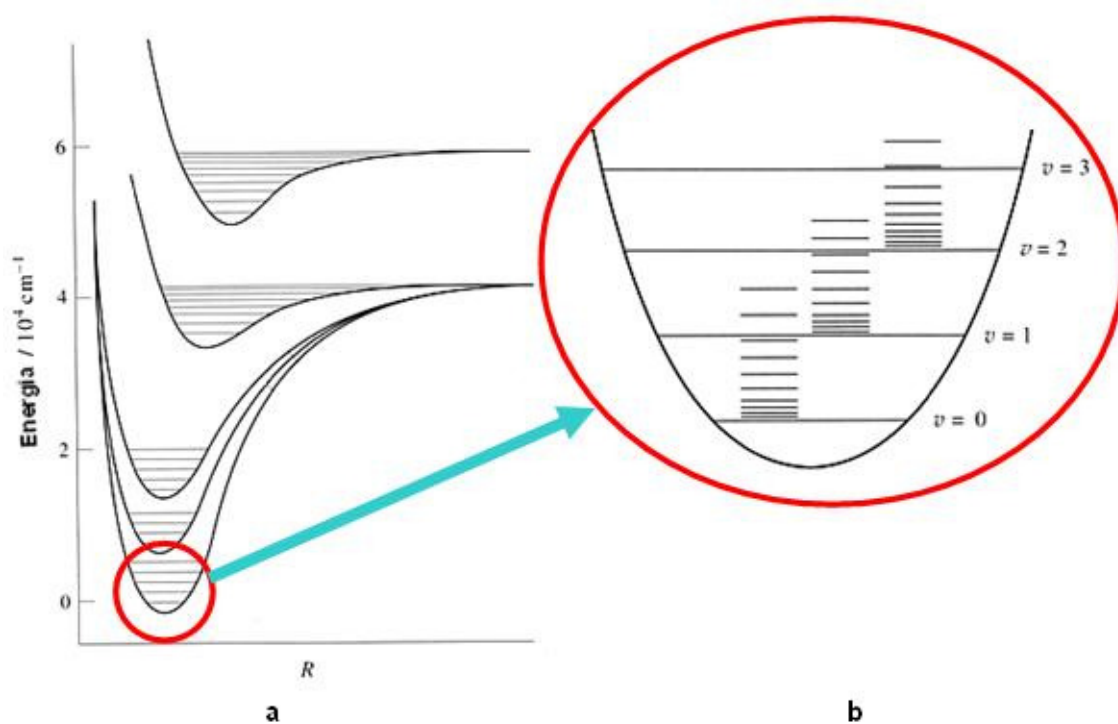


Figura 7. (a) Curva de energia potencial de uma molécula em função da distância internuclear R para cinco estados eletrônicos. No detalhe à direita (b), representa-se a variação de vários níveis de energia rotacionais para cada nível vibracional, e a variação destes para um mesmo nível eletrônico.

Vale ressaltar que, em estados excitados, os átomos encontram-se mais fracamente ligados; portanto, as curvas de potencial se tornam mais largas e mais rasas, e a separação internuclear de equilíbrio (valor mínimo da curva de potencial) aumenta para valores crescentes da excitação eletrônica, como observado na figura acima^{85,88}.

3.5. FOTOQUÍMICA

3.5.1. Leis da Fotoquímica

Para a proposta deste trabalho, não se faz necessária uma análise muito mais profunda a respeito das considerações da mecânica quântica. Ao contrário, seria mais interessante analisar-se a geração de estados excitados, bem como as possíveis interações entre estes estados, sob o ponto de vista químico, já que oxidações biológicas causadas por fotossensibilizadores ocorrem via mecanismos químicos mediados pela luz.

O estudo acerca das reações químicas resultantes da ação da radiação sobre moléculas é realizado pela fotoquímica. Ela abrange todos os aspectos da química e da física dos estados eletronicamente excitados da matéria, desde sua criação até sua eventual desativação. Este assunto se encontra bastante discutido na literatura^{85,105}.

A primeira consideração importante neste estudo diz respeito à definição de espécie química. Após a excitação da molécula, temos uma alteração na distribuição eletrônica – ou seja, os elétrons são promovidos a outros estados, de maior energia, e os núcleos então se rearranjam de forma a obter uma geometria de equilíbrio, mais favorável, neste estado excitado. Assim, tem-se uma mudança na espécie química em questão, uma vez que esta molécula excitada passa a ter sua própria geometria e, portanto, propriedades diferentes daquelas do estado fundamental. Exemplo conveniente para este trabalho diz respeito à molécula de oxigênio, que em seu estado fundamental é estável e quimicamente inerte, ao passo que no estado excitado torna-se altamente reativa.

Os processos fotoquímicos somente podem ocorrer caso haja a absorção de um fóton pela molécula em questão. Isto é o que diz a Primeira Lei da Fotoquímica, ou Lei de Grotthuss-Draper⁸⁵, que considera o fóton como reagente limitante, o que equivale a dizer que somente a radiação efetivamente absorvida pela molécula pode induzir uma transformação fotoquímica.

Outro conceito muito importante, ao se estudarem moléculas em estados excitados, diz respeito ao rendimento quântico Φ . Sua definição vem da Segunda Lei da Fotoquímica, de Einstein-Planck, ou Lei da Equivalência Fotoquímica. Tal lei estabelece que um fóton é capaz de criar somente um estado excitado. Assim, introduz-se um cálculo de probabilidades a respeito das diversas transições que podem ocorrer com a molécula a partir de seu estado excitado. Este cálculo de probabilidades nada mais é que o referido rendimento quântico, que expressa a eficiência de uma determinada reação fotoquímica. Matematicamente, Φ é a relação entre o número de mols do fotoprocesso em questão e o número de mols do estado excitado inicial:

$$\Phi = \frac{\text{número de mols formados}}{\text{número de mols de fótons absorvidos}} = \frac{\text{número de mols do fotoprocisso}}{\text{número de mols do estado excitado inicial}} \quad (31)$$

O rendimento quântico é então determinado a partir de relações entre constantes de taxa k de cada processo. Como se trata de um cálculo probabilístico, a relação que leva à determinação do rendimento quântico de um determinado processo, em termos de constantes de taxa, tomaria a seguinte forma:

$$\Phi = \frac{\text{modo de desativação do estado excitado } l}{\sum (\text{modos que desativam este estado})} = \frac{k_l}{\sum_i k_i} \quad (32)$$

3.5.2. Considerações Cinéticas

Sendo a excitação óptica inicial representada por



onde $I(t)$ representa a intensidade da luz absorvida pela molécula, pode-se escrever as taxas de variação nas concentrações de S_1 e T_1 como:

$$\frac{d[S_1]}{dt} = I(t) - (k_f + k_{CIS} + k_{CI} + k_{RS}) \cdot [S_1] \quad (34)$$

$$\frac{d[T_1]}{dt} = k_{CIS} \cdot [S_1] - (k_p + k_{CIS} + k_{RT}) \cdot [T_1] \quad (35)$$

Em (34), o número de mols de moléculas em S_1 formado (representado através da intensidade da radiação absorvida – Lei de Grotus-Draper (fóton = reagente limitante)) diminui de acordo com as etapas de desativação possíveis para este estado (representadas pelas constantes de taxa: k_f = radiativa, k_{CIS} = cruzamento intersistemas, k_{CI} = conversão interna, k_{RS} = reação do singleto, k_p = fosforescência, k_{RT} = reação do tripleto). Obviamente, estas etapas de desativação são dependentes da concentração do estado excitado a cada momento.

Em (35), a população do estado T_1 é determinada a partir do número de moléculas que sofreram cruzamento intersistemas. Os primeiros e os últimos termos das duas equações são, portanto, análogos entre si.

Caso a excitação se dê por meio de um pulso luminoso em $t=0$, ao invés de uma fonte de emissão contínua, o termo $I(t)$ em (34) se torna nulo, o que implica:

$$\frac{d[S_1]_t}{[S_1]_t} = -(k_f + k_{CIS} + k_{CI} + k_{RS})dt \quad (36)$$

Logo, a probabilidade de se encontrar o sistema excitado em S_1 em algum instante t qualquer é obtido integrando-se ambos os lados de (36):

$$\frac{[S_1]_t}{[S_1]_0} = e^{-(k_f + k_{CIS} + k_{CI} + k_{RS})t} = e^{-\frac{t}{\tau_f^0}} \quad (37)$$

o que significa que o decaimento de $[S_1]$ é exponencial com tempo de vida do estado singleto (ou tempo de vida de fluorescência, τ_f^0) dado por

$$\tau_f^0 = (k_f + k_{CIS} + k_{CI} + k_{RS})^{-1} \quad (38)$$

Similarmente, a probabilidade de se encontrar o sistema em T_1 em um instante t é:

$$\frac{[T_1]_t}{[S_1]_0} = \frac{k_{CIS} \cdot \tau_f^0 \cdot \tau_T^0}{\tau_T^0 - \tau_f^0} \left(e^{-\frac{t}{\tau_T^0}} - e^{-\frac{t}{\tau_f^0}} \right) \quad (39)$$

com τ_T^0 correspondendo ao tempo de vida do estado tripleto (tempo de vida de fosforescência).

Sob circunstâncias usuais ($\tau_T^0 \gg \tau_f^0$), T_1 decai exponencialmente com tempo de vida de:

$$\tau_T^0 = (k_p + k_{CIS} + k_{RT})^{-1} \quad (40)$$

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

A hipocrelina B (HB) foi adquirida tanto da Sigma-Aldrich Corporation Ltda como da Shaanxi Tianze Bio-Technology CO, LTD. Os cloretos de lantanídeos utilizados ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{TbCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corporation Ltda. Foi utilizado como solvente etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), proveniente de Vetec Química Fina Ltda. Diluições dos fotossensibilizadores para os testes *in vitro* e para a estimativa da geração de oxigênio singlete pelo método indireto foram feitas em PBS e em água destilada, respectivamente. Como meio de cultura, utilizou-se ágar sabouraud dextrose da Acumedia Manufacturers. O PBS (*phosphate-buffered saline*, uma solução salina tamponada de fosfatos) foi preparado a partir de NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, todos adquiridos da Acumedia Manufacturers. Todos os reagentes possuem pureza analítica e foram utilizados como adquiridos.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Preparação das Amostras

De uma forma geral para as duas etapas deste trabalho, calcularam-se as quantidades em gramas de HB e dos cloretos de Ln^{3+} necessárias para que se preparassem soluções em etanol de mesma concentração destas substâncias. Estas soluções foram então misturadas em volumes tais que propiciassem a razão desejada entre o número de mols de HB e de Ln^{3+} e agitadas por 20 minutos. Para a pesagem utilizou-se balança analítica modelo AUW220D da Shimadzu (precisão de 0,01 mg). As razões molares utilizadas neste trabalho para os complexos HB: Ln^{3+} foram 1:0,5; 1:1; 1:2 e 1:3. O modo de preparo dos complexos encontra-se esquematizado na **Tabela 4**, em que se parte de soluções de HB e de Ln^{3+} de igual concentração.

Tabela 4. Preparação dos complexos HB: Ln^{3+} .

Razão Molar	HB	Lantanídeo	Solvente	Volume Total
1:0,5	1 mL	0,5 mL	2,5 mL	4 mL
1:1	1 mL	1 mL	2 mL	4 mL
1:2	1 mL	2 mL	1 mL	4 mL
1:3	1 mL	3 mL	---	4 mL

Diluições posteriores, até concentrações de 0,5 μM , foram efetuadas de acordo com as necessidades de cada experimento. Para os testes *in vitro*, as amostras foram diluídas em PBS; para a estimativa do rendimento quântico de geração de oxigênio singlete pelo método indireto, em água destilada.

4.2.2. Medidas de Absorção Óptica

Os espectros de absorção óptica das amostras foram tomados com o auxílio de um espectrofotômetro Olis Cary-17 D, da Varian, do Laboratório de Espectroscopia de Absorção Óptica do Centro de Lasers e Aplicações (CLA) do IPEN, empregando-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm. As amostras foram analisadas na região de 300 a 800 nm, com resolução de 1 nm.



Figura 8. Espectrofotômetro Olis Cary-17 D, da Varian, do Laboratório de Espectroscopia de Absorção Óptica do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN.

4.2.3. Variações de pH

A fim de se verificar a influência do pH no comportamento dos fotossensibilizadores estudados, mudanças neste parâmetro para as melhores amostras foram realizadas por intermédio de solução de NaOH 1% (1g de hidróxido de sódio por 100 mL de solvente) em água destilada. Gotas de NaOH foram adicionadas às soluções de HB para que se efetuasse o aumento gradual do pH da solução, o qual foi determinado com o auxílio de um pHmetro digital de bancada modelo pHS-3B da Labmeter. Para cada valor de pH obtido uma pequena alíquota da solução foi reservada e posteriormente seu espectro de absorção foi tomado conforme item 4.2.2.

4.2.4. Medidas de Emissão Óptica

Para os experimentos de emissão no visível foram empregados um espectrômetro de fibra da Newport Instruments, modelo OSM-400-UV/VIS, com resolução de 1 nm, juntamente com cubeta de quartzo de caminho óptico 1 mm (**Figura**

9), um espectrofluorímetro Jobim Yvon, modelo Fluorolog 3, com resolução de 0,3 nm e cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm (**Figura 10**) e um arranjo experimental modular, desenvolvido no Laboratório de Espectroscopia Óptica do CLA do IPEN, baseado na técnica de *lock-in* (**Figura 11**). Os comprimentos de onda de excitação foram escolhidos de acordo com os máximos de absorção de cada amostra, exceto quando do uso do equipamento da Newport, com o qual foi utilizado laser de Nd:YAG ($\lambda = 532$ nm) para excitação.

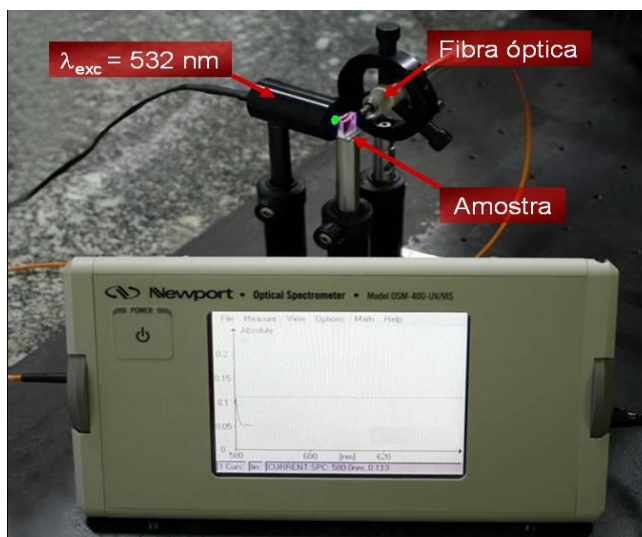


Figura 9. Configuração experimental para tomada de espectros de emissão feita com espectrômetro de fibra da Newport Instruments, modelo OSM-400-UV/VIS.



Figura 10. Espectrofluorímetro Jobim Yvon Fluorolog 3 utilizado para tomada dos espectros de emissão.

No arranjo utilizando a técnica de *lock-in*, uma lâmpada de xenônio de 300 W e um monocromador Jarrel-Ash de 0,25 m, com resolução de 0,5 nm, são utilizados para selecionar os comprimentos de onda de excitação das amostras. A luminescência das mesmas é coletada perpendicularmente à direção da excitação por um monocromador

Spex de 0,5 m, sendo detectada por um tubo fotomultiplicador Hammamatsu e amplificada por um *lock-in* EG&G 7220. Com a técnica *lock-in*, apenas sinais de frequência igual à de um obturador mecânico colocado no caminho óptico da excitação e conectado ao *lock-in* são amplificados, de forma a melhorar a razão sinal/ruído. Utilizou-se cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 mm, e os espectros foram tomados de 550 a 800 nm (para excitações em cerca de 470 nm) ou de 590 a 800 nm (para excitações em torno de 575 nm). Na **Figura 11** encontram-se representação esquemática e fotografia do arranjo em questão.

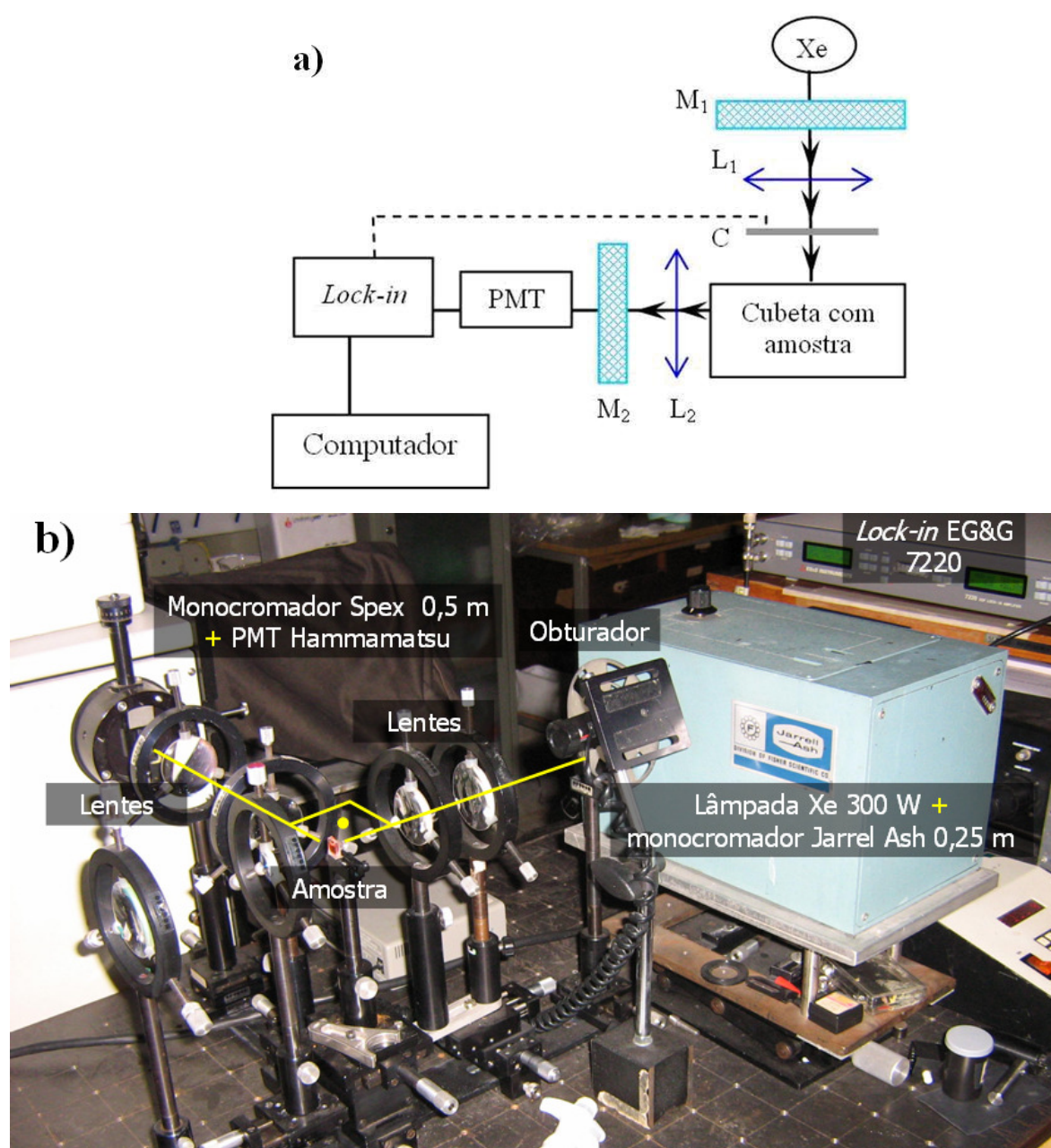


Figura 11. a) Representação esquemática do aparato experimental baseado na técnica de lock-in empregado para a tomada de espectros de emissão no Laboratório de Espectroscopia Óptica do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN. b) Fotografia do referido arranjo.

4.2.5. Determinação das Constantes de Dimerização K_D

A tendência de o fotossensibilizador formar dímeros em solução foi estudada por meio de espectroscopia óptica de absorção e de emissão. As constantes de dimerização dos fotossensibilizadores foram calculadas com base na relação entre sinal emitido e concentração da amostra. Para tanto, uma ampla faixa de valores de concentração molar para as amostras foi analisada. As medidas de absorção foram feitas conforme o item 4.2.2; para a emissão, empregou-se o espectrômetro de fibra da Newport (item 4.3.3), sendo a excitação realizada por um laser de Nd:YAG ($\lambda = 532$ nm) de 10 mW de potência.

4.2.6. Análise do Fotobranqueamento

Lasers de Nd:YAG, um de 10 mW (142 mW/cm^2) e outro de 50 mW (400 mW/cm^2) foram empregados como fontes de radiação ($\lambda = 532$ nm), de forma que se pudessem comparar os efeitos da ação de duas intensidades diferentes em uma mesma amostra de fotossensibilizador, avaliando assim sua tendência à fotodegradação. As soluções investigadas, acondicionadas em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e sob constante agitação (para garantir irradiação uniforme) foram irradiadas por um período de 60 minutos. Os espectros de emissão foram então tomados em intervalos regulares de 5 minutos em um espectrofluorímetro Jobin Yvon, modelo Fluorolog 3, com resolução de 0,3 nm e em cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm (item 4.3.3).

4.2.7. Medidas de Absorção no Infravermelho

Foi empregado o espectrofotômetro Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation do Laboratório de Espectroscopia de Absorção FT-IR do CLA do IPEN. Foram empregadas duas janelas ópticas de CaF_2 para selecionar a região de números de onda que se estende desde 1000 até 5000 cm^{-1} . As amostras foram colocadas entre estas janelas ópticas, e um caminho óptico de 1 mm foi adotado para padronizar as medições. Visava-se identificar diferenças entre a HB e seus complexos no tocante aos comprimentos de onda de absorção, o que evidenciaria a efetiva formação dos complexos.

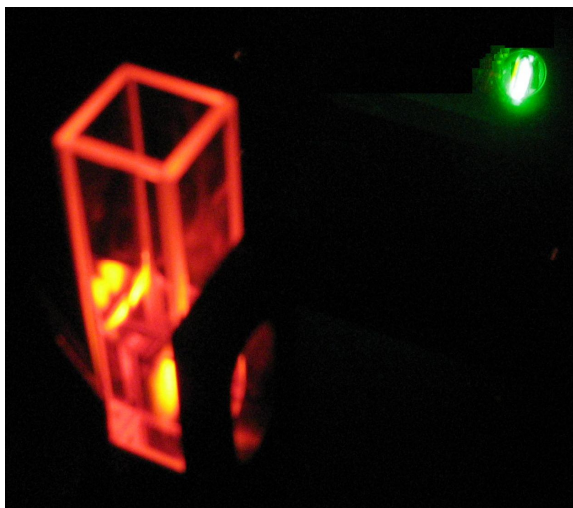


Figura 12. Detalhe em que é mostrada a excitação em 532 nm (à direita) e a emissão da amostra na região do vermelho (à esquerda).



Figura 13. Espectrofotômetro Nicolet 6700 FT-IR da Thermo Electron Corporation.

