



Universidade Federal de Goiás
Instituto de Física

Andrew Gabriel Boaventura França

**Estudo das propriedades de estados
excitados de porfirinas: formação de estados
tripletos e oxigênio singleto**

Orientador: Dr. Pablo José Gonçalves

Goiânia 2023



UFG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome completo do autor: ANDREW GABRIEL BOAVENTURA FRANÇA

Título do trabalho: Estudo das propriedades de estados excitados de porfirinas: formação de estados tripletos e oxigênio singlete

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [X] SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Pablo José Gonçalves, Professor do Magistério Superior**, em 28/08/2023, às 21:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13](#)

[de novembro de 2020.](#)



Documento assinado eletronicamente por **Andrew Gabriel Boaventura França, Discente**, em 29/08/2023, às 13:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4000387** e o código CRC **8955AB2B**.

Referência: Processo nº 23070.029983/2023-32

SEI nº 4000387

Andrew Gabriel Boaventura França

**Estudo das propriedades de estados
excitados de porfirinas: formação de estados
tripletos e oxigênio singlete**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à banca examinadora do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Física.

Orientador: Dr. Pablo José Gonçalves.

Goiânia 2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Boaventura França, Andrew Gabriel
Estudo das propriedades de estados excitados de porfirinas: formação de estados tripletos e oxigênio singleto [manuscrito] / Andrew Gabriel Boaventura França. - 2023.
XXXVIII, 38 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Física, Goiânia, 2023.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras.

1. Terapia fotodinâmica. 2. Porfirina. 3. Estados excitados. 4. Oxigênio singleto. 5. Estado tripleto. I. Gonçalves, Pablo José, orient. II. Título.

CDU 577.3

Andrew Gabriel Boaventura França

**Estudo das propriedades de estados
excitados de porfirinas: formação de estados
tripletos e oxigênio singlete**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Física do Instituto de Física da
Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para
obtenção do título de Bacharel em Física. Banca
Examinadora constituída pelos professores:

Prof. Dr. Pablo José Gonçalves

Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás
Presidente da Banca

Prof. Dr. Márcio Adriano Rodrigues Souza

Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás

Prof. Dra. Cássia Alessandra Marquezin

Instituto de Física – Universidade Federal de Goiás



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos 22 dias do mês de agosto de 2023, a partir das 14h00min, realizou-se a sessão pública de Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso do estudante do curso de Física, Bacharelado, ANDREW GABRIEL BOAVENTURA FRANÇA, matrícula 23070.029983/2023-32, para apresentar sua monografia intitulada: "Estudo das propriedades de estados excitados de porfirinas: formação de estados tripletos e oxigênio singlete". A banca examinadora foi composta pelos professores Dra. Cássia Alessandra Marquezin (IF/UFG), Dr. Marcio Adriano Rodrigues de Souza (IF/UFG) e Dr. Pablo José Gonçalves (IF/UFG). A sessão pública de Defesa de TCC foi aberta pelo Presidente da Banca Examinadora, Professor Pablo José Gonçalves (Orientador), que na sequência passou a palavra para o estudante apresentar sua monografia. Após a exposição, a Banca Examinadora realizou a arguição do estudante. Ao finalizar a arguição, a Banca reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da monografia. A Banca atribuiu ao estudante a nota 9,3, este foi APROVADO na disciplina de TCC. Proclamados os resultados pelo Professor Pablo José Gonçalves (Presidente), foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Cássia Alessandra Marquezin, Professora do Magistério Superior**, em 22/08/2023, às 16:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Adriano Rodrigues Souza, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2023, às 16:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Pablo José Gonçalves, Professor do Magistério Superior**, em 22/08/2023, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3960672 e o código CRC 9BBC4D56.

Agradecimentos

Inicialmente gostaria de agradecer á minha família que me proporcionou todo apoio e incentivo necessário para concluir essa etapa importante da minha vida. Tal como todos os docentes do Instituto de Física que ajudaram na minha formação, tanto pessoal como profissional.

Agradeço também a todos os meus bons amigos que fiz nesta jornada árdua, aqueles que estão comigo desde o início e aqueles que fomos nos conhecendo durante a caminhada, agradeço a todos os participantes do Diretório Acadêmico por toda ajuda e auxílio acadêmico e, também, pelas tardes descontraídas pós refeição no restaurante universitário, e claro, agradeço a todos membros que compõem o grupo de Biofotônica do Instituto de Física.

Um agradecimento especial aqueles que sempre estiveram comigo para dividir as vitórias e também derrotas, Arielli Peres Pinheiro, João Victor Batista da Silva, Matheus Rodrigues Soares Vaz, Mauro Oliveira de Castro, Samanta Aparecida Portes, Thayna Alves Moraes, Thallys Philipe Silva Fonseca e finalmente minha namorada, Gabriela Guimarães Souza.

Por último e não menos importante, agradeço meu orientador Dr. Pablo José Gonçalves por me aceitar como seu aluno e me preparar na conclusão desta etapa, e também, agradeço a técnica de laboratório Jaqueline Cristine Desordi por me instruir na área experimental.

Resumo

A Fotofísica vem ganhando cada vez mais importância, tanto na área acadêmica, quanto na área tecnológica. Em especial, destacamos sua importância na Fotomedicina, onde os mecanismos fotofísicos são fundamentais para explicar a Terapia Fotodinâmica, uma nova modalidade terapêutica empregada para o tratamento de microrganismos e até de tumores. Esta terapia emprega o uso de um composto fotossensibilizador, que em seu estado excitado após a absorção de luz visível, produz espécies reativas de oxigênio que podem levar à morte celular de alvos específicos. Neste trabalho de conclusão de curso foi realizado um estudo da dinâmica de estados excitados de moléculas orgânicas, das principais características de estados excitados de porfirinas e uma breve revisão das técnicas experimentais envolvidas para a devida caracterização de um composto fotossensibilizador. Experimentalmente, foi obtido o rendimento de formação do estado de tripleto, analisamos os efeitos da concentração de moléculas fotossensibilizadoras e a concentração de oxigênio sobre a emissão de fosforescência do oxigênio singlete, uma das principais espécies reativas de oxigênio envolvido na ação fotodinâmica. Foi verificado também, a importância de ajustar a absorção da amostra em estudo para 0,2 e um tempo de 20 a 30 minutos de borbulhamento de oxigênio para saturação da solução.

Palavras chave: Terapia fotodinâmica, Porfirina, Estados excitados, Oxigênio singlete, Estado tripleto.

Abstract

Photophysics has been gaining more and more importance, both in the academic area and in the technological area. In particular, we highlight its importance in Photomedicine, where photophysical controls are fundamental to explain Photodynamic Therapy, a new therapeutic modality used for the treatment of microorganisms and even tumors. This therapy employs the use of a photosensitizing compound, which in its excited state after absorption of visible light, produces reactive oxygen species that can lead to cell death of specific targets. In this course conclusion work, a study of the dynamics of excited states of organic signals, the main characteristics of excited states of porphyrins and a brief review of the experimental techniques involved for the proper characterization of a photosensitizer compound were carried out. Experimentally, the efficiency of triplet state formation was obtained, analyzing the effects of the concentration of photosensitizers and the concentration of oxygens on the phosphorescence emission of singlet oxygen, one of the main reactive oxygen species involved in the photodynamic action. It was also verified the importance of adjusting the absorption of the sample under study to 0.2 and a time of 20 to 30 minutes of bubbling oxygen for saturation of the solution.

Keywords: Photodynamic therapy, Porphyrin, Excited states, Singlet oxygen, Triplet state.

Lista de Figuras

Figura 1 - Macrociclo tetrapirrólico comum das porfirinas.....	15
Figura 2 - Diagrama de níveis de energia.	18
Figura 3 - Diagrama de energias dos estados singlete e tripleto.	21
Figura 4 - Diagrama de energia típico de um composto FS, seus estados eletrônicos singletos (Si) e tripletos (Tj), os processos fotofísicos de absorção da luz e relaxação, produção de espécies reativas que levarão ao estresse oxidativo e morte celular.....	22
Figura 5 - Arranjo experimental utilizado na técnica de Flash-fotólise.	23
Figura 6 - Arranjo experimental para detecção de oxigênio singlete.....	25
Figura 7 - (a) Espectro de absorção de um típico FS (porfirina) na região de 450 a 750 nm em diferentes concentrações e (b) valores de absorbância monitoradas em 516 nm em função da concentração do FS que irão permitir obter o valor de $\epsilon(\lambda)$	26
Figura 8 - Esquemática do monocromador.	28
Figura 9 - Processo de medição de fosforescência do oxigênio singlete.	29
Figura 10 - (a) A esquerda, espectros de absorção das porfirinas TMPyP e TPPS ₄ . Detalhe para o comprimento de excitação laser em 532 nm. (b) A direita, curva típica de decaimento ΔA de onde pode se obter o tempo de vida do estado tripleto.	31
Figura 11 - a) Curvas de tempo de vida dos estados tripleto da TPPS ₄ em diferentes energias do feixe de bombeio, obtidas pela técnica flash-fotólise; b) Dependência da absorção transiente (ΔA) em função da energia do feixe de bombeio, em milejoules, para TPPS ₄ e TMPyP.	32
Figura 12 -a) O gráfico a esquerda representa o espectro de emissão de fosforescência, com valores de absorbância distintos. b) Gráfico a direita representa as diferentes áreas sobre as curvas do espectro de emissão de fosforescência por absorbância.	33
Figura 13 - Transmitância de uma amostra em função do valor da absorção ao longo do caminho ótico de uma cubeta de comprimento de 1 cm em função da absorbância. Os valores das absorbâncias foram variadas de 0 a 2.0.	34
Figura 14 -a) O Gráfico a esquerda representa a simulação do produto da transmitância com a absorbância em valores distintos de absorbância. b) Gráfico a direita representa uma extrapolação para maiores valores de absorbância.	35
Figura 15 – Gráfico que representa a o produto da transmitância do feixe com a absorbância.	36

