



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAROLINA SALGADO DO NASCIMENTO

Efeitos da substituição de derivados de chalcona nos processos fotofísicos de tetrafenilporfirinas base livre: um estudo experimental

São Carlos
2023

CAROLINA SALGADO DO NASCIMENTO

Efeitos da substituição de derivados de chalcona nos processos fotofísicos de
tetrafenilporfirinas base livre: um estudo experimental

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 –
Instituto de Física de São Carlos

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.

Nascimento, Carolina Salgado do

Efeitos da substituição de derivados de chalcona nos processos fotofísicos de tetrafenilporfirinas base livre: um estudo experimental / Carolina Salgado do Nascimento; orientador Leonardo De Boni – São Carlos, 2023.
28 p.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Físicas e Biomoleculares) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. Espectroscopia. 2. Porfirina. 3. Cruzamento intersistema. I. Título. II. De Boni, Leonardo, orient.

RESUMO

Este projeto tem como objetivo a caracterização e análise das propriedades fotoquímicas e fotofísicas de um grupo de tetrafenilporfirinas contendo um ligante chalcona lateral diferente para cada molécula no âmbito linear e não linear. Inicialmente, foram preparadas cinco soluções com as amostras nomeadas de CP1, CP2, CP3, CP4 e CP5 dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO). Foram realizadas análises dos espectros de absorção e fluorescência estacionária dessas amostras, e as eficiências quânticas de fluorescência foram determinadas pelo método de Brouwer. O estudo de fluorescência resolvida no tempo permitiu a determinação dos tempos de vida de fluorescência e da eficiência quântica de formação de triplete, em uma janela temporal de nanosegundos, que puderam ser obtidos através de técnicas desenvolvidas pelo Grupo da Fotônica, com destaque para a técnica de fluorescência induzida por duplo pulso (DPF) que possibilitou a análise do cruzamento intersistema das amostras. Dessa forma, foi possível uma maior compreensão da influência da estrutura química das moléculas nos processos de relaxamento radiativo, não radiativo, e de cruzamento intersistema.

Palavras-chave: Espectroscopia, porfirina, cruzamento intersistema.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	MOTIVAÇÃO	7
1.2	BASE TEÓRICA	8
2	MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1	ESPECTROSCOPIA ESTACIONÁRIA	16
2.2	FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO	19
2.2.1	OBTENÇÃO DO DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA	19
2.2.2	TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR DUPLO PULSO	20
3	RESULTADOS	21
4	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
5	REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

1.1 MOTIVAÇÃO

A compreensão das características fotofísicas e fotoquímicas de moléculas fotossensibilizadoras têm se tornado cada vez mais relevante no âmbito científico. A capacidade de absorção de luz leva a respostas distintas para cada grupo e variação de moléculas, resultando inevitavelmente na criação de novas tecnologias com ampla aplicação em diversos setores, incluindo engenharia e medicina. Nesse sentido, um grupo de fotossensibilizadores, conhecidos como porfirinas, vem sendo amplamente estudados. Essa classe de moléculas é identificada pela sua estrutura molecular particular tetrapirrólica, que possibilita uma diversidade de propriedades fotofísicas e fotoquímicas, quando grupo doadores ou aceitadores de carga são ligados ao anel principal (anel porfirínico). O sucesso dessa classe de moléculas foi evidenciado com a implementação da Photofrin^{©1}, ou porfímero sódico, em 1993 para o tratamento de diversos tipos de câncer. Com isso, o interesse científico por essa classe de compostos tem aumentado significativamente nas últimas décadas, impulsionando a busca por novos e aprimorados fotossensibilizadores.

O uso desse fármaco inclui a terapia fotodinâmica, a qual envolve a administração do composto químico no organismo, seguida da irradiação de luz no tecido oncológico, no qual a substância se acumula. Ao interagir com a luz, são formadas espécies reativas de oxigênio, que causam morte celular localizada, proporcionando uma alternativa minimamente invasiva comparada a outros métodos disponíveis.² Além de seu uso na oncologia, a terapia fotodinâmica também se mostra extremamente relevante no tratamento de superbactérias³, uma vez que aborda a problemática do uso excessivo de antibióticos. O uso indiscriminado de antibióticos tem levado ao desenvolvimento alarmante de resistência bacteriana, tornando muitos antibióticos tradicionais ineficazes.⁴ Como o método de inativação bacteriana da terapia fotodinâmica se baseia na oxidação não seletiva de biomoléculas por um agente reativo, não há a criação de resistência como ocorre com compostos que inativam ou impedem a reprodução da bactéria a partir de alvos específicos e de forma repetitiva ao longo de dias.

