UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – UFG
INSTITUTO DE FÍSICA – IF

RUBENS ANTÔNIO GUERRA

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PORFIRINAS COM NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS BIOCOMPATIVEIS

Goiânia – GO
2015

RUBENS ANTÔNIO GUERRA

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PORFIRINAS COM NANOPARTICULAS MAGNÉTICAS BIOCOMPATIVEIS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Mestre em Física.

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves

Goiânia – GO

2015

Agradecimentos

- À Deus, pela inspiração e pela força necessária que me concedeu nos momento difíceis.
- À minha esposa Jesíbias Oliveira Pacheco Guerra pelo amor a mim concedido, pelo incentivo e pela confiança. Eu não teria êxito nesta etapa da minha vida se não tivesse o seu apoio.
- Às minhas filhas Anna Lara P. Guerra e Bárbara Fernandes Guerra, a vocês pela compreensão relativa a minha ausência, durante este curso. Foi pensando em dar-lhes o melhor que obtive a coragem necessária para superar o que me parecia quase impossível.
- À minha mãe, por sempre orar por mim. Quando conversávamos sobre meus estudos, ela pronunciava palavras de otimismo, dizendo que Deus iria me abençoar e que em breve terminaria esse curso.
- Ao meu sogro João dos Reis Pacheco e à minha sogra Ana Fernandes de Oliveira Pacheco que contribuíram de forma significativa. Sem eles, acredito que não teria conseguido êxito. Nos momentos difíceis, pediram intercessão à Deus ao meu favor, e tenho certeza que ele os ouviu.
- Aos meus cunhados e cunhadas que de forma direta ou indireta, me incentivaram a dar sequência aos meus estudos. Muito obrigado.
- Ao professor Dr. Pablo José Gonçalves pela oportunidade, paciência e tolerância que teve comigo enquanto fui seu orientando. Sou ciente de que não foi fácil me orientar, pois inúmeras foram as dificuldades. Ao longo desse período, e através dos seus ensinamentos, percebi suas qualidades cristãs. Sou grato pelos seus ensinamentos científicos durante a elaboração deste trabalho, pela disponibilidade de tempo e dedicação em me orientar. Obrigado por tudo.
- A todos os professores do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG), por terem me proporcionado desenvolvimento e crescimento intelectual durante o curso.
- A todos os colegas do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG), por terem me proporcionado desenvolvimento e crescimento intelectual durante o curso.
- À Universidade Federal de Goiás (UFG) e ao Instituto de Física pelas oportunidades.
- À CAPES pela bolsa de pesquisa e a FAPEG pelo apoio por meio do financiamento ao meu projeto de pesquisa.

RESUMO

O objetivo deste trabalho de mestrado é o estudo das interações entre porfirina de base livre (TMPP) e seu complexo metálico (ZnTMPP) com nanopartículas magnéticas biocompatíveis com diferentes camadas de cobertura. O sistema em estudo mostrou potencial para possíveis aplicações na medicina moderna, particularmente na terapia fotodinâmica ou como marcador fluorescente na magnetohipertermia. O presente sistema foi investigado através do uso de técnicas espectroscópicas de onde foram obtidas constantes de ligação, supressão, anisotropia e constante de velocidade bimolecular.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1.	Tratamentos oncológicos atuais	1
1.2.	Novas terapias	2
2.	Objetivos	7
3.	Materiais e métodos	8
3.1.	Materiais	8
3.1.1.	Fotossensibilizador (FS)	8
3.1.2.	Nanopartículas magnéticas (NPMs)	9
3.2.	Métodos	12
3.2.1.	Modelo fotofísico	12
3.2.1.	Rendimento quântico de fluorescência	14
3.2.2.	Mecanismos de supressão da fluorescência	15
3.2.3.	Formação de Complexo no estado fundamental e determinação da constante de ligação	18
4.	Técnicas experimentais	20
4.1.	O Espectrofotômetro	21
4.2.	O Espectrofluorímetro	26
4.2.1.	Medidas de fluorescência estacionária	26
4.2.2.	Medida de fluorescência resolvida no tempo	28
4.2.3.	Anisotropia de fluorescência	30
4.3.	Difração de raio x (DRX)	32
4.4.	Espalhamento de luz dinâmico (DLS)	32
4.5.	Potencial zeta	33
4.6.	Magnetometria de amostra vibrante (VSM)	33
5.	Procedimento experimental	34
5.1.	Preparação das amostras de porfirinas	35

5.2. Preparação das amostras de NPMs..... 35
5.3. Procedimento das medidas experimentais da interação do sistema..... 35
6. Resultados e discussões..... 36
6.1. Caracterização das porfirinas..... 36
6.2. Caracterização das NPMs..... 37
6.3. Interação das porfirinas com NPMs..... 43
6.4. Discussões..... 52
7. Conclusões..... 54
Referências..... 55

LISTA DAS FIGURAS

Figura 1: Diagrama esquemático da ação fotodinâmica 3

Figura 2: Estrutura molecular da porfirina TMPP..... 9

Figura 3: Representação esquemática dos fluidos magnéticos..... 10

Figura 4: Estrutura molecular das camadas de cobertura das NPMs..... 11

Figura 5: Diagrama de níveis de energia..... 12

Figura 6: Esquema dos componentes principais de um espectrofotômetro..... 21

Figura 7: Absorção da luz por uma amostra..... 23

Figura 8: Esquema de um espectrofotômetro..... 24

Figura 9: Esquema de um espectrofluorímetro estacionário..... 27

Figura 10: Diagrama do espectrofluorímetro de resolução temporal..... 29

Figura 11: Curva de decaimento de fluorescência 29

Figura 12: Efeito da polarização na excitação e difusão rotacional..... 30

Figura 13: Diagrama esquemático para medida de anisotropia de fluorescência..... 32

Figura 14: Espectros de absorção das porfirinas TMPP e ZnTMPP..... 36

Figura 15: Espectros de emissão e tempo de vida de fluorescência..... 37

Figura 16: Difratograma de raio x das NPMs..... 38

Figura 17: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão das NPMs..... 39

Figura 18: Histograma de polidespersão das NPMs 40

Figura 19: Gráficos de potencial zeta das NPMs 41

Figura 20: Espectros de absorbância das NPMs 42

Figura 21: Espectros de absorbância da interação de TMPP com NPMs..... 43

Figura 22: Espectros de absorbância da interação de ZnTMPP com NPMs..... 44

Figura 23: Espectros de emissão de fluorescências da TMPP com NPMs..... 45

Figura 24: Espectros de emissão de fluorescências da ZnTMPP com NPMs..... 46

Figura 25: Espectros de medida de tempo de vida de fluorescência..... 47

Figura 26: Gráficos de ajuste linear de Stern-Volmer para TMPP e ZnTMPP..... 48

Figura 27: Gráfico da relação de $log[(F_0 - F)/F]$ versus log [NPMs]..... 49
Figura 28: Interação eletrostática 50

LISTA DAS TABELAS

Tabela 1: Resultados: DRX, MET e potencial zeta..... 41

Tabela 2: Anisotropia de fluorescência, rendimento quântico de fluorescência, tempo de vida de fluorescência, constante de supressão e constante de ligação, constante de velocidade bimolecular e sítios de ligação..... 51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tratamentos Oncológicos Atuais

O Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima cerca de 576 mil novos casos de câncer para o ano de 2014, levando em conta todos os tipos de neoplasias [1]. A Organização Mundial da Saúde (OMS) através da International Agency Researton Cancer (IARC) aponta uma crescente incidência da doença, sendo que a previsão é de que em 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento [2].

Em virtude do crescente número de novos casos de câncer a comunidade científica tem buscado métodos de tratamento com maior eficiência de cura e que sejam menos agressivos do que as terapias utilizadas atualmente (quimioterapia, radioterapia e cirurgia). Dentro dessa perspectiva, a terapia fotodinâmica [3] e a magnetohipertermia [4] tem recebido grande interesse científico. Tais terapias fazem uso de metodologias atuais para o controle e o combate de células e de micro-organismos e apresentam grande potencial para serem utilizadas em tratamentos de doenças graves como o câncer [5,6].

1.2. Novas Terapias

A terapia fotodinâmica (PDT) é um procedimento terapêutico minimamente invasivo promissor que emprega três componentes individualmente não-tóxicos (luz visível, composto fotossensibilizador e oxigênio molecular) que são combinados para induzir um forte estresse oxidativo em um alvo biológico. Este procedimento tem sido destinado ao tratamento de uma variedade de tumores sólidos e lesões não-malignas [7].

A ação fotodinâmica está representada esquematicamente na Figura 1. O passo inicial consiste na absorção de luz, de energia apropriada (hν), por um composto fotossensibilizador (FS). Este passará de seu estado de menor energia para o estado excitado ($^1FS^*$). A partir de então ocorrerá uma série de processos fotofísicos de relaxação. Uma possibilidade é realizar um cruzamento intersistema, passando para o estado excitado triplete ($^3FS^*$). Nesse estado ele poderá transferir energia para o oxigênio molecular ($^3O_2{}^*$), o qual pode formar íons e/ou espécies reativas, como o oxigênio singlete ($^1O_2$*). Essa espécie de oxigênio interage com outras moléculas presente no organismo podendo desencadear uma série de reações químicas e bioquímicas provocando a morte celular e até a destruição de tumores [3,6].

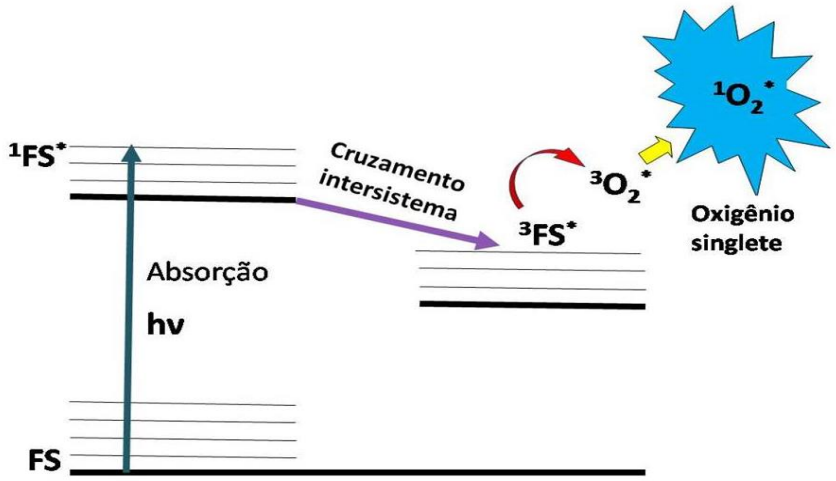

Figura 1: Diagrama esquemático da ação fotodinâmica.

Em um meio biológico, o oxigênio singlete reagirá prontamente com várias biomoléculas circundantes, tais como proteínas, lipídios e ácidos nucléicos [6,8]. Essa reação poderá causar danos oxidativo às biomoléculas. Assim três processos biológicos importantes para a PDT poderão acontecer: 1) a morte da célula cancerosa direto por necrose ou apoptose; 2) isquemia induzida por lesão vascular do tumor e 3) a ativação do sistema imunológico contra antígenos tumorais [6,9].

Os três processos biológicos resultantes da ação fotodinâmica poderão interagir com os mecanismos de outros fármacos quimioterápicos, levantando a possibilidade da aplicação conjunta com outros medicamentos numa única terapia anticâncer [9,10,11].

As principais vantagens da PDT estão associadas ao uso de luz visível e alta seletividade do FS, o que minimiza os efeitos colaterais em relação às tradicionais quimioterapias e radioterapias. No entanto essa terapia não se restringe somente ao tratamento de tumores, mas aplica-se também no tratamento de outras doenças que têm como característica o crescimento anormal de células, tais como degeneração macular da retina- doença que acomete grande parte dos idosos - psoríase, infecções bacterianas, verrugas, arteriosclerose, entre outras [11-14].

Clinicamente, a PDT já é empregada no tratamento de alguns casos de câncer tais como: anal [15], ovário [16], melanoma [17], pele [18], pulmão [19], etc. Todos esses são casos onde a penetração da luz é facilitada por simples exposição ou pelo uso de endoscópios acoplados a fibras óticas [20]. O uso da PDT em diagnósticos e no delineamento de lesões por fluorescência está aumentando [21,22]. Essa técnica pode atuar de forma conjunta com as técnicas convencionais, promovendo a redução do tumor antes da intervenção cirúrgica, bem como, atuar na profilaxia do local tratado após a cirurgia [23]. Nesta modalidade de tratamento, pode ocorrer a completa restauração do tecido e o procedimento pode ser repetido várias vezes, causando um mínimo de danos ao tecido saudável. Estas são as maiores vantagens da PDT em relação aos incômodos de outras terapias [3,6,24].

Apesar da sua comprovada eficácia, tem-se observado que FS tradicionais podem apresentar efeitos indesejados como prolongada fotossensibilidade cutânea, baixa solubilidade e seletividade [24]. Ainda, a natureza hidrofóbica de muitos fármacos resulta numa menor eficiência de entrega pela circulação sanguínea e sua agregação pode comprometer os seus efeitos terapêuticos [25]. Nesse sentido, para aumentar a eficácia terapêutica dos FS, tem havido enorme interesse em estudar e compreender mecanismos eficientes de entrega dirigida de fármacos [25,26]. Significativos progressos têm sido alcançados em sistemas baseados em dispersões micelares, lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas magnéticas [27-29].

As nanopartículas magnéticas (NPMs) têm apresentado um grande potencial para serem utilizadas na medicina. Suas principais características são: tamanho nanométrico, respondem a um campo magnético externo, apresentam

biocompatibilidade em pH fisiológico, pode-se também adsorver fármacos à sua superfície [30-34].

O uso de NPMs como nanocarreadores de fármacos tem mostrado ser promissor. Esse sistema consiste em acoplar fármacos de interesse na superfície das nanoestruturas magnéticas, com o objetivo de realizar a entrega dirigida de fármacos, possibilitando a sua liberação de forma controlada [30-33].

Os sistemas de liberação controlada de fármacos, frequentemente descritos como "drug delivery", oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional [25]. Neste sentido quando um fármaco, tal como um FS, se encontra no organismo, a interação deste fármaco com estruturas biológicas pode alterar suas características influenciando sua eficácia podendo ainda provocar efeitos colaterais.

Com a intenção de reduzir os efeitos colaterais indesejáveis oriundos de tratamentos neoplásicos, tem-se pesquisado sobre possíveis sistemas nanoestruturados que possam atuar como agentes carreadores de fármacos, possibilitando ainda a liberação controlada de agentes quimioterápicos (fármacos) [8,18]. Nesse sentido as nanopartículas magnéticas apresentam alta potencialidade e vêm recebendo grande atenção da comunidade científica [28,34].

Com a utilização da nanotecnologia para alterar as características de medicamentos no sentido de aumentar a sua solubilidade, e diminuir a sua degradação durante a circulação, e de tal forma que o fármaco se concentre no local a ser tratado, melhorando sua ação terapêutica. Esse procedimento poderá aumentar a sua eficácia e ao mesmo tempo reduzir os efeitos colaterais indesejados [8,28,34].

Existem algumas vantagens na utilização de sistema de entrega dirigida de fármacos, entre os quais, estão: menor uso de medicamento, redução da dosagem,

seletividade em relação ao alvo biológico (tecido ou células), redução dos efeitos colaterais, e ainda evitar os picos de dosagens, típicos de medicamentos convencionais [6,17,28,34]. Estes, além de trazerem vários benefícios terapêuticos, podem também superar casos de resistências a múltiplos fármacos pelas células cancerosas [35].

Outra técnica de aplicação das NPMs é na magnetohipertermia (MHT). Esta técnica consiste na aplicação intravenosa de uma concentração NPMs e em seguida utiliza-se de um campo magnético externo para provocar o aquecimento de um tecido específico. Tem sido relatado que um aquecimento a 41 e 45°C poderá provocar a destruição do tecido alvo até mesmo células tumorais [5,6,28].

Diante disso, neste trabalho iremos estudar a incorporação de moléculas orgânicas fotossensibilizadoras em NPMS. A elaboração de tal sistema FS-NP pode permitir seu uso no carreamento de fármacos para PDT, ou empregar as propriedades fluorescentes dos FS para serem empregados como sondas fluorescentes em aplicações como a MHT.

2. OBJETIVOS

Esta dissertação tem como objetivo estudar a interação de moléculas orgânicas fotoativas com nanopartículas biocompativeis, visando potencial aplicação para o transporte de fármacos e nas modernas técnicas de terapias de combate ao câncer e diagnóstico fluorescente.