Figura 16 - a) O gráfico a esquerda representa o espectro de emissão de fosforescência da porfirina TPPS₄ com absorvância de 0,2 após o adicionar oxigênio durante tempos distintos. b) Gráfico a direita representa as diferentes áreas sobre a curva de espectro de emissão de fosforescência da porfirina TPPS₄ com absorvância de 0,2.....37

Figura 17 - a) O gráfico a esquerda representa o espectro de emissão de fosforescência porfirina TPPS₄ com absorvância de 0,4 após o adicionar oxigênio durante tempos distintos. b) Gráfico a direita representa as diferentes áreas sobre o espectro de emissão de fosforescência da porfirina TPPS₄ com absorvância de 0,4.38

Sumário

Capítulo 1: Introdução	9
Capítulo 2: Objetivos	12
Capítulo 3: Base científica e fundamentação teórica	13
3.1 Dinâmica de estados excitados e processos fotofísicos	13
3.2 A técnica da Flash-fotólise.....	17
3.3 Detecção de oxigênio singlete	20
Capítulo 4: Metodologia	21
4.1 Caracterização das propriedades físicas de uma amostra	21
4.2 Quantização de estado tripleto por meio da técnica da Flash-Fotólise	22
4.3 Obtenção de fosforescência de oxigênio singlete	25
Capítulo 5: Resultado e discussões	26
Capítulo 6: Conclusões	34

INTRODUÇÃO

O estudo da dinâmica de estados excitados consiste em avaliar o processo de absorção da luz por um composto, a formação de seus estados excitados e os processos de relação subsequentes. Tal estudo fornece valiosas informações para diversas aplicações tecnológicas como o desenvolvimento de células solares e na fotomedicina com o desenvolvimento de fototerapias e diagnóstico fluorescente. A ênfase deste trabalho de conclusão de curso será nas aplicações em fotomedicina, um dos principais objetos de estudo do nosso grupo, o Grupo de Biofotônica da UFG.

Atualmente, a terapia fotodinâmica (PDT) tem se mostrado uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de tumores e doenças infecciosas. A ação da PDT é uma abordagem que utiliza uma combinação de luz, um agente fotossensibilizador (FS) e oxigênio. Neste caso, alvejamos o fotossensibilizador com alguma fonte de luz para excita-lo, então o mesmo absorve a luz e irá reagir com o meio formando espécies reativas de oxigênio, uma destas espécies é o oxigênio singlete que é capaz de danificar o sistema biológico acarretando na morte celular (ALLISON, Ron R, 2013).

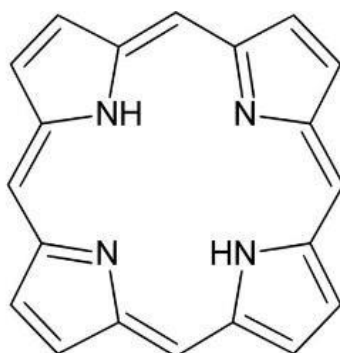
A PDT tem se destacado bastante na área de tratamentos de câncer, tais como câncer de pele (WANG et al., 2008), esôfago, pulmão, bexiga, entre outros (YANO; WANG, 2020). Primeiramente o agente fotossensibilizador é administrado ao paciente, e após um período onde ocorrerá o acúmulo do agente no ponto alvo (células cancerígenas), a região é exposta a luz, luz esta que possui o comprimento de onda específico para sua ativação, o fotossensibilizador irá gerar espécies reativas que causarão uma morte seletiva das células alvo, assim poupando o máximo de células saudáveis possível. A PDT também se destaca em tratamentos dermatológicos, amplamente aplicada no tratamento de acne, ceratose actínica (lesões pré-cancerosas na pele) e alguns tipos de tumores benignos. Neste cenário a PDT age com eficácia para eliminar as células anormais e reduzir inflamações, recuperando o seu aspecto mais saudável.

É fácil de se imaginar os motivos da PDT ser foco de diversos estudos demonstrando sua eficácia, aplicabilidade e possíveis descobertas futuras na área que tange a Biofotônica. O destaque da PDT se deve ao seu procedimento ser relativamente simples e pouco invasivo, podendo ser realizado em ambulatório e consultório médico, evitando as mesas de cirurgia mais agressivas, também a sua baixa toxicidade na ausência da luz, alta precisão e seletividade para o alvo a ser tratado, aumentando a expectativa de vida de pacientes que não suportem uma operação (ABRAHAMSE; TYNGA, 2018) e vetando algum mecanismo de defesa ou resistência natural do alvo biológico (AGOSTINIS et al., 2011).

Logo, se faz de extremo interesse a busca por agentes fotossensibilizadores que, cada vez mais, ressaltem melhor as características citadas anteriormente, esta busca movimenta e reúne diversas áreas de interesse, tais como Química, Física, Biologia e Ciências da saúde. Para o melhor funcionamento da PDT, o fotossensibilizador deve apresentar uma boa absorção na janela entre 600 e 800 nm, já que nosso tecido biológico tem uma certa afinidade para este comprimento de onda, o vermelho e o infravermelho tendem a penetrar mais nosso tecido, facilitando o encontro do fotossensibilizador com a luz. Obviamente, ele deve ser capaz de gerar oxigênio singlete (1O_2) e produzir espécies reativas de oxigênio (EROs), deve também, apresentar uma farmacocinética favorável, sendo de fácil absorção e fácil manipulação, podendo melhor direcionar os agentes fotossensibilizadores para o ponto alvo da ação (CALORI; TEDESCO, 2016).

Uma das principais classes de moléculas que satisfazem esses requisitos são as porfirinas, no geral, elas possuem uma estrutura de macrociclo tetrapirrólico, demonstrada na figura 1. Elas são biocompatíveis (substâncias que simulam uma estrutura natural para o corpo humano), possuem absorção na região visível do espectro eletromagnético e alta formação de estados tripletos e oxigênio singlete.

Figura 1 - Macrociclo tetrapirrólico comum das porfirinas



Fonte: DEPOSITPHOTOS (2015, p.2)

Para desenvolver novas abordagens terapêuticas baseadas em PDT é essencial entender a natureza da interação dos fotossensibilizadores com as estruturas biológicas, tais como proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. As interações modificam as propriedades fotofísicas e, portanto, sua formação de espécies reativas (moléculas instáveis) que causarão a morte celular ou inativação do microrganismo. Dentre as características fotofísicas, a formação de estados excitados tripletos se faz fundamental para a produção de oxigênio singleto, o principal agente para morte celular numa aplicação fotodinâmica (ALLISON, Ron R, 2013).

Assim, a avaliação da eficiência de formação dos estados tripletos é crucial para o desenvolvimento de novos compostos e novos mecanismos de ação terapêutica. Uma das formas de avaliar a produção de estados tripletos é a utilização da flash-fotólise ou Espectroscopia de Absorção Transiente. Essa técnica foi recentemente implantada em nosso grupo de pesquisa e no momento está sendo desenvolvido um modelo para quantificar a produção de estados tripletos.

Além disso, o estudo da capacidade de formação de oxigênio singleto das moléculas com potencial para uso como agentes fotossensibilizadores, faz-se necessário para avaliar suas potencialidades, melhorar sua eficiência, trazendo ganhos significativos em diversas áreas, tais como Física, Química, Biologia, Ciência da saúde.

OBJETIVOS

O presente trabalho de conclusão de curso tem como objetivo o estudo da fotofísica de moléculas orgânicas, a formação de estados tripletos e de oxigênio singleto. Para isso, uma revisão das propriedades fotofísicas foi realizada bem como o estudo das principais técnicas espectroscópicas envolvidas nesta área. Por fim, medidas experimentais serão apresentadas, as quais levam a obtenção dos valores dos rendimentos quânticos de formação de estados tripletos e oxigênio de moléculas típicas de porfirinas.

Podemos destacar os objetivos específicos:

- i. Estudo da dinâmica de estados excitados;
- ii. Estudo do funcionamento da técnica de Laser Flash-Fotólise;
- iii. Obtenção do tempo de vida de estados tripletos;
- iv. Obtenção do rendimento quântico de formação de estados tripletos;
- v. Estudo da técnica espectroscópica de emissão fosforescente;
- vi. Estudo do sinal da emissão de fosforescência de oxigênio singleto em função da concentração das porfirinas;
- vii. Estudo do efeito da adição de oxigênio na solução aquosa de porfirinas.

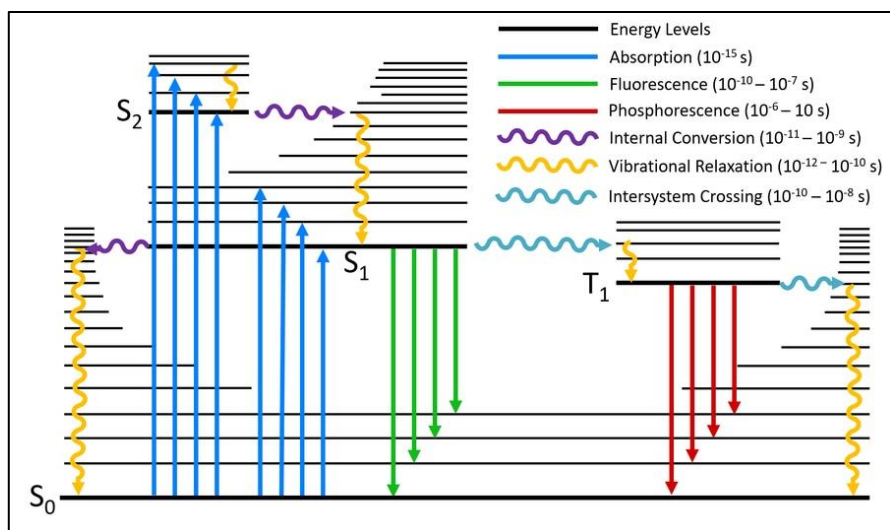
BASE CIENTÍFICA E FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Dinâmica de estados excitados e processos fotofísicos

Para compreendermos bem a interação das moléculas com a luz, faz-se muito importante, estudarmos os conceitos estabelecidos por Aleksander Jabłoński, considerado pai da espectroscopia de fluorescência, devido a suas importantíssimas contribuições no estudo de estados excitados.

