

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DIEGO FRANÇA DE OLIVEIRA

Estudo das taxas de decaimento de estado excitado e cruzamento
intersistemas de porfirinas neutras e catiônicas em solução

São Carlos
2023

DIEGO FRANÇA DE OLIVEIRA

Estudo das taxas de decaimento de estado excitado e cruzamento
intersistemas de porfirinas neutras e catiônicas em solução

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Física de São
Carlos da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Bacharel em
Ciências Físicas e Biomoleculares.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo De Boni

São Carlos
2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Oliveira, Diego França de

Estudo das taxas de decaimento de estado excitado e cruzamento intersistemas de porfirinas neutras e catiônicas em solução / Diego França de Oliveira; orientador Leonardo De Boni -- São Carlos, 2023.

27 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Físicas e Biomoleculares) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Espectroscopia. 2. Fotossensibilizadores. 3. Cruzamento intersistemas. I. De Boni, Leonardo, orient. II. Título.

RESUMO

Porfirinas são moléculas muito valiosas na área da fotomedicina, atuando como bons agentes diagnósticos e terapêuticos ativados por luz. Sua estrutura molecular lhes garante a capacidade de absorver e emitir luz com boa eficiência, além de permitir sua transição entre estados singlete e tripleto de multiplicidade, o que possibilita a geração de oxigênio altamente reativo no meio celular, tornando-as alvos promissores de estudo. No entanto, antes de aplicar esses fotossensibilizadores, é preciso fazer um estudo fotofísico prévio, a fim de compreender como funcionam os mecanismos de absorção e liberação de energia dessas moléculas. Esse tipo de estudo permite direcionar cada molécula para sua melhor aplicação, além de elucidar quais são as vantagens e limitações de sua utilização. Nesse sentido, o presente trabalho visa fazer um estudo fotofísico de um grupo de moléculas da classe das tetrafenilporfirinas, a fim de obter seus parâmetros fotofísicos em solução e relacionar os mesmos com sua estrutura molecular. As amostras estudadas incluem duas porfirinas base livre neutras e duas porfirinas base livre que, em solução, são catiônicas. São estudadas suas propriedades estacionárias de absorvidade molar e de rendimento quântico de fluorescência, a fim de compreender a eficiência de seus processos de absorção e emissão de luz. Além disso, é feito um estudo no regime temporal, a fim de obter a velocidade de relaxamento de seus estados excitados, pela obtenção do tempo de vida de fluorescência. Por fim, é obtida a eficiência quântica de cruzamento intersistemas dessas moléculas, permitindo avaliar seu potencial de atuação na terapia fotodinâmica. Utilizando todas essas características, é possível descrever as taxas de decaimento do estado excitado em um regime de nanossegundos e associar esses processos à estrutura molecular do composto e as características distintas entre elas. É observado que o grupo ligante neutro não influencia significativamente nas propriedades das moléculas, enquanto a presença de um grupo carregado favorece o processo de decaimento não radiativo. Além disso, é atestado que o átomo pesado de iodo é responsável por aumentar o processo de cruzamento intersistemas. Por fim, os valores de eficiência de formação de tripleto encontrados são comparáveis aos valores de fotossensibilizadores comuns na terapia fotodinâmica, indicando potencial de aplicação das moléculas analisadas. Seu artigo de síntese havia reportado que as porfirinas catiônicas são capazes de produzir oxigênio singlete e induzir morte celular de bactérias. Esses resultados foram corroborados pela quantificação do processo de cruzamento intersistemas, mas foi observado que a quantidade de espécies tripleto não é necessariamente proporcional à formação de oxigênio singlete.

Palavras-chave: Espectroscopia. Fotossensibilizadores. Cruzamento intersistemas.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	MOTIVAÇÃO.....	7
1.2	BASE TEÓRICA.....	8
2	MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1	ESPECTROSCOPIA OPTICA ESTACIONÁRIA	13
2.2	FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO	15
2.3	TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR DUPLO PULSO	16
3	RESULTADOS	19
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

Moléculas fotoresponsivas têm sido amplamente utilizadas em aplicações médicas nos últimos anos. Desde 1900, quando foi descrito o uso desta classe de compostos para a eliminação de protozoários, diversos compostos foram desenvolvidos para aplicações clínicas, tanto para diagnóstico quanto para terapias. (1) Os fotossensibilizadores, como são chamados, são compostos capazes de absorver luz e apresentar respostas diversas a isto, variando sua aplicação de acordo com o tipo de resposta que apresentam. Na área de diagnóstico, são utilizadas moléculas capazes de emitir sinais luminosos, auxiliando na formação de imagens médicas por fluorescência na avaliação de tumores ou observação de populações de microrganismos. (2) Como vantagem adicional, muitos desses fotossensibilizadores se acumulam naturalmente em tecido oncológico e alteram suas propriedades luminescentes quando em contato com os mesmos, permitindo sua aplicação como sensores altamente específicos. Na área da terapia, um dos mecanismos característicos de muitos fotossensibilizadores é a sua possibilidade de aplicação em terapia fotodinâmica, um procedimento minimamente invasivo para o tratamento de tumores. Essa terapia consiste na aplicação do fotossensibilizador e sua excitação para induzir a geração de espécies reativas de oxigênio, que causam morte celular localizada na área irradiada, sendo menos invasivo que o método tradicional de cirurgia enquanto apresenta resultados semelhantes ou até melhores que este. (3-4) O mesmo mecanismo fotodinâmico também permite o tratamento de infecções bacterianas sem a necessidade do uso de antibióticos tradicionais. A vantagem neste caso é que, diferente dos antibióticos comuns, a terapia fotodinâmica antimicrobiana não induz o aumento da resistência das cepas de bactérias ao longo de suas gerações. (5) Esse tipo de aplicação vem ganhando destaque na última década frente à possibilidade cada vez maior de uma crise de superbactérias. (6) Dessa forma, é evidente que a aplicação de moléculas fotossensibilizadoras é bastante ampla, mas para determinar qual a melhor aplicação de um determinado fotossensibilizador é preciso fazer um estudo de suas propriedades fotofísicas, através de medidas de espectroscopia óptica.

Para ter potencial de aplicação como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica, uma molécula deve apresentar propriedades adequadas. Mais especificamente, moléculas capazes

de passar por cruzamento intersistemas (passando de um estado quântico singlete para um estado tripleto) são capazes de uma grande formação de oxigênio reativo. Isso porque a molécula de oxigênio ocorre naturalmente em estado tripleto, de forma que a interação tripleto-tripletto entre fotossensibilizador e molécula permite a formação de oxigênio singlete, altamente reativo. Sendo assim, a busca por fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica tem como base a busca por moléculas com alta taxa de cruzamento intersistemas. No entanto, como a transição entre singlete e tripleto não emite sinal visível, a quantificação do processo de cruzamento intersistemas não é trivial. Para a correta quantificação da dinâmica de cruzamento intersistemas, é preciso conhecer os tempos envolvidos nos processos de excitação e relaxação da molécula estudada. O presente projeto utiliza uma técnica que, conhecendo as taxas de transição entre diferentes estados energéticos, relaciona as informações do sinal de fluorescência às populações eletrônicas do estado singlete e tripleto ao longo do tempo. Assim, é possível determinar quantitativamente a eficiência quântica de formação de tripleto e a taxa de cruzamento intersistemas.

