



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE FÍSICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA**



Cassiano Batestin Costa

**Propriedades Fotofísicas da Hidróxido Ftalocianina de Alumínio  
em diferentes meios**

**Ouro Preto – MG**  
**2016**

Cassiano Batesttin Costa

## **Propriedades Fotofísicas da Hidróxido Ftalocianina de Alumínio em diferentes meios**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cazati

Co-Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Bruna Bueno Postacchini

**Ouro Preto – MG**

**2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA**

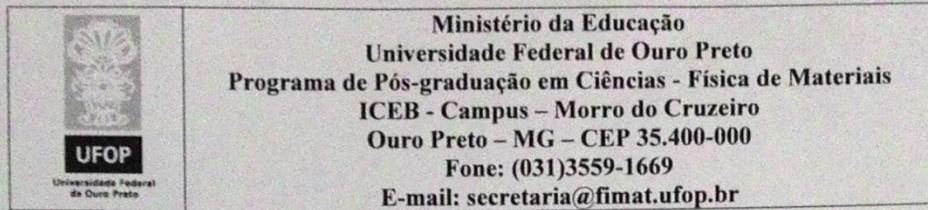
C837p Costa, Cassiano Batesttin.  
Propriedades fotofísicas da hidróxido ftalocianina de alumínio em diferentes meios [manuscrito] / Cassiano Batesttin Costa. - 2016.  
111f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Cazati.  
Coorientadora: Profa. Dra. Bruna Bueno Postacchini.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Física. Programa de Pós-Graduação em Ciências.  
Área de Concentração: Física dos Materiais.

1. Hidróxidos. 2. Alumínio. 3. Nanoestrutura. I. Cazati, Thiago. II. Postacchini, Bruna Bueno. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

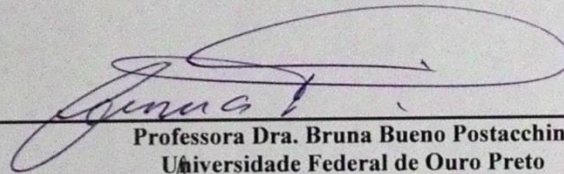
CDU: 620.3

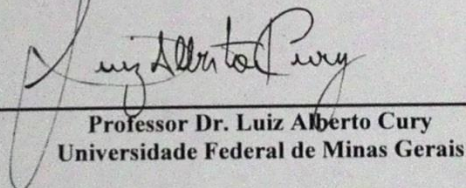


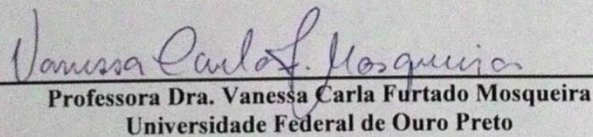
***“Propriedades Fotofísicas da Hidróxido Ftalocianina de  
Alumínio em diferentes Meios.”***

***Autor: Cassiano Batesttin Costa***

Dissertação defendida e aprovada, em 18 de março de 2016, pela banca examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Dra. Bruna Bueno Postacchini**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**

  
\_\_\_\_\_  
**Professor Dr. Luiz Alberto Cury**  
**Universidade Federal de Minas Gerais**

  
\_\_\_\_\_  
**Professora Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira**  
**Universidade Federal de Ouro Preto**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por tudo, por mais esta etapa concluída na minha vida.

Agradeço ao professor Thiago pela oportunidade, pelos ensinamentos e dedicação para me ajudar a concluir esta etapa.

Agradeço a professora Bruna pelos ensinamentos, pela paciência, pela oportunidade e por disponibilizar boa parte do seu tempo para me ajudar a chegar ao fim de mais esta jornada.

Agradeço a professora Vanessa pelos ensinamentos e por ter disponibilizado o material e o Laboratório de Pesquisa Tecnologia Farmacêutica Nanobiotecnologia para o desenvolvimento de parte da pesquisa. E em especial agradeço a Gwenaelle e a Mônica por toda a ajuda e explicações.

Agradeço a técnica Patrícia do CIPHARMA Laboratório Multiusuário no Departamento de Farmácia pela ajuda e explicações.

Agradeço aos professores e técnicos do laboratório do Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo

Agradeço a UFOP, pelo apoio financeiro.

Agradeço a Mariana, secretária do programa FIMAT por toda ajuda.

Agradeço o companheirismo e amizade dos colegas do Laboratório de Materiais Optoeletrônicos e do Laboratório de Fotofísica Molecular: Ana Cláudia, Ana Carolina, Jeilce, Junnia, Sérgio, Silvia e Tomás.

Agradeço aos amigos e companheiro de sala: Adriana, Anderson, Brillian, Carlos, Genilson, Harley, João, Juliana, Kennedy, Naiane e Tiago.

Agradeço aos irmãos da república Canaan por terem participado de mais esta jornada.

Agradeço as amigas da república Feitiça por estarem presentes em mais esta etapa.

Agradeço as amigas da república Nascente por terem me acompanhado em mais esta etapa.

Agradeço a Karaokê pela amizade e por ter participado desta etapa.

Agradeço a Mafê pela amizade, pelo carinho e por ter tornado esta etapa melhor e mais agradável.

E agradeço ao Diego pelo incentivo. Aos meus sobrinhos Calebe e Miguel, que sempre me alegram e me animam. A minha irmã por sempre torcer por mim. E aos meus pais, José e Cruzimar, que sempre acreditaram no meu sucesso, pelo apoio e amor que sempre me deram.

## RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento medicinal que apresenta alta seletividade terapêutica, e conseqüentemente vem apresentando excelentes resultados clínicos no tratamento de certos tipos de câncer. Este tratamento consiste em eliminar o tecido cancerígeno através dos produtos fototóxicos (espécies reativas de oxigênio) gerados por um fotossensibilizador ao interagir com a luz. O fotossensibilizador é uma molécula orgânica com capacidade de absorver luz em faixas específicas do espectro eletromagnético na região do visível, tal como as *Hidróxido Ftalocianina de Alumínio (AIOHPc)* estudada neste trabalho, a qual tem duas faixas de absorção, sendo estas entre 300-400 nm e entre 600-750 nm. O objetivo deste trabalho foi caracterizar as propriedades fotofísicas da AIOHPc e verificar o comportamento destas em diferentes meios, os quais foram: em diferentes solventes (etanol e sulfóxido de dimetilo (DMSO)), em diferentes concentrações (0,04-363,63  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em diferentes proporções volumétricas de etanol/água destilada (v/v) e quando encapsulada em nanoesferas de ácido polilático (PLA). Neste estudo foram utilizadas as técnicas de caracterização de absorção óptica, de fluorescência estacionária, de fluorescência resolvida no tempo e de espalhamento de luz ressonante, e foram calculados os valores de eficiência quântica de fluorescência, da constante de Stern-Volmer e do coeficiente de absorção molar da AIOHPc. A compreensão das propriedades fotofísicas da AIOHPc em diferentes meios busca aprimorar a utilização desta molécula como fotossensibilizador no tratamento por TFD.

Palavras chaves: Hidróxido ftalocianina de alumínio, fotossensibilizador, propriedades fotofísicas, nanoesfera polimérica

---

## ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a medical treatment that exhibits high therapeutic selectivity and consequently has shown excellent clinical results in treating of certain types of cancer. This treatment consists in removing the cancerous tissue through of phototoxic products (reactive oxygen species) generated by a photosensitizer to interact with the light. The photosensitizer is an organic molecule with capacity of absorbing light at specific bands of the electromagnetic spectrum in the visible region, such as *Aluminum Hydroxide Phthalocyanine (AlOHPc)* studied this work, which exhibits two main absorption bands, the so called Soret band (300-400 nm) and the Q band (600-750 nm). This study evaluated the photophysical properties behavior of AlOHPc at different solvents (ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO)), different concentrations (0,04-363,63  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), different volumetric ratios of ethanol/distilled water (v/v) and encapsulated in nanospheres of polyacid lactic (PLA). The AlOHPc in solution were characterized by optical absorption, stationary fluorescence, time resolved fluorescence and by resonant light scattering (RLS). The fluorescence quantum efficiency, the Stern-Volmer constant and the molar absorption coefficient for AlOHPc were obtained. The studying of the photophysical properties of AlOHPc in different environments are relevant to understanding the behavior and use of *Aluminum Hydroxide Phthalocyanine* as a photosensitizer for clinical application in photodynamic therapy (PDT) treatment.

Key words: Aluminum hydroxide phthalocyanine, photosensitizer, photophysical properties, polymeric nanosphere

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Diagrama de Jablonski representando os processos monomoleculares que podem ocorrer após interação da molécula com a luz.  $S_0$  é o estado fundamental,  $S_1$  e  $S_2$  é o primeiro e o segundo estados excitados singletos, respectivamente.  $T_1$  e  $T_2$  é o primeiro e segundo estados excitados tripletos. Absorção de radiação eletromagnética (setas em vermelho). Processos radiativos por fluorescência ou fosforescência (setas em azul) e por processos não radiativos (setas ondulada e tracejada).....6
- Figura 2 – Representação da orientação do spin no processo de excitação. (a) Spins com diferente multiplicidade e mesma energia, caracterizando o estado fundamental. (b) Spins com diferente multiplicidade e com energias diferentes, caracterizando o estado excitado singlete. (c) Spins com multiplicidade iguais e com energias diferentes, caracterizando o estado excitado tripleto .....7
- Figura 3 – Teorema de Förster, representação da transferência de energia ressonante mostrando que os elétrons 1 (verde) e 2 (amarelo) permanecem no doador e no receptor, respectivamente, mesmo após a transferência de energia. Fonte<sup>7</sup> .....9
- Figura 4 – Representação do teorema de Dexter. Múltipla troca no processo de transferência de energia de Dexter, os elétrons 1 (verde) e 2 (amarelo) trocam de molécula. Fonte<sup>7</sup> ..... 10
- Figura 5 – Representação dos processos de supressão estática. Fonte<sup>9</sup>, imagem alterada ..... 11
- Figura 6 – Comparação do processo de dissipação radiativa por fluorescência: em  $F$  moléculas diluídas em solvente com baixo momento dipolar ( $\mu$ ), em  $F^*$  mesma moléculas diluídas em solvente com alto momento dipolar ( $\mu^*$ ). Fonte<sup>9</sup> ..... 13
- Figura 7 – Representação da geometria dos tipos de agregados: (a) agregado H, (b) agregado J e (c) agregado HJ ..... 15
- Figura 8 – Diagrama de energia para dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição: (a) agregados tipo J; (b) agregados tipo H. A seta continua representam a transição de maior probabilidade e as setas pontilhadas a de menor probabilidade.  $E$  representa o dipolos induzido da molécula ..... 15
- Figura 9 – Representação da estrutura química da: (a) indol e (b) da ftalocianina de base livre ..... 16



- Figura 10 – Espectro de absorção característico da ftalocianina sem metal central (linha preta) e da ftalocianina com metal central (linha vermelha)..... 17
- Figura 11 – Representação da profundidade de penetração da radiação eletromagnética na região do visível na pele humana. Fonte<sup>34</sup>, imagem modificada..... 19
- Figura 12 – Representação do diagrama de Jablonski após excitação do fotossensibilizador ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), com cruzamento intersistemas entre o estado excitado singlete para o estado excitado tripleto do fotossensibilizador ( $S_1 \rightarrow T_1$ ). Reação do tipo I e representação da formação de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) na reação tipo II. Fonte<sup>34</sup>, imagem modificada ..... 20
- Figura 13 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fotossensibilizador dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; (b) fotossensibilizador adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; (c) fotossensibilizador retido na matriz polimérica da nanoesfera; (d) fotossensibilizador adsorvido ou disperso na matriz polimérica da nanoesfera. Fonte**Erro! Indicador não definido.**, imagem alterada ..... 22
- Figura 14 – (a) Espectrofotômetro da Hitachi modelo Double Beam U-2900, localizado no Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. (b) Representação do arranjo instrumental do espectrofotômetro da Hitachi modelo Double Beam U-2900. Fonte, imagem modificada ..... 25
- Figura 15 – (a) Espectrofotômetro modular da Ocean Optics modelo Red Tide USB650, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto. (b) Representação do sistema de detecção do espectrofotômetro modular Ocean Optics Red Tide USB650. Fonte..... 26
- Figura 16 – Espectrofluorímetro da Shimadzu modelo RF-5301PC, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto..... 27
- Figura 17 – Representação do espectrofluorímetro ..... 28
- Figura 18 – Espectrômetro modular de fluorescência da Picoquant modelo Fluotime 200, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular, do Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto..... 31
- Figura 19 – (a) Arranjo experimental para medidas de tempo de vida. (b) Histograma mostrando o número de fótons de X tempo, que reproduz o comportamento temporal da emissão da amostra ..... 31

- Figura 20 – Curvas características obtidas pela técnica de TCSPC e ajuste utilizando o software FluoFit<sup>®</sup>. Curva em azul, decaimento da fluorescência. Curva em vermelho, função resposta do laser. Abaixo em azul, resíduo do ajuste e no canto superior direito qualidade do ajuste ( $\chi^2$ )..... 33
- Figura 21 – Estrutura química da hidróxido ftalocianina de alumínio..... 34
- Figura 22 – Representação do método de deposição interfacial utilizado na preparação de nanoesferas de PLA contendo AlOHPc..... 37
- Figura 23 – Comparação dos espectros normalizado de absorção e de fluorescência (excitação em 636 nm) da AlOHPc em solvente etanol ..... 40
- Figura 24 – Comparação dos espectros normalizado de absorção e de fluorescência (excitação com 636 nm) da AlOHPc em solvente DMSO..... 41
- Figura 25 – Comparação do perfil e intensidade dos espectros: (a) de absorção e (b) de fluorescência (excitação em 636 nm) da AlOHPc em ambos os solventes. AlOHPc em concentração de  $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  em ambos solventes ..... 42
- Figura 26 – Curva de decaimento de fluorescência da AlOHPc no solvente etanol (linha preta) e em solvente DMSO (linha azul), para excitação (a) em 401 nm e (b) em 636 nm. Função resposta do laser em vermelho e curva de ajuste monoexponencial em verde ..... 44
- Figura 27 – Espectros de absorção da AlOHPc em diferentes concentrações nos solventes (a) etanol e (c) DMSO, e as intensidade dos picos de absorção em função da concentração nos solventes (b) etanol e (d) DMSO ..... 45
- Figura 28 – Intensidade dos picos de absorção da AlOHPc em função da concentração. (a) Principal pico de absorção em 669 nm e (b) nos picos em 353 nm, em 604 nm e em 640 nm, em solvente etanol. (c) Principal pico de absorção em 673 nm e (d) nos picos em 350 nm, 607 nm e 645 nm, em solvente DMSO. Ajuste linear (linha tracejada)..... 46
- Figura 29 – Espectro de fluorescência da AlOHPc em função da concentração no solvente (a) etanol e no (c) DMSO. Espectro de fluorescência normalizada da AlOHPc no solvente (b) etanol e no (d) DMSO. Excitação em 636 nm..... 48
- Figura 30 – Comportamento do pico de intensidade de fluorescência da AlOHPc em função da concentração no solvente: (a) etanol e (b) DMSO, para as soluções excitas em 350 nm, 401 nm, 636 nm e 670 nm ..... 49

- Figura 31 – Eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc em função da concentração em solvente etanol (circulo preto) e em solvente DMSO (quadrado vermelho). Excitação em 636 nm..... 50
- Figura 32 – Tempo de vida do AIOHPc (a) em etanol e (b) em DMSO em função da concentração, para excitação em 401 nm e em 636 nm ..... 51
- Figura 33 – Comparação do tempo de vida do AIOHPc nos solventes etanol e DMSO em função da concentração, quando excitado em (a) 401 nm e (b) em 636 nm ..... 52
- Figura 34 – Comparação da eficiência quântica de fluorescência ( $\Phi_F$ ) da AIOHPc dada pelo modelo de Birks (Eq. 2) como a eficiência quântica de fluorescência obtida pelo método experimental (Eq.6), em solvente (a) etanol e em (b) DMSO ..... 53
- Figura 35 – Espectros de absorção da AIOHPc com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol com diferentes de proporção de água (v/v). Em detalhe, máximos de intensidades dos picos de absorção da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) nas soluções com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ..... 55
- Figura 36 – Espectros de absorção da AIOHPc com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol com diferentes de proporção de água (v/v). Em detalhe, máximos de intensidades dos picos de absorção da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) nas soluções com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ..... 56
- Figura 37 – Espectros de absorção da AIOHPc com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol com diferentes de proporção de água (v/v). Em detalhe, máximos de intensidades dos picos de absorção da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) nas soluções com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ..... 57
- Figura 38 – Espectros de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 636 \text{ nm}$ ) da AIOHPc com concentração (a) de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de (b) de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes proporções volumétricas de etanol/água (v/v). Nas figuras em detalhes estão os gráficos de intensidade máxima do pico de emissão em função da proporção de água (v/v)..... 58
- Figura 39 – Espectros de fluorescência estacionária ( $\lambda_{\text{exc}} = 636 \text{ nm}$ ) da AIOHPc com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da proporção de água (v/v). Em detalhe, intensidade máxima do pico de fluorescência em função da proporção de água (v/v)..... 59
- Figura 40 – Espectros corrigidos de RLS da AIOHPc com concentração de (a)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de (b)  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de (c)  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em função da proporção de água (v/v).

- Curva da intensidade máxima de espalhamento dos espectros de RLS da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) ..... 61
- Figura 41 – (a) tempos de vida da AIOHPc com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em mistura etanol/água quando irradiada com 401 nm e (b) suas respectivas amplitudes ..... 63
- Figura 42 – (a) tempos de vida da AIOHPc com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em mistura etanol/água quando irradiada com 401 nm e (b) suas respectivas amplitudes ..... 64
- Figura 43 – (a) tempos de vida da AIOHPc com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em mistura etanol/água quando irradiada com 401 nm e (b) as respectivas amplitudes..... 65
- Figura 44 – Comparação dos tempos de vida da AIOHPc para a concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (símbolos preto), de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (símbolos vermelho) e de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (símbolos verde), em função das proporção de água (v/v) nas soluções, irradiada com 401 nm ..... 66
- Figura 45 – Curva de Stern-Volmer obtida a partir da fluorescência da AIOHPc (soluções com 0-60% água (v/v)) quando excitada com 636 nm em função da concentração molar da água, nas concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Em detalhe, ajuste linear (linha tracejada) do gráfico de Stern-Volmer (soluções com 0-30% água (v/v)) ..... 67
- Figura 46 – Espectros de absorção das formulações contendo AIOHPc em nanoesferas de PLA..... 69
- Figura 47 – Espectros de fluorescência das formulações contendo AIOHPc em nanoesferas de PLA, com excitação em 636 nm..... 70
- Figura 48 – Tempos de vidas das formulações de AIOHPc encapsulada em nanoesferas de PLA. Excitação em 401 nm ..... 71
- Figura A. 1 – Distribuição de diâmetro médio da AIOHPc encapsulada em nanoesferas de PLA. (a) Formulação “branca”, (b) Formulação 1, (c) Formulação 2, (d) Formulação 3 e (e) Formulação 4..... 86
- Figura A. 2 – Espectro de fluorescência da AIOHPc em função da concentração no solvente etanol, quando excitada em (a) 350 nm, em (c) 401 nm e em (e) 670 nm. Espectro de fluorescência normalizada da AIOHPc em função da concentração no solvente etanol, quando excitada em (b) 350 nm, em (d) 401 nm e em (f) 670 nm ..... 87
- Figura A. 3 – Espectro de fluorescência da AIOHPc em função da concentração no solvente DMSO, quando excitada em (a) 350 nm, em (c) 401 nm e em (e) 670 nm.

---

Espectro de fluorescência normalizada da AIOHPc em função da concentração no solvente DMSO, quando excitada em (b) 350 nm, em (d) 401 nm e em (f) 670 nm .....	88
Figura A. 4 – Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo da AIOHPc com concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes proporções de etanol/água (0%, 30%, 60%, 65 % e 70% de água) e função resposta do laser em vermelho Irradiação em 401 nm .....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades físicas do solvente etanol e do solvente DMSO .....	35
Tabela 2 – Massas da AIOHPc em $\mu\text{g}$ utilizadas na preparação de nanoesferas de PLA, do ácido poliláctico em mg e do surfactante em mg .....	36
Tabela 3 – Valores da massa da AIOHPc em $\mu\text{g}$ utilizadas na preparação de nanoesferas de PLA, com os respectivos diâmetro médio e do índice de polidispersão .....	38
Tabela 4 – Coeficiente de absorção molar ( $\epsilon(\lambda)$ ) da molécula de AIOHPc em solvente etanol e em solvente DMSO.....	42
Tabela 5 – Eficiência quântica de fluorescência da molécula de AIOHPc ( $\Phi_F$ ) na concentração de $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol e em DMSO .....	43
Tabela 6 – Tempo de vida ( $\tau$ ) da AIOHPc para concentração $3,15 \mu\text{mol L}^{-1}$ no solvente etanol e no solvente DMSO, quando excitada em 401 nm e em 636 nm.....	43
Tabela 7 – Coeficiente de absorção molar ( $\epsilon(\lambda)$ ) da AIOHPc em solvente etanol e em DMSO e a qualidade da regressão linear ( $R^2$ ).....	46
Tabela 8 – Valor da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para o caso de supressão dinâmica da AIOHPc, constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ) e qualidade do erro ( $R^2$ ).....	68
Tabela 9 – Tempos de vida das formulações de AIOHPc, irradiada com 401 nm. Amplitudes respectivas dos tempos de vida e qualidade do ajuste ( $\chi^2$ ).....	71
Tabela A. 1 – Valores das concentrações em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e em $\text{mg L}^{-1}$ da AIOHPc em solvente etanol e em DMSO .....	85
Tabela A. 2 – Eficiência quântica de fluorescência em 401 nm (banda Soret) e em 636 nm e em 670 nm (banda Q) da AIOHPc no solvente etanol e no DMSO .....	89
Tabela A. 3 – Tempo de vida ( $\tau$ ) da AIOHPc no solvente etanol e no DMSO em função da concentração, para a excitação em 401 nm e em 636 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ ) .....	90
Tabela A. 4 – Tempos de vida da AIOHPc e amplitude dos tempos de vida na concentrações de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em função da % água (v/v), para a excitação em 401 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ ) .....	92

---

Tabela A. 5 – Tempos de vida da AlOHPc e amplitude dos tempos de vida na concentrações de 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função da % água (v/v), para a excitação em 401 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ ) .....	92
Tabela A. 6 – Tempos de vida da AlOHPc e amplitude dos tempos de vida na concentrações de 70,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em função da % água (v/v), para a excitação em 401 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ ) .....	93

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\bar{\alpha}$	Probabilidade média de um único fóton emitido ser absorvido
$\Delta\lambda$	Deslocamento de Stokes
$\Delta\lambda_{\text{abs}}$	Deslocamento do pico de absorção
$\varepsilon(\lambda)$	Coefficiente de absorção molar no comprimento de onda
$\tau$	Tempo de permanência da molécula no estado excitado singlete / tempo de vida
$\tau_0$	Tempo de permanência da molécula no estado excitado singlete na ausência de supressor
$\Phi_0$	Eficiência quântica de fluorescência da molécula na ausência de supressor
$\Phi_D$	Eficiência quântica de fluorescência da molécula doadora
$\Phi_F$	Eficiência quântica de fluorescência
$\Phi_{\text{ref}}$	Eficiência quântica de fluorescência da referência
$\lambda$	Comprimento de onda
$\lambda_{\text{emi}}$	Comprimento de onda de emissão
$\lambda_{\text{exc}}$	Comprimento de onda de excitação
$\mu$	Momento dipolar
$\nu$	Frequência
$[Q]$	Concentração molar do agente supressor
$O_2^-$	Ânions superóxidos
$^1O_2$	Oxigênio singlete
$^3O_2$	Oxigênio tripleto
$OH^-$	Radicais Hidroxilas
$A$	Absorbância
$A(\lambda_{\text{exc}})$	Absorbância no comprimento de onda de excitação
AlClPc	Ftalocianina de alumínio cloro
AlOHPC	Hidróxido ftalocianina de alumínio
$Abs$	Absorbância da amostra mesmo comprimento de onda da irradiação
$Abs_{\text{ref}}$	Absorbância da referência no mesmo comprimento de onda da irradiação
CI	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistema



Co(II)Pc	Ftalocianina de cobalto
DMSO	Sulfóxido de dimetilo ou Dimetilsulfóxido
$\vec{E}$	Dipolos induzidos das moléculas
EROs	Espécies reativas de oxigênio
$F'$	Áreas sob o espectro de fluorescência da amostra
$F'_{ref}$	Áreas sob o espectro de fluorescência da referência
F	Intensidade de fluorescência da molécula
$F_0$	Intensidade de fluorescência da molécula na ausência do supressor
$F(\lambda_{exc})$	Intensidade de fluorescência por comprimento de onda
h	Constante de Planck
I	Intensidade de luz irradiada
$I_0$	Intensidade de luz monocromática incidente
$I_{corrigido}$	Curva de espalhamento de luz corrigido
$I_F$	Intensidade de fluorescência
$I_R$	Espectro de Rayleigh
$I_{SP}$	Espectro de espalhamento da solução pura.
$I_{medido}$	Espectro de espalhamento de luz da amostra
$I_T$	Intensidade de luz transmitida
k	Fator instrumental relacionado aos parâmetros do equipamento
K	Função sensibilidade do espectrofluorímetro
$k_q$	Constante de supressão bimolecular
$K_{SV}$	Constante de Stern-Volmer
l	Caminho óptico
M	Molécula orgânica / Cromóforo
M*	Molécula orgânica excitada / Cromóforo excitado
n	Índice de refração
$n_{ref}$	Índice de refração da referência
PGA	Ácido poliglicólico
PI	Polidispersão
PLA	Ácido polilático
PLGA	Ácido poli(lático-co-glicólico)
Q	Receptor / Supressor
Q*	Receptor excitado

---

$R$	Espectro de Rayleigh
$R_N$	Espectro de Rayleigh normalizado
RLS	Espalhamento de luz ressonante
RV	Relaxamento vibracional
$S_0$	Estado fundamental
$S_1$	Primeiro estado excitado
$S_2$	Segundo estado excitado
$S_n$	n-estado singleto
$t$	Tempo
$T_1$	Primeiro estado tripleto
TFD	Terapia fotodinâmica
$T_n$	n-estado tripleto
UV-Vis	Ultravioleta-visível
ZnPc	Ftalocianina de zinco
$X$	Concentração molar da amostra

---

## SUMÁRIO

<b>PREFÁCIO .....</b>	<b>3</b>
<b>1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS EM FOTOFÍSICA MOLECULAR.....</b>	<b>5</b>
1.1 PROCESSOS FOTOFÍSICOS INTRAMOLECULAR .....	5
1.2 PROCESSOS FOTOFÍSICOS BIMOLECULARES .....	7
1.2.1 <i>Processos de supressão de fluorescência</i> .....	10
1.3 EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE FLUORESCÊNCIA .....	12
1.4 EFEITO DO SOLVENTE .....	13
1.5 AGREGAÇÃO.....	13
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>16</b>
2.1 FTALOCIANINAS .....	16
2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA .....	18
2.2.1 <i>Fotossensibilizadores: Ftalocianinas</i> .....	20
2.3 ENCAPSULAMENTO / NANOESFERA.....	21
<b>3 OBJETIVO .....</b>	<b>23</b>
<b>4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA.....</b>	<b>24</b>
4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓPTICA .....	24
4.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA.....	26
4.3 ESPALHAMENTO DE LUZ RESSONANTE.....	29
4.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO .....	30
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
6.1 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DA ALOHPC EM SOLVENTE ETANOL E EM DMSO... 39	
6.2 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO NAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DA ALOHPC ... 44	
6.3 ESTUDO DA ALOHPC EM MISTURA ETANOL/ÁGUA DESTILADA .....	53
6.4 FOTOFÍSICA DA ALOHPC EM NANOESFERAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO .....	68
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>72</b>

---

<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>74</b>
<b>GLOSSÁRIO.....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>86</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE D.....</b>	<b>89</b>
<b>APÊNDICE E.....</b>	<b>90</b>
<b>APÊNDICE F.....</b>	<b>91</b>
<b>APÊNDICE G.....</b>	<b>92</b>

## PREFÁCIO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento utilizado no combate de doenças oncológicas, dermatológicas e oftálmicas, com resultados científicos promissores desde os anos 80. Essa terapia baseia-se nas reações fotofísicas originadas a partir da ação da luz no fotossensibilizador localizadas no tecido afetado. Após a ativação (excitação) destes fotossensibilizadores, espécies reativas de oxigênio (EROs) como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), o hidroperoxila ( $\text{HO}_2$ ), o hidroxila ( $\text{OH}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), são geradas e induzem a apoptose e/ou necrose das células tumorais. No entanto, a escolha do fotossensibilizador é um fator de grande importância no tratamento por TFD, pois devido às propriedades fotofísicas deste a taxa de formação de EROs no tecido cancerígeno pode ser elevada, acarretando conseqüentemente em uma elevada eficiência de tratamento.

Este trabalho consistiu em estudar as propriedades fotofísicas da Hidróxido Ftalocianina de Alumínio (AlOHPc), a qual tem sido estudada como possível fotossensibilizador no tratamento por TFD. Para realização deste trabalho foi proposto estudar a AlOHPc em diferentes meios, buscando compreender como suas propriedades eletrônicas nestes meios.

Inicialmente foi utilizada a técnica de absorção óptica, como o intuito de averiguar a região no espectro de luz visível que a molécula absorve. A compreensão da região de absorção da AlOHPc é de grande importância na TFD, pois a partir da interação com a luz e excitação do fotossensibilizador, desencadeiam-se os processos físico-químicos no tecido cancerígeno, classificados como reações do tipo I e do tipo II na TFD, nas quais ocorrem a formação dos EROs. Também foi utilizada a espectroscopia de fluorescência estacionária, a qual permitiu verificar a região e a intensidade relativa de fluorescência da AlOHPc, e calcular a eficiência quântica de fluorescência da AlOHPc. Conhecer o comprimento de onda de máxima absorção e a região de emissão do fotossensibilizador permite inferir sobre a eficiência do tratamento.

Outra técnica utilizada foi a espectroscopia de espalhamento de luz ressonante, a qual permitiu verificar a formação de agregados moleculares. Detectar a formação de agregados do fotossensibilizador é relevante, pois a agregação molecular geralmente ocasiona a alteração nas propriedades fotofísicas, quando comparadas com as propriedades da molécula em forma monomolecular. E a técnica de fluorescência resolvida no tempo, a qual além de informar os

valores do tempo de permanência da AIOHPc no estado excitado, permitiu detectar a ocorrência de agregados moleculares devido ao meio. O tempo de permanência no estado excitado singlete é uma variável importante na terapia fotodinâmica, pois quanto mais longo esse tempo mais eficiente à formação do estado tripleto e conseqüentemente mais provável a formação de espécies reativas de oxigênio.

A caracterização óptica em diferentes meios é importante devido às interações físico-químicas da molécula com o solvente. Sendo então realizada a caracterização da AIOHPc solubilizada nos solventes etanol e DMSO e verificando se ocorreu alteração nestas propriedades devido à interação da AIOHPc com o solvente (interação soluto-solvente). A interação entre as moléculas de AIOHPc (interação soluto-soluto) é de grande importância, por poder ocasionar alterações nas propriedades fotofísicas. Sendo assim, também foi realizada a caracterização da AIOHPc em função da concentração ( $0,04-363,63 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) averiguando os processos fotofísicos intramolecular e bimoleculares (ou intramoleculares).

Também realizou-se o estudo da AIOHPc em diferentes proporções volumétricas de etanol/água destilada (v/v). Devido às ftalocianinas serem moléculas hidrofóbicas e à utilização desta molécula como fotossensibilizadores ser em meio aquoso (sangue), necessita-se a compreensão das propriedades fotofísicas da AIOHPc em função da proporção de água.

E por fim neste trabalho foi realizado a caracterização da AIOHPc encapsulada em nanoesferas de ácido polilático, utilizada para garantir a solubilidade da AIOHPc em presença de água. No entanto, o encapsulamento pode ocasionar alterações das propriedades monomoleculares do fotossensibilizador, portanto foi verificada e relacionada às propriedades fotofísicas da AIOHPc encapsulada, com os resultados obtidos nos meios anteriores.

---

## 1 FUNDAMENTOS TEÓRICOS EM FOTOFÍSICA MOLECULAR

---

*Este capítulo aborda os processos fotofísicos intramolecular e os processos fotofísicos bimoleculares que pode ocorrer após as moléculas orgânicas interagirem com a radiação eletromagnética na região do UV-Vis. Também descreve sobre o efeito do solvente nas propriedades ópticas da molécula e os tipos de agregações moleculares.*

---

As propriedades fotofísicas de uma molécula orgânica (cromóforo) como a eficiência quântica, o coeficiente de absorção molar e o tempo de permanência no estado excitado, são determinadas pela natureza e pela energia de seus estados eletronicamente excitados. No entanto, devido ao meio a molécula pode ter alterações na estrutura química inicial. A compreensão e a caracterização das energias relativas dos estados eletrônicos dessas moléculas é o objetivo da fotofísica molecular.<sup>1,2</sup>

Após a molécula orgânica absorver radiação eletromagnética, os elétrons no estado de menor energia (estado fundamental  $S_0$ ) são excitados para estados de maior energia (estados excitados,  $S_n$ ), apresentando transições eletrônicas características. No estado excitado a molécula tende a retornar ao estado fundamental por processos radiativos (com emissão de fóton) e não radiativos (sem emissão de fóton).