As moléculas com potencial uso como agente fotossensibilizador podem ser descritas com base no famoso diagrama de níveis de energia proposto por JABLONSKI (1933), este diagrama carrega importantes informações, como fluorescência, fluorescência retardada e fosforescência, como ilustrado na figura 2.

Figura 2 - Diagrama de níveis de energia.



Fonte: ENDINGBURGH INSTRUMENTS (2013, p.5).

Os níveis de energia de uma molécula são mostrados pelas linhas pretas horizontais; com a energia aumentando ao longo do eixo vertical do diagrama. As linhas em negrito representam o nível vibracional mais baixo de cada estado eletrônico, com os níveis vibracionais mais altos representados por linhas mais finas. Os níveis vibracionais tornam-se menos espaçados à medida que a energia aumenta e eventualmente formam um contínuo. Para maior clareza, apenas um subconjunto desses níveis vibracionais é representado no diagrama.

A nomenclatura dos estados eletrônicos é baseada na configuração do momento angular de spin de cada estado. Os estados singleto (momento angular total de zero) são denotados por um **S** e os estados tripleto (momento angular total de um) por **T**.

S_0 refere-se ao primeiro estado de energia, o estado fundamental do singleto; S_1 refere-se ao primeiro estado excitado de energia e S_n se refere ao enésimo estado excitado do singleto. T_1 refere-se ao primeiro estado excitado do tripleto e T_n refere-se ao enésimo estado excitado de tripleto.

As setas coloridas representam as várias transições que podem transferir energia entre os estados moleculares e são divididas em transições radiativas e não radiativas. Transições radiativas: são transições entre dois estados moleculares onde a diferença de energia é compensada pela emissão ou por absorção de fótons, são representadas no diagrama de Jablonski por setas verticais retilíneas. Transições não radiativas: são transições entre dois estados moleculares sem absorção ou emissão de fótons e são representadas em um diagrama de Jablonski por setas onduladas verticais ou horizontais.

O processo de absorção efetua-se quando uma transição radiativa ocorre, a energia de um fóton é absorvida e convertida em energia interna da molécula promovendo-a de um menor estado de energia a um estado superior de maior energia ($S_0 \rightarrow S_n$). Como demonstrado no diagrama de Jablonski, o processo de absorção é o mais rápido dentre eles, ocorrendo numa escala da ordem de 10^{-15} segundos. Podemos perceber também, que a absorção de um fóton não acarretará em uma promoção direta para o estado de tripleto, pois não é possível pela conservação de momento angular (ATVARS, 2002).

O processo de relaxação vibracional é uma transição não radiativa em que a molécula é rebaixada para um nível vibracional inferior dentro do mesmo estado eletrônico. Uma vez que a molécula é excitada, ela se encontra em um estado de não equilíbrio e rapidamente dissipará esta energia para retornar ao seu estado fundamental, a primeira maneira de perda de energia é através da relaxação vibracional (setas onduladas verticais amarelas), este processo ocorre de maneira rápida numa escala da ordem de 10^{-12} a 10^{-10} segundos.

O processo de conversão interna é uma transição não radiativa que ocorre dentre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Como demonstrado no diagrama a molécula em um estado eletrônico superior irá transitar para um estado inferior que rapidamente sofre relaxação retornando ao seu estado fundamental, demonstrado pelas setas horizontais roxas.

O processo de fotoluminescência é uma transição radiativa que ocorre dentre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. Este processo ocorre em uma escala da ordem de 10^{-10} a 10^{-7} segundos, esta emissão de fótons também é conhecida como fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$) (LAKOWICZ, 2006).

O processo de cruzamento intersistemas é uma transição não radiativa entre dois níveis vibracionais isoenergéticos que possuam multiplicidade de spins diferentes, como exemplificado no diagrama, uma transição do estado de singleto (S_1) para o estado de tripleto (T_1) demonstrado pelas setas azul claro. Essa transição é, em princípio, proibida devido à conservação do momento angular do spin; no entanto, o acoplamento spin-órbita entre o momento angular de spin e o momento angular orbital o torna fracamente permitido.

O processo de fosforescência é uma transição radiativa entre dois estados eletrônicos de diferentes multiplicidades de spin. A emissão de fótons da transição $T_1 \rightarrow S_0$ é conhecida como fosforescência. Da mesma forma que o cruzamento intersistemas a fosforescência é, em princípio, uma transição proibida, mas é fracamente permitida por meio do acoplamento spin-órbita. Uma consequência de ser uma transição proibida é que a constante de taxa de fosforescência é muito baixa e, portanto, a fosforescência ocorre em uma escala de tempo muito maior do que a fluorescência, com tempos de vida típicos de fosforescência na faixa de 10^{-6} a 10 segundos.

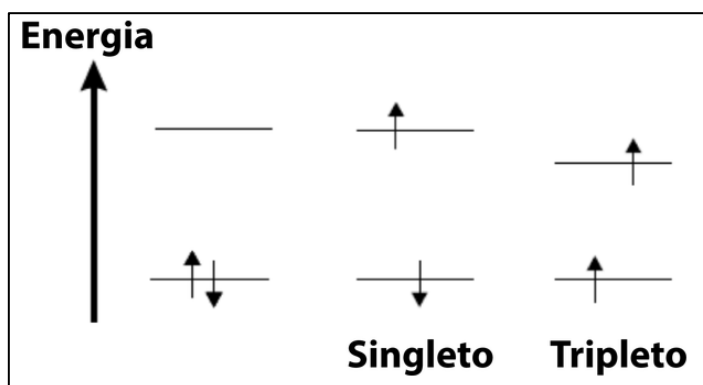
Sabemos que uma das diferenciações entre o estado de singleto e estado de tripleto são as multiplicidades de spins M , onde a multiplicidade é dada pela relação entre os momentos angulares totais de spin dos elétrons S :

$$M = 2S + 1 \text{ (Eq. 1)}$$

No mesmo nível de energia os elétrons podem apresentar tanto orientação paralela quanto orientação antiparalela. O estado de singleto é descrito por uma configuração eletrônica com a orientação dos spins antiparalela, e de acordo com a (Eq.1). Já o estado de tripleto, como

dito anteriormente, por ser uma transição “proibida” e só ocorrer graças ao acoplamento spin-órbita, demonstra uma configuração de spins paralela, fazendo com que a multiplicidade total do estado eletrônico resulte em 3 (ATKINS; PAULA, 2008).

Figura 3 - Diagrama de energias dos estados singlete e tripleto.

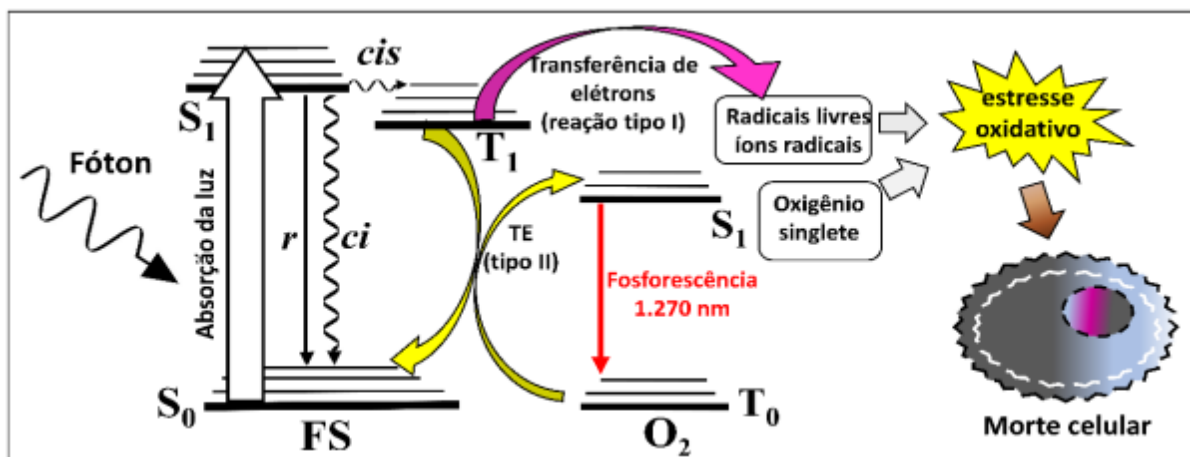


Fonte: QUORA (2018, p.3)

Do ponto de vista energético, o estado tripleto possui uma energia levemente inferior ao estado singlete, esse fenômeno é previsto pela lei de Hund e está relacionado aos efeitos de correlação de spins. Enquanto os elétrons do estado T_1 possuem spins paralelos, eles possuem uma tendência de se manterem afastados, diminuindo a repulsão eletrostática resultando numa contração da nuvem eletrônica devido ao aumento da atração entre elétron com o núcleo, o que, por sua vez, diminui a energia do estado. (ATKINS; PAULA, 2008).

Uma vez que alcançamos o estado de tripleto, o fotossensibilizador tem energia suficiente para interagir com outras moléculas, por meio de foto-oxidação, onde esta interação pode resultar em uma morte celular, como podemos ver na figura 4. Essas reações podem ocorrer através de foto oxidação, na qual este produto resulta na morte celular, onde se tem diversas aplicações na PDT.

Figura 4 - Diagrama de energia típico de um composto FS, seus estados eletrônicos singletos (S_1) e tripletos (T_1), os processos fotofísicos de absorção da luz e relaxação, produção de espécies reativas que levarão ao estresse oxidativo e morte celular.



Fonte: GONCALVES, P. J, et al. (2021, cap.1 p.17)

Antes de ocorrer a foto-oxidação há uma disputa entre dois mecanismos, sendo eles, a transferência de elétrons (reação tipo I) e um processo de transferência de energia para o oxigênio que já está no estado excitado tripleto (reação tipo II).