As moléculas orgânicas estudadas foram às porfirinas catiônicas *meso*-tetrametilpiridil (TMPP), em sua forma base livre e formando complexo com átomo de zinco (ZnTMPP). As nanopartículas magnéticas biocompativeis utilizadas nesta interação foram as ferritas de manganês ($MnFe_2O_4$) na forma iônica e com diferentes camadas de cobertura (citrato, DMSA e fosfato). Empregaram-se diversas técnicas espectroscópicas tais como: a absorção UV/VIS, fluorescência estática e temporal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão apresentados os materiais empregados neste trabalho bem como as técnicas experimentais empregadas.

3.1. Materiais

3.1.1. Fotossensibilizador (FS)

Um dos principais fotossensibilizadores utilizados na PDT são as porfirinas. As porfirinas são moléculas orgânicas nitrogenadas que apresentam ligações metil e são organizadas na forma cíclica por quatro anéis pirrólicos fundidos, como os apresentados na figura 2. Elas estão entre as substâncias mais utilizadas na PDT por apresentarem as seguintes características: absorção de luz na região visível do espectro eletromagnético, particularmente na janela terapêutica entre 600 a 800 nm, alto rendimento quântico de estado triplete e geração de oxigênio singlete, baixa toxicidade no escuro e uma rápida eliminação pelo organismo [3,5,10,24].

Neste trabalho de pesquisa foram empregados os seguintes compostos porfirínicos: o catiônico *meso*-tetrametilpiriumil (TMPP), bem como seu complexo metalado com átomos de zinco (ZnTMPP). Ambas as porfirinas vem sendo empregadas na PDT com significativos resultados [36,37].

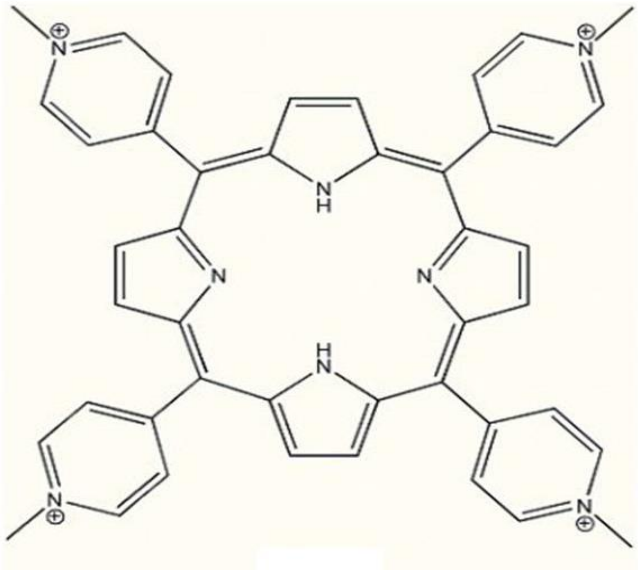

Figura 2: Estrutura molecular da porfirina TMPP.

3.1.2. Nanopartículas Magnéticas (NPMs)

Atualmente os ferrofluidos, como também são conhecidos os fluidos magnéticos, podem ser descritos como núcleos magnéticos nanométricos recobertos por algum agente estabilizante. Em geral, essas partículas possuem entre 2 nm e 100 nm e são chamadas de nanopartículas. Os fluidos magnéticos são dispersões coloidais cuja fase dispersa é composta por nanopartículas de ferro (Fe_3O_4, $MnFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$ e outros) e a fase contínua é um solvente líquido polar ou apolar. Em geral, as nanopartículas magnéticas apresentam forma esférica, possuindo estabilidade em pH fisiológico, tornando-as biocompativeis e portanto promissoras para utilização como carreadores de fármacos e em magnetohipertermia [22,26,28,31].

Na figura 3 está apresentada a funcionalização das NPMs. Em pH ácido as NPMs apresentam carga superficial positiva e não são estáveis. Para obter a estabilidade do fluido magnético, é preciso fazer a sua funcionalização. O processo de

funcionalização consiste em formar uma densidade superficial de cargas elétricas negativas em todas as NPMs, fazendo com que se forme na superfície da nanopartícula uma cobertura e assim as NPMs ficarão estáveis. Através desse procedimento obtém-se o fluido magnético iônico [28].

A funcionalização das NPMs poderá ser feita também através da sua ligação à moléculas orgânicas (citrato, DMSA, tripolifosfato) que se coordenam ao metal na superfície da NPMs, sendo que estás moléculas apresentam carga elétrica que proporcionam repulsão eletrostática, através da qual se obtém uma estabilização coloidal, nesse caso o fluido será surfactado [28,38].

O recobrimento das NPMs consiste na adsorção em sua superfície, de moléculas orgânicas (citrato, DMSA, tripolifosfato). Através da funcionalização as NPMs apresentarão certa uniformidade de forma e dimensão. Outro fator importante é que através da funcionalização das NPMs, serão preservadas as propriedades físicas e químicas, o que certamente reduzirá a formação de aglomerados e agregados. Tais efeitos poderiam afetar as propriedades magnéticas das NPMS [28,38].

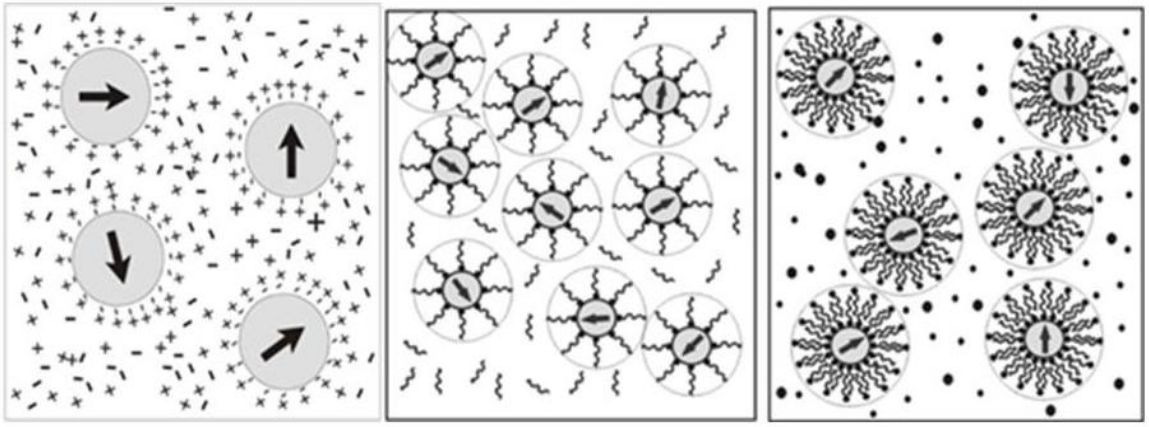

Figura 3: Representação esquemática de um (a) fluido iônico, (b) fluido surfactado e (c) iônico-surfactado.

Na figura 4 estão apresentadas as estrutura molecular das camadas de cobertura utilizadas no recobrimento das NPMs. As camadas de cobertura são importantes, pois além de evitarem a sua aglomeração e agregação é através das camadas de cobertura que as NPMs se ligarão às moléculas orgânicas [28].

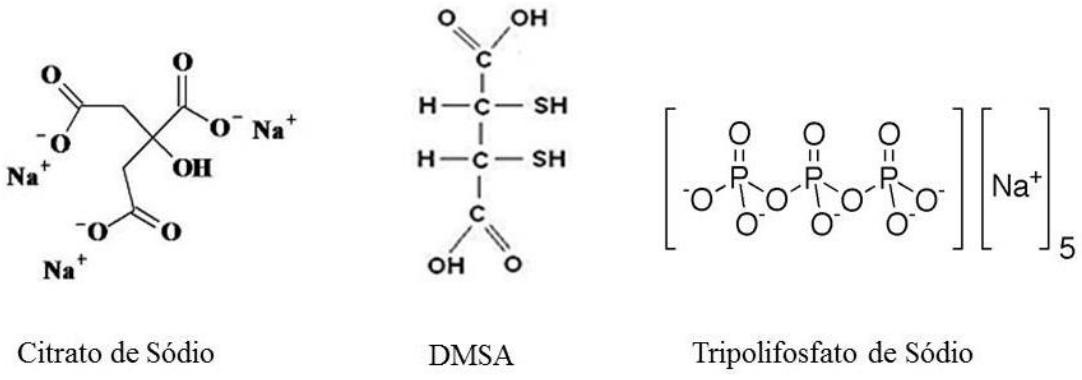

Figura 4: Estrutura molecular das camadas de cobertura utilizadas no recobrimento das NPMs.

A síntese e a caracterização das NPMs utilizadas neste trabalho de pesquisa foram feitas no Laboratório de Síntese do Instituto de Física - UFG. O procedimento de síntese foi executado pelo aluno de doutorado Nicolas Zufelato (IF/UFG), sob a orientação do Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis (IF/UFG), o qual nos forneceu informações referentes à caracterização de DRX, MET, VSM, Potencial Zeta, informando também as concentrações dos fluidos e os diâmetros médios das nanoestruturas.

3.2. Métodos

3.2.1. Modelo Fotofísico

Os processos a serem investigados nesta dissertação de mestrado estão associados à fotofísica das moléculas orgânicas e serão analisados em termos de um diagrama de níveis de energia conhecido como diagrama de Perrin-Jablonski. Nesse diagrama são apresentados os processos de absorção e relaxação de uma molécula através da representação de seus níveis eletrônicos.

Na figura 5 são apresentados os estados de energia S_0, S_1, S_2 e T_1. Estes são os níveis de energia eletrônica de uma molécula orgânica. As linhas horizontais representam os níveis vibracionais de cada estado. Os estados S representam os estados singletos enquanto os estados T os estados tripletos. A nomenclatura associa-se aos estados de spin eletrônico total da molécula, nos estados singletos os spins estão emparelhados (antiparalelos) e nos estados tripletos desemparelhados (paralelos) [39].

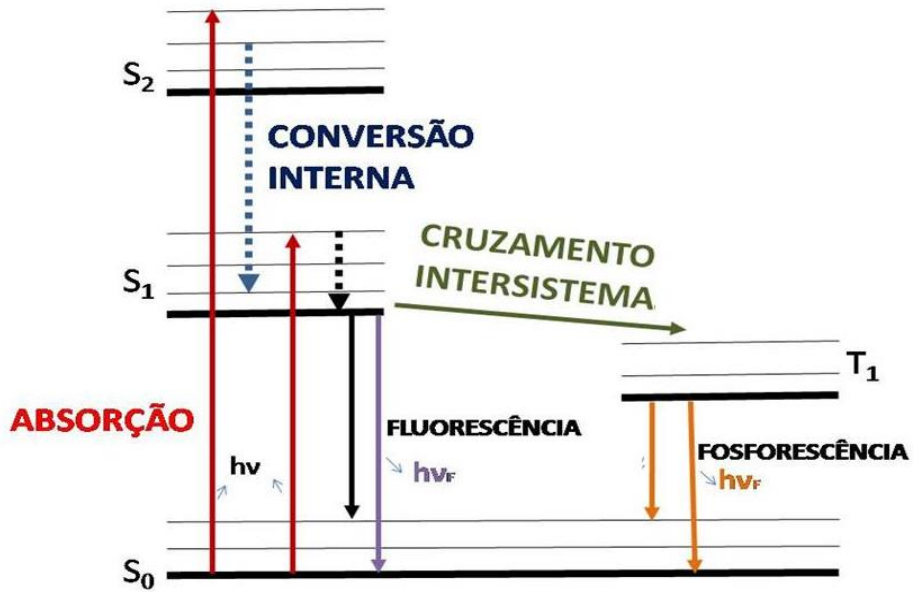

Figura 5: Diagrama de níveis de energia ilustrando os estados energéticos de uma molécula e as transições eletrônicas entre elas.

No equilíbrio termodinâmico, a molécula se encontra em seu estado fundamental (S_0). Ao absorver um fóton de energia adequada, ela pode sofrer uma transição eletrônica para um dos estados excitados (S_1 ou S_2). Considerando que ocorra a transição para o estado singlete excitado S_2 ($S_0 \rightarrow S_2$). Após a absorção do fóton, terá início uma série de processos de relaxação vibracionais que ocorrerão até que se estabilize no nível vibracional de menor energia deste estado. Neste momento ocorre a relaxação entre níveis de energia do estado S_2 para o estado S_1. O processo não radioativo entre bandas é denominado de conversão interna. Uma vez no estado S_1, novamente ocorrerá relaxação vibracional dentro da banda até que se estabilize no nível vibracional de menor energia do estado S_1. A partir de então, a molécula tem três caminhos possíveis a seguir:

1º– realiza a transição eletrônica do estado singlete excitado S_1 para o estado singlete fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$) através da fluorescência, emitindo fóton;

2º – transição eletrônica ($S_1 \rightarrow S_0$) através do processo de conversão interna, sem emissão de fóton;

3º – transição eletrônica entre o estado singlete excitado S_1 e o estado triplete excitado T_1 ($S_1 \rightarrow T_1$). Este processo $S_1 \rightarrow T_1$ chama-se cruzamento intersistema e ao ser realizado a molécula inverterá um se seus spins eletrônicos.

No estado T_1, a molécula tende a voltar para o estado S_0 através do processo de conversão interna ou pelo processo de fosforescência, com emissão de fóton. O processo de retorno do estado triplete T_1 para o estado singlete S_0 acontece de forma mais lenta, pois os spins eletrônicos se encontram antiparalelos devido à inversão no processo de transição $S_1 \rightarrow T_1$.

3.2.2. Rendimento Quântico de Fluorescência

O rendimento quântico de fluorescência é a razão entre o número total de fótons emitidos pelo total de fótons absorvidos. Considerando todos os processos de relaxação, define-se que o rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) de um composto consistirá na razão entre a constante da taxa de fluorescência e o somatório de todos os processos de relaxação do estado excitado singlete conforme indicado na equação 1:

$$\phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{ci} + k_{isc} + k_q} \quad (1)$$

onde as constantes de taxa (k_i) são: a constante de fluorescência (k_f), de convenção interna (k_{ci}), de cruzamento intersistema (k_{isc}) e de supressão (k_q) [27,35].

O rendimento quântico de fluorescência é um parâmetro importante pois determina a eficiência fluorescente de uma molécula. Seu valor pode ser obtido através da relação entre a intensidade de absorção e a área de sua curva da emissão comparando com um composto padrão [24], conforme apresentado na equação 2:

$$\phi_f = \phi_f(padrão) \times \frac{(I) \times A_{pd}}{(A) \times I_{pd}} \quad (2)$$

onde I e I_{pd} são as áreas sob as curvas de emissão de fluorescência das amostras e do padrão, A e A_{pd} são as absorbâncias da amostra e do padrão no comprimento de onda de excitação. Neste trabalho empregamos como padrão as porfirinas TMPP e a ZnTMPP que são bem conhecidas na literatura e a [41,42].

3.2.2. Mecanismo de Supressão de Fluorescência

A intensidade de fluorescência de uma molécula pode ser reduzida por uma série de mecanismos fotofísicos. Os principais processos que suprimem a intensidade de fluorescência de uma molécula fluorescente são: reações no estado excitado, formação de complexo no estado fundamental, transferência de elétron, transferência de energia, rearranjo molecular e acoplamento spin orbita [39,40].

A supressão da fluorescência de uma molécula ocorre por diferentes mecanismos de relaxação não radiativa do estado excitado para o estado fundamental. A supressão dinâmica é um processo que acontece quando a molécula no estado excitado sofre um decaimento não radiativo por meio do contato com a molécula supressora, e tem a sua fluorescência suprimida. Nesse mecanismo não acontecerá uma reação química entre as moléculas. Na supressão estática a molécula fluorescente e o agente supressor formarão um complexo estável não fluorescente, o qual absorve fóton, vai para o estado excitado, mas retornará para o estado fundamental sem a emissão de fóton. No mecanismo de supressão estática, a intensidade de fluorescência, dependerá da concentração do supressor, nesse mecanismo apenas as moléculas complexadas deixam de emitir fluorescência, e as moléculas não complexadas continuam a emitir fluorescência [39,40,43].