### 1.1 PROCESSOS FOTOFÍSICOS INTRAMOLECULAR

Os processos intramolecular radiativos e não radiativos são representados no diagrama de Jablonski da Figura 1. A relaxação da molécula excitada por processos intramolecular não radiativos pode ser: **i) conversão interna (CI)**, que ocorre entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin, no qual a molécula no estado excitado mais energético perde energia decaindo para um estado excitado de menor energia, e poderá continuar a dissipar energia por CI até o retorno do elétron ao estado fundamental  $S_0$ ; **ii) relaxamento vibracional (RV)**, onde o elétron no estado vibracional do nível energético perde energia decaindo para o nível vibracional zero do nível energético (fundo de banda); e **iii) cruzamento intersistema (CIS)**, é uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais

de mesma energia (isoenergético) pertencente a estados eletrônicos de diferentes multiplicidade.<sup>3</sup>

No caso da desativação por processos radiativos a molécula excitada retorna para o estado fundamental emitindo um fóton, esse processo é chamado de *fotoluminescência*. No entanto, a fotoluminescência é dividida em duas categorias: **i**) a **fluorescência** ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) (fenômeno investigado neste trabalho) na qual o elétron no estado excitado singleto preserva a multiplicidade de spin que tinha no estado fundamental (Figura 2(b)), isso permite que o seu retorno ao estado fundamental ocorra de forma mais rápida com emissão na ordem de  $10^{-10}$ – $10^{-7}$  s; e **ii**) a **fosforescência** ( $T_1 \rightarrow S_0$ ), a emissão do fóton ocorre a partir de um estado excitado tripleto (Figura 2(c)), no qual o elétron excitado apresenta a mesma multiplicidade de spin do elétron no estado fundamental. O retorno do elétron ao estado fundamental a partir do estado excitado tripleto é considerado uma transição proibida, tornando a emissão lenta, da ordem de  $10^{-3}$ – $10^0$  s.<sup>3</sup>

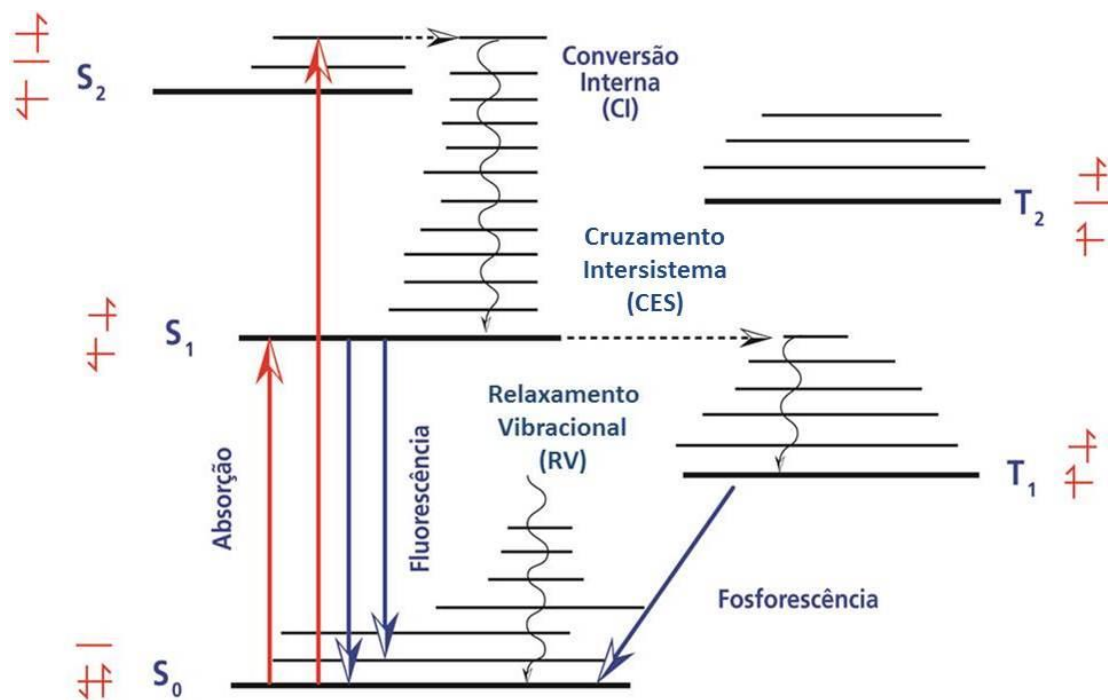


Figura 1 – Diagrama de Jablonski representando os processos monomoleculares que podem ocorrer após interação da molécula com a luz. S<sub>0</sub> é o estado fundamental, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> é o primeiro e o segundo estados excitados singletos, respectivamente. T<sub>1</sub> e T<sub>2</sub> é o primeiro e segundo estados excitados tripletos. Absorção de radiação eletromagnética (setas em vermelho). Processos radiativos por fluorescência ou fosforescência (setas em azul) e por processos não radiativos (setas ondulada e tracejada)



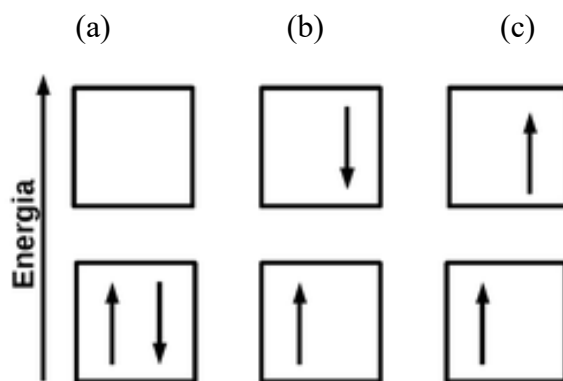


Figura 2 – Representação da orientação do spin no processo de excitação. (a) Spins com diferente multiplicidade e mesma energia, caracterizando o estado fundamental. (b) Spins com diferente multiplicidade e com energias diferentes, caracterizando o estado excitado singlete. (c) Spins com multiplicidade iguais e com energias diferentes, caracterizando o estado excitado tripleto

De forma geral, as diferenças entre os níveis vibracionais do estado fundamental e do estado excitado singlete são semelhantes, de modo que o espectro de fluorescência muitas vezes se assemelha a primeira banda de absorção (imagem especular), isto devido à emissão de um fóton ser tão rápido como a absorção do fóton ( $\approx 10^{-15}$  s), porém a molécula excitada permanece no estado excitado durante um determinado tempo, sendo entre  $10^{-12}$  s até  $10^{-9}$  s (dependendo do tipo de molécula e do meio) antes de emitir um fóton ou submeter-se a processos fotofísicos. Durante a permanência da molécula no estado excitado, esta tende a perder parte da energia absorvida devido às conversões internas e ao rearranjo eletrônico dos orbitais moleculares, causando um deslocamento do espectro de fluorescência para comprimentos de onda de menor energia em relação ao espectro de absorção. A diferença entre o máximo da primeira banda de absorção e o máximo de fluorescência é chamado o deslocamento de Stokes ( $\Delta\lambda$ ).<sup>9</sup>

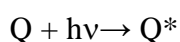
Este parâmetro pode fornecer informações importantes sobre os estados excitados da molécula, como por exemplo, se o momento de dipolo de uma molécula fluorescente é maior no estado excitado do que no estado fundamental  $S_0$ . O deslocamento de Stokes aumenta com o aumento da polaridade do solvente.

## 1.2 PROCESSOS FOTOFÍSICOS BIMOLECULARES

Além dos processos intramolecular descritos anteriormente, a molécula no estado excitado pode retornar ao estado fundamental por processos bimoleculares (ou intermoleculares), no qual ocorre interação entre duas ou mais moléculas similares ou

distintas. Estas interações bimoleculares podem desencadear processo de transferência de energia radiativa e não radiativa, transferência da carga, dissociação química e formação de complexos.

O caso da **transferência de energia radiativa** (ou **transferência de energia trivial**) consiste em duas etapas ocorrendo consecutivamente, sendo a emissão de radiação por parte da molécula doadora no estado excitado ( $M^*$ ) e a posterior reabsorção desta radiação por parte da molécula receptora (Q), como representado abaixo:



A eficiência da transferência de energia radiativa depende de fatores como: a sobreposição espectral entre a emissão do doador e absorção do receptor, do coeficiente de absorção molar do receptor, da concentração do receptor e da eficiência quântica de fluorescência do doador ( $\Phi_D$ ).<sup>4</sup>

Birks propôs um simples modelo cinético para estudar o caso da transferência radiativa entre moléculas idênticas, as quais apresentam tempo de permanência no estado excitado mais longo devido as sucessivas reabsorções e reemissões. O modelo de Birks baseia-se na suposição da probabilidade média de um único fóton emitido ser reabsorvido ( $\bar{\alpha}$ ) e é expresso pela seguinte equação:<sup>9</sup>

$$\tau = \frac{\tau_0}{1 - \bar{\alpha}\Phi_0}, \quad (1)$$

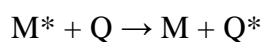
sendo, o tempo de permanência da molécula no estado excitado ( $\tau$ ) mais longo que o tempo de permanência da molécula no estado excitado na ausência de transferência radiativa ( $\tau_0$ ).

O modelo de Birks também pode ser utilizado para analisar o comportamento da eficiência quântica de fluorescência da molécula ( $\Phi_F$ ), a qual tende a ser menor que a eficiência quântica de fluorescência da molécula na ausência de transferência radiativas ( $\Phi_0$ ). Essa diminuição da eficiência quântica é causada pelo aumento da probabilidade do fóton emitido ser reabsorvido e é calculada pela seguinte equação:<sup>9</sup>

$$\Phi_F = \frac{\Phi_0 - \bar{\alpha}\Phi_0}{1 - \bar{\alpha}\Phi_0}. \quad (2)$$

A utilização deste modelo permitiu explicar quantitativamente as alterações das propriedades fotofísicas da AIOHPc em função da concentração.

A **transferência de energia não radiativa** consiste basicamente em envolver simultaneamente o decaimento da molécula doadora no estado excitado ( $M^*$ ) causando a excitação da molécula receptora ( $Q$ ), sendo:



A transferência de energia não radiativa causada pela presença do receptor influencia a eficiência de emissão do doador,<sup>4</sup> mas não altera a forma do espectro de fluorescência e não causa alteração no tempo de permanência do doador no estado excitado (no caso de moléculas do mesmo tipo).<sup>5,9</sup> Dois casos bem conhecidos de transferência de energia não radiativa são:

i) *Teoria de Förster*, que consiste da molécula doadora no estado excitado ( $M^*$ ) transferir energia não radiativa ou ressonante para a molécula receptora ( $Q$ ) via interações do tipo dipolo-dipolo de longo alcance, não envolvendo colisão entre as moléculas, reabsorção ou transferência de elétrons (Figura 3).<sup>6</sup> No entanto, para que ocorra a transferência de energia é necessária uma condição ressonante entre as oscilações dos campos elétricos do estado excitado do doador e do estado fundamental do receptor, além da sobreposição entre o espectro de emissão do doador e o espectro de absorção do receptor e também da orientação espacial entre os dipolos elétricos dos dois estados diretamente envolvidos.

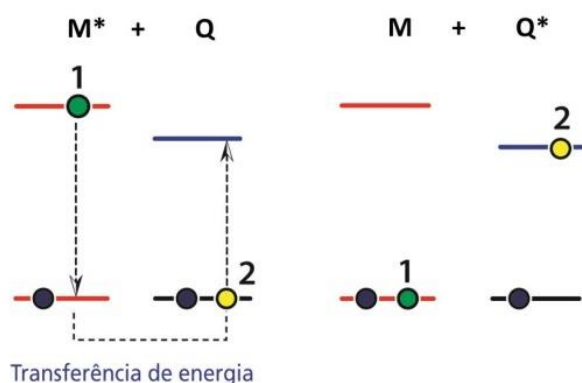


Figura 3 – Teorema de Förster, representação da transferência de energia ressonante mostrando que os elétrons 1 (verde) e 2 (amarelo) permanecem no doador e no receptor, respectivamente, mesmo após a transferência de energia. Fonte<sup>7</sup>

ii) *Teoria de Dexter*, este modelo se aplica especialmente a sistemas onde a distância de transferência intermolecular é muito curta, sendo da ordem entre 8-12 Å para

haver interação entre as nuvens eletrônicas (interpenetração orbital). Como representado na Figura 4, a transferência na radiativa ocorre com a molécula doadora no estado excitado ( $M^*$ ) transferindo um elétron da banda de condução para a banda de condução da molécula receptora (Q), e simultaneamente o receptor transfere um elétron da banda de valência para a banda de valência do doador (M) (recirculação de elétrons ou múltipla-troca). Devido à troca de elétrons esse tipo de transferência é confundido com transferência de carga, no entanto, neste caso não há formação de radicais livres e as cargas da molécula se conservam. Essa transferência de energia não radiativa requer sobreposição direta entre os orbitais envolvidos e a restrição de spin deve ser obedecida para a conservação global de spin.<sup>4,7</sup>

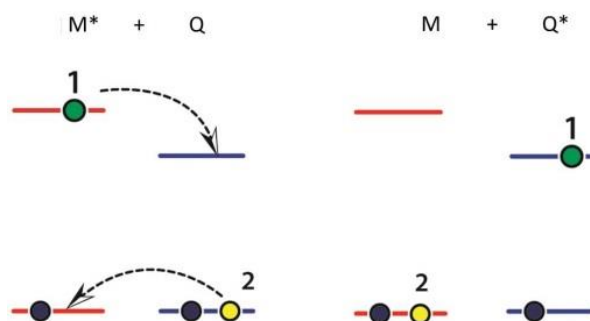


Figura 4 – Representação do teorema de Dexter. Múltipla troca no processo de transferência de energia de Dexter, os elétrons 1 (verde) e 2 (amarelo) trocam de molécula. Fonte<sup>7</sup>

### 1.2.1 Processos de supressão de fluorescência

A interação de uma molécula (M) ou molécula excitada ( $M^*$ ) com uma molécula supressora (Q, do inglês *quencher*) pode resultar na diminuição da intensidade de fluorescência da molécula. Algumas destas interações podem ocorrer por colisões moleculares, formação de complexos não fluorescentes, rearranjo molecular, transferência de energia ou transferência de elétrons.<sup>2,8</sup> A supressão de fluorescência molecular ocasionada devido à presença de um supressor, pode ser atribuída a processos de supressão dinâmica (ou colisional), a processos de supressão estática ou ocorrência de ambos os processos ocorrendo simultaneamente.

No caso da **supressão dinâmica** a molécula excitada colide com o supressor, retornando ao estado fundamental sem emitir fóton. A supressão dinâmica pode ser determinada através da relação entre intensidade de fluorescência da molécula na ausência do supressor ( $F_0$ ) pela intensidade de fluorescência da amostra na presença do supressor ( $F$ ), ou

da eficiência quântica de fluorescência da molécula na ausência do supressor ( $\Phi_0$ ) pela eficiência quântica de fluorescência da amostra na presença do supressor ( $\Phi$ ), ou do tempo de permanência da molécula no estado excitado na ausência do supressor ( $\tau_0$ ) pelo tempo de permanência da molécula no estado excitado na presença do supressor ( $\tau$ ), na qual se a relação for linear obtém-se a constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ), dada por:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\Phi_0}{\Phi_F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV}[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q] \quad (3)$$

onde,  $[Q]$  é a concentração molar do agente supressor e  $k_q$  é constante de supressão bimolecular. Na supressão dinâmica o tempo de permanência da molécula no estado excitado é alterado pela presença do supressor.<sup>9</sup>

A **supressão estática** pode ocorrer de duas formas distintas: *i*) no primeiro caso conhecido como **esfera de supressão efetiva**, define-se ao redor da molécula excitada um volume esférico, na qual se a molécula supressora encontra-se dentro deste volume a emissão da molécula excitada não ocorre (Figura 5(a)). *ii*) O segundo caso é chamado de **formação de complexos não fluorescentes**, que ocorre devido à interação da molécula com o supressor ainda no estado fundamental gerando um complexo não fluorescente (Figura 5(b)). Em ambos os casos o tempo de permanência da molécula no estado excitado não é alterado pela presença do supressor.<sup>9</sup>

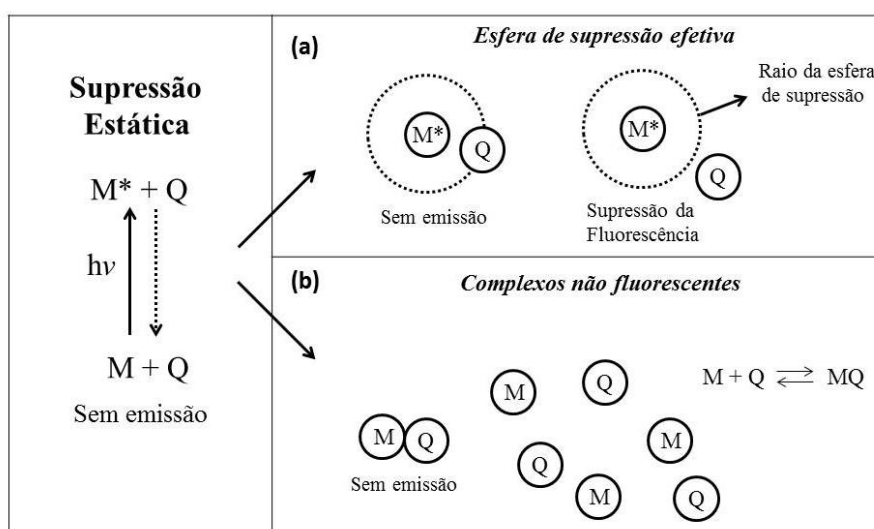


Figura 5 – Representação dos processos de supressão estática. Fonte<sup>9</sup>, imagem alterada

Na supressão estática, a curva de Stern-Volmer pode apresentar relação linear e não linear. No caso de formação de complexos não luminescentes observa-se uma relação linear, sendo obtida a partir da intensidade de fluorescência da molécula ou eficiência quântica, dada por:

$$\frac{F_0}{F} = \frac{\Phi_0}{\Phi} = 1 + k_S[Q], \quad (4)$$

sendo,  $k_S$  a constante de associação. No caso de esfera de supressão efetiva a relação é não linear, e dada por:

$$\frac{F_0}{F} = \exp(V_q N_A [Q]), \quad (5)$$

onde,  $V_q$  é o volume esférico da molécula e  $N_A$  é a constante de Avogadro.

Para o caso onde ocorrer à supressão dinâmica e estática simultaneamente, observa-se o desvio da linearidade da curva de Stern-Volmer.<sup>9</sup>

### 1.3 EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE FLUORESCÊNCIA

A eficiência quântica de fluorescência ( $\Phi_F$ ) é a razão entre os fótons emitidos e os fótons absorvidos, ou seja, informa a eficiência da desativação do estado excitado singlete por emissão de fótons.

O método de cálculo de eficiência quântica de fluorescência utilizado nesse trabalho é um método comparativo e é calculado pela seguinte equação:

$$\Phi_F = \Phi_{ref} \frac{n^2}{n_{ref}^2} \frac{F'}{F'_{ref}} \frac{Abs_{ref}}{Abs} \quad (6)$$

onde,  $\Phi_{ref}$  é a eficiência quântica de fluorescência da referência,  $n$  e  $n_{ref}$  são os índice de refração da amostra e da referência, respectivamente. A  $F'$  e  $F'_{ref}$  são as áreas sob o espectro de fluorescência da amostra e da referência, respectivamente. E  $Abs$  e  $Abs_{ref}$  são os valores de absorvância da amostra e da referência no mesmo comprimento de onda da irradiação.<sup>10</sup>

#### 1.4 EFEITO DO SOLVENTE

No estudo fotofísico de moléculas em solução a escolha do solvente utilizado é de grande importância, pois devido a propriedades do solvente como: polaridade, grupo funcional, viscosidade entre outras, o solvente irá interagir de diferentes formas com a molécula em solução. Essa interação entre moléculas do soluto e do solvente é conhecida como solvatação.

O valor da polaridade do solvente, a qual é determinada pelo momento dipolar ( $\mu$ ) das moléculas do solvente, ocasiona o deslocamento espectral da banda característica de absorção ou emissão das moléculas do soluto, chamando de deslocamento solvatocrômico. Ou seja, a utilização de solventes com alta polaridade tende a causar o deslocamento do pico de absorção ou de emissão do espectro característico das moléculas do soluto para comprimentos de onda de menor energia (deslocamento batocrômico), isto devido à polaridade causar o rearranjo na orientação das moléculas do soluto e conseqüentemente a diminuição entre os níveis de energia, como representado na Figura 6. Quando ocorre o deslocamento para comprimentos de onda de maior energia o efeito é chamado de deslocamento hipsocrômico.<sup>9,11</sup>

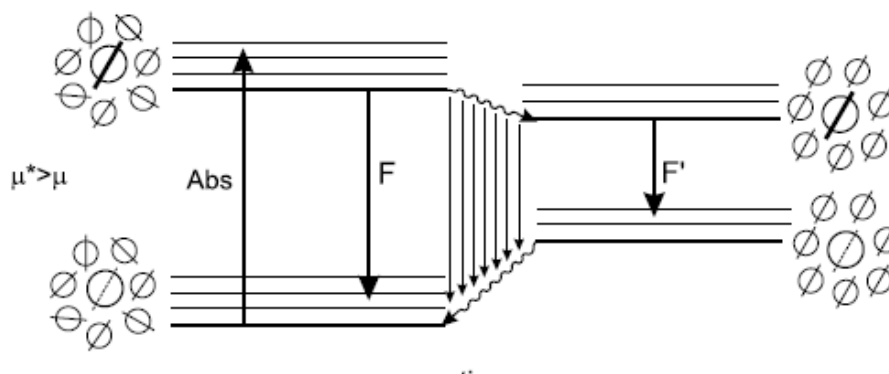


Figura 6 – Comparação do processo de dissipação radiativa por fluorescência: em F moléculas diluídas em solvente com baixo momento dipolar ( $\mu$ ), em F' mesma moléculas diluídas em solvente com alto momento dipolar ( $\mu^*$ ). Fonte<sup>9</sup>

#### 1.5 AGREGAÇÃO

Os agregados moleculares são formados por ligações ou interações químicas entre as moléculas, podendo ser caracterizado pela sua estrutura espacial (posição relativa de partículas no agregado) e pelo número de agregação  $n$  (número médio de partículas no

agregado). O tamanho destes sistemas complexos pode variar entre nanômetros (micelas) a micrometros (filmes finos, membranas).

O estudo da agregação é de grande importância, pois em certos casos os agregados resultantes possuem propriedades diferentes da molécula isolada. No caso das clorofilas, a associação destas moléculas na membrana da tilacóide é responsável pela captura da luz solar e pelo processo de fotossíntese.<sup>12</sup> A formação da membrana celular é outro caso de agregação, na qual os fosfolipídios agregados tem a função de separar o interior da célula do meio exterior.<sup>13</sup> Devido as diferentes propriedades dos agregados, o estudo e aplicação destes abrangem diferentes áreas como a Química, a Física, a Engenharia e a Medicina.

Há muitos aspectos experimentais e teóricos ainda não compreendidos relacionados à formação dos agregados como, por exemplo, a dinâmica de formação de tais sistemas. No trabalho de Aggarwal,<sup>14</sup> são descritos alguns dos mecanismos que favorecem a formação de agregados, sendo:

i) *Interação eletrostática*: são resultantes da interação de cargas opostas entre dipolo-dipolo ou dipolo-íons, cuja magnitude é diretamente dependente da constante dielétrica do meio e da distância entre as cargas;

ii) *Formação de pontes de hidrogênio*: é a interação entre o átomo de hidrogênio de uma molécula com o átomo altamente eletronegativo de outra molécula. Para que ocorra esta formação os monômeros devem apresentar boa aproximação para que as nuvens eletrônicas dos átomos que formam essa ligação se sobreponham. Esta interação é eficiente para distâncias curtas e apresentam boa estabilidade no agregado formado;

iii) *Empilhamento  $\pi$ - $\pi$*  (do inglês,  *$\pi$ - $\pi$  stacking*): ocorre a uma atração não covalente entre anéis aromáticos, empilhando-os. São atribuídas às interações bimoleculares;

iv) *Interação hidrofóbica*: está interação acontece ao adicionar moléculas hidrofóbicas em solução aquosa. As moléculas hidrofóbicas (apolares) interagem entre si, minimizando o contato com as moléculas polares.

Entre os agregados moleculares existem três importantes tipos de agregado que possuem arranjo molecular altamente ordenado, sendo estes arranjos conhecidos como: agregado tipo J, agregado tipo H e agregado tipo HJ. No caso do agregado tipo H (Figura 7(a)) as moléculas são dispostas face-a-face e devido a maior área de contato este agregado apresenta maior estabilidade, quando comparado ao agregado tipo J (Figura 7(b)), o qual possui arranjo molecular lado-a-lado. A formação do agregado misto tipo HJ é de difícil observação, e o arranjo das moléculas com contato face-a-face não é completo (Figura 7(c)).



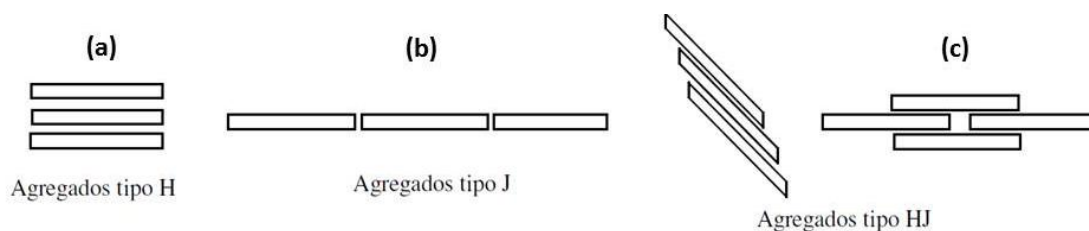


Figura 7 – Representação da geometria dos tipos de agregados: (a) agregado H, (b) agregado J e (c) agregado HJ

Estes tipos de agregados apresentam diferentes propriedades eletrônicas e ópticas quando comparadas com as propriedades da molécula na forma monomolecular. No caso dos agregados tipo J observa-se o deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda de menor energia, e os agregados do tipo H apresentam deslocamento da banda de absorção para comprimentos de onda de maior energia. Basicamente este efeito pode ser explicado da seguinte forma: os agregados do tipo J tem o ângulo entre o momento de transição e a linha que une o centro dos monômeros sendo zero, e os dipolos induzidos orientam-se de tal forma que o polo positivo de um deles fica próximo do polo negativo do outro, conseqüentemente diminuindo a energia de transição e deslocando a banda de absorção para comprimentos de onda de menor energia (Figura 8(a)). Nos agregados tipo H, o momento de transição do monômero é perpendicular à linha que os une, desta forma a onda eletromagnética induz a formação de dois dipolos, onde cargas semelhantes se aproximam aumentando a energia de transição e deslocando a banda de absorção para comprimentos de onda de maior energia (Figura 8(b)).<sup>14</sup>

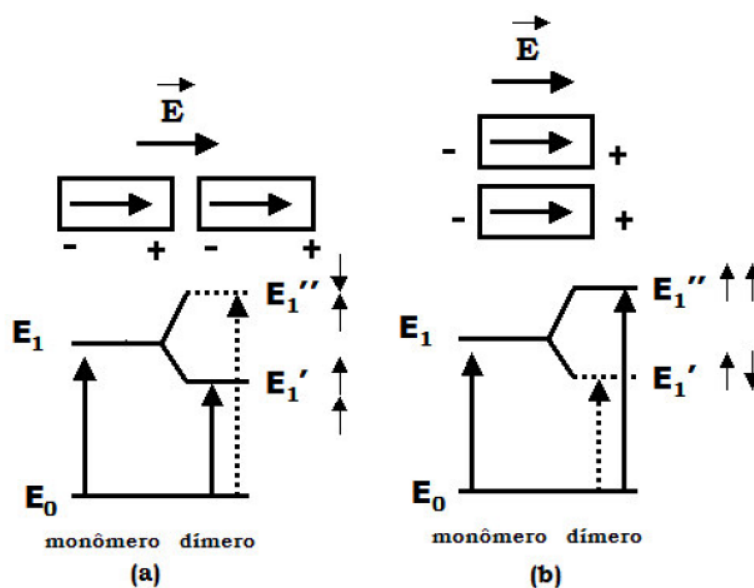


Figura 8 – Diagrama de energia para dímeros com diferentes arranjos geométricos dos dipolos de transição: (a) agregados tipo J; (b) agregados tipo H. A seta continua representam a transição de maior probabilidade e as setas pontilhadas a de menor probabilidade.  $\vec{E}$  representa o dipolos induzido da molécula

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICAS

---

*Neste capítulo são apresentadas algumas informações sobre as ftalocianinas e suas aplicações, em especial na utilização como fotossensibilizador no tratamento por terapia fotodinâmica (TFD). Também é abordada a importância do encapsulamento do fotossensibilizadores para a utilização na TFD.*

---

### 2.1 FTALOCIANINAS

As ftalocianinas foram descobertas acidentalmente em 1907 por Braun e Tchernic na *South Metropolitan Gas Company* em Londres, após sintetizarem a *o*-cianobenzamida com a ftalamida e o anidrido acético e observar a formação de um composto escuro e insolúvel em água, o qual viria a ser classificado como ftalocianina e ter sua estrutura química compreendida somente em 1930 pelo Prof. Reginald P. Linstead.<sup>15</sup> O nome ftalocianina, do inglês *phthalocyanine* foi concebido como a combinação do prefixo *phthal*, originalmente do grego *naphtha* (óleo de rocha), para enfatizar a associação com seus vários precursores derivados do ácido ftálico e da palavra grega *cyanine* (azul escuro).<sup>16</sup>

A estrutura química das ftalocianinas é formada por quatro unidades de indol (Figura 9(a)) que são unidos por átomos de nitrogênio (Figura 9(b)). O indol é um composto orgânico aromático heterocíclico. As ftalocianinas são moléculas de origem sintética e planares. O macrociclo é formado por 18 elétrons  $\pi$  conjugados, que conferem a aromaticidade por obedecerem à **regra de Huckel**. A ftalocianina de base livre (sem elemento metálico) é constituída por 32 átomos de carbono, 8 átomos de nitrogênio e 18 átomos de hidrogênio.<sup>17</sup>

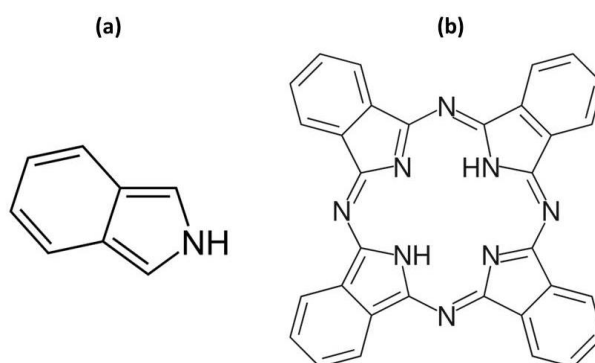


Figura 9 – Representação da estrutura química da: (a) indol e (b) da ftalocianina de base livre

A região central da molécula de ftalocianina pode ser ocupada por um elemento metálico (metalofthalocianina) gerando algumas alterações nas características específicas do composto original. A Figura 10 mostra os espectros de absorção característicos da ftalocianina de base livre (sem elemento metálico) e da ftalocianina com elemento metálico (metalofthalocianina), observa-se que as ftalocianinas possuem duas bandas de absorção. A banda Soret (ou banda B), a qual ocorre entre 300-400 nm, com um largo pico de absorção e é caracterizada por transferência eletrônica entre os orbitais moleculares dos grupos indol. As transições eletrônicas ( $a_{2u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ ) originadas na banda Soret causa a redistribuição e o aumento da densidade eletrônica ao redor dos átomos de nitrogênio que ligam os grupos indol. A banda Q é originada por transferências eletrônicas entre os orbitais moleculares dos grupos indol e os anéis benzênicos ( $a_{1u}(\pi) \rightarrow e_g(\pi^*)$ ). As variações de densidade eletrônica devido às transições da banda Q não induzem a uma carga pontual, mas ao invés disso se espalha por toda a molécula. Na banda Q se observa a formação de três picos de absorção na região entre 600-750 nm. O pico de maior intensidade de absorção tem o valor do coeficiente de absorção molar ( $\epsilon$ ) característico da ordem de  $10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  e os outros dois picos de menor intensidade correspondem a transições vibracionais. A banda Soret e a banda Q são atribuídas às transições eletrônicas dos orbitais  $\pi$  (Homo) para o orbital  $\pi^*$  (Lumo) do macrociclo.<sup>16,18,19</sup>

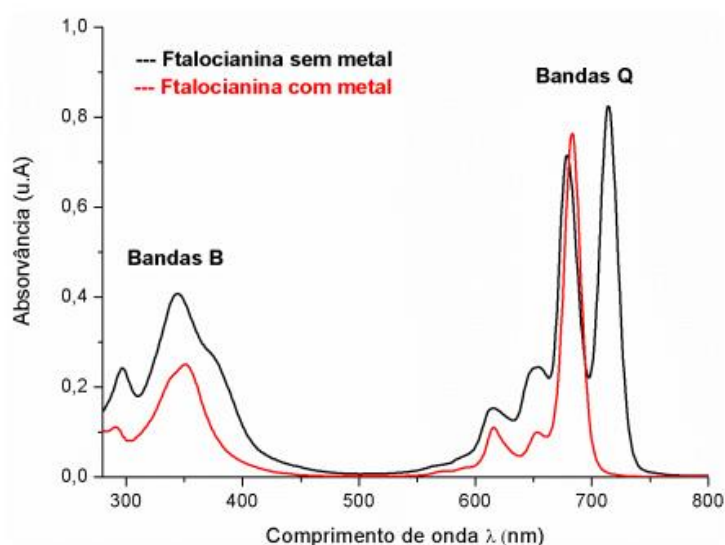


Figura 10 – Espectro de absorção característico da ftalocianina sem metal central (linha preta) e da ftalocianina com metal central (linha vermelha)

Inicialmente as ftalocianinas eram utilizadas como corantes na indústria têxtil.<sup>20</sup> No entanto, devido a melhor compreensão das propriedades das ftalocianinas como: alta

transferência de elétrons, moléculas não tóxicas, hidrofobicidade, alta estabilidade física e química, entre outras, elas tem sido estudadas e aplicadas em diversas áreas. Braik e colaboradores<sup>21</sup> tem utilizado derivados da ftalocianina de cobalto (Co(II)Pc) no desenvolvimento de filmes finos aplicados como sensores de perclorato. No desenvolvimento de células solares, Yuen e colaboradores<sup>22</sup> tem utilizado diferentes metaloftalocianinas com fulereno buscando o desenvolvimento de células solares com elevadas taxas de eficiência de conversão de energia. As ftalocianinas também têm sido aplicadas no desenvolvimento de cristais líquidos.<sup>23,24</sup> E dentre outras áreas, verifica-se muitos estudos sendo realizados utilizando as ftalocianinas como fotossensibilizadores no tratamento medicinal por terapia fotodinâmica (TFD),<sup>17,25</sup> aplicação está que é de interesse neste trabalho.