O mecanismo I gera uma espécie reativa do oxigênio (EROs) e tende a acontecer em um meio com menor índice de concentração de oxigênio molecular, causando uma morte celular programada (apoptose), consequência do stress causado geralmente no retículo endoplasmático.

Já o mecanismo II acaba resultando na formação de oxigênio singleto (1O_2), que é uma substância muito interessante pelo seu pequeno tamanho permitindo que ele se difunda facilmente em sistemas “congestionados”, como polímeros e estruturas celulares. Mas a característica que mais importa para a PDT é a sua estrutura eletrônica que o torna extremamente reativo e ter uma vida útil relativamente longa, de segundos em sua fase gasosa e de microssegundos na água, oferecendo tempo suficiente para reagir aos alvos remotos (NONELL; FLORS, 2016).

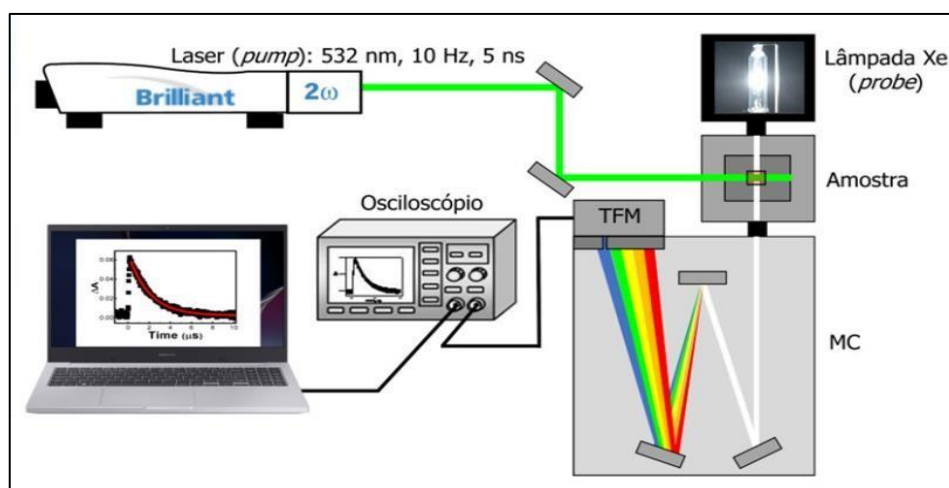
3.2. A técnica de Flash-fotólise

Esta é uma poderosa técnica espectroscópica que permite estudo de espécies transientes. Especificamente, permite monitorar e avaliar a formação de estados tripleto e seu tempo de vida assim como a taxa de supressão do oxigênio e espectro transiente do estado tripleto. Portanto, é de fundamental importância para o estudo de sistemas que visem a ação fotodinâmica.

O sistema flash-fotólise consiste de um sistema de bombeio e prova (*pump-probe*) e é basicamente constituído por:

- i. Sistema de excitação: um laser de Nd:YAG da ordem de nanossegundos, que será o bombeio do sistema (*pump*), que levará as moléculas do estado fundamental para seu estado excitado e que relaxarão para o estado tripleto;
- ii. Sistema de análise: uma lâmpada contínua de xenônio em uma *housing* (invólucro), alimentada por uma fonte de tensão, gera a luz de análise (*probe*) que por sua vez irá monitorar a absorção transiente do estado tripleto;
- iii. Sistema de detecção: um monocromador (MC) seleciona o comprimento de onda da luz de análise, o qual é amplificado por uma fotomultiplicadora (FM).
- iv. Sistema de digitalização: um osciloscópio de 500 MHz que digitalizará o sinal detectado e envia ao computador para análise.

Figura 5 - Arranjo experimental utilizado na técnica de Flash-fotólise.



Fonte: autoria própria.

O sistema é disposto de forma que o feixe laser de bombeio se superponha ortogonalmente ao feixe de prova exatamente sobre a amostra, contida em um invólucro, na forma de uma excitação transversa.

Após a excitação do feixe laser, a população eletrônica que inicialmente se encontra no estado singleto fundamental S_0 será promovida para o estado excitado S_1 , por uma transição $S_0 \rightarrow S_1$. Esse processo é descrito pelo coeficiente de absorção molar ϵ_S . Após um breve intervalo de tempo, parte da população excitada retorna ao estado fundamental S_0 por meio dos processos radiativos de fluorescência e não radiativo de conversão interna. Outra parte sofre um processo de cruzamento intersistemas indo para o estado tripleto T_1 .

A luz de análise encontra a distribuição de população entre os estados S_0 e T_1 , e agora podem haver as transições $S_0 \rightarrow S_1$ e $T_1 \rightarrow T_n$. A Flash fotólise mede o decaimento populacional do T_1 analisando o decaimento de absorção transiente $\Delta A(\lambda, t)$ (BORISSEVITCH; GONÇALVES; SCHABERLE, 2015) pela relação:

$$\Delta A(\lambda, t) = [\epsilon_T(\lambda) - \epsilon_S(\lambda)]C_T(t)\ell \quad (Eq. 2)$$

Onde C_T é concentração molar no estado T_1 , ℓ o caminho óptico da cubeta em que a amostra é acondicionada, ϵ_T e ϵ_S os coeficientes de absorção molar das transições $T_1 \rightarrow T_n$ e $S_0 \rightarrow S_1$, respectivamente. Uma vez que os coeficientes de absorção para um dado λ e o caminho óptico ℓ são constantes, o decaimento temporal observado no sinal $\Delta A(\lambda, t)$ representa a redução da população de T_1 ($C_T(t)$), ou seja, o tempo de vida de T_1 . Como mencionado previamente, o T_1 é ponto chave na ação fotodinâmica devido ser o ponto inicial para produção de EROs para ambos os mecanismos fotodinâmicos que levarão à morte celular do alvo biológico.

A medida em que a energia do feixe laser é aumentada, uma maior fração da população do estado S_0 é promovida ao estado S_1 e irá se acumular no estado T_1 . No caso limite, toda a população estará no estado T_1 . Nesse sentido, nosso grupo desenvolveu um modelo que permite obter o rendimento quântico de formação de estados tripletos (ϕ_T) (BORISSEVITCH *et al.*, 2021).

3.3. Detecção do oxigênio singlete

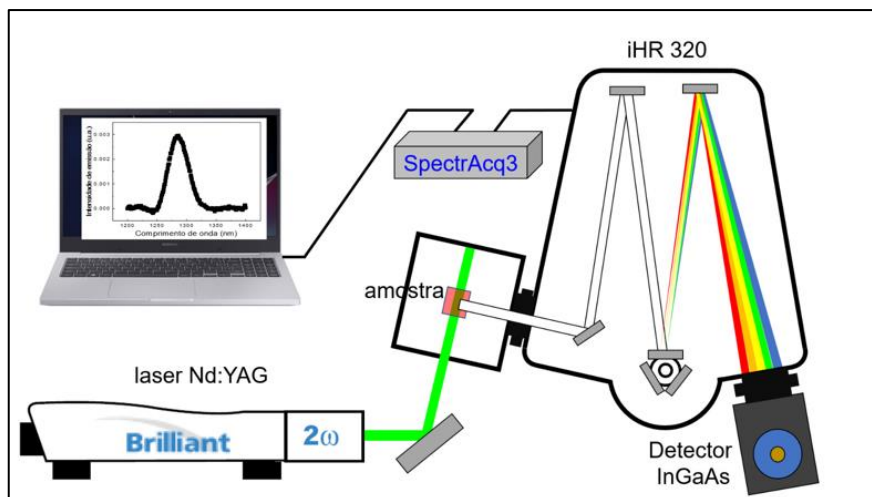
A possibilidade de quantificar a produção do oxigênio singlete é de suma importância para melhor caracterizar as propriedades de uma molécula, colocando-a na classe de um possível fotossensibilizador.

O procedimento para detecção e mensuração do oxigênio singlete se dá pelo estudo das propriedades fosforescentes, que é a capacidade de uma substância absorver luz de um determinado comprimento de onda emitido por uma fonte externa e reemitindo-a na forma de radiação.

Assim, podemos monitorar, por uso de um espectrômetro de fosforescência, com uma refrigeração árdua, para que diminua o máximo de energia térmica, restando apenas as interações quânticas da substância analisada. O sistema adquirido pelo Grupo de Biofotônica da UFG consiste em:

- i. Sistema de excitação: uma fonte de laser que poder ser contínuo ou pulsado;
- ii. Sistema de detecção: um monocromador (MC) seleciona o comprimento de onda da luz de análise, a qual é coletada por um detector de estado sólido refrigerado (InGaAs) para detecção na região do infravermelho;
- iii. Sistema de digitalização: console de controle e processamento de dados (*SpectrAcq*) que fará a interface com um computador.

Figura 6 - Arranjo experimental para detecção de oxigênio singlete.



Fonte: autoria própria.

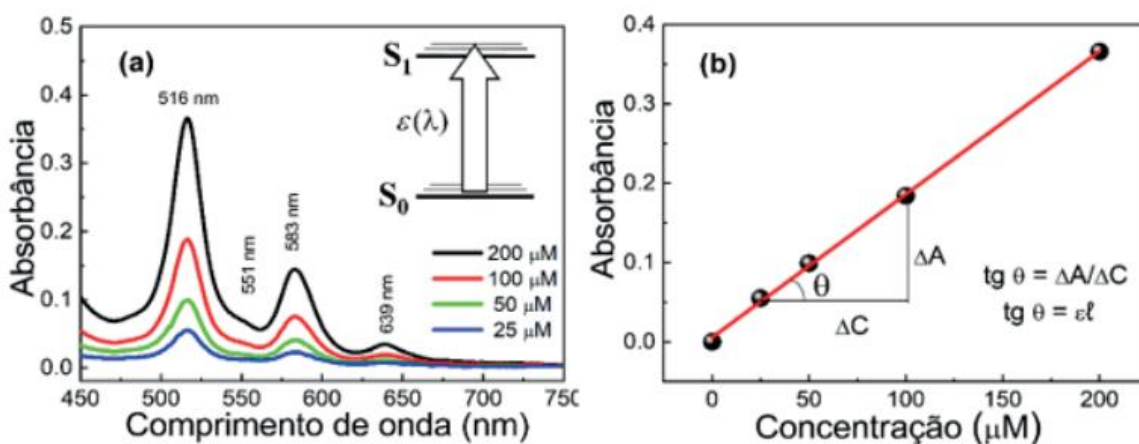
METODOLOGIA

4.1 Caracterização das propriedades fotofísicas de uma amostra

O processo experimental para caracterizar as propriedades fotofísicas, tem como base a técnica de absorção molar que atua na região do ultravioleta e do visível (UV-Vis), nos possibilitando observar e analisar a região específica em que a substância analisada absorve a luz, saindo do estado menor energético para o primeiro estado excitado ($S_0 \rightarrow S_1$). Isso nos permite saber a probabilidade deste processo ocorrer por meio da determinação de absorção molar em um determinado comprimento de onda $\epsilon(\lambda)$ (GONCALVES, P. J, et al. 2021).