A eficácia de um composto nesse tipo de tratamento pode ser primeiramente avaliada observando a dinâmica do estado tripleto dessas moléculas porfirínicas após a absorção da luz. O estado tripleto possui um tempo de duração longo, da ordem de microssegundos, permitindo que a energia armazenada nele possa interagir com outras moléculas. Uma dessas formas de interação é a tripleto-triplet e pode ocorrer entre uma molécula que foi excitada e passou por

cruzamento intersistema entre o estado excitado singlet e o triplete e o oxigênio triplete, como é encontrado naturalmente. Essa interação pode gerar o oxigênio singlet altamente reativo, responsável por causar a morte celular, característica que é explorada principalmente por fotossensibilizadores de segunda geração, como as porfirinas, que possuem alta capacidade de cruzar para o estado triplete devido ao grande acoplamento spin-órbita gerada pela ressonância em seu anel tetrapirrólico.

Entretanto, obter informações sobre este estado especial não é simples devido a ausência de emissão de sinal coletável, tornando complexa a determinação de suas características, o que faz esse tipo de medida ser notável, além de relevante. Consciente disso, o estudo das transições eletrônicas entre estados excitados de energia, e de sua dependência com a estrutura química do composto, bem como destas com o meio, é importante para o entendimento e determinação da eficácia da geração de oxigênio singlet (reativo), as quais são essenciais para determinar se um composto possui as propriedades necessárias para o processo. Dada a variedade de porfirinas ainda não avaliadas e sendo sintetizadas, além da importância desse grupo de moléculas na comunidade científica, há um grande interesse em continuar a pesquisa destas, tanto em termos de suas propriedades ópticas lineares e de suas dependências.

1.2 BASE TEÓRICA

Nesta seção, serão abordados os conceitos teóricos estudados envolvendo a espectroscopia de absorção, espectroscopia de fluorescência estacionárias e espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo, necessários para o entendimento da interação da luz com as porfirinas e, assim, na avaliação dos processos de transferência de energia que media a geração do oxigênio reativo.

Primeiramente, o movimento de um elétron em um estado de energia para outro de diferente energia é chamado de transição eletrônica. Ele ocorre em decorrência da absorção de um fóton por uma molécula, que ao aumentar sua energia interna, precisa compensá-lo e o faz pelo salto quantizado em energia para um elétron, o qual vai a um orbital molecular de maior energia a partir de um orbital molecular de menor energia. Quando isso ocorre, é dito que a molécula passou do seu estado fundamental de energia para um estado excitado.

Porfirinas apresentam dois tipos de bandas de absorção notáveis em seu espetro localizado no visível, que advém especificamente da sua estrutura de seu anel central. O modelo de quatro orbitais de Gouterman⁵ explica que a sua banda de maior intensidade, chamada de banda de Soret, representa a transição entre o estado molecular ocupado de maior energia, HOMO (a_{1u}),

para o estado molecular desocupado de menor energia, LUMO (e_g). As porfirinas naturalmente possuem um estado HOMO+1 (a_{2u}), de energia muito próxima ao estado HOMO. A transição de HOMO+1 para LUMO gera as bandas de menor energia, chamadas bandas Q. No caso de porfirinas sem ligantes centrais (base livre), as bandas Qs são atribuídas às transições $b_{1u} \rightarrow b_{2g}$ e $b_{1u} \rightarrow b_{3g}$, que ocorrem dada sua simetria D_{2h} . Essas transições são um desdobramento da transição $a_{2u} \rightarrow e_g$ de porfirinas com ligante central metálico (metaloporfirinas) de simetria D_{4h} , dado que a remoção do ligante e adição de H quebra a simetria da molécula. Essa diminuição da simetria quebra a degenerescência do estado LUMO, o que gera o aumento do número de transições possíveis e, portanto, aumento do número de bandas. A Figura 1 ilustra as transições eletrônicas mencionadas.

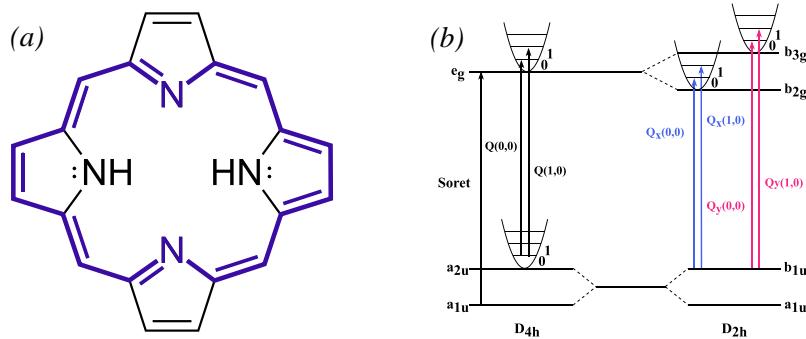


Figura 1 - (a) Macroscopo tetrapirrólico de uma porfírina. (b) Transições eletrônicas principais na região do visível em porfirinas.