1.2 BASE TEÓRICA

Para que as análises de espectroscopia óptica realizadas neste trabalho possam ser interpretadas, é necessário ter claros os processos de interação da luz com a matéria, nesse caso moléculas orgânicas. Toda molécula orgânica possui uma configuração espacial estável de mínima energia, chamada de estado fundamental eletrônico, no qual a posição de seus núcleos e a distribuição de seus elétrons é tal que as forças que existem no sistema atingem equilíbrio. Ao adicionar energia a essas moléculas é possível fazer a transição para níveis eletrônicos de energia superiores, os níveis excitados. Uma vez num nível excitado, a molécula deve retornar ao nível fundamental liberando energia por diversos caminhos, seja de forma radiativa, emitindo luz por processo de fluorescência, ou de forma não radiativa, transferindo energia por colisão ou interações eletrostáticas. Como as energias dos estados eletrônicos são discretas, a transição entre os estados ocorre pela liberação ou absorção de quantidades bem definidas de energia. Além disso, cada nível eletrônico possui subníveis vibracionais de energia, associados aos modos normais de oscilação das ligações covalentes das moléculas. Os níveis vibracionais, assim como os níveis eletrônicos, tendem a se estabilizar e apresentam separações energéticas discretas. O princípio de Franck-Condon diz que as transições eletrônicas, dadas pela variação

da distribuição dos elétrons, ocorrem de maneira tão rápida que os núcleos, muito mais pesados, podem ser tratados como imóveis nesse intervalo. Dessa forma, uma transição será permitida se a energia perdida ou concedida possibilitar a transição dos elétrons entre diferentes orbitais moleculares. Os orbitais moleculares envolvidos em uma transição usualmente são o estado ocupado de mais alta energia (HOMO) e o estado desocupado de mais baixa energia (LUMO), também conhecidos como orbitais de fronteira, já que a diferença de energia entre esses é a menor para gerar uma transição.

Embora os conceitos referentes aos estados de energia e transições eletrônicas sejam válidos para todas as moléculas orgânicas, as porfirinas tem propriedades estruturais que lhe concedem características particulares. A estrutura das porfirinas tem como base um anel tetrapirrólico, formando uma estrutura com ressonância de 18 elétrons π e dois eixos de simetria no plano da molécula. Esses dois eixos de simetria, distintos apenas pela presença de um par de hidrogênios, no caso das porfirinas de base livre, levam à existência de dois orbitais HOMO e dois LUMO *quasi*-degenerados, o que implica a possibilidade de quatro transições eletrônicas permitidas entre eles para o processo de absorção. As transições para o estado LUMO mais energético são atribuídos às bandas B's, enquanto a transição para o estado LUMO menos energético caracterizam as bandas Q's de absorção. As bandas Q's podem ainda ser separadas em duas cada, devido à possibilidade de participação de níveis vibracionais distintos. (7) No caso do processo de emissão por fluorescência, as porfirinas obedecem a regra de Kasha, que diz que a emissão ocorre de forma significativa apenas do nível mais baixo de energia do estado excitado, dessa forma, apenas uma banda de emissão deve ser observada. (8) Por fim, a alta ressonância que existe no anel tetrapirrólico das porfirinas, garante uma alta interação entre o spin magnético dos elétrons e seu momento angular orbital, de forma que essas duas propriedades são acopladas e podem se influenciar fortemente. Esse processo de acoplamento spin-órbita permite que a molécula de porfirina seja capaz de transitar entre diferentes estados quânticos de spin. Naturalmente a molécula de porfirina se encontra em estado fundamental singleto, com spin resultante $S = 0$, e seus estados excitados acessados durante uma transição por absorção também são estados singleto, ou seja, não há mudança de spin resultante durante a transição. No entanto, uma vez em um estado singleto excitado, é possível que a molécula passe por um processo de cruzamento intersistemas, no qual transitará de seu estado singleto para um tripleto, com spin resultante $S = 1$. (7) A Figura 1 ilustra a distribuição dos orbitais de fronteira previstos pelo modelo de Gouterman para porfirinas, o qual descreve os quatro orbitais envolvidos nas transições eletrônicas. A mesma Figura também apresenta o diagrama de

Jablonski simplificado, o qual descreve os níveis energéticos e transições eletrônicas permitidas para estas moléculas.

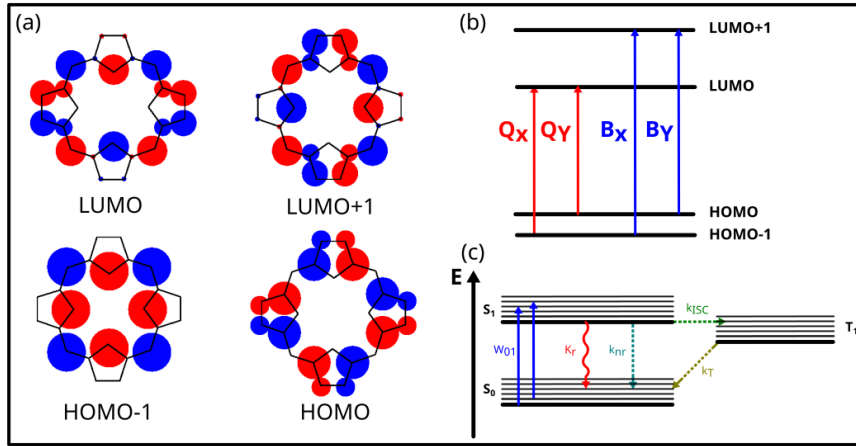


Figura 1 - (a) Orbitais de fronteira previstos pelo modelo de Gouterman para porfirinas. (b) Transições eletrônicas induzidas por absorção para o modelo de quatro orbitais. (c) Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando os caminhos de absorção e liberação de energia.

Fonte: Adaptada de GOUTERMAN (7)

Além da análise dos níveis de energia e suas transições permitidas, é possível analisar a variação das populações de moléculas nos diferentes estados de energia. (9) Considerando uma população de moléculas, a variação do seu número no primeiro estado singleto excitado S_1 em função do tempo e decaindo naturalmente é dada pelo seguinte Conjunto de Equações:

$$\frac{dN_{S_1}}{dt} = -K_{S_1}N_{S_1}$$

$$N_{S_1}(t) = N_{S_1}(0) \exp(-K_{S_1}t) \quad (1)$$

$$N_{S_1}(t) = N_{S_1}(0) \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right)$$

A taxa de decaimento de estado singleto (K_{S_1}) é tradicionalmente representada pelo tempo de vida de estado singleto (τ_s), seu inverso. Como ilustrado na Figura 1, o decaimento espontâneo do estado excitado pode ser dividido em suas componentes radiativa (k_r), não-radiativa (k_{nr}) e de cruzamento intersistemas (k_{isc}), tais que $\frac{1}{\tau_s} = k_r + k_{nr} + k_{isc}$. As taxas k descrevem a velocidade com que cada processo contribui para esvaziar o estado excitado S_1 . Dessa forma, a razão entre a taxa k de um processo e a taxa total K_{S_1} de decaimento do estado singleto, fornece o rendimento quântico (ϕ) desse processo, como descrito pelo seguinte Conjunto de Equações:

$$k_r\tau_s = \phi_f ; k_{nr}\tau_s = \phi_{nr} ; k_{isc}\tau_s = \phi_T \quad (2)$$