## 2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento utilizado no combate a doenças oncológicas,<sup>26</sup> dermatológicas,<sup>27</sup> oftalmológicas<sup>28</sup> e também pode ser utilizado na eliminação de microrganismos tais como bactérias, fungo e vírus.<sup>29</sup> O termo fotodinâmica começou a ser utilizado pelo von Tappeiner em 1904, para descrever as reações química que consumiam oxigênio induzidas pela fotossensibilização. Após estudos, von Tappeiner publicou que o tratamento por TFD consistia basicamente da utilização de um fotossensibilizador, de oxigênio e de luz na região do visível, no entanto, devido aos equipamentos e conhecimentos físico-químico da época, o tratamento por TFD só passou a apresentar resultados mais promissores a partir dos anos 80.<sup>30</sup>

Para iniciar o processo de fotossensibilização e tratamento por TFD o fotossensibilizador deve ser adicionado na região desejada ou acumular-se no tecido cancerígeno após ser injetado na corrente sanguínea. A região então é irradiada com fonte de luz, de preferencia no comprimento de onda de maior absorção do fotossensibilizador, iniciando as reações fotofísicas e fotoquímicas desejadas.<sup>31,32</sup> Estas reações geram produtos fototóxicos danosos ao tecido cancerígeno ocasionando a morte das células alvo (**células neoplásticas**). Como vantagem da utilização da TFD tem-se alta taxa de seletividade de destruição do tecido cancerígeno e baixos efeitos colaterais quando comparados com os efeitos da quimioterapia, da radioterapia ou da cirurgia.<sup>26,33</sup>

Para uma boa eficiência da TFD, além da escolha do fotossensibilizador com as propriedades ideais para o tratamento, a escolha do comprimento de onda de irradiação (ou

faixa de comprimento) é de grande importância. Estudos mostram que a irradiação com comprimentos na região do vermelho e do infravermelho (600-1200 nm) apresentam maior profundidade de penetração no tecido celular, como representado na Figura 11.<sup>34,35</sup> No entanto, para comprimentos de onda maiores que 800 nm a energia da irradiação é baixa, resultando em baixa taxa de oxigênios singletos ( $^1\text{O}_2$ ) formado durante os processos fotofísicos da TFD.<sup>36</sup>

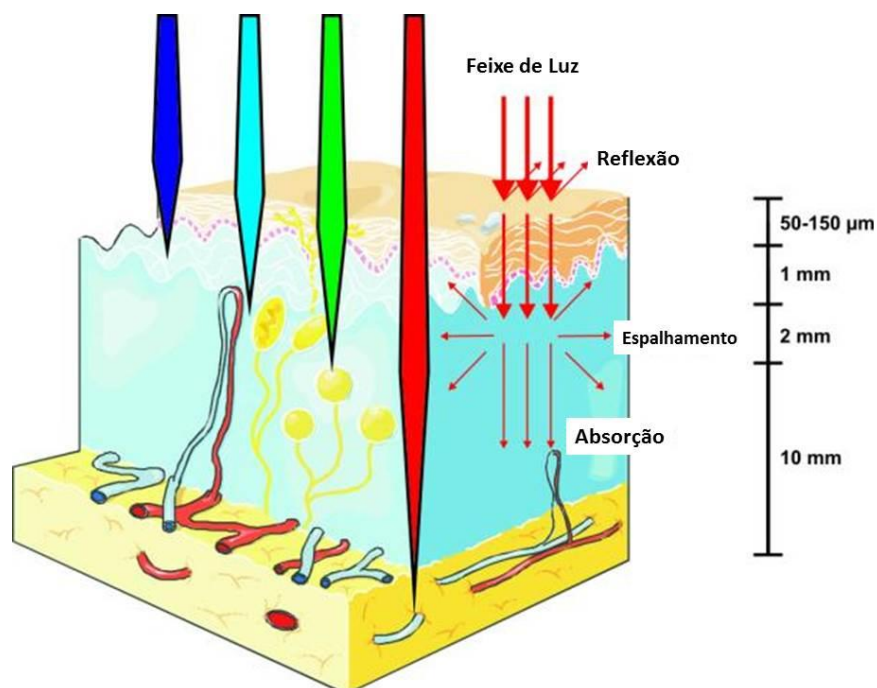


Figura 11 – Representação da profundidade de penetração da radiação eletromagnética na região do visível na pele humana. Fonte<sup>34</sup>, imagem modificada

Os processos fotofísicos necessários para a terapia fotodinâmica consistem inicialmente da irradiação do fotossensibilizador ocasionando a excitação deste para um estado excitado singlete. Neste estado excitado singlete ocorre a transição por cruzamento intersistema do fotossensibilizador excitado para o primeiro estado excitado tripleto, o qual pode desencadear dois tipos de reações, com representado na Figura 12.<sup>37</sup> Na reação do **tipo I**, o fotossensibilizador já no estado tripleto transfere elétrons para as moléculas vizinhas formando radicais livres ou íons radicais, os quais ao reagirem com o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) levam a produção de espécies de oxigênio reativos como: ânions superóxidos ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e radicais hidroxilas ( $\text{OH}^-$ ), que são capazes de oxidar varias moléculas causando danos irreparáveis ao tecido cancerígeno.<sup>38,39</sup> Na reação do **tipo II** ocorre transferência direta da energia não radiativa para o oxigênio que encontra-se naturalmente no estado tripleto ( $^3\text{O}_2$ ),<sup>34</sup> levando à formação de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) que é altamente

citotóxico e capaz de matar diretamente células neoplásticas através da indução de **apoptose** e/ou **necrose**.<sup>40,41</sup>

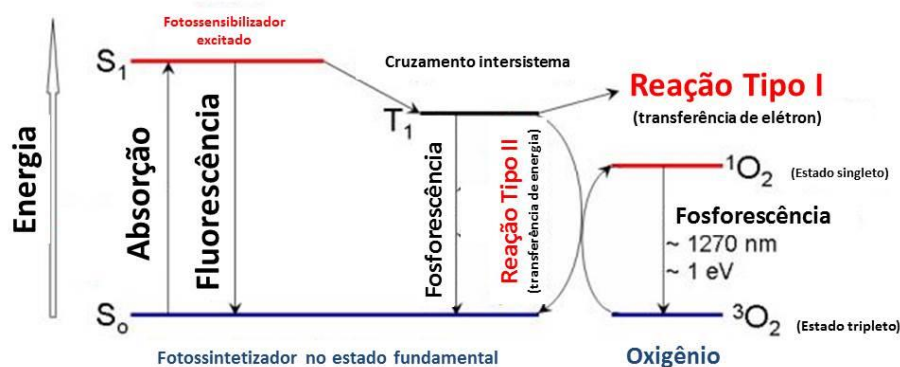


Figura 12 – Representação do diagrama de Jablonski após excitação do fotossensibilizador ( $S_0 \rightarrow S_1$ ), com cruzamento intersistemas entre o estado excitado singlete para o estado excitado tripleto do fotossensibilizador ( $S_1 \rightarrow T_1$ ). Reação do tipo I e representação da formação de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) na reação tipo II. Fonte<sup>34</sup>, imagem modificada

### 2.2.1 Fotossensibilizadores: Ftalocianinas

Os fotossensibilizadores são moléculas capazes de absorver radiação eletromagnética e transferir esta energia por transferência de energia ou de elétrons para outras moléculas, este processo é à base do tratamento por terapia fotodinâmica (TFD). Após os fotossensibilizadores serem injetados na corrente sanguínea, eles são transportados por afinidade com a lipoproteína do plasma sanguíneo<sup>42</sup> e tende a se concentrar no tecido cancerígeno.<sup>43</sup> Para que ocorra boa eficiência do tratamento por TFD o fotossensibilizador deve apresentar: baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada, rápida eliminação pelo corpo, alta seletividade e penetração no tecido cancerígeno, formação do estado tripleto excitado com alta taxa de transferência de energia para os oxigênios tripletos, baixa agregação em meio aquoso e alto coeficiente de absorção molar para absorção na região entre 600-750 nm.<sup>44,45</sup>

No entanto, devido às propriedades necessárias para utilização de moléculas como fotossensibilizador na TFD, estes acabaram sendo classificados em primeira e segunda geração de fotossensibilizadores. Na primeira geração, são encontrados os fotossensibilizadores derivados da Hematoporfirina (HpD), molécula esta encontrada nos glóbulos vermelhos e pertencente ao grupo das porfirinas.<sup>46,47</sup> Este fotossensibilizador foi aprovado para uso clínico no tratamento de câncer de bexiga por terapia fotodinâmica em 1993 no Canadá com o nome de Photofrin<sup>®</sup> (Axcan Pharma, Inc),<sup>48</sup> porém apesar de

apresentar resultados positivos nos tratamentos, este fotossensibilizador apresentava limitações, como: baixa intensidade de absorção na região entre 600-750 nm, longa permanência na pele deixando o paciente sensível a luz por semanas e baixo acúmulo do tecido cancerígeno.<sup>47,49</sup> Limitações semelhantes foram identificadas em outros fotossensibilizadores desenvolvidos utilizando moléculas pertencentes ao grupo das porfirinas.<sup>17</sup>

Devido a estes limitantes outras moléculas como as ftalocianinas começaram a ser estudadas como fotossensibilizadores, pertencendo então à segunda geração. Algumas ftalocianinas apresentarem propriedades ópticas ideais para a aplicação no tratamento médico por TFD, como elevado coeficiente de absorção molar na região de 600-750 nm, região que corresponde a uma **janela terapêutica** ideal para o tratamento.<sup>50</sup> De acordo com de Oliveira e colaboradores<sup>17</sup> o primeiro composto fotossensibilizador a base de ftalocianina e com permissão para tratamento médico em tumores de coróide, olhos, pálpebras e bexiga é o Photosens<sup>®</sup>, e têm apresentado bons resultados.<sup>51</sup> Outros compostos a base de ftalocianina já foram desenvolvidos, no entanto ainda estão em fase de testes clínicos.

### 2.3 ENCAPSULAMENTO / NANOESFERA

Apesar das vantagens e bons resultados que a terapia fotodinâmica tem apresentado, a hidrofobicidade da maioria dos fotossensibilizadores tem sido uma das maiores dificuldades neste tratamento por causar à agregação do fotossensibilizador devido o meio aquoso (sangue), alterando suas propriedades fotofísicas. Sendo assim, uma alternativa que tem sido pesquisada é o encapsulamento do fotossensibilizador.

O encapsulamento de fotossensibilizador permite a liberação deste em tecidos preferenciais, buscando proporcionar vantagens e contornando limitações de: propriedades físico-químicas (solubilidade), farmacodinâmicas (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinéticas (controle da absorção e distribuição tecidual), além de possibilitar redução da toxicidade local e sistêmica.<sup>52</sup> Exemplos de tipos de encapsulamento utilizados no transporte de fotossensibilizador são as nanopartículas poliméricas biodegradáveis, as nanoemulsões, os lipossomos, as nanopartículas magnéticas, as nanopartículas lipídicas, os dendrímetros, entre outros.<sup>53</sup>

As nanopartículas poliméricas, são sistemas carreadores de fotossensibilizador que apresentam diâmetro inferior a 1  $\mu\text{m}$ .<sup>54</sup> As nanopartículas são divididas em nanoesferas e em

nanocápsulas, por apresentarem diferente composição e organização estrutural. As nanocápsulas (Figura 13(a) e (b)) são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fotossensibilizador estar disperso neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas (Figura 13(c) e (d)), que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fotossensibilizador pode ficar retido ou adsorvido.

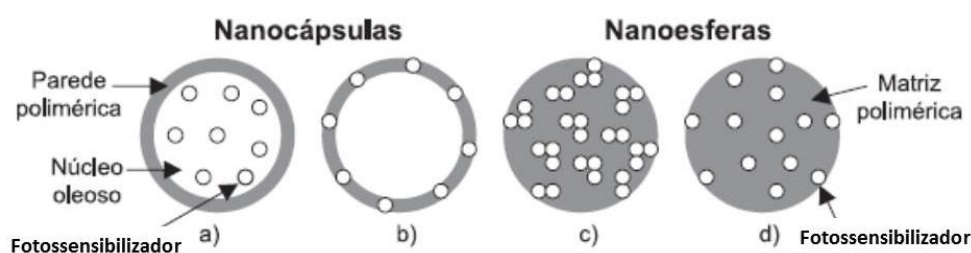


Figura 13 – Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: (a) fotossensibilizador dissolvido no núcleo oleoso da nanocápsula; (b) fotossensibilizador adsorvido à parede polimérica da nanocápsula; (c) fotossensibilizador retido na matriz polimérica da nanoesfera; (d) fotossensibilizador adsorvido ou disperso na matriz polimérica da nanoesfera. Fonte **Erro! Indicador não definido.**, imagem alterada

A utilização de polímeros no encapsulamento de fotossensibilizador tem-se mostrado uma alternativa positiva para aumentar a biocompatibilidade e a dispersão de compostos que são insolúveis em água, garantindo assim a dispersão do fotossensibilizador em meio aquoso. Alguns dos polímeros mais estudados são: o ácido polilático (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e os copolímeros ácido poli(lático-co-glicólico) (PLGA). Esses polímeros apresentam baixa toxicidade e consistem de materiais biocompatíveis, os quais são degradados *in vivo* em fragmentos menores e facilmente excretados.<sup>55</sup>

Alguns resultados sobre a utilização de polímeros no encapsulamento de fotossensibilizadores já tem sido publicados, como por exemplo, o apresentado por Ricci-Junior e colaboradores<sup>56</sup>, no qual se realizou o encapsulamento da ftalocianina de zinco (ZnPc) utilizando o polímero PLGA e obtendo um sistema hidrofílico de tamanho apropriado para acumular-se na região tumoral e sem alteração significativa das propriedades do fotossensibilizador.

No entanto, o encapsulamento do fotossensibilizador pode trazer algumas desvantagens como prolongar a fotossensibilização do tecido e causar alterações nas propriedades fotofísicas características do fotossensibilizador, quando em forma monomolecular.<sup>57</sup>



### 3 OBJETIVO

Este trabalho tem como objetivo realizar a caracterização das propriedades fotofísicas da AIOHPc em diferentes meios, utilizando as técnicas de absorção óptica, de fluorescência estacionária, de fluorescência resolvida no tempo e de espalhamento de luz ressonante. E também calcular os valores de eficiência quântica de fluorescência, da constante de Stern-Volmer e do coeficiente de absorção molar. Para isto:

- Investigou-se as propriedades fotofísicas da AIOHPc nos solventes etanol e sulfóxido de dimetilo (DMSO) comparando-as, e em seguida analisando o comportamento destas propriedades em função da concentração. Este estudo buscou compreender os processos fotofísicos monomoleculares e bimoleculares, como as interações soluto-solvente e soluto-soluto, que podem ocorrer nestes meios após a interação da AIOHPc com a luz;

- Realizou-se a caracterização da AIOHPc em diferentes proporções volumétricas de etanol/água (v/v). Sabe-se que a AIOHPc é uma molécula hidrofóbica e em presença de água ela tende a agregar-se, então este estudo consiste em verificar se ocorre alteração das propriedades fotofísicas da AIOHPc em função do aumento da proporção de água nas soluções;

- Foi realizado o encapsulamento da AIOHPc em nanoesferas de PLA. Nesta parte buscou-se verificar se as propriedades fotofísicas da AIOHPc como forma monomolecular seriam mantidas.

---

## 4 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA

---

*As técnicas de caracterização óptica utilizadas neste trabalho foram: espectroscopia de absorção óptica (UV-Vis), espectroscopia de fluorescência estacionária, espalhamento de luz ressonante e espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo.*

---

### 4.1 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓPTICA

A espectroscopia de absorção óptica permite a caracterização de moléculas e materiais em geral, através da investigação das transições eletrônicas.<sup>58,59</sup> Durante este trabalho foi utilizado dois modelos de espectrofotômetros para a caracterização das transições eletrônicas da AIOHPc.

O espectrofotômetro da Hitachi modelo Double Beam U-2900 (Figura 14(a)) com comprimento de onda variável e feixe duplo, alocado no Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, o qual foi utilizado no estudo do efeito da concentração e do solvente puro sobre as propriedades ópticas da AIOHPc. Este equipamento é constituído por: fonte de radiação (lâmpada de deutério/tungstênio) permitindo a caracterizar do material entre a região de 190 nm até 1100 nm, espelhos, monocromador e detectores, conforme representado na Figura 14(b). Durante a medida a radiação produzida pela fonte é selecionada pelo monocromador, essa luz monocromática incide na amostra onde é absorvida e/ou transmitida. O detector coleta a luz transmitida e compara com a intensidade do feixe de referência (não passa pela amostra). A diferença entre as intensidades representa a absorção ou absorbância da amostra para aquele comprimento de onda. O mesmo procedimento é repetido automaticamente para cada comprimento de onda presente no espectro da lâmpada (fonte), resultando no espectro de absorção óptico do material.

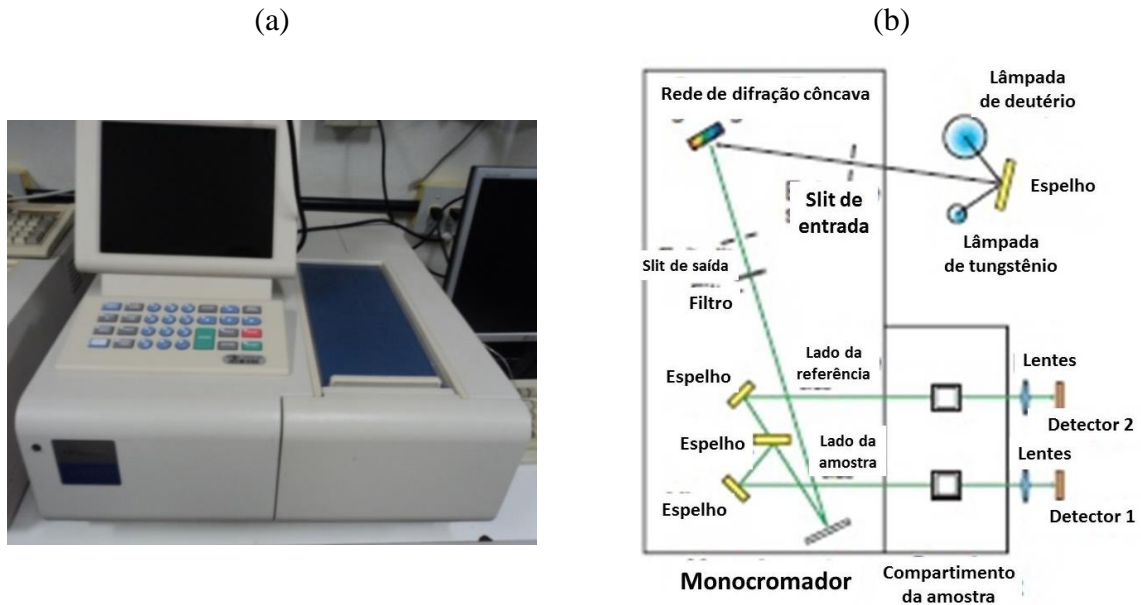


Figura 14 – (a) Espectrofotômetro da Hitachi modelo Double Beam U-2900, localizado no Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. (b) Representação do arranjo instrumental do espectrofotômetro da Hitachi modelo Double Beam U-2900. Fonte<sup>60</sup>, imagem modificada

O espectrofotômetro modular da Ocean Optics modelo Red Tide USB650 com comprimento de onda variável e feixe único, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto (Figura 15(a)), foi usado para o estudo da AIOHPc em diferentes proporções volumétricas de etanol/água (v/v) e em nanoesferas poliméricas contendo a AIOHPc. Como representado na Figura 15(b) este equipamento é constituído por: uma fonte de luz (lâmpada de tungstênio) permitindo a caracterizar do material entre a região de 300 nm até 1000 nm, entrada do feixe de luz (1), regulador do slit de entrada de luz (2), filtro de radiação óptica (3), espelhos para colimação do feixe de luz (4 e 6), rede de difração (5), detectores da intensidade da luz transmitida (7, 8, 9 e 10). O espectro de absorção óptico da amostra neste equipamento é obtido inicialmente registrando o espectro característico da fonte de radiação (lâmpada) no software *SpectraSuite*, seguido do espectro característico na ausência da radiação, obtido através do bloqueio do caminho óptico (espectro escuro). Em seguida a amostra é inserida no porta cubeta e o software automaticamente calcula a diferença da intensidade do espectro da lâmpada e do espectro escuro pela intensidade da luz transmitida da amostra, gerando assim o espectro de absorção da amostra.



Figura 15 – (a) Espectrofotômetro modular da Ocean Optics modelo Red Tide USB650, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto. (b) Representação do sistema de detecção do espectrofotômetro modular Ocean Optics Red Tide USB650. Fonte<sup>61</sup>

A intensidade de absorção do material (absorbância,  $A$ ) depende do número de moléculas que possuem iguais capacidades de absorção e estão situados no caminho óptico do feixe de radiação eletromagnética. A absorbância pode ser obtida pela equação:

$$A = -\log \left( \frac{I_T}{I_0} \right) = \varepsilon l X, \quad (7)$$

onde,  $I_0$  é a intensidade de luz monocromática incidente,  $I_T$  é a intensidade de luz transmitida,  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar [ $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ],  $l$  é o caminho óptico [cm] e  $X$  é a concentração molar da amostra [ $\text{mol L}^{-1}$ ]. Essa teoria é conhecida como lei de Beer-Lambert,<sup>59,62</sup> e a partir dela foi possível estimar o valor do coeficiente de absorção molar da AIOHPc.

## 4.2 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA ESTACIONÁRIA

O uso da espectroscopia de fluorescência estacionária permitiu obter o espectro de fluorescência da AIOHPc em solução. O espectro de fluorescência estacionária foi obtido a partir de uma fonte de radiação eletromagnética (lâmpada de xenônio), a qual é limitada a uma luz monocromática usando um monocromador para a excitação da amostra. Essa luz monocromática incide na amostra sendo absorvida e consequentemente causando a fluorescência, cuja passa por outro monocromador posicionado à  $90^\circ$  do feixe incidente,

permitindo registrar no detector a intensidade de fluorescência em função do comprimento de onda.

Para o estudo da fluorescência da AIOHPc foram utilizados dois espectrofluorímetros da Shimadzu modelo RF-5301PC (Figura 16). Um dos espectrofluorímetros utilizado está localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto, neste equipamento foram realizadas as medidas de fluorescência da AIOHPc em diferentes proporções volumétricas de etanol/água (v/v) e da nanoesfera polimérica contendo AIOHPc. O outro espectrofluorímetro encontra-se no Grupo de Polímeros “Prof. Bernhard Gross” no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo e neste equipamento foram realizadas as medidas de fluorescência da AIOHPc em diferentes solventes e da AIOHPc em diferentes concentrações.

Estes espectrofluorímetros são compostos por: fonte de radiação eletromagnética posicionado a 90° do detector, dois monocromadores sendo um para selecionar o comprimento de onda de emissão da amostra e o outro para o comprimento de onda da excitação. Com a possibilidade de baixa intensidade do sinal de emissão, os espectrofluorímetros operam com tubos fotomultiplicadores para amplificação do sinal. A configuração típica dos espectrofluorímetros é representada na Figura 17.<sup>62,63</sup>



Figura 16 – Espectrofluorímetro da Shimadzu modelo RF-5301PC, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto

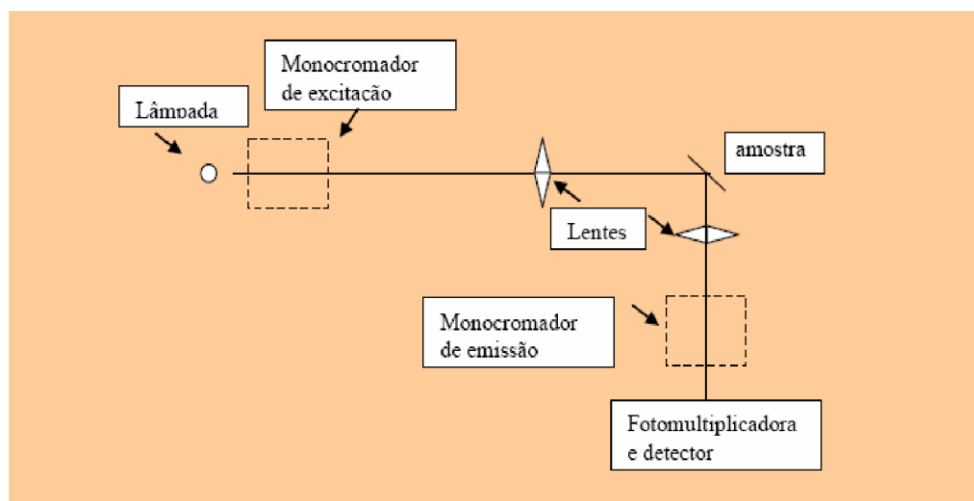


Figura 17 – Representação do espectrofluorímetro

A intensidade de fluorescência ( $I_F$ ) de uma molécula fluorescente é proporcional à concentração, e esta relação pode ser estimada pela seguinte equação<sup>9</sup>:

$$I_F(\lambda_{exc}, \lambda_{emi}) = kF(\lambda_{emi})I_0(\lambda_{exc})\{1 - \exp[-2,3\varepsilon(\lambda)lc]\} \quad (8)$$

ou pode ser dada em função do valor da absorbância do composto<sup>9</sup>:

$$I_F(\lambda_{exc}, \lambda_{emi}) = kF(\lambda_{emi})I_0(\lambda_{exc})\{1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}\} \quad (9)$$

sendo,  $\lambda_{exc}$  é o comprimento de onda excitação,  $\lambda_{emi}$  é o comprimento de onda de emissão,  $I_0(\lambda_{exc})$  é a intensidade do feixe incidente sobre a amostra,  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar no comprimento de onda,  $A(\lambda_{exc})$  é a absorbância no comprimento de onda de excitação,  $F(\lambda_{exc})$  é a variação da intensidade de fluorescência por comprimento de onda com condição normalizada ( $\int_0^\infty F(\lambda_F)d\lambda_F = \Phi_F$ ) e  $k$  é um fator instrumental relacionados aos parâmetros do equipamento.

Então com base nas Equações 8 e 9 a intensidade de fluorescência de uma molécula fluorescente irá apresentar três comportamentos. No primeiro comportamento ocorre o aumento linear da intensidade de fluorescência em função da concentração, ou em função da absorbância (para valores menores que 0,05 u.a.). No segundo, o comportamento da intensidade de fluorescência aumenta de forma não linear em função da concentração (ou absorbância), e no terceiro comportamento a intensidade de fluorescência tende a saturação em função da concentração (ou absorbância).<sup>9</sup>

No entanto, fatores como a transferência de energia radiativa entre moléculas da mesma espécie (item 1.2) e efeito de filtro interno podem causar a diminuição da intensidade de fluorescência esperada. O efeito de filtro interno ocorre devido à solução apresentar um alto número de moléculas (alta concentração), ocasionando à atenuação do feixe de radiação incidente, ou seja, o feixe de radiação não irradia proporcionalmente a mesma quantidade de moléculas.<sup>9</sup>

### 4.3 ESPALHAMENTO DE LUZ RESSONANTE

As medidas de espalhamento de luz ressonante foram realizadas utilizando o espectrofluorímetro da Shimadzu modelo RF-5301PC, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto. O espalhamento de luz ressonante foi utilizada no estudo da AIOHPc em diferentes proporções volumétricas de etanol/água destilada (v/v).

A técnica de espalhamento de luz ressonante (do inglês, *Resonant Light Scattering – RLS*) consiste da interação das moléculas com a radiação eletromagnética. Essa técnica tem se mostrado extremamente útil devido a sua alta sensibilidade e seletividade na verificação da existência de agregados (dímeros, trímeros, entre outros). De acordo com Pasternack e colaboradores,<sup>64,65</sup> o aumento do sinal de espalhamento na região espectral de absorção indica a formação de espécies de moléculas agregadas. O espectro experimental de RLS das moléculas monomoleculares é diferenciado do espectro de moléculas agregadas por apresentar um mínimo local devido à “perda de fótons” via absorção superpondo-se a qualquer sinal de espalhamento, ou seja, o aumento da intensidade da luz espalhada no comprimento de onda indica espécies de agregados com transição eletrônica.

Os espectros de RLS foram obtidos realizando inicialmente a medida da solução pura (sem AIOHPc) e depois das soluções contendo AIOHPc. Os espectros foram registrados com o detector do equipamento posicionado a 90° da fonte de radiação eletromagnética, durante a varredura simultânea dos monocromadores de excitação e de emissão, ou seja, ambos ajustados inicialmente com mesmo comprimento de onda ( $\Delta\lambda=0$ ) varrendo automaticamente a região entre 300 até 900 nm.

A técnica de RSL consiste em analisar a extensão com que a partícula/agregado absorve ou espalha luz dependendo do seu tamanho, da forma e do índice de refração do meio. No entanto, o espalhamento causando por pequenas partículas esféricas muito menores

do que o comprimento de onda da radiação incidente é conhecido como **espalhamento de Rayleigh**. Desta forma, podemos prever a intensidade de luz espalhada da solução na ausência de absorção óptica pela lei de Rayleigh, ou espectro de Rayleigh ( $R$ ), dada por:

$$R \sim \frac{1}{\lambda^4} \quad (10)$$

A utilização da lei de Rayleigh se faz necessária na correção da intensidade do espectro de RLS da solução pura (sem partícula ou agregado) por não absorver na região espectral da amostra e também devido à dependência da sensibilidade do espectrofluorímetro com o comprimento de onda ( $\lambda$ ). Logo, com o espalhamento real da solução pura e utilizando a lei de Rayleigh, pode-se calcular a função sensibilidade do espectrofluorímetro ( $K$ ) por:

$$K = \frac{I_{SP}}{R_N}, \quad (11)$$

onde  $R_N$  é o espectro de Rayleigh normalizado,  $I_{SP}$  é o espectro de espalhamento da solução pura.

Finalmente, utilizando o espectro de espalhamento de luz da amostra ( $I_{medido}$ ) e dividindo pela função sensibilidade do espectrofluorímetro, obtém-se a curva de espalhamento de luz corrigido ( $I_{corrigido}$ ),<sup>66</sup> ou seja,

$$I_{corrigido} = \frac{I_{medido}}{K}. \quad (12)$$

#### 4.4 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO

A espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo é a técnica utilizada para determinar o tempo de permanência da molécula no estado excitado singlete, que a seguir será chamado por tempo de vida ( $\tau$ ), e que fornece informações como: a existência de agregados, a ocorrência de processos de transferência de energia e permite inferir sobre distâncias moleculares. O equipamento utilizado foi o espectrômetro modular de fluorescência da Picoquant modelo Fluotime 200 (Figura 18), localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular no Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto, que utiliza a técnica de contagem de fótons únicos com correlação temporal (do inglês, *time correlated*



*single photon counting*, TCSPC), o tempo de vida da molécula no estado excitado é determinado pela diferença de tempo entre a absorção e a detecção de um pulso de fluorescência.



Figura 18 – Espectrômetro modular de fluorescência da Picoquant modelo Fluotime 200, localizado no Laboratório de Fotofísica Molecular, do Departamento de Física da Universidade Federal de Ouro Preto

A Figura 19(a) mostra o arranjo experimental para medidas de tempo de vida. A Figura 19(b) representa a curva de decaimento formada pelo acúmulo de fótons registrado no detector em função do tempo de detecção.

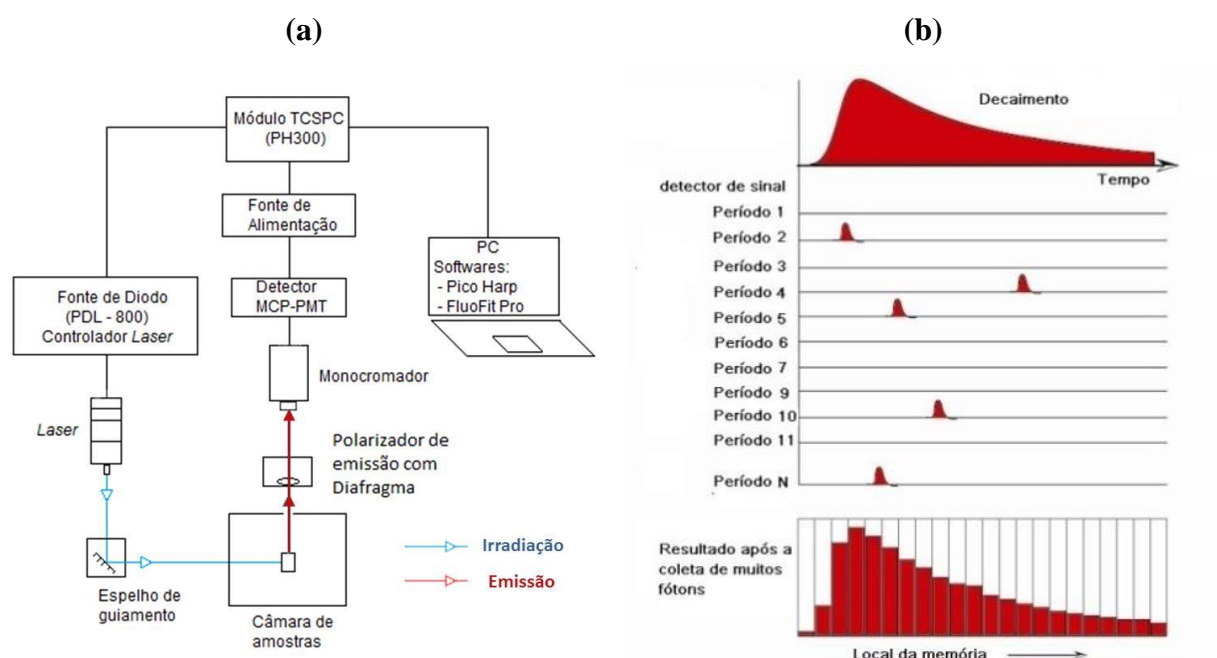


Figura 19 – (a) Arranjo experimental para medidas de tempo de vida. (b) Histograma mostrando o número de fótons de X tempo, que reproduz o comportamento temporal da emissão da amostra

As fontes de excitação utilizadas no estudo do tempo de vida da AIOHPc em diferentes meios foram lasers de diodo pulsado com comprimento de onda fixos em 401 nm e

em 636 nm (utilizados separadamente). A intensidade de luz monocromática irradiada pelo laser e a frequência dos pulsos, foi ajustado pelo modulo pulsed diode laser (PDL) modelo 800-D. Perpendicularmente a luz monocromática de excitação está posicionada o sistema de detecção do equipamento, o qual consiste de um monocromador associado a uma fotomultiplicadora com placa de micro canais (do inglês, microchannel plate-photomultiplier tube, MCP-PMT) da Hamamatsu modelo R3809U-50. A emissão da amostra foi coletada após passar através de um polarizador definido no ângulo mágico ( $\approx 57,74^\circ$ ). O módulo TCSPC registra a diferença de tempo entre o evento de excitação da amostra e a detecção do fóton emitido pelo material e então transfere o valor desta diferença a um local na memória da placa de micro canais, correspondendo à dada contagem para o canal. A repetição desse processo para um elevado número de pulsos de excitação sobre a amostra resulta em um histograma do número de contagens em função do tempo no detector MCP-PMT (Figura 19(b)). A contagem em cada canal é proporcional à probabilidade de fluorescência no intervalo de tempo  $\Delta t$ . A curva de decaimento de fluorescência da amostra é representada por  $n\Delta t$ , onde  $n$  é o número de canais e  $\Delta t$  é a largura em picosegundo (ps).