Observando a Figura 7a, percebemos 4 bandas (ou picos) de absorção de uma porfirina representativa. O espectro de análise fez uma varredura em uma região que comporta desde os 750 aos 450nm. Este espectro fora obtido utilizando o aparelho Espctrofotômetro UV-Visível U2900 Hitachi™, acessível no Laboratório de Biofotônica do Instituto de Física da UFG.

Figura 7 - (a) Espectro de absorção de um típico FS (porfirina) na região de 450 a 750 nm em diferentes concentrações e (b) valores de absorbância monitoradas em 516 nm em função da concentração do FS que irão permitir obter o valor de $\epsilon(\lambda)$.



Fonte: GONCALVES, P. J, et al. (2021, cap.1 p.17)

O coeficiente de absorção molar $\epsilon(\lambda)$, pode ser determinado pela lei de Lambert-Beer:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) c l \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo $A(\lambda)$ o valor da absorvância; $\varepsilon(\lambda)$ o coeficiente de absorção molar; c a concentração molar e l o caminho óptico da amostra. Já a figura 7b, representa um gráfico de $A(\lambda) \times C$, onde podemos obter a inclinação da reta pela $\text{tg}(\theta)$ que é fornecida pelo produto de $\varepsilon \times l$ (BORISSEVITCH; GONÇALVES; SCHABERLE, 2015).

Compreender estes espectros de absorção nos permite monitorar diferentes moléculas e caracteriza-las como fotossensibilizadores, implicando em alterações nas bandas de absorção e o surgimento de novas bandas (GONCALVES, P. J, et al. 2021). Após a coleta de dados, os mesmos são processados pelo software OriginPro 2018®, versão 9.5, posteriormente o tratamento de dados foi realizado no mesmo software.

4.2 Quantização de estado tripleto por meio da técnica da Flash-Fotólise

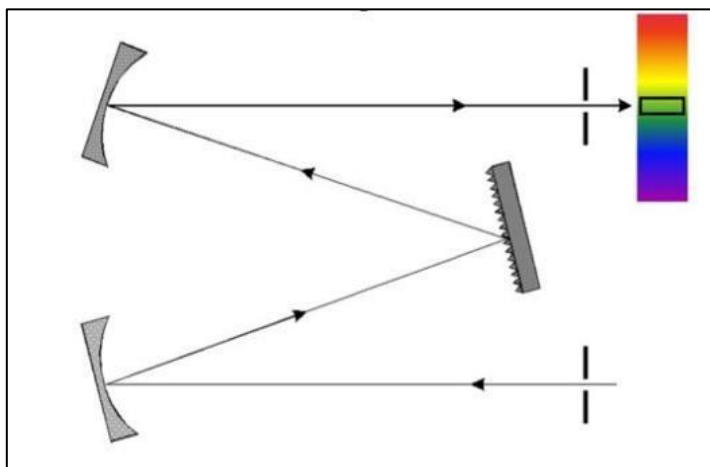
Para primeira etapa deste trabalho de conclusão de curso avaliamos a porfirina TMPyP, uma porfirina catiônica frequentemente utilizada na PDT e um bom modelo para estudos. A porfirina TPPS₄ foi utilizada como padrão para o cálculo do rendimento quântico de formação de estados tripletos.

As amostras foram inicialmente solubilizadas em água e sua absorvância foi ajustada para aproximadamente 0,2 na região de excitação do laser em 532 nm. O procedimento experimental para as medidas da Flash-fotólise se inicia ligando a lâmpada de análise e o laser para sua estabilização. Este processo pode durar de 10 a 20 minutos.

Após estabilização do laser, disparos contínuos de fótons causarão o bombeamento na amostra posicionada a frente do feixe do laser, populando níveis mais elevados de energia por meio de absorção ($S_0 \rightarrow S_1$). Em seguida a relaxação espontânea ocorrerá, fazendo com que parte da população retorne ao estado fundamental S_0 . Perpendicular a este feixe, fora posicionado a lâmpada de xenônio, que alvejará a amostra simultaneamente, excitando o restante da população da amostra.

Um monocromador (MC) é usado para selecionar o comprimento de onda da luz analítica, que é detectada por um tubo fotomultiplicador (FM). O sinal é então digitalizado por um osciloscópio, que envia os dados para um computador para análise posterior.

Figura 8 - Esquemática do monocromador.



Fonte: JAS.CO (2020, p.2)

Após a captura e organização de dados, o primeiro parâmetro fotofísico obtido pela flash-fotólise é o tempo (τ_T) de vida do tripleto. Este valor está relacionado com a estabilidade da molécula fotossensibilizadora em seu estado de tripleto excitado, que afeta o processo de transferência de energia para a molécula.

O rendimento de formação de tripleto (ϕ_T) pode ser obtido pela equação (BORISSEVITCH *et al.*, 2023).

$$\phi_T = \frac{\Delta A_0 A_{ex}^p C_0 \Delta A_{max}^p}{\Delta A_0^p A_{ex} C_0^p \Delta A_{max}} \phi_T^p \quad (Eq. 4)$$

Sendo ΔA o pico da curva de decaimento do tripleto, A_{ex} o valor da absorvância no comprimento de onda de excitação do laser (532 nm), C_0 a concentração da amostra, ΔA_{max} o valor do pico da curva de decaimento extrapolado para energia infinita, ou seja, quando toda população eletrônica se encontra no estado tripleto.

O valor ΔA_{max} será obtido pelo ajuste da curva utilizando o software Origin. Os índices superescritos “p” se referem aos valores da amostra padrão que possui rendimento quântico de tripleto conhecido; em nosso caso a porfirina TPPS₄ (BORISSEVITCH *et al.*, 2021, p. 8).

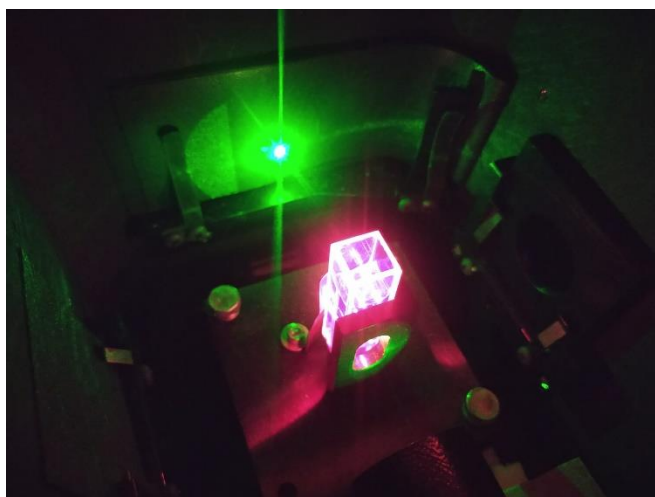
4.3 Obtenção de fosforescência de oxigênio singleto

Na segunda etapa do trabalho, analisamos o rendimento quântico de oxigênio singleto da porfirina TPPS₄ de duas maneiras distintas. Inicialmente solubilizamos a porfirina TPPS₄ em PBS (solução tampão) e ajustamos os valores de sua absorbância para aproximadamente 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 na região de excitação do laser em 532nm, para que tenhamos várias amostras com diferentes absorbâncias e possamos compara-las posteriormente.

Posteriormente adicionamos oxigênio na solução das porfirinas cujo valor de absorbância eram 0,2 e 0,4 durante períodos de 10, 20 e 30 minutos. Após a adição de oxigênio medimos e comparamos a fosforescência da amostra, agora numa disposição maior de oxigênio com intuito de saturar a solução com o mesmo.

Para detecção de oxigênio singleto utilizamos uma técnica que se baseia na detecção da emissão fosforescente do oxigênio singleto que acontece na sua relaxação. A solução é bombardeada pelo laser com energia suficiente para promover o oxigênio para seu estado de singleto, após oxigênio retornar para o seu estado fundamental (T_0), ele irá emitir sua fosforescência no espectro infravermelho, com o pico do espectro em torno de 1270 nm.

Figura 9 - Processo de medição de fosforescência do oxigênio singleto.



Fonte: autoria própria.