Fonte: Adaptada de GOUTERMAN⁵.

O estudo da espectroscopia de absorção faz uso de uma lei que relaciona a absorbância à concentração da amostra em solução c , o caminho óptico percorrido pela luz (l) e a seção de choque de absorção molar (conhecido como absorvidade molar $\varepsilon(\lambda)$). Essa lei é a de Beer-Lambert⁶, descrita na Eq. (1) para quantificar a absorbância da luz $A(\lambda)$ de uma molécula.

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl \quad (1)$$

Em decorrência da absorção de energia, a molécula estará em um estado de maior energia. Naturalmente a molécula tenderá a minimizar sua energia, emitindo luz ou realizando outros dissipativos, e assim ocorre a relaxação da molécula, voltando para o seu estado fundamental de energia. Existem diversos processos de relaxação que podem ocorrer, seja por relaxações não-radiativas como a conversão interna, relaxação vibracional e cruzamento intersistemas (conversão em estados tripletos), ou por transições radiativas como a fluorescência e fosforescência.⁷ O diagrama de Jablonski, representado na Figura 2(a), mostra a dinâmica dos tipos de relaxação que podem ocorrer, e a sua simplificação, na Fig. Figura 2(b), mostra as taxas correspondentes para cada processo.

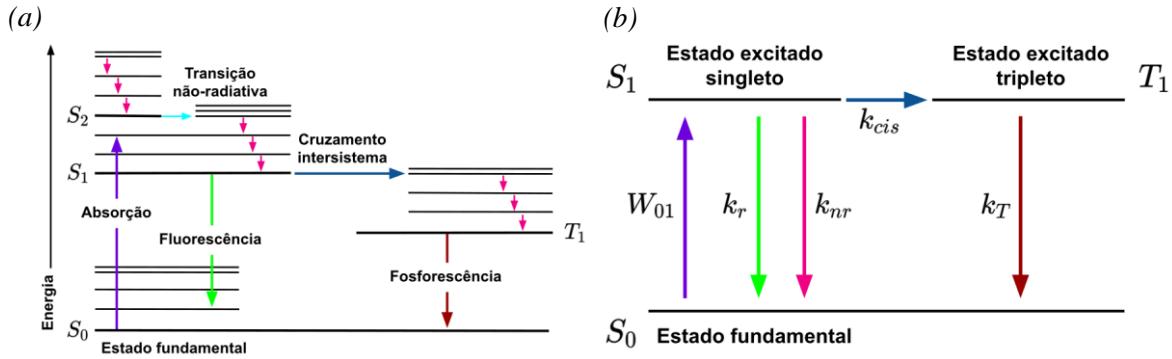


Figura 2 - (a) Diagrama de Jablonski representando as possíveis transições entre os estados fundamental, singuleto e triplexo. (b) Diagrama de Jablonski simplificado contendo taxas referentes a cada tipo de transição. Fonte: Adaptada de GOUTERMAN⁵.

Dentre os processos relaxativos existentes, a fluorescência possui o comportamento mais simples de ser estudado, pois sua emissão é de fácil detecção, diferente de outros processos, como os não radiativos, que apresentam maior dificuldade de medição direta. Portanto, a análise da fluorescência se mostra vantajosa, trazendo algumas características da molécula a ser estudada. Entre essas, é interessante a quantificação da eficiência quântica de fluorescência (ϕ_f), definida pela fração de números de fótons emitidos e número de fótons absorvidos pela molécula. Além dele, o espectro de emissão de fluorescência no regime estacionário, sem influência temporal, também se mostra relevante, pois ao analisar a quantidade de picos de intensidade e o seu deslocamento, junto a outros fatores, pode-se compreender melhor o comportamento característico de uma molécula⁸ e a sua interação com o meio.