As equações a seguir descrevem a cinética de supressão de fluorescência. Na equação 3 é apresentado um fluoróforo [F] no estado fundamental que, ao absorver um fóton de energia hv, passará para o estado excitado [F^*].

$$[F] \overset{hv}{\rightarrow} [F*] \tag{3}$$

Uma vez neste estado excitado, o fluoróforo [*F**] poderá retornar para o estado fundamental através de um processo radiativo, emitindo fluorescência numa taxa k_f.

$$[F*] \overset{k_f}{\rightarrow} [F] + hv \tag{4}$$

O fluoróforo excitado [*F**] também pode retornar para o estado fundamental sem emissão de fótons, por um processo não radiativo com uma taxa k_d, que envolve os processos de conversão interna e cruzamento intersistema.

$$[F*] \overset{k_d}{\rightarrow} [F] \tag{5}$$

O fluoróforo excitado, também pode interagir com outras moléculas do meio e sofrer um processo de supressão bimolecular com uma constante de velocidade de supressão (k_q).

$$[F*] + NPM \overset{k_q}{\rightarrow} NPM^* + [F] \tag{6}$$

Uma descrição da supressão pode ser dada pela equação de Stern-Volmer que será apresentada a seguir.

Sob uma iluminação contínua (*f(t)*), a taxa de formação da população de [*F**] é igual a sua taxa de relaxação, de forma que sua população total $[F*]^T$ seja constante durante a excitação $\left(\frac{d[F^*]^T}{dt} = 0\right)$.

Na ausência de um composto supressor, podemos escrever:

$$\frac{d[F^*]^T}{dt} = f(t) - k_f[F^*]_0 \quad (7)$$

Onde $[F^*]_0$ é a população do fluoróforo no estado excitado na ausência do supressor. Por sua vez, na presença do supressor, podemos escrever:

$$\frac{d[F^*]^T}{dt} = f(t) - \big(k_f + k_d + k_q[N]\big)[F^*] \quad (8)$$

Onde $[F^*]$ é a população do fluoróforo no estado excitado na presença do supressor, $[N]$ é a concentração de supressor e k_q é a constante de supressão bimolecular. A combinação das equações (7) e (8) obtém-se a equação 9:

$$\frac{[F^*]_0}{[F^*]} = \frac{\big(k_f + k_d + k_q[N]\big)[F^*]}{k_f[F^*]_0} \quad (9)$$

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_{sv}[N] \quad (10)$$

Onde F_0 e F é a intensidade de fluorescência na ausência e na presença do supressor, respectivamente, sendo que existirá uma proporcionadade entre a emissão de fluorescência e a concentração do fluoróforo. A equação 10 é conhecida como a equação de Stern-Volmer que retrata os mecanismos de supressão da fluorescência. O valor da constate será obtido pela inclinação da reta de um gráfico (F_0 / F) em função da concentração do supressor [N] [39,40].

3.2.3. Formação de Complexos no Estado Fundamental e Determinação da Constante de Ligação.

A formação de complexos entre porfirinas e NPMs pode ocorrer a razões estequiométricas, envolvendo uma molécula de porfirina e *n* moléculas de NPMs. Essas considerações levam em conta a determinação das constantes de ligação desse sistema e os sítios de ligação [39,43].

Supondo que o processo de formação de complexos porfirina-NPMs obedece à relação:

$$P + nN \rightarrow PN_n \tag{11}$$

onde uma NPM (*N*) interage com *n* moléculas de porfirinas (*P*), formando o complexo PN_n . Desta forma, pode-se definir a constante de ligação no equilíbrio, k_b como:

$$k_b = \frac{[PN_n]}{[P][N]_n} \tag{12}$$

onde $[P]$ é a concentração da porfirina livre, $[N]$ é a concentração da NPM livre e $[PN_n]$ é a concentração de moléculas do complexo porfirina-NPM. Considerando $[PN_n] = [P_0] - [P]$, onde $[P_0]$ é a concentração total de porfirina e $[P]$ é a concentração de porfirina na presença da nanopartícula, a expressão (12) pode ser modificada para a forma:

$$k_b = \frac{[P_0] - [P]}{[P][N]_n} \tag{13}$$

A intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de porfirinas, então utiliza-se a relação $\frac{[P_0]}{[P]} = \frac{F_0}{F}$ na equação 13 teremos, e obtém-se a equação 14.

$$log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = log k_b + n\ log[N] \tag{14}$$

Na equação 14 o logaritmo da razão entre a redução da intensidade fluorescência (diferença entre fluorescência inicial e a fluorescência observada) e a intensidade de fluorescência observada é equivalente ao logaritmo da constante de ligação (termo independente) adicionado ao produto entre o número de sítios de ligação e o logaritmo da concentração do agente supressor [44,45,46,47].

4. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

As técnicas experimentais espectroscópicas de absorção UV/Vis e emissão fluorescente permitem monitorar as propriedades fotofísicas de moléculas orgânicas como as porfirinas, devido sua grande sensibilidade às mudanças na estrutura eletrônica. Enquanto que a absorção fornece informações sobre o primeiro passo dos processos fotofísicos, a espectroscopia de fluorescência permite avaliar os processos de relaxação e transferência de energia das porfirinas.

Estas são técnicas valiosas para o estudo da interação entre as moléculas orgânicas e outras estruturas como nanopartículas magnéticas biocompativeis e que foram empregadas nesta dissertação.

As técnicas de análise espectroscópica baseiam-se na obtenção de espectros que representam grandezas como (transmitância ou absorbância e emissão) em função do comprimento de onda da radiação. Tal espectro se deve a transições entre estados de energia e pode fornecer informações quando uma molécula absorve, emite ou espalha radiação eletromagnética. Com o uso destas técnicas experimentais, é possível obter parâmetros experimentais importantes como por exemplo: anisotropia de fluorescência, tempo de vida de fluorescência, rendimento quântico de estado tripleto, constante de supressão, constante de ligação e o número de sítios de ligação [39-48].

Nos experimentos realizados neste trabalho, foram feitas as correções do efeito de filtro interno. Este efeito refere-se à absorção de luz no comprimento de onda de excitação ou emissão pelos compostos presentes na solução. Taís correções teve o objetivo de evitar o efeito causado pela reabsorção da luz. Assim assume-se que a emissão da fluorescência vem do centro da cubeta.

4.1. Espectrofotômetro

Os espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados de absorbância de uma molécula em função do comprimento de onda. As moléculas ao absorverem energia, passarão por uma transição eletrônica do estado fundamental para estado excitado. Este registro é chamado de espectro de absorbância. A característica mais importante dos espectrofotômetros é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer-Lambert.

Quando a região espectral usada é a ultravioleta/visível, são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. A figura 6 apresenta um esquema sobre os componentes principais dos espectrofotômetros, que em geral, contêm cinco componentes principais: fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as amostras, detectores e indicadores de sinal.

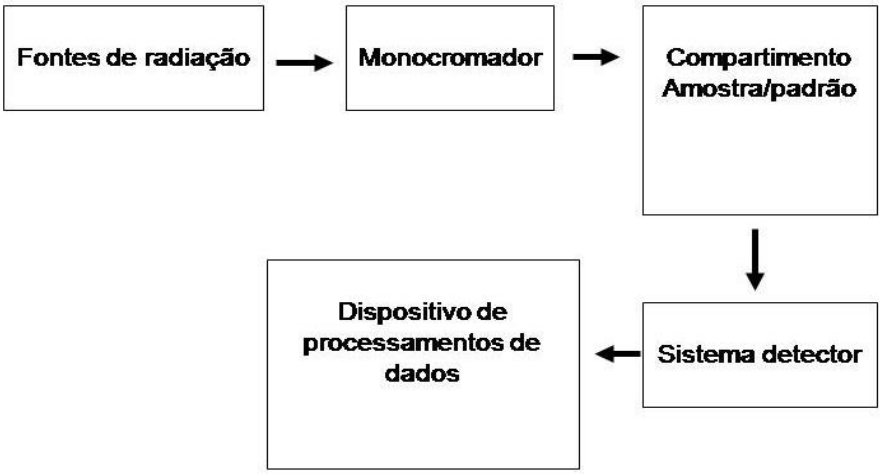

Figura 6: Esquema dos componentes principais de um espectrofotômetro.

Os efeitos associados à intensidade de radiação estão relacionados entre si por uma expressão linear descrita pela equação 15:

$$I_o = I_r + I_e + I_a + I_t \quad (15)$$

Onde: I_o representa a Intensidade do feixe de luz incidente; I_r a Intensidade do feixe refletido, resultado das diferenças do índice de refração entre o absorvedor e o ambiente, I_e é a intensidade do feixe espalhado, I_a a intensidade do feixe absorvido e I_t é a intensidade do feixe transmitido. Assim ao fazer a medida inicial só com o solvente, obtém-se parâmetros e através de ajustes no equipamento, considera-se I_r e I_e como zero, desse modo obtém-se a equação 16:

$$I_o = I_a + I_t \quad (16)$$

A intensidade de luz (monocromática) transmitida por um corpo homogêneo é proporcional à intensidade de luz incidente, isto é:

$$I_t = k\, I_o \quad (17)$$

A intensidade de luz (monocromática) transmitida decresce exponencialmente com o aumento da espessura da camada do corpo homogêneo. A equação 18 relaciona a intensidade de luz que incide na amostra e a intensidade de luz que é transmitida pela amostra. Essa relação é dada pela lei de Beer-Lambert [39,40]:

$$I_t = I_0 e^{-\alpha l} \quad (18)$$

onde α é o coeficiente de absorção da substância e *l* é o caminho óptico da cubeta.

A relação log I_0/I_t chama-se absorbância (A), e a relação I_t/I_o é a transmitância (T). Esta grandeza física indica a eficiência da absorção para um comprimento de onda A(**λ)** e ela pode ser expressa pelo logaritmo inverso da transmitância, equação 19:

$$\log\left(\frac{I_t}{I_0}\right) = -logT = A \tag{19}$$

Então a lei de Beer-Lambert é expressa pela equação 20, onde **ε** representa o coeficiente de absorção molar ($M^{-1}cm^{-1}$), o l e caminho ótico (cm) e c concentração da amostra (M). Na figura 7 é apresentada uma cubeta e o processo de absorção de luz por uma amostra, onde I_0 representa a luz incidente e I_t a luz transmitida.

Por meio da equação 20 obtém-se uma relação linear entre a absorbância e a concentração, desse modo é possível determinar a concentração de uma espécie em solução através dos resultados da absorbância.

$$A = \varepsilon \, l \, c \tag{20}$$

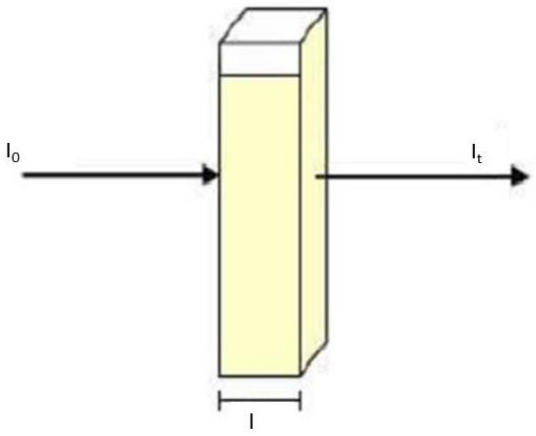

Figura 7: Absorção de luz por uma amostra.

Na figura 8 é apresentado um esquema dos principais componentes do espectrofotômetro e na sequência serão descritos as funções de cada componente.

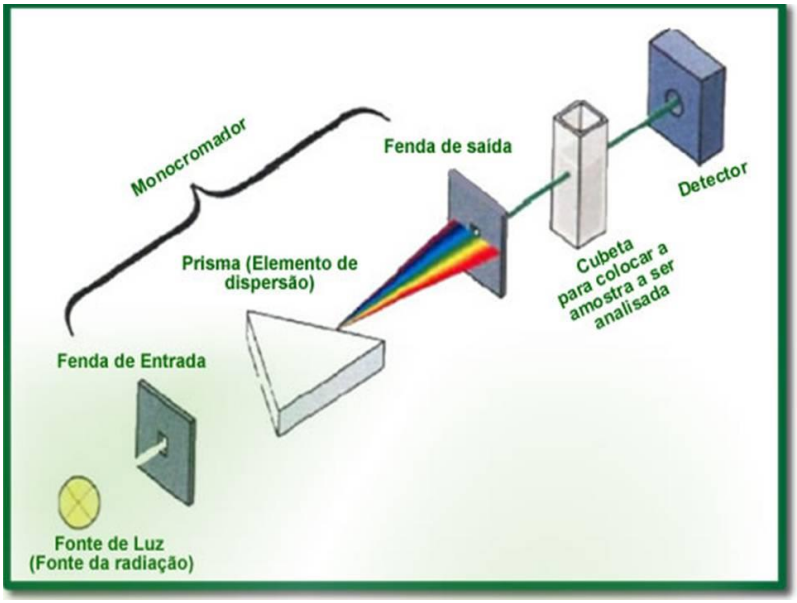

Figura 8: Imagem do espectrofotômetro (www.chemkeys.com.br).

- **Fonte de irradiação:** são lâmpadas cuja potência não varie bruscamente em uma faixa considerável de comprimento de onda. As mais utilizadas são as lâmpadas de deutério (tempo de vida: 1.000 h) para excitação na região do ultravioleta ($\lambda < 350$ nm) e de tungstênio ou tungstênio-halogênio ($\lambda > 350$ nm); (tempo de vida 10.000 h) para excitação na região do visível e infravermelho próximo.
- **Monocromador:** tem a função de dispersar a luz e selecionar uma faixa estreita de comprimento de onda (λ) para passar pela amostra ou pelo detector. Seu princípio de execução se dá através da difração da luz. Suas características de desempenho se baseiam em: pureza espectral, dispersão, resolução e poder de coleta.
- **Recipientes para amostra:** porta amostra é uma peça onde a cubeta com a amostra a ser estudada é colocada.
- **Dispositivos de leitura:** é o dispositivo que irá fornecer a impressão dos sinais elétricos em uma linguagem de leitura, será um computador com o software específico.

A etapa referente ao processo de medida de absorbância de uma amostra ocorrerá da seguinte forma. A fonte emitirá um feixe de luz no qual este feixe passara por uma fenda, e na sequência será feita a seleção de comprimento de onda de excitação e, em seguida o feixe de luz é direcionado para a cubeta, que contém a amostra, a luz transmitida pela amostra será coletada pelo detector, que enviará o resultado da medida para o dispositivo de saída do instrumento, no caso o computador, que apresentará o espectro obtido através da medida [39,40].

4.2. Espectrofluorímetro

O espectrofluorímetro é um instrumento que permitirá registrar os sinais da emissão e da excitação fluorescente, o tempo de vida de fluorescência e a anisotropia de fluorescência da amostra [39,40]. Existem duas classes de Espectrofluorímetro: o espectrofluorímetro estacionário e o espectrofluorímetro resolvido no tempo.

4.2.1. Medida de Fluorescência Estacionária

As medidas de excitação, emissão de fluorescência e anisotropia foram feitas no espectrofluorímetro estacionário.

Na figura 9 é apresentado um esquema de um espectrofluorímetro estacionário. Este em geral, é composto por dois monocromadores, um de excitação e um de emissão, a fonte de luz de excitação é uma lâmpada de xenônio e um sistema de detecção (que normalmente é um tubo fotomultiplicador). O monocromador é composto por um arranjo óptico, possuindo uma fonte de luz policromática, a qual emitirá um feixe de luz que incidira em uma grade de difração decompondo em diferentes comprimentos de onda. Os comprimentos de onda para a excitação da amostra são selecionados pelo monocromador de excitação, e a radiação emitida é analisada pelo monocromador de emissão, sendo que a intensidade da radiação emitida é determinada pelo tubo fotomultiplicador [39,40].