4.2.8. Estimativa do Rendimento Quântico de Geração de Oxigênio Singlete Φ_{Δ} pelo Método Espectroscópico Direto: Luminescência em 1270 nm

Um sistema de emissão da Edinburg Analytical Instruments, do Instituto de Química da USP, foi empregado para a tomada dos espectros de emissão na região de 1230 a 1320 nm. Tal sistema é constituído por um laser de Nd:YAG *Q-switched* (continuum Surelite III) que emite pulsos em 532 nm com energia de 30 mJ e com 5 ns de largura à meia altura em segundo harmônico, à taxa de repetição de 10 Hz, uma fotomultiplicadora Hamamatsu R5509 e uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm. A emissão em 1270 nm deve-se à desexcitação do $^1\Delta_g$, conforme (23).

4.2.9. Estimativa da Taxa de Produção de Oxigênio Singlete, pelo Método Indireto: Degradação Secundária do RNO

O método químico indireto utilizado para detecção de oxigênio singlete em solução consiste na degradação secundária do composto denominado p-nitrosodimetilanilina (**RNO**). O fotossensibilizador, inicialmente em solução em etanol a 1 mM, é diluído em água destilada até atingir a concentração de 5 μ M. É então adicionado ao fotossensibilizador **RNO** em solução em água destilada a 13,3 μ M e **L-H** (L-histidina) também diluída em água destilada a 15 mM, e é feita irradiação da solução resultante com LED azul ($\lambda = 460$ nm) de 430 mW de potência por um intervalo de tempo de 3 minutos. A cada 20 segundos é verificada a absorção no comprimento de onda de 440 nm, um máximo de absorção do **RNO**. Tais medidas foram realizadas em triplicata para assegurar a significância estatística do método. Empregou-se o espectrofotômetro Biospectro modelo SP-220 do Laboratório de Fotoprocessos Não-Térmicos em Biociências do Centro de Lasers e Aplicações do IPEN.

Conforme ocorre a degradação do **RNO**, ou seja, conforme se dá a formação de oxigênio singlete, maior é a queda na densidade óptica neste comprimento de onda. Portanto, através do cálculo do coeficiente angular da reta que representa tal degradação em função do tempo de irradiação, pode-se identificar uma maior ou menor capacidade de formação de oxigênio singlete pelo fotossensibilizador. Em outras palavras, quanto mais rápida for esta diminuição no referido comprimento de onda, melhor será o fotossensibilizador em termos de geração de oxigênio singlete.

4.2.10. Terapia fotodinâmica antimicrobiana - Testes *in vitro*

Para preparação e quantificação inicial do inóculo de *Candida albicans* ATCC 90028, as amostras foram cultivadas em placas de Petri contendo ágar sabouraud dextrose e crescidas em atmosfera de ar por 48 horas a 37°C. As células foram colhidas da superfície do ágar e suspensas em PBS (pH = 7,2). A concentração de células foi estimada através da porcentagem de transmitância no comprimento de onda de 530 nm da suspensão em PBS de *C. albicans*. Para que se obtivessem aproximadamente 1.10^6 unidades formadoras de colônia (ou simplesmente UFC) por mL de suspensão, a transmitância foi ajustada para $(72 \pm 5)\%$. A quantificação inicial do inóculo foi confirmada pelo crescimento das células do grupo controle^{36,106,107}.

A suspensão de *C. albicans* foi dividida em três grupos: grupo controle (L-FS-), sem adição de fotossensibilizador ou exposição à luz; grupo fotossensibilizador (L-FS+), destinado à verificação de efeitos tóxicos sem irradiação – ou seja, apenas pela ação do fotossensibilizador –; e grupo PDT (L+FS+). O grupo L+FS+ foi subdividido em outros

grupos de acordo com os intervalos de tempo de irradiação empregados e comprimentos de onda utilizados para a irradiação. Nos grupos L-FS+ e L+FS+, o fotossensibilizador foi adicionado ao inóculo de forma a se obter uma concentração final de 10 μ M de HB. Para o grupo L+FS+, utilizou-se tempo de pré-irradiação de 5 minutos.

Pelo fato de a hipocrelina B apresentar bandas distintas em seu espectro de absorção, foram utilizados dois tipos de excitação nos comprimentos de onda ressonantes ao fotossensibilizador, um LED (Quantum, EccoFibras) de 430 mW de potência com emissão em 460 nm e um laser (Photon Lasell, DMC) de 100 mW de potência em 660 nm (**Tabela 5**). Os microorganismos foram irradiados pelo topo de um dos poços de uma placa de microtitulação com a luz atravessando toda a suspensão.

Tabela 5. *Parâmetros de irradiação.*

	LASER	LED
Comprimento de onda	660 \pm 5 nm	460 \pm 30 nm
Área irradiada	0,3 cm²	1,29 cm²
Potência	100 mW	430 mW
Intensidade	333 mW/cm²	333 mW/cm²
Tempo de irradiação	0 - 360 s	

Alíquotas de 20 μ L foram colhidas de cada grupo e diluídas serialmente em PBS para gerar concentrações de 10⁻¹ a 10⁻⁴ vezes a concentração original¹⁰⁷.

Quatro alíquotas de 10 μ L correspondentes a cada diluição foram escorridas em triplicata em placas de Petri contendo ágar sabouraud e incubadas por 12 horas a 37°C para permitir a formação das colônias¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRIMEIRA ETAPA: CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DOS COMPLEXOS HB:Ln³⁺

Na etapa inicial do presente trabalho, foram preparadas soluções em etanol de hipocrelina B (HB) e dos cloretos de lantânio, európio e térbio em uma mesma concentração molar. Alíquotas de volumes diferentes destas soluções foram então misturadas e agitadas por 20 minutos, originando misturas em equilíbrio de HB pura e de complexos HB:Ln³⁺ em razões molares entre HB e Ln³⁺ iguais a 1:0,5; 1:1; 1:2 ou 1:3. Tais misturas são daqui em diante chamadas de soluções HB:Ln³⁺.

5.1.1. Melhores razões molares para os complexos HB:Ln³⁺

A hipocrelina B (HB) em etanol exibe banda de absorção na região do visível do espectro eletromagnético que se estende desde cerca de 400 nm até aproximadamente 600 nm. Tal banda de absorção é caracterizada por três picos centrados em 461, 548 e 589 nm, como se observa na **Figura 14**. Estes resultados estão de acordo com o fato de o espectro de absorção no visível de pigmentos do tipo perileno com a presença de grupos quinona consistir em três picos, sendo o de menor comprimento de onda devido a uma transição eletrônica $\pi \rightarrow \pi^*$ ³⁸ (por este motivo apresentando maior intensidade).

A formação de complexos com os três íons lantanídeos foi efetiva, uma vez que alterações nos picos de absorção em relação à HB pura foram notadas, como mostrado na **Figura 14**. A concentração final de HB nestes casos fez 70 μM . A HB, que tem coloração vermelha, foi gradualmente se tornando mais escura e adquirindo um tom marrom-esverdeado conforme se aumentava a concentração de lantanídeos em solução, como mostrado na **Figura 15**.

Nota-se da análise da **Figura 14** que os complexos de lantanídeos da HB exibem espectro de absorção semelhante ao da HB pura, com três picos, sendo o de menor comprimento de onda de maior intensidade. Para comprimentos de onda maiores que 600 nm, entretanto, a absorvidade molar aumenta consideravelmente em relação à HB. Este fato é positivo sob o ponto de vista da aplicação em terapia fotodinâmica (PDT), haja vista a presença de picos de absorção na região da janela terapêutica – em que a penetração da luz nos tecidos alcança um máximo –, o que possibilita o tratamento de lesões mais profundas.

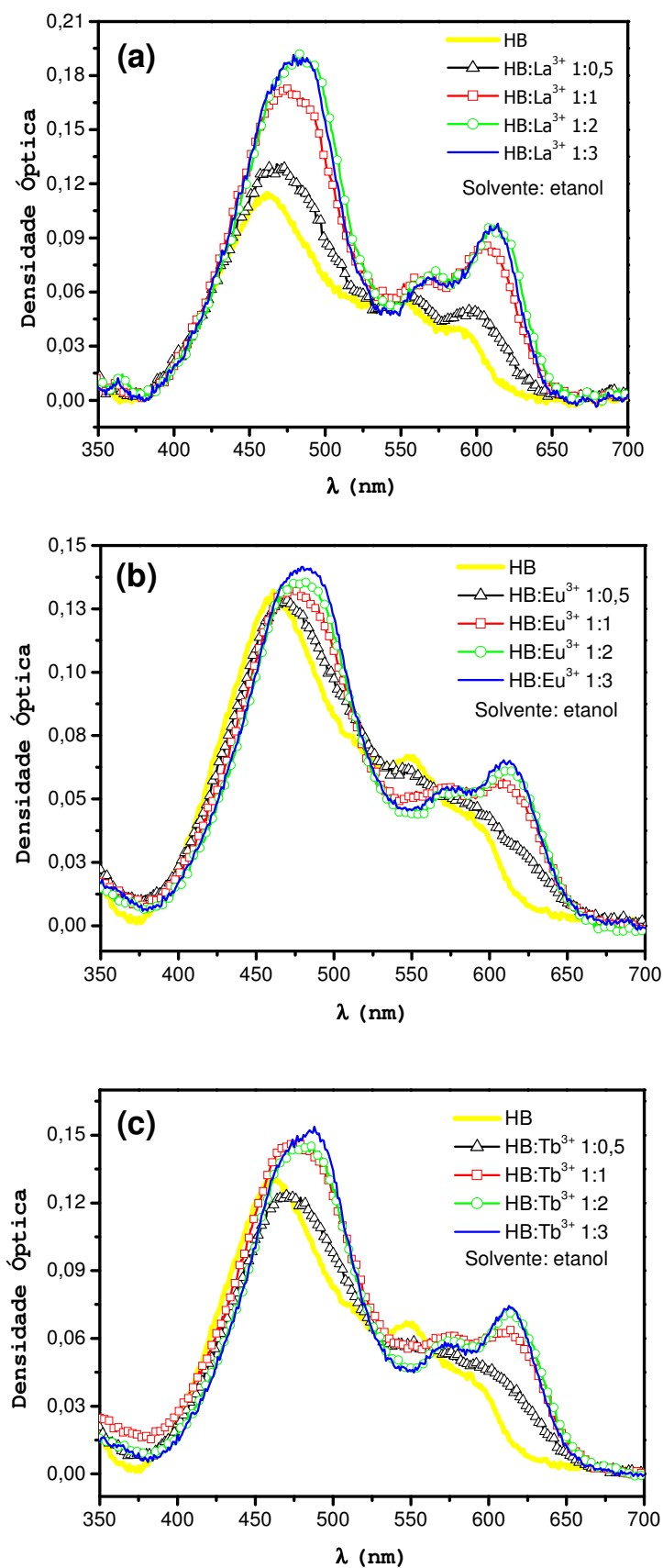


Figura 14. Espectros de absorção óptica da HB e de seus complexos em diferentes razões molares: (a) HB:La³⁺, (b) HB:Eu³⁺ e (c) HB:Tb³⁺.



Figura 15. Soluções em etanol de HB, HB:La³⁺ (1:2), HB:Eu³⁺ (1:2) e HB:Tb³⁺ (1:2), da esquerda para a direita, com concentração de HB igual a 70 μ M.

Também é possível perceber que os três íons lantanídeos alteraram a estrutura molecular da HB de forma semelhante, uma vez que propiciaram a formação de picos de absorção nos mesmos comprimentos de onda. Tal fato era esperado, uma vez que elementos químicos agrupados em uma mesma família possuem características químicas semelhantes.

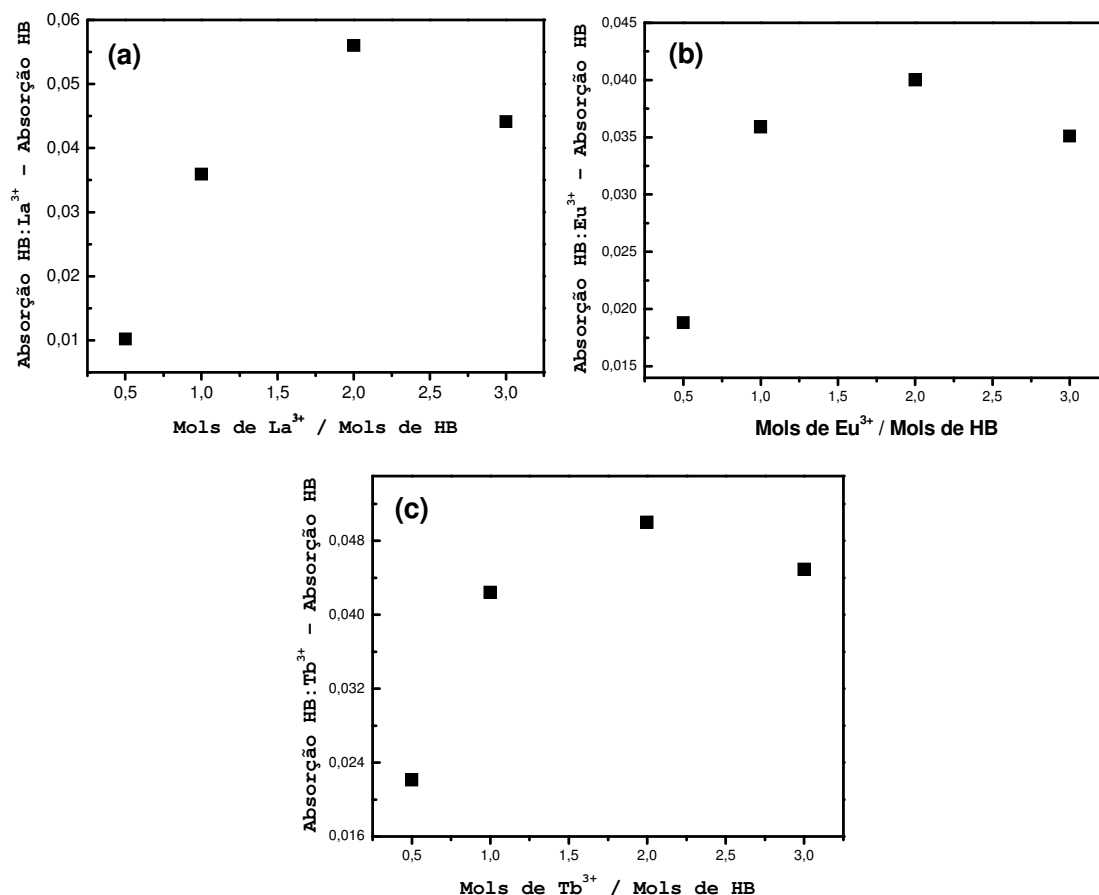


Figura 16. Densidade óptica em 630 nm (comprimento de onda em que a HB apresenta absorção quase nula) em função da razão entre íons lantanídeos e moléculas de HB para (a) HB:La³⁺, (b) HB:Eu³⁺ e (c) HB:Tb³⁺, evidenciando em todos os casos que a melhor proporção entre moléculas de HB e íons lantanídeos é de 1:2.

Quanto às razões molares, observa-se que os complexos com dois mols de Ln^{3+} para cada mol de HB (1:2) apresentaram aumentos mais significativos nos valores de absorvância em comprimentos de onda maiores que 600 nm em comparação à HB pura (vide **Figura 16**) em relação aos demais complexos, mostrando picos em 485, 574 e 614 nm. Isso equivale a dizer que há dois sítios de ligação na molécula de HB livres para que os íons de lantanídeos se posicionem. Na **Tabela 6** encontram-se os picos de absorção das amostras analisadas, bem como o valor do deslocamento do pico de absorção de maior comprimento de onda para o vermelho (em inglês, *red-shift*):

Tabela 6. Picos de absorção da HB e dos complexos HB:Ln^{3+} nas melhores razões molares (1:2).

Parâmetro	HB	HB:La ³⁺	HB:Eu ³⁺	HB:Tb ³⁺
λ_1 (nm)	461	485	485	485
λ_2 (nm)	548	574	574	574
λ_3 (nm)	589	614	614	614
Red-shift (nm)	---	25	25	25

Deve ser ressaltado o fato de o íon de lantânio ter sido capaz de trazer um incremento mais acentuado à absorção da HB na região da janela terapêutica, como elucidado pela **Figura 17**; portanto, com base nas medidas de absorção óptica na região do visível, pode-se afirmar, até o momento, ser HB:La³⁺ (1:2) o melhor dentre os complexos HB:Ln³⁺ estudados.

Como todos os complexos apresentaram melhores resultados para a razão molar 1:2, grande parte dos próximos resultados se refere apenas a estas razões molares.

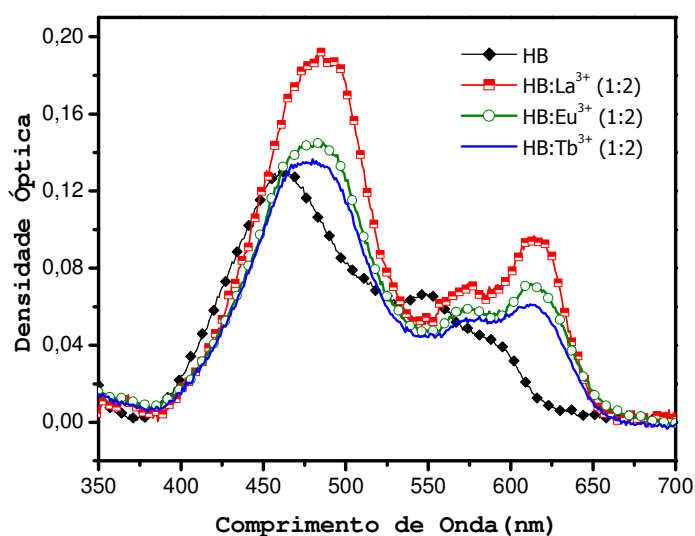


Figura 17. Comparação entre as densidades ópticas da HB e de seus complexos nas melhores razões molares (1:2). Todas as amostras apresentam a mesma concentração de HB, de 70 μM .

5.1.2. Variação de pH

Na **Figura 18** encontram-se os espectros de absorção das amostras de HB em etanol (concentração de 70 μM) com pH variando de 6 até 12.

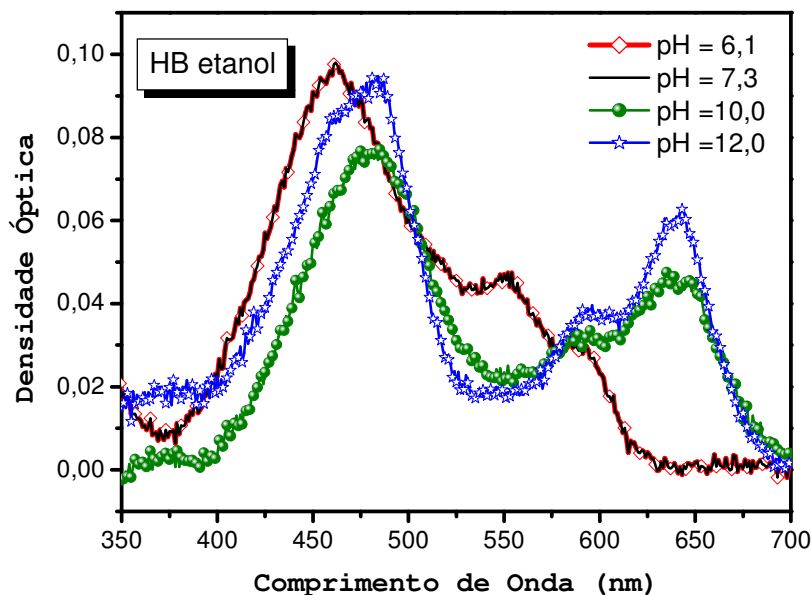


Figura 18. Variações no espectro de absorção óptica de HB etanol devidas a aumentos no pH do meio.

É possível notar que a HB se mantém sem alterações em condições de pH ácidos e neutros, ao menos na faixa de valores tomados neste experimento (picos em 461, 548 e 589 nm). Afinal, não se identificam alterações no espectro de absorção da HB entre o pH 6,1 (pH natural da HB) e o pH 7,3. Conforme se aumenta o caráter básico da solução, observa-se tendência de deslocamento dos picos de absorção da HB para a região de maiores comprimentos de onda, e os dados obtidos indicam que este deslocamento tende aos valores de comprimento de onda de 481, 593 e 640 nm. Visualmente, a amostra de HB passa a apresentar coloração verde.

Com base nestes resultados, seria possível que se chegasse à conclusão de que, ao invés de se buscar melhoria na absorção da HB através da formação de complexos, uma rota mais simples e mais eficiente seria a alteração de pH. Contudo, tal idéia é prematura, dado que é conhecido o fato de as hipocrelinas possuírem uma maior resistência ao fotobranqueamento em condições de pH mais ácido^{45,109}. Além disso, o pH dos fluidos biológicos é em torno de 7, e dos tecidos neoplásicos, por volta de 5,5; assim, o uso de um fotossensibilizador com pH fortemente básico poderia ser prejudicial ao organismo.

Ao se repetir o experimento acima para a amostra de HB:La³⁺ (1:2) em etanol ([HB] = 70 μM), um resultado inesperado sobreveio. A HB:La³⁺ precipitou-se ao atingir o valor de pH de 8,9, como mostrado pelas **Figuras 19 e 20**. Os espectros da **Figura 19**

com valores de pH superiores a 7,5 referem-se à parte líquida da solução, tomada após a decantação do precipitado.

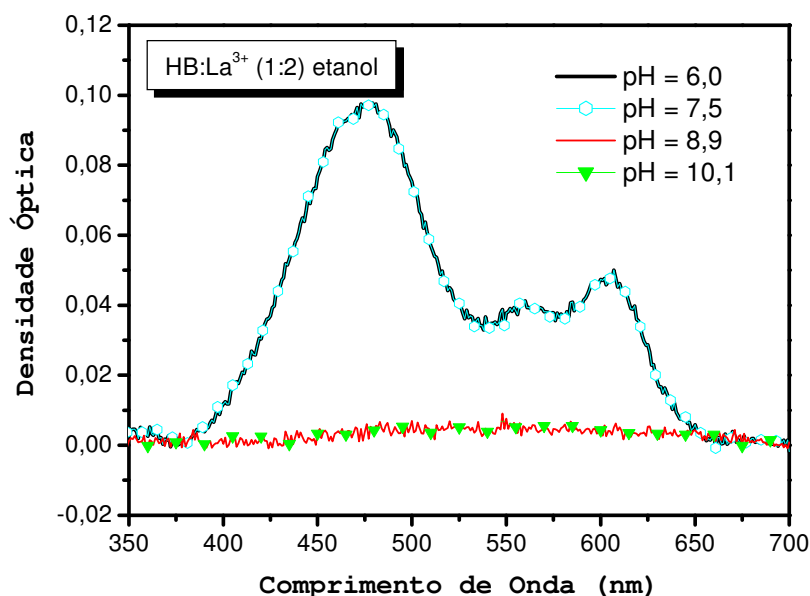


Figura 19. Variações nos espectros de absorção óptica de $HB:La^{3+}$ (1:2) em etanol devidas a aumentos no pH do meio.