Eficiências quânticas de fluorescência (ϕ_f), de decaimento não radiativo (ϕ_{nr}) e de formação de espécies tripleto (ϕ_T) também podem ser obtidas considerando a razão entre o número de moléculas que passa por um determinado processo e o número de moléculas

inicialmente disponíveis no estado excitado. Para o caso da fluorescência isso é simples de ser avaliado, já que cada molécula excitada (e, portanto, disponível no estado excitado) corresponde a um fóton absorvido, enquanto cada decaimento por fluorescência equivale a um fóton emitido. Assim, a razão entre o número de fótons emitidos e absorvidos fornece ϕ_f . O número de fótons absorvidos é proporcional à atenuação da luz incidente, o que é simples de se obter: a absorbância de uma amostra é definida pela relação entre a intensidade luz incidente nesta e a quantidade de luz transmitida por ela. A lei de Beer-Lambert diz que a absorbância de uma solução homogênea depende do caminho percorrido pela luz na solução (l), de sua concentração (c) e do coeficiente de absortividade molar (ϵ) característico desta solução, resultando na Equação (3).

$$A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} ; A = \epsilon cl \quad (3)$$

O número de fótons emitidos por fluorescência, da mesma forma, será proporcional à intensidade de luz emitida, porém, como a fluorescência não é direcionada, os fótons serão emitidos espacialmente em uma esfera centrada na região de excitação. Dessa forma, para determinar a intensidade de fluorescência (I_f) e conseguir calcular a eficiência ($\phi_f = \frac{I_f}{I_0 - I}$) seria necessário captar toda a luz emitida por ela em uma área esférica ao redor da amostra, o que exigiria um equipamento altamente específico para tal. Será visto na seção de métodos experimentais que o método de Brouwer é capaz de determinar ϕ_f de forma indireta utilizando um fluorímetro simples.

O comportamento da emissão de fluorescência após uma excitação obedecerá ao processo de decaimento estabelecido pelo Conjunto de Equações (1). Dessa forma, a intensidade de fluorescência será proporcional à contribuição do decaimento radiativo (k_r) no processo de esvaziamento do estado excitado ($-K_{S_1}N_{S_1}$).

$$I_f(t) \propto \phi_f \left| \frac{dN_{S_1}}{dt} \right| ; I_f(t) \propto \phi_f K_{S_1} N_{S_1}(0) \exp(-K_{S_1}t) \quad (4)$$

Aqui, é fácil ver que a curva de intensidade de fluorescência ($I_f(t)$) possui perfil de decaimento exponencial com tempo característico τ_s . O fato de $I_f(t)$ ser descrita pelo tempo de vida de estado singleto, faz com que esse tempo também seja conhecido como tempo de vida de fluorescência (τ_f), sendo esta a nomenclatura mais utilizada na literatura. A fim de preservar a coesão do texto, esse valor continuará sendo denominado tempo de vida de estado singleto. Assim, como ambos ϕ_f e τ_s são observáveis, a taxa k_r pode ser determinada matematicamente. Para finalizar a descrição das taxas através da Equação (2) basta obter ϕ_T , o que permite definir

k_{isc} e, conseqüentemente, k_{nr} . O processo de determinação de ϕ_T não é simples, visto que o estado tripleto das moléculas estudadas não emite sinal. Dessa forma, a correta quantificação do fenômeno de cruzamento intersistemas depende da utilização de um aparato experimental adequado capaz de atuar em um regime de tempo conveniente. Para este projeto a determinação de ϕ_T será feita através da técnica de fluorescência induzida por duplo pulso, relatada em detalhe na seção de Materiais e métodos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Serão estudadas 4 porfirinas, ainda não caracterizadas, do grupo das tetrafenilporfirinas, que são diferenciáveis por seus ligantes laterais. As moléculas estudadas vêm em pares, com um par possuindo um grupo lateral de diéster de pirrolina e o outro par possuindo grupo lateral de diéster de pirrolidina. Cada par possui uma molécula neutra e uma molécula com sal de iodo. A molécula com sal se torna catiônica uma vez que dissocia em solução, liberando um ânion de iodo e permanecendo com um cátion de amônio (NH_4^+). A estrutura molecular das amostras pode ser vista na Figura 2.

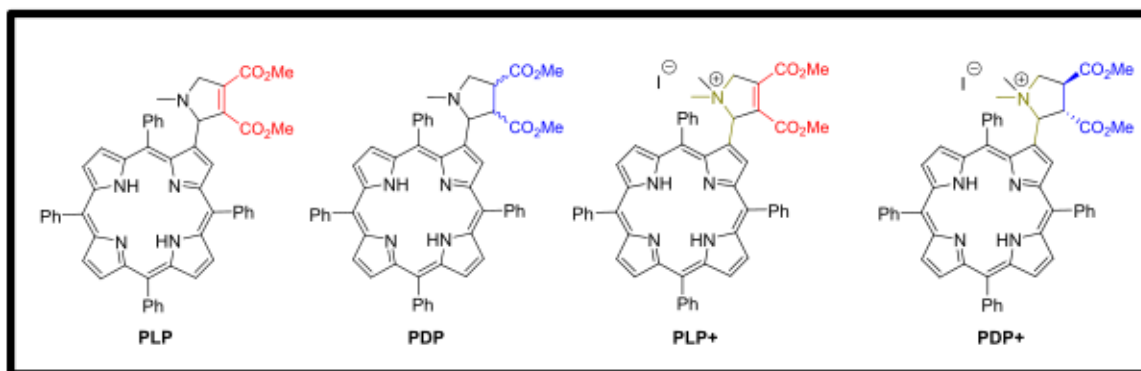


Figura 2 - Estrutura molecular das amostras de Tetrafenilporfirina diéster de pirrolina neutra (PLP) e catiônica (PLP+) e Tetrafenilporfirina diéster de pirrolidina neutra (PDP) e catiônica (PDP+).

Fonte: Elaborada pelo autor

2.1 ESPECTROSCOPIA OPTICA ESTACIONÁRIA

A primeira parte da caracterização consiste no preparo das soluções padrão a partir das massas de soluto e do conhecimento das massas moleculares dos compostos, determinados no artigo de síntese dos quais se originam. (10) É escolhido o solvente orgânico Dimetilsulfóxido (DMSO), visto que este é amplamente utilizado para aplicação de fotossensibilizadores em uso clínico, devido à sua baixa toxicidade e alta miscibilidade com a água. Além disso, o solvente não apresenta absorção ou emissão na faixa da luz visível, o que garante que os sinais obtidos serão atribuídos puramente ao soluto. Soluções estoque são preparadas em DMSO com concentração de cerca de $100\mu M$, utilizando uma balança de precisão e uma micropipeta para a determinação das massas de soluto e volume de solvente. As soluções padrão são caracterizadas utilizando uma cubeta de quartzo de 2mm em um espectrômetro comercial. O

espectrômetro incide luz monocromática na amostra através da associação de uma lâmpada e uma rede de difração. A relação entre a luz incidente (I_0) e a luz transmitida (I) na amostra fornece a absorção (A) da solução. Considerando que a solução obedece ao regime de Beer-Lambert, que estipula soluções de baixa concentração, é possível obter a absorbância da solução e por consequência a absortividade molar (ϵ) da amostra dissolvida em DMSO.