Após estudar a molécula em um regime estacionário, é importante entender como a sua intensidade de fluorescência se comporta no tempo após excitá-la com um pulso laser curto. No instante inicial após a excitação com um único pulso intenso, haverá um número N_{S_1} de moléculas no estado excitado de energia. A variação da população de moléculas no estado excitado pode ser dada estudando o decaimento da população em função do tempo, descrito pela Eq. (2).

$$-\frac{dN_{S_1}}{dt} = (k_r + k_{nr} + k_{cis})N_{S_1} \quad (2)$$

sendo que as constantes k_r , k_{nr} e k_{cis} representam as taxas de decaimento radiativo, não-radiativo e cruzamento intersistema, respectivamente, das moléculas no primeiro estado singuleto excitado. Resolvendo esta equação diferencial, obtém-se:

$$N_{S_1}(t) = N_{S_1}(0)e^{-\frac{t}{\tau_f}}, \quad (3)$$

em que τ_f é definido como tempo de vida de fluorescência, e representa uma simplificação do inverso da soma das taxas de decaimento:

$$\tau_f = \frac{1}{k_r + k_{nr} + k_{cis}} \quad (4)$$

Retornando à definição da eficiência quântica de fluorescência, pode-se escrevê-la em termos das taxas, em que ela será a razão da energia liberada pelo processo radiativo de fluorescência e da energia total absorvida no estado singuleto da molécula⁹, como descrito pelo Eq. (5):

$$\phi_f = \frac{k_r}{k_r + k_{nr} + k_{cis}} = k_r \tau_f \quad (5)$$

Com os valores de ϕ_f e τ_f conhecidos, e com a Eq. (5), é possível recuperar a taxa radiativa.

Buscando finalizar a descrição dos processos relaxativos, explora-se a eficiência quântica de formação de estado triplexo (ϕ_T), como é conhecida na literatura, que trata da taxa de cruzamento intersistema do primeiro estado excitado singuleto para o estado excitado triplexo, e se dá de forma similar a ϕ_f . No entanto, para obtê-la se torna mais complicado, dado que esse processo não emite sinal, e, portanto, uma análise do preenchimento e esvaziamento dos estados de forma mais profunda se torna necessária.

Assim, considerando os equipamentos utilizados e a natureza das moléculas de porfirina, é possível simplificar o sistema incluindo apenas o estado fundamental (S_0), o primeiro estado excitado singuleto (S_1) e o primeiro estado excitado triplexo (T_1), como presente na Figura 2(b). Despreza-se as relações de estados energéticos mais altos devido a velocidade com que as moléculas decaem deles para o primeiro estado excitado singuleto, com um tempo de decaimento de uma ordem inferior a picossegundos¹⁰, em relação ao regime de tempo dos experimentos realizados de nanossegundos. Da maneira análoga, despreza-se o decaimento dos estados vibracionais do estado eletrônico singuleto em razão do seu tempo ser inferior a picossegundos. Além disso, o esvaziamento do estado triplexo, correspondente a taxa k_T , também é desconsiderado, pois a ordem de grandeza do decaimento do triplexo é muito maior que o regime de nanossegundos que está sendo trabalhado aqui, considerando então $k_T \ll k_r, k_{nr}, k_{cis}$.¹¹ Dessa forma, monta-se as equações de taxa:

$$\begin{aligned}
 \frac{dn_0(t)}{dt} &= -n_0(t)W_{01} + n_1(t)k_r + n_1(t)k_{nr} \\
 \frac{dn_1(t)}{dt} &= n_0(t)W_{01} - n_1(t)k_r - n_1(t)k_{nr} - n_1(t)k_{cis} \\
 \frac{dn_T(t)}{dt} &= n_1(t)k_{cis}
 \end{aligned} \tag{6}$$

Aqui, n_0 , n_1 e n_T refletem a razão de moléculas presentes nos estados S_0 , S_1 e T_1 respectivamente, em que, a soma total desses valores resulta em 1. A variação da população em cada estado de energia pode ser representada a partir da derivada temporal de seu n respectivo. Ao popular um estado, se soma determinado valor de n a ele, ao despopular, se subtrai tal valor. Temos que $n_0 W_{01}$ representa as moléculas que foram excitadas de $S_0 \rightarrow S_1$, os termos $n_1(t)k_r$ e $n_1(t)k_{nr}$ correspondem aos decaimentos de $S_1 \rightarrow S_0$ e $n_1(t)k_{cis}$ representa a transição de $S_1 \rightarrow T_1$. Considerando τ_f , como definido na equação Eq. (4), as equações de taxa podem ser escritas como:

$$\begin{aligned}
 \frac{dn_0(t)}{dt} &= -n_0 W_{01} + \frac{n_1(t)}{\tau_f} - n_1(t)k_{cis} \\
 \frac{dn_1(t)}{dt} &= n_0 W_{01} - \frac{n_1(t)}{\tau_f} \\
 \frac{dn_T(t)}{dt} &= n_1(t)k_{cis}
 \end{aligned} \tag{7}$$