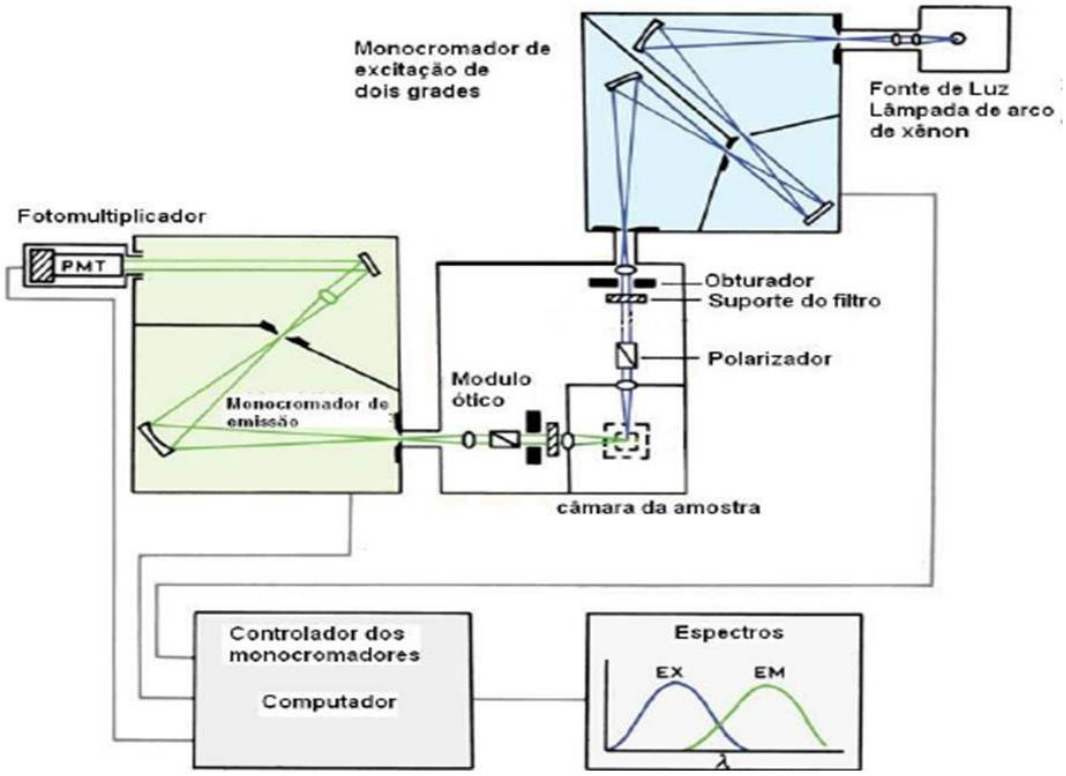

Figura 9: Esquema de funcionamento de um espectrofluorímetro estacionário [39].

A lâmpada de xenônio emite praticamente em toda a região visível e ultravioleta (250 nm < λ < 800 nm). No espectrofluorímetro a radiação emitida pela amostra é focalizada na entrada do monocromador de emissão sob um ângulo de 90° em relação à radiação incidente. Esta geometria é diferente daquela de um espectrofotômetro de absorção no qual a luz que emerge da amostra vai para o detector tendo a mesma direção da luz incidente. A fluorescência emitida será coletada por um monocromador posicionado sob um ângulo de 90° em relação ao feixe de luz de excitação, essa geometria tem o objetivo de eliminar qualquer tipo de luz espalhada durante a medida de emissão de fluorescência [39,40].

4.2.2. Medida de Fluorescência Resolvida no Tempo

Neste trabalho foram medidos os tempos de vida de fluorescência utilizando um espectrofluorímetro de fluorescência resolvida no tempo. Esta técnica é baseada no método de contagem de fóton único. A figura 10 mostra um diagrama de um espectrofluorímetro de resolução temporal. O principio desta técnica está no fato de que a probabilidade de detectar um fóton único no tempo t depois de um pulso de excitação é proporcional à intensidade de fluorescência naquele tempo [39,40].

Após a sincronização e gravação de fótons únicos, e depois de um grande número de pulsos de excitação, a curva de decaimento da intensidade de fluorescência é reconstruída. Neste procedimento a fonte de excitação utilizada foi o laser [39,40].

Um pulso elétrico associado com o pulso ótico é gerado e encaminhado através de um discriminador, para a entrada INICIAR do conversor tempo-amplitude. A amostra é excitada pelo pulso ótico e emite fluorescência. Os sistemas óticos são ajustados de modo que o fotomultiplicador detecte não mais de um fóton por cada pulso de excitação. O pulso elétrico correspondente é encaminhado, através de um discriminador, para a entrada de DETER do conversor tempo-amplitude. Este último produz um pulso de saída cuja amplitude é diretamente proporcional ao intervalo de tempo entre os pulsos INICIAR e DETER. O intervalo de tempo é convertido a um valor digital por meio de um conversor analógico-digital. O analisador multicanal aumenta de um o conteúdo do canal de memória correspondendo ao valor digital do pulso detectado. Depois de um grande número de eventos de excitação-detecção, forma-se o histograma dos fótons detectados, que representam a curva de decaimento de

fluorescência. Obviamente, quanto maior o número de eventos melhor é a precisão da curva de decaimento.

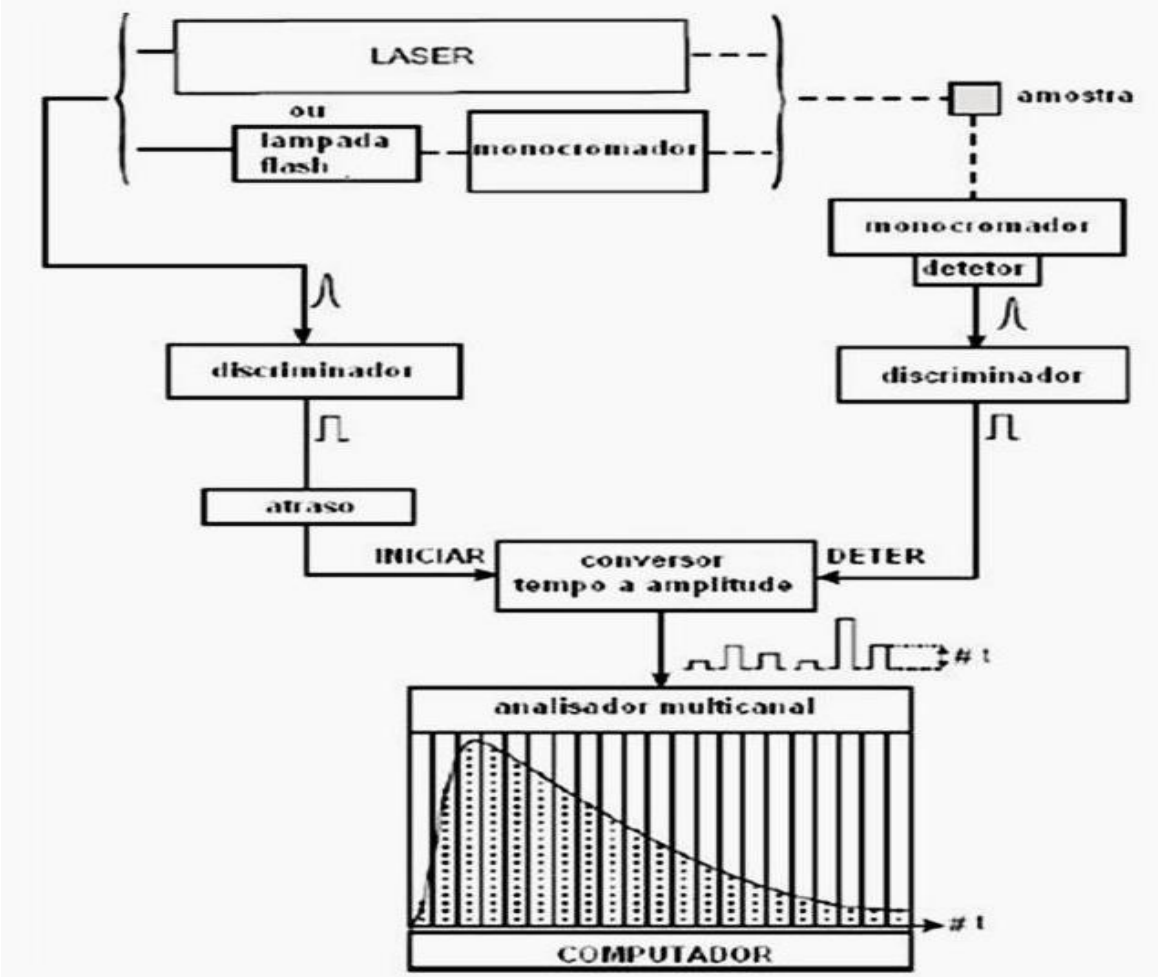

Figura 10: Diagrama esquemático espectrofluorímetro de resolução temporal [40].

A figura 11 apresenta a curva de decaimento de fluorescência, depois de um grande número de eventos excitação-detecção e a reta indica que o decaimento é monoexponencial.

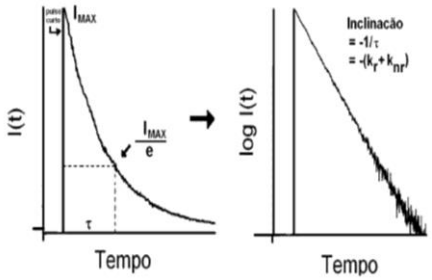

Figura 11: Descrição esquemática de uma curva de decaimento de fluorescência típica do método pulsado [40].

4.2.3. Anisotropia de Fluorescência

Uma das medidas importantes obtidas com o espectrofluorímetro estático é a anisotropia de fluorescência que consiste na medida da difusão rotacional de uma molécula a partir da diferença na correlação de polarização de fluorescência (fig.12). A extensão de polarização de emissão pode ser descrita em função da anisotropia (*r*). A origem deste fenômeno está baseada na existência de momentos de dipolos de transição da absorção e emissão, que estão alinhados ao longo de direções específicas dentro da estrutura do fluoróforo. As medições de anisotropia revelam o deslocamento médio angular do fluoróforo que ocorre entre a absorção e a subsequente emissão de um fóton. Esse deslocamento angular depende da velocidade e extensão rotacional durante o tempo de vida do estado excitado. Para fluoróforos pequenos em solução de baixa viscosidade, a difusão rotacional é mais rápida que a emissão e, consequentemente, ela é despolarizada e a anisotropia é próxima de zero. Numa solução homogênea, as moléculas fluorescentes em seu estado fundamental são orientadas aleatoriamente. Ao serem expostos a uma luz polarizada, os fluoróforos que têm seus momentos de dipolo de transição orientados numa direção perto da direção do vetor campo elétrico da radiação incidente e são preferencialmente excitados. Se a população não está orientada aleatoriamente o resultado seria uma emissão polarizada [39].

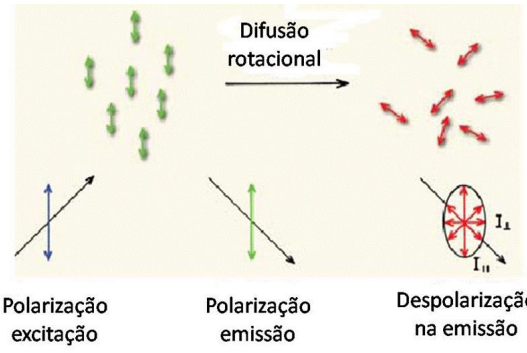

Figura 12: Efeito da polarização na excitação e difusão rotacional e polarização na emissão [39].

O momento de dipolo de transição para absorção e para emissão tem orientações fixas em cada fluoróforo e o ângulo entre estes momentos determina a anisotropia máxima medida [40].

A medida de anisotropia de fluorescência está ilustrada na figura 13. Nessa medida a amostra poderá ser excitada com luz polarizada verticalmente e o vetor campo elétrico de excitação está orientado paralelo ao eixo z. A intensidade da emissão é medida com o auxilio de um polarizador. Quando este está orientado paralelamente ($\parallel$) à direção da excitação, a intensidade é $I_{\parallel}$. Por outro lado, quando o polarizador está orientado perpendicularmente ($\perp$) à excitação, a intensidade medida é chamada de $I_{\perp}$. Nesse caso a anisotropia de fluorescência pode ser definida através da equação 21.

$$r = \left(\frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} \right) \tag{21}$$

A excitação das moléculas depende do ângulo θ entre o plano da polarização da luz incidente e o momento de dipolo da transição. A probabilidade de ocorrer a absorção é proporcional ao $\cos^2 \theta$. Para a luz completamente polarizada $I_{\perp} = 0$ e $r = 1$.

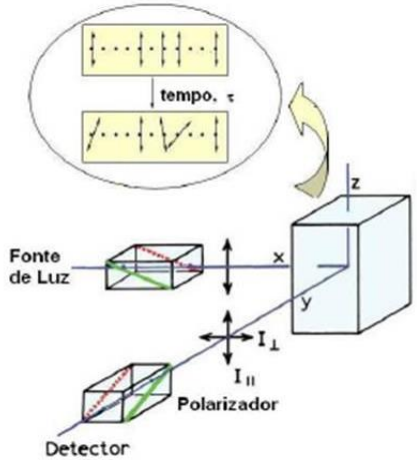

Figura 13: Diagrama esquemático para medida de anisotropia de fluorescência [39].

4.3. Difração de Raio X (DRX)

A difração de raio X (DRX) é uma técnica padrão para caracterizar estrutura cristalina dos materiais. Nos sistemas cristalinos, que possuem estrutura organizada, os feixes de raios X que são espalhados, sofrem interferências muito características, formando um padrão de interferências construtivas e destrutivas. Esse padrão é capaz de informar as várias características qualitativas e quantitativas do sistema. O padrão característico ocorre ao mudar o ângulo de incidência dos feixes de raios X sob a amostra. Com esse procedimento os feixes de raios X são espalhados por todos os planos cristalinos da amostra, e com isso surge um padrão de difração da amostra. A DRX é utilizada para identificar a estrutura cristalina do material e também quantificar o tamanho médio das partículas. A quantificação das NPMs realizada através da DRX e realizada na amostra em forma de pó [28].

4.4. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

O Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) é utilizado para indicar a distribuição de tamanho de pequenas partículas, que são da ordem de micro a nanômetros. A amostra estando em suspensão, é possível com essa técnica determinar o diâmetro hidrodinâmico da partícula, e avalia-se também o efeito da camada de cobertura adsorvida na superfície da partícula [28].

4.5. Potencial ZETA

A medida do Potencial Zeta é utilizada para medir o potencial elétrico médio na superfície da nanopartícula fornecendo uma indicação a respeito da estabilidade da suspensão no meio aquoso. Existem cargas elétricas nas NPMs em razão da presença de íons que interagem eletricamente com as partículas em suspensão [28,38]. A medida do potencial Zeta, foi realizada no equipamento ZetaSizer (Nano-ZS,Nano Series), sendo que essas medidas foram realizada na Central Analítica do Instituto de Química - UFG.

4.6. Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM)

A Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM-Vibrating Sample Magnetometer) é uma técnica bastante sensível, sendo útil para medir as propriedades magnéticas da amostra através da curva de histerese, essa medida é obtida através da magnetização por indução. Na obtenção do sinal de magnetização, a amostra é colocada para vibrar perpendicularmente ao campo aplicado, e este ao oscilar, produzirá uma variação do fluxo de campo magnético local, gerando uma corrente induzida alternada nas bobinas posicionadas em torno da amostra [4,28,29].

Dessa forma registra-se a intensidade do momento magnético da amostra [4,28,29]. As amostras utilizadas nesta dissertação foram medidas no equipamento VSM EV9 System do Laboratório de Magnetometria e Magnetotransporte do Instituto de Física-IF/UFG

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1. Preparação das Amostras de Porfirinas

As amostras de porfirinas TMPP e ZnTMPP foram diluídas em água Milli-Q e suas concentrações foram ajustadas espectroscopicamente. No experimento foram empregadas cubetas de quartzo com duas faces polidas e caminho ótico de 0,2 cm. As amostras foram preparadas em duas concentrações e o ajuste da concentração foi feito utilizando o coeficiente de extinção molar ε, sendo que para TMPP o ε_{518nm} = 13.944 $M^{-1}cm^{-1}$ e para a ZnTMPP o ε_{550nm} = 17.400 $M^{-1}cm^{-1}$.

As medidas de absorção UV/Vis foram realizadas no espectrofotômetro Spectrometer-UV/VIS, Modelo: Lambda 1050 WB marca: Perkin Elmer e as medidas de fluorescência no espectrofluorímetro modelo: Fluorolog-FL3-221, marca: Horiba/Jobin-Yvon Inc, no laboratório do Grupo de Física dos Materiais IF/UFG.

5.2. Preparação das Amostras de Nanopartículas

O método utilizado na síntese dos fluidos magnéticos foi o de co-precipitação em meio aquoso. Este é um método de baixo custo e que possibilita a obtenção de partículas magnéticas com índices de pureza e estequiometria [28]. No processo de síntese das NPMs é ajustado do tamanho das nanopartículas, esse ajuste dependerá de alguns fatores: modo de preparo, tempo de preparo, velocidade da agitação, pH das soluções, temperatura de reação, concentração de íons e o tipo de base utilizada (NaOH, KOH, NH_4OH).

É importante comentar que a cristalinidade das nanopartículas, o diâmetro médio e sua dispersão podem ser ajustados fazendo-se a precipitação na presença de ligantes iônicos, tais como: citrato, DMSA, tripolifosfato [28,38].

Para caracterizar os fluidos magnéticos foram utilizadas as seguintes técnicas: difratometria de raio x (DRX), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), Potencial Zeta e Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM). As NPMs foram sintetizadas em uma concentração estoque variando de 4,9 µM a 40,7 µM e posteriormente foram diluídas em água Milli-Q em concentrações menores.