A função de resposta (do inglês, *Instrument Response Function*, IRF) é adquirida utilizando como amostra uma solução espalhadora de nanopartículas de sílica (ludox<sup>®</sup>) e corresponde à curva de decaimento mais curta que pode ser medida com esse equipamento em função comprimento de onda do laser. O IRF deve ser obtido mantendo a mesma frequência e contagem de fótons da medida da amostra, e com o monocromador de detecção posicionado no mesmo comprimento de onda do laser. À largura a meia altura da intensidade do pulso do laser está atribuída à resolução temporal do equipamento, sendo cerca de 60 ps para o laser de 401 nm e 120 ps para o laser de 636 nm.

No cálculo do tempo de vida do estado excitado o software FluoFit<sup>®</sup> faz a análise e ajuste da curva de decaimento de fluorescência do material em estudo, utilizando a função multiexponencial abaixo:

$$I(t) = \sum_{i=1}^{\infty} A_i \exp(-t/\tau_i), \quad (13)$$

onde,  $I$  é a intensidade de luz irradiada,  $A_i$  é o fator pré-exponencial ou amplitude,  $t$  é o tempo e  $\tau$  é o tempo de vida no estado excitado singleto. O software FluoFit<sup>®</sup> após calcular o tempo de vida, também informa o valor do resíduo e o qui-quadrado reduzido ( $\chi^2$ ), estes valores são parâmetros do ajuste que informam a precisão e qualidade do procedimento de análise.

Valores de resíduo em torno de 0,0 e com pouco ruído, e  $\chi^2$  próximos de 1,0 são considerados bons ajustes.

A Figura 20 mostra duas curvas características obtida pela técnica de TCSPC, sendo a curva de cor vermelha corresponde à função resposta (IRF) do laser de excitação em 401 nm e a de cor azul correspondente à curva de decaimento de fluorescência da amostra. Na curva de decaimento de fluorescência da amostra é mostrada uma curva de ajuste monoexponencial (cor preta) obtida com base na Equação 13 e gerada pelo software FluoFit<sup>®</sup>

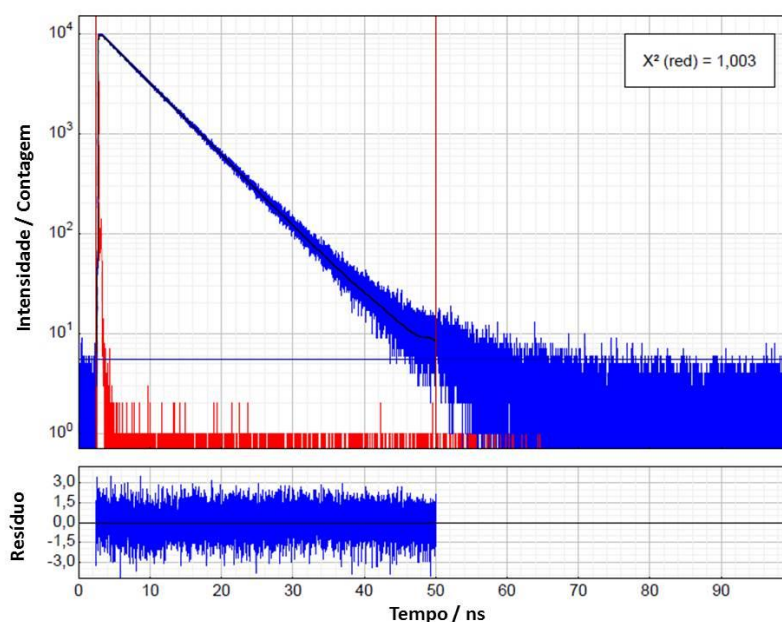


Figura 20 – Curvas características obtidas pela técnica de TCSPC e ajuste utilizando o software FluoFit<sup>®</sup>. Curva em azul, decaimento da fluorescência. Curva em vermelho, função resposta do laser. Abaixo em azul, resíduo do ajuste e no canto superior direito qualidade do ajuste ( $\chi^2$ )

No estudo de tempo de vida da AIOHPc em diferentes solventes e em diferentes concentrações foi utilizados os laser de diodo pulsado com 401 nm e com 636 nm, os quais foram configurados com frequência de pulsos de 20 MHz e contagem de 3000 fótons. Para o estudo da AIOHPc em mistura etanol/água (v/v) as medida de tempo de vida foram realizadas com o laser de 401 nm, o laser foi configurado com frequência de pulsos de 20 MHz e contagem de 2000 fótons, as medidas foram realizadas utilizando um filtro antes do detector de emissão para impedir que o laser de excitação contribuísse na contagem de fótons. O estudo do tempo de vida das formulações de nanoesferas de ácido polilático contendo AIOHPc foi realizado com o laser de 401 nm, configurado com frequência de pulsos de 20 MHz e a contagem de fótons foi de 3000, as medida também foram realizadas utilizando um filtro posicionado antes do detector de emissão do equipamento.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

---

*Nesta seção será mostrada a estrutura química da hidróxido ftalocianina de alumínio e as propriedades relevantes da molécula. Também será descrito os solventes, as concentrações e as proporções volumétricas etanol/água destilada em que a AlOHPc foi solubilizada. O modo de preparação da AlOHPc encapsulada em nanoesferas de ácido poliláctico, também é descrito neste capítulo.*

---

A molécula de Hidróxido Ftalocianina de Alumínio (AlOHPc) utilizada neste trabalho de caracterização fotofísica é comercializada pela Sigma-Aldrich® com 85 % de pureza, no entanto esta molécula foi gentilmente cedida pela professora Vanessa Mosqueira do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. A AlOHPc foi utilizada sem purificação adicional.

A estrutura química da AlOHPc é representada na Figura 21. A molécula de AlOHPc é formada por 32 átomos de carbono, 17 átomos de hidrogênio, 8 átomos de nitrogênio e 1 átomo de alumínio, sendo assim a fórmula molecular da AlOHPc é  $C_{32}H_{17}AlN_8O$ , e possui massa molar de  $556,51 \text{ g mol}^{-1}$ . O átomo de alumínio da AlOHPc fica localizado no centro da molécula realizando ligações químicas com os átomos de nitrogênio dos anéis indol e com uma hidroxila (OH) formando uma geometria piramidal.

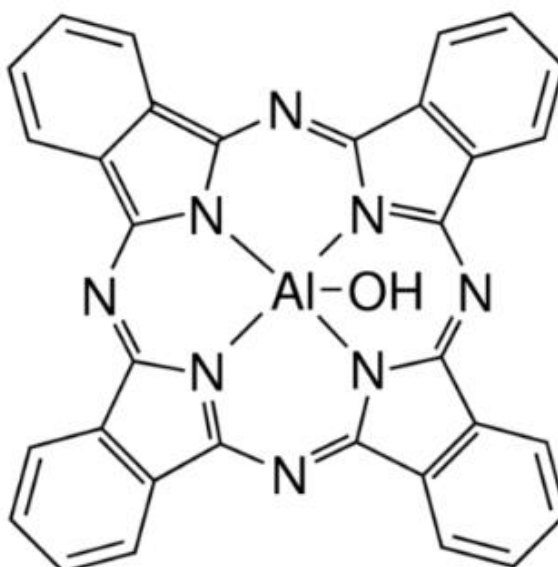


Figura 21 – Estrutura química da hidróxido ftalocianina de alumínio

*Efeito do solvente sobre as propriedades ópticas da AIOHPc*

No estudo fotofísico da AIOHPc em diferentes solventes, utilizou-se o etanol<sup>67</sup> obtido da NEON<sup>®</sup> Reagentes Analíticos e o sulfóxido de dimetilo (DMSO)<sup>68</sup> obtido da Labsynth<sup>®</sup> Produtos para Laboratórios. Na Tabela 1 estão os valores do momento dipolar e do índice de refração desses solventes que foram necessários durante este estudo. Depois de adicionada a AIOHPc nos solventes, as soluções foram submetidas a 5 minutos no ultrassom a temperatura ambiente.

Devido às ftalocianinas apresentarem baixa solubilidade em muitos solventes orgânicos,<sup>69</sup> a utilização dos solventes etanol e DMSO basearam-se em trabalhos já publicados, nos quais haviam utilizado ftalocianina e apresentado boa solubilidade no solvente etanol<sup>75</sup> e no solvente DMSO<sup>70</sup>. Estes solventes também são comumente utilizados em TFD por apresentarem baixa toxicidade no organismo.<sup>71,72</sup>

Tabela 1 – Propriedades físicas do solvente etanol e do solvente DMSO

	<b>Índice de Refração</b>	<b>Momento Dipolar / D*</b>	<b>Viscosidade / mPa s</b>
<b>DMSO<sup>68</sup></b>	1,479	3,96	1,996
<b>Etanol<sup>67</sup></b>	1,360	1,69	1,200

\*Unidade debye, D = 3,33x10<sup>-30</sup> C m

*Efeito da concentração sobre as propriedades ópticas da AIOHPc*

Para a caracterização das propriedades fotofísicas da AIOHPc em diferentes concentrações inicialmente foi preparado uma solução estoque com concentração de 727  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol e com concentração de 725  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em DMSO. Para garantir a diluição da AIOHPc nos solventes, as soluções foram submetidas a 5 minutos no ultrassom a temperatura ambiente. A partir destas soluções estoque foram preparadas soluções com diferentes concentrações variando entre 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  até 363,63  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os principais valores de concentrações usados em ambos solventes são mostrados na Tabela A. 1 do Apêndice A.

*Efeito da proporção volumétrica de etanol/água destilada (v/v) nas propriedades ópticas da AIOHPc*

O estudo da AIOHPc na mistura etanol/água destilada (v/v), foi realizado com concentrações de 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e 70,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AIOHPc em diferentes proporções de etanol/água (v/v). As porcentagens de água (v/v) utilizadas nas soluções foram: 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, e 90%. Após a adição da AIOHPc nas soluções com diferentes proporções de etanol/água (v/v), estas foram submetidas a 5 minutos no ultrassom a temperatura ambiente.

*Preparação e propriedades ópticas das nanoesfera contendo AIOHPc*

As nanoesferas de ácido polilático (PLA) contendo AIOHPc foram produzidas pelo método de deposição interfacial de um polímero pré-formado, descrito previamente por de Paula e colaboradores,<sup>73</sup> o qual consiste em verter e misturar uma fase orgânica em uma fase aquosa contendo um surfactante hidrofílico.

Neste trabalho foram preparadas cinco formulações de nanoesferas de PLA utilizando diferentes massas de AIOHPc, como mostrada na Tabela 2. Sendo que, no caso da Formulação “branca” não foi utilizada AIOHPc na preparação da nanoesfera de PLA.

Tabela 2 – Massas da AIOHPc em  $\mu\text{g}$  utilizadas na preparação de nanoesferas de PLA, do ácido polilático em mg e do surfactante em mg

<b>Formulação</b>	<b>Massa de AIOHPc / <math>\mu\text{g}</math></b>	<b>PLA / mg</b>	<b>Surfactante (pluronic – F68) / mg</b>
<b>“branca”</b>	---	60,3	75,3
<b>1</b>	0,27	60,0	75,3
<b>2</b>	5,29	60,3	75,3
<b>3</b>	197,73	60,3	75,1
<b>4</b>	534,25	60,2	75,0

De forma geral, a preparação das formulações de nanoesferas de PLA iniciou-se preparando a fase orgânica, a qual continha em torno de 60 mg de PLA, e que foi diluído em

10 mL de solução contendo: “X”  $\mu\text{g}$  de AIOHPc diluída em 5 mL de etanol + 5 mL de acetona. Esta solução contendo o PLA foi aquecida a  $30^{\circ}\text{C}$  e com auxílio de um agitador magnético, misturada por 5 minutos. Na fase aquosa, utilizou-se em torno de 75 mg de surfactante pluronic e 20 mL de água, os quais foram misturados por agitação magnética por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa e misturada por agitação magnética durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, o excesso de solvente (acetona, etanol e água) resultante da mistura entre a fase orgânica e fase aquosa foi evaporado sob pressão reduzida em rotavapor da Buchi (Switzerland) modelo R-3 (localizado no Laboratório de Pesquisa Tecnologia Farmacêutica Nanobiotecnologia no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto) em uma temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ , como representado na Figura 22. Devido a baixa solubilidade da AIOHPc em solvente acetona, foi necessário utilizar o solvente etanol na fase orgânica para a preparação das formulações.

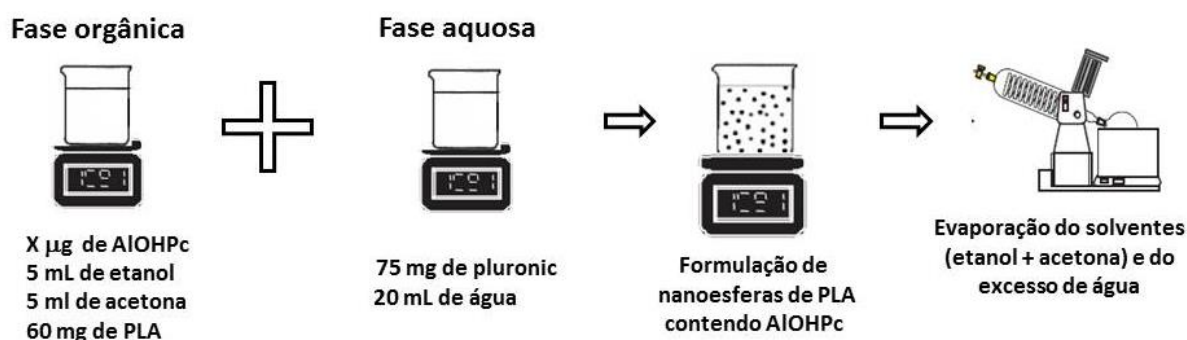


Figura 22 – Representação do método de deposição interfacial utilizado na preparação de nanoesferas de PLA contendo AIOHPc

Após o preparo, as formulações de nanoesferas de PLA foram filtradas por um filtro de seringa de  $0,8 \mu\text{m}$  da Nalgene<sup>®</sup>, com o objetivo de remover precipitados. Para cada formulação filtrada foi realizado medidas de diâmetro médio das nanoesferas de PLA, índice de polidispersão e caracterização óptica da AIOHPc encapsulada.

As medidas do diâmetro médio e do índice de polidispersão (PI) foram realizadas utilizando o equipamento Zetasizer Nano series modelo PN 3702 (localizado no CIPHARMA Laboratório Multiusuário no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto), o qual realiza estas medidas de acordo com a técnica de espectroscopia de espalhamento dinâmico da luz. Na Tabela 3 são mostrados os valores do diâmetro médio e o índice de polidispersão com o respectivo desvio padrão para cada formulação. A Figura A. 1 do Apêndice B mostra as medidas de diâmetro médio da AIOHPc encapsuladas em

nanoesferas de PLA. O índice de polidispersão para todas as formulações apresentou valor inferior a 0,3, indicando que estas podem ser consideradas monodispersas.<sup>25,74</sup> A partir da análise do tamanho das nanoesferas de PLA pode-se considerar que as formulações apresentaram diâmetro médio de  $160 \pm 30$  nm, indicando que a quantidade de massa AlOHPC utilizada não afetou diretamente o diâmetro.

Tabela 3 – Valores da massa da AlOHPC em  $\mu\text{g}$  utilizadas na preparação de nanoesferas de PLA, com os respectivos diâmetro médio e do índice de polidispersão

<b>Formulação</b>	<b>Massa de AlOHPC / <math>\mu\text{g}</math></b>	<b>Diâmetro médio / nm</b>	<b>Polidispersão</b>
<b>“branca”</b>	---	$130 \pm 1$	$0,07 \pm 0,01$
<b>1</b>	0,27	$126 \pm 1$	$0,05 \pm 0,01$
<b>2</b>	5,29	$181 \pm 2$	$0,05 \pm 0,03$
<b>3</b>	197,73	$171 \pm 1$	$0,10 \pm 0,02$
<b>4</b>	534,25	$212 \pm 1$	$0,12 \pm 0,01$



---

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

*Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos a partir das técnicas de caracterização ópticas: de absorção óptica, de fluorescência estacionária, de fluorescência resolvida no tempo e de espalhamento de luz ressonante, da AIOHPc em diferentes solventes, com diferentes concentrações, em solução binária etanol/água e quando encapsulada em nanoesferas de PLA.*

---

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO ÓPTICA DA AIOHPc EM SOLVENTE ETANOL E EM DMSO

Os resultados apresentados neste item são referentes ao estudo da hidróxido ftalocianina de alumínio (AIOHPc) na concentração de  $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solvente etanol e em DMSO, obtidos a partir da espectroscopia de absorção óptica, de fluorescência estacionária e de fluorescência resolvida no tempo.

A Figura 23 mostra o espectro normalizado da absorção da AIOHPc em etanol, neste espectro observar-se: **i)** três picos de absorção na **região da banda Q** (600-750 nm), sendo o pico mais intenso em torno de 669 nm correspondente a transições do estado fundamental  $S_0$  para o primeiro estado excitado  $S_1$  ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) e os outros dois picos de menor intensidade em 604 nm e 640 nm relacionados a transições vibracionais da molécula; e **ii)** um pico localizado **na região da banda Soret** (300-400 nm) em torno de 353 nm correspondente a transições do estado fundamental  $S_0$  para o segundo estado excitado  $S_2$  ( $S_0 \rightarrow S_2$ ).<sup>75</sup>

No estudo da fluorescência estacionária foram utilizados os comprimentos de onda de 350 nm e de 670 nm para a excitação da AIOHPc, estes comprimentos de onda foram escolhidos devido a elevada intensidade de absorção na região da banda Soret e da banda Q, respectivamente (como mostrado no espectro de absorção da Figura 25(a)). Os comprimento de onda de 401 nm e de 636 nm também foram utilizados para a excitação da AIOHPc, pois o estudo de fluorescência resolvida no tempo é conduzido com excitação de laser nestes comprimentos de onda, o qual será apresentado mais adiante.

O espectro normalizado da fluorescência da AIOHPc em etanol quando excitada com 636 nm também é mostrado na Figura 23, no qual observa-se um único pico de fluorescência

em torno de 675 nm para esta concentração, e verifica-se uma interseção bastante considerável entre os espectros de absorção e de fluorescência, com deslocamento de Stokes em torno de 6 nm. Ao irradiar a solução de AIOHPc em etanol com 350 nm, 401 nm e 670 nm (Figura A. 2 do Apêndice C) observou-se que independente do comprimento de onda de excitação o pico do espectro de fluorescência ocorre sempre no mesmo comprimento de onda. O mesmo perfil do espectro de fluorescência foi obtido por Tsubone e colaboradores<sup>75</sup> para a AIOHPc irradiada em 604 nm.

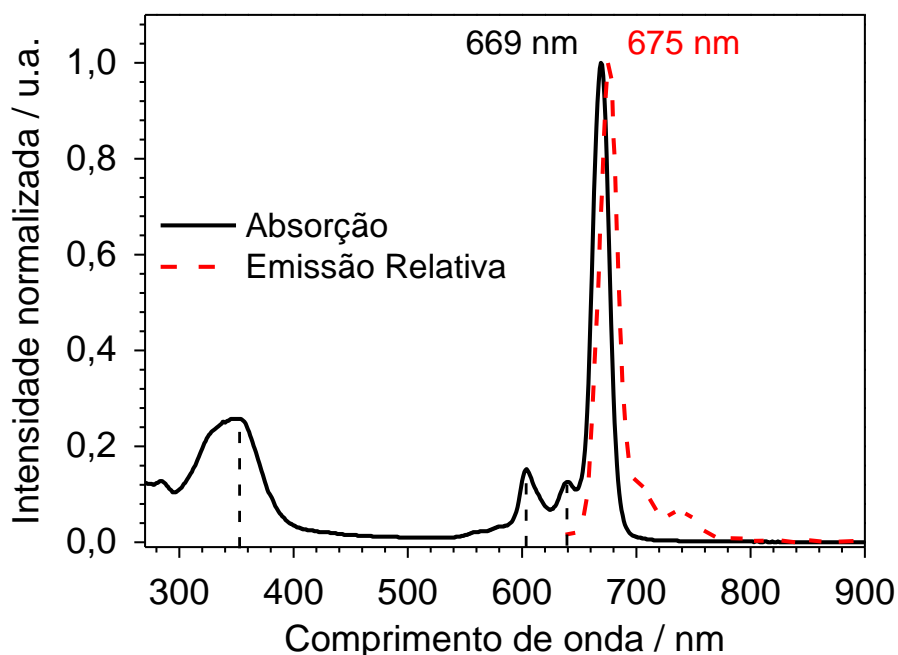


Figura 23 – Comparação dos espectros normalizados de absorção e de fluorescência (excitação em 636 nm) da AIOHPc em solvente etanol

No espectro normalizado da absorção da AIOHPc no solvente DMSO mostrado na Figura 24, observa-se o pico mais intenso de absorção da banda Q ocorrendo em 673 nm (transição de  $S_0 \rightarrow S_1$ ) e os outros picos com menor intensidade na região da banda Q em 607 nm e 645 nm (transições vibracionais). Na banda Soret o pico de absorção está em torno de 350 nm correspondendo à transição de  $S_0 \rightarrow S_2$ . O espectro de fluorescência da AIOHPc em solvente DMSO quando irradiada com 636 nm também é mostrado na Figura 24. Verifica-se o pico de fluorescência em torno de 681 nm e uma interseção bastante considerável entre o espectro de absorção e o espectro de fluorescência, com deslocamento de Stokes em torno de 9 nm. Os espectros de fluorescência da AIOHPc em solvente DMSO obtidos irradiando a solução com 350 nm, 401 nm e 670 nm (Figura A. 3 do Apêndice C) apresentaram o pico de fluorescência no mesmo comprimento de onda da solução quando excitada com 636 nm.

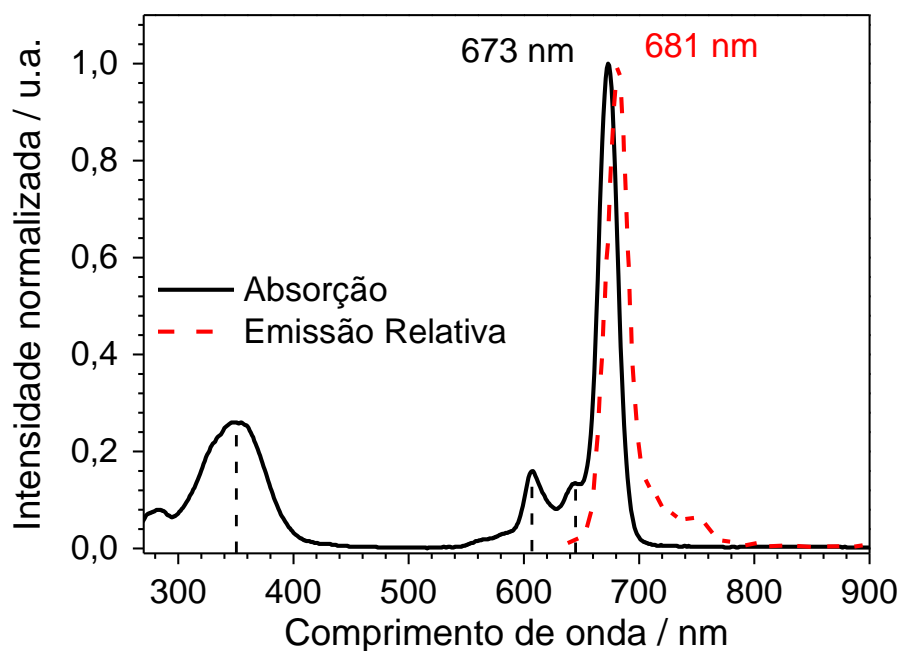


Figura 24 – Comparação dos espectros normalizado de absorção e de fluorescência (excitação com 636 nm) da AIOHPc em solvente DMSO

A Figura 25(a) compara os espectros de absorção da AIOHPc em etanol e em DMSO, verifica-se que os solventes usados não afetaram de forma significativa a intensidade e a forma do espectro de absorção para concentração de  $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ , apresentando apenas um pequeno deslocamento dos picos de absorção da AIOHPc em DMSO para comprimentos de onda de menor energia, quando comparados aos picos de absorção da AIOHPc em etanol. Na Figura 25(b), a qual compara os espectros de fluorescência da AIOHPc quando excitada com 636 nm em ambos os solventes, observa-se também um pequeno deslocamento do pico de emissão da AIOHPc em DMSO para região de comprimento de onda de menor energia, quando comparado com o pico de fluorescência em etanol, e também se observa menor intensidade de fluorescência da AIOHPc em solvente DMSO. Devido o solvente DMSO apresentar polaridade maior que o solvente etanol (Tabela 1 do item 5), esta diferença pode estar acarretando na diminuição da energia entre os estados eletrônicos e no deslocamento para comprimentos de onda de menor energia do pico de fluorescência da AIOHPc em solvente DMSO.<sup>9</sup>

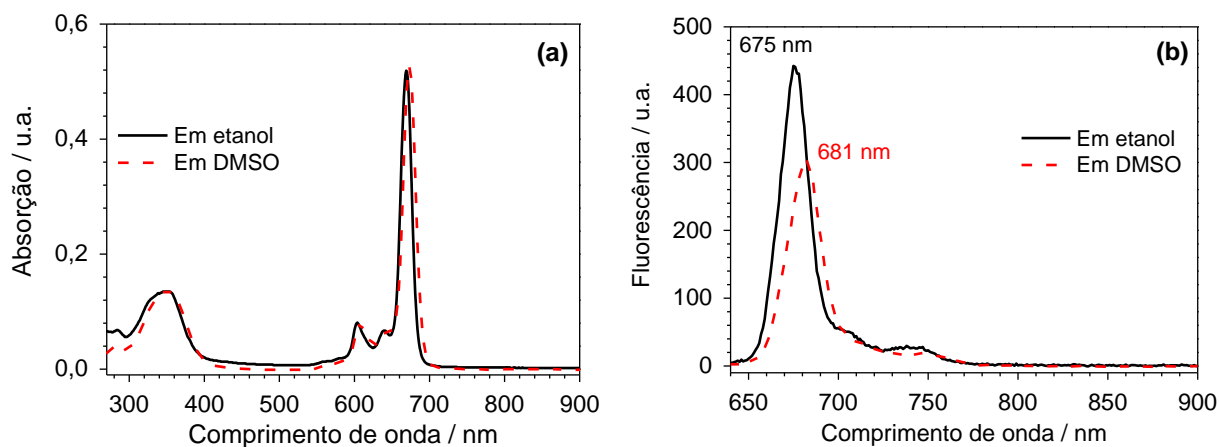


Figura 25 – Comparação do perfil e intensidade dos espectros: (a) de absorção e (b) de fluorescência (excitação em 636 nm) da AIOHPc em ambos os solventes. AIOHPc em concentração de  $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$  em ambos solventes

Os valores de coeficiente de absorção molar ( $\epsilon(\lambda)$ ) para os picos de absorção da AIOHPc foram obtidos pela Equação 7 (lei de Beer-Lambert) e são mostrados na Tabela 4 juntamente com os valores obtidos por Tsubone (para a concentração de  $3,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  da AIOHPc em solvente etanol). Os valores calculados para o coeficiente de absorção molar da AIOHPc em etanol e em DMSO são consideravelmente próximos, pois as intensidades de absorção da AIOHPc em ambos os solventes foram próximos (Figura 25(a)). Ao comparar os valores de coeficiente de absorção molar obtidos com os valores apresentados por Tsubone, verifica-se que os valores apresentam diferença, mas a ordem de grandeza dos coeficientes de absorção molar são iguais. Em virtude da divergência, foi proposto o estudo sistemático de absorção em função da concentração, o qual será apresentado na seção seguinte (item 6.2).

Tabela 4 – Coeficiente de absorção molar ( $\epsilon(\lambda)$ ) da molécula de AIOHPc em solvente etanol e em solvente DMSO

Em solvente etanol ( $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ )		Em solvente DMSO ( $3,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ )		Em solvente etanol <sup>75</sup> ( $3,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ )	
$\lambda_{\text{pico}}$ (nm)	$\epsilon /$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{pico}}$ (nm)	$\epsilon /$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{pico}}$ (nm)	$\epsilon /$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
<b>353</b>	43,6	<b>350</b>	43,6	<b>353</b>	82,7
<b>604</b>	26,1	<b>607</b>	26,5	<b>606</b>	42,6
<b>640</b>	21,6	<b>645</b>	22,3	<b>640</b>	37,8
<b>669</b>	167,4	<b>673</b>	169,4	<b>671</b>	263

Os cálculos da eficiência quântica de fluorescência ( $\Phi_F$ ) da AIOHPc com excitação em 401 nm e em 636 nm nos solventes etanol e DMSO foram realizado utilizando a Equação 6 (método comparativo de eficiência quântica). Os valores de eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Eficiência quântica de fluorescência da molécula de AIOHPc ( $\Phi_F$ ) na concentração de 3,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol e em DMSO

$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$\Phi_F$ em etanol	$\Phi_F$ em DMSO
<b>401</b>	0,013	0,031
<b>636</b>	0,284	0,274

\*No cálculo da eficiência quântica de fluorescência utilizou-se como amostra de referência uma solução de clorofila em tolueno ( $n=1,496$ ), cuja eficiência quântica de fluorescência é de 0,33.<sup>76</sup>

No estudo do tempo de permanência da AIOHPc no estado excitado (Tabela 6) nos solventes etanol e DMSO as curvas de decaimento da fluorescência foram obtidos com excitação em 401 nm e em 636 nm, nestas curvas realizou-se um ajuste monoexponencial de acordo com a Equação 13. O valor do tempo de vida obtido para a AIOHPc excitada com 401 nm em solvente etanol foi de 6,92 ns e em solvente DMSO foi de 6,18 ns, estes tempos foram ligeiramente mais longo do que o obtido com excitação em 636 nm, sendo de 6,91 ns em etanol e de 6,16 ns em DMSO. No entanto, ao considerar o intervalo de incerteza das medidas em ambas as irradiações pode-se considerar que os tempos de vida são similares, ou seja, o tempo de vida não depende do comprimento de onda nesta concentração. Na comparação entre solventes, o tempo de vida da AIOHPc em etanol é mais longo (cerca de 1 ns mais longo) que em DMSO para ambas as excitações. Nas Figura 26(a) e (b), são compara as curvas de decaimento de fluorescência da AIOHPc nos diferentes solvente quando excitada em 401 nm e em 636 nm, respectivamente.

Tabela 6 – Tempo de vida ( $\tau$ ) da AIOHPc para concentração 3,15  $\mu\text{mol L}^{-1}$  no solvente etanol e no solvente DMSO, quando excitada em 401 nm e em 636 nm

$\lambda_{\text{exc}} / \text{nm}$	$\tau / \text{ns}$ em etanol	$\chi^2$	$\tau / \text{ns}$ em DMSO	$\chi^2$
<b>401</b>	6,92 $\pm$ 0,04	1,009	6,18 $\pm$ 0,03	0,987
<b>636</b>	6,91 $\pm$ 0,04	0,987	6,16 $\pm$ 0,03	1,007

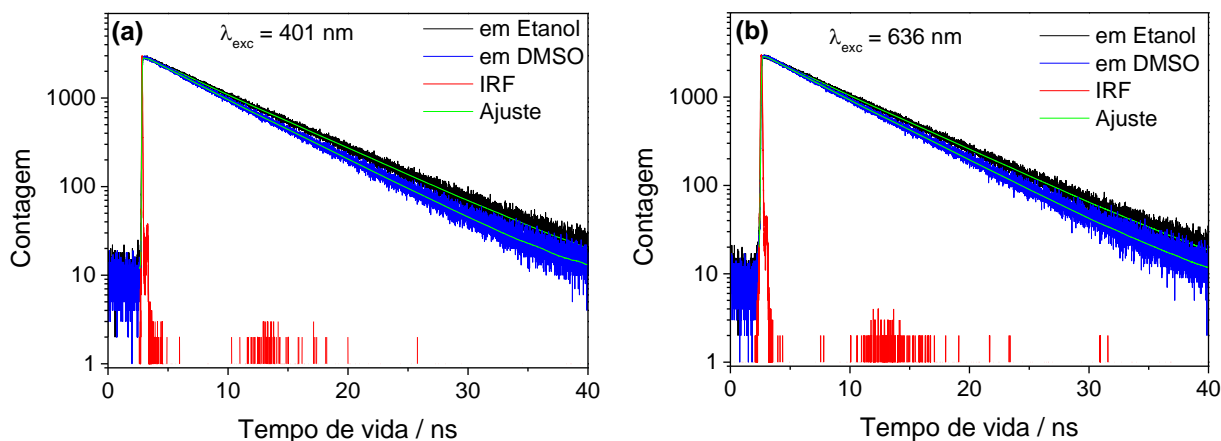


Figura 26 – Curva de decaimento de fluorescência da AIOHPc no solvente etanol (linha preta) e em solvente DMSO (linha azul), para excitação (a) em 401 nm e (b) em 636 nm. Função resposta do laser em vermelho e curva de ajuste monoexponencial em verde

## 6.2 ESTUDO DA CONCENTRAÇÃO NAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DA AIOHPc

Nesta seção foi verificado o comportamento das propriedades fotofísicas da AIOHPc em função da concentração ( $0,04\text{-}363,63 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) nos solventes etanol e DMSO. A seguir, são apresentados os resultados obtidos a partir das técnicas de absorção óptica, de fluorescência estacionária e de fluorescência resolvida no tempo.

Inicialmente utilizou-se a técnica de absorção óptica para verificar o comportamento das bandas de absorção da AIOHPc em função da concentração ( $0,04\text{-}30,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em solventes etanol e DMSO, mostrados nas Figura 27(a) e (c) respectivamente. Observa-se que não ocorre alteração significativa na forma dos espectros de absorção e tampouco ocorre deslocamento dos picos de absorção da AIOHPc com o aumento da concentração. Porém, verifica-se um aumento da intensidade de absorção em função do aumento da concentração de AIOHPc em ambos os solventes como era esperado, devido o número de moléculas absorvedoras aumentar nas soluções. Para concentrações maiores que  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  em ambos os solventes, a intensidade de absorção na banda Soret e na banda Q ultrapassou o limite máximo de detecção do equipamento.