Buscando resolver essas equações, supomos um sistema que irá receber um pulso laser de largura temporal de $\sim 1\text{ps}$ no tempo $t = 0$. Assumindo que os tempos de relaxação ocorrem na ordem de nanosegundos, pode-se considerar que essa excitação pelo feixe luminoso ocorre instantaneamente. Assim, durante a excitação ocorre apenas o efeito de absorção, como pode ser visto em:

$$\begin{aligned}
 \frac{dn_0(t)}{dt} &= -n_0 W_{01} \\
 \frac{dn_1(t)}{dt} &= n_0 W_{01} \\
 \frac{dn_T(t)}{dt} &= 0
 \end{aligned} \tag{8}$$

Nos instantes seguintes iniciam-se os efeitos de relaxação, e o sistema segue:

$$\begin{aligned}
\frac{dn_0(t)}{dt} &= \frac{n_1(t)}{\tau_f} - n_1(t)k_{cis} \\
\frac{dn_1(t)}{dt} &= -\frac{n_1(t)}{\tau_f} \\
\frac{dn_T(t)}{dt} &= n_1(t)k_{cis}
\end{aligned} \tag{9}$$

Analizando o grupo de Eq. (8), temos que a taxa de absorção W_{01} é dependente da seção de choque de absorção, σ_{01} , da molécula da transição $S_0 \rightarrow S_1$, assim como da energia $h\nu$ do fóton responsável pela excitação da molécula.

$$\begin{aligned}
\frac{dn_0(t)}{dt} &= -n_0 W_{01} \\
\int_0^{\Delta t} \frac{dn_0(t)}{n_0(t)} &= -\frac{\sigma_{01}}{h\nu} \int_0^{\Delta t} I(t)
\end{aligned} \tag{10}$$

Podemos considerar que a energia completa do pulso irá atingir a amostra, fazendo com que, nesse instante, a integral da intensidade $I(t)$ seja equivalente a fluência total (F) do pulso.

$$\begin{aligned}
\int_0^{\Delta t} \frac{dn_0(t)}{n_0(t)} &= -\frac{\sigma_{01}}{h\nu} F(t) \\
n_0(\Delta t) &= \exp\left(-\frac{\sigma_{01}}{h\nu} F\right)
\end{aligned} \tag{11}$$

Assim, pode-se definir a variação populacional como $\delta_p = 1 - \exp\left(-\frac{\sigma_{01}}{h\nu} F_p\right)$, sendo $p = 1$ e $p = 2$ correspondente a cada pulso laser de excitação. Visando a resolução das equações nestas condições, dividem-se três momentos imediatos: (1) instante após primeira excitação, (2) instante antes da segunda excitação e (3) instante após segunda excitação. Antes da primeira excitação, considera-se que a totalidade de moléculas se encontra no estado fundamental, portanto $n_0(0) = 1$. Iniciando o processo de duplo pulso, temos no instante (1):

$$\begin{aligned}
n_0(t_1) &= 1 - \delta_1 \\
n_1(t_1) &= \delta_1 \\
n_T(t_1) &= 0
\end{aligned} \tag{12}$$

No instante (2), imediatamente antes do segundo pulso, no tempo $t_2 = \Delta T$, as populações serão:

$$\begin{aligned}
n_0(t_2) &= n_0(t_1) + n_1(t_1) \left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_f} \right) \right) (1 - \phi_T) \\
n_1(t_2) &= n_1(t_1) \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_f} \right) \\
n_T(t_2) &= n_1(t_1) \left(1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_f} \right) \right) \phi_T
\end{aligned} \tag{13}$$

Finalmente, no instante (3), imediatamente após o segundo pulso:

$$\begin{aligned}
n_0(t_3) &= n_0(t_2)(1 - \delta_2) \\
n_1(t_3) &= n_1(t_2) + n_0(t_2)\delta_2 \\
n_T(t_3) &= n_T(t_2)
\end{aligned} \tag{14}$$

A fluênci, F_p , contida em δ_p pode mudar de um pulso em relação ao outro, necessitando dessa separação. Essa diferença deixa de ser relevante para fluências mais altas, pois há um limite de quanta luz as moléculas podem absorver realizando a transição de $S_0 \rightarrow S_1$, que é atingido ao excitar toda a população do estado fundamental de forma a atingir um regime de saturação. Logo, adicionar mais intensidade de luz não trará grandes alterações entre os pulsos. Além disso, nesse regime de alta fluênci, tem-se $\delta_p \rightarrow 1$.