Para determinar o espectro de fluorescência da solução é utilizado um fluorímetro comercial modelo Hitachi-8000. O equipamento excita a amostra com luz monocromática e coleta a luz emitida perpendicularmente à fonte de emissão. O sinal é coletado por excitação com dois comprimentos de onda distintos, para garantir que há constância nos comprimentos de onda de emissão. Isso é feito para eliminar possíveis sinais de espalhamento, dependentes do comprimento de excitação, e considerar apenas sinais de fluorescência, independentes dos comprimentos de absorção de acordo com a regra de Kasha. Além do perfil do espectro de fluorescência, é feita a determinação da eficiência quântica de fluorescência (ϕ_f), pelo método comparativo descrito por Brouwer. (11) Para isso é utilizada uma amostra de referência que possua ϕ_f definido na literatura, neste caso será utilizada a Tetrafenilporfirina dissolvida em Tolueno, com $\phi_f^{ref} = 11\%$ (12) Dessa forma, considerando que as condições geométricas do experimento permaneçam inalteradas entre as medidas, é possível dizer que a integral do sinal de fluorescência captado pelo detector ($I_f = \int S(\lambda)d\lambda$) terá intensidade proporcional à ϕ_f do emissor e sua absorbância no comprimento de onda de excitação. Além disso, considerando que a luz irá refratar quando passar da solução para o ar, antes de chegar ao detector, a intensidade medida será inversamente proporcional ao índice de refração do solvente (n). Assim, $I_f \propto \frac{\phi_f A(\lambda_{EX})}{n}$, o que permite obter a Equação (5), que descreve a comparação entre amostra de referência e a amostra a ser determinada.

$$\phi_f = \frac{I_f}{I_f^{ref}} \cdot \frac{n}{n^{ref}} \cdot \frac{A(\lambda_{EX})^{ref}}{A(\lambda_{EX})} \phi_f^{ref} \quad (5)$$

As variáveis acompanhadas por sobrescrito *ref* são pertencentes à amostra de referência, enquanto aquelas sem sobrescrito são pertencentes à amostra analisada.

2.2 FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO

Agora, para introduzir a análise das transições eletrônicas em função do tempo, é preciso revisitar as ordens de grandeza do processo relaxativo e utilizar um aparato que permita resolução temporal suficiente para sua observação. Para tanto, é utilizado um osciloscópio eletrônico associado a um fotodetector, o que permitirá acompanhar a evolução da intensidade de emissão de fluorescência da amostra em solução com uma resolução temporal de 50ps. Além disso, visando observar o decaimento de fluorescência após a excitação, mas não durante a mesma, utiliza-se um laser pulsado ultra curto, configurado para uma largura de pulso de 1 ps. Como a largura do pulso é muito menor que o tempo característico do decaimento do estado singlete (da ordem de ns), e também do que a resolução temporal do osciloscópio, é possível considerar que a excitação gerada pelo pulso é instantânea. Assim, a partir do momento de excitação é possível acompanhar o decaimento de fluorescência, observado uma curva que obedece $I = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right)$, sendo I_0 a intensidade de fluorescência máxima observada no instante logo após a excitação. É possível recuperar valor de τ_s aplicando o logaritmo $\ln I = \ln I_0 - \frac{t}{\tau_s}$, visto que o coeficiente angular da curva $\ln I \times t$ corresponde ao valor de τ_s^{-1} . Apesar de já ser possível obter o valor da curva dessa forma, dada a natureza da instrumentação utilizada existe uma resposta eletrônica inerente ao equipamento, a qual polui o sinal adquirido e pode gerar alterações na quantificação de τ_s . Assim, o sinal medido (I) é na verdade um convolução entre o sinal real de fluorescência (I_f) e um sinal de resposta característico do equipamento (IRF).

$$I(t) = (I_f * IRF)(t). \quad (6)$$

Para obter o sinal verdadeiro $I_f(t)$ é possível deconvoluir a curva, conhecendo as funções $I(t)$ e $IRF(t)$. A função $IRF(t)$ do equipamento pode ser obtida fazendo uma medida com a mesma instrumentação, mas utilizando como amostra um vidro opaco. O material irá espalhar a luz do pulso curto e todo sinal medido corresponderá puramente à função $IRF(t)$.

2.3 TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR DUPLO PULSO

A técnica de fluorescência induzida por duplo pulso permite abusar das ordens de grandeza dos processos de absorção e emissão das porfirinas a fim de determinar a taxa de cruzamento intersistemas (k_{isc}) e a eficiência quântica de formação de tripleto (ϕ_T). Assim como foi feito para a determinação do tempo de vida, sabe-se que um pulso com largura temporal muito menor que nanossegundos induz um processo de excitação que pode ser considerado instantâneo. Agora, além desse fato, pode ser considerado que o tempo de duração do estado tripleto, da ordem de microssegundos, é infinito em uma escala de tempo de poucos nanossegundos. Sendo assim, será feita a excitação por duplo pulso de uma mesma população de moléculas, de forma que o segundo pulso atinja a amostra em um tempo ΔT após o primeiro. A magnitude da taxa de transição populacional causada pela absorção será $W_{01} = \frac{\sigma(\lambda)}{E_{ph}(\lambda)} I(t)$, onde $\sigma(\lambda)$ é a seção de choque de absorção do absorvedor, $I(t)$ a intensidade do pulso e $E_{ph}(\lambda)$ a energia do fóton absorvido. O decaimento do estado excitado ocorre conforme descrito no Conjunto de Equações (1). Nessa condição, as equações de taxa que descrevem as populações do estado S_0 , S_1 e T_1 , serão:

$$\begin{aligned}\frac{dn_0^S}{dt} &= -W_{01}n_0^S + \frac{(1 - \phi_T)}{\tau_s} n_1^S \\ \frac{dn_1^S}{dt} &= W_{01}n_0^S - \frac{n_1^S}{\tau_s} \\ \frac{dn_T}{dt} &= \frac{\phi_T}{\tau_s} n_1^S\end{aligned}\tag{7}$$

A forma mais simples de resolver as equações na condição temporal analisada é dividir a situação em 3 momentos: (i) o instante após a primeira excitação, (ii) o instante antes da segunda excitação e (iii) o instante após a segunda excitação. (i) e (iii) serão equações apenas com o termo associado à excitação, enquanto (ii) terá apenas o termo associado ao decaimento. Inicialmente, considera-se que todas as moléculas estão no estado fundamental, logo $n_0^S(0) = 1$. Como os pulsos são trabalhados independentemente, é definido o termo de variação populacional δ_p , diferente para cada pulso ($p=1$ ou $p=2$). A magnitude da variação é dada por $\delta_p = 1 - \exp\left(\frac{-\sigma(\lambda)}{h\nu} F_p\right)$, sendo F_p a fluência do pulso, ou seja, $F_p = \int_{-\infty}^{\infty} I_p(t) dt$. Portanto a situação (i) se resolve:

$$\begin{aligned}
n_0^S &= 1 - \delta_1 = 1 - \left(1 - \exp \left(\frac{-\sigma(\lambda)}{h\nu} F_1 \right) \right) \\
n_1^S &= \delta_1 \\
n_1^T &= 0
\end{aligned} \tag{8}$$

Para a situação (ii), ou seja, após o tempo ΔT e logo antes do segundo pulso, se resolve:

$$\begin{aligned}
n_0^S &= (1 - \delta_1) + \delta_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \right) (1 - \phi_T) \\
n_1^S &= \delta_1 \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \\
n_1^T &= \delta_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \right) \phi_T
\end{aligned} \tag{9}$$