As Figura 27(b) e (d) mostram o comportamento da intensidade dos picos de absorção em função da concentração em solvente etanol e em DMSO, respectivamente. Observa-se que a intensidade de absorção aumenta linearmente para os picos em torno de 353 nm, de 604 nm

e de 640 nm, no entanto, para 669 nm em etanol e em 673 nm em DMSO, a linearidade ocorre apenas para concentrações inferiores a  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

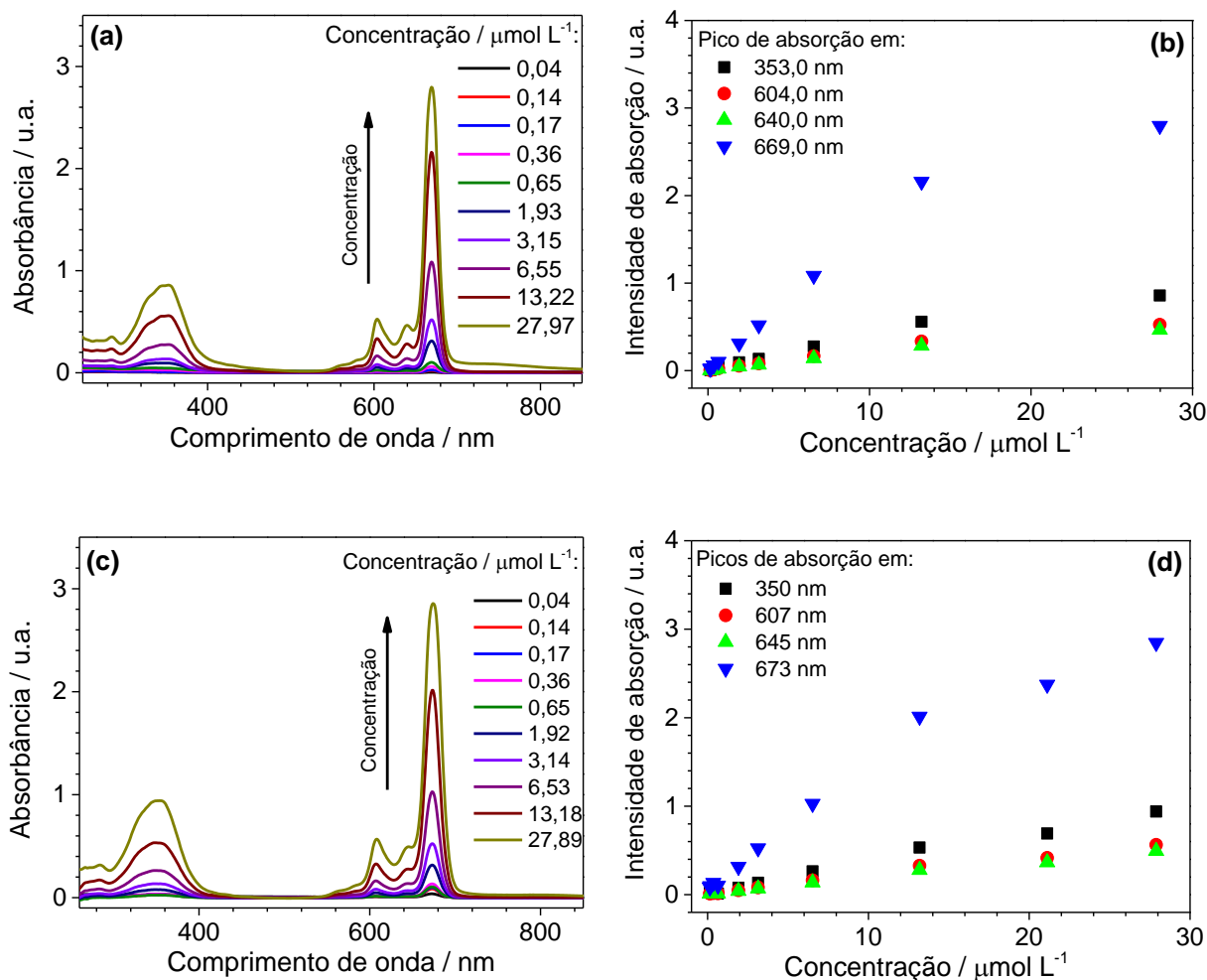


Figura 27 – Espectros de absorção da AIOHPc em diferentes concentrações nos solventes (a) etanol e (c) DMSO, e as intensidade dos picos de absorção em função da concentração nos solventes (b) etanol e (d) DMSO

A Figura 28 mostra o ajuste linear feito nos gráficos de intensidade de absorção da AIOHPc versus concentração em etanol ((a) pico em 669 nm e (b) pico em 353 nm, 604 nm, 640 nm) e em solvente DMSO ((c) pico em 673 nm e (d) pico em 350 nm, 607 nm, 645 nm) com base na Equação 7. Para o cálculo foi utilizada somente concentrações inferiores a  $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , pois de acordo com Jayme e colaboradores<sup>77</sup> solução com concentração maior que  $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  podem apresentar desvios no espectro de absorção devido ao efeito de filtro interno da solução ou interação entre soluto-soluto ou soluto-solvente. Na Tabela 7 são mostrados os valores do coeficiente de absorção molar da AIOHPc obtidos através do

regressão linear da lei de Beer-Lambert para os picos de absorção e a qualidade do ajuste linear ( $R^2$ ).

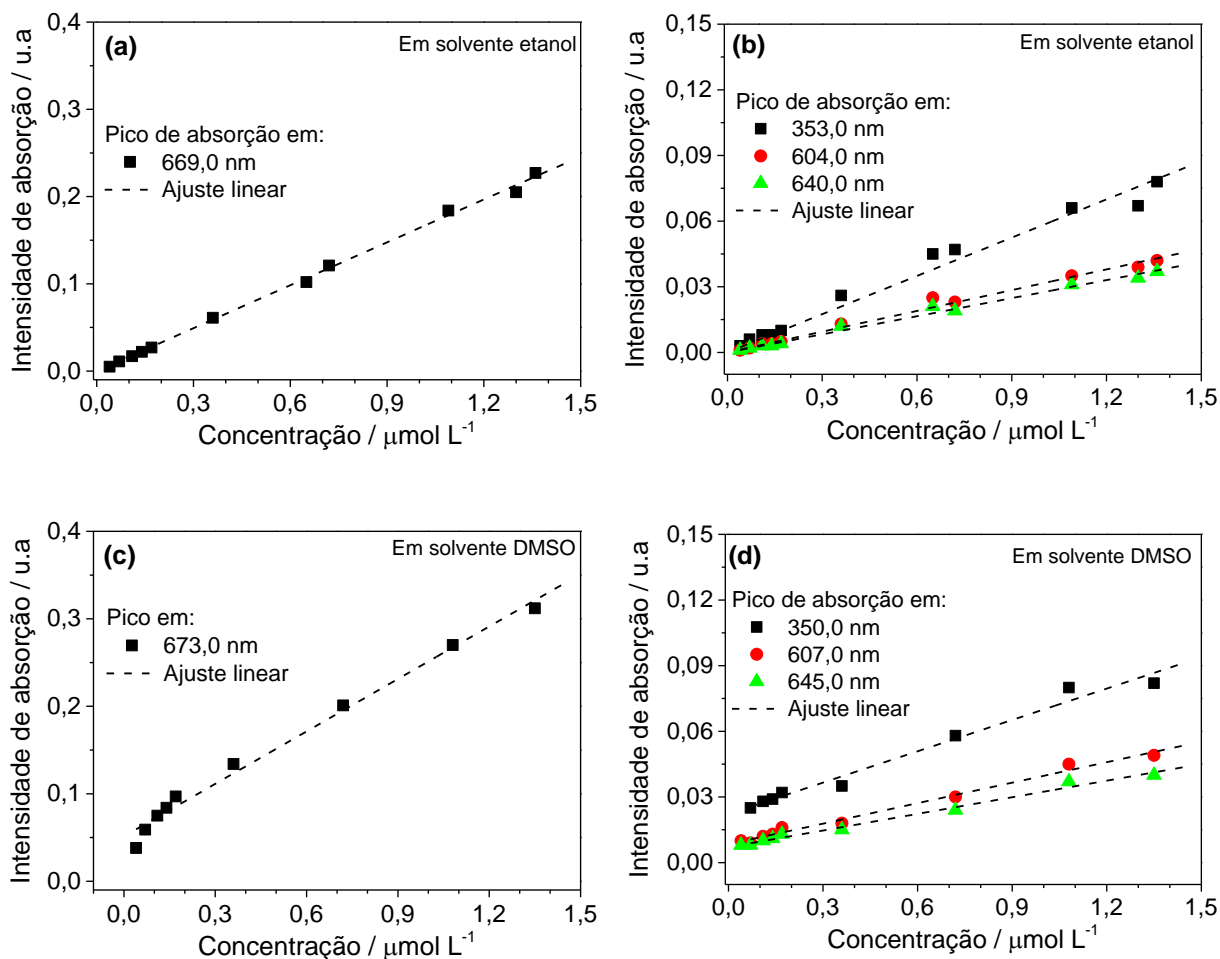


Figura 28 – Intensidade dos picos de absorção da AIOHPc em função da concentração. (a) Principal pico de absorção em 669 nm e (b) nos picos em 353 nm, em 604 nm e em 640 nm, em solvente etanol. (c) Principal pico de absorção em 673 nm e (d) nos picos em 350 nm, 607 nm e 645 nm, em solvente DMSO. Ajuste linear (linha tracejada)

Tabela 7 – Coeficiente de absorção molar ( $\epsilon(\lambda)$ ) da AIOHPc em solvente etanol e em DMSO e a qualidade da regressão linear ( $R^2$ )

Etanol			DMSO		
$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$R^2$	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$R^2$
353	$58 \pm 2$	0,989	350	$48 \pm 3$	0,975
604	$32 \pm 1$	0,995	607	$31 \pm 1$	0,986
640	$26 \pm 1$	0,995	645	$25 \pm 1$	0,986
669	$164 \pm 2$	0,999	673	$200 \pm 8$	0,987



Comparando estes resultados de coeficiente de absorção molar da AIOHPc em solvente etanol com os resultados mostrados na Tabela 4 do item 6.1, observa-se que os valores do coeficiente de absorção molar da AIOHPc em etanol foram próximos (ligeiramente maiores) para todos os picos de absorção, em especial o coeficiente de absorção molar em 669 nm, cuja diferença de apenas  $3 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . No entanto, os valores obtidos neste estudo diferem dos valores de coeficiente de absorção molar da AIOHPc em etanol apresentados por Tsubone<sup>75</sup>, porém ainda mantém a mesma ordem de grandeza.

Na comparação do coeficiente de absorção molar da AIOHPc em solvente DMSO obtidos neste estudo com os valores da Tabela 4 do item 6.1, verifica-se um aumento significativo do valor do coeficientes de absorção molar do pico em 673 nm, sendo um aumento de aproximadamente  $30 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , no entanto o valor obtido a partir da regressão linear apresenta qualidade de ajuste um pouco inferior ( $R^2 = 0,987$ ), quando comparada a qualidade da regressão linear da AIOHPc em etanol ( $R^2 = 0,999$ ). Estes valores de coeficiente de absorção molar da AIOHPc em DMSO comparados com os valores apresentados por Tsubone da AIOHPc no solvente etanol, também apresentaram diferença.

O estudo da fluorescência estacionária da AIOHPc em função da concentração ( $0,04$ - $145 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para excitação em 636 nm nos solventes etanol e DMSO são mostrados nas Figura 29(a) e (c), respectivamente. Observa-se que com o aumento da concentração ocorre o deslocamento batocrômico do pico de emissão em ambos os solventes e o surgimento de um ombro em torno de 745 nm, melhor observados nos espectros normalizados da AIOHPc nos solventes etanol e DMSO mostrados nas Figura 29(b) e (d), respectivamente. O mesmo comportamento dos espectros de fluorescência foi observado nas soluções de AIOHPc em ambos os solventes quando excitadas em 350 nm, em 401 nm e em 670 nm, estes resultados estão no Apêndice C.

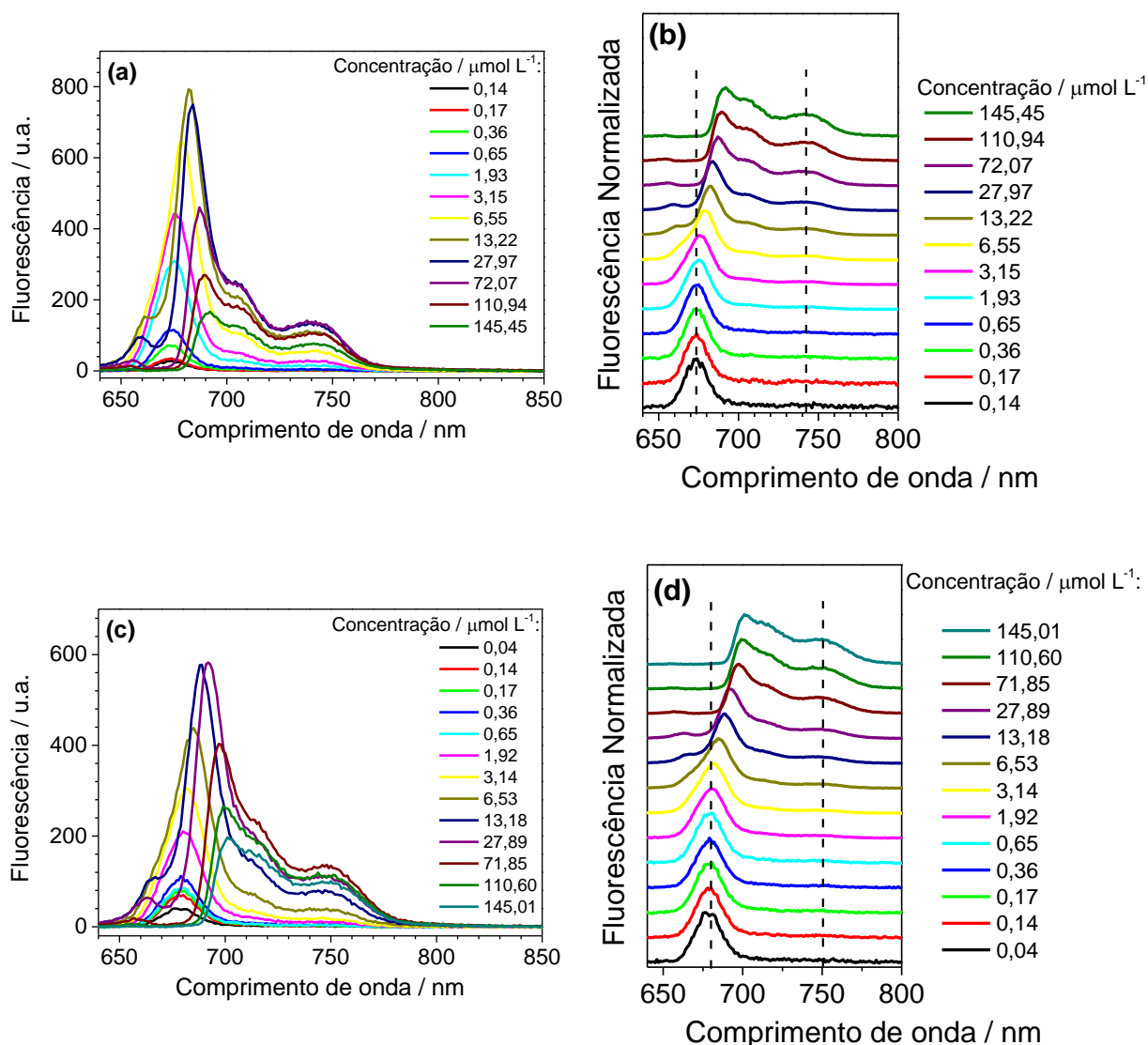


Figura 29 – Espectro de fluorescência da AIOHPc em função da concentração no solvente (a) etanol e no (c) DMSO. Espectro de fluorescência normalizada da AIOHPc no solvente (b) etanol e no (d) DMSO. Excitação em 636 nm

Dhami e colaboradores<sup>78</sup> observaram nos espectros de fluorescência das ftalocianinas sulfonadas de alumínio em solução com diferentes concentrações além do pico principal de emissão a formação de um ombro em torno de 750 nm. A ocorrência deste ombro com o aumento da concentração foi atribuídos ao efeito dos processos de reabsorção entre as moléculas de ftalocianinas, e não a formação de agregados de ftalocianinas como sugerido por Yoon e colaboradores<sup>79</sup>. Sendo assim o ombro observado em torno de 745 nm nos espectros de emissão da AIOHPc em função da concentração pode estar relacionado a ocorrência de transferência de energia radiativa por processos de reabsorção e reemissão de fótons entre as moléculas.

As Figura 30(a) e (b) mostram os gráficos da intensidade máxima de fluorescência da AIOHPc em função da concentração nos solventes etanol e DMSO, respectivamente para as soluções excitadas em 350 nm, 401 nm, 636 nm e 670 nm. Pode-se verificar nestas curvas que a intensidade de emissão da AIOHPc em ambos os solventes aumenta até a concentração próxima de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  para ambos os comprimento de onda de excitação, no entanto para concentrações superiores a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  começa a ocorrer supressão da fluorescência.

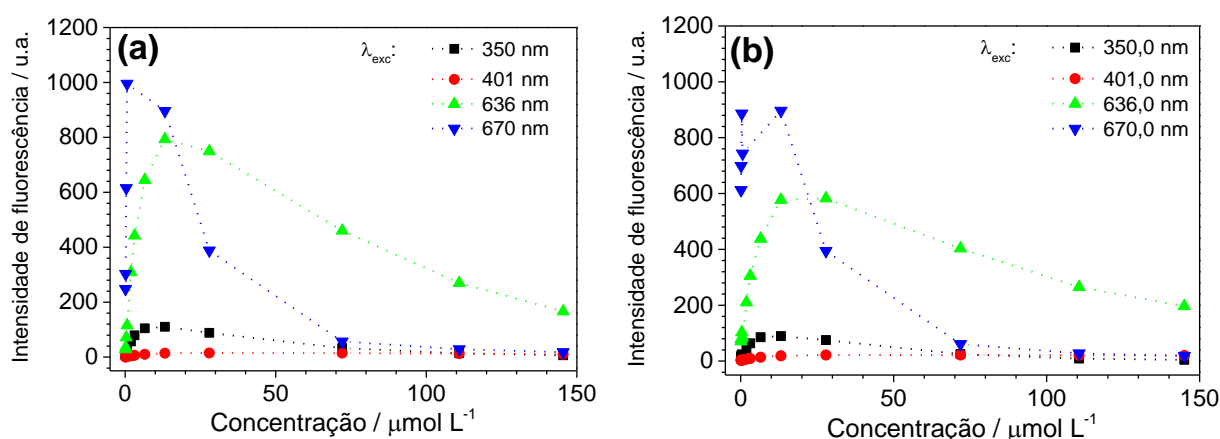


Figura 30 – Comportamento do pico de intensidade de fluorescência da AIOHPc em função da concentração no solvente: (a) etanol e (b) DMSO, para as soluções excitadas em 350 nm, 401 nm, 636 nm e 670 nm

O aumento da intensidade de fluorescência em função do aumento da concentração para valores até  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ , independente do comprimento de onda de excitação, condiz com as Equações 8 e 9 abordadas no item 4.2. No entanto, a diminuição da intensidade de fluorescência para concentrações superiores a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  contradiz a Equação 8, indicando que o aumento da concentração de AIOHPc nas soluções poderia estar ocasionando o efeito de filtro interno, ou que poderia estar ocorrendo processos fotofísicos bimoleculares de transferência de energia radiativa por reabsorção e reemissão entre as moléculas de AIOHPc.

O cálculo da eficiência quântica de fluorescência ( $\Phi_F$ ) da AIOHPc em função da concentração em solvente etanol e em DMSO foram realizados a partir da Equação 6. Os valores de eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc em função da concentração, referente a excitação em 636 nm estão apresentados na Figura 31. Nesta excitação a AIOHPc apresenta maior eficiência quântica de fluorescência, sendo de 0,36 na concentração de  $0,14 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solvente etanol e de 0,35 na concentração de  $0,65 \mu\text{mol L}^{-1}$  em solvente DMSO. Para as demais concentrações a eficiência quântica de fluorescência diminuiu. Essa diminuição pode estar relacionada com o aumento da densidade de molécula na solução e

consequentemente o aumento da probabilidade de sucessivas reabsorções entre as moléculas de AIOHPc. A ocorrência de reabsorção também está associada à área de intersecção entre os espectros de absorção e emissão, e esta intersecção é observada nos espectros da AIOHPc apresentados nas Figura 23 e Figura 24 do item 6.1.

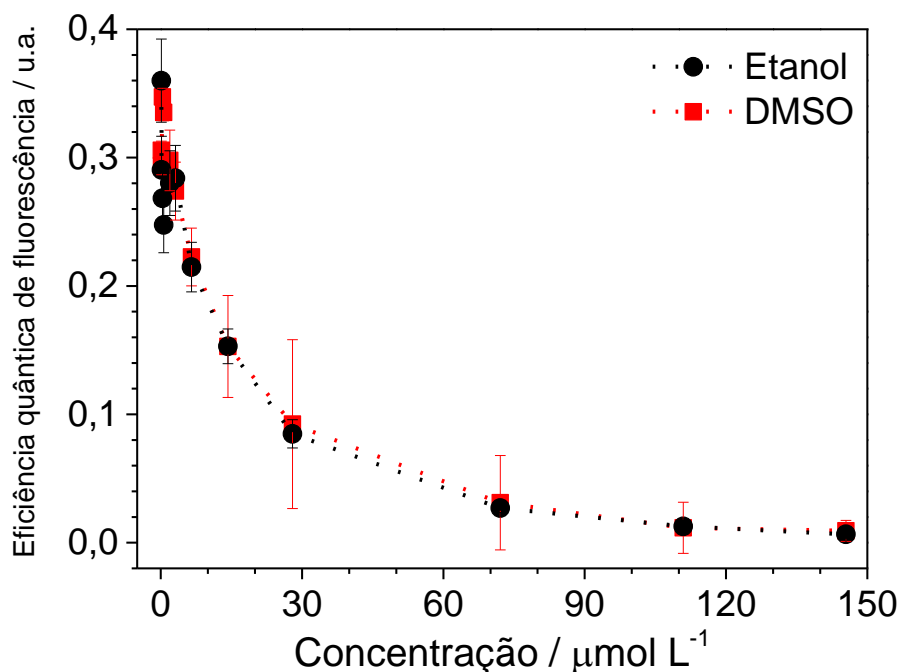


Figura 31 – Eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc em função da concentração em solvente etanol (círculo preto) e em solvente DMSO (quadrado vermelho). Excitação em 636 nm

As soluções de AIOHPc em ambos os solventes apresentaram maior eficiência quântica de fluorescência quando excitadas em 670 nm, sendo na solução com 0,14 μmol L<sup>-1</sup> de AIOHPc em solvente etanol a  $\Phi_F \approx 0,37$  e a solução com 0,04 μmol L<sup>-1</sup> de AIOHPc em solvente DMSO a  $\Phi_F \approx 0,43$ . Os valores de eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc em função da concentração, referente a excitação em 401 nm, em 636 nm e em 670 nm obtidos em ambos os solventes são mostrados na Tabela A. 2 do Apêndice D.

As curvas de decaimento de fluorescência da AIOHPc em função da concentração (0,04–363,63 μmol L<sup>-1</sup>) para ambos os solventes irradiado com o laser em 401 nm e em 636 nm foram obtidas coletando fótons no comprimento de onda do máximo de emissão do espectro de fluorescência (Figura 29(a) e (c) do item 6.2). As curvas de decaimentos de fluorescência foram melhor ajustadas com função monoexponencial de acordo com a Equação 13. Os valores do tempo de vida da AIOHPc com diferentes concentrações para ambos os solventes estão na Tabela A. 3 do Apêndice E. A solução de AIOHPc com concentração de 0,04 μmol L<sup>-1</sup> em solvente etanol apresentou valores de tempo de vida de 6,13 ns e de 6,07 ns

quando irradiada em 401 nm e em 636 nm, respectivamente. No entanto, com o aumento da concentração o tempo de vida da AIOHPc fica mais longo, alcançando valores de 10,2 ns (401 nm) e de 10,34 ns (636 nm) na concentração de 363,63  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol. Comportamento semelhante foi observado nas soluções de AIOHPc em solvente DMSO, no qual os valores do tempo de vida da molécula na concentração de 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram de 4,80 ns e de 4,75 ns com excitação em 401 nm e em 636 nm, respectivamente, e na concentração de 363,63  $\mu\text{mol L}^{-1}$  alcançaram valores de 10,77 ns (401 nm) e de 11,24 ns (636 nm).

As Figura 32(a) e (b) mostram a variação do tempo de vida da AIOHPc em função da concentração nos solventes etanol e DMSO, respectivamente. Para as excitações em 401 nm e em 636 nm os valores de tempo de vida da AIOHPc em função da concentração foram equivalentes. Observa-se que a variação dos valores do tempo de vida da AIOHPc ocorre de forma mais abrupta para as concentrações entre 0,04  $\mu\text{mol L}^{-1}$  até 120,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e para concentrações maiores que 120,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  o tempo de vida tende a estabilizar para ambos os solventes.

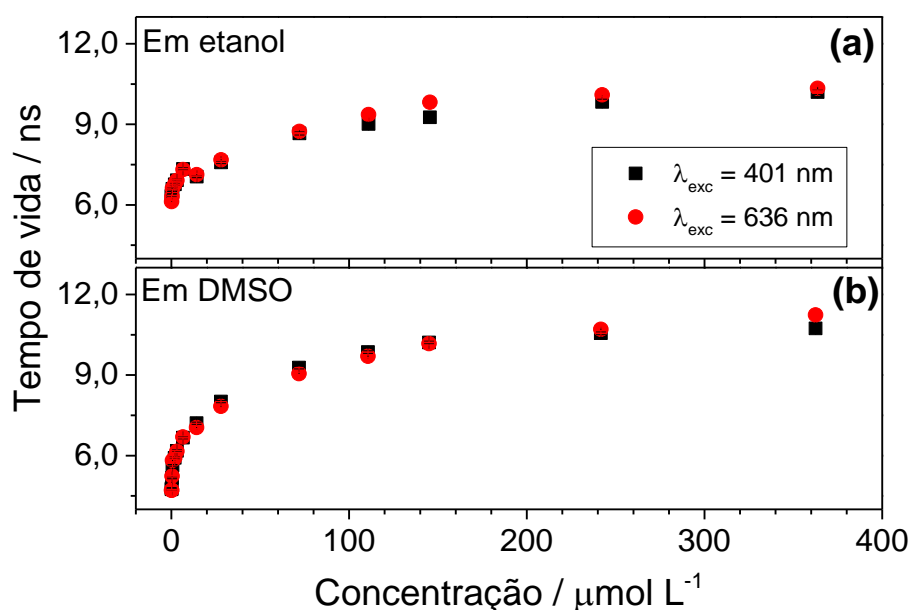


Figura 32 – Tempo de vida do AIOHPc (a) em etanol e (b) em DMSO em função da concentração, para excitação em 401 nm e em 636 nm

As Figura 33(a) e (b) mostram a comparação dos valores de tempos de vida da AIOHPc em ambos os solventes para a excitação em 401 nm e em 636 nm, respectivamente. Para baixas concentrações os valores do tempo de vida da AIOHPc no solvente DMSO em ambas as excitações é significativamente mais curto, no entanto com o aumento da concentração os valores do tempo de vida em DMSO tornam-se ligeiramente mais longos.

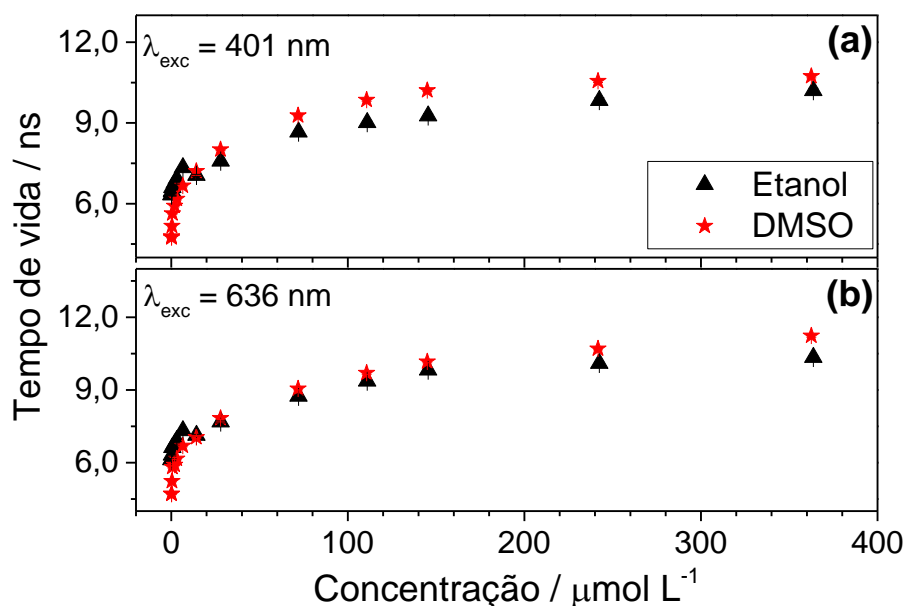


Figura 33 – Comparação do tempo de vida do AIOHPc nos solventes etanol e DMSO em função da concentração, quando excitado em (a) 401 nm e (b) em 636 nm

O aumento do tempo de vida da AIOHPc em função da concentração em ambos os solventes, reforça a hipótese da ocorrência de transferência de energia radiativa entre as moléculas de AIOHPc devido a sucessivas reabsorções e reemissões, favorecida pelo aumento da concentração.<sup>78</sup>

Sendo o modelo de Birks um método teórico, o qual também permite simular a eficiência quântica de fluorescência de moléculas na presença da transferência de energia radiativa por processos de reabsorções e reemissões, utilizou-se inicialmente os valores do tempo de vida obtidos da AIOHPc em diferentes concentrações nos solventes etanol e DMSO com irradiação em 636 nm na Equação 1 para obter o valor da probabilidade média de um único fóton emitido ser absorvido ( $\bar{\alpha}$ ), para cada concentração. A partir dos valores de  $\bar{\alpha}$  e do valor da eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc na ausência de transferência de energia radiativa ( $\Phi_0$ ), obteve-se o valores de eficiência quântica de fluorescência na presença de transferência de energia radiativa ( $\Phi$ ), utilizando a Equação 2. As Figura 34(a) e (b) comparam a eficiência quântica de fluorescência em função da concentração de AIOHPc prevista pelo modelo de Birks (todos o valores estão Tabela A. 2 no Apêndice D) com a obtida experimentalmente através da Equação 6 em solvente etanol e em DMSO, respectivamente, relativo à excitação em 636 nm. Observa-se que os valores de eficiência quântica de fluorescência obtida pelo modelo de Birks e pelo método experimentalmente

diminuem com o aumento da concentração em ambos os solventes, apresentando uma curva de diminuição semelhante.

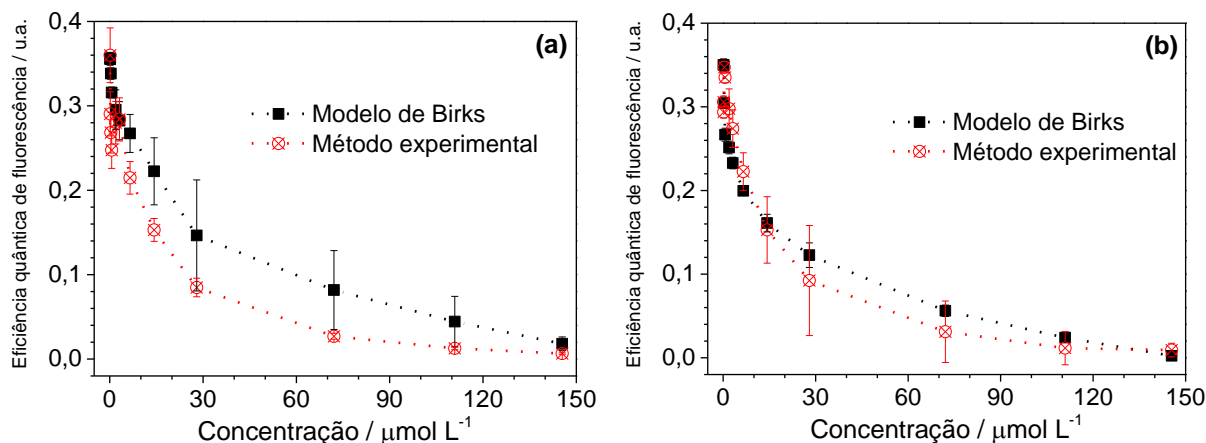


Figura 34 – Comparação da eficiência quântica de fluorescência ( $\Phi_F$ ) da AIOHPc dada pelo modelo de Birks (Eq. 2) como a eficiência quântica de fluorescência obtida pelo método experimental (Eq.6), em solvente (a) etanol e em (b) DMSO

Com base nos resultados de fluorescência apresentados por Dhami<sup>78</sup> e com os resultados de eficiência quântica de fluorescência obtidos usando as equações do modelo de Birks, confirma a hipótese de que o aumento da concentração de AIOHPc nas soluções está ocasionando processos fotofísicos bimoleculares de transferência de energia radiativa causado por reabsorção e reemissão de fótons entre as moléculas de AIOHPc. Esta transferência de energia radiativa é responsável pela: diminuição da intensidade de fluorescência da AIOHPc nos solventes etanol e DMSO, surgimento de um ombro em 745 nm, diminuição da eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc e aumento dos valores de tempo de vida da AIOHPc em função do aumento da concentração.

### 6.3 ESTUDO DA AIOHPc EM MISTURA ETANOL/ÁGUA DESTILADA

As ftalocianinas são moléculas hidrofóbicas e conseqüentemente em presença de água elas tendem a se agregarem, podendo causar alterações das propriedades fotofísica que as ftalocianinas apresentam quando na forma monomolecular. Devido os fotossensibilizadores utilizados na TFD serem aplicado em meio aquoso (sangue, contém em torno de 81 % de água<sup>80,81</sup>), o estudo do comportamento das propriedades fotofísicas da molécula de AIOHPc na presença de água torna-se, portanto, relevante. Sendo assim, foi realizado um estudo da

AIOHPc nas concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes proporções volumétricas de etanol/água destilada (v/v), utilizando as técnicas de absorção ótica, de fluorescência estacionária, de espalhamento de luz ressonante e de fluorescência resolvida no tempo.

A concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AIOHPc utilizadas neste estudo foram intencionalmente escolhidas com base nas concentrações de AIOHPc em etanol apresentados no estudo anterior (item 6.2), vistos que nessas concentrações não há indícios da ocorrência significativa de processos fotofísicos bimoleculares. A concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AIOHPc foi escolhida por ser uma concentração considerada elevada, a qual já apresenta indícios de processos bimoleculares, como a supressão da intensidade de fluorescência e o aumento do tempo de vida devido às reabsorções como verificado no estudo anterior (item 6.2).