Considerando que a intensidade de fluorescênci tem proporcionalidade com a despopulação do estado singlet $I_f(t) \propto \frac{dn_1(t)}{dt}$, esta que se relaciona com a sua população na forma $\frac{dn_1(t)}{dt} = \frac{n_1(t)}{\tau}$, pode-se conectar as diferenças entre as intensidades dos pulsos e entre as populações, definindo $r_f = \frac{I_f^2 - I_f^1}{I_f^2} = n_1(t_3) - n_1(t_2)$. Assim, pode-se isolar a eficiênci quântica de formação de triplete ϕ_T presente em $n_1(t_3)$, de forma que as intensidades de fluorescênci se relacionem com a propriedade fotofísica buscada.

$$\phi_T = 1 - \frac{r_f}{1 - \exp \left(-\frac{\Delta T}{\tau_f} \right)} \tag{15}$$

Portanto, a Eq. (15) permite determinar a eficiênci quântica de formação de triplete de forma experimental se baseando na intensidade dos picos de intensidade do sinal da fluorescênci decaindo com o tempo. É importante ressaltar que a relação é válida apenas para um regime no qual a fluênci do pulso laser é suficientemente grande a ponto de esvaziar todo a população do estado fundamental.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho faz o estudo de 5 porfirinas inéditas, ainda não caracterizadas quanto à algumas propriedades fotofísicas, inclusive a eficiência quântica de formação de triplexo. Esses compostos foram sintetizados pelo Grupo de Química da Universidade de Aveiro, Portugal, da Professora Maria Amparo Ferreira Faustino. Essas moléculas tem a sua base livre e possuem um grupo fenil nas posições 5, 10, 15 e 20, o que as torna pertencentes ao grupo de tetrafenilporfirinas, e podem ser diferenciadas por seus ligantes laterais, derivados de chalcona, localizados na posição 2 do anel central (veja Figura 3). Os grupos laterais se diferenciam a partir do anel de cada derivado, possuindo as variações de um pirrol, fenil, fenil ligado a dióxido de nitrogênio e fenil ligado a metil e acetilpiridina.

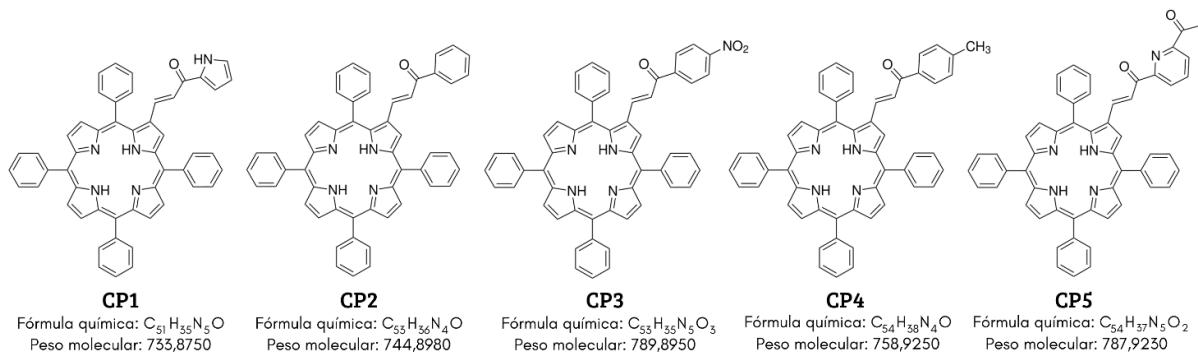


Figura 3 - Estrutura molecular das amostras de tetrafenilporfirinas com ligantes derivados de chalcona diferenciados na adição do pirrol (CP1), fenil (CP2), fenil ligado a dióxido de nitrogênio (CP3), fenil ligado a metil (CP4) e acetilpiridina (CP5).

Fonte: Adaptada de MOURA^{12,13}.

O primeiro passo para a caracterização das moléculas de interesse consiste no preparo das soluções de porfirinas a partir das massas moleculares dos compostos, como determinadas em seus artigos de síntese.^{12,13} É realizada a dissolução dos compostos no solvente dimetilsulfóxido (DMSO) utilizando uma balança de precisão e micropipeta para determinação da massa do soluto e volume do solvente, e com o auxílio de um ultrassom e uma chapa aquecedora para dissolução completa. Vale ressaltar que a concentração foi mantida na ordem de 10⁻⁵M, de forma a evitar a agregação do soluto, permitindo a confiabilidade das medidas. A escolha do solvente se dá em razão de ser um composto orgânico com baixa toxicidade e alta miscibilidade com água, o que o torna favorável para ampla aplicação com fotossensibilizadores, além de que ele não possui absorção ou emissão de fluorescência nos comprimentos de onda a serem analisados e, portanto, não interfere na aquisição dos dados.