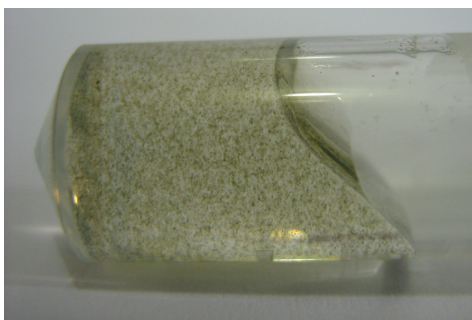


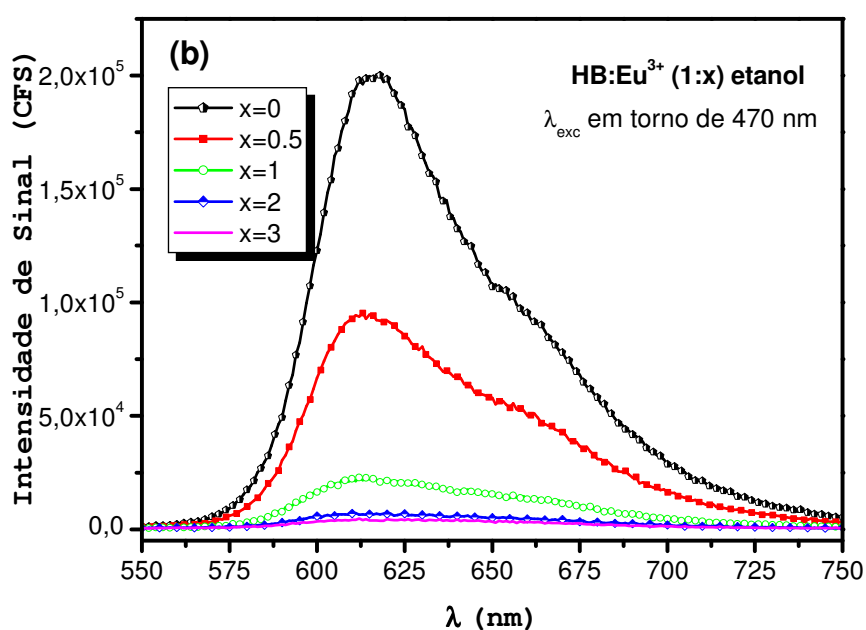
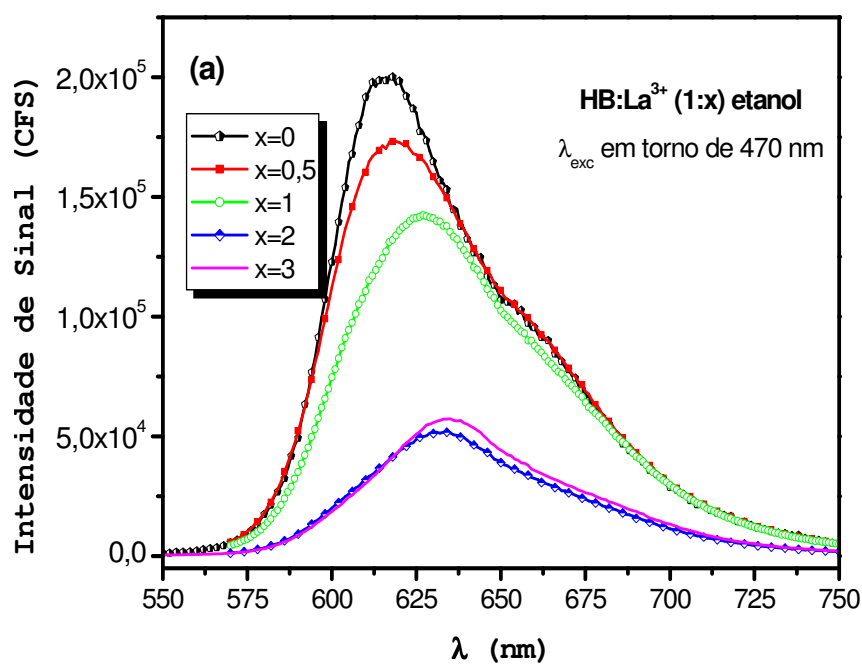
Figura 20. Fotografia em que se identificam os precipitados formados após o aumento do caráter básico da solução de $HB:La^{3+}$.

Supõe-se que o lantânio tenha mais afinidade com a hidroxila (OH^-) do que com a HB; deste modo, com o aumento do pH (logo, da concentração de OH^-), ocorre uma interação entre o lantânio presente nos complexos e a hidroxila, o que acarreta a formação de um produto não solúvel em etanol.

É importante ressaltar que tal alteração na estabilidade do complexo não foi revertida com o tempo, o que indica que em meios básicos $HB:La^{3+}$ não é estável e forma precipitado. Tal fato, porém, não compromete sua aplicação em terapia fotodinâmica, uma vez que, do ponto de vista das aplicações clínicas, deve-se manter o fotossensibilizador em pH neutro.

5.1.3. Medidas de Emissão no Visível

Na **Figura 21** estão representados os espectros de emissão dos complexos em diferentes razões molares, tomados com o auxílio do espectrofluorímetro Jobin Yvon Fluorolog 3. As excitações foram realizadas com os menores comprimentos de onda de absorção de cada complexo, como consta da **Tabela 6**. Foram utilizadas amostras com concentração de HB igual a 70 μM .



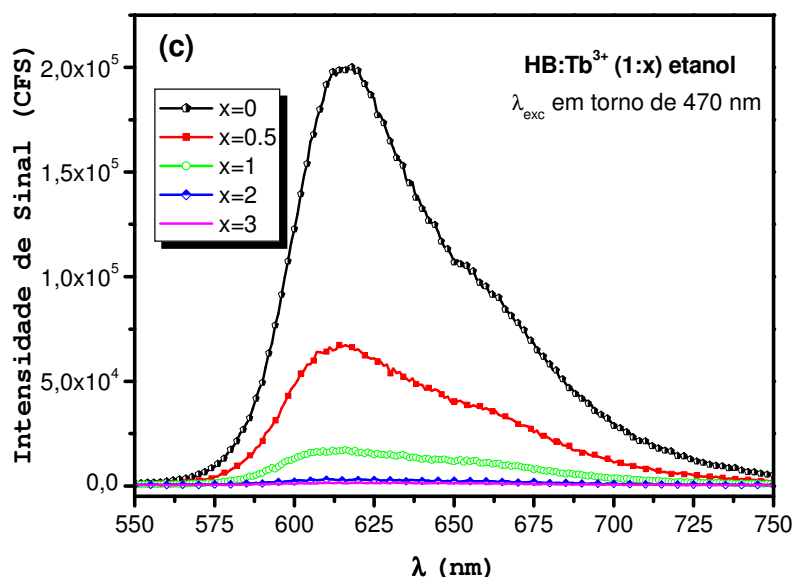


Figura 21. Espectros de emissão ($\lambda_{exc} = \lambda_l$ (Tabela 6)) de: (a) HB:La³⁺, (b) HB:Eu³⁺ e (c) HB:Tb³⁺.

Sob excitação em 461 nm, a HB apresenta uma banda de luminescência que se entende desde cerca de 600 nm até aproximadamente 750 nm, com picos em 612 e 662 nm. O pico de emissão em menor comprimento de onda é devido a uma transição $\pi \rightarrow \pi^{*38}$. Na **Figura 22** encontra-se uma fotografia da cubeta com a HB sob excitação no comprimento de onda supracitado, evidenciando a intensa emissão no vermelho.

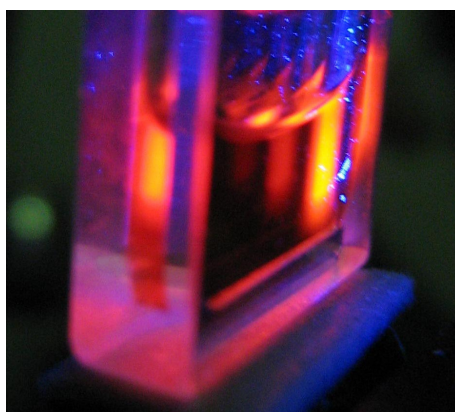


Figura 22. Fotografia da hipocrelina B (HB) acondicionada em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm excitada em 461 nm (azul) por uma lâmpada de xenônio de 300 W. Pode-se notar a intensa emissão vermelha da HB.

HB:La³⁺ (1:0,5) excitada em 481 nm apresenta picos de emissão em torno de 612 e 662 nm, à semelhança da HB pura. Para a proporção molar 1:1, nota-se pequeno deslocamento do pico em 612 para 627 nm. Para a razão molar 1:2, o pico se dá em 634 nm, e para 1:3, em 632 nm. Essa evolução pode ser um indicativo do processo gradual no qual o complexo vai se formando conforme se dá a adição de lantânio na HB. Já HB:Eu³⁺ e HB:Tb³⁺, com excitação em 478 e 482 nm, respectivamente, mantêm o espectro de emissão da HB.

É importante notar que a excitação em outro comprimento de onda, em torno de 570 nm (correspondente ao segundo pico de absorção das amostras, λ_2 – vide **Tabela 6**) produziu espectros de emissão idênticos aos da **Figura 21**, como mostrado na **Figura 23**.

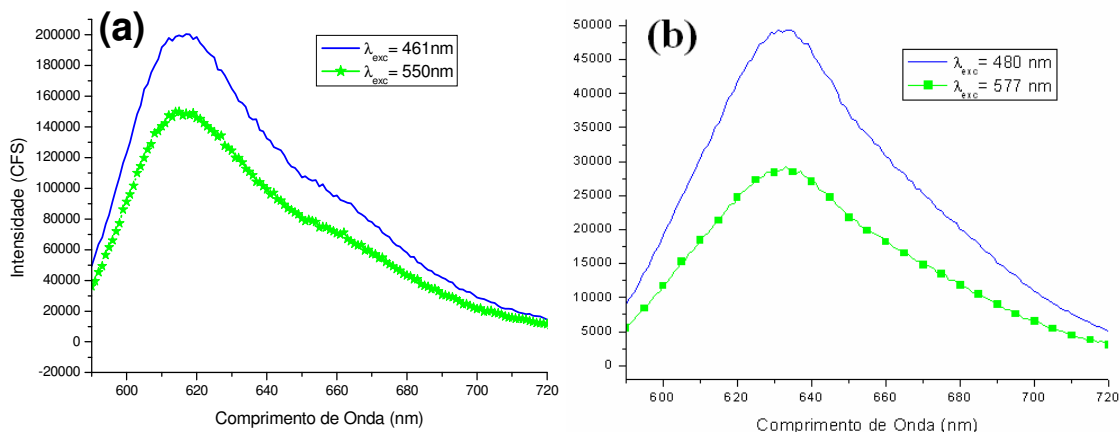


Figura 23. Alteração no comprimento de onda de excitação das amostras não influencia no comprimento de onda de emissão. Em (a), HB, e em (b), HB:La³⁺ (1:2).

Além disso, todos os complexos apresentam intensidade de luminescência inferior à da HB, e esta intensidade foi inversamente proporcional à quantidade de lantânio presente no complexo. Em outras palavras, os valores das constantes de taxa de decaimento radiativo dos complexos são menores que da HB, o que pode levar a maiores valores para as constantes de taxa de estado excitado tripleto e, conseqüentemente, a um maior rendimento quântico de geração de oxigênio singleto. Acredita-se que este fenômeno ocorre devido a um processo de transferência de energia entre o complexo HB:Ln³⁺ e o oxigênio do meio. Desta forma, a emissão do complexo diminui e a emissão do oxigênio singleto aumenta em relação à emissão HB precursora.

Cabe aqui ainda uma observação interessante acerca das medidas de emissão óptica: o comprimento de onda do pico de maior intensidade dos complexos é dependente da posição em que o feixe de excitação atinge a amostra. Afinal, como se pode perceber das **Figuras 21** e **24**, a emissão do complexo HB:Eu³⁺, por exemplo, apresenta ora pico de maior intensidade de luminescência em torno de 612 nm, ora em torno de 650 nm. Tal variação no espectro de luminescência foi observada também para os complexos com lantânio e com térbio, mas não para a HB pura. Ao se excitar a solução HB:Ln³⁺ no centro da cubeta, nota-se diminuição da intensidade de emissão em torno de 612 nm; transferindo-se o feixe de excitação para a extremidade da cubeta, o espectro de emissão dos complexos toma aparência semelhante ao espectro da HB, com máximo de emissão ao redor de 612 nm. A partir destes resultados, e lembrando-se que a intensidade de emissão da HB pura é maior que dos complexos, infere-se que a HB presente na solução e que eventualmente não tenha formado complexo com os

lantânídeos sofre o fenômeno de auto-absorção de forma muito mais intensa do que os complexos o fazem.

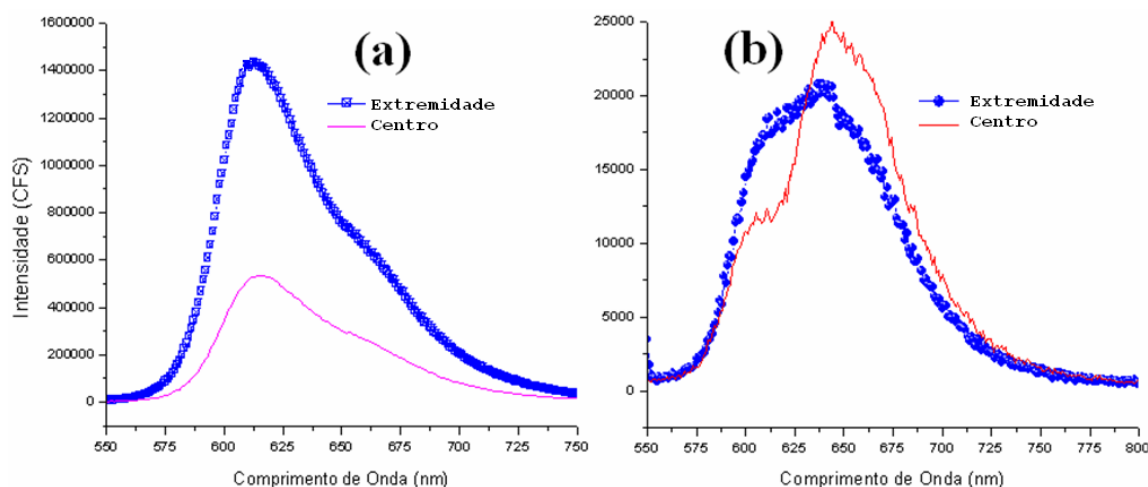


Figura 24. Influência da posição do feixe de excitação nos espectros de emissão da (a) HB e (b) seus complexos (apenas o complexo com európio é mostrado pois os demais seguem o mesmo comportamento). Para a HB não se nota diferença; para os complexos, a excitação no centro altera o espectro em relação à HB, o que indica haver auto-absorção da HB.

5.1.4. Cálculo de Níveis de Energia

Os níveis de energia da molécula de HB e de seus complexos com íons lantânídeos foram estimados com base em seus espectros de absorção e de emissão. Para tanto, os valores dos comprimentos de onda máximos de absorção que constam da **Tabela 6**, bem como dos comprimentos de onda máximos de emissão, foram convertidos em energia através da relação expressa por (26). Obtiveram-se assim os valores de energia expressos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Valores correspondentes a níveis de energia da molécula de HB e de seus complexos com íons lantânídeos.

Amostra	HB		HB:La ³⁺ (1:2)		HB:Eu ³⁺ (1:2)		HB:Tb ³⁺ (1:2)	
	λ (nm)	E (eV)	λ (nm)	E (eV)	λ (nm)	E (eV)	λ (nm)	E (eV)
Absorção	461	2,70	481	2,58	478	2,60	482	2,60
	548	2,27	570	2,18	575	2,16	575	2,16
S ₁	589	2,11	614	2,02	614	2,02	614	2,02
Emissão	614	2,02	627	1,98	627	1,98	627	1,98
	T ₁	648	1,92	658	1,89	658	1,89	658
S ₁ -T ₁		0,19		0,13		0,13		0,13

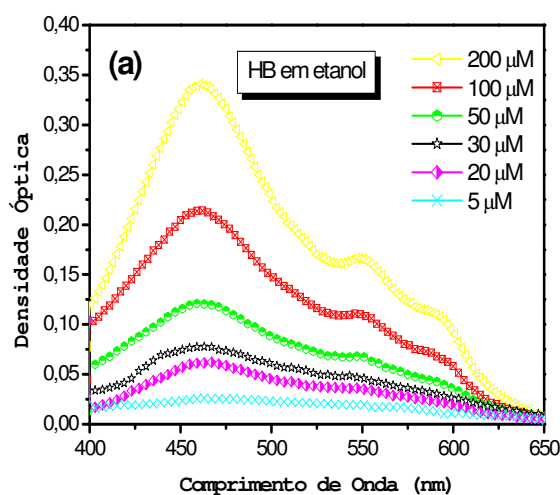
Conclui-se destes resultados que a energia correspondente à transição $S_0 \rightarrow S_1$ perfaz, para a HB, 2,11 eV, e para os complexos, 2,02 eV, dado que o maior comprimento de onda de absorção é equivalente à menor energia absorvida pela molécula. Isso ocorre pois a absorção parte do nível vibracional mais baixo do estado fundamental S_0 ⁸⁵. Além disso, o maior comprimento de onda (ou a menor energia) emitido pode ser atribuído à transição $T_1 \rightarrow S_0$. Obtêm-se, a partir destas observações, os valores indicados na **Tabela 7** para a diferença energética entre S_1 e T_1 , e percebe-se que a adição de íons lantanídeos à estrutura molecular da HB reduziu esta diferença. Este fato facilita a população do estado tripleto do fotossensibilizador, o que, em última instância, pode vir a aumentar a eficiência quântica de geração de espécies reativas de oxigênio.

Outra observação importante diz respeito ao fato de todos os fotossensibilizadores possuírem níveis excitados com energia superior a 0,98 eV, o valor de energia do nível excitado singleto do oxigênio; assim, espera-se eficiência na transferência de energia entre estas duas espécies^{46,86}.

5.1.5. Determinação das Constantes de Dimerização K_D

A fim de se determinar a concentração abaixo da qual se pode afirmar haver apenas monômeros em solução, determinaram-se as constantes de equilíbrio de dimerização K_D das amostras estudadas. Estas foram calculadas com base no modelo proposto por Margalit em 1983^{110,111}.

Inicialmente, utilizou-se espectroscopia de absorção óptica para verificar algum indício de aglomeração, que podia se revelar sob a forma de alguma alteração em comprimentos de onda de absorção ou ainda como variação na relação linear entre absorbância e concentração da amostra. Na **Figura 25** encontram-se representadas tais medidas:



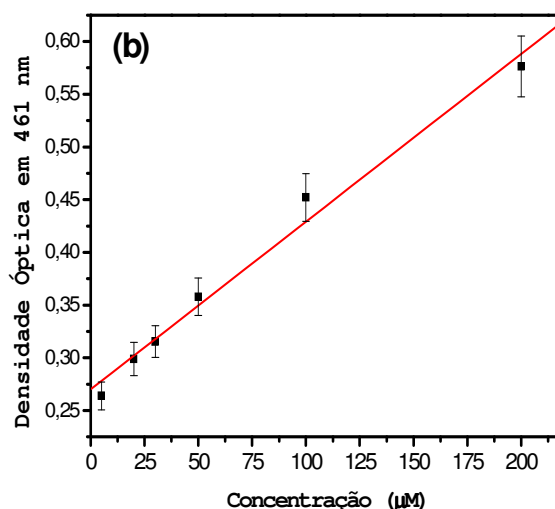


Figura 25. (a) Espectro de absorção da HB em diferentes concentrações; (b) relação linear entre absorvância (para o comprimento de onda de 461 nm, máximo de absorção da HB) e concentração, não evidenciando a presença de agregados.

Como, pela **Figura 25 (b)**, não se observa quebra na relação linear entre absorção e concentração da amostra (ou seja, como a Lei de Beer é obedecida), seria plausível supor que a HB não forma agregados na faixa de concentrações estudadas. Porém, de acordo com Margalit^{110,111}, a espectroscopia de absorção não é sensível o suficiente para detectar a formação de dímeros; logo, buscou-se analisar os espectros de emissão destas mesmas amostras (**Figura 26**) e aplicar o modelo proposto pelo autor.

Pelo referido modelo, admite-se que a dimerização é o processo de agregação predominante que ocorre na molécula e que apenas os monômeros são capazes de exibir luminescência.

O processo de dimerização pode ser representado por



onde **M** representa os monômeros, **D**, os dímeros e **K_D**, a constante de equilíbrio desta equação, ou simplesmente constante de dimerização. Como a concentração total de fotossensibilizador (**[HB]**) corresponde à soma da concentração de fotossensibilizador na forma monomérica com o dobro da concentração de fotossensibilizador na forma de dímeros, chega-se a:

$$K_D = \frac{[HB] - [M]}{2[M]^2}$$

$$\frac{[HB]}{[M]} = 2 K_D [M] + 1 \quad (42)$$

Assumindo-se que apenas os monômeros emitem luminescência, $[M]$ pode ser substituído por αI , onde α é uma constante de proporcionalidade e I é a intensidade de luminescência. Assim, chega-se a:

$$\frac{[HB]}{I} = 2 K_D \alpha^2 I + \alpha \quad (43)$$

que representa a relação linear entre a concentração de fotossensibilizador ponderada pela intensidade de luminescência ($[HB]/I$) e a intensidade de luminescência (I). Logo, determinando-se os espectros de luminescência de soluções de HB com concentrações variadas e traçando-se o gráfico de $[HB]/I$ contra I , com o cuidado de se utilizar apenas dados obtidos sob condições experimentais idênticas, a magnitude de K_D pode ser obtida da inclinação da reta e do intercepto da mesma com um dos eixos.

Com base no exposto, os espectros de emissão das amostras com diferentes concentrações molares de HB foram tomados, sob excitação em 532 nm, conforme ilustrado na **Figura 26**. Os espectros foram normalizados para apresentarem intensidade máxima igual à unidade.

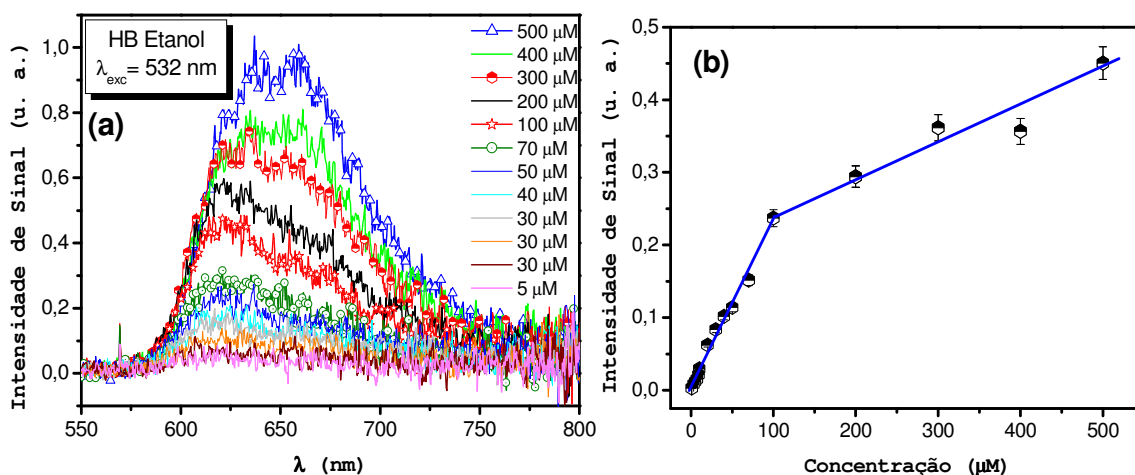


Figura 26. (a) Espectros de emissão das amostras com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) quebra na relação linear entre a intensidade de emissão e a concentração das amostras a partir da concentração de 100 μM de HB.