5.3. Procedimento das medidas experimentais da interação do sistema

Inicialmente, tem-se a concentrações estoque do fluido magnético. Para realizar os experimentos, diluímos parte da concentração estoque em 50 vezes, essa diluição foi feita em água Milli-Q e em seguida fez-se as medidas de absorção do fluido magnético.

Para o estudo da interação fixou-se a concentração das porfirinas TMPP (33 µM) e ZnTMPP (20 µM). Na concentração de porfirina foram adicionadas sequencialmente concentrações de NPMs. Através deste procedimento monitorou-se o que ocorreu com a interação desse sistema. O monitoramento foi feito através dos espectros de absorção e emissão de fluorescência estacionária e resolvida no tempo.

6 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo serão apresentados os resultados dos experimentos realizados e suas análises, seguidos de uma posterior discussão.

6.1. Caracterização das Porfirinas

Na figura 14 estão apresentados os espectros de absorção das porfirinas TMPP e ZnTMPP. A TMPP apresenta uma intensa banda em 421 nm chamada de banda de Soret ou banda B, fig.14(a). As outras quatro bandas entre 500 e 700 nm são chamadas de bandas Q fig.14(b).

Na presença do átomo central de zinco, a banda de Soret da ZnTMPP se desloca para 427 nm, enquanto as quatro bandas Q são reduzidas a apenas duas. Esse fato ocorre em função da inserção do metal no anel central da porfirina, o que aumenta a simetria da porfirina [44].

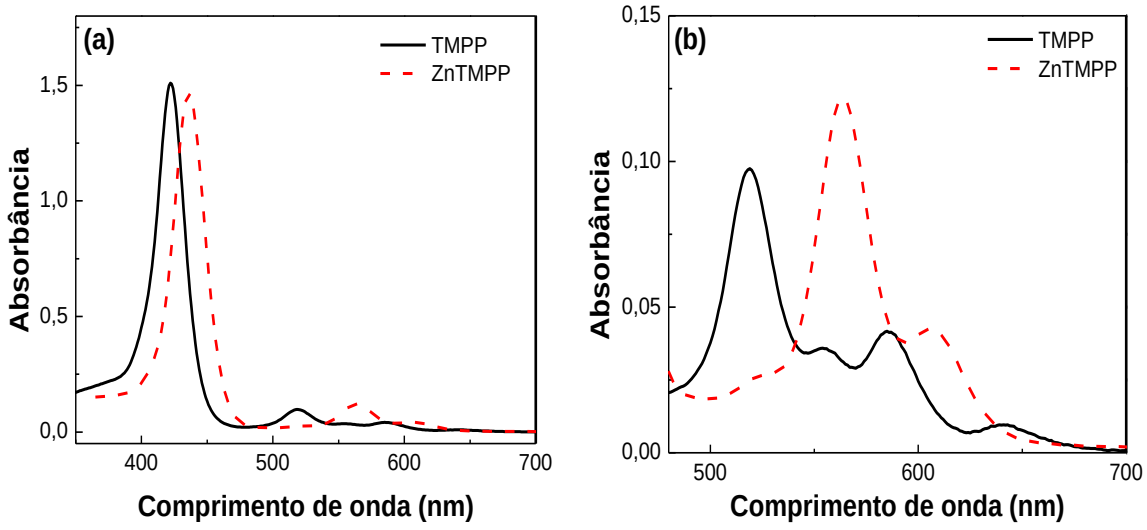

Figura 14: Espectros absorção das porfirinas TMPP e ZnTMPP: (a) na região UV/Visível de 350 a 700 nm e (b) suas bandas Q de 480 a 700 nm.

A figura 15 apresenta os espectros de emissão de fluorescência (a) e medidas de tempo de vida de fluorescência (b) das porfirinas TMPP e ZnTMPP. O pico de emissão de fluorescência da TMPP está centrado em 665 nm e da ZnTMPP em 628 nm. A presença do zinco faz o tempo de vida de fluorescência reduzir de 4,51 ns para 1,33 ns.

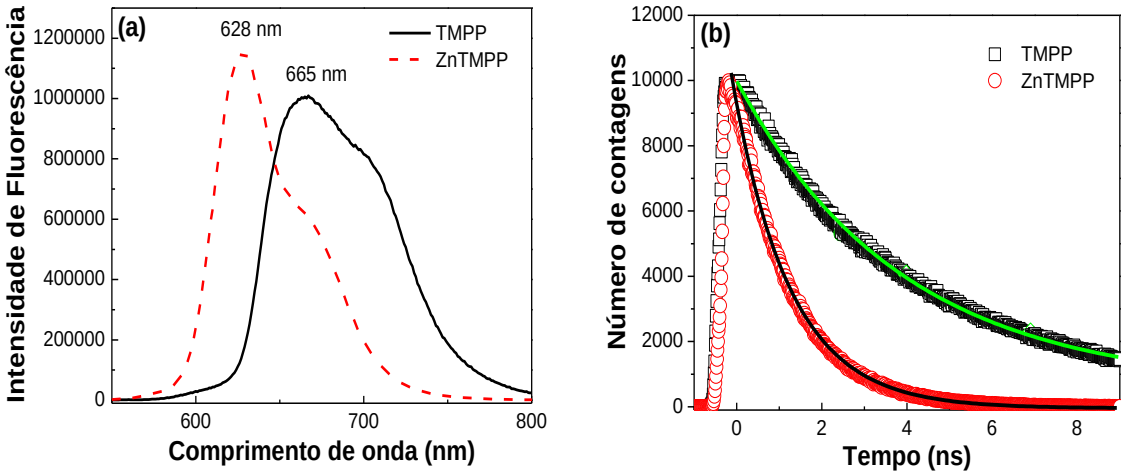

Figura 15: (a) Espectros de emissão de fluorescência, (b) Curva de decaimento de fluorescência.

6.2. - Caracterização das Nanopartículas Magnéticas

Na caracterização das amostras de NPMs, foram utilizadas as técnicas de difratometria de raio X (DRX) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e potencial Zeta [28].

A técnica de difratometria de raio X foi realizada na amostra do material magnético (forma de pó) e foi utilizada para confirmar a estrutura cristalina e para estimar o tamanho médio das NPMs. A partir do difratograma de raio x da amostra, utilizou-se os picos de difração da amostra, fazendo a estimativa do diâmetro médio D das NPMs. O diâmetro médio das NPMs foi determinado a partir dos espectros, sendo calculado à largura à meia altura da reflexão mais intensa da amostra.

Na figura 16 estão apresentados os difratogramas de raio X das amostras das NPMs.

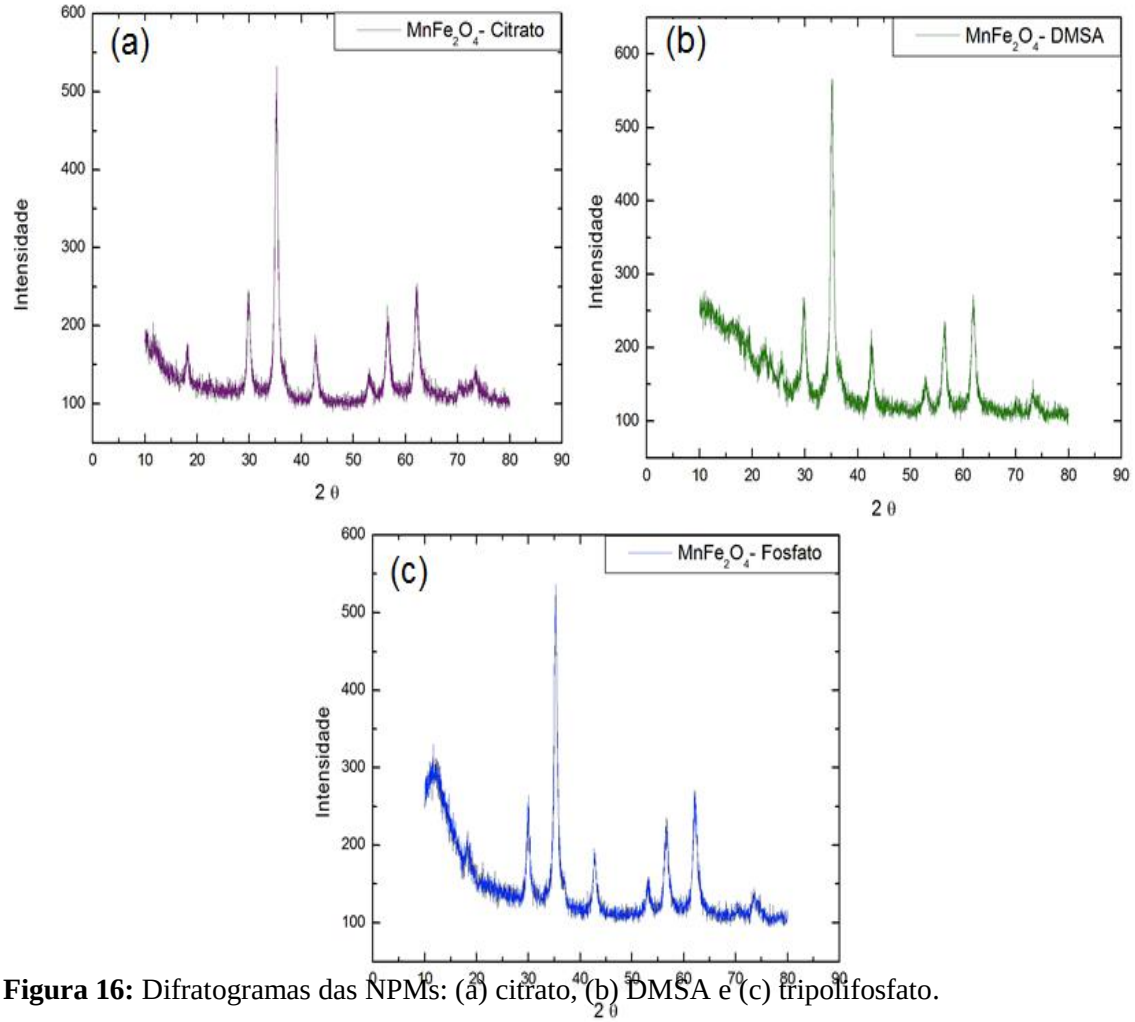

Figura 16: Difratogramas das NPMs: (a) citrato, (b) DMSA e (c) tripolifosfato.

Na figura 17 estão apresentadas as imagens das NPMs obtidas através da microscopia de transmissão eletrônica (MET) em diferentes escalas.

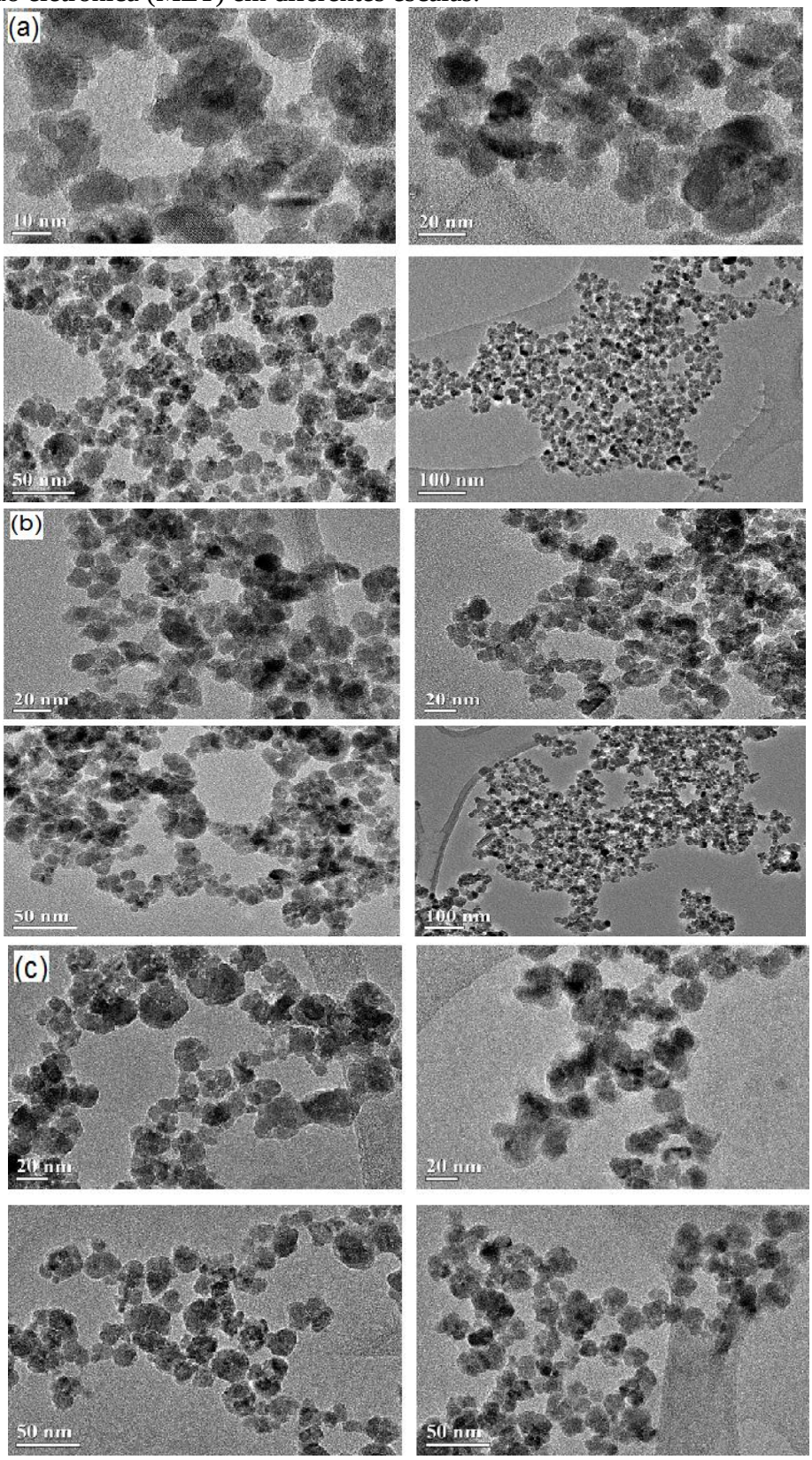

Figura 17: Imagens de MET das NPMs: (a)citrato, (b)DMSA e (c) tripolifosfato.

Na figura 18 estão apresentados os histogramas da polidespersão das nanopartículas magnéticas, obtidas através da MET. O melhor ajuste é representado pela linha continua [28]. Na tabela 1 são apresentados os valores dos diâmetros médios das NPMs.

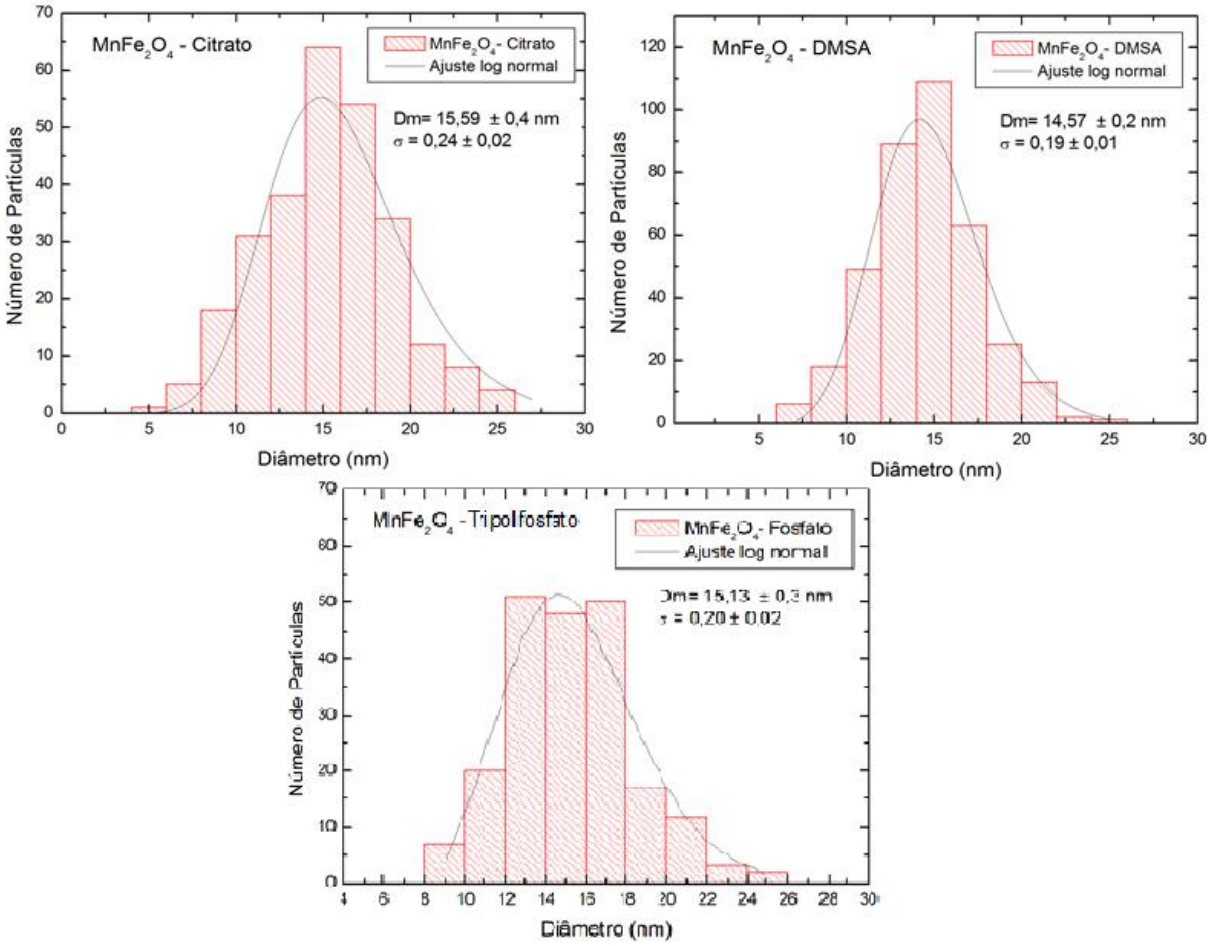

Figura 18: Histogramas da polidispersão das NPMs, obtidos por MET.