2.1 ESPECTROSCOPIA ESTACIONÁRIA

Com as soluções estoque preparadas, são realizadas medidas de absorção de luz das amostras contidas em uma cubeta de quartzo fundido de caminho óptico $l = 2\text{mm}$ utilizando um espectrômetro comercial Shimadzu 1800 UV-Vis. O funcionamento do espectrômetro consiste na relação da luz de incidência (I_0) monocromática, formada a partir da associação de uma lâmpada e uma rede de difração, e da luz transmitida (I) pela amostra, que resulta na absorbância (A) da solução. Sabendo que a solução obedece a lei de Beer-Lambert devido à baixa concentração, pode-se obter a absorvidade molar (ε) da porfirina dissolvida em DMSO.

Para realizar as medidas de fluorescência no estado estacionário, foi utilizado um fluorímetro comercial Hitachi F-7000 com as amostras inseridas em uma cubeta de quartzo de caminho óptico $l = 1\text{cm}$. Uma fonte de luz monocromática excita a solução e o perfil de emissão de fluorescência é captado perpendicularmente à fonte de emissão. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de $\lambda = 430\text{nm}$, próxima ao comprimento de onda equivalente à banda B de absorção das porfirinas, para que o sinal seja bem intenso, e foram coletadas as curvas de fluorescência de 530nm a 900nm .

Visando obter os dados necessários para próxima etapa, foi necessário realizar uma segunda diluição das amostras para que seus valores de absorbância no comprimento de onda de excitação escolhido para captar a fluorescência, sendo este $\lambda_{ex} = 525\text{nm}$, sejam similares e baixas, por volta de $A = 0,1$, procurando minimizar a reabsorção da luz emitida por elas mesmas. A alteração do comprimento de onda de excitação em relação ao utilizado anteriormente não muda o espetro de emissão de fluorescência da amostra, concordando com a regra de Kasha¹⁴, e apenas diminui a sua intensidade devido a menor absorção em 525nm . Dessa forma obteve-se novamente os espetros de absorção e de fluorescência, que serão utilizados para o cálculo da eficiência quântica de fluorescência (ϕ_f).

O cálculo de eficiência quântica foi realizado com o método de Brouwer.¹⁵ Ele consiste na utilização de uma molécula caracterizada previamente como referência, comparando-a com a amostra de interesse. A referência utilizada foi a tetrafenilporfirina dissolvida em tolueno (Tol), que possui a eficiência quântica de fluorescência em $\phi_f^{ref} = 11\%$.¹⁶ A relação desse método é definida pela Eq. (16).

$$\phi_f = \phi_f^{ref} \times \frac{\int_{\lambda_0}^{\lambda} F(\lambda) d\lambda}{\int_{\lambda_0}^{\lambda} F_{ref}(\lambda) d\lambda} \times \frac{f_{ref}(\lambda)}{f(\lambda)} \times \frac{n^2}{n_{ref}^2}. \quad (16)$$

Nela são utilizados os valores da absorbância em $\lambda_{ex} = 525nm$ para determinar $f = 1 - 10^{-A(\lambda_{ex})}$, representando a fração de luz não absorvida pela amostra neste comprimento de onda. O espectro de fluorescência das amostras no intervalo de $630 - 900nm$ são integrados computacionalmente gerando $F(\lambda)$. Os índices de refração dos solventes são dados por $n = n_{DMSO} = 1.479$ e $n_{ref} = n_{Tol} = 1.497$.^{17,18}

2.2 FLUORESCÊNCIA RESOLVIDA NO TEMPO

2.2.1 OBTENÇÃO DO DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA

Para a determinação do tempo de vida de fluorescência, as amostras de interesse foram diluídas e inseridas em uma cubeta de quartzo fundido de caminho óptico $l = 2mm$. Foi utilizado um laser Pharos pulsado com largura temporal da ordem de 200 femtossegundos, cujo feixe fundamental é de $\lambda = 1030nm$ e a partir de um cristal gerador de segundo harmônico pode ser dobrado para $\lambda = 515nm$, comprimento de onda utilizado no experimento. A amostra foi excitada com esse feixe de luz após ele ser focalizado por um conjunto de lentes e espelhos. A emissão de fluorescência da solução foi coletada por uma fibra óptica e direcionada para um fotodetector acoplado a um osciloscópio de 1 GHz, no qual é possível observar o decaimento da fluorescência no tempo em tempo real. Essa informação é então armazenada no computador para pós-processamento. Foram coletadas curvas do decaimento da fluorescência no tempo com a taxa de repetição do laser diferentes, 1Hz e 10Hz, ambas baixas, utilizando 90% de atenuação da potência máxima do laser, e a amostra foi posicionada de maneira a estar a uma certa distância da região focal do feixe. Dessa forma, evita-se a degradação devido a intensidade do feixe e a geração de efeitos não lineares do solvente.