Primeiramente, nota-se que o comprimento de onda em que se dá o máximo da emissão da HB varia com a concentração da mesma em solução. Para concentrações de HB maiores que 300 μM , o máximo de emissão ocorre em cerca de 657 nm; para as demais concentrações, o pico de emissão de menor comprimento de onda, em torno de 620 nm, torna-se o mais intenso. Para concentrações de HB ainda menores, obtém-se o valor de 612 nm como comprimento de onda correspondente ao máximo de emissão,

conforme obtido nas medidas de emissão (item 5.2.2). Tal fato acusa a formação de dímeros, que são reconhecidos por emitirem luminescência em comprimentos de onda maiores que os monômeros^{99,112}. Além disso, verifica-se que a espectroscopia de emissão acusa quebra na relação linear entre intensidade de luminescência e concentração da solução, o que indica a formação de agregados. Assim, aplicando-se o Modelo de Margalit para a região linear da **Figura 26 (b)**, obtém-se o seguinte gráfico:

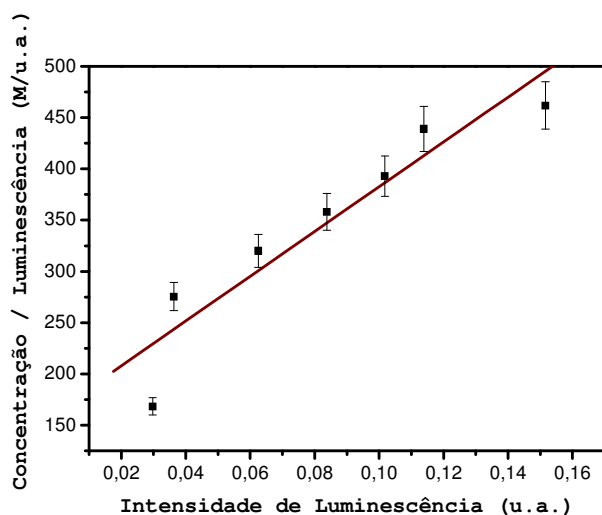


Figura 27. Gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D da HB em etanol.

Através do gráfico acima e da equação (43), calcula-se para a HB em etanol uma constante de dimerização igual a $4,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Procedendo-se de forma semelhante para os complexos com lantanídeos da HB, obtiveram-se os seguintes espectros:

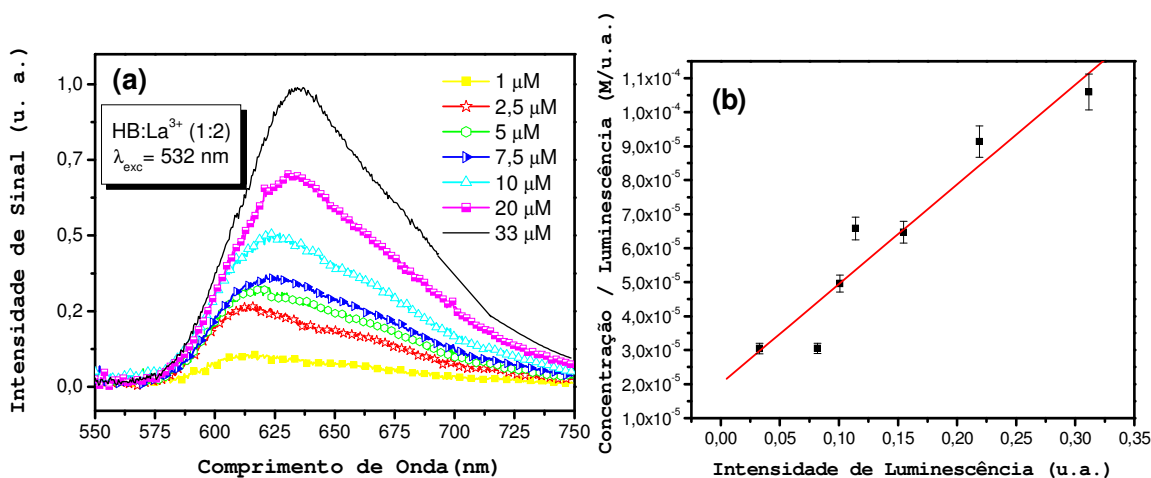


Figura 28. (a) Espectros de emissão das amostras de HB:La³⁺ (1:2) com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D .

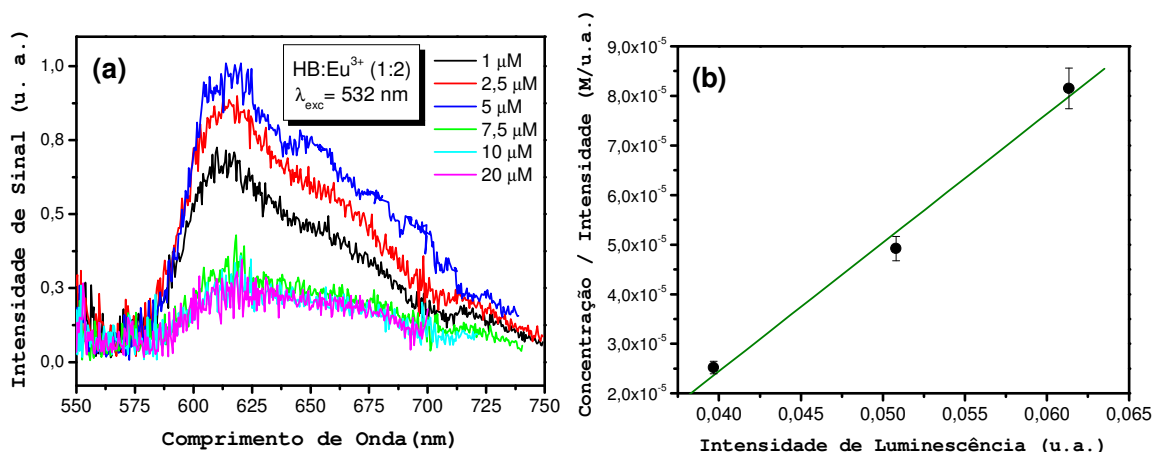


Figura 29. (a) Espectros de emissão das amostras de HB:Eu^{3+} (1:2) com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D .

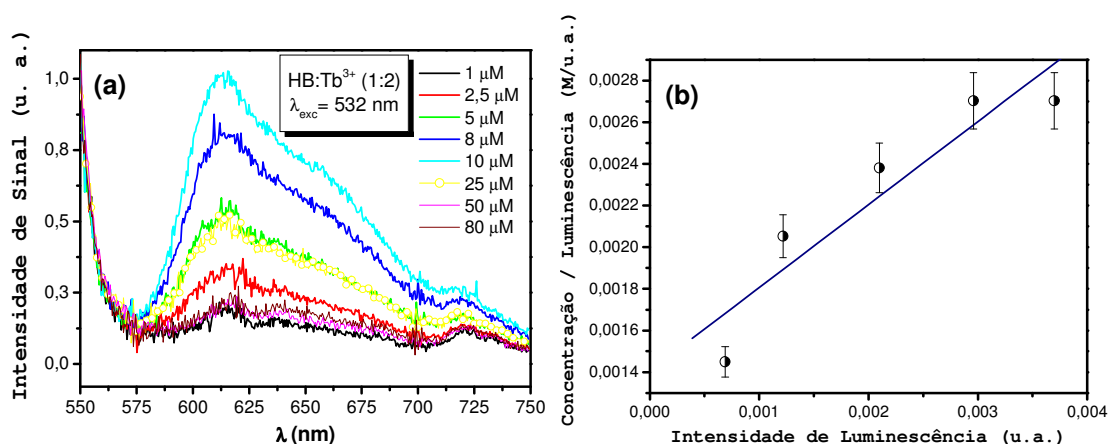


Figura 30. (a) Espectros de emissão das amostras de HB:Tb^{3+} (1:2) com diferentes concentrações de HB, sob excitação em 532 nm; (b) gráfico da relação entre a razão da concentração pela intensidade de luminescência e a intensidade de luminescência utilizado para o cálculo da constante de dimerização K_D .

que forneceram os valores de constantes de dimerização mostrados na **Tabela 8**:

Tabela 8. Valores calculados para as constantes de dimerização K_D .

	HB	HB:La ³⁺	HB:Eu ³⁺	HB:Tb ³⁺
K_D (M ⁻¹)	$4,7 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5$

Quanto maior a constante de dimerização, maior é a tendência do composto para formar agregados. Era de se esperar que os complexos apresentassem, portanto, um maior valor para este parâmetro em comparação à HB pura, dado que os íons incorporados à HB podem atuar como elementos que unem umas moléculas às outras. Esta interpretação dos complexos será melhor explanada no item 5.2.7.

Comparando a tendência à agregação dos complexos de HB com outros fotossensibilizadores estudados na literatura, verifica-se que os valores de K_D são equiparáveis. Ribeiro et. al.⁴⁶ calcularam a K_D de dois compostos derivados porfirínicos e

obtiveram valores próximos a $4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Borisov⁴⁷ e colaboradores mostraram que as constantes de dimerização de variados compostos porfirínicos encontram-se na faixa de 10^3 a 10^4 M^{-1} . Ou seja, os complexos de HB estudados possuem valores de K_D comparáveis aos de outros fotossensibilizadores.

Há ainda um outro ponto, referente a estas medidas de emissão dos complexos para diferentes concentrações de HB, a ser ressaltado: durante a execução deste experimento, notou-se que os complexos de térbio e európio apresentaram uma queda brusca na intensidade de emissão ao atingirem concentração de HB acima de $10 \mu\text{M}$ e de $5 \mu\text{M}$, respectivamente. Este comportamento não foi notado para o complexo com La^{3+} , em que a intensidade emitida aumenta com a concentração da solução, como mostra a **Figura 31**. Este é o comportamento esperado, uma vez que uma maior concentração implica um maior número de espécies emissoras de luz.

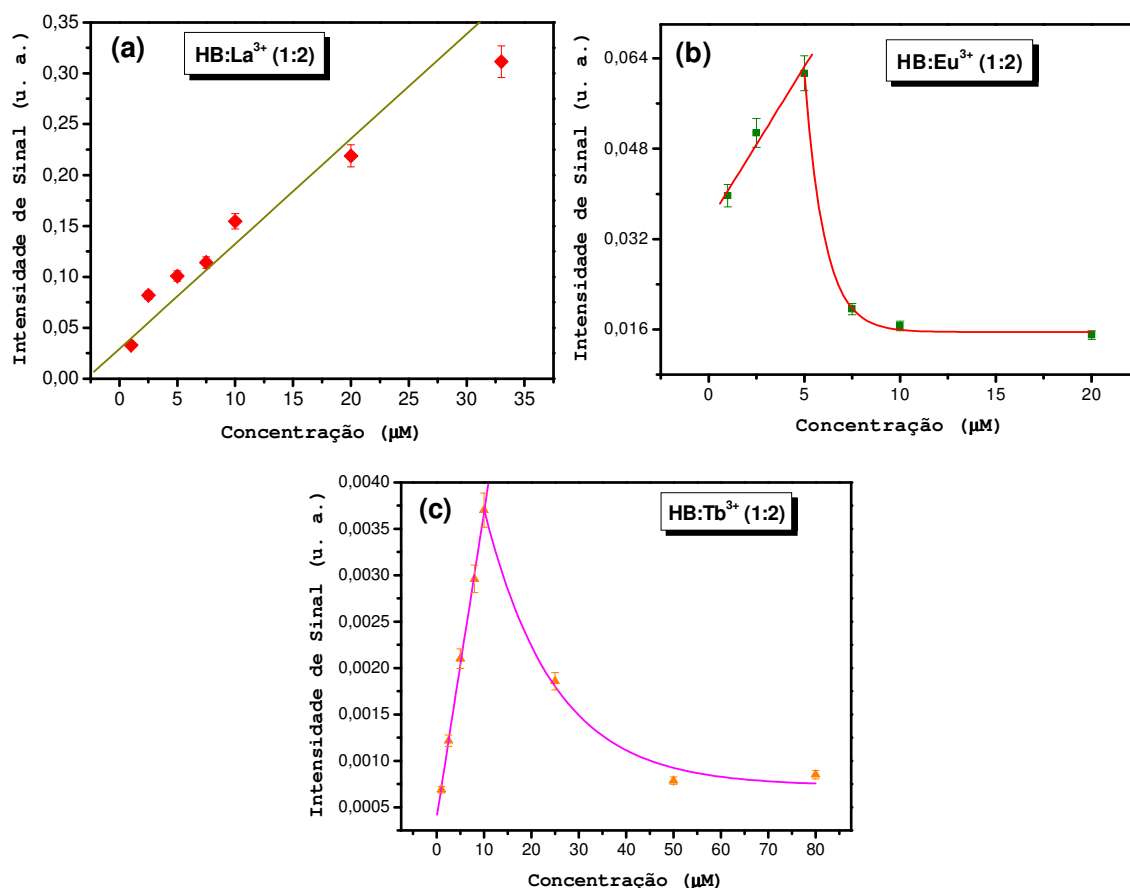


Figura 31. Variação das intensidades de emissão de (a) HB:La^{3+} (1:2), (b) HB:Eu^{3+} (1:2) e (c) HB:Tb^{3+} (1:2) em função da concentração de HB em solução.

Essa observação mostra que, para os complexos com európio e térbio, ocorre um processo de transferência da energia emitida pela HB para os íons lantanídeos, uma vez que estes apresentam níveis de energia no visível. Por este motivo é observada a

supressão da emissão para estes dois complexos. Além disso, este fenômeno somente ocorreu a partir de um determinado valor de concentração pois assim se preencheu o requisito do raio crítico para que houvesse a possibilidade de transferência de energia. Como o lantânio não possui níveis de energia na região do visível, tal comportamento não foi notado para este complexo.

5.1.6. Análise do Fotobranqueamento

Importante parâmetro que avalia o comportamento do candidato a fotossensibilizador em sua situação real de uso, o fotobranqueamento das soluções estudadas foi investigado. Fotobranqueamento (conhecido também por fotodegradação ou ainda *photobleaching*, do termo inglês) corresponde a um processo irreversível de destruição da molécula do fotossensibilizador. Pode ser identificado através de perdas em intensidades de absorção ou emissão do cromóforo após sua exposição à luz. Tais perdas são advindas de reações do fotossensibilizador com as espécies reativas de oxigênio formadas no meio, que originam espécies oxidadas não emissoras, como mostrado esquematicamente na **Figura 32**.

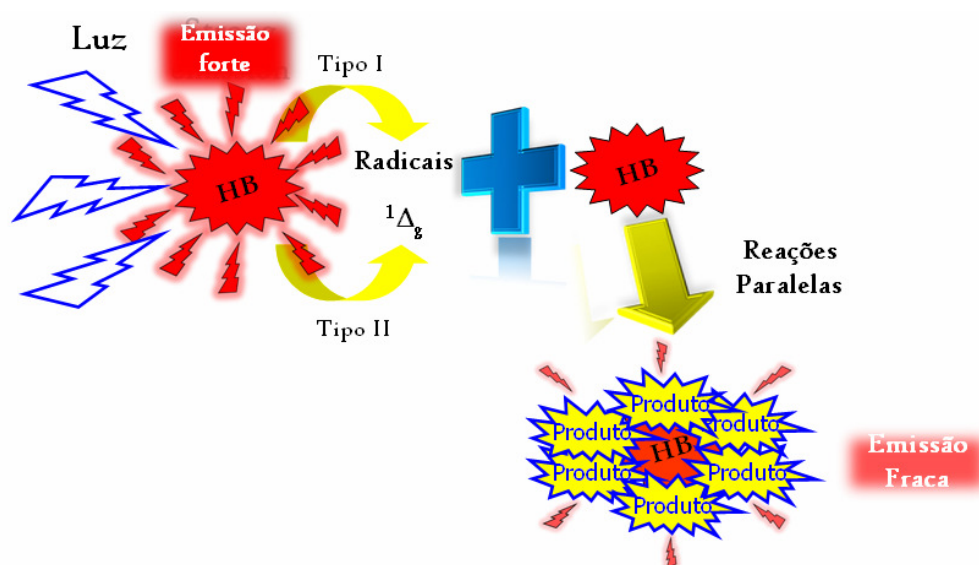


Figura 32. Representação esquemática do processo de fotobranqueamento.

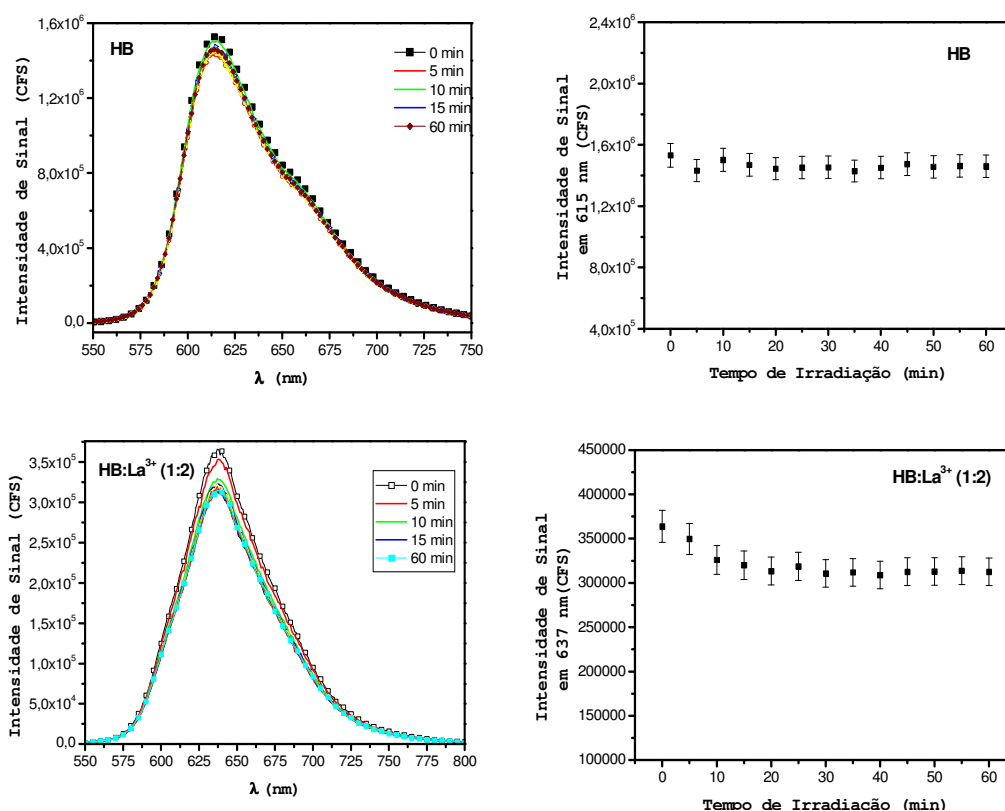
Desta maneira, a análise da ocorrência de fotobranqueamento é de vital importância para conduzir o fotossensibilizador dos centros de pesquisa aos consultórios médicos.

Experimentalmente, o fotobranqueamento foi analisado por intermédio de excitação com laser de Nd:YAG com emissão em 532 nm e com dois diferentes valores de potência: 10 mW (correspondente a uma intensidade de 142 mW/cm²) e 50 mW

(intensidade de 400 mW/cm^2). Para estudos de fotobranqueamento, mais interessante que a potência é a intensidade da luz incidente, pois esta relaciona a energia por unidade de tempo recebida por unidade de área da superfície da cubeta que contém a solução. Desta forma é considerada, então, a quantidade de energia luminosa que atinge um certo número de moléculas do fotossensibilizador em um determinado instante de tempo.

As amostras foram expostas à ação do laser por 60 minutos sob agitação contínua (para garantir iluminação homogênea), e em intervalos de tempo de 5 minutos os espectros de emissão foram tomados. Qualquer redução significativa nas intensidades emitidas é um indício de que o fotossensibilizador está reagindo com as espécies reativas geradas, o que por sua vez leva à perda de sua ação fotodinâmica.

A **Figura 33** mostra os espectros obtidos para excitação com laser de intensidade de 142 mW/cm^2 , juntamente com um gráfico que relaciona a intensidade de sinal com o tempo de irradiação. As concentrações de HB nas amostras usadas para este estudo foram de $10 \mu\text{M}$. Como se pode verificar, nenhuma das soluções estudadas sofre fotobranqueamento sob as condições experimentais. As diminuições observadas nas intensidades de emissão não são significativas. Tal fator é positivo, dado que a ausência de fotobranqueamento demonstra que os compostos em questão não terão redução na capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio por este fator.



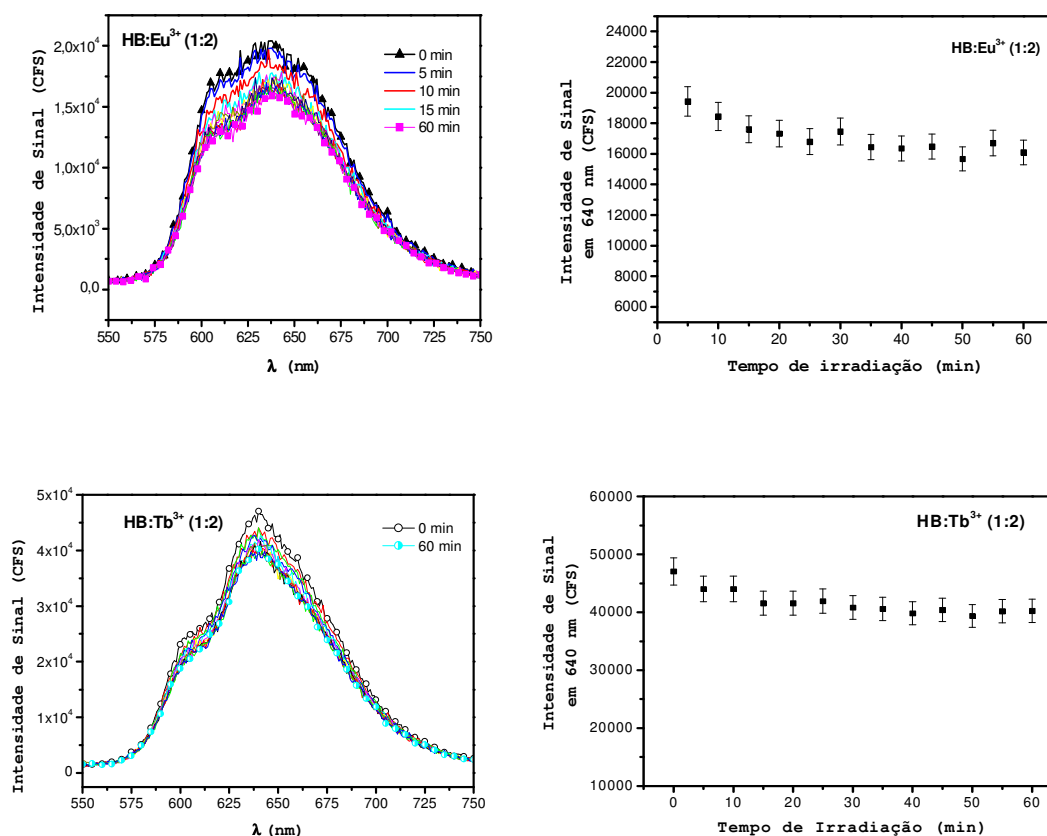


Figura 33. Análise do fotobranqueamento da HB e seus complexos com Ln^{3+} , todos com $[\text{HB}] = 10 \mu\text{M}$, sob excitação com laser de Nd:YAG ($\lambda = 532 \text{ nm}$) de intensidade 142 mW/cm^2 .

Analisando-se o comportamento das amostras em condição de excitação em 532 nm com intensidade de 400 mW/cm^2 , obtêm-se os espectros mostrados na **Figura 34**. Novamente não se observa decréscimo muito acentuado nas intensidades de sinal obtidas para os quatro fotossensibilizadores estudados, mesmo empregando-se uma fonte de radiação com intensidade cerca de 3 vezes maior que no primeiro caso. Portanto, comprova-se a baixa tendência ao fotobranqueamento das soluções estudadas neste trabalho sob as condições adotadas (comprimento de onda de 532 nm e intensidade de 400 mW/cm^2), o que vem a acrescentar à sua potencialidade enquanto fotossensibilizadores.