Por fim, para a situação (iii), no instante após o terceiro pulso, se resolve:

$$\begin{aligned}
n_0^S &= \left[(1 - \delta_1) + \delta_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \right) (1 - \phi_T) \right] (1 - \delta_2) \\
n_1^S &= \delta_1 \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \\
&+ \left[(1 - \delta_1) + \delta_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \right) (1 - \phi_T) \right] \delta_2 \\
n_1^T &= \delta_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \right) \phi_T
\end{aligned} \tag{10}$$

Aqui, conhecendo τ_s , ΔT e δ_p já é possível determinar ϕ_T sabendo que a intensidade de fluorescência é proporcional à população n_1^S . A maior fonte de incerteza da equação vem do F_p presente em δ_p , já que irá depender fortemente do conhecimento sobre o perfil de intensidade do laser em cada um dos pulsos, o qual pode conter instabilidades. Para contornar esse problema, é possível trabalhar em um regime de alto F_p , de forma que $\delta_p \rightarrow 1$. Nessa condição, no instante logo após o segundo pulso, as populações serão

$$\begin{aligned}
n_1^S(ii) &= \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \\
n_1^S(iii) &= \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) + \left[\left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \right) (1 - \phi_T) \right] \\
n_1^T(iii) &= n_1^S(ii) \left[\left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_s} \right) \right) (1 - \phi_T) \right]
\end{aligned} \tag{11}$$

Como a intensidade de fluorescência é tal que $I_f(t) \propto \frac{dn_1^S}{dt}$, e a taxa de decaimento está relacionada a população como $\frac{dn_1^S}{dt} = \frac{n_1^S}{\tau}$, a diferença entre as intensidades dos pulsos

corresponde a uma diferença igual entre as populações $\frac{I_f^{(iii)} - I_f^{(ii)}}{I_f^{(iii)}} = n_1^S(iii) - n_1^S(ii) = r_f$.

Aplicando isso à Equação (11), obtém-se a relação entre as intensidades de fluorescência e a eficiência quântica de tripleto em um regime saturado de excitação.

$$\phi_T = 1 - \frac{r_f}{1 - \exp\left(-\frac{\Delta T}{\tau_s}\right)} \quad (12)$$

A montagem instrumental que permitirá atingir as condições necessárias para a aplicação da Equação (12) e determinação da eficiência de formação de tripleto pode ser vista na Figura 3. A montagem se inicia com a utilização do laser pulsado modelo PHAROS atuando em seu segundo harmônico em 515nm, desta vez configurado para a emissão de dois pulsos consecutivos com espaçamento temporal de 15ns, largura temporal de 1ps e taxa de repetição de 10Hz. Antes da realização da medida, é caracterizada a energia do duplo pulso, utilizando um medidor de potência e sabendo a taxa de repetição do laser. Entretanto, para determinar a energia de cada pulso individualmente, é feita uma medida do espalhamento de luz de ambos os pulsos com uso de uma amostra de vidro opaco. Com isso é possível observar a intensidade espalhada relativa entre os pulsos. Dada a boa estabilidade do laser, a relação entre os pulsos geralmente se mantém próxima de 1:1, o que é ideal para a medida. Variações nessa relação não influenciam desde que se atinja o regime de saturação e a energia do segundo pulso não seja muito mais baixa que a do primeiro.

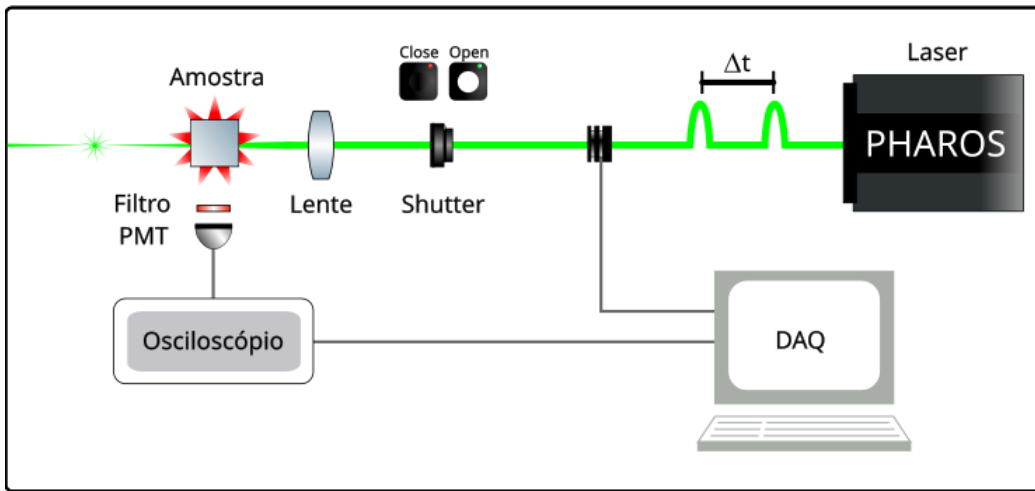


Figura 3 - Aparato experimental para a medida de fluorescência induzida por duplo pulso, que inclui laser pulsado modelo PHAROS, medidor de potência, obturador de feixe (*shutter*), sistema de lentes, filtro colorido, fotomultiplicadora e sistema de aquisição de dados (DAQ).

Fonte: Elaborada pelo autor

3 RESULTADOS

Foram preparadas inicialmente as soluções para estudo, partindo da dissolução de aproximadamente 1mg de soluto em 5mL de Dimetilsulfóxido (DMSO), resultando em soluções estoque com concentração da ordem de $2 \cdot 10^{-4}M$. As soluções foram mantidas a baixa temperatura e ao abrigo da luz a todo momento no qual não estavam sendo analisadas. Antes de qualquer medida as soluções eram postas em temperatura ambiente até atingir estabilidade térmica. Apenas a medida de absorvidade molar foi realizada com a concentração original da solução, as medidas subsequentes ocorrerem com diluição da solução estoque, a fim de atingir concentrações adequadas a cada tipo de medida. A medida de determinação da absorvidade molar foi realizada utilizando as soluções estoque colocadas em uma cubeta de caminho óptico de 2 mm. A partir desta curva, e aplicando a lei de Beer-Lambert exposta na Equação (3), foi determinada os espectros de absorvidade molar para todas as amostras, o que pode ser visto na Figura 4.