Na figura 19 estão apresentados os resultados da analise da mobilidade eletroforética das nanopartículas magnéticas, obtidas através da analise de potencial zeta. As NPMs apresentam variação de sua carga em função do pH, conforme mostra os gráficos, os valores de potencial zeta. Os resultados estão mostrados na tabela 1.

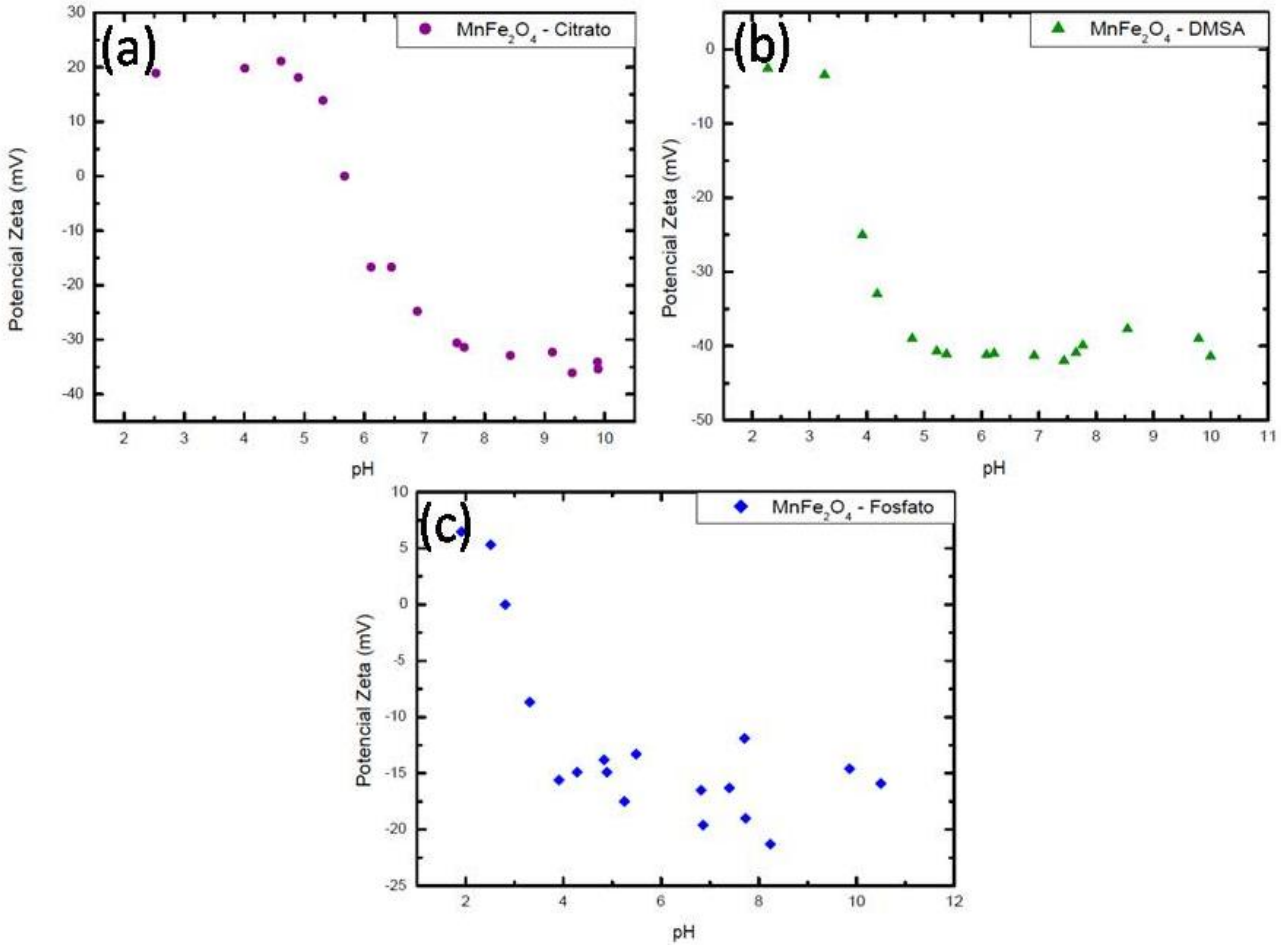

Figura 19: Gráfico de potencial zeta das NPMs.

TABELA 1: Diâmetro médio (DRX) , diâmetro médio (MET) e potencial zeta.

NPM Camada de cobertura:	**Diâmetro Médio (DRX) (nm)**	**Diâmetro Médio (MET) (nm)**	**Potencial Zeta (pH 7) (mV)**
Citrato	13,9	15,6(±0,4)	-30
DMSA	14,1	14,6(±0,2)	-40
Tripolifosfato	14,0	15,1(±0,3)	-20
Iônico	9,2	-	Sem carga

Através do gráfico de absorbância das NPMs apresentado na figura 20, percebe-se uma intensa absorção das NPMs em comprimentos de onda menores que 400 nm. Além disso, pode-se observar que não há mudança de perfil da banda de absorção ao adicionar maiores concentrações de NPMs. As diferentes camadas de cobertura das nanoestruturas magnéticas apresentaram o mesmo comportamento espectral, como mostrado nos espectros de absorbância abaixo.

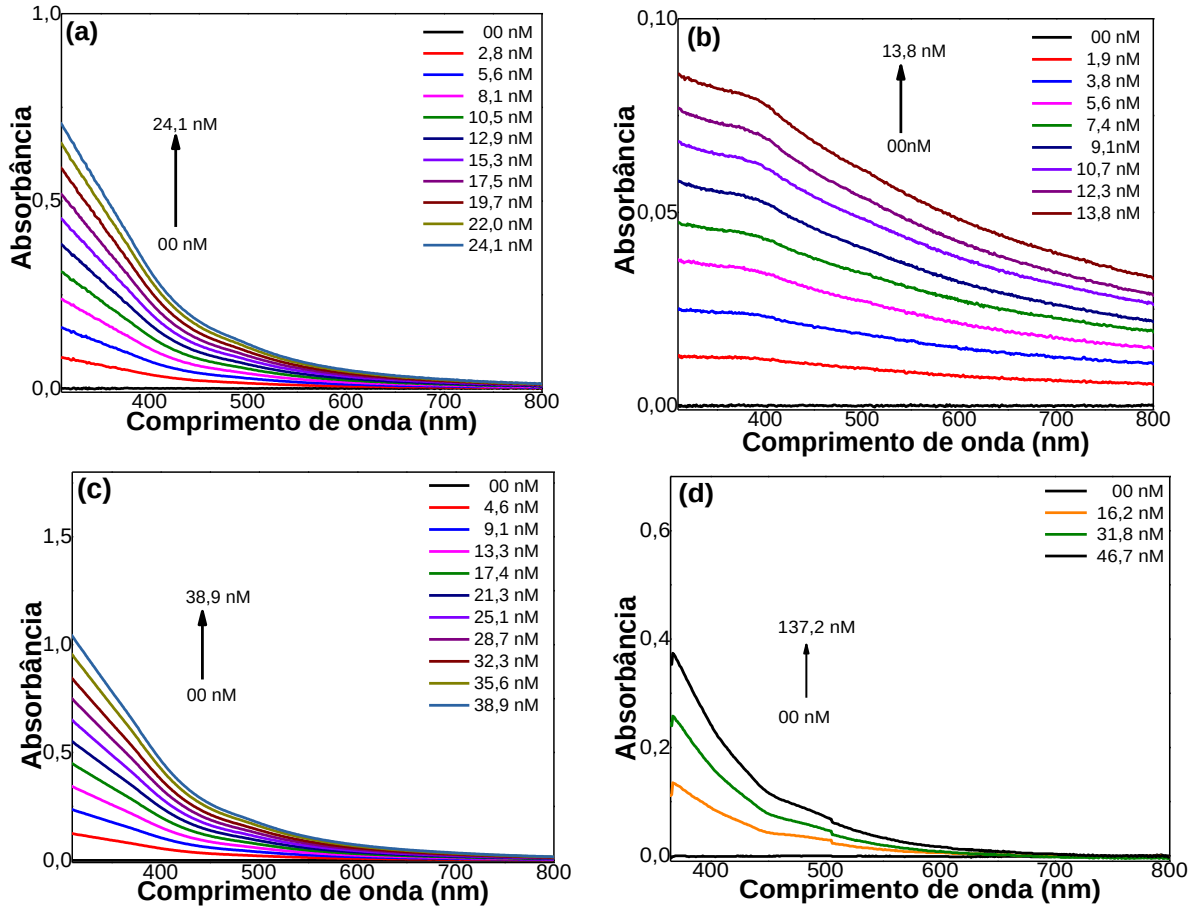

Figura 20: Espectros de absorbância das NPMs ($MnFe_2O_4$): (a) citrato, (b) DMSA, (c) tripolifosfato e (d) iônico.

6.3. Interação de Porfirinas e NPMs

Nas figuras 21 e 22 estão apresentados as alterações nos espectros de absorbância das porfirinas TMPP e ZnTMPP devido a presença de NPMs com diferentes camadas de cobertura. Através dos espectros de absorção verifica-se que ocorre aumento na absorbância das porfirinas em todas as bandas Q quando adicionou-se NPMs. Observa-se que na presença de NPMs com camada de cobertura houve redução na banda de Soret para ambas as porfirinas TMPP e ZnTMPP. Para as NPMs iônica ocorre aumento da absorbância na banda de Soret fig.21(d) e 22(d).

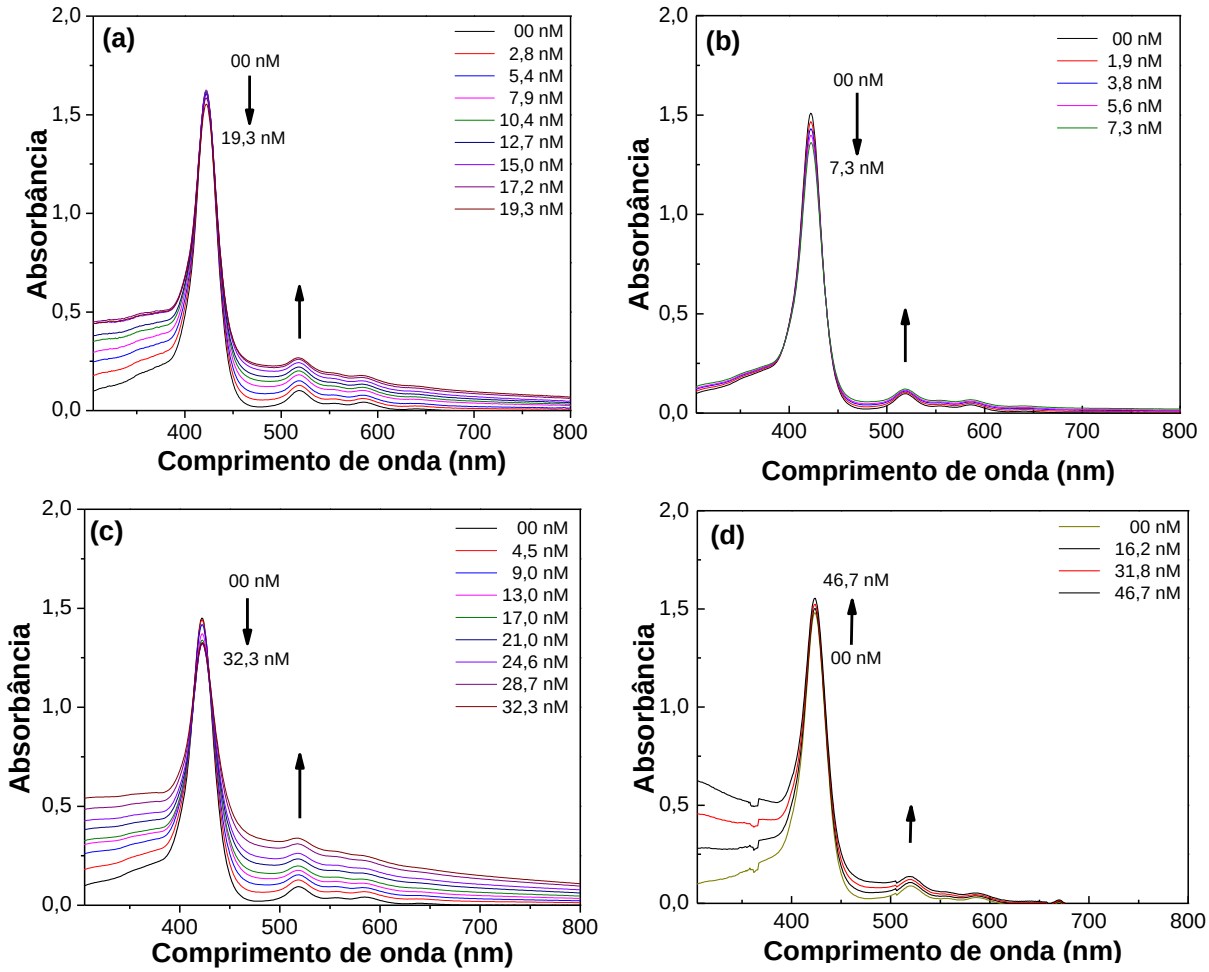

Figura 21: Espectros de absorção da porfirina TMPP na sua interação com NPMS: (a) citrato, (b) DMSA, (c) tripolifosfato e (d) iônico.