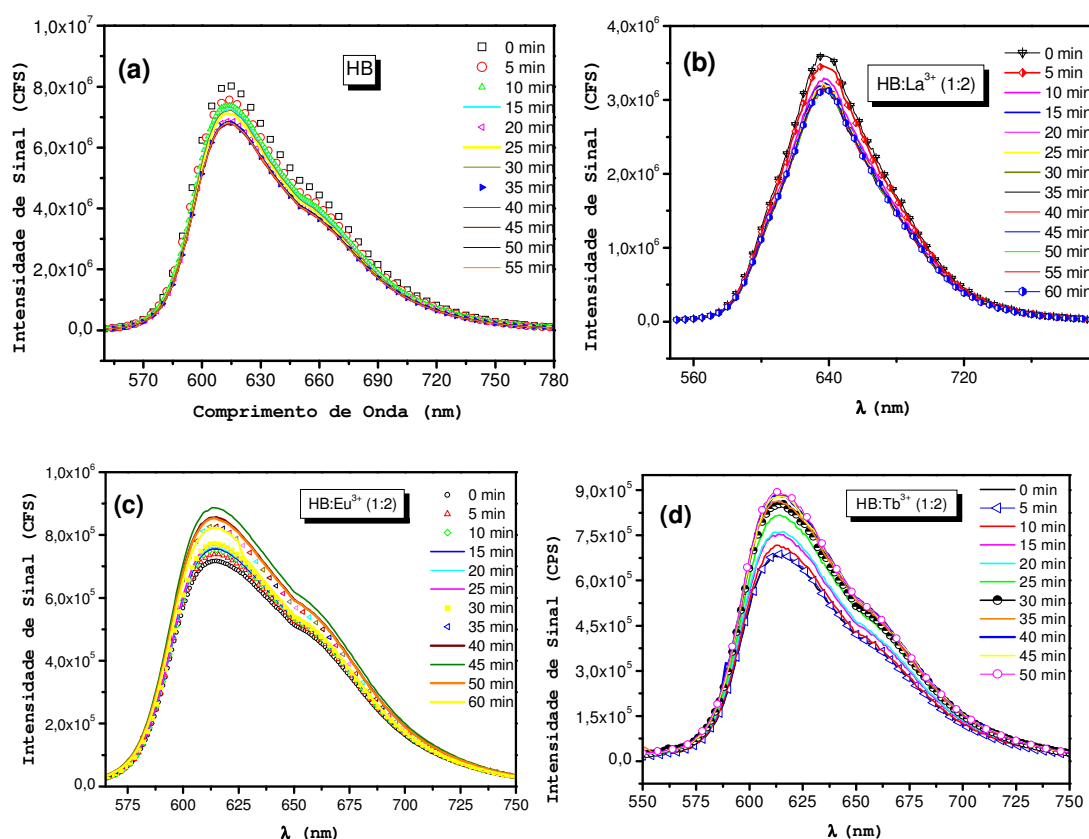


Figura 34. Análise do fotobranqueamento da HB e seus complexos com Ln^{3+} , todos com $[\text{HB}] = 10 \mu\text{M}$, sob excitação com laser de Nd:YAG ($\lambda = 532 \text{ nm}$) de intensidade 400 mW/cm^2 .

5.1.7. Medidas de Absorção no Infravermelho

A fim de se identificarem mais indícios da efetiva formação de complexos de hipocrelina B (HB) com íons metálicos, foi empregada a técnica de espectroscopia de absorção no infravermelho (IR). Radiação com tal comprimento de onda é capaz de excitar níveis energéticos correspondentes às vibrações dos átomos que formam uma ligação química; assim, quaisquer alterações nas ligações químicas presentes na molécula de HB após a adição de íons lantanídeos podem ser identificadas comparando-se espectros de absorção no IR da HB pura em etanol e de seus complexos.

Na **Figura 35** encontram-se os referidos espectros, que estão mascarados pela fortíssima absorção do etanol (o solvente empregado), da água e de outras moléculas orgânicas (presentes no meio) na região de comprimentos de onda estudada. Porém, tal fato não compromete as observações a serem feitas, uma vez que as mesmas são comparativas entre as quatro amostras.

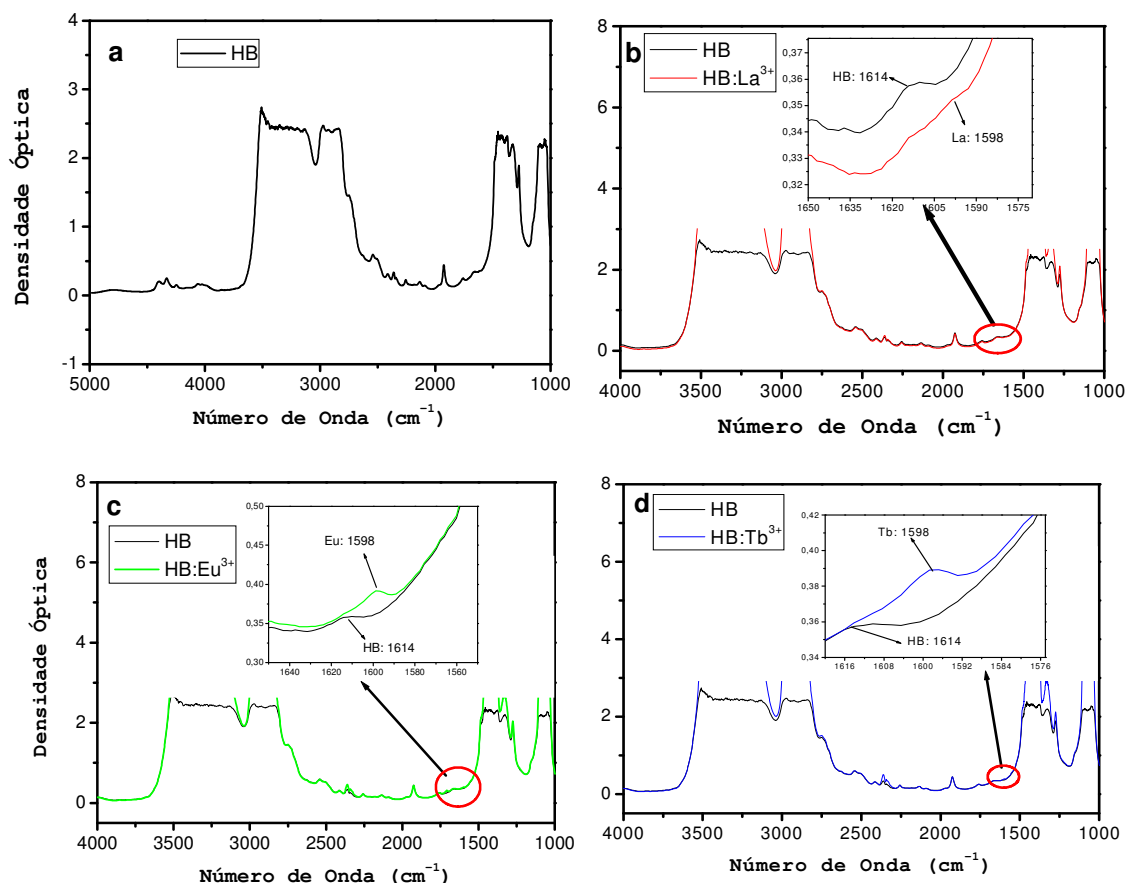


Figura 35. Espectros de absorção no infravermelho das amostras de: (a) HB. (b) HB:La³⁺, (c) HB:Eu³⁺ e (d) HB:Tb³⁺. Nos detalhes estão evidenciados os comprimentos de onda discordantes entre a HB pura e seus complexos.

Os espectros de absorção no infravermelho revelaram indícios de mudanças nos tipos de ligações presentes na HB após a formação dos complexos. Observa-se deslocamento do pico de absorção da HB em 1614 cm⁻¹, característico desta molécula, para 1598 cm⁻¹, pico correspondente à coordenação do oxigênio da carbonila com o íon metálico^{76,77}. Identifica-se, por conseguinte, um sítio de ligação do íon lantanídeo na molécula de HB.

As observações provenientes do estudo de pH colaboram para a identificação dos demais sítios de ligação. Ma et. al.⁷⁵ realizaram estudo semelhante e afirmaram que como o aumento do caráter básico da solução é capaz de remover o hidrogênio da hidroxila do anel fenólico, e como a formação de complexos trouxe um efeito semelhante no espectro de absorção (deslocamento para a região de maiores comprimentos de onda), acredita-se que a formação de complexos também remova este mesmo átomo de hidrogênio da molécula de HB. Logo, este seria outro ponto em que o íon lantanídeo se liga à molécula.

Com base nestes resultados e nos espectros de absorção óptica, propõe-se um modelo para a estrutura dos complexos HB:Ln³⁺, semelhante aos encontrados na

literatura^{68,75,77} para complexos $\text{HA}:\text{La}^{3+}$ e $\text{HB}:\text{Al}^{3+}$, em que dois íons metálicos se ligam aos átomos de oxigênio do anel fenólico e do grupo carbonila da molécula de HB. A ligação entre estes dois íons pode ser feita por íons Cl^- do meio (provenientes dos cloretos de lantanídeos utilizados para a formação dos complexos), como mostrado na **Figura 36**. Forma-se, assim, uma estrutura oligomérica.

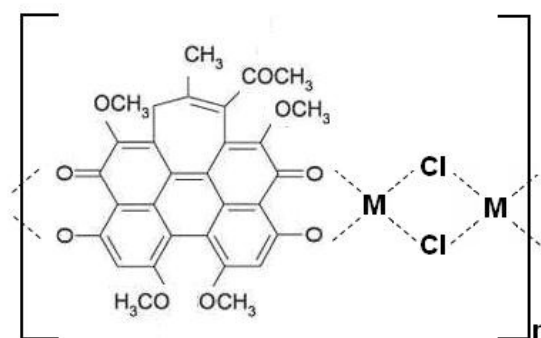


Figura 36. Possível estrutura para os complexos $\text{HB}:\text{Ln}^{3+}$, em que M corresponde ao íon lantanídeo.

5.1.8. Estimativa do Rendimento Quântico de Geração de Oxigênio Singlete Φ_{Δ} pelo Método Espectroscópico Direto: Luminescência em 1270 nm

A emissão da HB e de seus complexos $\text{HB}:\text{Ln}^{3+}$ (1:1) em 1270 nm foi verificada com o intuito de se determinar a capacidade de geração de oxigênio singleto de cada solução. Afinal, o oxigênio singleto ($^1\Delta_g$) perde energia sob a forma de radiação eletromagnética durante sua transição para seu estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$), como mostrado na equação (23).

O valor do rendimento quântico de geração de oxigênio singleto da amostra de HB foi adotado como sendo igual à unidade, de forma a servir como padrão para os cálculos dos valores de Φ_{Δ} de seus complexos. É deveras importante que todas as amostras comparadas estejam diluídas no mesmo solvente pelo fato de a eficiência de luminescência do oxigênio singleto, η_L , poder variar entre solventes diferentes. Como é buscado o valor de Φ_{Δ} pela intensidade de emissão do oxigênio singleto em 1270 nm, I , e como tal intensidade pode sofrer variações não apenas por uma maior ou menor presença de $^1\Delta_g$, mas também por influência da eventual supressão desta luminescência em algum solvente específico – ou seja, como

$$I \propto [^1\text{O}_2] \cdot \eta_L \quad (44)$$

sendo $[^1\text{O}_2]$ a concentração do oxigênio singleto e η_L a eficiência de luminescência do mesmo –, temos que, fixando-se o solvente, η_L torna-se constante e então

$$I \propto [^1\text{O}_2] \quad (45)$$

o que comprova ser possível estimar-se Φ_Δ pelo valor de I .

Portanto, há uma simples relação entre a intensidade de emissão I e Φ_Δ :

$$\frac{I_S}{I_P} = \frac{\Phi_\Delta^S}{\Phi_\Delta^P}$$

$$\frac{\frac{I_S}{A_S}}{\frac{I_P}{A_P}} = \frac{\Phi_\Delta^S}{\Phi_\Delta^P}$$

$$\Phi_\Delta^S = \frac{I_S}{I_P} \cdot \frac{A_R}{A_S} \cdot \Phi_\Delta^R \quad (46)$$

onde I é a intensidade de sinal em 1270 nm, A , a absorvância em 532 nm e os índices S e R representam, respectivamente, amostra e referência. Isso significa que os valores de Φ_Δ foram calculados ponderando-se os sinais de luminescência pelas absorvâncias das amostras no comprimento de onda de excitação.

Na **Figura 37** encontram-se os espectros de luminescência na região do infravermelho dos fotossensibilizadores estudados.

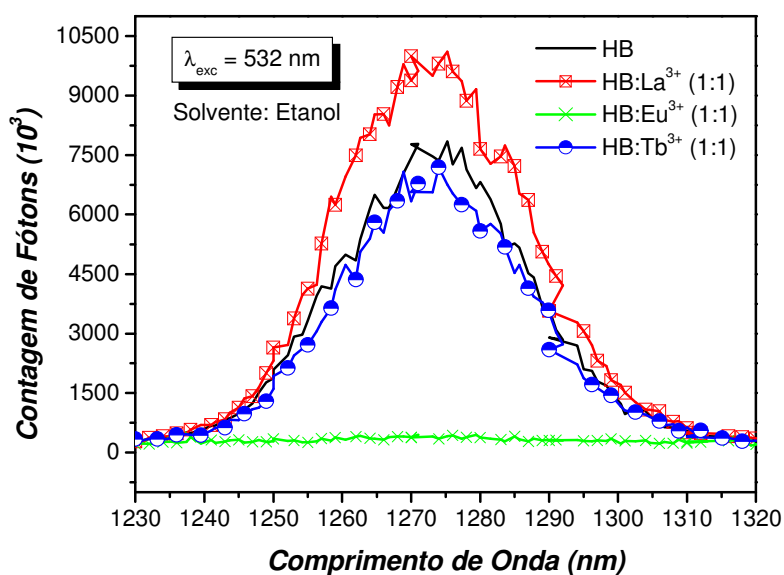


Figura 37. Espectros de emissão das amostras de HB e seus complexos na razão molar 1:1 na região de luminescência do oxigênio singleto (1270 nm), sob excitação em 532 nm, ponderados pelas respectivas absorvâncias neste mesmo comprimento de onda.

A partir destes espectros e da equação (46) podem-se calcular os valores de Φ_{Δ} para as amostras. Tais valores encontram-se na **Tabela 9**.

Tabela 9. Valores calculados para os rendimentos quânticos de geração de oxigênio singlete Φ_{Δ} .

	HB	HB:La ³⁺	HB:Eu ³⁺	HB:Tb ³⁺
Φ_{Δ}	1	1,32	0,06	0,89

Analisando-se os dados acima, comprova-se a potencialidade do complexo HB:La³⁺, dado que este foi o único que aumentou o sinal característico do oxigênio singlete em relação à HB (aumento de 32%). Os demais complexos diminuiram o valor de tal parâmetro, de maneira menos (Tb³⁺) ou mais (Eu³⁺) significativa.

5.1.9. Estimativa da Taxa de Produção de Oxigênio Singlete pelo Método Indireto: Degradação Secundária do RNO

As amostras de HB e de HB:La³⁺ (1:2) tiveram suas capacidades de geração de oxigênio singlete testadas pelo método químico da fotodegradação do **RNO**. Como comentado em 4.2.9, a presença de ¹Δ_g em uma solução pode ser verificada diretamente através de sua luminescência em torno de 1270 nm. Todavia, a captação de tal emissão requer aparatos experimentais extremamente sensíveis, dado que esta emissão é relativamente fraca e que o tempo de vida do oxigênio singlete é curto, o que acaba por tornar o método oneroso.

Uma alternativa para a detecção de ¹Δ_g é a utilização de um método indireto, isto é, em que é mensurada uma outra propriedade que por sua vez se relaciona com a formação do mesmo. Um método bem fundamentado na literatura¹¹³⁻¹¹⁵ trata da supressão de forma secundária da substância denominada p-nitrosodimetilanilina, ou simplesmente **RNO**, pela ação de ¹Δ_g. O ¹Δ_g não reage quimicamente com o **RNO**; ele é capturado por um outro composto também adicionado ao sistema, a L-histidina (**L-H**), um substrato da família dos imidazóis (compostos orgânicos aromáticos de fórmula geral HC₃H₃N₂), e como subproduto é formado um composto oxidado. Este subproduto, por sua vez, é responsável por reagir com o **RNO**, induzindo assim sua degradação, como mostrado nas equações a seguir:





onde **A** é o substrato (no caso, a **L-H**) e **-RNO** representa o **RNO** degradado.

A presença do substrato é fundamental para que ocorra a degradação do **RNO**, ou seja, quando da ausência de **L-H** não há perda mensurável de **RNO**, o que mostra que nem o fotossensibilizador nem o $^1\Delta_g$ ou outra espécie reativa de oxigênio formada é capaz de interagir quimicamente com o **RNO** e corrobora o fato de o intermediário secundário **AO₂** atuar diretamente na degradação do **RNO**.

Foi empregado LED de comprimento de onda de 460 nm e potência de 430 mW para a excitação (uniforme) das amostras, e a intervalos regulares de 20 segundos a absorbância em 440 nm era monitorada. Ao fotossensibilizador, inicialmente diluído em etanol a 1 mM, foi acrescentada água destilada até que se alcançasse a concentração de 5 μM . O sistema fotossensibilizador 5 μM + **L-H** 15 mM + **RNO** 13,3 μM foi acondicionado em um tubo de ensaio para a irradiação e a tomada dos espectros de absorção. Na **Figura 38** encontram-se as variações de absorbância em 440 nm ($\Delta\text{D.O.}$) em função do tempo de irradiação. As medidas foram feitas em triplicata, e os dados apresentados referem-se às médias aritméticas dos valores obtidos.

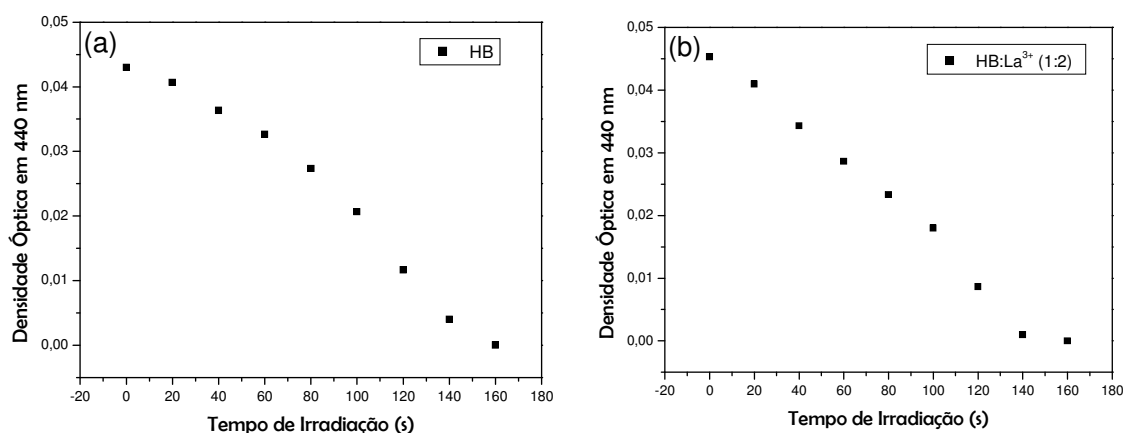


Figura 38. Absorção em 440 nm em função do tempo de irradiação com LED (460 nm) de 430 mW para (a) HB e (b) HB:La³⁺ (1:2).

Como se percebe da análise da figura acima, o composto **RNO** foi totalmente degradado nos dois casos com até 160 segundos de irradiação. Pode-se, portanto, afirmar que oxigênio singlete é produzido tanto por HB quanto por HB:La³⁺ (1:2).

Além disso, verifica-se que a degradação do **RNO** segue dinâmica de primeiro grau, ou seja, a diminuição na densidade óptica em 440 nm é linear com o tempo de irradiação, mostrando assim a inexistência de um intervalo de tempo mínimo necessário para que se dê início ao processo de formação de oxigênio singlete e desencadeiem-se as reações posteriores (o que era de se esperar, pela natureza quântica desta interação).

Através do ajuste linear dos pontos obtidos nos gráficos da **Figura 38**, puderam-se determinar os valores dos coeficientes angulares das retas que representam a dinâmica de degradação do **RNO**, como mostrado na **Figura 39**.

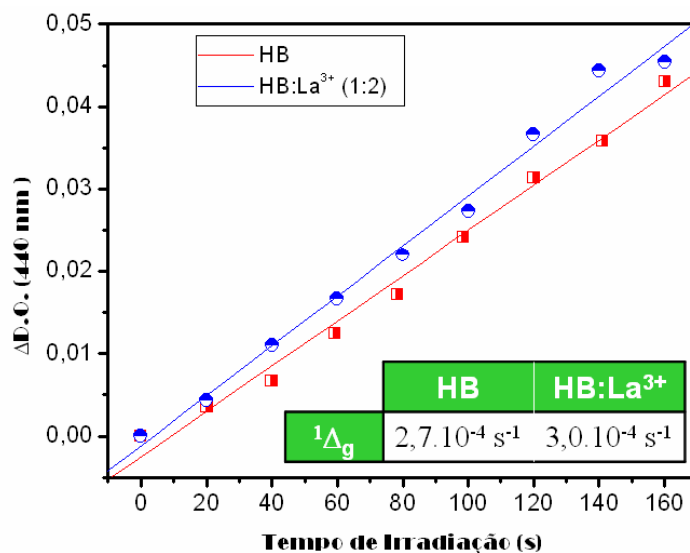


Figura 39. Confronto entre a capacidade de geração de oxigênio singlete (representada pela inclinação da reta do gráfico $\Delta D.O.$ vs. tempo de irradiação) de HB e de seu complexo com lantânio em razão molar 1:2.

No gráfico acima, $\Delta D.O.$ representa a variação na densidade óptica entre o tempo de irradiação 0 e o tempo de t segundos de irradiação. Para a HB, obteve-se o valor de $2,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; para HB:La³⁺ (1:2), $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Como o coeficiente angular obtido para o comportamento do complexo é maior que o da HB, comprova-se que HB:La³⁺ (1:2) tem ligeira superioridade quando comparado ao seu precursor também em relação à capacidade de geração de oxigênio singlete. Por conseqüência, espera-se que o complexo apresente melhores efeitos fotodinâmicos quando aplicado em testes de PDT *in vitro*. Além disso, este resultado era de se esperar, dado que não se observa diferença muito grande entre as densidades ópticas da HB e de seu complexo na região de comprimentos de onda utilizada para a excitação. Uma maior diferença entre as inclinações das retas da **Figura 39** seria esperada ao se efetuar a irradiação com luz vermelha, que a HB absorve com uma eficiência muito menor que o seu complexo.

5.2. SEGUNDA ETAPA: TESTES *IN VITRO* EM CULTURA DE CÉLULAS

Para os testes em cultura de *Candida albicans*, apenas os fotossensibilizadores HB e HB:La³⁺ (1:2) em etanol foram utilizados, visto que este último destacou-se em suas propriedades fotodinâmicas, apresentando grande *red-shift* e elevada capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio. Portanto, torna-se interessante compará-lo em

PDT in vitro com seu precursor, a HB. Ambos os fotossensibilizadores foram diluídos em PBS (solução salina tamponada) a partir da concentração de 1 mM até atingirem a concentração empregada no estudo, de 10 μ M.