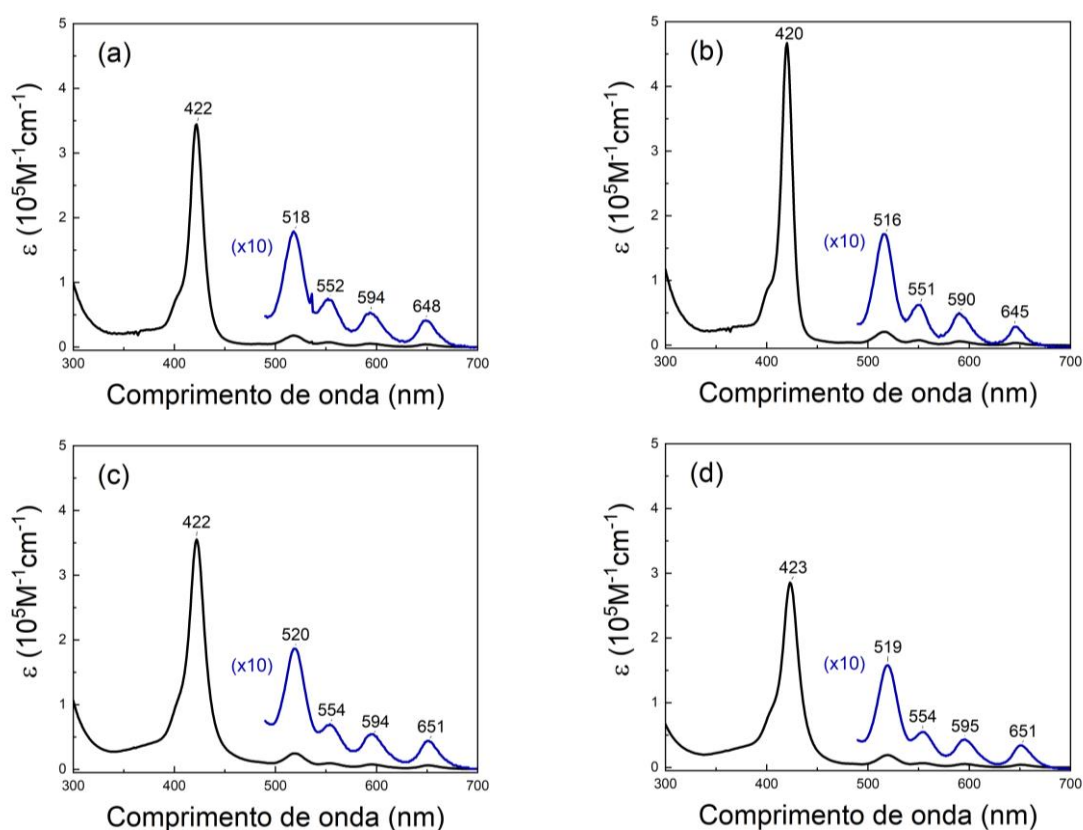


Figura 4 - Espectros de absorvidade molar em função do comprimento de onda para as amostras (a) PLP, (b) PDP, (c) PLP+ e (d) PDP+.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os máximos observados correspondem às bandas de Soret, próximo a 420nm, e às bandas Q's, no intervalo de 500 a 650nm. É possível notar que para as bandas de Soret, a transição mais energética é predominante e define o formato e região do pico, enquanto uma segunda transição mais fraca faz surgir um “ombro” na curva. As bandas Q's surgem como esperado, com 4 transições no total, sendo duas provenientes da degenerescência gerada pelos eixos de simetria e duas provenientes dos níveis vibracionais envolvidos. Para comprimentos de onda mais curtos que 300nm o solvente começa a absorver luz, inviabilizando a medida.

Em seguida, foram obtidos os espectros de emissão de fluorescência e os valores de ϕ_f das amostras por comparação com amostra de referência (Tetrafenilporfirina dissolvida em Tolueno). A cada medida as amostras foram colocadas em uma cubeta de caminho óptico de 1cm, e com concentração diluída a ponto de obter uma absorbância total de 0.15 no comprimento de onda de excitação. Foram feitas aquisições de curvas de emissão entre 600 e 800nm utilizando dois comprimentos de onda de excitação. A determinação do valor de eficiência quântica de fluorescência foi feita a partir da relação do método de Brouwer, dada na Equação (5). A Figura 5 ilustra as curvas de emissão para as amostras em ambos os comprimentos de onda. O valor de ϕ_f calculado são apresentados na Tabela 1.

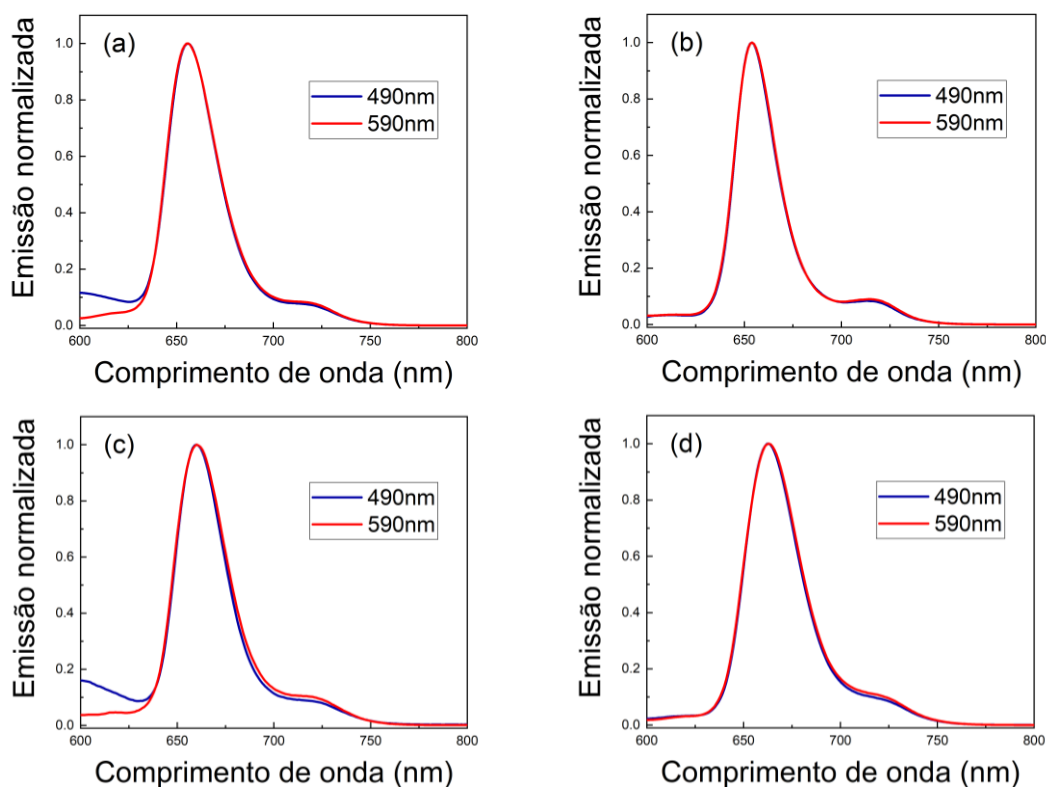


Figura 5 - Curvas de emissão normalizada de fluorescência em função do comprimento de onda para as amostras (a) PLP, (b) PDP, (c) PLP+ e (d) PDP+.

Fonte: Elaborada pelo autor

A determinação do tempo de vida de fluorescência foi feita a partir da observação da intensidade de fluorescência $I(t)$ após a incidência de um pulso curto de luz (pulso laser em 515nm). A amostra foi excitada em uma cubeta de 2mm de caminho óptico e a luz emitida foi captada na direção perpendicular à excitação, passando por um filtro que atenuava a luz do laser proveniente do espalhamento. A medida foi realizada a taxa de repetição de laser de 10Hz ao longo de 10 segundos, totalizando 100 aquisições, das quais foi realizada a média e o desvio padrão. Também foi feita a aquisição da função resposta $IRF(t)$, por medida de espalhamento de um vidro opáco, para aplicação do método de convolução e obtenção da curva de fluorescência $I_f(t)$ sem influência eletrônica. A Figura 6 mostra o decaimento logarítmico das intensidades de fluorescência após aplicação da deconvolução para a amostra neutra PDP. Os valores referentes às demais amostras são apresentados na Tabela 1.