Os espectros de absorção da solução de AIOHPc na concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  com diferentes proporções volumétrica de etanol/água (v/v) são mostrados na Figura 35. Nesta concentração os espectros de absorção da AIOHPc para as soluções com 10-60 % de água (v/v) apresentam formas semelhantes ao espectro obtido da solução com 0 % de água e ao espectro de absorção da AIOHPc em solução pura de etanol apresentado na Figura 23 do item 6.1. Porém, o pico de maior intensidade de absorção em 675 nm (banda Q) apresenta um pequeno deslocamento para comprimentos de onda de menor energia (deslocamento batocrômico) e uma diminuição da intensidade de absorção em função do aumento da proporção de água (v/v). Para a solução de AIOHPc com 65 % de água (v/v), observa-se uma diminuição significativa da intensidade de absorção nos picos da região da banda Q e o surgimento de um pico em torno de 831 nm. Nas soluções com 70-90 % de água (v/v), os espectros de absorção da AIOHPc apresentam alteração significativa quando comparados com os espectros de absorção das soluções de 0-60 % de água (v/v) e da Figura 23, sendo observado: o desaparecimento do pico de absorção em torno de 675 nm, o alargamento do pico em torno de 612 nm, e o deslocamento de 46 nm do pico em torno de 836 nm para comprimentos de onda de maior energia em função do aumento da proporção de água (v/v) nas soluções. Em detalhe na Figura 35 é mostrado o comportamento da intensidade dos picos de máxima absorção em função da proporção de água (v/v), onde se observa a diminuição significativa da intensidade de absorção do pico em 675 nm para as soluções com proporções acima de 65 % de água (v/v).



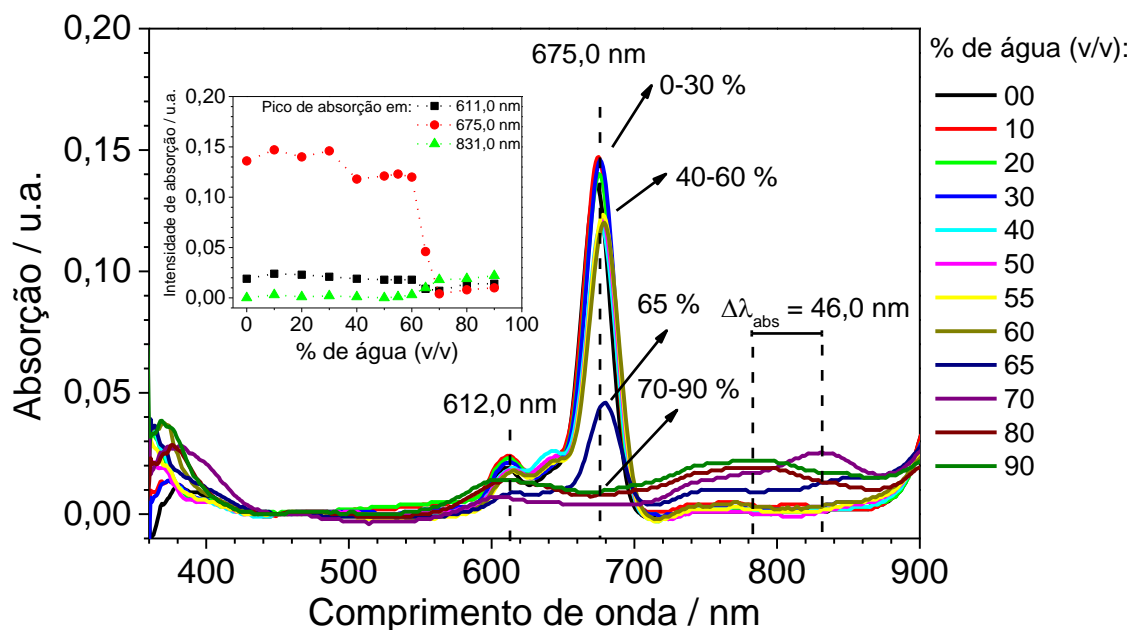


Figura 35 – Espectros de absorção da AIOHPc com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol com diferentes de proporção de água (v/v). Em detalhe, máximos de intensidades dos picos de absorção da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) nas soluções com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$

Os espectros de absorção das soluções de AIOHPc com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  com diferentes proporções de água são mostrados na Figura 36, e apresentam comportamento semelhante ao das soluções na concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os espectros de absorção da AIOHPc ( $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) nas soluções com 10-50 % de água (v/v) apresentam formas semelhantes ao espectro obtido com 0 % de água e ao espectro de absorção da AIOHPc em solução pura de etanol da Figura 23 do item 6.1. No entanto, para a solução com 60 % de água (v/v), se observa uma maior alteração na forma do espectro e o surgimento do pico em torno de 836 nm. Nas soluções com 70-90 % de água (v/v), também se observa: o desaparecimento do pico de absorção em torno de 675 nm, o alargamento do pico em torno de 612 nm e o deslocamento de 50 nm do pico em torno de 836 nm para comprimentos de onda de maior energia em função do aumento da proporção de água (v/v) nas soluções. Em detalhe na Figura 36 é mostrado o comportamento da intensidade dos picos de absorção em função da proporção de água (v/v).

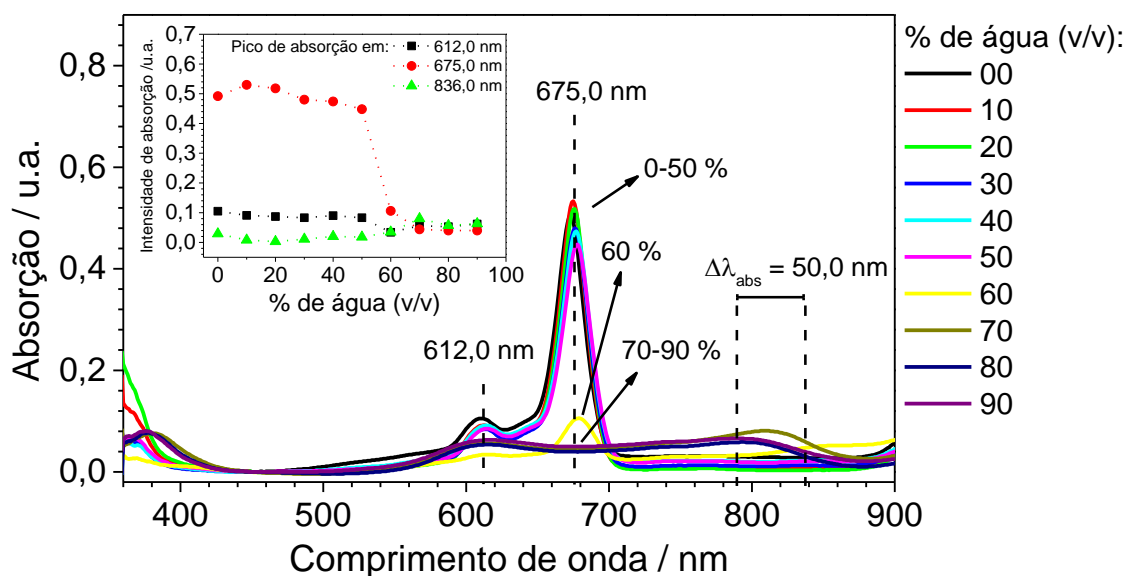


Figura 36 – Espectros de absorção da AIOHPc com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol com diferentes de proporção de água (v/v). Em detalhe, máximos de intensidades dos picos de absorção da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) nas soluções com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$

Na Figura 37 são mostrados os espectros de absorção da AIOHPc com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Para as soluções com 10 % e 20 % de água (v/v) os espectros de absorção apresentam formas semelhantes ao espectro obtido com 0 % de água e ao espectro de absorção da AIOHPc em solução pura de etanol da Figura 23 do item 6.1, com o pico de maior intensidade de absorção em torno de 675 nm, apresentando um pequeno deslocamento para comprimentos de onda de menor energia e ligeira diminuição da intensidade de absorção em função do aumento da proporção de água (v/v). Neste caso, o surgimento de um pico de absorção em torno de 848 nm já é observado para a solução com 30 % de água (v/v), o qual se desloca para comprimentos de onda de maior energia em função da proporção de água (v/v), apresentando um deslocamento de 68 nm quando comparado com o pico de absorção em 780 nm da solução com 90 % de água (v/v). A solução com 40 % de água (v/v) apresenta uma diminuição significativa da intensidade de absorção do pico em torno de 675 nm e para as soluções com 60-90 % de água (v/v) não se observa mais a presença deste pico. Em detalhe na Figura 37, é mostrado o comportamento da intensidade dos picos de absorção em função da proporção de água (v/v).

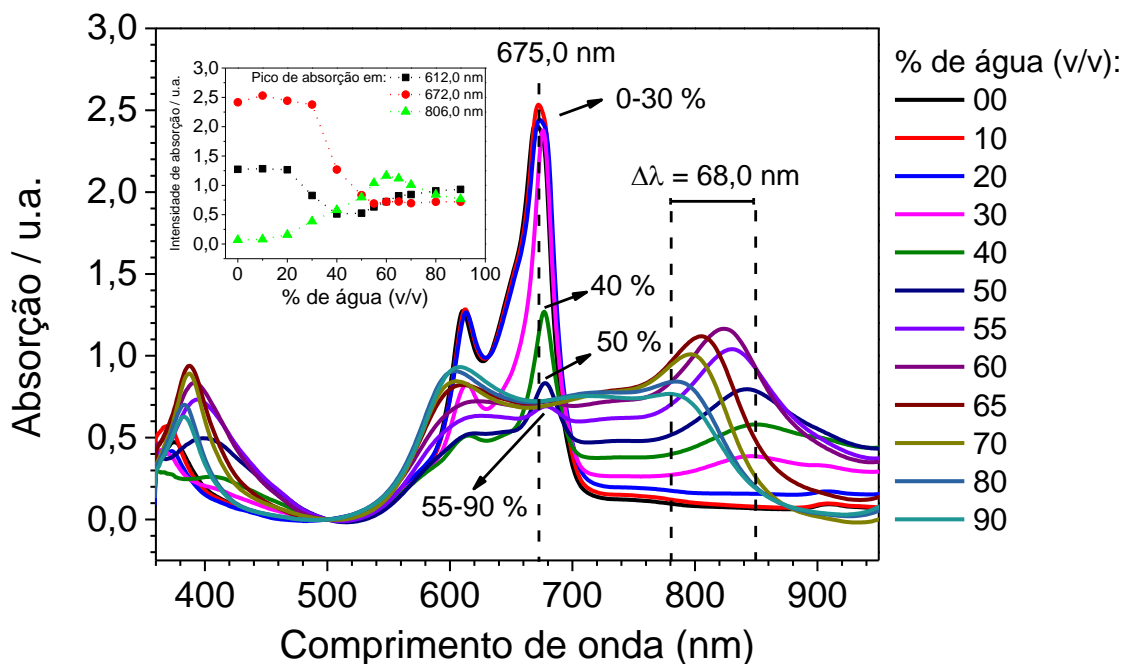


Figura 37 – Espectros de absorção da AIOHPc com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em etanol com diferentes de proporção de água (v/v). Em detalhe, máximos de intensidades dos picos de absorção da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) nas soluções com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$

De forma geral, estes resultados mostram que as modificações mais significativas do espectro de absorção da AIOHPc ocorreram nas soluções com proporção de água (v/v) acima de 65 % para a concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , acima de 60% de água para a concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e acima de 50% de água para a concentração de  $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ . As alterações na forma do espectro de absorção podem estar relacionadas com a formação de agregados. Em especial o pico de absorção observado em torno 830 nm, indica uma possível formação de agregados do tipo J (lado-a-lado), visto que esses agregados têm como característica a absorção em comprimentos de onda de menor energia.

As Figura 38(a) e (b) mostram os espectros de fluorescência obtidos excitando com 636 nm as soluções com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Nota-se que os espectros de fluorescência apresentaram resultados semelhantes para estas concentrações, nos quais se verifica o deslocamento do pico de fluorescência para comprimentos de onda de menor energia e a diminuição da intensidade de fluorescência em função do aumento da proporção de água (v/v). Nestas concentrações, nas soluções de AIOHPc com 70-90 % de água (v/v) não foi detectada emissão. O gráfico em detalhe na Figura 38(a) ( $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e na Figura 38(b) ( $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), mostra a intensidade do pico de emissão em função da proporção de água (v/v). Estes gráficos mostram que a intensidade de fluorescência da AIOHPc diminui com o aumento da proporção de água (v/v) nas soluções.

Na concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  a diminuição de intensidade é mais significativa entre as soluções com 60-65 % de água (v/v), e para a concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  a alteração mais significativa ocorre entre 50-60 % de água (v/v).

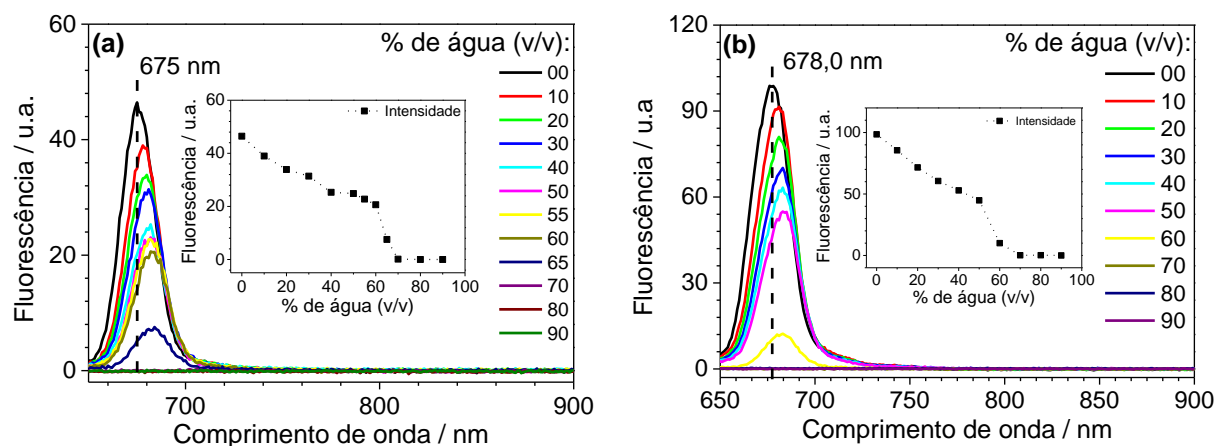


Figura 38 – Espectros de fluorescência ( $\lambda_{\text{exc}} = 636 \text{ nm}$ ) da AIOHPc com concentração (a) de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de (b) de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes proporções volumétricas de etanol/água (v/v). Nas figuras em detalhes estão os gráficos de intensidade máxima do pico de emissão em função da proporção de água (v/v)

Os espectros de fluorescência da AIOHPc com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  obtidos irradiando em  $636 \text{ nm}$  as soluções com diferentes proporções de água (v/v), são mostrados na Figura 39. Para esta concentração os espectros de fluorescência das soluções de 0-30 % de água (v/v) apresentaram o pico de fluorescência em torno de  $692 \text{ nm}$  e a diminuição da intensidade de fluorescência com o aumento da proporção de água (v/v), como observado nas concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da proporção de água (v/v). No entanto, para as soluções de 40-65% de água (v/v) a intensidade de fluorescência diminui com o deslocamento do pico de fluorescência para comprimentos de onda de maior energia. Para as soluções com 70-90 % de água (v/v) não foi detectada emissão. Em detalhe na Figura 39, é mostrado o comportamento da intensidade do pico de fluorescência em função da proporção de água (v/v).

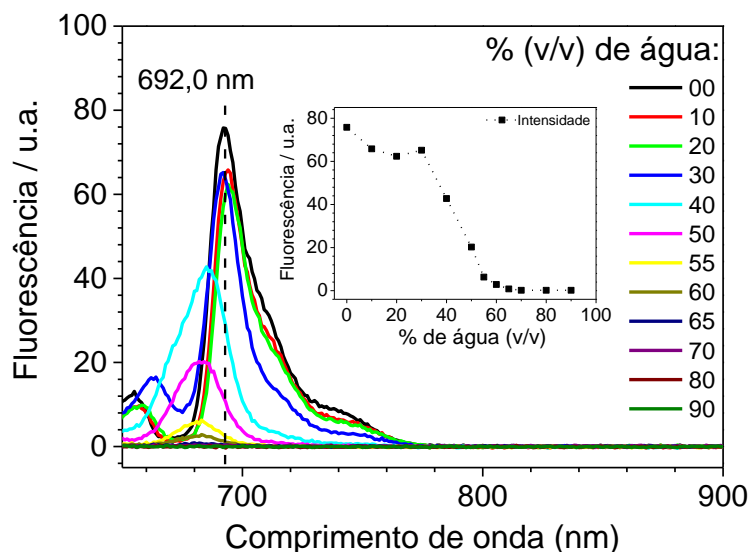


Figura 39 – Espectros de fluorescência estacionária ( $\lambda_{exc} = 636 \text{ nm}$ ) da AIOHPc com concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da proporção de água (v/v). Em detalhe, intensidade máxima do pico de fluorescência em função da proporção de água (v/v)

As soluções de AIOHPc em mistura etanol/água com concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $70 \mu\text{mol L}^{-1}$ , também foram irradiadas em  $350 \text{ nm}$  e em  $401 \text{ nm}$  e os espectros de fluorescência obtidos apresentaram forma semelhante com os obtidos com excitação em  $636 \text{ nm}$ .

Com base nos resultados de absorção e de fluorescência da AIOHPc observa-se que o aumento da proporção de água (v/v) nas soluções está ocasionando dois tipos de regimes, sendo no **regime 1** a água está favorecendo a formação de agregados de AIOHPc nas concentrações estudadas para soluções com mais de 50 % de água (v/v), e no **regime 2** a água está atuando como molécula supressora de fluorescência nas soluções com proporções de água inferiores a 50 % (v/v).

De acordo com Tsubone e colaboradores<sup>75</sup> a técnica de espalhamento de luz ressonante (RLS) pode ser utilizada para verificar se há presença de agregados nas soluções, sendo assim foram obtidos espectros de RLS para as soluções com 0-90 % de água (v/v) com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , como mostrado nas Figura 40 (a), (b) e (c), respectivamente. Os espectros de espalhamento de luz ressonante da AIOHPc nestas concentrações foram corrigidos de acordo com as equações 10, 11 e 12 mostradas no item 4.3.<sup>66</sup>

Na Figura 40(a) os espectros corrigidos de RLS das soluções de AIOHPc na concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  para 0-60 % de água (v/v) não apresentaram intensidade de espalhamento, sugerindo que as soluções estão com alta proporção de AIOHPc na forma

monomolecular. As soluções com 65 % e 70 % de água (v/v) apresentam intensidade de espalhamento nos espectros, indicando a possível agregação das moléculas de AIOHPc. E nas soluções com 80-90 % de água os espectros não apresentam intensidade de espalhamento, isto de acordo com Tsubone indica a possível precipitação da AIOHPc nas soluções. Já nos espectros corrigidos de RLS das soluções com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (Figura 40(b)) a intensidade de espalhamento para as soluções de AIOHPc com 0-40 % de água (v/v) é baixa, indicando também que as soluções apresentam alta proporção de moléculas AIOHPc na forma monomolecular. Nesta concentração observa-se que a solução com 50 % de água (v/v) já apresenta intensidade de espalhamento no espectro, a qual aumenta até a solução com 70 % de água (v/v). Para as soluções com 80 % e 90 % ainda ocorre espalhamento, porém com menor intensidade.

Na concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  o espectro corrigido de RLS (Figura 40(c)) para a solução com 0 % de água (v/v) não apresenta intensidade de espalhamento, indicando que as moléculas de AIOHPc na solução estão na forma monomolecular. No entanto, nas soluções com 10-55 % de água (v/v) observa-se o aumento da intensidade de espalhamento nos espectros, possivelmente devido à formação agregados de AIOHPc causando pela alta hidrofobicidade das moléculas de AIOHPc em água. Este aumento da intensidade de espalhamento pode estar atribuído à quantidade e/ou ao tamanho dos agregados formando em função da proporção de água (v/v). Para as soluções com 60 % de água ou mais a intensidade de espalhamento diminui, possivelmente devido à precipitação da AIOHPc com o aumento da proporção de água (v/v) nas soluções.<sup>75,82</sup>

A Figura 40(d) mostra a curva normalizada formada a partir dos picos de máxima intensidade de espalhamento dos espectros corrigidos de RLS em função da proporção de água (v/v), para todas as concentrações. Nas concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  ocorre o aumento da intensidade de espalhamento nas soluções com até 70 % de água (v/v) e depois diminui para as soluções com 80 % e 90 % de água (v/v). Na concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  o máximo da intensidade de espalhamento ocorre na solução com 55 % de água (v/v), e na solução com 60 % ou acima disto, a intensidade de espalhamento diminui.

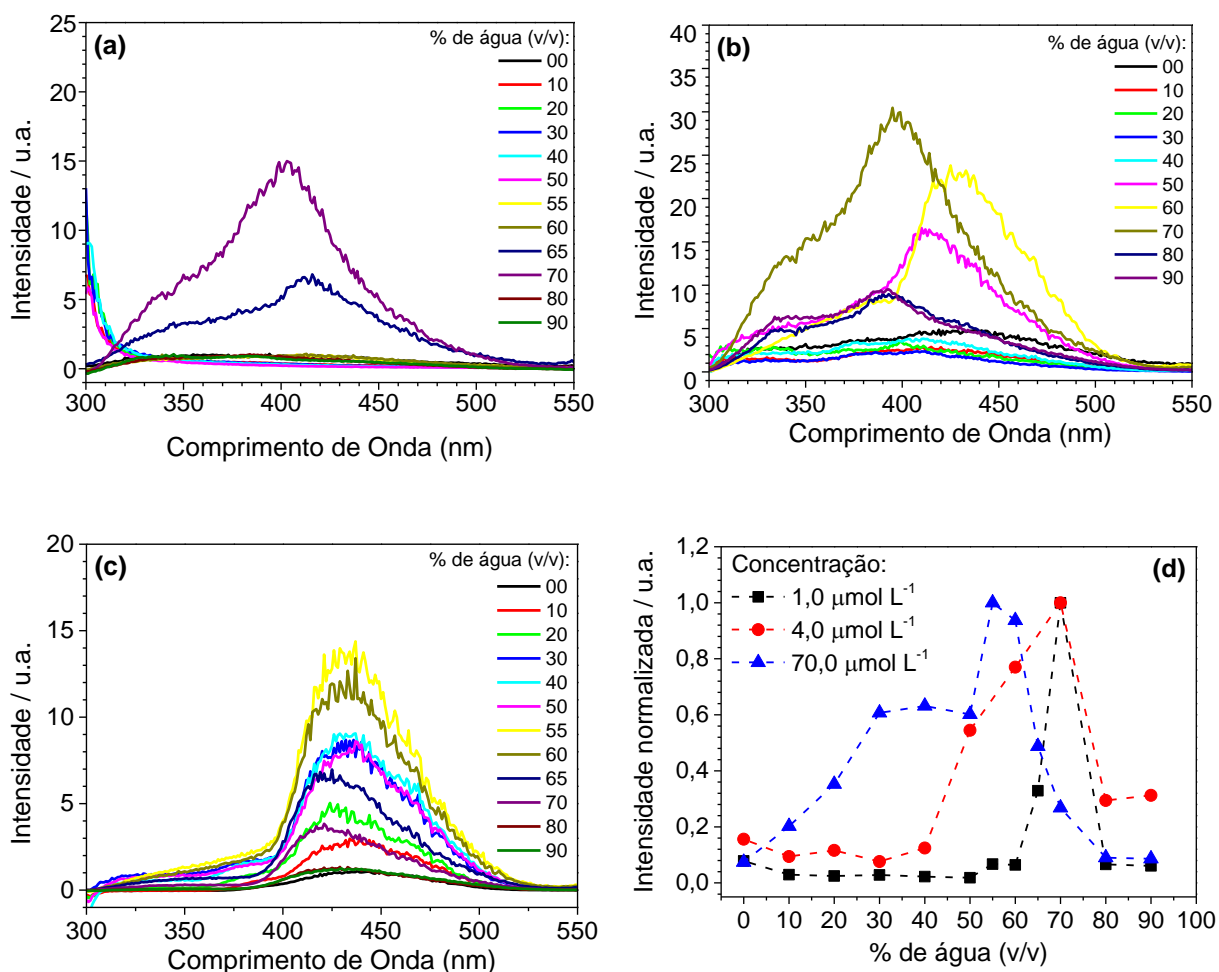


Figura 40 – Espectros corrigidos de RLS da AIOHPc com concentração de (a)  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de (b)  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de (c)  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em função da proporção de água (v/v). Curva da intensidade máxima de espalhamento dos espectros de RLS da AIOHPc em função da proporção de água (v/v)

Com base nos resultados de RLS pode-se dizer que nas soluções acima de 50 % de água (v/v) (regime 1) está ocorrendo à agregação das moléculas de AIOHPc. E a partir dos resultados de absorção, de fluorescência e de RLS, verifica-se que quanto mais concentrada as soluções de AIOHPc menor será a porcentagem de água necessária para causar alterações nas propriedades ópticas da molécula.

A utilização da técnica TCSPC além de permitir determinar o tempo de permanência das moléculas fluorescentes no estado excitado, também permite verificar a ocorrência de formação de agregados moleculares, como no caso das moléculas de metaloftalocianinas, as quais em forma agregada podem apresentar estados excitados com mais de um tempo de vida, sendo estes mais curtos, da ordem de 1-2 ns e 0,1-0,5 ns, quando comparado ao tempo de vida da forma monomolecular (sem ocorre processos de transferência de energia radiativa), geralmente entre 4-6 ns.<sup>77,83</sup>

Na Figura 41(a) são mostrados os valores dos tempos de vida da AIOHPc na concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da proporções de água (v/v) quando excitadas em 401 nm. As curvas de decaimento de fluorescência da AIOHPc obtidas para esta concentração neste estudo são mostradas na Figura A. 4 do Apêndice F. A solução de AIOHPc em etanol puro (0 % de água) apresentou um único tempo de vida em torno de 6,74 ns, obtido por ajuste monoexponencial (Equação 13). Nas soluções com 10-60 % de água (v/v) os decaimentos também foram monoexponencial e os valores dos tempos de vida da AIOHPc diminuiram ligeiramente em função da proporção de água (v/v) nas soluções, alcançando o valor de 5,76 ns (diferença de 1,07 ns) para a solução com 60 % de água (v/v). Para as amostras com 65-90 % de água (v/v) foram obtidos três tempo de vida da AIOHPc distintos a partir do ajuste triexponencial (Equação 13), sendo o tempo de vida mais longo ( $\tau_1$ ) da ordem de 5,5 ns e outros dois tempos mais rápidos, um intermediário ( $\tau_2$ ) em torno de 1,2 ns e outro mais curto ( $\tau_3$ ) em torno de 0,15 ns. Pode-se atribuir o tempo de vida mais longo à emissão da AIOHPc na forma monomolecular e os demais tempos à agregação da molécula. A Figura 41(b) mostra a amplitude (contribuição) de cada tempo de vida da AIOHPc em função da proporção de água (v/v). Nas soluções entre 0-60 % de água (v/v) a contribuição foi de 100 % para o tempo de vida mais longo ( $A_1$ ), atribuído à emissão da forma monomolecular da AIOHPc. Na solução com 65-90 % de água (v/v) a amplitude do tempo de vida mais longo ( $A_1$ ) diminui de 88,06 % para 15,54 % enquanto as amplitudes do tempo de vida  $\tau_2$  e  $\tau_3$  aumentam em função da proporção de água, sendo a variação da amplitude de  $A_2$  de 3,59 % para 25,35 % e a de  $A_3$  de 8,35 % para 59,11 %. Os valores de tempo de vida da AIOHPc com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e as respectivas amplitudes estão na Tabela A. 4 do Apêndice G.



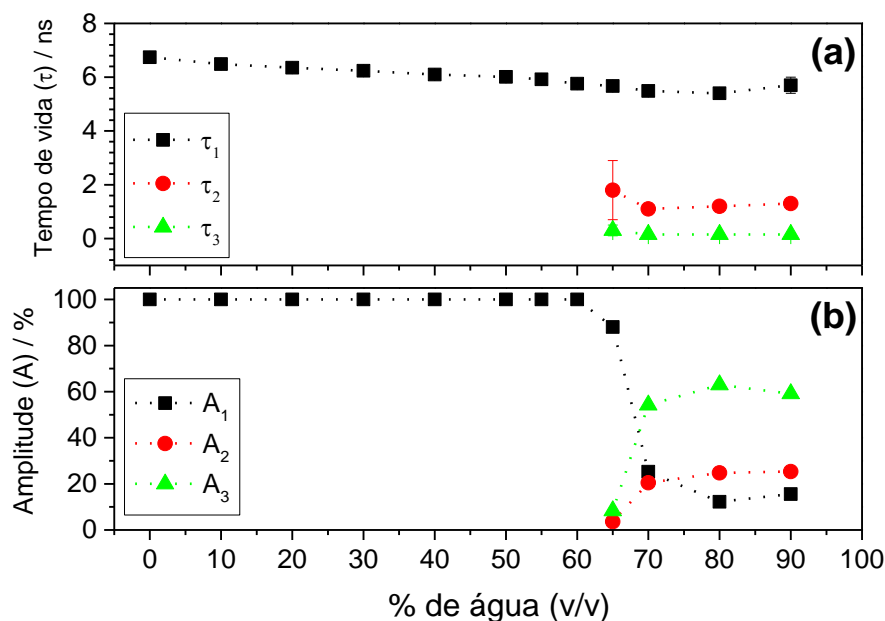


Figura 41 – (a) tempos de vida da AIOHPc com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em mistura etanol/água quando irradiada com 401 nm e (b) suas respectivas amplitudes

Os valores dos tempos de vida da AIOHPc em concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  com diferentes porcentagem de água (v/v) e as respectivas amplitudes obtidos com excitação em 401 nm são mostrados nas Figura 42(a) e (b), respectivamente. Na solução de AIOHPc em etanol puro (0 % de água) o tempo de vida obtido com um ajuste monoexponencial foi em torno de 7,29 ns. Para as soluções de 10-50 % de água (v/v), os valores do tempo de vida da AIOHPc nas soluções foram obtidos por ajuste monoexponencial, e os valores dos tempos de vida diminuíram ligeiramente com o aumento da proporção de água (v/v), sendo o tempo de vida na solução com 50 % de água (v/v) de 5,75 ns (diferença de 1,54 ns). Já para as amostras com 60-90 % de água (v/v) foram obtidos três diferentes tempos de vida da AIOHPc a partir do ajuste triexponencial, cujo tempo de vida mais longo ( $\tau_1$ ) foi da ordem de 5,4 ns e outros dois tempos, um intermediário ( $\tau_2$ ) em torno de 1,2 ns e outro mais curto ( $\tau_3$ ) em torno de 0,15 ns. Com relação às amplitudes de tempos de vida da AIOHPc em função da proporção de água (Figura 42(b)), as soluções entre 0-50 % de água (v/v) a contribuição ( $A_1$ ) foi de 100 % para o tempo de vida mais longo, novamente atribuído à emissão da forma monomolecular da AIOHPc e para a solução de 65-90 % de água (v/v) a amplitude do tempo de vida mais longo ( $A_1$ ) diminui de 73,17 % para 13,54 % enquanto as amplitudes do tempo de vida  $\tau_2$  e  $\tau_3$  aumentam em função da proporção de água, sendo a amplitude  $A_2$  variando de 7,3 % para 19,13 % e a  $A_3$  de 19,53 % para 67,33 %. Os valores de tempo de vida da AIOHPc com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e suas respectivas amplitudes, estão na Tabela A. 5 do Apêndice G.

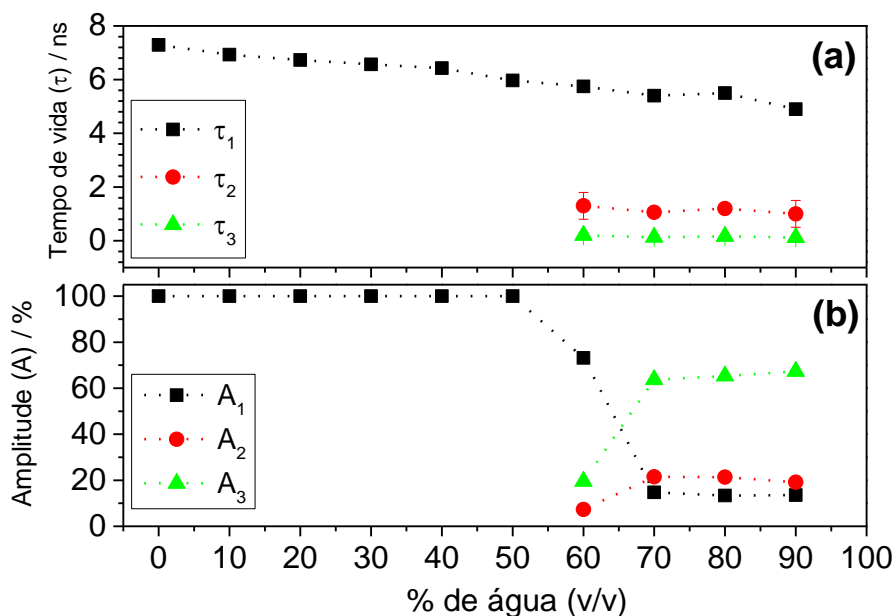


Figura 42 – (a) tempos de vida da AIOHPc com concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em mistura etanol/água quando irradiada com 401 nm e (b) suas respectivas amplitudes

Como mostrado nas Figura 43(a) e (b) os valores dos tempos de vida da AIOHPc em concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  com diferentes porcentagem de água (v/v) e as respectivas amplitudes quando excitada em 401 nm, apresenta comportamento semelhante aos resultados das concentrações de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $4 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Na solução de AIOHPc etanol puro obteve-se um único tempo de vida em torno de 10,68 ns, obtido por um ajuste monoexponencial e para as soluções de 10-55 % de água (v/v), as curvas de decaimento fluorescência também apresentaram um melhor ajuste monoexponencial e os valores dos tempos de vida da AIOHPc diminuíram com o aumento da proporção de água (v/v), alcançando valores de 5,87 ns (diferença de 4,81 ns) para a solução com 55 % de água (v/v). Nas soluções com 60-90 % de água (v/v) os decaimentos apresentaram três distintos tempos de vida da AIOHPc (obtidos com um ajuste triexponencial), sendo o tempo de vida mais longo ( $\tau_1$ ) da ordem de 5,5 ns e outros dois tempos, um intermediário ( $\tau_2$ ) em torno de 1,1 ns e outro mais curto ( $\tau_3$ ) em torno de 0,10 ns. Na amplitude de cada tempo de vida da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) (Figura 43(b)), as soluções entre 0-55 % de água (v/v) tem amplitude de 100 % para o tempo de vida mais longo ( $A_1$ ), atribuído à emissão da forma monomolecular da AIOHPc. Na solução com 60-90 % de água (v/v) a amplitude do tempo de vida mais longo ( $A_1$ ) diminui de 79,97 % para 10,21 % enquanto as amplitudes do tempo de vida  $\tau_2$  e  $\tau_3$  aumentam em função da proporção de água, sendo a variação da amplitude de  $A_2$  de 2,42 % para 13,56 % e a de  $A_3$

de 17,61 % para 76,23 %. Os valores de tempo de vida da AIOHPc com concentração de 70,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e suas respectivas amplitudes, estão na

Tabela A. 6 do Apêndice G.