5.2.1. Influência da concentração do fotossensibilizador no efeito fotodinâmico

A influência da concentração do fotossensibilizador HB:La³⁺ (1:2) foi estudada na PDT antimicrobiana, a fim de se determinar a menor concentração que proporciona efeito fotodinâmico. Para tanto, foi realizado ensaio com tempo de pré-irradiação de 5 minutos e com excitação por LED em 460 nm com intensidade de 333 mW/cm²; o tempo de irradiação empregado foi de 10 segundos e as concentrações de fotossensibilizador, 0,5; 1; 5 e 10 μ M.

Nota-se que houve efeito fotodinâmico apenas para a concentração de 10 μ M de fotossensibilizador, já que para concentrações de 0,5 a 5 μ M não se observa diferença significativa entre o grupo L-FS+ (grupo zero ou fotossensibilizador, em que se verifica a toxicidade do corante quando da ausência de luz) e os grupos L+FS+ (grupos PDT, em que se dá o tratamento propriamente dito). Além disso, também é possível verificar que com apenas 10 segundos de terapia ocorre redução de 3 logs, o que atesta a potencialidade do fotossensibilizador elaborado.

Obtiveram-se, então, os seguintes resultados referentes à redução da *Candida albicans*:

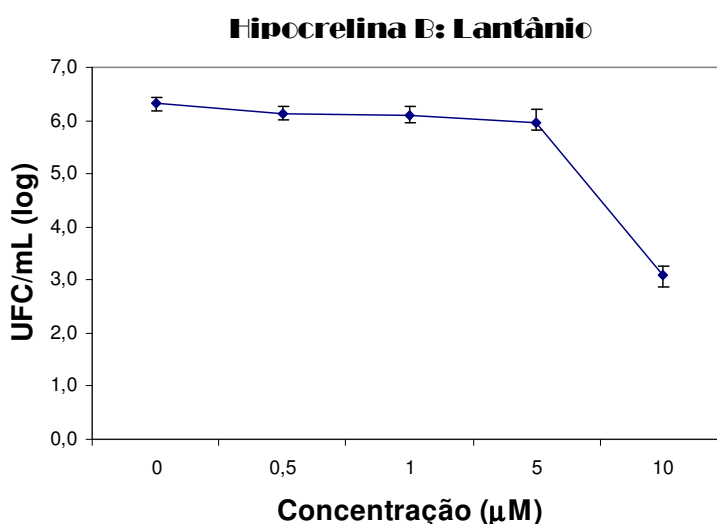


Figura 40. Efeito da concentração do fotossensibilizador na inativação da *Candida albicans* por PDT com HB:La³⁺ (1:2). Identifica-se efeito apenas com concentração de fotossensibilizador de 10 μ M.

5.2.2. Efeito fotodinâmico antimicrobiano

Realizou-se ensaio com a amostra de HB:La³⁺ (1:2) a 10 µM excitada em 460 nm com LED de 440 mW de potência e em 660 nm com laser de 100 mW de potência, adotando-se tempo de pré-irradiação de 5 minutos. Esta diferença entre as potências não representa um empecilho à interpretação dos resultados, dado que a intensidade de 333 mW/cm² foi empregada para ambos os comprimentos de onda.

Os grupos estudados foram L-FS- (grupo controle, suspensão de células sem ação de luz ou fotossensibilizador), L-FS+ (suspensão de células + fotossensibilizador, sem exposição à luz), L+FS+ (PDT com irradiação por 3 minutos) e grupo L+FS+ (PDT com irradiação por 6 minutos), todos realizados em triplicata.

Da análise dos dados, conclui-se que o fotossensibilizador HB:La³⁺ (1:2) a 10µM com cinco minutos de contato com as células não apresenta toxicidade quando da ausência de luz, uma vez que os grupos controle não mostraram diferenças significativas entre o número de células viáveis em comparação com o grupo corado, porém sem irradiação. Para excitação do fotossensibilizador com o LED em 460 nm, em apenas 30 segundos de terapia foi observado efeito fotodinâmico letal a todas as células da suspensão (**Figura 41**). Para os grupos tratados com laser em 660 nm, tal efeito fotodinâmico deu-se no intervalo de tempo de seis minutos (**Figura 42**). Esta diferença era esperada, uma vez que a absorção do fotossensibilizador é muito maior no azul que na região do vermelho.

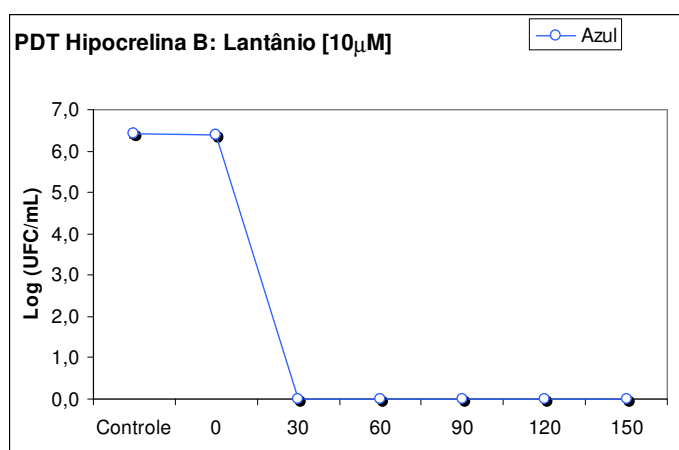


Figura 41. Representação do comportamento da fração sobrevivente de *Candida albicans*. PDT por intervalo de tempo de apenas 30 segundos já foi suficiente para que houvesse esterilização.

A título de comparação, a PDT com azul de metileno a 100 µM (concentração 10 vezes superior à utilizada neste estudo) com intensidade de excitação de 300 mW/cm² (aproximadamente a mesma que a utilizada neste trabalho) apresenta efeito fotodinâmico

ótimo sobre *C. albicans* com 9 minutos de irradiação (ou seja, o tempo necessário para que ocorra o mesmo efeito fotodinâmico que o observado neste trabalho é 18 vezes maior)³⁶. Desta maneira, identifica-se grande potencial de uso de HB:La³⁺ (1:2) como agente fotossensibilizador em PDT antimicrobiana.

Por fim, para que fosse possível traçar um paralelo entre o complexo HB:La³⁺ (1:2) e seu precursor, a HB foi também testada em PDT contra o mesmo microorganismos e sob as mesmas condições. Esta análise comparativa representa o último e mais importante método para identificação de melhorias nas propriedades fotodinâmicas de HB advindas da formação do complexo com íons de lantânio.

Para irradiação com o LED em 460 nm, o efeito da HB assemelhou-se muito ao de seu complexo com lantânio; já para a excitação com o laser em 660 nm, o efeito obtido foi bem menos pronunciado, como mostrado na **Figura 42**.

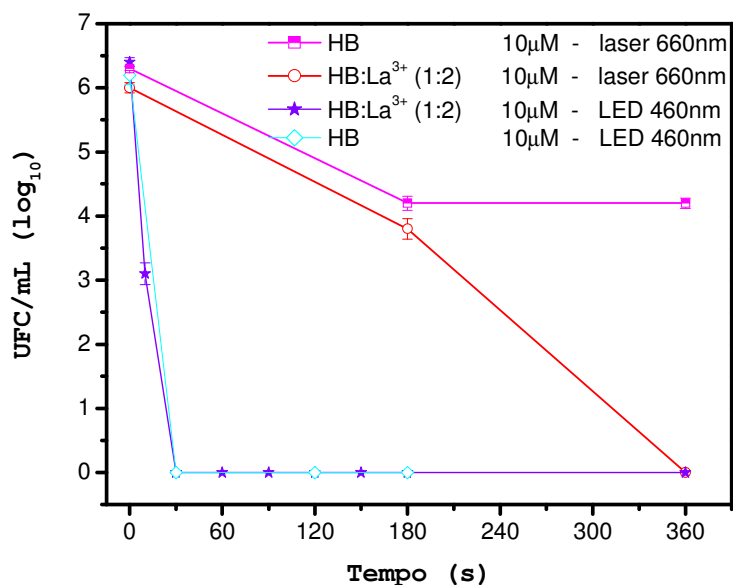


Figura 42. Gráfico comparativo do comportamento das frações sobreviventes de *C. albicans* para PDT realizada com HB:La³⁺ a 10 µM e com HB a 10 µM ($\lambda = 660 \text{ nm}$ e $\lambda = 470 \text{ nm}$).

A HB a 10 µM, assim como seu complexo com lantânio, não apresentou citotoxicidade na ausência de luz quando em contato com as células por 5 minutos, dado que não se percebeu diferença significativa entre os grupos controle (células sem fotossensibilizador e sem luz) e zero (células com fotossensibilizador na ausência de luz). Com apenas 30 segundos de irradiação com LED azul ($\lambda = 460 \text{ nm}$), nota-se total redução microbiana.

Comparando-se a HB e de seu complexo com lantânio, equivocadamente se poderia afirmar que o complexo não acarreta nenhuma vantagem que compense seu uso, uma vez que seus efeitos fotodinâmicos para excitação no azul foram semelhantes.

Porém, não se deve esquecer que a formação do complexo induziu um deslocamento significativo do comprimento de onda máximo de absorção do precursor para a região da janela terapêutica, ampliando a gama de fontes de excitação que podem ser utilizadas, como mostrado na **Figura 42**, em que se observa que PDT com HB com excitação em 660 nm não induziu um efeito citotóxico muito pronunciado. Além disso, nesse comprimento de onda (660 nm), é possível o tratamento de infecções/lesões de maior profundidade, o que mais uma vez mostra a superioridade do complexo elaborado.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram estudadas as propriedades ópticas do fotossensibilizador hipocrelina B (HB). Buscou-se melhorar tais propriedades, visando aplicações em terapia fotodinâmica (PDT), através da formação de complexos com os íons lantanídeos (Ln^{3+}) lantânio (La^{3+}), európio (Eu^{3+}) e térbio (Tb^{3+}). Espectroscopia óptica foi utilizada como meio de investigação do comportamento de tais complexos em uma primeira etapa do trabalho.

De uma forma geral, na primeira etapa do trabalho identificou-se que os complexos foram efetivamente formados, conforme evidenciado por mudanças em comprimentos de onda de absorção (mudança na coloração das soluções) e de emissão. De forma mais específica, pode-se dizer que os três complexos estudados formam-se seguindo a razão de 1 mol de HB para 2 mols de Ln^{3+} ; afinal, para tais proporções molares percebeu-se um maior deslocamento da banda de absorção da HB para comprimentos de onda maiores que 600 nm. O pico de absorção máximo deu-se em torno de 614 nm (*red-shift* de 25 nm), e um aumento na absorbância muito significativo foi notado nesta região de comprimentos de onda. Verificou-se também que a HB apresenta um aumento significativo na absorbância em comprimentos de onda superiores a 600 nm conforme se aumenta o caráter básico da solução; entre os valores de pH ácidos estudados, não se notaram alterações no espectro de absorção da HB. Já seu complexo com lantânio se mostrou instável em pH básico, vindo a sofrer precipitação. Porém, como a degradação do fotossensibilizador pela ação da luz se torna muito mais significativa para pH básico, é preciso que se ponderem os prós (alta absorção de 600 até aproximadamente 670 nm) e contras (baixa resistência ao fotobranqueamento) de cada alteração na molécula de HB (pH básico ou formação de complexos com lantanídeos), de acordo com cada aplicação. Além disso, como a alteração de pH trouxe modificações no espectro de absorção da HB semelhantes àquelas provocadas pela formação de complexos com lantanídeos (deslocamento dos picos de absorção para a região de maiores comprimentos de onda), supõe-se que ambas as modificações acarretem alterações semelhantes na estrutura molecular da HB. Sabe-se que o aumento do caráter básico da solução abstrai o hidrogênio ligado ao oxigênio do anel fenólico; portanto, este é um possível sítio de ligação dos lantanídeos na molécula de HB. Medidas de espectroscopia de absorção no infravermelho revelaram haver deslocamento do pico de absorção em 1610 cm^{-1} , característico da HB, para 1598 cm^{-1} , frequência esta que representa a energia da ligação do oxigênio da carbonila com um íon metálico, quando da formação dos complexos. Com base em todos estes resultados, foi proposto um

modelo para a estrutura molecular dos complexos HB:Ln³⁺, em que dois íons lantanídeos associam-se cada um a um par de átomos de oxigênio (provenientes do grupo carbonila e do anel fenólico). A ligação entre cada par de íons lantanídeos, que dá o caráter oligomérico ao complexo, é feita por algum ânion do meio, como por exemplo o íon Cl⁻ proveniente do cloreto de lantanídeo empregado. Desta forma, é criada uma espécie de “cadeia” que une as diversas moléculas de HB na solução por intermédio dos íons lantanídeos, formando o complexo em questão. Os picos de emissão da molécula de HB e de seus complexos também foram determinados e notou-se diminuição na luminescência da molécula após a formação dos complexos, o que pode ser um indicativo de que a formação de complexos favorece outras rotas de perda de energia proveniente da radiação, em detrimento à luminescência. Este fato pode levar a um maior rendimento de estado tripleto excitado da molécula do fotossensibilizador e, conseqüentemente, a um melhor efeito fotodinâmico. Os níveis de energia dos primeiros estados excitados singleto e tripleto foram calculados com base nos espectros de absorção e de emissão, e para todos os fotossensibilizadores encontrou-se para o estado excitado de menor energia um valor superior a 0,98 eV, a quantidade de energia necessária para se levar a molécula de oxigênio de seu estado fundamental (um estado tripleto) ao seu estado excitado (um estado singleto, altamente reativo e, portanto, muito visado em PDT). As constantes de dimerização, tanto da HB como de seus complexos, foram calculadas através do modelo proposto por Margalit, e notou-se que tais constantes para os complexos de lantânio, európio e térbio ($3,6 \cdot 10^5$, $2,1 \cdot 10^5$ e $1,0 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$) apresentaram valores com uma ordem de grandeza maior que para a HB ($4,7 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), o que corrobora a estrutura oligomérica proposta para os mesmos. O fenômeno de degradação dos corantes por incidência de radiação foi testado por intermédio de lasers de Nd:YAG com intensidades de 142 mW/cm^2 e 400 mW/cm^2 , e após uma hora de irradiação não se notou alteração significativa no comportamento óptico dos mesmos, atestando assim a estabilidade da molécula e dos complexos formados. Foi verificada também melhora na capacidade de geração de oxigênio singleto da HB pela formação de complexos com íons de lantânio, através do método direto de detecção da luminescência do $^1\Delta_g$ em 1270 nm (aumento de 32% para a HB:La³⁺ (1:1) em relação à HB), bem como através do método químico de degradação do RNO ($2,7 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para a HB e $3,0 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para HB:La³⁺ (1:2)). Analisando-se todas estas propriedades ópticas, elegeu-se o complexo HB:La³⁺ (1:2) como o melhor dentre os fotossensibilizadores investigados, pelo aumento significativo da absorbância em comprimentos de onda maiores que 600 nm e pela grande capacidade de gerar oxigênio singleto.

Em uma segunda etapa do trabalho, buscou-se verificar a correspondência entre as propriedades ópticas dos fotossensibilizadores HB e HB:La³⁺ (1:2) e sua ação

em testes de PDT antimicrobiana *in vitro* com cultura de células do fungo *Candida albicans*. A influência da concentração do fotossensibilizador HB:La³⁺ (1:2) foi estudada na PDT antimicrobiana, a fim de se determinar a menor concentração que propicia efeito fotodinâmico. Houve redução microbiana apenas para a concentração de 10 µM de fotossensibilizador, já que para concentrações de 0,5 a 5 µM não se observa diferença significativa entre o grupo fotossensibilizador e os grupos PDT. Ambos os fotossensibilizadores, HB e HB:La³⁺ (1:2), quando em concentração de 10 µM e em contato com as células por 5 minutos antes da irradiação, atendem ao requisito básico de um fotossensibilizador de não apresentarem qualquer citotoxicidade na ausência de luz. Somado a isso, apresentaram efeito fotodinâmico ideal (total esterilização) com apenas 30 segundos de tratamento quando excitados com LED azul ($\lambda = 460$ nm) de 430 mW de potência e 333 mW/cm² de intensidade, um efeito excelente e extremamente rápido, quando em comparação com outros fotossensibilizadores. Para HB:La³⁺ (1:2), PDT empregando laser de comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW e intensidade de 333 mW/cm² apresentou efeito fotodinâmico ideal após um intervalo de irradiação de 6 minutos (tempo maior que para excitação no azul, o que era esperado, já que a densidade óptica no azul é muito mais significativa que no vermelho). Já para a HB não se observou efeito tão significativo quando sob excitação em 660 nm. Como a banda de absorção do complexo HB:La³⁺ (1:2) cobre toda a região de comprimentos de onda visíveis, pode-se empregar ampla variedade de fontes de excitação, o que amplia sua margem de utilização. Além disso, em comparação com seu precursor, tem-se a vantagem da possibilidade de tratamento de infecções mais profundas, pela possibilidade do uso de excitação em comprimento de onda transparente aos tecidos biológicos (superior a 600 nm), o que não é permitido à HB. O complexo de lantânio da HB mostrou-se superior em relação ao seu precursor, tanto espectroscopicamente (presença de comprimentos de onda de absorção no vermelho e aumento na eficiência quântica de geração de oxigênio singleto) quanto na prática.

Em suma, este trabalho possibilitou o desenvolvimento de um novo fotossensibilizador, HB:La³⁺ (1:2), que apresenta picos de absorção em 485, 574 e 614 nm – o que se traduz em um *red-shift* de 25 nm em relação ao seu precursor, ampliando, por conseguinte, a gama de fontes de radiação passíveis de serem empregadas no tratamento por PDT e possibilitando o tratamento de lesões mais profundas –, bem como elevada capacidade de geração de oxigênio singleto, o que, como comprovado pelos testes *in vitro*, faz deste um eficiente agente fotossensibilizador.

7. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos Completos Publicados em Periódicos

- TOFFOLI, D.J., GOMES, L., VIEIRA JR., N.D., COURROL, L.C. Photodynamic potentiality of hypocrellin B and its lanthanide complexes. *Journal of Optics. A, Pure and Applied Optics*, v. 10, p. 104026-104033, 2008.
- TOFFOLI, D.J., GOMES, L., VIEIRA JR., N.D., COURROL, L. C. Investigação do Comportamento Óptico de Complexos de Lantanídeos: Possíveis Aplicações Biomédicas. *Exacta (São Paulo)*, v. 5, p. 119-126, 2007.
- TOFFOLI, D.J., COURROL, L.C., TARELHO, L.V.G., GOMES, L., VIEIRA JR., N.D. Estudo das Propriedades Ópticas do Complexo Hipocrelina-Lantanídeos. *Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo*, v. 20, p. 12-15, 2006.
- TOFFOLI, D.J., COURROL, L.C., TARELHO, L.V.G., GOMES, L., VIEIRA JR., N.D. Estudo do Complexo Hipericina-Európio para Uso em Diagnóstico Clínico. *Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo*, v. 20, p. 32-34, 2006.

Trabalhos Completos Publicados em Anais de Congressos

- TOFFOLI, D.J.; GOMES, L.; VIEIRA JR., N.D.; COURROL, L.C. Photobleaching Process Investigation of the Second Generation Photosensitizer Hypocrellin B: Consequences in its Photodynamic Efficiency. Em: *XXXI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada*, 2008, Águas de Lindóia. Anais do XXXI ENFMC, 2008.
- TOFFOLI, D.J.; VIEIRA JR., N.D.; COURROL, L.C. Hypocrellin B, a perylenequinonoid pigment, and its complexes with lanthanide ions: optical characterization and enhancements in its photodynamic properties. Em: *International Conference on Luminescence and Optical Spectroscopy of Condensed Matter (ICL 08)*, 2008, Lyon. ICL 08, 2008.
- TOFFOLI, D.J.; GOMES, L.; VIEIRA JR., N.D.; COURROL, L.C. Enhancement on the Hypocrellin B Singlet Oxygen Generation Quantum Yield in the Presence of Rare Earth Ions. Em: *Iberoamerican Conference on Optics (RIO), Latinamerican meeting on Optics, Lasers and Applications (OPTILAS)*, 2007, Campinas. Anais do Iberoamerican Conference on Optics (RIO), Latinamerican meeting on Optics, Lasers and Applications (OPTILAS), 2007.

- TOFFOLI, D.J.; GOMES, L.; VIEIRA JR., N.D.; COURROL, L.C. Spectroscopic Characterization of Hypocrellin B:Lanthanide Complexes. Em: **XXX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada**, 2007, São Lourenço. Anais do XXX ENFMC, 2007.

Resumos Publicados em Anais de Congressos

- TOFFOLI, D.J.; GOMES, L.; COURROL, L.C. Determinação da Constante de Dimerização do Fotossensibilizador Hipocrelina B e sua Importância na Eficiência do Tratamento via Terapia Fotodinâmica. Em: **XXXI Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada**, 2008, Águas de Lindóia. Anais do XXXI ENFMC, 2008.
- TOFFOLI, D.J.; GOMES, L.; VIEIRA JR., N.D.; COURROL, L.C. Estudos Comparativos das Propriedades Ópticas dos Complexos de Hipocrelina A e Hipocrelina B com Íons de Lantânio e Verificação de sua Potencialidade para Uso em PDT. Em: **XXX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada**, 2007, São Lourenço. XXX Encontro Nacional de Física da Matéria Condensada, 2007.
- TOFFOLI, D.J.; RICOTTA, R.M. Sólitons: Soluções da Equação de Schrödinger não-linear e sua Propagação em Fibras Ópticas. Em: **13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP**, 2005, São Carlos. 13º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2005.
- TOFFOLI, D.J.; RICOTTA, R.M. Sólitons e sua Propagação em Fibras Ópticas. Em: **7º Simpósio de Iniciação Científica e Tecnológica**, 2005, São Paulo. Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo. São Paulo: Editado pela FATEC-SP, 2005. v. 19. p. 52-52.

Apêndices

APÊNDICE A

Estados Singlete e Triplete

Os termos singlete e triplete referem-se à multiplicidade de cada estado eletrônico. Por multiplicidade entende-se, de forma simples, o número total de configurações possíveis para os spins dos elétrons. Logo, multiplicidade singlete reflete que há apenas um modo de os spins se ajustarem de modo a se tornarem emparelhados (por emparelhado subentende-se spin total nulo), enquanto por multiplicidade triplete compreende-se que há três modos distintos de os spins dos elétrons se combinarem de modo desemparelhado (logo, três maneiras de o spin total não ser nulo). A figura a seguir auxilia na compreensão do explicado acima:

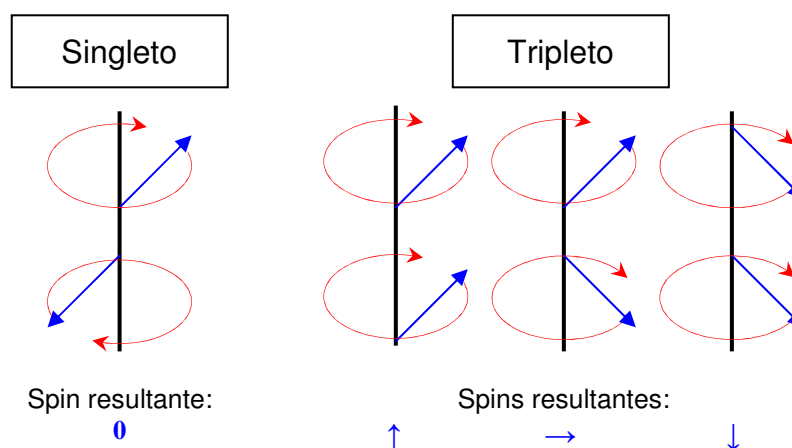


Figura A-1. Representação esquemática dos spins eletrônicos em configurações singlete e triplete.