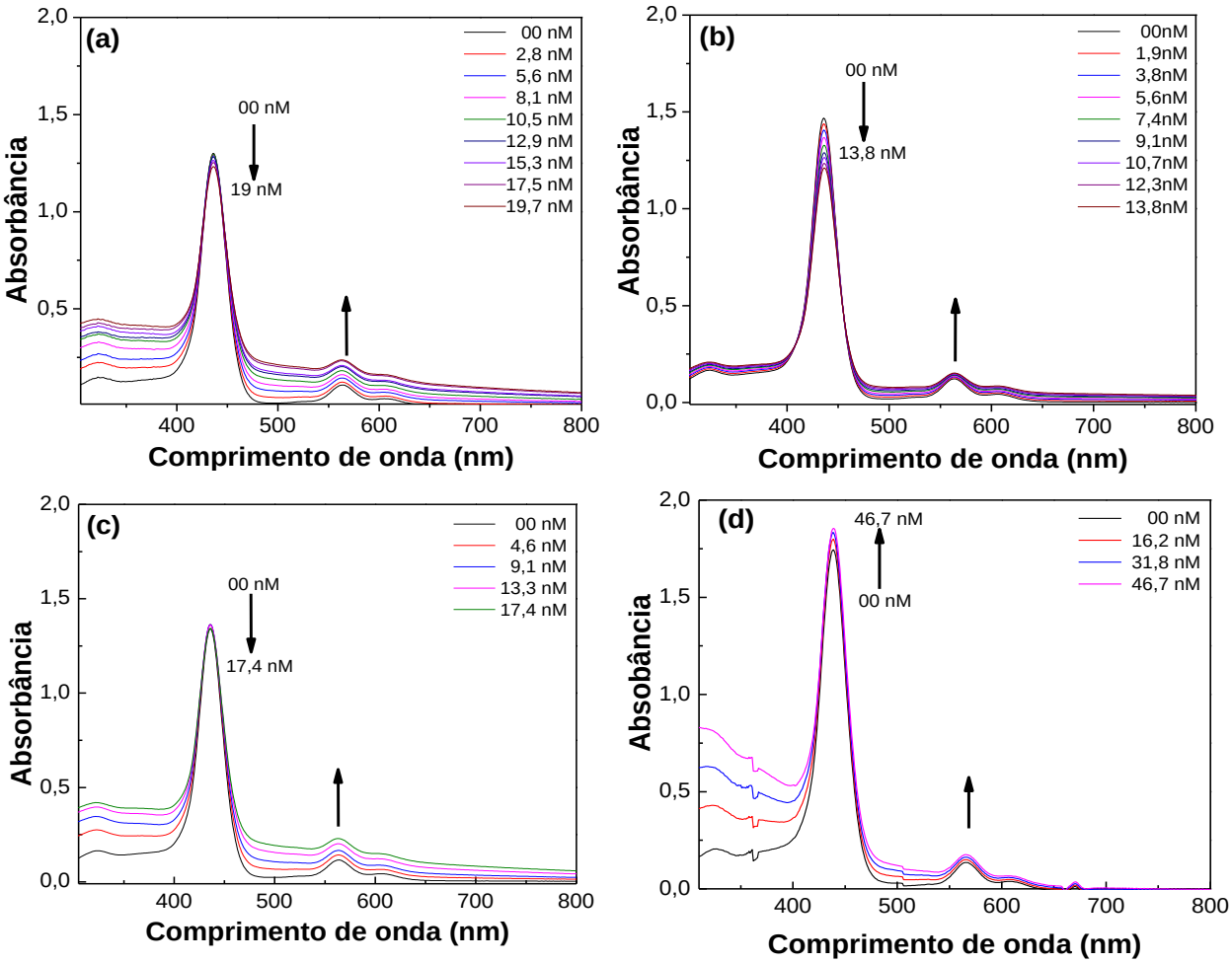

Figura 22: Espectros de absorção da porfirina ZnTMPP na sua interação com NPMs: (a) citrato, (b) DMSA, (c) tripolifosfato e (d) iônico.

Nas figuras 23 e 24 são apresentados os efeitos da adição de nanopartículas magnéticas nos espectros de emissão de fluorescência das porfirinas TMPP e ZnTMPP. Ambas porfirinas foram excitadas em 532 nm e o pico de emissão de fluorescência da TMPP foi em 665 nm (fig.23) e da ZnTMPP em 628 nm (fig.24).

Pode-se observar que com a adição de NPMs ocorre a redução na intensidade de fluorescência. Os espectros de emissão de fluorescência não apresentam alteração em seu perfil espectral e nem a formação de novas bandas. Nesse sentido pode-se dizer que a interação reduziu a fluorescência desse sistema, conforme mostrado nas figuras 23 e 24.

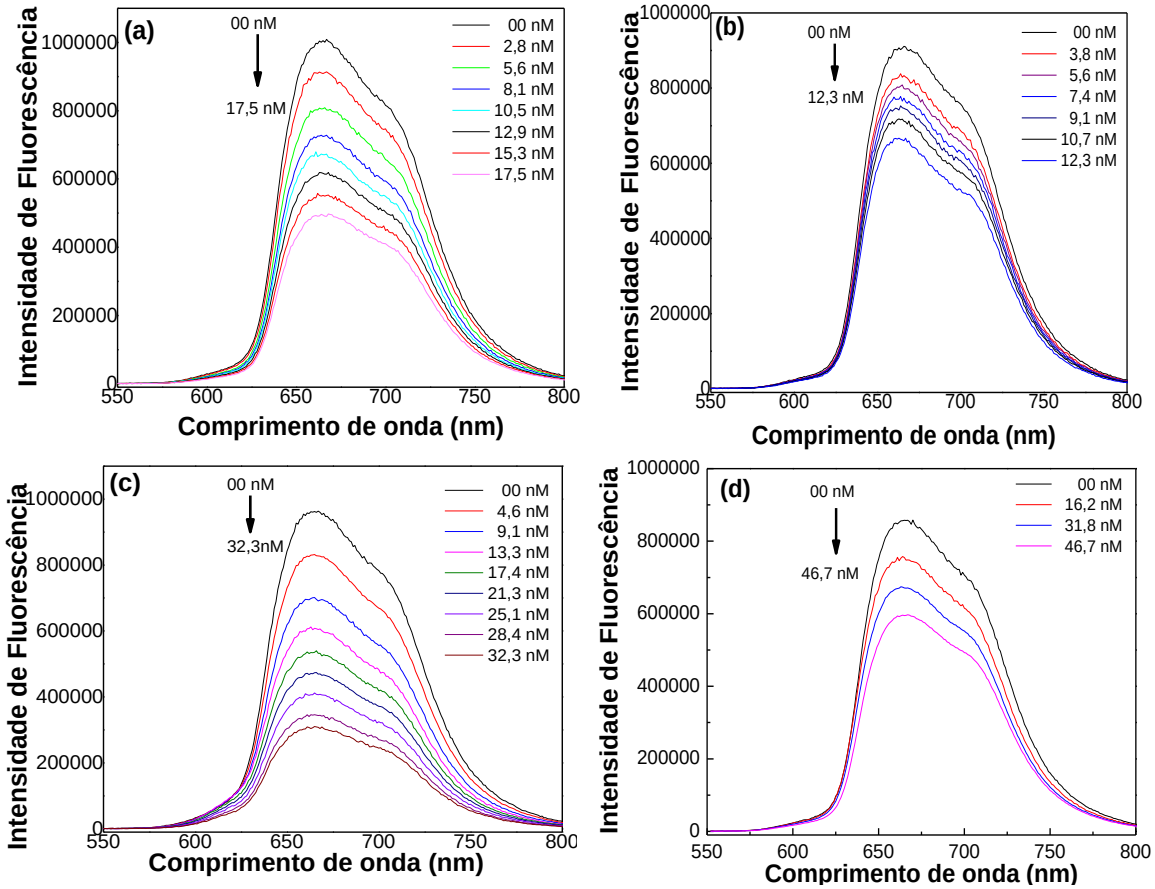

Figura 23: Espectros de emissão de fluorescência da porfirina TMPP na presença de NPMS: (a) citrato, (b) DMSA, (c) tripolifosfato e (d) iônico.

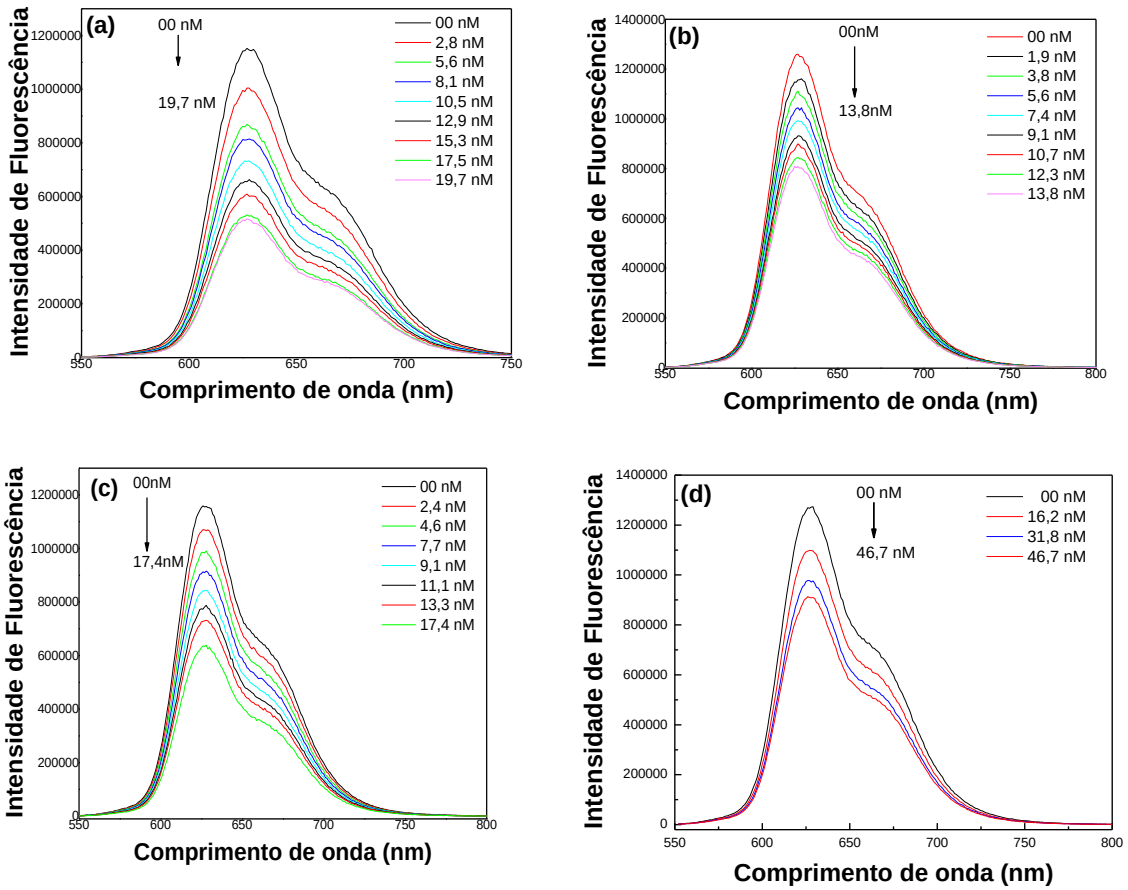

Figura 24: Espectros de emissão de fluorescência da porfirina ZnTMPP ausência e na presença de nanopartículas magnéticas: (a) citrato, (b) DMSA, (c) tripolifosfato e (d) iônico.

As curvas de decaimento da fluorescência das porfirinas TMPP e ZnTMPP na interação com NPMs estão apresentadas na figura 25 (a) e (b). Os gráficos foram obtidos através das medidas de fluorescência resolvida no tempo e utilizou-se o método de contagens de fótons únicos correlacionados temporalmente, conforme apresentada na seção 4.2.2.

Para a TMPP e ZnTMPP o comprimento de onda de excitação foi em 430 nm e a emissão de fluorescência foi analisada em 658 nm para TMPP e em 630 nm para ZnTMPP. Os tempos de vida de estado singleto apresentaram decaimento monoexponenciais para todas as condições experimentais utilizadas.

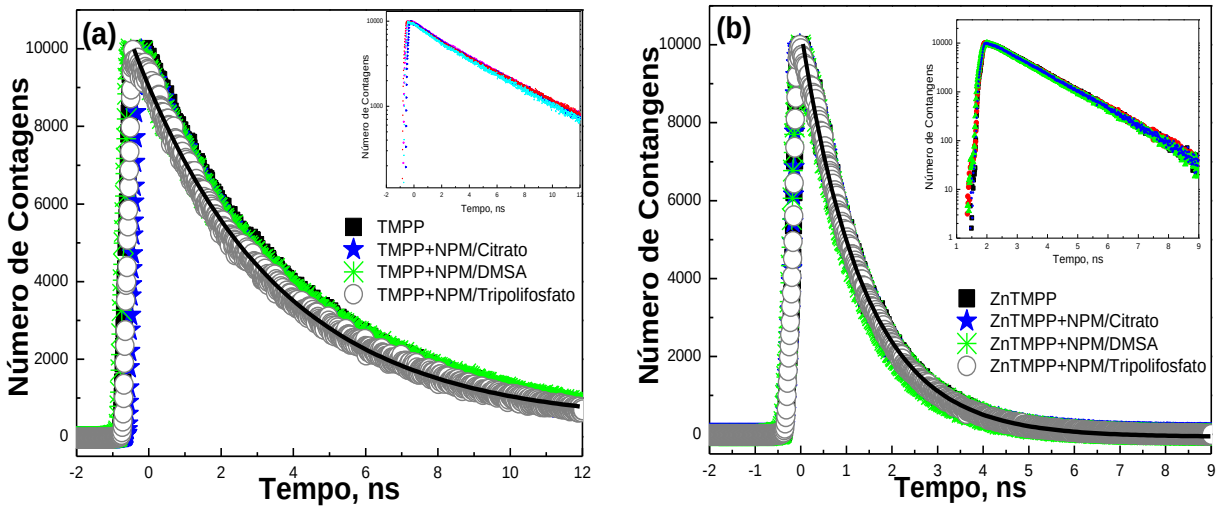

Figura 25: Curva de decaimento da fluorescência das porfirinas TMPP e ZnTMPP na ausência e presença NPMs.

Na figura 26 estão apresentados os gráficos de Stern-Volmer para as porfirinas TMPP (a) e ZnTMPP (b). Os gráficos foram obtidos através das medidas de fluorescência no estado estacionário na presença de NPMs. As concentrações das porfirinas utilizadas foram de 33 µM para TMPP e de 20 µM para ZnTMPP, sendo adicionadas concentrações de NPMs ao composto porfirinico.

Para calcular a constante de supressão, utilizou-se o rendimento quântico de fluorescência e a concentração das NPMs [46]. Fez-se ajuste linear da concentração de NPMs em função da razão do rendimento quântico de fluorescência na ausência e presença de NPMs, utilizando-se a equação 12, e com esse procedimento obtém-se o valor da inclinação da reta, que representa a constante de supressão (k_{sv}) apresentado na tabela 2.

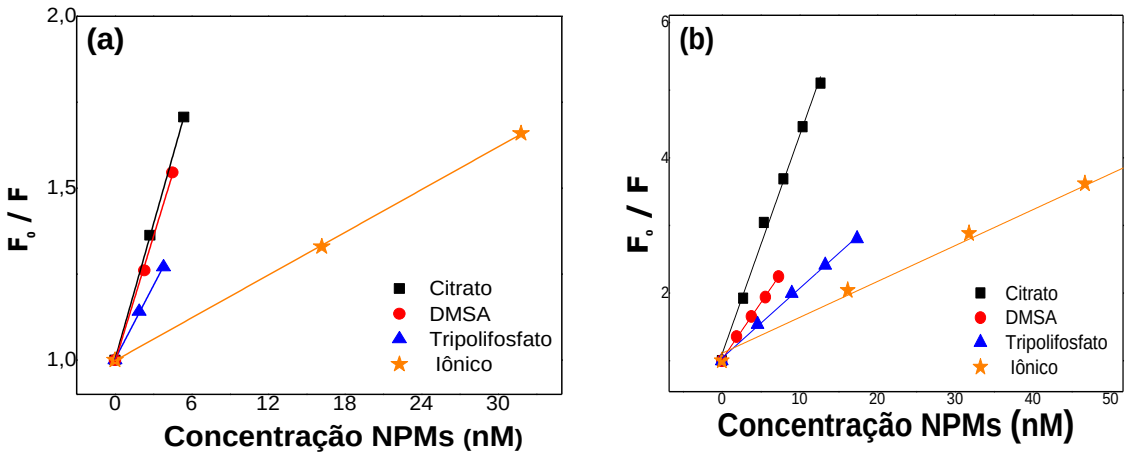

Figura 26: Gráfico de ajuste linear Stern-Volmer: (a) TMPP (b) ZnTMPP.

Partindo do pressuposto de que as NPMs tem *n* sítios de ligação independentes, os sítios de ligação e a constante de ligação pode ser obtida a partir da equação:

$$log\left[\frac{F_0 - F}{F}\right] = logk_b + nlog[NPM] \quad (22)$$

onde ϕ e ϕ_0 são os rendimentos quânticos de fluorescência na presença e ausência de NPMs respectivamente, e k_b é a constante de ligação, *n* é o número de locais de ligação. Assim, um gráfico do $log[(F_0 - F)/F]$ em função do log [NPMs] pode será usado para determinar o *n* e o k_b. Os valores de *n* e k_b , a partir da inclinação linear do gráfico, estão apresentados na tabela 2.