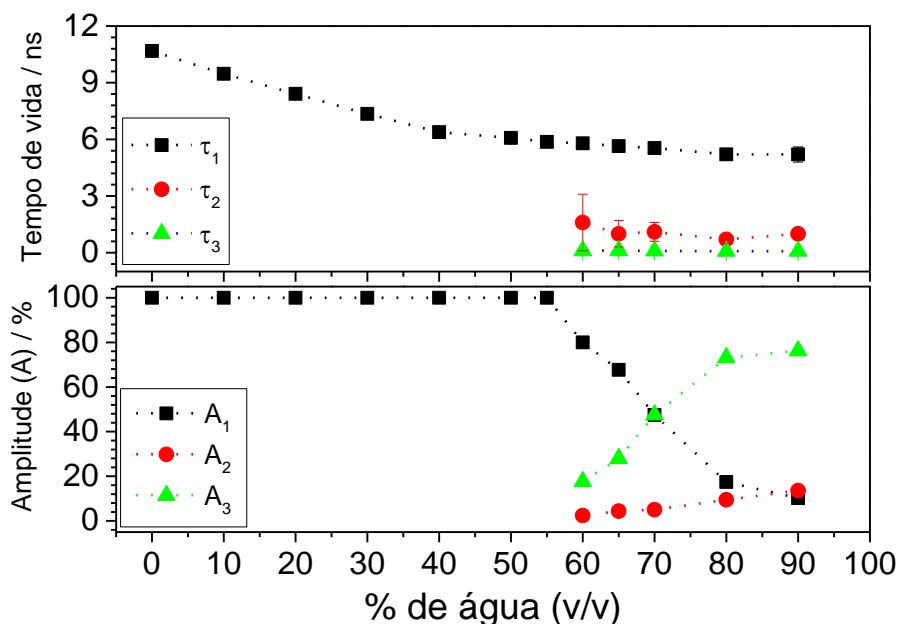


Figura 43 – (a) tempos de vida da AIOHPc com concentração de 70,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em mistura etanol/água quando irradiada com 401 nm e (b) as respectivas amplitudes

A Figura 44 compara os valores dos tempos de vida de AIOHPc obtidos na concentração de 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , de 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e de 70,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Observa-se nestas concentrações o tempo de vida mais longo atribuído à forma monomolecular da AIOHPc diminuindo com o aumento da proporção de água (v/v). A diminuição do tempo de vida da AIOHPc em função da proporção de água (v/v) pode ser estar relacionada ao processo fotofísicos bimoleculares de supressão de fluorescência (item 1.2.1), sendo a água o agente supressor. Para as soluções de AIOHPc com 60-90 % de água (v/v) independente da concentração, a ocorrência de três tempos de vida evidencia a coexistência de moléculas e agregados. No qual o tempo de vida mais longo da AIOHPc corresponde à emissão monomolecular, os dois outros tempos de vida ( $\tau_2 \approx 1,2$  ns e  $\tau_3 \approx 0,15$  ns) estão relacionado à emissão dos agregados (possíveis dímeros, trímeros e/ou tetrâmeros), como verificado para a Ftalocianina de Cloro Alumínio (AICIPc) de acordo com Jayme e colaboradores<sup>77</sup>.

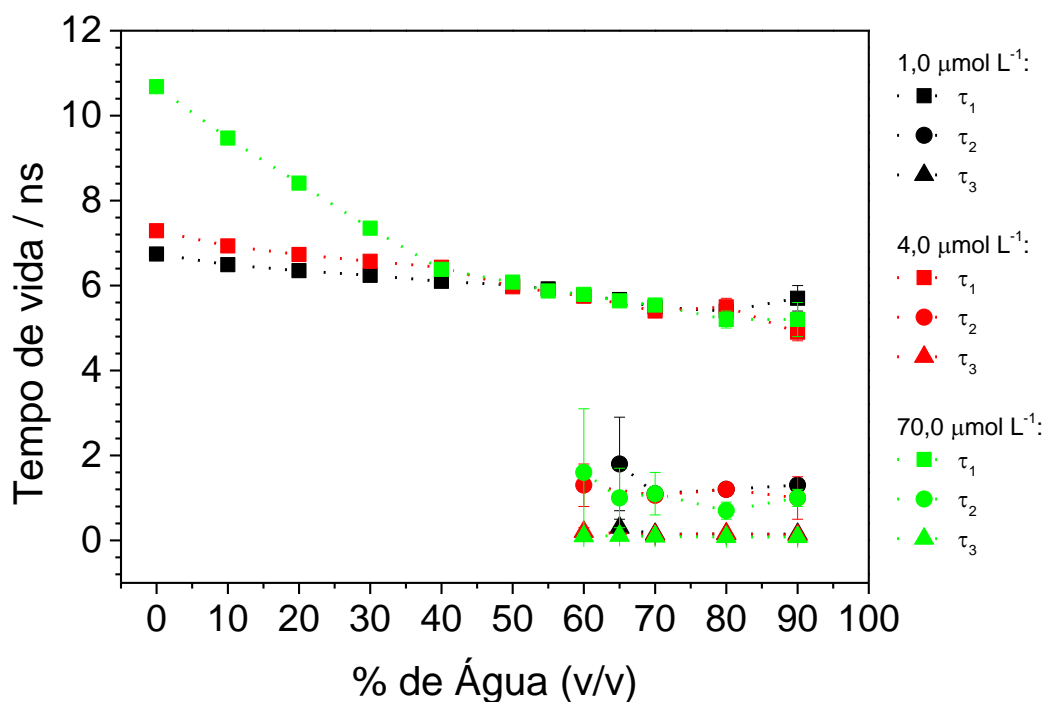


Figura 44 – Comparação dos tempos de vida da AIOHPc para a concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (símbolos preto), de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (símbolos vermelho) e de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (símbolos verde), em função das proporção de água (v/v) nas soluções, irradiada com 401 nm

Ainda para elucidar sobre o **regime 2**, no qual foi observado diminuição da intensidade de fluorescência nas concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em função da proporção de água (v/v), foi realizado um estudo para verificar qual o processo de supressão de fluorescência que ocorre nas soluções de AIOHPc causado pelas moléculas de água. A Figura 45 mostra o gráfico de Stern-Volmer, dado pela razão dos picos de fluorescência da AIOHPc (fluorescência na ausência do supressor pela fluorescência com supressor,  $F_0 / F$ ) em função da concentração molar da água, para as concentrações estudadas. Observa-se que para as soluções com concentração molar entre  $0-27,77 \text{ mol L}^{-1}$  (soluções de  $0-50 \%$  de água (v/v)) a curva exibiu um comportamento linear para ambos os solventes. Com base neste comportamento linear do gráfico de Stern-Volmer e com os resultados do tempo de vida da AIOHPc em mistura etanol/água (v/v), os quais mostraram variação no tempo de vida em função da proporção de água (v/v), a diminuição da intensidade de fluorescência da AIOHPc para as soluções entre  $0 \%$  até  $50 \%$  de água (v/v), para estas concentrações são característicos da ocorrência da supressão dinâmica. Neste caso a diminuição da intensidade de fluorescência da AIOHPc está ocorrendo devido à colisão entre molécula de água e molécula de AIOHPc excitada, consequentemente a molécula de AIOHPc excitada retorna ao estado fundamental  $S_0$  sem emitir um fóton (Item 1.2.1).

Em detalhe na Figura 45, é mostrado o ajuste linear das soluções de AIOHPc para as concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com concentração molar de água variando de  $0-16,67 \text{ mol L}^{-1}$  ( $0-30 \%$  de água (v/v)) utilizando a Equação 3. Os valores das constantes de Stern-Volmer (Tabela 8) foram de  $30 \text{ mL mol}^{-1}$  para a concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de  $22 \text{ mL mol}^{-1}$  para a concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e de  $14 \text{ mL mol}^{-1}$  para a concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

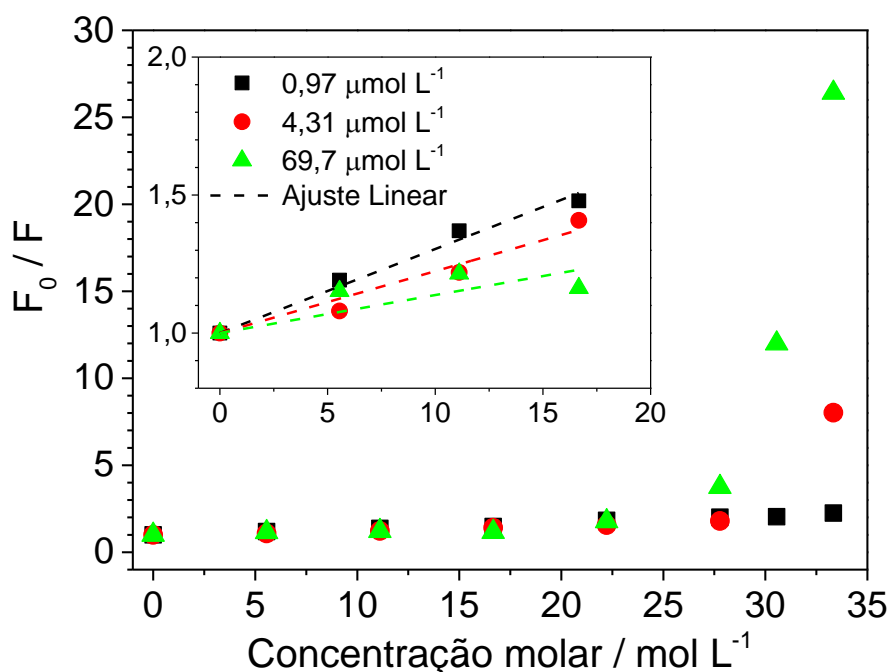


Figura 45 – Curva de Stern-Volmer obtida a partir da fluorescência da AIOHPc (soluções com 0-60% água (v/v)) quando excitada com 636 nm em função da concentração molar da água, nas concentrações de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Em detalhe, ajuste linear (linha tracejada) do gráfico de Stern-Volmer (soluções com 0-30% água (v/v))

A partir da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) pelo tempo de vida da AIOHPc na ausência de supressor ( $\tau_0$ ) (Equação 3), pode-se calcular a constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ), ou seja:

$$k_q = \frac{K_{SV}}{\tau_0}$$

A constante de supressão bimolecular informa a eficiência do supressor ou a acessibilidade da molécula (AIOHPc) ao supressor (água). Estudos mostram que na supressão controlada por difusão a constante de supressão bimolecular é próxima de  $1 \times 10^{10} \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

Para moléculas que apresentem constante de supressão bimolecular menor que este valor a eficiência de supressão é considerada baixa.<sup>8</sup>

Sendo assim, os valores da constante de supressão bimolecular obtidos (Tabela 8) foram: de  $4,45 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  para a concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , de  $3,02 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  na concentração de  $4,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  foi e de  $1,31 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$  na concentração de  $70,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Estes resultados mostram que: a água apresentou baixa eficiência de supressão nas moléculas de AIOHPc e que as acessibilidades das molécula de água diminuem com o aumento da concentração de AIOHPc.

Tabela 8 – Valor da constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para o caso de supressão dinâmica da AIOHPc, constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ) e qualidade do erro ( $R^2$ )

<b>Concentração de AIOHPc</b> $\mu\text{mol L}^{-1}$	$K_{SV}$ $\text{mL mol}^{-1}$	$k_q$ $\text{L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$R^2$
<b>1,0</b>	$30 \pm 1$	$4,45 \times 10^6$	0,999
<b>4,0</b>	$22 \pm 2$	$3,02 \times 10^6$	0,999
<b>70,0</b>	$14 \pm 3$	$1,31 \times 10^6$	0,996

Para as soluções com mais de  $27,77 \text{ mol L}^{-1}$  de água (mais de 50 % de água (v/v)), a não linearidade observada na curva de Stern-Volmer é atribuída à extinção da fluorescência causada devido à formação de agregado de moléculas de AIOHPc. Resultados similares da transição de monômero/agregado foram observados por Jayme e colaboradores<sup>77</sup>, na qual ocorreu a agregação da molécula de Ftalocianina de Cloro Alumínio (AICIPc) para soluções com proporções de água acima de 50 %.

#### 6.4 FOTOFÍSICA DA AIOHPc EM NANOESFERAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO

A seguir será apresentado o estudo das propriedades fotofísicas da AIOHPc em nanoesferas de ácido poliláctico (PLA), realizados a partir das técnicas de absorção ópticas, de fluorescência estacionária e de fluorescência resolvida no tempo. Foram preparadas formulações com diferentes quantidades de massa de AIOHPc, como mostrado na Tabela 2 do item 5.

A Figura 46 compara os espectros de absorção das formulações. O espectro de absorção da Formulação “branca” (não contém AIOHPc) não foi apresentado, devido à curva

de absorção obtida representar a “absorção de fundo” gerada pelo espalhamento da luz (fonte de radiação) nas nanoesferas em meio aquoso. O espectro de absorção da Formulação 1 não indica absorção associada à presença de AIOHPc possivelmente devido à baixa quantidade de massa utilizada. A alteração da forma do espectro de absorção da Formulação 2 indica a presença da AIOHPc. Nas Formulações 3 e 4 os espectros de absorção apresentam pico de absorção em torno de 675 nm característico da AIOHPc em forma monomolecular, e os picos em torno de 592 nm e de 809 nm característicos da AIOHPc em presença de água, como apresentado no item 6.3, indicando a existência de agregados de moléculas de AIOHPc.

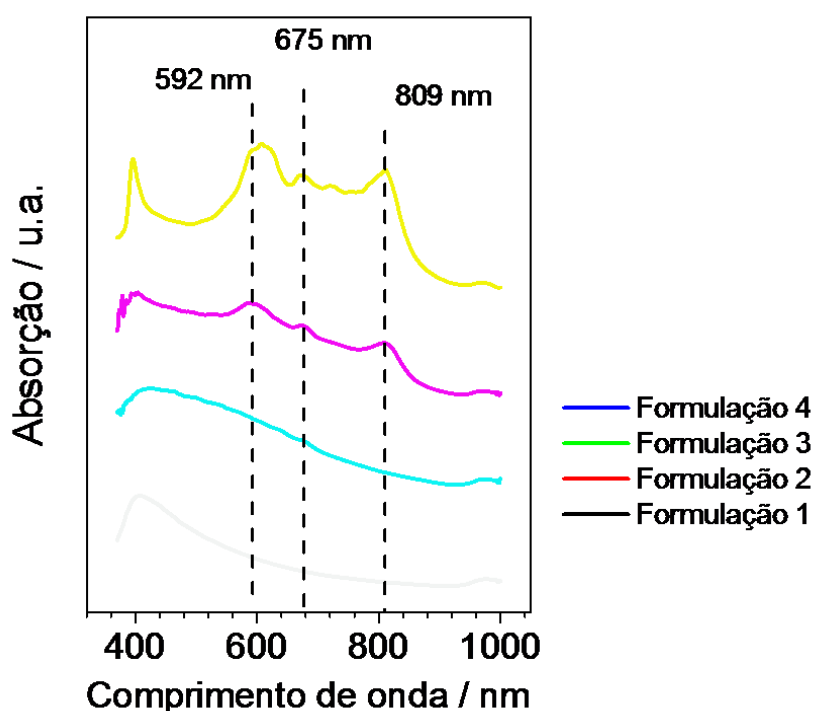


Figura 46 – Espectros de absorção das formulações contendo AIOHPc em nanoesferas de PLA

Estes resultados indicaram que nas formulações, há moléculas de AIOHPc na forma agregada e monomolecular. No caso do agregado não é possível determinar se estes encontram-se no meio externo (água) ou nas nanoesferas de PLA seja no interior ou na superfície. A AIOHPc monomolecular possivelmente encontra-se ligada a nanoesfera de PLA, pois por ser hidrofóbica, no meio externo ocorreria agregação.

A Figura 47 mostra os espectros de fluorescência quando irradiada em 636 nm, no qual se observa o pico de emissão em torno de 680 nm para as Formulações 2-4, com comportamento característico da AIOHPc em etanol, conforme observado no item 6.1. Para as Formulações 2 e 3 a intensidade de emissão foi significativamente mais alta, quando

comparada com a Formulações 4. As formulações também foram excitadas em 350 nm e em 401 nm e os espectros de fluorescência apresentaram resultados semelhantes.

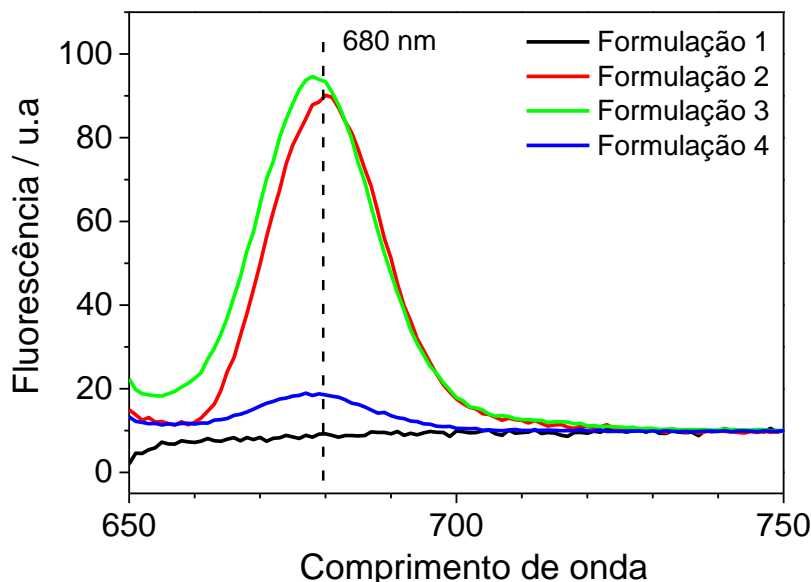


Figura 47 – Espectros de fluorescência das formulações contendo AIOHPc em nanoesferas de PLA, com excitação em 636 nm

A partir dos resultados de fluorescência da AIOHPc é possível inferir que na Formulação 4, devido a maior quantidade de massa, ocorreu supressão da fluorescência.

As medidas do tempo de vida da AIOHPc nas formulações foi realizada com excitação em 401 nm. As curvas de decaimento de fluorescência para todas as formulações foram ajustadas com um ajuste biexponencial de acordo com a Equação, fornecendo os tempos de vida médios de  $7,0 \pm 0,4$  ns e  $2,1 \pm 0,6$  ns. Observa-se que os tempos de vida da AIOHPc independem da massa utilizada na preparação das formulações, conforme mostrado na Figura 48 e na Tabela 9.



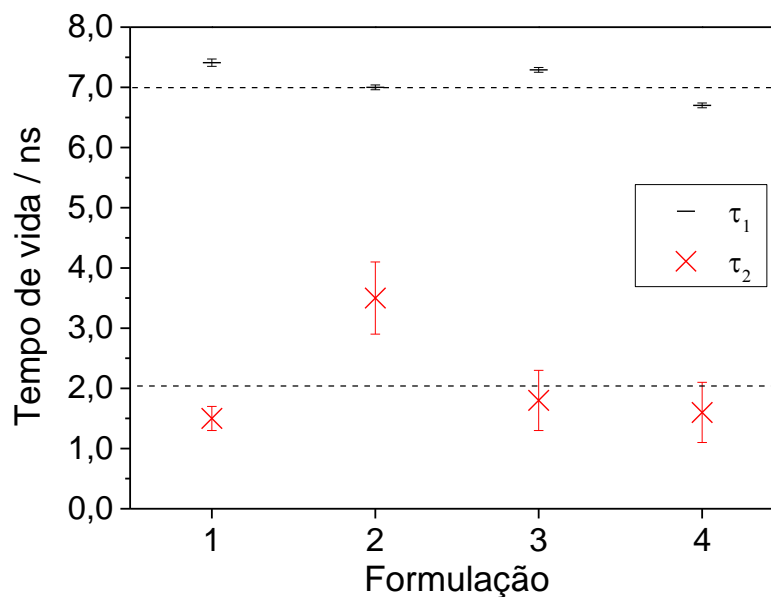


Figura 48 – Tempos de vidas das formulações de AIOHPc encapsulada em nanoesferas de PLA. Excitação em 401 nm

Os valores do tempo de vida longo ( $\tau_1 \approx 7,0$  ns) estão próximos do tempo de vida monomolecular da AIOHPc em etanol mostrado na Tabela 6 do item 6.1, sustentando a hipótese de que nas formulações há também AIOHPc na forma monomolecular. O tempo de vida mais curto encontrado nas formulações ( $\tau_2 \approx 2,1$  ns) está relacionado à existência de agregados, assim como obtido no estudo da AIOHPc em mistura etanol/água (v/v) e mostrado no item 6.3. No entanto a baixa contribuição do tempo de vida mais curto ( $A_2$ ) indica que os agregados pouco contribuem com a fluorescência (Tabela 9). Ainda não é possível determinar se estes encontram-se no meio externo ou nas nanoesferas de PLA seja no interior ou na superfície

Tabela 9 – Tempos de vida das formulações de AIOHPc, irradiada com 401 nm. Amplitudes respectivas dos tempos de vida e qualidade do ajuste ( $\chi^2$ )

Formulação	$\tau_1$ / ns	$A_1$	$\tau_2$ / ns	$A_2$	$\chi^2$
“branca”	---	---	---	---	---
1	$7,41 \pm 0,06$	81,59%	$1,5 \pm 0,2$	18,41%	1,119
2	$7,00 \pm 0,04$	91,49%	$3,5 \pm 0,6$	8,51%	1,058
3	$7,29 \pm 0,04$	95,89%	$1,8 \pm 0,5$	4,11%	1,007
4	$6,70 \pm 0,04$	93,43%	$1,6 \pm 0,5$	6,57%	1,000

## 7 CONCLUSÃO

Na comparação das propriedades fotofísicas da AIOHPc nos solventes etanol e DMSO, as alterações nas propriedades de absorção, de fluorescência, a eficiência quântica de fluorescência e o tempo de permanência da AIOHPc no estado excitado apresentaram diferenças poucos significativas.

No estudo sistemático da absorção da AIOHPc em função da concentração realizado nos solventes etanol e DMSO, os valores de coeficiente de absorção molar da AIOHPc são relativamente próximos, no entanto, nenhum dos valores obtidos confirma os valores apresentados por Tsubone<sup>75</sup>. Os maiores valores de eficiência quântica de fluorescência da AIOHPc, quando irradiada em 670 nm, foram em torno 0,40 nos solventes etanol e DMSO para as baixas concentrações, sendo estes adequados para o uso em terapia fotodinâmica. O modelo de Birks confirma que a supressão da fluorescência (diminuição da eficiência quântica) e o aumento dos valores de tempo de vida da AIOHPc, ocorrem predominantemente devido a processos de reabsorção e reemissão de fótons entre as moléculas de AIOHPc, provocado pelo aumento da concentração.

Verificou-se que as propriedades fotofísicas da AIOHPc em solução de etanol são significativamente alteradas com o aumento da proporção de água. Nas proporções de 0-40 % de água (v/v) ocorre à supressão colisional da fluorescência da AIOHPc pela presença de moléculas de água, e para as proporções superiores a 50 % de água ocorre à formação de agregados. A formação de agregados é confirmada a partir da alteração da forma dos espectros de absorção óptica, do aumento de intensidade do RLS, e da ocorrência de mais dois tempos de vida obtidos pela técnica de fluorescência resolvida no tempo. A supressão colisional entre as moléculas de água e as moléculas de AIOHPc excitadas é confirmada a partir da linearidade no gráfico de Stern-Volmer para a intensidade de fluorescência e da diminuição dos valores do tempo de vida da AIOHPc em função da água (v/v). Os valores da constante de supressão bimolecular ( $k_q$ ), mostram que a água tem baixa eficiência de supressão.

O método proposto para o encapsulamento da AIOHPc resultou em nanoesferas de PLA monodispersas ( $PI < 0,3$ ) com diâmetro médio de  $160 \pm 30$  nm. As formulações obtidas a partir de massa de AIOHPc entre 5-200 mg apresentaram fluorescência, indicando que nessas condições é possível utilizar a AIOHPc como marcador de fluorescência *in situ*. O uso de massa de AIOHPc menor que a citada não permite medidas possivelmente devido à sensibilidade de detecção do equipamento, e para massa maior ocorre à supressão da

fluorescência. Os espectros de absorção e os valores de tempos de vida obtidos confirmam a ocorrência das moléculas de AIOHPc tanto em forma agregada, como em forma monomolecular.

Supõe-se que a forma monomolecular da AIOHPc esteja retida no interior ou na interface da nanoesfera de PLA, pois o meio externo sendo hidrofóbico favorece a auto-agregação. Conforme apresentado por Silva<sup>25</sup> o método de deposição interfacial de polímero pré-formado apresenta elevada porcentagem de encapsulamento, portanto os agregados detectados também estão retidos nas nanoesferas.

Como perspectivas futuras, serão preparadas novas formulações de AIOHPc encapsulada variando de massa de AIOHPc entre 5-200 µg, buscando determinar a taxa de AIOHPc em forma monomolecular/agregada nas nanoesferas, verificar a eficiência de encapsulamento de AIOHPc em função da massa e confirmar as conclusões que já foram abordadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- <sup>1</sup> TURRO, N. J. **Molecular Photochemistry**. W. A Benjamin INC., London, 1965.
- <sup>2</sup> RIBEIRO, J. **Fotofísica e determinação de parâmetros fotodinâmicos da ftalocianina de zinco em meios homogêneo e macroheterogêneo**. 2003. 119 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.
- <sup>3</sup> ATIKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química**. 3ª Edição. Artmed, 2006.
- <sup>4</sup> SOUZA, E. R.; SIGOLI, F.A. Princípios fundamentais e modelos de transferência de energia inter e intramolecular. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1841-1847, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422012000900024>>. Acessado em: 29 mar. 2016.
- <sup>5</sup> HENNEBICQ, E. et al. Exciton migration in rigid-rod conjugated polymers: An improved Förster model. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 13, p. 4744-4762, 2005. DOI:10.1021/ja0488784
- <sup>6</sup> FÖRSTER, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. **Anmeldung der Physik**, v. 437, n. 1-2, p. 55-75, 1948. DOI:10.1002/andp.19484370105
- <sup>7</sup> POSTACCHINI, B. B. **Fotofísica em heteroestruturas contendo o polímero emissor PPV e espécies supressoras**. 2009. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- <sup>8</sup> LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2ª ed., New York, 1999.
- <sup>9</sup> VALEUR, B. **Molecular Fluorescence Principles and Applications**. Wiley-VCH, 2ª ed. 2001.
- <sup>10</sup> EATON, D. F. Reference materials for fluorescence measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 60, n. 7, p.1107-1114, 1988. DOI:10.1351/pac198860071107

- <sup>11</sup> LERSEN, A. L.; REID, C. E. An Investigation of Certain Solvent Effect in Absorption Spectra. **Journal of Advanced Research in Physics**, v.20, n. 2, p. 233, 1952. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.1700384>>. Acessado em: 29 mar. 2016.
- <sup>12</sup> STREIT, N. M. et al. As clorofilas. **Ciência Rural**, v.35, n. 3, p. 748-755, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>>. Acessado em: 28 mar. 2016.
- <sup>13</sup> ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5ªed., Porto Alegre: Artmed, 2010.
- <sup>14</sup> AGGARWAL, L. P. F. **Interações das porfirinas aquo-solúveis TPPS<sub>4</sub> e TMPyP com sistemas biológicos e modelos. Efeitos de pH e da força iônica**. 2005. 150 f. Tese (Doutorado em Física) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- <sup>15</sup> LAWRENCE, D. S.; WHITTEN, D. G. Photochemistry and Photophysical Properties of Novel Unsymmetrically Substituted Metallophthalocyanines. **Photochemistry and Photobiology**, v. 64, n. 6, p. 923-935, 1996. DOI:10.1111/j.1751-1097.1996.tb01857.x
- <sup>16</sup> MELO, C. C. de. **Síntese e investigações estruturais de arranjos supramoleculares formados por metaloporfirinas e metaloftalocianinas**. 2012. 113 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2012.
- <sup>17</sup> OLIVEIRA, K. T. de. et al. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015. DOI:10.5935/1984-6835.20150016
- <sup>18</sup> MACK. J.; KOBAYASHI, N. Low Symmetry Phthalocyanines and their Analogues. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 2, p. 281-321, 2011. DOI:10.1021/cr9003049
- <sup>19</sup> ROTELOK, D. **Síntese de novos materiais baseados em ftalocianinas para captura de CO<sub>2</sub>**. 2013. 66 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.
- <sup>20</sup> RIO, Y.; RODRÍGUEZ-MORGADE, M. S.; TORRES, T. Modulating the electronic properties of porphyrinoids: a voyage from the violet to the infrared regions of the

- electromagnetic spectrum. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, p. 1877-1894, 2008. DOI: 10.1039/b800617b
- <sup>21</sup> BRAIK, M. et al. Investigation of structural, optical and electrical properties of a new cobalt phthalocyanine thin films with potential applications in perchlorate sensor. **Synthetic Metals**, v. 209, p. 135-142, 2015. DOI:10.1016/j.synthmet.2015.07.011
- <sup>22</sup> YUEN, A. P. et al. Photovoltaic properties of M-phthalocyanine/fullerene organic solar cells. **Solar Energy**, v. 86, n. 6, p. 1683-1688, 2012. DOI:10.1016/j.solener.2012.03.019
- <sup>23</sup> BASOVA, T. V. et al. Composites of liquid crystalline nickel phthalocyanine with gold nanoparticles: Liquid crystalline behaviour and optical properties. **Dyes and Pigments**, v. 111, p. 58-63, 2014. DOI:10.1016/j.dyepig.2014.05.033
- <sup>24</sup> BECHTOLD, I. H. et al. New Columnar Zn-Phthalocyanine Designed for Electronic Applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, p. 13554-13560, 2012. DOI:10.1021/jp307825u
- <sup>25</sup> SILVA, S. A. **Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas poliméricas contendo AlOHPc - agente fotossensibilizador para terapia fotodinâmica**. 2014. 48 f. Monografia (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.
- <sup>26</sup> BROWN, S. B.; BROWN, E. A.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The Lancet Oncol**, v. 5, p. 497-508, 2004. DOI:10.1016/S1470-2045(04)01529-3
- <sup>27</sup> ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011>>. Acessado em: 28 mar. 2016.

- <sup>28</sup> RUIZ-MORENO, J.M. et al. Photodynamic therapy for chronic central serous chorioretinopathy. **Acta Ophthalmologica**, v. 88, n. 3, p. 371-376, 2010. DOI:10.1111/j.1755-3768.2008.01408.x
- <sup>29</sup> PERUSSI, J. R. Inativação Fotodinâmica de Microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>>. Acessado em: 28 mar. 2016.
- <sup>30</sup> KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, p. 389-413, 2000. DOI:10.1016/S0190-9622(00)90209-3
- <sup>31</sup> DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998. DOI:10.1093/jnci/90.12.889
- <sup>32</sup> BLISS, J. M. et al. **Susceptibility of Candida Species to photodynamic effects of photofrin**. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 6, p. 2000-2006, 2004. DOI:10.1128/AAC.48.6.2000-2006.2004
- <sup>33</sup> BUGGIANI, G. et al. Photodynamic therapy: off-label and alternative use in dermatological practice. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 5, n. 2, p. 134-138, 2008. DOI:10.1016/j.pdpdt.2008.03.001
- <sup>34</sup> AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic Therapy of Cancer: An Update. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011. DOI:10.3322/caac.20114
- <sup>35</sup> JUZENIENE A.; NIELSEN K. P.; MOAN J. Biophysical aspects of photodynamic therapy. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 25, n. 1-2, p. 7-28, 2006. DOI:10.1615/JEnvironPatholToxicolOncol.v25.i1-2.20
- <sup>36</sup> HENDERSON, B. W. BUSCH, T. M.; SNYDER, J. W. Fluence rate as a Modulator of PDT Mechanisms. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 489-493, 2006. DOI:10.1002/lsm.20327

- <sup>37</sup> VIZENTINI, C. S. **Sistema lipossomal de ftalocianina de cloro-alumínio, contendo ácido fólico, aplicada à Terapia Fotodinâmica.** 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.
- <sup>38</sup> BARBUGLI, P. A. **Estudo dos efeitos da terapia fotodinâmica na progressão tumoral em modelos celulares tridimensionais.** 2010. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.
- <sup>39</sup> PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009. DOI:10.1007/s10103-008-0539-1
- <sup>40</sup> CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two: cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2005. DOI:10.1016/S1572-1000(05)00030-X
- <sup>41</sup> DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, n. 1, p. 351-371, 2002. DOI:10.1016/S0010-8545(02)00034-6
- <sup>42</sup> REDDI, E. Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 37, n. 3, p. 189-195, 1997. DOI:10.1016/S1011-1344(96)07404-0
- <sup>43</sup> HAMBLIN, M. R.; NEWMAN, E. L. New trends in photobiology: On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 23, n. 1, p. 3-8, 1994. DOI:10.1016/S1011-1344(94)80018-9
- <sup>44</sup> BALL, D. J. et al. A comparative study of the cellular uptake and photodynamic efficacy of three novel zinc phthalocyanines of differing charges. **Photochemistry and Photobiology**, v. 69, n. 3, p. 390-396, 1999. DOI:10.1111/j.1751-1097.1999.tb03303.x



- <sup>45</sup> ROKITSKAYA, T. I. et al. Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels. **Biophysical Journal**, v. 78, n. 5, p. 2572-2580, 2000. DOI:10.1016/S0006-3495(00)76801-9
- <sup>46</sup> CALZAVARA-PINTON, P. G.; VENTURINI, M.; SALA, R. Photodynamic therapy: update 2006 Part 1: Photochemistry and Photobiology. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 21, n. 3, p. 293-302, 2007. DOI:10.1111/j.1468-3083.2006.01902.x
- <sup>47</sup> O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053-1074, 2009. DOI:10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x
- <sup>48</sup> HENDERSON, B. W.; DOUGHERTY, T. J. How does photodynamic therapy work? **Photochemistry and Photobiology**; v. 55, n. 1, p. 145-157, 1992. DOI:10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x
- <sup>49</sup> DOUGHERTY, T. J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. **Photochemistry and Photobiology**, v. 46, n. 5, p. 569-573, 1987. DOI:10.1111/j.1751-1097.1987.tb04815.x
- <sup>50</sup> PASZKO, E. et al. Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 8, n. 1, p. 14-29, 2011. DOI:10.1016/j.pdpdt.2010.12.001
- <sup>51</sup> SEKKAT, N. et al. Like a Bolt from the Blue: Phthalocyanines in Biomedical Optics. **Molecules**, v. 17, n. 1, p. 98-144, 2012. DOI:10.3390/molecules17010098
- <sup>52</sup> ZANETTI, F. L. P.; TOMÉ, F. M. Estudo Teórico a eficiência e Vantagens da encapsulação de fármacos em ciclodextrinas. **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica**, 20 – 21 de outubro de 2005, São José dos Campos.