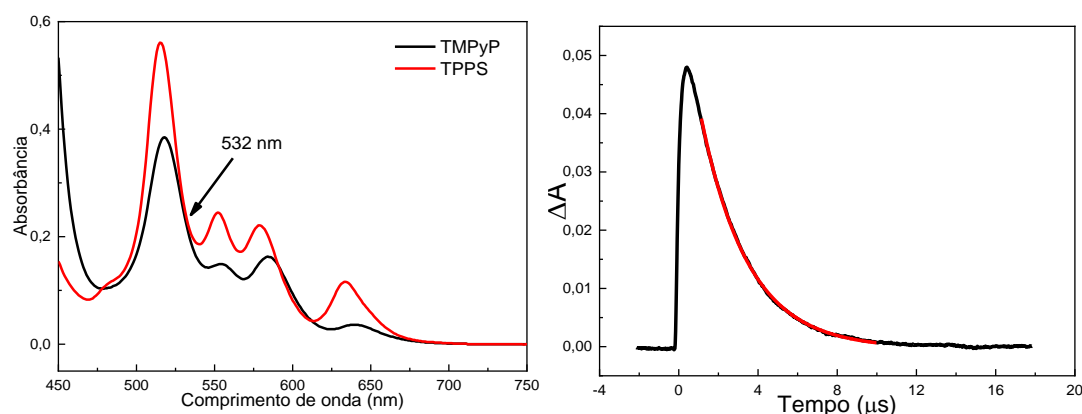
A medição do espectro de fosforescência de oxigênio singlete foi realizada no espectrômetro Horiba™ IHR320, a amostra foi bombardeada por um laser contínuo iZI-LaserLine (532 nm, 50 mW, largura de pico $\Delta\lambda_{1/2} = 9\text{nm}$). A composição do espectrômetro de fosforescência consiste em uma câmara para alocação de amostras, um monocromador para distinguir a emissão em função do comprimento de onda, um fotodetector de infravermelho que irá converter a luz em sinais elétricos (InGaAs) e um software para controle e processamento de dados (SpectrAcq).

As medições foram realizadas à temperatura ambiente. A varredura do software em uma janela variando o espectro de 1210 a 1360 nm usando fendas frontais e laterais de 2,0 mm com tempo de integração de 0,5s. Posteriormente, os espectros de fosforescência foram processados no software OriginPro 2018® versão 9.5. (ORIGINLAB Corporation, 2017).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Figura 10a estão apresentados os espectros de absorção das porfirinas TPPS₄ e TMPyP e na Figura 10b o decaimento da absorção transiente ΔA em função do tempo.

Figura 10 - (a) A esquerda, espectros de absorção das porfirinas TMPyP e TPPS₄. Detalhe para o comprimento de excitação laser em 532 nm. (b) A direita, curva típica de decaimento ΔA de onde pode se obter o tempo de vida do estado tripleto.



Fonte: autoria própria.

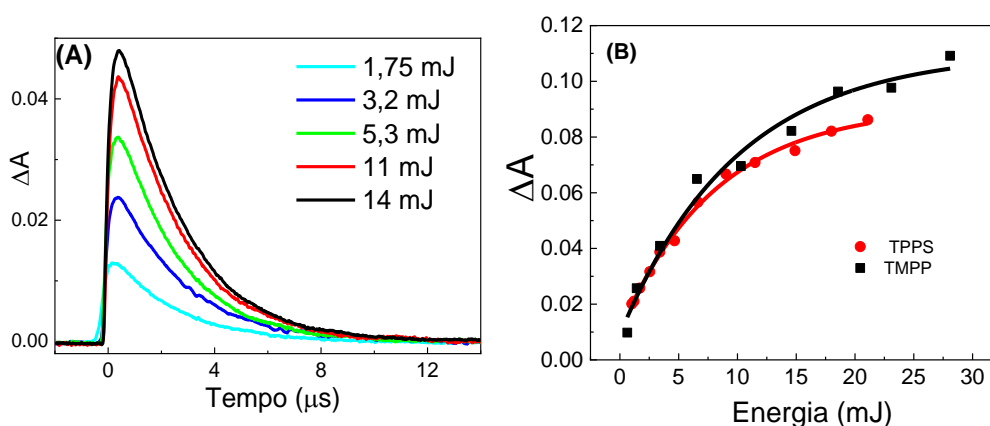
A partir dos espectros de absorção é possível obter os valores de absorbância no comprimento de excitação e a concentração de cada amostra. Os valores utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 1.

O tempo de vida da porfirina TMPyP foi obtido de um ajuste de decaimento exponencial utilizando o software Origin. Este tempo de vida representa o valor médio residido no estado energético analisado, o valor obtido foi de 2,4 μs , semelhante ao reportado na literatura para TMPyP e outras porfirinas em solução aquosa (GONCALVES, P. J, et al. 2021).

O valor do rendimento quântico de tripleto Φ_T pode ser obtido utilizando a Eq. 4. Para isso, a curva de absorção transiente é medida em diferentes valores da energia do pulso do feixe de bombeio (laser). O aumento da energia causa uma variação na magnitude da absorção transiente diferencial (ΔA). A Figura 10b mostra as curvas de decaimento de ΔA em diferentes valores energia do feixe de bombeio para a porfirina TPPS₄.

A partir dos máximos valores de ΔA obtidos pelas curvas de decaimento, exemplificadas na Figura 11a, é construída uma curva destes valores em função da energia do feixe de bombeio. Essa nova curva (Figura 11b) com comportamento de crescimento exponencial, cuja extrapolação para o infinito (máxima energia) fornece o termo ΔA_{max} pela Eq.4 que corresponde ao máximo de espécies no estado tripleto que podem ser geradas.

Figura 11 - a) Curvas de tempo de vida dos estados tripleto da TPPS₄ em diferentes energias do feixe de bombeio, obtidas pela técnica flash-fotólise; b) Dependência da absorção transiente (ΔA) em função da energia do feixe de bombeio, em mJ, para TPPS₄ e TMPyP.



Fonte: autoria própria.

A tabela 1 apresenta os valores obtidos dos ajustes das curvas ΔA em função da energia e os demais valores obtidos para o cálculo do rendimento de formação do estado tripleto. Todos os valores correspondentes á amostra padrão foram retirados da literatura (GONCALVES, P. J, et al. 2005).

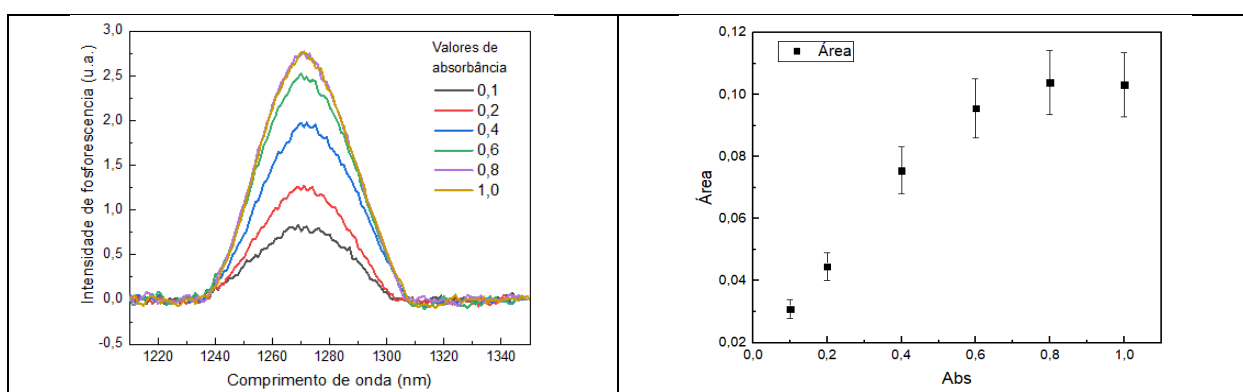
Tabela 1 – Parâmetros experimentais obtidos e utilizados no cálculo do rendimento de formação do estado tripleto através da Eq. 4:

Amostra	$\Delta A/\Delta A^p$	A_{ex}	A_{ex}^p	ΔA_{max}	ΔA_{max}^p	C_0^p (μM)	C_0 (μM)	ϕ_T^p	ϕ_T
TMPyP	1,14	0,216	0,189	0,1106	0,0909	23,9	26,5	0,77	0,70

Diante dos valores experimentais apresentados na Tabela 1 obtivemos o valor φ_T da porfirina TMPyP igual a 0,70. Isso representa que 70% da população eletrônica que foi inicialmente excitada $S_0 \rightarrow S_1$ irá relaxar para o estado tripleto. Esse é um dos motivos pelo qual essa molécula é frequentemente utilizada em aplicações fotodinâmicas. Cabe ressaltar que este valor é próximo ao reportado na literatura (GONCALVES, P. J, et al. 2021).

Já a figura 12 representa um gráfico de espectros de emissão de fosforescência de uma solução contendo a porfirina TPPS₄ em PBS (solução tampão), onde variamos diferentes valores de absorbância (no comprimento de onda do laser de excitação) desde o 0,1 até 1,0. Como esperado seu pico está por volta do comprimento de onda em 1270nm.

Figura 12 -a) O gráfico a esquerda representa o espectro de emissão de fosforescência, com valores de absorbância distintos. b)O Gráfico a direita representa as diferentes áreas sob as curvas do espectro de emissão de fosforescência por absorbância.



Fonte: autoria própria.

A figura 12 b) representa a área sob a curva de cada espectro de emissão em função da absorção da porfirina TPPS₄ em PBS. Podemos observar o aumento linear do valor numérico da integral da área em função da absorbância da amostra, seguido de uma tendência a se comportar de forma constante, uma saturação. Isto indica que mesmo a adição de mais porfirina à solução, não nos retornaria necessariamente um aumento na emissão de fosforescência. Esta saturação advém de uma soma de fatores que impactam diretamente na formação do oxigênio singleto e consequentemente na sua emissão da fosforescência.

O primeiro fator é a própria potência do feixe de excitação, que elevará a população eletrônica ao estado excitado de singleto, seguido do cruzamento intersistemas para o estado de tripleto, assim formando espécies de oxigênio singleto que ao relaxar emitirá a fosforescência

medida posteriormente. Outro fator contribuinte é a concentração de porfirina na solução, uma vez que, quanto mais fotossensibilizadores absorvendo a luz, haverá maior emissão de fosforescência de oxigênio singlete. Contudo, aumentar a concentração indiscriminadamente de porfirina não necessariamente implica num aumento direto de fosforescência, pois existem processos que competem para que haja a emissão de fosforescência. A própria absorbância das amostras em solução interfere na emissão de fosforescência devido ao arranjo experimental utilizado para a medição, em virtude de mais fotossensibilizadores, ao primeiro contato do feixe de excitação na solução, mais moléculas absorverão o feixe, assim atenuando o feixe que percorrerá o caminho ótico encontrando mais e mais moléculas fotossensíveis.