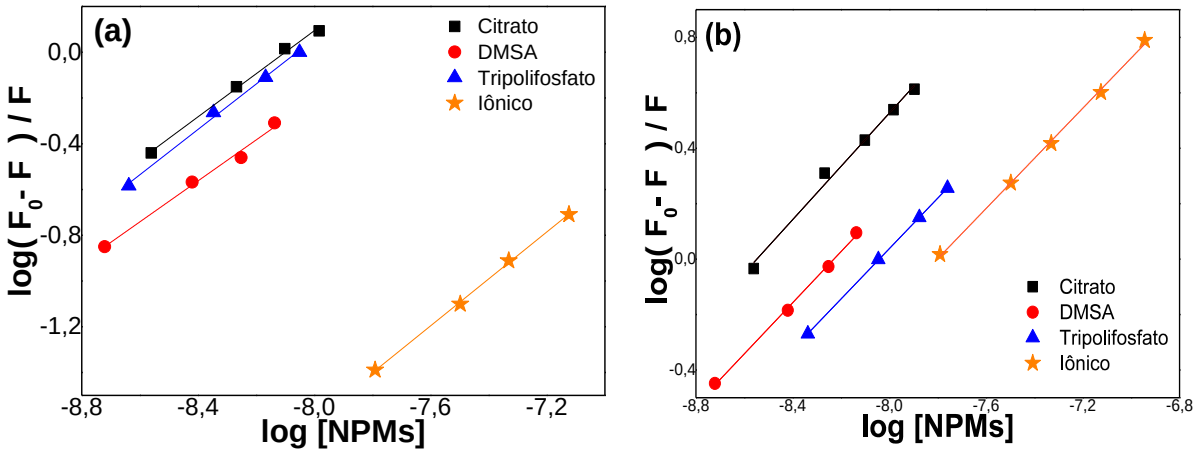

Figura 27: Gráfico da relação de $log[(F_0 - F)/F]$ versus *log [NPMs]:* **a**) TMPP, (b) ZnTMPP.

Na figura 28 é mostrado um esquema de atração eletrostática entre nanopartícula magnética e a molécula orgânica. A superfície da NPM em pH fisiológico é aniônica, o que possibilita a interação eletrostática com as porfirina (TMPP e ZnTMPP). As moléculas orgânicas (TMPP e ZnTMPP) serão eletrostaticamente atraídas pela carga oposta da nanopartícula magnética [49,53].

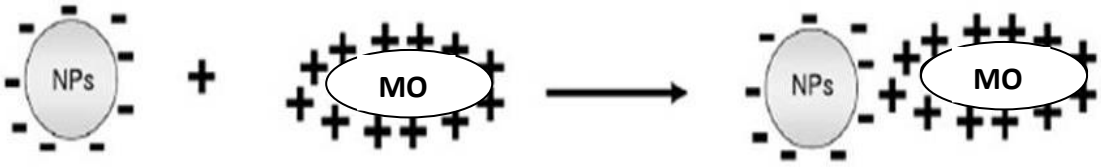

Figura 28: Interação Eletrostática entre NPs e Molécula orgânica.

TABELA 2: Resultados da interação entre as porfirinas TMPP e ZnTMPP com NPMs: anisotropia de fluorescência (r), rendimento quântico de fluorescência (ϕ_{fl}), tempo de vida de fluorescência (τ_{fl}), constante de Stern-Volmer (k_{sv}), constante de ligação (k_b), sítios de ligação (n) e constante de velocidade bimolecular (k_q).

Porfirina	**NPM$_S$ cobertura**	**[NPM] (nM)**	***r***	ϕ_{fl}	τ_{fl}, **ns**	K_{sv}, 10^7 **M^{-1}**	k_b, 10^6 **M^{-1}**	***n***	k_q, 10^{16} **M^{-1}s^{-1}**
TMPP 33 µM	-	0	0,016	0,050	4,5	-	-	-	-
	Citrato	15,0	0,022	0,018	4,4	13,1	41,6	0,94	2,9
	DMSA	10,5	0,019	0,029	4,5	7,1	9,0	0,89	1,6
	Tripoli Fosfato	17,0	0,022	0,018	4,3	12,1	96,1	0,99	2,8
	Iônico	16,2	0,037	0,037	4,3	2,1	4,0	1,03	48,1
ZnTMPP 20 µM	-	0	0,015	0,029	1,3	-	-	-	-
	Citrato	15,0	0,022	0,005	1,3	33,0	165,3	0,96	25,2
	DMSA	10,5	0,030	0,010	1,3	17,0	38,9	0,92	13,1
	Tripoli Fosfato	17,0	0,032	0,010	1,3	10,3	20,6	0,90	7,6
	Iônico	16,2	0,016	0,014	1,3	5,2	11,4	0,90	3,9

7. DISCUSSÕES

O valor da anisotropia de fluorescência das porfirinas teve um ligeiro aumento na presença das NPMs, tanto para o sistema TMPP-NPMs, quanto para ZnTMPP-NPMs. Este fato é um indicativo da interação entre as porfirinas e as NPMs que podem estar associados à interação eletrostática entre as porfirinas catiônicas e as NPMs que possuem uma carga residual negativa, conforme indica a tabela 2.

Observa-se que o rendimento quântico de fluorescência reduz para todos os sistemas investigados indicando a ocorrência da supressão da fluorescência das porfirinas. Uma vez que não houve alteração nos valores de tempo de vida acredita-se que o mecanismo de supressão seja o estático. Neste mecanismo, a supressão de fluorescência ocorre por meio da formação de um complexo no estado fundamental da porfirina. Assim, a emissão de fluorescência é proveniente de moléculas de porfirinas não complexadas, cuja concentração é reduzida com o acréscimo de NPMs ao sistema.

Percebe-se também que não houve formação de novas bandas, ou deslocamento espectral considerável, de tal modo que atribuímos que não ocorre reação no estado excitado tampouco a formação de agregados moleculares.

É de se destacar que os altos valores de k_b *e* k_{sv} indicam que o sistema está fortemente ligado. Como era de se esperar, os valores da constante de supressão k_{sv} são influenciados pelo material utilizado em sua funcionalização. Para a porfirina TMPP, nota-se um menor valor da k_{sv} para NPMs iônicas. Isto se justifica devido ao fato de que a NPM na forma iônica tem menor carga residual em relação às demais NPMs analisadas. Em pH fisiológico a carga da NPM iônica é nula, enquanto para as demais são negativas. Por outro lado, os valores de k_{sv} na interação da TMPP com NPMs

recobertas com citrato e tripolifosfato apresentaram valores seis vezes maiores, enquanto a DMSA apenas 3,5. Podemos representar a ordem dos valores de k_{sv} da seguinte maneira: iônica < DMSA < citrato ≅ tripolifosfato. Um comportamento similar também pode ser observado nos valores das constantes de ligação, sendo a ordem dos valores de k_b da seguinte maneira: iônica < DMSA < citrato < tripolifosfato. Este comportamento é diferente daquele observado pelo potencial zeta, apresentado na tabela 1 onde observamos: tripolifosfato < citrato < DMSA. Desta forma, o caráter eletrostático não é suficiente para explicar os resultados aqui obtidos. Por outro lado, acredita-se que esse comportamento poderia estar associado ao número de átomos de oxigênio da camada de cobertura das NPMs disponíveis para ligação com os átomos de nitrogênio das porfirinas.

Analisando o mecanismo de supressão para a porfirina ZnTMPP, observa-se que houve alteração no valor das constantes em relação à TMPP. A presença do átomo de zinco no anel provocará mudança na estrutura da porfirina, alterando tantos os valores da constante de ligação e de supressão, bem como sua interação com as diferentes camadas de cobertura. Pode ser observado que os valores das constantes k_b e k_{sv} para este sistema seguem a seguinte ordem: iônico < tripolifosfato < DMSA < citrato. Desta forma, é necessário considerar a existência de algum(s) outro(s) mecanismo(s) para explicar tal comportamento, tais como interação de van der Waals, estérica ou outros.

Para o mecanismo estático assume-se que existem locais de ligações semelhantes e independentes no sistema. Assim, os resultados indicam que a interação possui força de ligação forte entre as NPMs e as porfirinas, e o sistema formará apenas um sitio de ligação. Os valores encontrados para n estão apresentados na tabela 2 e são valores próximos de 1.

7. CONCLUSÕES

Apresentamos neste trabalho estudos envolvendo a interação de duas porfirinas aquo-solúveis, a porfirina catiônica TMPP e a ZnTMPP na presença de nanoparticulas magnéticas com diferentes camadas de recobrimento. A eficiência na elaboração de um sistema como esse poderá ser empregado em diversas aplicações desde a área médica como de materiais. Para o sistema em estudo foi observado que ambas as porfirinas interagem fortemente com as NPMs e a ocorrência de um mecanismo de supressão estática. Além disso, foi observado que apenas a interação eletrostática não foi suficiente para explicar os mecanismos envolvidos nesta interação e a necessidade de novos estudos empregando outras técnicas é evidente.

Referências

[1] Instituto Nacional de Cancer.
http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2 (20/10/2014).

[2] International Agency Researton Cancer.
http://www.iarc.fr/en/research-groups/sec1/index.php (20/10/2014).

[3] T.J.Dougherty, C.J.Gomer, B.W.Henderson, G.Jori,D.Kessel, M.Korbelik. J. Natl Cancer Inst. **90** (1998) 889.

[4] D.Bechet, P.Couleaud, C.Frochot, M.L.Viriot, F.Guilhemin, M.B.Heyob. Trends in Biotechnology **26** (2008) 612.

[5] P.Wust, B. Hildebrandt, G. Sreenivasa, B. Rau, J. Gellermann, H. Riess, R. Felix, P. M. Schlag. Lancet Oncol. **3** (2002) 487.

[6] P.Mroz, A.Yaroslavsky, G.B.Kharkwal, M.R.Hamblin. J.Cancers **3** (2011) 2516.

[7] A.Mitra, G.I.Stables. Photodiagn. Photodyn. Ther. **3** (2006) 116.

[8] E.Paszko, C.Ehrhardt, M.O.Senge, D.P.Kelleher, J.V.Reynolds. Photodiagn. Photodyn. Ther. **8** (2011) 14.

[9] S. K. Sharma, P. Mroz, T. Dai, YY. Huang, G. Tyler, et al. Isr. J. Chem. **52** (2012) 691.

[10] A.P.Castano, P.Mroz, M.X.Wu, M.R.Hamblin. Proc. Natl. Acad. Sci. **105** (2008) 5495.

[11] J.Gray, G.Fullarton. Photodiagn. Photodyn. Ther. **4** (2007) 151.

[12] H. Kato, M. Harada, S. Ichinose, J.Usuda,T.Tsuchida. Photodiagn. Photodyn. Ther. **1** (2004) 49.

[13] R. R.Allison, R.E.Cuenca, G. H.Downie,P.Camnitz,B.Brodish,C.H.Sibata. Photodiagn. Photodyn. Ther. **2** (2005) 205.

[14] C.S.Souza, L.B. A.Felicio, J.Ferreira, C.Kurachi, M.V.B.Bentley, A.C.Tedesco, V. S.Bagnato. Photodiagn. Photodyn. Ther. **6** (2009) 207.

[15] R.R.Allison,C.Sheng,R.Cuenca,V.S.Bagnato,C.Austerlitz,C. H. Sibata, Photodiagn. Photodyn. Ther. **7** (2010) 115.

[16] L. Guyon,M.Ascencio, P.Collinet, S.Mordon. Photodiagn. Photodyn. Ther. **9** (2012) 16.

[17] V. Monge-Fuentes, L.A.Muehlmann, R.B. de Azevedo. Nano Reviews **5** (2014) 24381.

[18] E.R.Silva, E.P.Santos, E.Ricci-Júnior. Rev. Bras. Farm., **90** (2009) 211.

[19] K.Moghissi, K. Dixon.Laser Fluorescence **596** (2005) 804.

[20] A.Behrens, A.Mary, L.Gossner, E.Gunter, O.Pech, M.Vieth, M.Stolte, G.Seltz, C. Ell. Endoscopy **37** (2005) 999.

[21] J.N.Ribeiro, R.A. Jorge, A. R.da Silva, A.V.Flores, L.M.Ronchi, A.C.Tedesco. Eclética Química. **32** (2007) 7.

[22] M.A.D'Hallewin, A.R. Kamuhabwa, T. Roskams, P.A.M. Witte, L. Baert. BJU Internation **89** (2002) 760.

[23] T.Stinik, J.A.Hampton, B.W. Henderson. Bristish J. Cancer **77** (1998) 1386.

[24] L. Torezan, C.F.Neto, A.B.M.Niva. An. Bras. Dermatl. **84** (2009) 445.

[25] T.K. Vyas, L.Shah, M.M. Amiji. Expert Opin. Drug Deliv. **3** (2006) 613.

[26] C.Wang, J. Chen, T. Talavage, J. Irudayaraj. Angew. Chem. **121** (2009) 2797.

[27] F.L. Primo, M. M. A. Rodrigues, A. R. Simioni, M. V. L. B. Bentley, P. C. Morais, A. C. Tedesco, J. Magn. Mater. **320** (2008) 211.

[28] A.D.D.Nunes, L.S.Ramalho, A.P.S.sousa, E.P.Mendes, D.B.Colgnati, N. Zufelato, M. H.Sousa, A. F. Bakusis, C.H.Castro. International J. Nanomedicine, **9** (2014) 3299.

[29] L. C.Sampaio; F. Garcia; G. R. C. Cernicchiaro, A. Y. Takeuchi. Revista Brasileira de Ensino de Física, v. **22** (2000) 406.

[30] MP. Pileni. Nature Publishing Group **2** (2003) 145.

[31] L.L.Castro, G.R. R. Goncalves, K. S. Neto, P.C.Morais, A.F. Bakuzis, R.Miotto. Phys. Rev. E, **78**, (2008) 061507.

[32] V.P.Torchilin. European J. of Pharmaceutical Sciences **11** (2000) 81.

[33] M.J.Junior, L. C. Varanda, Química Nova Na Escola **9** (1999) 9.

[34] C.R.A.Valois, J.M.Braz, E.S.Nunes, M.A.R. Vinolo, E.C.D.Lima, R.Curi. Biomaterials **31** (2010) 366.

[35] N. R. Jabir, S. Tabrez, G. Md. Ashraf, S. Shakil, G.A. Damanhouri, M. A. Kamal, International Journal of Nanomedicine **7** (2012) 4391.

[36] A.G.Filip, S.Clichici, D. Daicoviciu, R.M. Ion, C.Tatomir, L.Rogojan, I. Opris, T. Mocan, D.Olteanu, A. Muresan. Braz. J. Med. Biol. Res. **44** (2011) 53.

[37] G.M.Gelfuso, T. Gratieri, J.G.Souza, J.A. Thomazine, R.F.V.Lopes. European J. Pham. BioPharma. **77** (2011) 249.

[38] A.F. Bakuzis, L.C.Branquinho, L.L.Castro, M.T.A. Eloi, R. Miotto. Adv. Colloid Interfaces Science **191** (2013) 1-21.

[39] Lakowicz, J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Klwer Academic/Plenum Publishers. 1999.

[40] Bernard Valeur. Molecular Fluorescence Principles and Applications. 2001.

[41] P.J.Goncalves, P.L.Franzen, D.S.Correa, L. M.Takara, A.S.Ito, S.C.Zílio, I.E. Borissevitch. Spectrochimica Acta Part A **79** (2011) 1532.

[42] P.J.Goncalves, D.S.Correa, P. L. Franzen, L. Boni, L.M. Almeida, C.R.Mendonça. Spectrochimica Acta Part **112** (2013) 309.

[43] Iouri.E.Borissevich, T.T.Tominaga, H.Imasato, M.Tabak. J. Luminesce **69** (1996) 65.

[44] C. Pavani, A. F. Uchoa, C. S. Oliveira, Y. Iamamoto, M. S. Baptista. Photochem. Photobiol. Sci. **8** (2009) 233.

[45] D.S. Neto, M.Tabak. J. Colloid Inteface Science **381** (2012) 73.

[46] I. E. Borissevitch. J. Luminescence **81** (1999) 219.

[47] D.S. Neto, A.Hawe, M. Tabak. Eur. Biopys. J. **42** (2013) 267.

[48] I.E.Borissevitch, G.G.Parra, V.E.Zagidullin, E.P.Lukashev, P.P.Knox, V.Z.Paschenko, A.B.Rubin. J. Luminescence **134** (2013) 83.

[49] J.Bai, T.Wang, Y. ang, X.Jiang. Biomater. Sci. **2** (2014) 493.

[50] P.S.Santiago, D.S.Neto, S.C.M. Gandini, M.Tabak. Colloids surf. Bionterfaces **65** (2008) 247.

[51] Y.Wang, Y.Mo, L.Zhou. Spectrochimica Acta **4** (2011) 8328.

[52] L.C.Branquinho.Estudo da Encapsulação de Nanopartículas Magnéticas em Nanoporos de Alumina. Dissertação de Mestrado em Física, Universidade Federal de Goiás, 2010.