- <sup>53</sup> KANWAR, J. R.; MAHIDHARA, G.; KANWAR, R. K. Antiangiogenic therapy using nanotechnological-based delivery system. **Drug Discovery Today**, v. 16, n. 5-6, p. 188-202, 2011. DOI:10.1016/j.drudis.2011.01.007
- <sup>54</sup> SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000500017>>. Acessado em: 29 mar. 2016.
- <sup>55</sup> BALA, I.; HARIHARAN, S. KUMAR, M. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 21, n. 5, p. 387-422, 2004. DOI:10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v21.i5.20
- <sup>56</sup> RICCI-JÚNIOR, E.; MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 310, n. 1-2, p. 187-195, 2006. DOI:10.1016/j.ijpharm.2005.10.048
- <sup>57</sup> MUTHU, M. S.; FENG, S. Pharmaceutical stability aspects of nanomedicines. **Nanomedicine**, v. 4, n. 8, p.857-860, 2009. DOI:10.2217/nmm.09.75
- <sup>58</sup> NEUBACHER, H.; LOHMANN, W. **Biophysics**. New York: Springer-Verlag, 1982.
- <sup>59</sup> BASSI, A. B. M. S. Conceitos Fundamentais em Espectroscopia. 2001. **Chemkeys – Liberdade para aprender**. Disponível em: <<http://www.gradadm.ifsc.usp.br/dados/20092/FFI0339-1/intro-espectroscopia.pdf>> Acessado em: 25 fev. 2016.
- <sup>60</sup> Manual do espectrofotômetro Hitachi Double Beam U-2900. Disponível online: <[http://www.hitachi-hightech.com/global/product\\_detail/?pn=ana-u2900](http://www.hitachi-hightech.com/global/product_detail/?pn=ana-u2900)> Acessado em: 23 dez. 2015.
- <sup>61</sup> Manual do espectrofotômetro modular Ocean Optics Red Tide USB650. Disponível online: <<http://fisica.ufpr.br/LE/USB650.pdf>> Acessado em: 23 dez. 2015.

- <sup>62</sup> SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª Edição Pioneiro, 2005.
- <sup>63</sup> BERNARDES, C. D. **Determinação Direta de *trans*-Resveratrol em Plasma Humano usando Espectrofluorimetria de Adição-Padrão de Segunda Ordem**. 2009. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Moleculares), Universidade do Estado de Goiás, Anápolis, 2009.
- <sup>64</sup> PASTERNAK, R. F.; COLLINS, P. J. Resonance light-scattering: A new technique for studying chromophore aggregation. **Science**, v. 269, n. 5226, p. 935-939, 1995. DOI:10.1126/science.7638615
- <sup>65</sup> PASTERNAK, R. F. et al. Single-stranded nucleic acids as templates for porphyrin assembly formation. **Inorganica Chimica Acta**, v. 246, n. 1-2, p.7-12, 1996. DOI:10.1016/0020-1693(96)05044-X
- <sup>66</sup> BORISSEVITCH, I. E. et al. Resonance light scattering study of aggregation of two water soluble porphyrins due to their interaction with bovine serum albumin. **Analytica Chimica Acta**, v. 343, n. 3, p. 281-286, 1997. DOI:10.1016/S0003-2670(97)00038-X
- <sup>67</sup> Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/02860?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 28 fev. 2016.
- <sup>68</sup> Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/solvents/dimethyl-sulfoxide-center.html>. Acesso em: 28 fev. 2016.
- <sup>69</sup> SAKAMOTO, K.; OHNO-OKUMURA, E. Syntheses and Functional Properties of Phthalocyanines. **Materials**, v. 2, n. 3, p. 1127-1179, 2009. DOI:10.3390/ma2031127
- <sup>70</sup> ÇAKIR, V. et al. Synthesis and Photophysical Properties of Novel Water Soluble Phthalocyanines. **Dyes and Pigments**, v. 125, p. 414-425, 2016. DOI:10.1016/j.dyepig.2015.10.035

- <sup>71</sup> SILVA, E. R. da.; SANTOS, E. P. dos.; RICCI-JÚNIOR, E. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 90, n. 3, p. 211-217, 2009. Disponível em: <[http://www.rbfarma.org.br/files/pag\\_211a217\\_terapia\\_fotodinamica\\_228.pdf](http://www.rbfarma.org.br/files/pag_211a217_terapia_fotodinamica_228.pdf)> Acesso em: 29 mar. 2016.
- <sup>72</sup> MARTINES, N. S. et al. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 36, n. 1, p. 59-64, 2007. Disponível em: <<http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/473.pdf>> Acesso em: 29 mar. 2016.
- <sup>73</sup> PAULA, C. S. de. et al. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 3, p. 371-381, 2013. DOI:10.1016/j.ejps.2013.03.011
- <sup>74</sup> SCHOLLES, P. D. et al. The preparation of sub-200 nm poly (lactide-co-glycolide) microspheres for site- specific drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 25, n. 1-2, p. 143, 1993. DOI:10.1016/0168-3659(93)90103-C
- <sup>75</sup> TSUBONE, T. M. et al. Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 890-897, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140058>> Acesso em: 29 mar. 2016.
- <sup>76</sup> SHI, W.; BARBER, J.; ZHAO, Y. Role of formation of statistical aggregates in chlorophyll fluorescence concentration quenching. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 117, n. 15, p. 3976-3982, 2013. DOI:10.1021/jp311821t
- <sup>77</sup> JAYME, C. C.; CALORI, I. R., TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, n. 15, p. 178-183, 2016. DOI:10.1016/j.saa.2015.08.027

- <sup>78</sup> DHAMI, S. et al. Phthalocyanine fluorescence at high concentration: dimers or reabsorption effect? **Photochemistry and Photobiology**, v. 61, n. 4, p. 341-346, 1995. DOI:10.1111/j.1751-1097.1995.tb08619.x
- <sup>79</sup> YOON, M.; CHEON, Y.; KIM, D. Absorption and fluorescence spectroscopic studies on dimerization of chloroaluminum (III) phthalocyanine tetrasulfonate in aqueous alcoholic solution. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, n. 1, p. 33-36, 1993. DOI:10.1111/j.1751-1097.1993.tb04899.x
- <sup>80</sup> MIRANDA, E. E. de. **A água no corpo humano**. Água na natureza, na vida e no coração dos homens. Campinas, 2004. Disponível em: <<http://www.meioambientenews.com.br/conteudo.ler.php?q%5B1%7Cconteudo.idcategoria%5D=27&id=215>> Acesso em: 22 fev. 2016.
- <sup>81</sup> KOLHS, M. **Água: fonte de vida**. SB Rural, ed. 54 Disponível em: <[http://www.ceo.udesc.br/arquivos/id\\_submenu/285/caderno\\_udesc\\_054.pdf](http://www.ceo.udesc.br/arquivos/id_submenu/285/caderno_udesc_054.pdf)> Acesso em: 22 fev. 2016.
- <sup>82</sup> PALEWSKA, K. et al. Light-induced effects in sulfonated aluminum phthalocyanines - potential photosensitizers in the photodynamic therapy Spectroscopic and kinetic study. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 197, n. 1, p.1-12, 2008. DOI:10.1016/j.jphotochem.2007.11.025
- <sup>83</sup> APOSTOL, P. et al. High rectification in organic diodes based on liquid crystalline phthalocyanines. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 17, n. 48, p. 32390-32397, 2015. DOI:10.1039/C5CP05582B

## GLOSSÁRIO

***Apoptose / Necrose:*** Apoptose é um tipo de morte celular programada, processo necessário para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, pois está relacionada com a manutenção da homeostase e com a regulação fisiológica do tamanho dos tecidos e também, quando há estímulos patológicos. No entanto, a necrose é a morte da célula ou parte de um tecido que compõe o organismo vivo. É a manifestação final de uma célula que sofreu uma lesão irreversível, em outras palavras é quando param as funções orgânicas e os processos reversíveis do metabolismo.

***Células neoplásicas:*** são aquelas que, por alguns mecanismos, tiveram seu código genético alterado, a ponto de perder a função característica. O termo neoplasia deve ser entendido como a formação de uma quantidade de células agregadas ou não, a um tecido, que perderam suas características fisiológicas normais, quando agregadas a um tecido.

***Espalhamento de Rayleigh:*** É a dispersão da luz ou qualquer outra radiação eletromagnética por partículas muito menores que o comprimento de onda dos fótons dispersados. Quando o tamanho das partículas é maior que o comprimento de onda, a luz não se decompõe em suas componentes cromáticas e todos os comprimentos de onda são igualmente dispersado.

***Janela terapêutica para TFD:*** Significa a área (ou faixa) entre a dose eficaz mínima, e, a dose máxima permitida. Portanto, corresponde a uma faixa aceitável na qual os resultados terapêuticos são positivos.

***Regra de Huckel:*** O físico-químico alemão, Erick Huckel desenvolveu a regra de Huckel, informando que para um composto cíclico e planar seja de fato aromático, é importante ter uma nuvem de elétrons conjugados, isto é,  $4n + 2$  elétrons  $n$ , sendo  $n$  um número inteiro, o elétron  $n$ , pode participar de ligações duplas e triplas, não compartilhados e ainda de cargas negativas.

## APÊNDICE A

## TABELA DE CONCENTRAÇÕES DE ALOHPC

Tabela A. 1 – Valores das concentrações em  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e em  $\text{mg L}^{-1}$  da ALOHPC em solvente etanol e em DMSO

$\mu\text{mol L}^{-1}$	$\text{mg L}^{-1}$
0,04	0,02
0,14	0,08
0,17	0,10
0,36	0,20
0,65	0,36
1,93	1,07
3,15	1,75
6,55	3,65
14,26	7,94
27,97	15,57
72,07	40,12
110,94	61,75
145,45	80,96
242,52	134,93
363,63	202,40

## APÊNDICE B

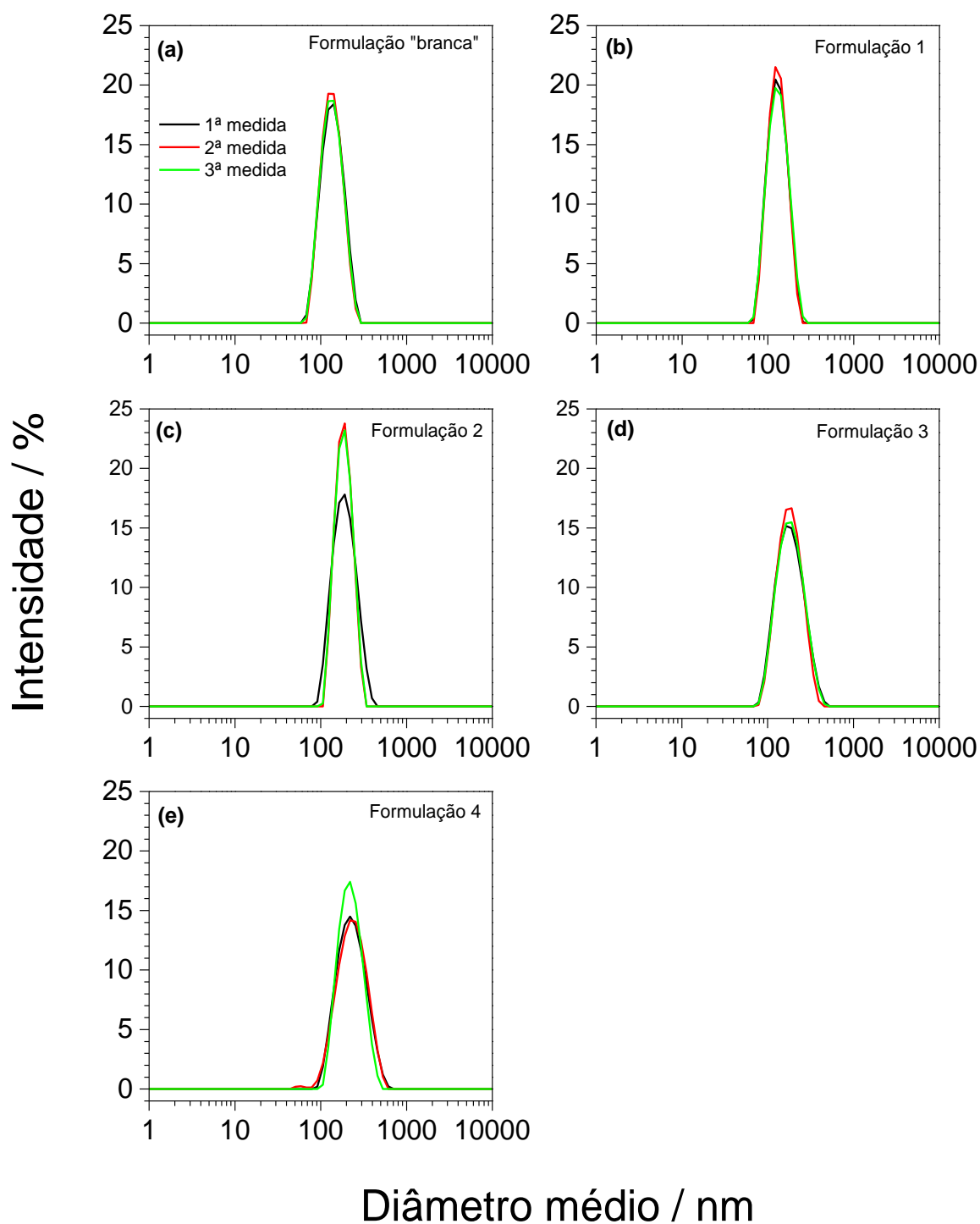
MEDIDAS DA DISTRIBUIÇÃO DE DIÂMETRO MÉDIO DA ALOHPC  
ENCAPSULADA EM NANOESFERAS DE PLA

Figura A. 1 – Distribuição de diâmetro médio da ALOHPC encapsulada em nanoesferas de PLA. (a) Formação “branca”, (b) Formação 1, (c) Formação 2, (d) Formação 3 e (e) Formação 4



## APÊNDICE C

## ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DA AIOHPC OBTIDOS COM DIFERENTES COMPRIMENTOS DE ONDA DE EXCITAÇÃO

Em solvente etanol.

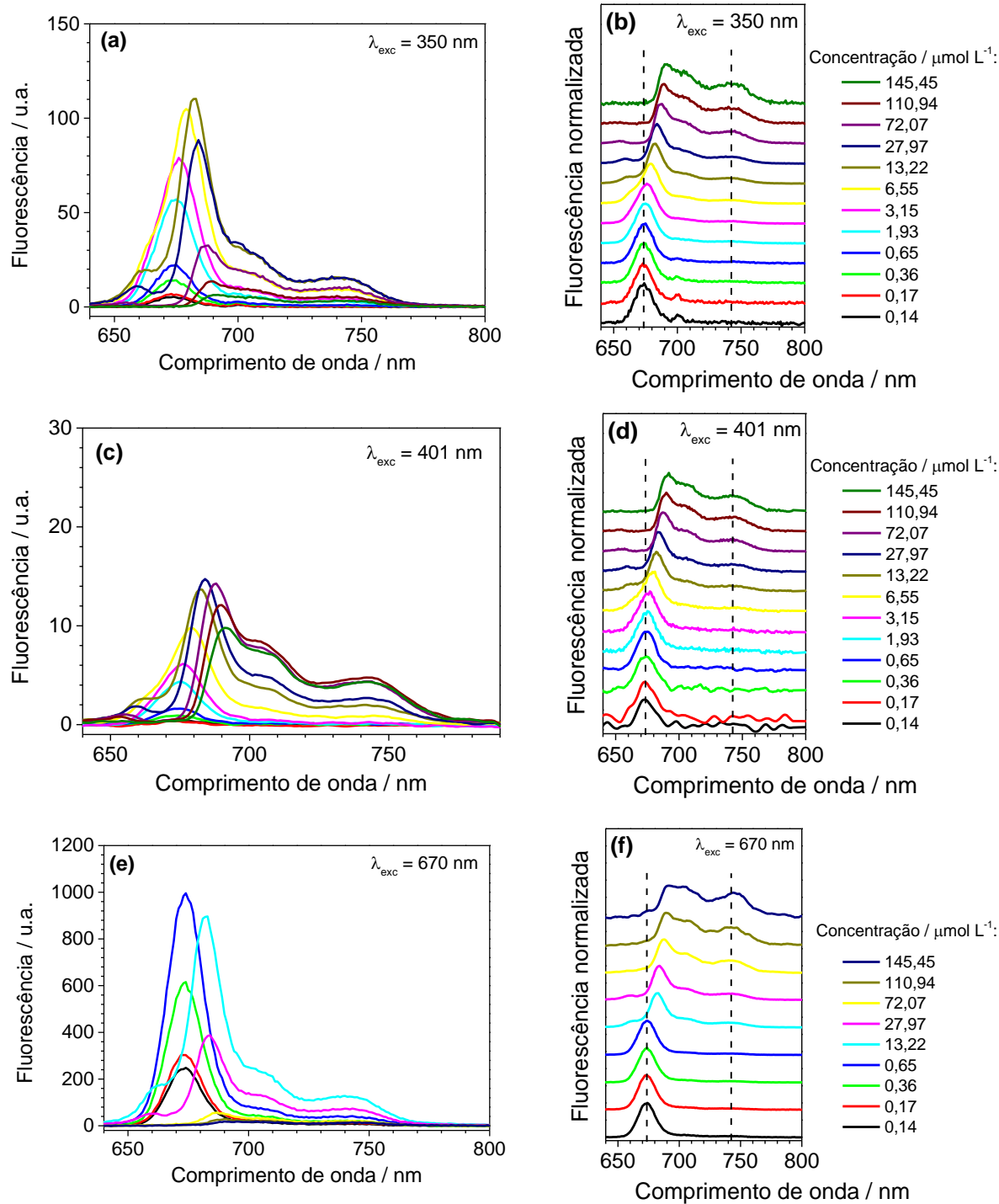


Figura A. 2 – Espectro de fluorescência da AIOHPC em função da concentração no solvente etanol, quando excitada em (a) 350 nm, em (c) 401 nm e em (e) 670 nm. Espectro de fluorescência normalizada da AIOHPC em função da concentração no solvente etanol, quando excitada em (b) 350 nm, em (d) 401 nm e em (f) 670 nm

Em solvente DMSO.

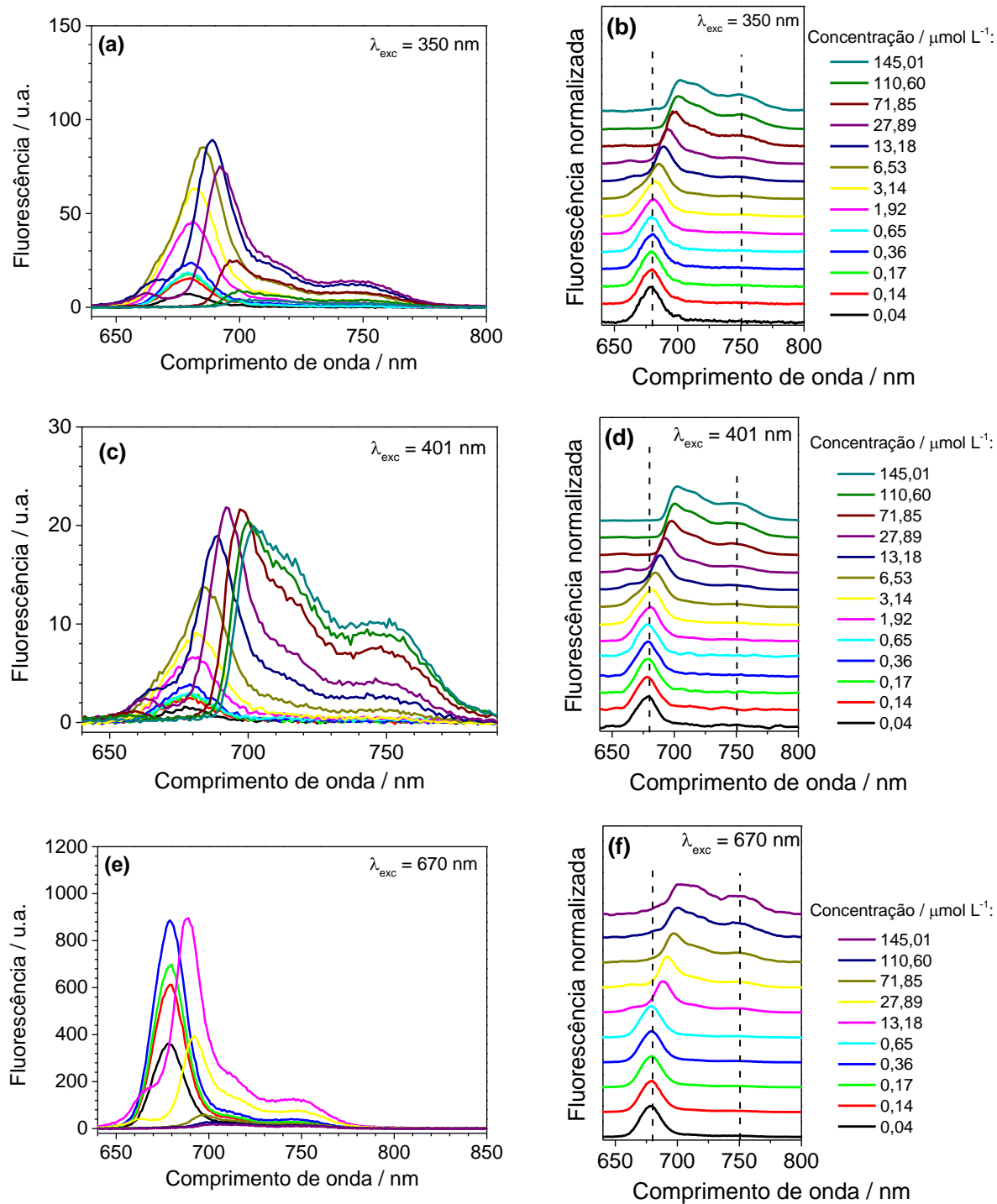


Figura A. 3 – Espectro de fluorescência da AIOHPC em função da concentração no solvente DMSO, quando excitada em (a) 350 nm, em (c) 401 nm e em (e) 670 nm. Espectro de fluorescência normalizada da AIOHPC em função da concentração no solvente DMSO, quando excitada em (b) 350 nm, em (d) 401 nm e em (f) 670 nm

## APÊNDICE D

## EFICIÊNCIA QUÂNTICA DE FLUORESCÊNCIA DA ALOHPC EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

Tabela A. 2 – Eficiência quântica de fluorescência em 401 nm (banda Soret) e em 636 nm e em 670 nm (banda Q) da AIOHPc no solvente etanol e no DMSO

Concentração $\mu\text{mol L}^{-1}$	Em solvente etanol			Em solvente DMSO		
	$\Phi_F$ em 401	$\Phi_F$ em 636	$\Phi_F$ em 670	$\Phi_F$ em 401	$\Phi_F$ em 636	$\Phi_F$ em 670
<b>0,04</b>	---	---	---	0,006	0,232	0,432
<b>0,14</b>	0,013	0,360	0,377	0,028	0,306	0,338
<b>0,17</b>	0,014	0,290	0,377	0,020	0,294	0,328
<b>0,36</b>	0,005	0,268	0,336	0,047	0,347	0,311
<b>0,65</b>	0,004	0,226	0,344	0,107	0,353	0,333
<b>1,93</b>	0,007	0,280	---	0,044	0,298	---
<b>3,15</b>	0,013	0,284	---	0,031	0,274	---
<b>6,55</b>	0,015	0,215	---	0,026	0,223	---
<b>14,26</b>	0,007	0,166	---	0,014	0,155	---
<b>27,97</b>	0,006	0,085	0,007	0,012	0,092	0,009
<b>72,07</b>	0,003	0,027	---	0,006	0,031	---
<b>110,94</b>	0,002	0,013	---	0,003	0,012	---
<b>145,45</b>	0,001	0,007	---	0,003	0,009	---

## APÊNDICE E

## TEMPO DE VIDA DA ALOHPC EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

Tabela A. 3 – Tempo de vida ( $\tau$ ) da ALOHPC no solvente etanol e no DMSO em função da concentração, para a excitação em 401 nm e em 636 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ )

Concentração $\mu\text{mol L}^{-1}$	Em solvente etanol				Em solvente DMSO			
	$\tau_{401}/$ <i>ns</i>	$\chi^2$	$\tau_{636}/$ <i>ns</i>	$\chi^2$	$\tau_{401}/$ <i>ns</i>	$\chi^2$	$\tau_{636}/$ <i>ns</i>	$\chi^2$
0,04	6,13 ± 0,05	1,025	6,07 ± 0,03	0,976	4,80 ± 0,03	1,098	4,75 ± 0,03	1,066
0,14	6,33 ± 0,04	1,012	6,12 ± 0,04	0,978	4,74 ± 0,03	1,048	4,71 ± 0,03	1,035
0,17	6,33 ± 0,04	1,001	6,13 ± 0,04	0,978	4,78 ± 0,03	1,032	4,71 ± 0,03	1,032
0,36	6,46 ± 0,04	1,003	6,31 ± 0,04	0,970	5,18 ± 0,03	1,033	5,24 ± 0,03	1,028
0,65	6,60 ± 0,04	0,998	6,62 ± 0,04	0,993	5,64 ± 0,03	1,003	5,82 ± 0,04	1,002
1,93	6,77 ± 0,04	1,012	6,77 ± 0,04	1,007	5,92 ± 0,04	0,989	5,91 ± 0,04	1,007
3,15	6,92 ± 0,04	1,009	6,91 ± 0,04	0,987	6,18 ± 0,04	0,987	6,16 ± 0,04	1,007
6,55	7,34 ± 0,04	1,007	7,32 ± 0,04	0,997	6,67 ± 0,04	0,996	6,70 ± 0,04	1,004
14,26	7,05 ± 0,04	1,005	7,13 ± 0,04	0,976	7,21 ± 0,04	1,004	7,05 ± 0,04	1,014
27,97	7,58 ± 0,04	1,022	7,68 ± 0,04	0,978	8,01 ± 0,04	1,001	7,84 ± 0,04	1,012
72,07	8,66 ± 0,06	1,190	8,74 ± 0,05	1,010	9,28 ± 0,05	1,015	9,05 ± 0,05	0,991
110,94	9,01 ± 0,07	1,194	9,37 ± 0,05	0,998	9,86 ± 0,05	0,977	9,70 ± 0,05	1,004
145,45	9,26 ± 0,08	1,221	9,82 ± 0,05	0,993	10,21 ± 0,05	1,012	10,17 ± 0,05	1,023
242,52	9,8 ± 0,1	1,312	10,10 ± 0,05	0,993	10,56 ± 0,05	0,998	10,70 ± 0,05	1,015
363,63	10,2 ± 0,1	1,176	10,34 ± 0,06	0,985	10,77 ± 0,06	1,001	11,24 ± 0,06	1,002

## APÊNDICE F

## CURVAS DE DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO DA ALOHPC EM DIFERENTES PROPORÇÕES DE ETANOL/ÁGUA DESTILADA

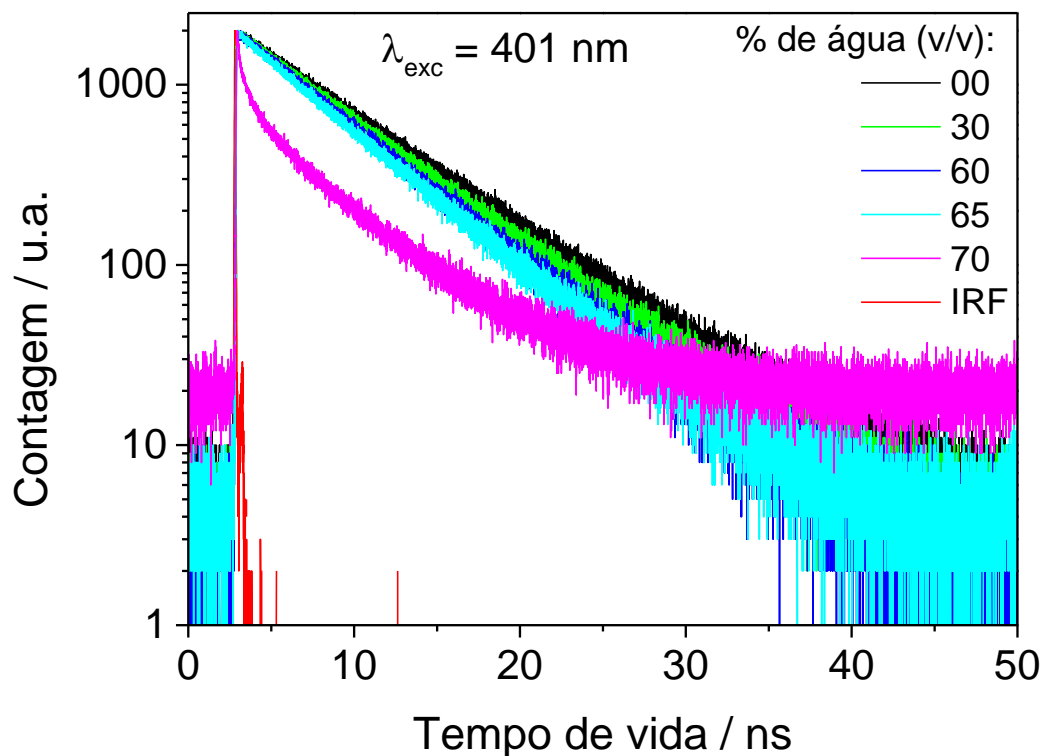


Figura A. 4 – Curvas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo da ALOHPC com concentração de  $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  em diferentes proporções de etanol/água (0%, 30%, 60%, 65 % e 70% de água) e função resposta do laser em vermelho Irradiação em 401 nm

## APÊNDICE G

## TEMPO DE VIDA DA ALOHPC EM MISTURA ETANOL/ÁGUA DESTILADA

Tabela A. 4 – Tempos de vida da ALOHPC e amplitude dos tempos de vida na concentrações de 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em função da % água (v/v), para a excitação em 401 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ )

% de água (v/v)	$\tau_1$ (ns)	% A <sub>1</sub>	$\tau_2$	% A <sub>2</sub>	$\tau_3$	% A <sub>3</sub>	$\chi^2$
0	6,74 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,990
10	6,49 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,982
20	6,35 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,980
30	6,24 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,999
40	6,10 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,958
50	6,01 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,966
55	5,92 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,982
60	5,76 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,999
65	5,67 ± 0,04	88,06%	1,8 ± 1,1	3,59%	0,3 ± 0,2	8,35%	0,973
70	5,49 ± 0,08	25,28%	1,1 ± 0,1	20,49%	0,15 ± 0,02	54,22%	0,984
80	5,4 ± 0,1	12,21%	1,2 ± 0,1	24,8%	0,15 ± 0,03	62,99%	0,994
90	5,7 ± 0,3	15,54%	1,3 ± 0,1	25,35%	0,15 ± 0,04	59,11%	0,987

Tabela A. 5 – Tempos de vida da ALOHPC e amplitude dos tempos de vida na concentrações de 4,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em função da % água (v/v), para a excitação em 401 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ )

% de água (v/v)	$\tau_1$ (ns)	% A <sub>1</sub>	$\tau_2$	% A <sub>2</sub>	$\tau_3$	% A <sub>3</sub>	$\chi^2$
0	7,29 ± 0,05	100,00%	---	---	---	---	0,991
10	6,93 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,982
20	6,73 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,973
30	6,57 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,987
40	6,43 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,996
50	5,97 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,996
60	5,75 ± 0,05	73,17%	1,3 ± 0,5	7,3%	0,2 ± 0,1	19,53%	1,019
70	5,40 ± 0,01	14,74%	1,1 ± 0,1	21,52%	0,13 ± 0,02	63,75%	1,018
80	5,5 ± 0,2	13,34%	1,2 ± 0,1	21,35%	0,16 ± 0,03	65,31%	0,994
90	4,9 ± 0,2	13,54%	1,0 ± 0,5	19,13%	0,12 ± 0,03	67,33%	0,987

Tabela A. 6 – Tempos de vida da AIOHPc e amplitude dos tempos de vida na concentrações de 70,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em função da % água (v/v), para a excitação em 401 nm. Qualidade do ajuste ( $\chi^2$ )

% de água (v/v)	$\tau_1$ (ns)	% A <sub>1</sub>	$\tau_2$	% A <sub>2</sub>	$\tau_3$	% A <sub>3</sub>	$\chi^2$
<b>0</b>	10,68 ± 0,06	100,00%	---	---	---	---	0,989
<b>10</b>	9,47 ± 0,06	100,00%	---	---	---	---	0,998
<b>20</b>	8,41 ± 0,05	100,00%	---	---	---	---	0,996
<b>30</b>	7,35 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,991
<b>40</b>	6,38 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,987
<b>50</b>	6,08 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,986
<b>55</b>	5,87 ± 0,04	100,00%	---	---	---	---	0,983
<b>60</b>	5,79 ± 0,04	79,97%	1,6 ± 1,5	2,42%	0,10 ± 0,07	17,61%	1,002
<b>65</b>	5,64 ± 0,04	67,71%	1,0 ± 0,7	4,35%	0,11 ± 0,04	27,94%	0,990
<b>70</b>	5,54 ± 0,05	47,46%	1,1 ± 0,5	5,03%	0,09 ± 0,02	47,51%	0,973
<b>80</b>	5,2 ± 0,2	17,42%	0,7 ± 0,2	9,48%	0,08 ± 0,02	73,09%	0,987
<b>90</b>	5,2 ± 0,4	10,21%	1,0 ± 0,2	13,56%	0,08 ± 0,02	76,23%	0,938