Seguimos com uma simulação onde buscamos analisar o comportamento da transmitância em função da posição na cubeta, ou seja, queremos observar o quão atenuado o feixe será ao decorrer do caminho ótico.

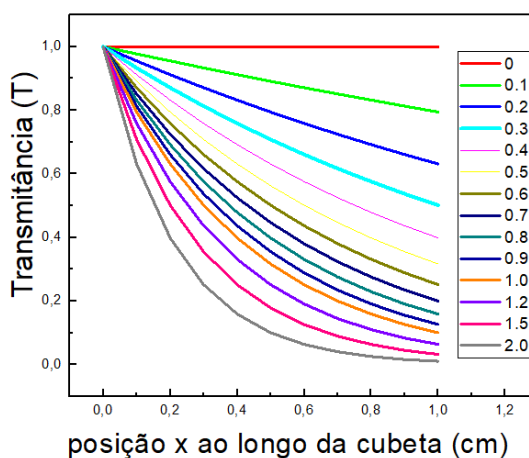
Podemos obter a equação da transmitância através da lei de Lambert-Beer:

$$A = -\log T \quad (\text{Eq. 5})$$

A é a absorbância da amostra, a mesma citada na Eq. 3, e T a transmitância que buscamos. Para evidenciarmos a mesma, basta exponenciar o 10 pela Eq. 5 e obtemos

$$T = 10^{-A} \quad (\text{Eq. 6})$$

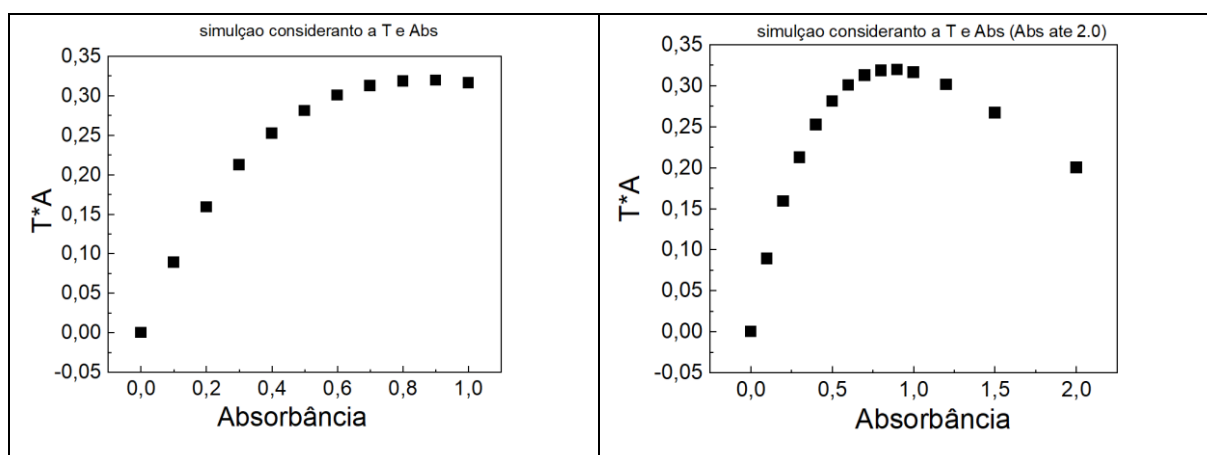
Figura 13- Transmitância de uma amostra em função do valor da absorção ao longo do caminho ótico de uma cubeta de comprimento de 1 cm em função da absorbância. Os valores das absorbâncias foram variados de 0 a 2.0.



Fonte: autoria própria

Podemos observar na Figura 13 o comportamento da transmitância do feixe ao longo de todo o caminho ótico. As curvas que possuem diferentes cores representam variações da absorbância (exibidas na lateral direita do gráfico), variando de 0 a 2.0. A absorbância de 0 representa uma transmitância total, onde o feixe não encontra atenuação na sua intensidade, já que não há nenhuma substância absorvendo o mesmo. Entretanto para todas as outros os valores de absorbância percebemos sua atenuação ao decorrer do caminho ótico.

Figura 14-a) O Gráfico a esquerda representa a simulação do produto da transmitância com a absorbância em valores distintos de absorbância. **b)** Gráfico a direita representa uma extrapolação para maiores valores de absorbância.

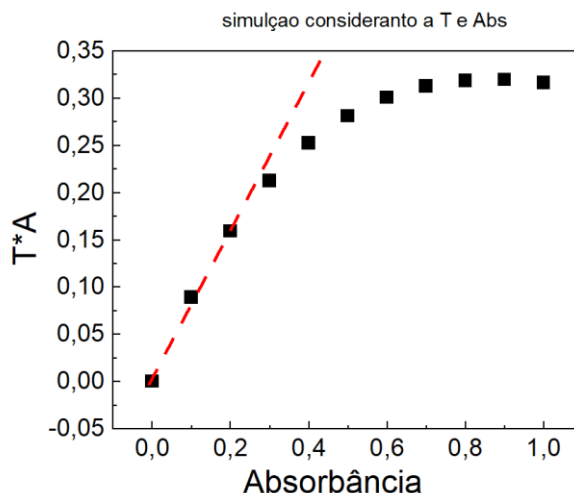


Fonte: autoria própria.

A figura 14-a) representa a simulação do produto da transmitância com a absorbância em função das absorbâncias que utilizamos nas amostras de TPPS₄, já que a produção de oxigênio singlete depende diretamente da intensidade luz e da concentração de amostra. A figura 14-b) é uma projeção mais extrapolada da absorbância. Adotamos a transmitância do feixe referente a mesma posição no centro da cubeta, ou seja, o ponto de 0,5 da figura 13, já que assumimos a saída da luz de análise de fosforescência está nesta posição central e perpendicular ao feixe de excitação.

Como previsto, a figura 14-a) corrobora exatamente com os dados experimentais obtidos e representados na figura 12, nos demonstrando a saturação obtida nos valores de absorbância de 0,8 e 1,0. Doravante, a figura 14-b) não só nos demonstra que o aumento de absorbância além de 0,8 é extremamente ineficaz, como o aumento indiscriminado do mesmo acabaria nos resultando em uma menor emissão de fosforescência do oxigênio singlete.

Figura 15 – Gráfico que representa a o produto da transmitância do feixe com a absorbância.

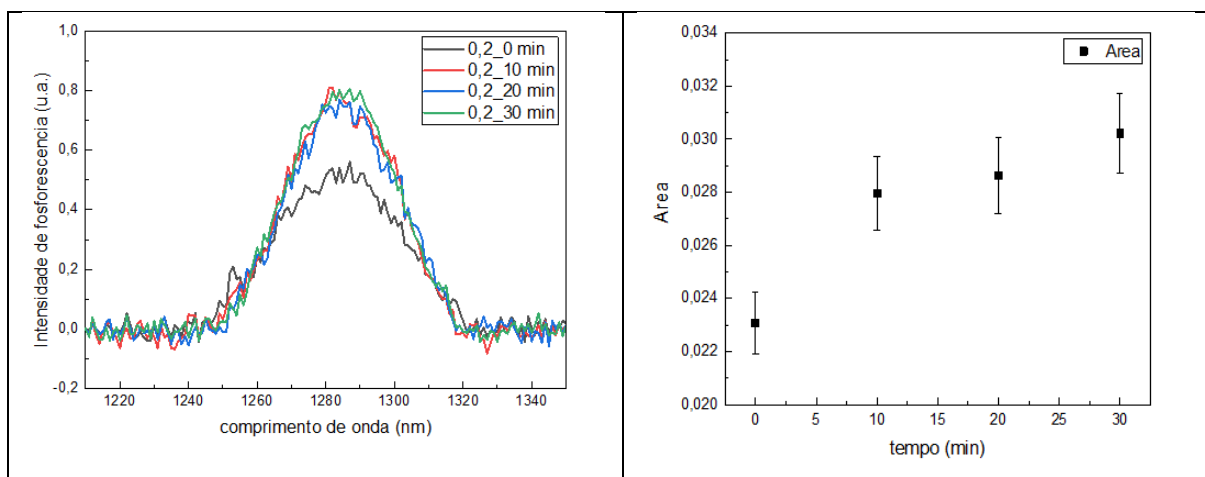


Fonte: autoria própria.

Como dito anteriormente, a luz de análise está disposta perpendicularmente ao feixe de excitação, assim calculamos a transmitância no centro da cubeta considerando três parâmetros, a potência do feixe de excitação, a transmitância e a absorção da solução. Inicialmente podemos observar o comportamento linear dos pontos representados nos gráficos, a partir da absorção 0,3 já observamos um desvio da tendência linear. Os pontos caracterizados por quadrados pretos representam a curva simulada, onde a potência do feixe de laser é estritamente constante, a curva tracejada vermelha caracteriza a tendência linear para baixas absorções da solução.

Vale ressaltar que em trabalhos e estudos utilizando a porfirina TPPS₄ a sua absorbância tende a ser ajustada em torno de 0,2 no comprimento de onda de excitação, onde o comportamento se mostrou aproximadamente linear, indicando uma melhor eficiência de geração de estado singleto do oxigênio, onde há menor interferência destes processos que possam competem entre si.

Figura 16 - a) O gráfico a esquerda representa o espectro de emissão de fosforescência da porfirina TPPS₄ com absorbância de 0,2 após o adicionar oxigênio durante tempos distintos. b) O gráfico a direita representa as diferentes áreas sobre a curva de espectro de emissão de fosforescência da porfirina TPPS₄ com absorbância de 0,2.