Em outras palavras, pode-se dizer que o estado singlete representa uma configuração com spins antiparalelos (elétrons emparelhados, $[\uparrow\downarrow]$), e que o estado triplete representa configuração de spins paralelos (elétrons desemparelhados, $[\uparrow\uparrow]$).

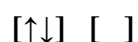
A multiplicidade M de um estado pode ser calculada por

$$M = 2S + 1$$

em que S corresponde à soma dos spins dos elétrons em questão. Para o primeiro caso representado na **Figura A-1**, um dos elétrons possui spin $s_1 = +\frac{1}{2}$, enquanto o outro, $s_2 = -\frac{1}{2}$ (dado que os spins são antiparalelos). Neste caso, $S = s_1 + s_2 = +\frac{1}{2} - \frac{1}{2} = 0$, resultando $M = 1$, que representa multiplicidade singlete. Para o caso de spins paralelos

(estado tripleto), teríamos $S = s_1 + s_2 = +\frac{1}{2} + \frac{1}{2} = 1$, trazendo $M = 2.1 + 1 = 3$, ou seja, multiplicidade tripleto.

É importante destacar que a energia de um determinado estado excitado singleto é maior que a energia do correspondente estado excitado tripleto. A origem deste fato é encontrada na chamada Regra de Hund, que diz que o arranjo mais estável dos elétrons em uma subcamada é aquele que contiver o maior número de spins paralelos. Isto é decorrência da tendência de busca por estados de menor energia. Afinal, na configuração singleto,



há forte repulsão entre os spins dos elétrons; já na configuração tripleto

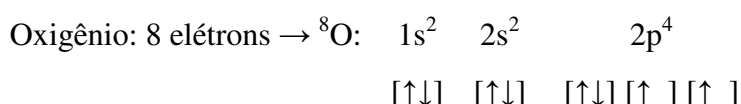


tem-se os elétrons mais afastados um do outro, acarretando menor repulsão e, por conseguinte, um estado de menor energia.

APÊNDICE B

Teoria do Orbital Molecular para a Molécula de Oxigênio

A Teoria da Ligação de Valência (TLV) não é capaz de explicar o comportamento da molécula de O₂. Afinal, pela distribuição dos elétrons de valência do átomo de oxigênio prevista pela referida teoria (Diagrama de Linus Pauling):



verifica-se que a ligação entre dois átomos de oxigênio resultaria em uma molécula com caráter singleto, uma vez que os elétrons desemparelhados de um dos átomos se uniriam aos elétrons correspondentes do outro átomo, extinguindo a presença de quaisquer elétrons desemparelhados.

Tal equívoco, à semelhança da impossibilidade de a TLV prever propriedades magnéticas de algumas moléculas (paramagnetismo), é oriundo da simplificação do comportamento dos orbitais intrínseco ao método de análise. Afinal, a TLV prevê que os elétrons de uma molécula ocupem orbitais referentes a átomos individuais, ou seja, esta teoria não considera a interação entre os diferentes átomos e sua ação conjunta sobre os elétrons. Esta é, de fato, uma aproximação grosseira, visto que os elétrons, após a ligação química, passam a pertencer à molécula como um todo e não a apenas um dos seus átomos.

A Teoria do Orbital Molecular (TOM) corrige tal aproximação, tratando os arranjos eletrônicos nas moléculas em termos de orbitais que envolvem a união dos orbitais atômicos, como será demonstrado a seguir para o caso específico da molécula de oxigênio.

Primeiramente, a TOM impõe que os orbitais atômicos devam ser combinados durante a ligação química, de modo a dar origem a orbitais moleculares característicos da molécula em questão. Portanto, o número de orbitais moleculares será correspondente ao número de orbitais atômicos combinados e, ao se juntar dois orbitais atômicos, obtêm-se dois orbitais moleculares, um de menor energia (denominado ligante) e outro de maior energia (antiligante) que os orbitais atômicos individualmente. Os orbitais ditos ligantes possuem alta densidade eletrônica entre os núcleos atômicos, sendo portanto estáveis, enquanto os antiligantes, por se caracterizarem por baixa densidade eletrônica entre os núcleos, apresentam elevadas forças de repulsão e são instáveis.

Após esta operação, os orbitais moleculares devem ser organizados em ordem crescente de energia, para que enfim os elétrons possam ser devidamente distribuídos entre eles. Tal distribuição segue as seguintes regras:

- cada orbital molecular pode conter no máximo dois elétrons;
- os elétrons se acomodam no orbital molecular de mais baixa energia;
- quando dois orbitais de mesma energia estão disponíveis para dois elétrons, cada um recebe um elétron, obtendo-se dois orbitais semi-preenchidos.

Aplicando-se a TOM para os 12 elétrons de valência da molécula de oxigênio (6 de cada átomo), tem-se que a união de dois orbitais **2s** origina dois orbitais tipo σ (orbital molecular associado a ligações em que a densidade eletrônica é maior no eixo internuclear), um ligante σ_{2s} e um antiligante σ_{2s}^* . Já a união dos seis orbitais atômicos **2p** resultaria em quatro orbitais moleculares tipo π (orbital molecular em que a densidade eletrônica está concentrada em lobos que não pertencem ao eixo internuclear) – sendo dois ligantes π_{2p} (referentes aos eixos y e z, dois eixos perpendiculares) e dois antiligantes π_{2p}^* – e dois orbitais moleculares tipo σ , sendo um ligante, σ_{2p}^* , e um antiligante, σ_{2p}^* . Logo, a molécula de oxigênio, de acordo com a TOM, apresentaria a seguinte distribuição eletrônica, em ordem energética:



Como se pode facilmente notar, tal distribuição eletrônica é capaz de explicar o fato de a molécula de oxigênio, em seu estado fundamental, possuir dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados π^* . Estes elétrons tendem a possuir o mesmo spin de forma a produzir multiplicidade máxima e, assim, um estado de mais baixa energia. Justifica-se, deste modo, o caráter tripleto do oxigênio em seu estado fundamental.

APÊNDICE C

Fundamentos de Espectroscopia Óptica e seus Arranjos Experimentais

Fundamentos

A espectroscopia de absorção está fundamentada na Lei de Beer-Lambert, que relaciona a intensidade de luz (e por conseguinte a quantidade de fótons) que atinge determinada amostra (I_0) e a intensidade luminosa transmitida (I_T). Tal relação é baseada na interação entre estes fótons que atingem o material e os átomos ou moléculas que constituem a amostra; caso haja ressonância entre a energia fornecida pelos fótons e os níveis de energia permitidos a estes átomos ou moléculas, dá-se a absorção.

Obviamente, tal relação é dependente da quantidade de espécies absorvedoras presentes na amostra, que está intimamente relacionada, por sua vez, com a espessura x da amostra e com sua concentração c . Logo, pode-se deduzir ser esta uma relação exponencial decrescente, que pode ser escrita na forma:

$$I_T = I_0 \cdot e^{-\alpha x c}$$

sendo α o coeficiente de absorção, parâmetro único para cada material.

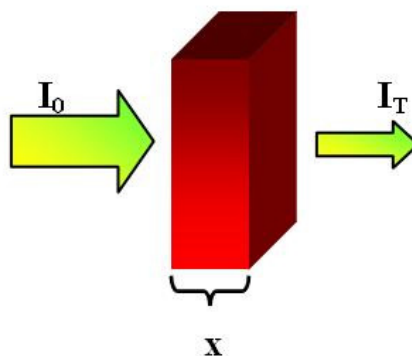


Figura C-1: Representação esquemática da Lei de Beer-Lambert.

Chama-se $\frac{I_T}{I_0}$ de transmitância, e ao logaritmo de $\frac{I_0}{I_T}$ de densidade óptica (D.O.).

Já a espectroscopia de luminescência, por sua vez, está baseada nos processos de decaimento radiativo (fluorescência, em que não há mudança na multiplicidade do sistema, ou fosforescência, em que tal mudança ocorre) que foram abordados no item 3.1.2. Para que seja possível analisar a emissão de uma amostra, deve-se excitá-la convenientemente, de forma que esta receba energia suficiente para atingir níveis de energia superiores e posteriormente decaia via emissão de fótons. Tal excitação portanto deve ser feita em um comprimento de onda em que a amostra possua grande densidade

óptica, uma vez que os picos de absorção representam transições com maior probabilidade de ocorrência. Vale ressaltar que a emissão sempre ocorrerá em comprimentos de onda superiores àquele de excitação (ao menos em casos em que se lida com efeitos não-lineares), visto que sempre se faz presente decaimento via fônons da rede e, conseqüentemente, a energia devolvida ao meio sob a forma de luz deve ser menor que aquela recebida, ou ao menos igual.

Aparato

Os equipamentos utilizados para a tomada de espectros – sejam eles de absorção ou de luminescência – são denominados genericamente espectrômetros. Porém, de forma mais criteriosa, denomina-se espectrofotômetro ao equipamento encarregado de tomar espectros de absorção, e de espectrofluorímetro aquele que mede espectros de fluorescência (termo que aqui se refere aos processos de luminescência de uma forma geral). Há duas categorias de espectrofluorímetros: aqueles que operam em condições fotoestacionárias (excitação constante) e aqueles em que a excitação é realizada de modo pulsado. No primeiro caso são obtidos os espectros de luminescência, enquanto que no segundo, os espectros resolvidos no tempo.

Os espectrômetros em geral possuem como elementos constituintes as fontes de radiação, os componentes ópticos, os obturadores mecânicos e os detectores de radiação. A diferença entre um espectrofotômetro e um espectrofluorímetro consiste no modo como estes elementos ópticos estão arranajados.

As fontes de radiação empregadas devem possuir intensidade aproximadamente constante em sua faixa de comprimentos de onda de operação, com pouco ruído e alta estabilidade, de forma a conferir confiabilidade e repetibilidade às medições. No entanto, tal fonte ideal não existe. Portanto, para cada aplicação se faz uso da fonte que possua tais características no intervalo de comprimentos de onda desejado. Comumente, nos instrumentos comerciais de absorção, empregam-se fontes de deutério para excitação na região do ultravioleta e de tungstênio para excitação na região do visível-infravermelho próximo. Em espectroscopia de emissão utilizam-se geralmente lâmpadas de xenônio ou de mercúrio. Como se pode verificar de seus espectros de emissão (**Figura C-2**), a lâmpada de xenônio oferece um maior número de comprimentos de onda para excitação, enquanto que a lâmpada de mercúrio oferece maior intensidade para excitação em comprimentos de onda bem determinados, dadas as linhas finas e com pequena largura à meia altura de seu espectro.

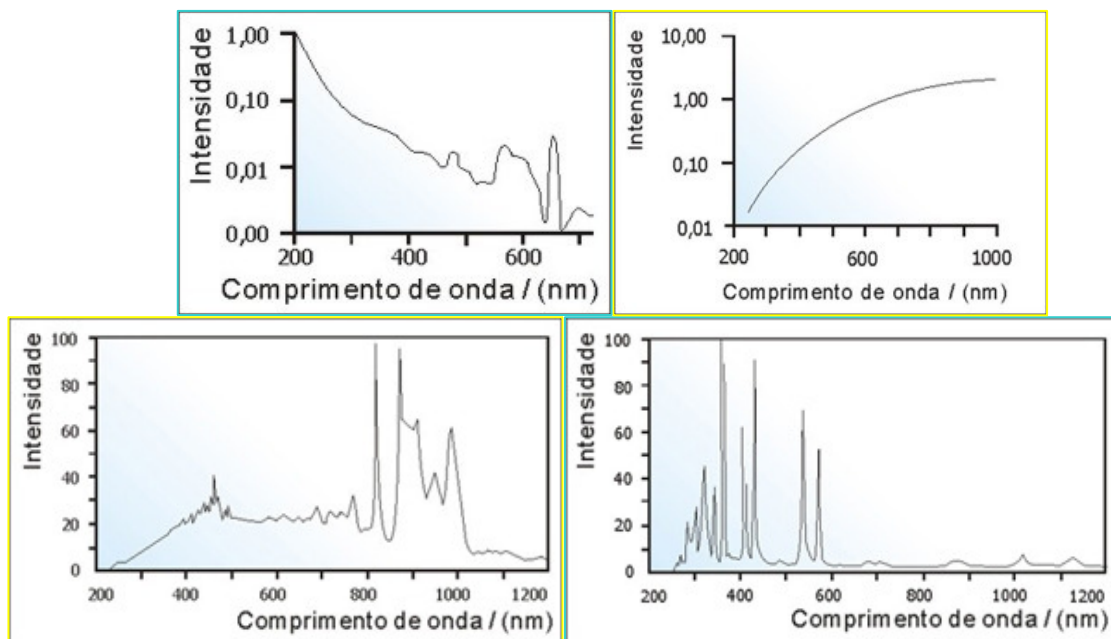


Figura C-2: Espectros de emissão das fontes de radiação comumente utilizadas em espectroscopia óptica – deutério, tungstênio, mercúrio e xenônio, em sentido horário a partir de cima e da esquerda.

Os componentes ópticos podem ser dispersivos ou interferométricos. Para trabalhos na região que se estende do ultravioleta ao infravermelho próximo – caso deste estudo –, utilizam-se apenas elementos dispersivos (grades de difração), que difratam a radiação eletromagnética com base na Lei de Bragg, assim permitindo a seleção do comprimento de onda apropriado para a medição.

As grades de difração são elementos ópticos que possuem uma série de ranhuras com espessuras comparáveis aos comprimentos de onda da luz incidente, e que portanto podem causar difração. Elas são empregadas no elemento denominado monocromador, que consiste em um componente óptico responsável pela seleção do comprimento de onda necessário à medição. A luz entra no monocromador pela fenda de entrada, atingindo em seguida um conjunto de espelhos que a guia até o elemento dispersivo. Por conseguinte, o feixe sofre difração e a seleção de um comprimento de onda em particular pode ser feita pelo ângulo entre a grade de difração e os espelhos que conduzem o feixe até a fenda de saída (**Figura C-3**).

Outro elemento muito importante que compõe o espectrômetro é o detector de radiação eletromagnética. Ele pode ser um tubo fotomultiplicador (ou simplesmente fotomultiplicadora, ou ainda PMT, do inglês *photomultiplier tube*) ou um fotodiodo. Como os equipamentos utilizados neste trabalho empregam tubos fotomultiplicadores como detectores de radiação eletromagnética, negligenciar-se-á informação acerca dos fotodiodos.

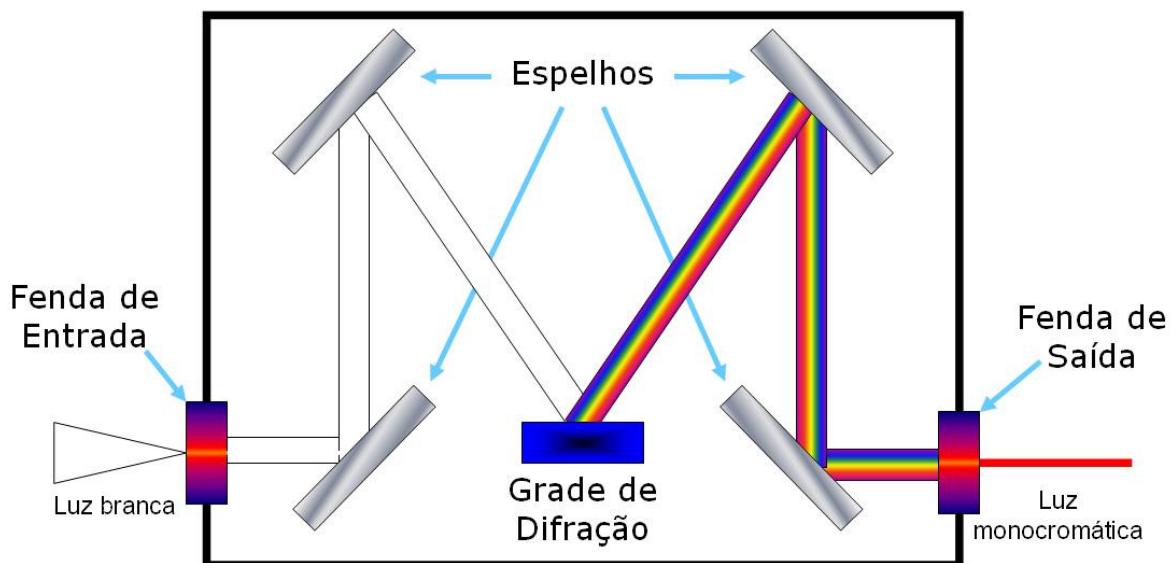


Figura C-3: Esquema representando um monocromador.

Um tubo fotomultiplicador é formado por um tubo de vidro ou de quartzo sob vácuo, no qual existe um conjunto de placas metálicas interligadas. Estas placas metálicas, quando atingidas por um fóton, têm alguns elétrons ejetados. Como estas placas estão interligadas e uma diferença de potencial elétrico é aplicada sobre elas, esta fotocorrente é amplificada e analisada por um circuito eletrônico. Assim, o menor indício de radiação pode ser detectado.

Por fim, um elemento de vital importância para a aquisição de dados sem sinal de fundo (*background*) é o obturador mecânico (ou *chopper*). Este consiste de um disco perfurado, posicionado entre a amostra e o feixe de luz, que gira em uma frequência pré-determinada. Sua função é fazer com que o feixe luminoso atinja a amostra com uma determinada taxa de repetição, de forma que apenas sinais com esta mesma frequência sejam analisados posteriormente.

Comparando-se espectrofotômetros e espectrofluorímetros, notam-se algumas diferenças no tocante aos arranjos experimentais. Em um estudo de espectroscopia de absorção, a amostra é excitada em uma série de comprimentos de onda (região em que se deseja determinar a absorção da amostra), ao passo que na espectroscopia de emissão a amostra é excitada através de um único comprimento de onda (aquele em que possui boa absorbância). Além disso, ao se tomar um espectro de absorção, a luz deve ser coletada a 180° em relação à fonte de radiação (ou seja, ela deve atravessar integralmente a amostra). Já para a tomada de um espectro de emissão, deve-se posicionar o detector a 90° da fonte de excitação, a fim de se evitar o mascaramento da luminescência pelo feixe de excitação que atravessa a amostra.

APÊNDICE D

Interações Bimoleculares Envolvendo Estados Excitados

Além dos processos de desativação de estados eletronicamente excitados visto até o momento, em que a molécula, via processos radiativos e/ou não radiativos atingia novamente seu estado fundamental, podem ocorrer fenômenos envolvendo mais de uma molécula que conduzam à desexcitação de uma das espécies. Tais processos de desativação bimolecular de espécies eletronicamente excitadas podem ser divididos basicamente em duas rotas, que são a formação de complexos excitados (excíplexes e excímeros, como representado por **(E-1)**) e a transferência de energia eletrônica **(E-2)**.



Nas equações acima, **D** representa a molécula doadora (ou seja, aquela que transfere a energia da excitação) e **A**, a molécula aceitadora (que capta tal energia). Os estados excitados são representados pelo símbolo $*$.

Excímeros e Excíplexes

Excímero é o nome dado a dímeros excitados, enquanto excíplexo se refere a complexos excitados. Em outras palavras, ambos os termos se referem a estados excitados de um sistema; contudo, no caso de um excímero (do inglês *excited dimer*) este sistema é formado por moléculas iguais (**D=A**), ao passo que um excíplexo (do inglês *excited complex*) apresenta moléculas diferentes formando um estado excitado (**D≠A**). Em ambos os casos, a interação entre uma molécula excitada **D*** e uma molécula não excitada **A** leva à formação reversível de um complexo excitado **(DA)*** que é associativo no estado excitado e dissociativo no fundamental.

Transferência de Energia

Processos de transferência de energia desempenham um papel fundamental em fotoquímica, uma vez que estão envolvidos em processos fotobiológicos como a fotossíntese e na fotofísica e fotoquímica de processos em geral. Tais processos resultam na migração ou troca de excitação eletrônica entre moléculas, sejam elas

semelhantes ou não; tem-se então a desexcitação de \mathbf{D}^* (supressão) e a excitação indireta de \mathbf{A} (sensibilização).

A transferência de energia entre as espécies \mathbf{D}^* e \mathbf{A} pode ser de dois tipos, radiativa ou não radiativa. O processo radiativo é denominado processo trivial, de conceito simples, em que o fóton emitido por \mathbf{D}^* é meramente absorvido por \mathbf{A} .



A transferência de energia radiativa não requer interação direta entre as espécies, sendo portanto um processo de “longa distância”. Seu requisito fundamental dita que a molécula aceitadora \mathbf{A} tenha um alto coeficiente de absorção molar na região espectral em que a molécula doadora \mathbf{D}^* emite. O rendimento quântico deste tipo de transferência é dado por:

$$\Phi_{\mathbf{D}^* \rightarrow \mathbf{A}}^{\text{rad}} = \Phi_{\mathbf{D}}^0 \int_0^{\infty} F_{\mathbf{D}}(\bar{\nu}) [1 - 10^{-\epsilon_{\mathbf{A}}(\bar{\nu}) c_{\mathbf{A}} b'}] d\bar{\nu} \quad (\text{D-4})$$

onde $\Phi_{\mathbf{D}}^0$ representa o rendimento quântico de emissão do doador na ausência do acceptor e o termo $\epsilon_{\mathbf{A}}(\bar{\nu}) c_{\mathbf{A}} b'$, a densidade óptica efetiva de \mathbf{A} na geometria empregada. O termo entre colchetes refere-se à fração absorvida por \mathbf{A} a cada comprimento de onda em que \mathbf{D}^* emite. Já a integral determina a sobreposição do espectro de emissão normalizado de \mathbf{D}^* ($\int F d\lambda = 1$) e do espectro de absorção de \mathbf{A} .

É importante lembrar que $\Phi_{\mathbf{D}^* \rightarrow \mathbf{A}}^{\text{rad}} \leq \Phi_{\mathbf{D}}^0$. O limite da igualdade se aplica quando \mathbf{A} absorve em todas as frequências emitidas por \mathbf{D}^* , e quando todos os fótons emitidos por \mathbf{D}^* são reabsorvidos por \mathbf{A} .

Por sua vez, processos de transferência de energia não radiativa não envolvem a intermediação de fótons, e requerem a interação direta ou indireta entre \mathbf{D}^* e \mathbf{A} . Desta forma, trata-se de mecanismos direcionais, em que a geometria de acoplamento entre as moléculas desempenha um importante papel.