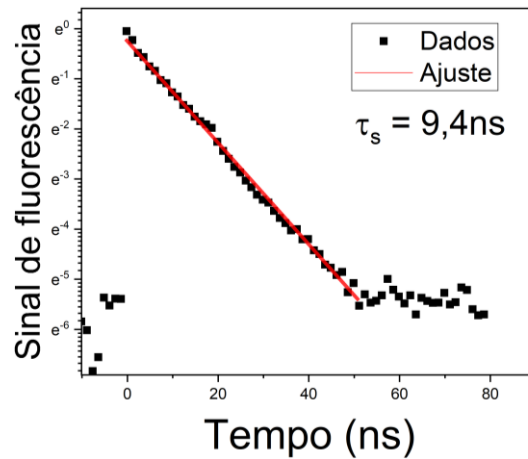


Figura 6 - Curva de decaimento do sinal de fluorescência em função do tempo, depois da deconvolução, para a amostra PLP.

Fonte: Elaborada pelo autor

O valor de ϕ_T foi determinado conforme o método de fluorescência induzida por duplo pulso, detalhado na seção anterior. Primeiramente foi feita a calibração das energias, fazendo a medida da potência do duplo pulso para diferentes configurações de atenuação do laser. Uma vez finalizada a calibração, foi feita a medida da fluorescência induzida por duplo pulso, colocando as amostras em uma cubeta de 2mm e captando a emissão de fluorescência através de uma fibra ótica perpendicular à direção de excitação. A medida foi feita para potências crescentes do laser, até se atingir um regime de saturação da fluorescência, o que permite a aplicação da Equação (12) para a determinação de ϕ_T .

Tabela 1 - Valores de eficiência quântica, tempo de vida de estado singlete e taxas de transição para as amostras PLP, PDP, PLP+ e PDP+ dissolvidas em DMSO.

	PLP	PDP	PLP+	PDP+
ϕ_f (%)	$10,4 \pm 0,9$	$10,3 \pm 0,5$	$1,0 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,6$
ϕ_T (%)	29 ± 3	31 ± 3	20 ± 2	18 ± 2
ϕ_{nr} (%)	61 ± 4	59 ± 4	79 ± 2	74 ± 3
τ_f (ns)	$9,4 \pm 0,1$	$10,7 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$
k_r (μs^{-1})	11 ± 1	$9,6 \pm 0,5$	5 ± 1	$11,1 \pm 0,9$
k_{isc} (μs^{-1})	31 ± 3	29 ± 3	110 ± 20	25 ± 3
k_{nr} (μs^{-1})	64 ± 5	55 ± 5	420 ± 70	103 ± 6

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 7 ilustra o comportamento da intensidade de fluorescência da amostra neutra PDP conforme varia-se energia. As demais amostras apresentaram comportamentos semelhantes a esta, atingindo a saturação para pulsos de cerca de $35 \mu J$. Após essa medida, conhecendo agora ϕ_f , τ_f e ϕ_T , é possível descrever todas as taxas de transição das amostras no regime de nanossegundos, utilizando a Equação (2), sintetizando os resultados na Tabela 1.

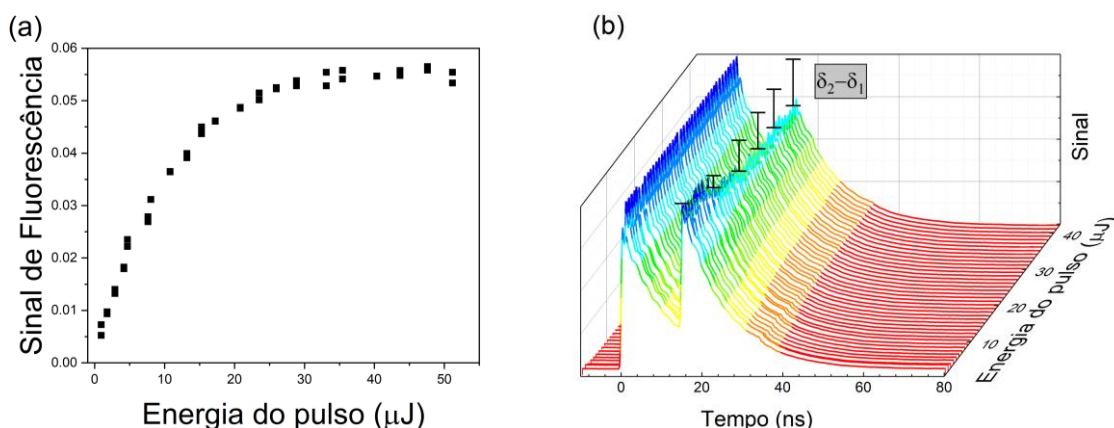


Figura 7 - (a) Evolução da intensidade de fluorescência do primeiro pulso em função do aumento de energia do pulso. (b) Evolução do sinal de fluorescência induzido pelo primeiro e segundo pulso em função do tempo e da energia do pulso.

Fonte: Elaborada pelo autor

Primeiramente nota-se a semelhança entre as taxas de transição das porfirinas neutras, PLP e PDP, a qual também existe em seus espectros de absorção e fluorescência, como foi observado nas Figuras 4 e 5. Esse comportamento é esperado, visto que as moléculas diferem apenas em uma ligação π em seu grupo lateral. Observando as moléculas catiônicas PLP+ e PDP+, no entanto, observam-se mais alterações interessantes. Primeiramente, as taxas não-radiativas das moléculas catiônicas são maiores que as de suas análogas neutras, sendo essa diferença por um fator de 7 na primeira e 2 na segunda. O aumento no valor dessa taxa é algo esperado devido à presença das cargas de iodo e nitrogênio. O íon de iodo permanece livre em solução e é capaz de interagir com moléculas de porfirina no meio, gerando um novo canal não

radiativo de liberação de energia, que irá competir com os outros, levando a um aumento do canal não-radiativo k_{nr} . Esse processo é chamado de extinção dinâmica de fluorescência, já que extingue o sinal de fluorescência ao diminuir o valor de τ_s . (13) Além disso, a presença do cátion de amônio garante a possibilidade de uma interação íon-dipolo entre o solvente e o grupo lateral da porfirina. Essa interação fornece um caminho de liberação de energia entre a molécula em estado excitado e o solvente em nível de energia mais baixo, novamente gerando aumento da taxa k_{nr} .

Quando se observa a taxa de cruzamento intersistemas da molécula catiônica PLP+, percebe-se que esta é maior que a da molécula neutra correspondente. Novamente, o átomo de iodo pode ter influência nessa alteração devido ao efeito do átomo pesado. O efeito do átomo pesado, que deriva das regras de seleção para transições eletrônicas, indica que a probabilidade de ocorrência de uma transição tripleto aumenta com a presença de átomos de número atômico mais alto, isto é, átomos mais pesados que carbono, nitrogênio e oxigênio. O efeito é mais comumente reportado para moléculas que possuem átomos pesados em sua estrutura interna, mas o efeito do átomo pesado gerado por moléculas externas à estrutura também é previsto pela teoria e suportado por dados experimentais. (14,15) Dessa forma, é possível que o átomo de iodo, com massa atômica 9 vezes maior que a do oxigênio, esteja favorecendo a transição de singlete para tripleto. A presença do átomo pesado também costuma diminuir k_r , algo que também é observado na molécula PLP+. É provável que a configuração eletrônica do ligante de PDP+, que possui dois hidrogênios ligados a mais no ciclo do ligante lateral, tenha maior repulsão ao átomo de iodo, enquanto a molécula PLP+ possui interação mais significativa pela ausência desses átomos. Assim, a diminuição de k_r e aumento de k_{isc} , causados pelo efeito do átomo pesado, são observáveis apenas na molécula de ligante pirrolina. Isso também justifica o aumento de k_{nr} ser mais brando na molécula de PDP+, uma vez que esta é capaz de repelir o átomo extintor e diminuir sua influência.