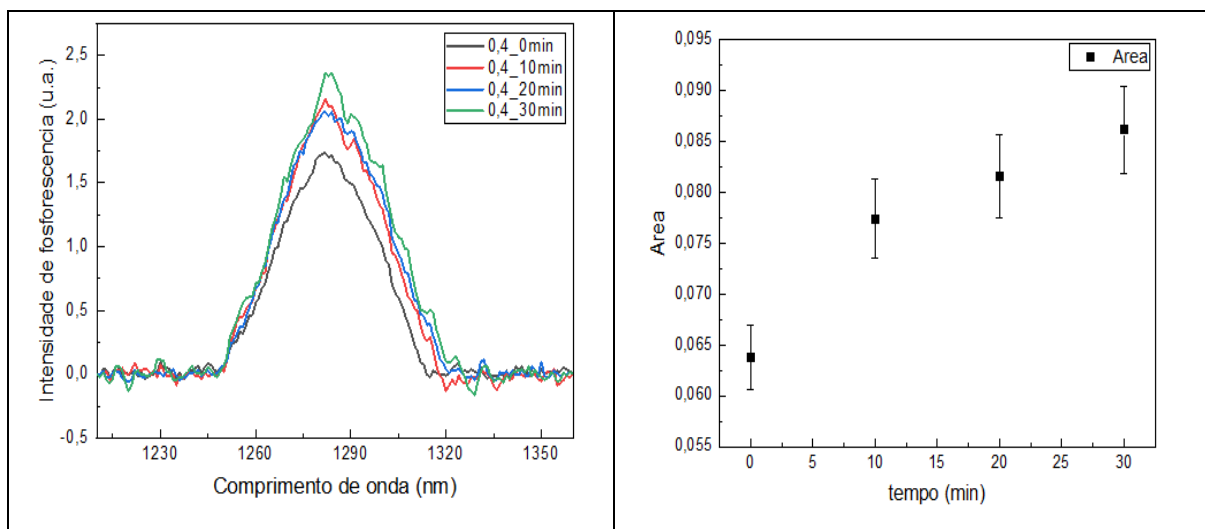


Fonte: autoria própria.

Já a figura 16-a) demonstra a intensidade de fosforescência da porfirina TPPS₄ após a adição do oxigênio na solução, nos períodos de 0 a 30 minutos, nos rendendo 4 curvas distintas. A curva sem adição de oxigênio tem menor intensidade comparada as outras 3 curvas, porém a partir da adição no período de 10 minutos, as curvas começam a se sobreporem, demonstrando um possível começo de saturação e uma menor eficiência da relação entre aumento de intensidade de fosforescência por tempo de oxigenação.

A figura 16-b) realça o aumento do valor numérico da integral sob as curvas de intensidade de fosforescência do oxigênio. Assim observamos o aumento de emissão de fosforescência nos primeiros 10 minutos, seguidos novamente da tendência do comportamento constante. Esta tendência ainda não é suficiente para decretarmos uma saturação, mas é um forte indicativo. Entretanto, precisaríamos de mais algumas coletas de dados para decretarmos esta saturação, possivelmente uma oxigenação de 40 ou 50 minutos seria suficiente.

Figura 17 - a) O gráfico a esquerda representa o espectro de emissão de fosforescência porfirina TPPS₄ com absorvância de 0,4 após o adicionar oxigênio durante tempos distintos. b) Gráfico a direita representa as diferentes áreas sobre o espectro de emissão de fosforescência da porfirina TPPS₄ com absorvância de 0,4.



Fonte: autoria própria.

As figuras 17-a) e 17-b) nos demonstra resultados já esperados e observados anteriormente, porém com uma concentração maior da porfirina TPPS₄, que se comparada a amostra anterior, podemos ver uma maior intensidade de fosforescência. Ambas amostras demonstraram um aumento de aproximadamente 21% no valor numérico da área sob as curvas de intensidade de fosforescência após os primeiros 10 minutos de adição de oxigênio na solução.

Assim identificamos o terceiro fator impactante para a produção de oxigênio singlete, que é a própria concentração do oxigênio. Onde observamos a dependência da intensidade de fosforescência advinda da intensidade do laser, da concentração da porfirina TPPS₄ e da concentração de oxigênio.

CONCLUSÕES

Neste presente trabalho de conclusão de curso estudamos as propriedades fotofísicas de moléculas orgânicas e algumas de suas características essenciais para compreendermos a ação fotodinâmica e os mecanismos envolvidos. Foi realizado um estudo teórico e alguns experimentos que permitiram estabelecer uma ponte entre a teoria e a prática e assim vivenciar sobre a rotina de um laboratório de pesquisa. Utilizando a técnica de Laser Flash-Fotólise, foi possível compreender seu princípio de funcionamento, assim como obter os tempos de vida do estado tripleto e o rendimento quântico de formação de estado tripleto. Além disso, foi possível avaliar os efeitos da concentração dos fotossensibilizadores e do oxigênio na solução do composto fotossensibilizador sobre a emissão de fosforescência do oxigênio singleto. Verificamos também, a importância de ajustar a absorvância da amostra em estudo para 0,2 e um tempo de 20 a 30 minutos de borbulhamento de oxigênio para saturação da solução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMSE, H.; TYNGA, I. S. M. Photodynamic Therapy, a Potential Therapy for Improve Cancer Management. In: BULUT, N. (org.). **Breast Cancer and Surgery**. [S. l.]: IntechOpen, 2018. Available at: <https://doi.org/10.5772/intechopen.74697>

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011. Available at: <https://doi.org/10.3322/caac.20114>

ALLISON, Ron R.; MOGHISSI, Keyvan. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24-29, 2013.

ATKINS, P.; PAULA, J. de. **Físico-Química**. Oitava Edied. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

ATVARS, Teresa DZ; MARTELLI, Cláudia. Espectroscopia de luminescência. **Revista Chemkeys**, n. 2, p. 1-9, 2002.

BORISSEVITCH, I. E.; GONÇALVES, P. J.; SCHABERLE, F. A. Fundamentos de Espectroscopia de Absorção Óptica. 1. ed. São Paulo: **Editora Livraria da Física**, 2015.

BORISSEVITCH, I. E.; et al. An Alternative Method to Determine the Quantum Yield of the Excited Triplet State Using Laser Flash Photolysis. **Photonics** 2023, 10, 409. <https://doi.org/10.3390/photonics10040409>

BORISSEVITCH, I. E. et al. Characterization of triplet state of cyanine dyes with two chromophores. Effect of molecule structure, [s. l.], 2023.

CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s. l.], v. 160, p. 240–247, 2016. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.050>

DEPOSITPHOTOS. **Macrociclo tetrapirrólico comum das porfirinas**

<https://br.depositphotos.com/stock-photos/porfirina.html> Acesso em 19 de Junho de 2023.

ENDINGBURGH INSTRUMENTS. **A typical Jablonski diagram showing the possible radiative and non-radiative transitions** [https://www.edinst.com/blog/jablonski-diagram-2/#:~:text=Jablonski%20Diagram\)%3F,What%20is%20a%20Jablonski%20Diagram%20\(Perrin%20Jablonski%20Diagram\)%3F,that%20can%20occur%20between%20them](https://www.edinst.com/blog/jablonski-diagram-2/#:~:text=Jablonski%20Diagram)%3F,What%20is%20a%20Jablonski%20Diagram%20(Perrin%20Jablonski%20Diagram)%3F,that%20can%20occur%20between%20them.). Acesso em 19 de Junho de 2023.

GONÇALVES, P. J.; DE BONI, L.; BARBOSA NETO, N.M.; RODRIGUES JR, J. J.; ZÍLIO, S. C.; BORISSEVITCH, I. E. “Effect of protonation on the photophysical properties of meso-tetra(sulfonatophenyl) porphyrin”, **sciencedirect Chemical Physics Letters**, 2005.

GONÇALVES, P. J.; FRANZEN, P. L.; CORREA, D. S.; ALMEIDA, L. M.; TAKARA, M.; ITO, A. S.; ZÍLIO, S. C.; BORISSEVITCH, I. E. “Effects of environment on the photophysical characteristics of mesotetrakis methylpyridiniumyl porphyrin (TMPyP)”, **Spectrochim. Acta A** **2011**, 79, 1532-1539.

JASCO. **Princípios de espectroscopia UVVis** <https://jasco.com.br/principios-de-espectroscopia-uvvis-4/>. Acesso em 01 de Julho de 2023.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3rd. ed. Boston, MA: Springer US, 2006. ISSN 14209136. Available at: <https://doi.org/10.1007/978-0387-46312-4>

ORIGINLAB CORPORATION. **Origin Pro 2018**. Nothampton: OriginLab, 2017. Software de Processamento de Dados e Análise Estatística.

NONELL, Santi; FLORS, Cristina (Ed.). **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1**. Royal Society of Chemistry, 2016.

WANG, X.-L. et al. Treatment of skin cancer and pre-cancer using topical ALA-PDT—A single hospital experience. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 127–133, 2008. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2008.05.003>

YANO, T.; WANG, K. K. **Photodynamic Therapy for Gastrointestinal Cancer**. *Photochemistry and Photobiology*, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 517–523, 2020. Available at: <https://doi.org/10.1111/php.13206>

QUORA. **Diagrama de energias dos estados singleto e tripleto** <https://pt.quora.com/Por-que-subst%C3%A2ncias-fluorescentes-ou-fosforescentes-brilham-e-qual-%C3%A9-a-diferen%C3%A7a-entre-elas#:~:text=A%20diferen%C3%A7a%20entre%20a%20fosforesc%C3%A2ncia,quando%20param%20de%20receber%20energia> . Acesso em 02 de julho de 2023.

GONCALVES, P. J.; ALMEIDA, L. M.; LIMA, A. R.; TELES, A. V.; OLIVEIRA, T. M. dos A.; BEZERRA, F. C.; SILVEIRA-ALVES, E; LEITE, C. K.; SOUZA, G. R. L.

INATIVAÇÃO FOTODINÂMICA: ASPECTOS FOTOFÍSICOS E APLICAÇÕES NO COMBATE A MICRORGANISMOS. *In*: DAL MOLIN, R. S.; LOPES, A. N. (eds.).

Infectologia bases epidemiológicas e clínicas. 1st ed. Guarujá: Editora Científica, 2021. p. 13–32. DOI 10.37885/210303817. Available at:

<http://www.editoracientifica.org/articles/code/210303817>.