Förster demonstrou que o valor absoluto da constante de velocidade $\eta_{\text{dd}}(\mathbf{R})$ para transferência dipolo-dipolo de acoplamento muito fraco, a uma distância entre \mathbf{D}^* e \mathbf{A} igual a \mathbf{R} , é:

$$\eta_{\text{dd}}(\mathbf{R}) = \frac{9000 \ln 10}{128 \pi^5 N} \cdot \frac{\Phi_{\text{D}}^0}{\tau_{\text{D}}^0} \cdot \frac{\kappa^2}{n^4 R^6} \cdot \int_0^{\infty} F_{\text{D}}(\bar{\nu}) \cdot \epsilon_{\text{A}}(\bar{\nu}) \cdot \frac{d\bar{\nu}}{\bar{\nu}^4} \quad (\text{D-5})$$

O termo da integral corresponde à sobreposição (em cm^6/mol) entre o espectro de emissão normalizado por área do doador e o espectro de absorção do acceptor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 39, p.1-18, 1997.
2. SIMPLÍCIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 25/5, p. 801-807, 2002.
3. MACHADO, A.E.H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, v.23/2, p. 237-243, 2000.
4. SHARMAN, W.M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J.E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Therapeutic Focus Reviews DDT**, v. 4/11, p. 507-517, 1999.
5. ALLISON, R.R.; SIBATA, C.H.; DOWNIE, G.H.; CUENCA, R. E. A clinical review of PDT for cutaneous malignancies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.3/4, p. 214-226, 2006.
6. DOLPHIN, D. Photomedicine and Photodynamic Therapy. **Can. J. Chem.** v. 72, 1994.
7. NORTH, J.; NEYNDORFF, H.; LEVY, J.G. Photosensitizers as virucidal agents. **J. Photochem. Photobiol.**, v.17, p. 99-108, 1993.
8. STERNBERG, E.D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54/17, p. 4151-4202, 1998.
9. SILVA, A.R. **Análise das propriedades fotossensibilizantes do In(III)-mesotetrafenilporfirina para uso em terapia fotodinâmica**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.
10. RIBEIRO, J.N. **Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica**. 2005. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.
11. ALMEIDA, R.D.; MANADAS, B.J.; CARVALHO, A.P.; DUARTE, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1704, p. 59-86, 2004.
12. SIBATA, C.H.; COLUSSI, V.C.; OLEINICK, N.L.; KINSELLA, T.J. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33/8, p. 869-880, 2000.
13. MANG, T.S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 43-48, 2004.
14. OLGIBY, P. Singlet oxygen – introduction. **Photochem. Photobiol.** v. 82, p. 1133-1135, 2006.

-
15. ZHAO, L. **Singlet oxygen**. 2001. Disponível em <<http://www.healthcare.uiowa.edu/corefacilities/esr/education/2001/1/ZhaoL-Paper1.pdf>>. Acessado em 11 de novembro de 2007.
16. GROSSWEINER, L.I. **Singlet oxygen: generation and properties**. Disponível em <<http://www.photobiology.com/educational/len2/singox.html>>. Acessado em 22 de novembro de 2007.
17. MASTERTON, W.L.; SLOWINSKI, E.J. **Química Geral Superior**. 4ª ed. Rio de Janeiro, RJ: Editora Interamericana, 1978.
18. CASTANO, A.P.; DEMIDOVA, T.N.; HAMBLIN, M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279-293, 2007.
19. BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v. 29/1, p. 113-123, 2006.
20. NÚÑEZ, S.C. **Estudo da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica**. 2007. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, São Paulo.
21. CASAS, A.; BATLLE, A. Photodynamic therapy in Argentina. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 3/4, p. 205-213, 2006.
22. XU, D.Y. Research and development of photodynamic therapy photosensitizers in China. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 4, p. 13-25, 2007.
23. BAGNATO, V.S.; KURACHI, C.; FERREIRA, J.; MARCASSA, L.G.; SIBATA, C.H.; ALLISON, R.R. PDT experience in Brazil: a regional profile. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, p. 107-118, 2005.
24. EDELSON, M.F. Light-activated drugs. **Sci. Am.**, v. 259, p. 68-75, 1988.
25. BONNETT, R. Photodynamic therapy in historical perspective. **Rev. Contemp. Pharmacother.**, v. 10, p. 1-17, 1999.
26. LIPSON, R.L.; GRAY, M.J.; BALDES, E.J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Em: 9th INTERNATIONAL CANCER CONGRESS, 1966, Tokyo. **Proceedings of the 9th international cancer congress**, 393, 1966.
27. DOUGHERTY, T.J.; KAUFMAN, J.E.; GOLDFARB, A.; WEISHAUP, K.R.; BOYLE, D.; MITTLEMAN, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res.**, v. 38, p. 2628-2635, 1978.
28. <<http://www.photofrin.com>>. Acessado em 7 de outubro de 2008.

-
29. SUBRAMANIAN, G.; MURAL, R.; HOFFMAN, S.L.; VENTER, J.C.; BRODER, S. Microbial disease in humans: a genomic perspective. *Mol. Diagn.*, v. 6, p. 243-252, 2001.
30. O'RIORDAN, K.; AKILOV, O.E.; HASAN, T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 247-262, 2005.
31. ORENSTEIN, A.; KLEIN, D.; KOPOLOVIC, J., WINKLER, E.; MALIK, Z; KELLER, N.; NITZAN, Y. The use of porphyrins for eradication of *Staphylococcus aureus* in burn wound infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, v. 19, p. 307-314, 1998.
32. SZPAKOWSKA, M.; LASOCKI, K.; GRZYBOWSKI, J.; GRACZYK, A. Photodynamic activity of the haematoporphyrin derivative with rutin and arginine substituents (HpD-rut(2)-arg(2)) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacol. Res.*, v. 44, p. 243-246, 2001.
33. WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 42, p. 13-28, 1998.
34. PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J.; JONES, R.N.; MESSER, S.A.; HOLLIS, R.J. Trends in antifungal susceptibility of *Candida spp.* isolated from pediatric and adult patients with bloodstream infections: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997 to 2000. *J. Clin. Microbiol.*, v. 3/40, p. 852-856, 2002.
35. GUALCO, L.; DEBBIA, E.A.; BANDETTINI, R.; PESCIOTTO, L.; CAVALLERO, A.; OSSI, M.C.; SCHITO, A.M.; MARCHESE, A. Antifungal resistance in *Candida spp.* isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 2/29, p. 179-184, 2007.
36. PRATES, R.A.; SILVA, E.G.; YAMADA JUNIOR, A.M.; SUZUKI, L.C.; PAULA, C.R.; RIBEIRO, M.S. The irradiation parameters investigation of photodynamic therapy on yeast cells. *Progress in Biomedical Optics and Imaging*, v. 9, p. 684606-1-684606-6, 2008.
37. GRIFFITHS, M.A.; WREN, B.W.; WILSON, M. Killing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in vitro using aluminium disulphonated phthalocyanine, a light-activated antimicrobial agent. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 40, p. 873-876, 1997.
38. DIWU, Z.; LOWN, J.W. Photosensitization by anticancer agents – 12. perylene quinonoid pigments, a novel type of singlet oxygen sensitizer. *J. Photochem. Photobiol. A*, v. 64, p. 273-287, 1992.
39. JORI, G.; SCHINDL, I.; SCHINDL, A.; POLO, L. Novel approaches towards a detailed control of the mechanism and efficiency of photosensitized processes in vivo. *J. Photochem. Photobiol. A*, v. 102, p. 101-107, 1996.
40. MAESTRIN, A.P.J.; RIBEIRO, A.O.; TEDESCO, A.C.; NERI, A.R.; VINHADO, F.S.; SERRA, O.A.; MARTINS, P.R.; IAMAMOTO, Y.; SILVA, A.M.G.; TOMÉ, A.C.; NEVES,

- M.G.P.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S. A Novel Chlorin Derivative of Meso-tris (pentafluorophenyl)-4-pyridylporphyrin: Synthesis, Photophysics and Photochemical Properties. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 15/6, p. 923-930, 2004.
41. CALZAVARA-PINTON, P.G.; VENTURINI, M.; SALA, R. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 78, p. 1-6, 2005.
42. MOAN, J. Properties for optimal PDT sensitizers. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 3/4, p. 521-4, 1990.
43. ROSENKRANZ, A.A.; JANS, D.A.; SOBOLEV, A.S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 452-464, 2000.
44. POLO, L.; VALDUGA, G.; JORI, G.; REDDI, E. Low-density lipoprotein receptors in the uptake of tumour photosensitizers by human and rat transformed fibroblasts. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 34, p. 10-23, 2002.
45. **Health in XXI century – a vision from the European youth.** Disponível em <<http://www.cienciaviva.pt/healthXXI/QtFlores/lab.asp>>. Acessado em 18 de novembro de 2008.
46. RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A. Avaliação da Influência da Agregação e da Fotodegradação na Atividade Fototerapêutica de Octaetilporfirina e meso-Tetramesitylporfirina. **Anais Assoc. Bras. Quim.**, v. 52/3, p. 129-134, 2003.
47. BORISOV, S.M.; BLINOVA, I.A.; VASIL'EV, V.V. The Influence of Dimerization of Water-Soluble Metalloporphyrins as Photosensitizers on the Efficiency of Generation of Singlet Oxygen. **High Energy Chem.**, v. 36/3, p. 189-192, 2002.
48. SABATÉ, R.; ESTELRICH, J. Determination of the dimerization constant of pinacyanol: Role of the thermochromic effect. **Spectrochim. Acta Part A**, v. 70/2, p. 471-476, 2008.
49. RONCHI, L.L.M.; RIBEIRO, A.V.F.N.; SILVA, A.R.; Sena, G.L.; JORGE, R.A.; RIBEIRO, J.N. Influência da agregação e do fotobranqueamento na atividade fotodinâmica de protoporfirina de magnésio. **Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia**, Vitória, n. 2, p. 5-12, 2007.
50. BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9513-9547, 2001.
51. L. WANG, X. WANG, H. ZHANG. A theoretical study on photobleaching mechanisms of hypocrellins. **Dyes Pigm.**, v. 67, p. 161-166, 2005.

-
52. MUSSI, L. ***Eficiência fotodinâmica das protoporfirinas IX de magnésio e zinco.*** 2003. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas.
53. YANG, H.; HUANG, F. Quantum chemical and statistical study of hypocrellin dyes with phototoxicity against tumor cells. ***Dyes Pigm.***, v. 74, p. 416-423, 2007.
54. HALDER, M.; CHOWDHURY, P.K.; GORDON, M.S.; PETRICH, J.W.; DAS, K.; PARK, J.; ALEXEEV, Y. Hypericin and its perylene quinone analogs: probing structure, dynamics, and interactions with the environment. ***Adv. Photochem.***, v. 28, p. 1-26, 2005.
55. ZHANG, H.; CHEN, D. Theoretical analysis of the fluorescence spectrum of hypocrellin A. ***Dyes Pigm.***, v. 42, p. 81-83, 2000.
56. WENG, M.; ZHANG, M.; SHEN, T. Electron transfer interaction between hypocrellin A and biological substrates and quantitative analysis of superoxide anion radicals. ***J. Chem. Soc.***, v. 2, p. 2393-2397, 1997.
57. CHIN, W.; LAU, W.; CHENG, C.; OLIVO, M. Evaluation of hypocrellin B in a human bladder tumor model in experimental photodynamic therapy: biodistribution, light dose and drug-light interval effects. ***International Journal of Oncology***, v. 25, p. 623-629, 2004.
58. DIWU, Z.; LOWN, J.W. Hypocrellins and their use in photosensitization. ***Photochem. Photobiol.***, v. 52, p. 609-616, 1990.
59. YANG, H.; HUANG, F. Quantum chemical and statistical study of hypocrellin dyes with phototoxicity against tumor cells. ***Dyes Pigm.***, v. 74, p. 416-423, 2007.
60. TOFFOLI, D.J.; GOMES, L.; VIEIRA JR., N.D.; COURROL, L.C. Photodynamic potentiality of hypocrellin B and its lanthanide complexes. ***J. Opt. A: Pure Appl. Opt.***, v. 10, p. 104026-104034, 2008.
61. ALI, S.M.; OLIVO, M. Efficacy of hypocrellin pharmacokinetics in phototherapy. ***International Journal of Oncology***, v. 21, p. 1229-1237, 2002.
62. CHALOUPKA, R.; SUREAL, F.; KOCISOVA, E.; PETRICH, J. Hypocrellin A photosensitization involves an intracellular pH decrease in 3T3 cells. ***Photochem. Photobiol.***, v. 68/1, p. 44-50, 1998.
63. LIU, J.; ZHAO, Y.; ZHAO, J.; XIA, A.; JIANG, L.; WU, S.; MA, L.; DONG, Y.; GU, Y. Two-photon excitation studies of hypocrellins for photodynamic therapy. ***J. Photochem. Photobiol. B***, v. 68, p. 156-164, 2002.
64. DUMAS, S.; LEPRÊTE, J.; LEPELLEC, A.; DARMANYAN, A.; JARDON, P. Reactivity of the photo excited forms of hypericin, hypocrellin A, hypocrellin B and methylated hypericin towards molecular oxygen: the role of charge transfer interaction. ***J. Photochem. Photobiol. A***, v. 163, p. 297-306, 2004.

-
65. TOFFOLI, D.J.; COURROL, L.C.; TARELHO, L.V.G.; GOMES, L.; VIEIRA JR., N.D. Estudo das Propriedades Ópticas do Complexo Hipocrelina-Lantanídeos. **Boletim Técnico da Faculdade de Tecnologia de São Paulo**, v. 20, p. 12-15, 2006.
66. MEI, G.D.; LUO, H.C. A report on four cases of photodermatitis caused by the eating of *Shiraia bambusicola* P. Heen. **Chin. J. Dermatol.**, v. 6, p. 434-436, 1958.
67. WAN, X. Y.; CHEN, Y.T. Hypocrellin A, a new drug for photochemotherapy. **Kexue Tongbao** (English edition) v. 26, p. 1040-1042, 1981.
68. ZHOU, J.; LIU, J.; XIA, S.; WANG, X.; ZHANG, B. Effect of chelation to lanthanum ions on the photodynamic properties of hypocrellin A. **J. Phys. Chem. B**, v. 109, p. 19529-19535, 2005.
69. CHOWDHURY, P.K.; DAS, K.; DATTA, A.; LIU, W.; ZHANG, H.; PETRICH, J. A comparison of the excited-state processes of nearly symmetrical perylene quinines: hypocrellin A and hypomycin B. **J. Photochem. Photobiol. A**, v. 154, p. 170-116, 2002.
70. TARDIVO, J.P.; DEL GIGLIO, A.; OLIVEIRA, C.S.; GABRIELLI, D.S.; JUNQUEIRA, H.C.; TADA, D.B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R.F.; BAPTISTA, M.S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2 p. 175-191, 2005.
71. JONES, L.R.; GROSSWEINER, L. Singlet oxygen generation by Photofrin® in light-scattering media homogeneous. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 26, p. 249-256, 1994.
72. DONG, C.Y.; JIA, H.T.; MA, C.M. The inhibitory effect of the new photosensitizer hypocrellin A on experimental tumors. **Chin. J. Biochem.**, v. 3, p. 468-472, 1987.
73. ZHAO, Y.; XIE, J.; ZHAO, J. The photosensitization activity of a water-soluble carboxylate of hypocrellin B. **Dyes Pigm.**, v. 66, p. 61-68, 2005.
74. LEE, H.; Zhou, Z.; CHEN, S.; ZHANG, M.; SHEN, T. New long-wavelength ethanolamino-substituted hypocrellin: photodynamic activity and toxicity to MGC803 cancer cell. **Dyes Pigm.**, v. 68, p. 1-10, 2006.
75. LEE, H.; CHEN, D.; ZHANG, M.; SHEN, T. Studies on the synthesis of two hydrophilic hypocrellin derivatives with enhanced absorption in the red spectral region and on their photogeneration of $O_2^{\cdot-}$ and $O_2(^1\Delta_g)$. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 71, p. 43-50, 2003.
76. ZHOU, J.; LIU, J.; FENG, Y.; WEI, S.; GU, X.; WANG, X.; ZHANG, B. Synthesis and characterization of the monomer ruthenium complex of hypocrellin B. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 3067-3070, 2005.
77. MA, J.; ZHAO, J.; JIANG, L. The aluminium(III) complex of hypocrellin B as a PDT photosensitizer. **New J. Chem.**, v. 25, p. 847-852, 2001.

78. ZHOU, J.; XIA, S.; CHEN, J.; WANG, X.; ZHANG, B. The photodynamic property improvement of hypocrellin A by chelation with lanthanum ions. **Chem. Commun.**, p. 1372-1373, 2003.
79. ZENG, Z.; ZHOU, J.; ZHANG, Y.; QIAO, R.; XIA, S.; CHEN, J.; WANG, X.; ZHANG, B. Photodynamic properties of hypocrellin A complexes with rare earth trivalent ions: role of the excited state energies of the metal ions. **J. Phys. Chem. B**, v. 111, p. 2688-2696, 2007.
80. HU, Y.Z.; AN, J.Y.; JIANG, L.J. Studies of the sulfonation of hypocrellin A and the photodynamic actions of the product. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 17, p. 195-201, 1993.
81. HU, Y.Z.; AN, J.Y.; JIANG, L.J. Effect of structural modifications on photosensitizing activities of hypocrellin dyes: EPR and spectrophotometric studies. **Free Radical Biol. Med.**, v. 26/9, p. 1146-1157, 1999.
82. MA, J.H.; ZHAO, J.Q.; JIANG, L.J. Synthesis of a novel hypocrellin B derivative and its photogeneration of semiquinone anion radical. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 61, p. 122-128, 2001.
83. XU, S.; CHEN, S.; ZHANG, M.; SHEN, T.; ZHAO, Y.; LIU, Z.; WU, Y. Butylamino-demethoxy-hypocrellins and photodynamic therapy decreases human cancer *in vitro* and *in vivo*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1537/3, p. 222-232, 2001
84. ZHOU, J.; XIA, S.; CHEN, J.; WANG, X.; ZHANG, B.; ZHANG, H.; ZOU, P.; AI, X.; ZHANG, J. Surface binding and improved photodamage of the lanthanum ion complex of hypocrellin A to calf thymus DNA. **J. Photochem. Photobiol. A**, v. 165, p. 143-147, 2004.
85. QUINA, F.R. **Photophysical concepts in condensed media**. Capítulo 1 em CHEMICAL AND BIOLOGICAL GENERATION OF EXCITED STATES, p. 1-36. Adam, W.; Cilento, G. New York, N.Y.: Academic Press, 1982.
86. SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. **Chem. Rev.**, v. 103, p. 1685-1757, 2003.
87. WOLFGANG, J. Goethe-Universität, Institut für Physikalische und Theoretische Chemie. Disponível em <<http://user.uni-frankfurt.de/~rsch/1O2-english.html>>. Acessado em 3 de outubro de 2008.
88. EISBERG, R.; RESNICK, R. **Física quântica: átomos, moléculas, sólidos, núcleos e partículas**. 2ª edição, Rio de Janeiro, RJ: Editora Campus, 1983.
89. LIN, Y.Y.; CHU, Z.T.; LIN, S.H. Theoretical and experimental study of the quenching of singlet oxygen by solvent. **J. Photochem. Photobiol. A**, v. 44, p. 229-242, 1988.

-
90. SCULLY, F.E.; HOIGNÉ, J. Rate constants for reactions of singlet oxygen with phenols and other compounds in water. *Chemosphere*, v. 16/4, p. 681-694, 1987.
91. LOSEV, A.P.; NICHIPOROVICH, I.N.; BYTEVA, I.M.; DROZDOV, N.N.; AL JGHGAMI, I.F. The perturbing effect of solvents on the luminescence rate constant of singlet molecular oxygen. *Chem. Phys. Lett.*, v. 181/1, p. 45-50, 1991.
92. KORÍNEK, M.; DEDIC, R.; MOLNÁR, A.; SVOBODA, A.; HÁLA, J. A comparison of photosensitizing properties of meso tetraphenylporphin in acetone and in dimethyl sulfoxide. *J. Mol. Struct.*, v. 744, p. 727-731, 2005.
93. FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43/1, p. 61-68, 1997.
94. JARVI, M.; NIEDRE, M.; PATTERSON, M.S.; WILSON, B.C. Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects. *Photochem. Photobiol.*, v. 82, p. 1198-1210, 2006.
95. ALCÂNTARA Jr, P. *Espectroscopia Molecular*. Universidade Federal do Pará, CURSO FÍSICA MODERNA II, 2002.
96. OLIVEIRA, L.F.C. Espectroscopia Molecular. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 4, 2001.
97. *Elementos de Espectroscopia*. Disponível em <<http://www.chemkeys.com.br>>. Acessado em 15 de março de 2006.
98. BARROW, G.M. *Introduction to molecular spectroscopy*. New York, NY: Editora McGraw-Hill, 1962.
99. KONSTANTINOVA, M.A. *Fluorimetric Analysis*. Em: SÉRIE PRINCÍPIOS FÍSICOS E TÉCNICAS DE ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA. Israel Program for Scientific Translations, Jerusalém, 1965.
100. MEYER-ARENDT, J.R. *Introduction to classical and modern optics*. New Jersey: Editora Prentice Hall, 1972.
101. ATKINS, P.; DE PAULA, J. *Físico-química – Volume 2*, 7ª edição, Rio de Janeiro, RJ: Editora LTC, 2002.
102. ARNOLD, D.R.; BAIRD, N.C.; BOLTON, J.R.; BRAND, J.C.D.; JACOBS, P.W.M.; MAYO, P.; WARE, W.R. *Photochemistry – an introduction*. New York, NY: Editora Academic Press, 1974.
103. SALA, O. *Fundamentos da espectroscopia Raman e no infravermelho*. São Paulo, SP: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.
104. PENZHORN, R.D.H. *Fotofísica de Gases*. Universidad de Chile, Santiago, 1972.

-
105. ROHATGI-MUKHERJEE, K.K. **Fundamentals of Photochemistry**. New York: Wiley, 1978.
106. PFALLER, M.A.; BURMEISTER, L.; BARTLETT, M.S.; RINALDI, M.G. Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 1437-1441, 1988.
107. PRATES, R.A.; SILVA, E.G.; YAMADA JUNIOR, A.M.; SUZUKI, L.C.; PAULA, C.R.; RIBEIRO, M.S. Light parameters influence cell viability in antifungal photodynamic therapy in a fluence and rate fluence-dependent manner, **Laser Physics**, v. 19, 2009 (*in Press*).
108. DEMIDOVA, T.N.; GAD, F.; ZAHRA, T.; FRANCIS, K.P.; HAMBLIN, M.R. Monitoring photodynamic therapy of localized infections by bioluminescence imaging of genetically engineered bacteria, **J. Photoch. Photobiol. B.**, v. 81, p. 15-25, 2005.
109. XU, S; CHEN, S.; ZHANG, M.; SHEN, T. Hypocrellin derivative with improvements of red absorption and active oxygen species generation. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 1499–1501, 2004.
110. MARGALIT, R.; SHAKLAI, N.; COHEN, S. Fluorimetric studies on the dimerization equilibrium of protoporphyrin IX and its haematoderivative. **Biochem J.**, v. 209, p. 547-552, 1983.
111. MARGALIT, R.; ROTENBERG, M. Thermodynamics of porphyrin dimerization in aqueous solutions. **Biochem. J.**, v. 219, p. 445-450, 1984.
112. HUANG, Y.M.; LAM, J.W.Y.; CHEUK, K.K.L.; GE, W.; TANG, B.Z. Tang. Monomer and dimer emissions in the solutions of a monosubstituted polyacetylene. **Mater. Sci. Eng., B**, v. 85, p. 118-121, 2001.
113. KRALJIC, I.; EL MOHSNI, S. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. **Photochem. Photobiol.**, v. 18, p. 577-581, 1978.
114. KRALJIC, I. Detection of singlet oxygen and its role in dye-sensitized photooxidation in aqueous and micelar solutions. **Biocimie**, v. 68, p. 807-811, 1986.
115. GARCEZ SEGUNDO, A.S. **Mecanismos da terapia fotodinâmica em presença de peróxido de hidrogênio**. 2007. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN, São Paulo.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)