Relacionando os dados obtidos com os presentes na literatura, a eficiência quântica de formação de tripleto se mostrou significativa tanto para as moléculas neutras ($\phi_T \sim 30\%$) quanto para as catiônicas ($\phi_T \sim 20\%$), sendo próxima da Indocianina verde ($\phi_T \approx 17\%$) (16), um fotossensibilizador consolidado em terapia fotodinâmica. Além disso, foi reportado no artigo de síntese dessas porfirinas que as espécies catiônicas são capazes de induzir morte celular de bactérias *E. coli in vitro*, eliminando cerca de 90% da população em 90 minutos de irradiação por luz. Também foi reportado no mesmo artigo sua capacidade de geração de oxigênio singlete, sendo a porfirina PDP+ quase duas vezes mais eficiente neste processo que a PLP+. (10) Isso confirma que a produção de espécies tripleto dessas moléculas é suficiente para

formação de oxigênio singleto e geração de efeito fotodinâmico, mas também mostra que essa produção não é necessariamente proporcional ao valor de ϕ_T . Além disso, é possível que outros efeitos estejam envolvidos na morte celular, como o aumento da temperatura local causado por decaimento não radiativo, já que este é o processo predominante nestas moléculas.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho visou realizar um estudo de espectroscopia óptica em um grupo de moléculas de porfirina recentemente sintetizadas, buscando catalogar suas propriedades fotofísicas de absorção, fluorescência e formação de tripleto, a fim de determinar as taxas de transição da molécula em um regime de nanossegundos. Essa análise busca viabilizar futuros estudos e aplicações para estas moléculas ao fornecer dados sobre suas características ópticas básicas.

Foram preparadas amostras de 4 compostos porfirínicos em solvente Dimetilsulfóxido e determinada a absorvidade molar dessas soluções. A análise foi capaz de observar as bandas de absorção previstas para esta classe de molécula, tendo como base a teoria presente na literatura sobre estruturas tetrapirrólicas. Após isso, foi feita uma análise estacionária do comportamento de emissão por fluorescência dessas amostras, onde foi possível observar um pico predominante de emissão. Através desta mesma análise também foi determinada a eficiência quântica de fluorescência das amostras estudadas, por comparação com uma amostra de referência e aplicação do método de Brouwer. Finalmente, foi feita a determinação da eficiência quântica de formação de tripleto, através da técnica de fluorescência induzida por duplo pulso, que utilizou do tempo de vida longo do estado tripleto para determinar a fração da população que passou por cruzamento intersistemas durante o intervalo de tempo entre dois pulsos de excitação. Através dessas medidas, foi possível determinar as taxas de decaimento radiativo, não-radiativo e taxa de cruzamento intersistemas para todas as moléculas estudadas.

Observando as taxas de decaimento obtidos, foi observado que as moléculas neutras não apresentam diferenças muito significativas em suas propriedades, visto que a estrutura eletrônica difere apenas pela presença ou ausência de ligação π no grupo lateral. Apesar disso, as porfirinas catiônicas apresentaram mudanças significativas no seu comportamento. Foi atestado que o ânion de iodo possui papel fundamental nas propriedades das porfirinas, diminuindo significativamente o decaimento radiativo e aumentando as taxas não radiativa e de cruzamento intersistemas, devido a efeitos de extinção dinâmica de fluorescência e efeito do átomo pesado. Esses efeitos foram mais significativos na molécula PLP+, indicando que os dois hidrogênios ligantes adicionais na molécula de PDP+ devem ajudar a repelir o ânion de Iodo, diminuindo sua influência na molécula.

As moléculas apresentaram taxa de cruzamento intersistemas significativa, concordando com estudos prévios que haviam reportado sua capacidade formação de oxigênio

singleto e indução de morte celular. Apesar dessa confirmação, foi observado que quantidade de formação de tripleto e a capacidade geração de oxigênio singleto não são proporcionais, o que indica que não deve ser possível quantificar uma propriedade a partir da outra. Dessa forma, as porfirinas estudadas apresentaram potencial de aplicação em terapia fotodinâmica, com eficiências de formação de tripleto comparáveis a fotossensibilizadores estabelecidos nesta área. Estudos futuros visam observar como as interações entre os fotossensibilizadores e os meios biológicos influenciam nas propriedades observadas em solução, a fim de compreender melhor o processo que leva à morte celular.

REFERÊNCIAS

- 1 DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. *ANZ Journal of Surgery*, v. 61, n. 5, p. 340–348, May 1991.
- 2 WAGNIERES, G. A.; STAR, W. M.; WILSON, B. C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochemistry and Photobiology*, v. 68, n. 5, p. 603–632, Nov. 1998.
- 3 MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 05, n. 02, p. 105–129, Fev. 2001.
- 4 NYST, H. J. *et al.* Is photodynamic therapy a good alternative to surgery and radiotherapy in the treatment of head and neck cancer? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 6, n. 1, p. 3–11, Mar. 2009.
- 5 KOSHI, E. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: an overview. *Journal of Indian Society of Periodontology*, v. 15, n. 4, p. 323, 2011.
- 6 IWU, C. D.; KORSTEN, L.; OKOH, A. I. The incidence of antibiotic resistance within and beyond the agricultural ecosystem: a concern for public health. *Microbiology Open*, v. 9, n. 9, Sept. 2020.
- 7 GOUTERMAN, M.; WAGNIÈRE, G. H.; SNYDER, L. C. Spectra of porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*, v. 11, n. 1–6, p. 108–127, Jan. 1963.
- 8 KASHA, M. Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday Society*, v. 9, p. 14, 1950.
- 9 VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. *Molecular fluorescence*. New York: Wiley, 2012.
- 10 LADEIRA, B. M. F. *et al.* Cationic pyrrolidine/pyrroline-substituted porphyrins as efficient photosensitizers against *E. coli*. *Molecules*, v. 26, n. 2, p. 464, 17 Jan. 2021.
- 11 BROUWER, A. M. Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 83, n. 12, p. 2213–2228, Aug. 2011.
- 12 SEYBOLD, P. G.; GOUTERMAN, M. Porphyrins. *Journal of Molecular Spectroscopy*, v. 31, n. 1–13, p. 1–13, Jan. 1969l.
- 13 CÁSTAÑO, F. *et al.* On the fluorescence quenching of pyrene by iodine. *Spectrochimica Acta Part A: molecular spectroscopy*, v. 39, n. 1, p. 33–35, Jan. 1983.
- 14 MCGLYNN, S. P.; SUNSERI, R.; CHRISTODOULEAS, N. External heavy-atom spin-orbital coupling effect. I. the nature of the interaction. *Journal of Chemical Physics*, v. 37, n. 8, p. 1818–1824, Oct. 1962.
- 15 BERBERAN SANTOS, M. External heavy-atom effect on fluorescence kinetics. *PhysChemComm*, v. 3, n. 5, p. 18, 2000.
- 16 REINDL, S. *et al.* Quantum yield of triplet formation for indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry*, v. 105, n. 1, p. 65–68, May 1997.