O decaimento de fluorescência obtido pela técnica experimental não representa o decaimento real devido a interferência eletrônica do equipamento. Portanto, é preciso a obtenção da função resposta do equipamento, e para isso, foi realizada uma medida do espalhamento de luz do feixe após passar por um material de vidro fosco. Com as curvas da função resposta instrumental e do decaimento experimental da fluorescência, pode-se realizar uma convolução de sinais¹⁹, gerando a resposta temporal real. Essa convolução pode ser representada como:

$$I_{mod} = F_{mod} * IRF, \quad (17)$$

sendo I_{mod} a curva experimental, F_{mod} a função teórica sem a influência da resposta temporal, ou seja, a curva de decaimento real da fluorescência, e o IRF a função da resposta temporal do

instrumento. O cálculo da convolução de sinais foi feito de forma computacional, com um software desenvolvido pelo Grupo da Fotônica no LabView. Nele, obtém-se o decaimento do número de elétrons do estado excitado através de funções exponenciais.

2.2.2 TÉCNICA DE FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR DUPLO PULSO

Visando a medida da eficiência quântica de formação de triplete (ϕ_T), foi utilizado o mesmo laser da técnica de fluorescência resolvida no tempo, com o comprimento de onda de excitação $\lambda = 515nm$. Configura-se o sistema laser de forma a liberar dois pulsos de $1ps$ por ciclo, espaçados temporalmente em $15ns$ entre cada um deles. A taxa de repetição do laser foi mantida a $10Hz$, de forma a minimizar os efeitos de fotodegradação limitando a potência que será recebida pela amostra. O aparato experimental também conta com um sistema de lentes para controlar quanto de volume será excitado dentro da cubeta de quartzo fundido, a qual possui caminho óptico de $l = 2mm$. O sinal da fluorescência provindo da amostra é captado a partir de uma fibra óptica posicionada perpendicularmente ao feixe incidente, acoplada a um filtro óptico responsável por remover o comprimento de onda de excitação. Esse sinal é direcionado a um fotodetector para finalmente ser observado em tempo real em um osciloscópio, que mostrará um comportamento de duplo decaimento de fluorescência.²⁰ Visando calibrar o sistema, é realizada a medida da potência do feixe de laser que incidirá na amostra a partir de um potenciômetro térmico. Essa configuração experimental pode ser observada de forma esquemática na **Figura 4 - Aparato experimental para a medida de fluorescência induzida por duplo pulso**.

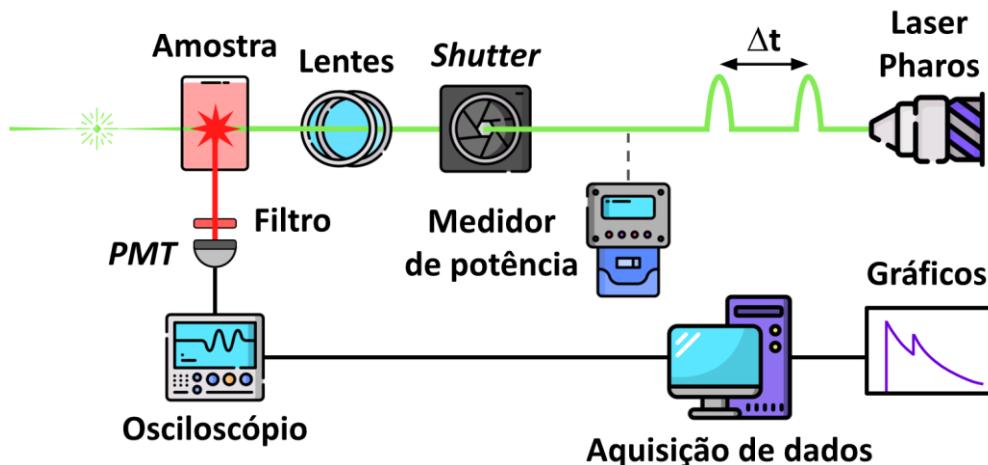


Figura 4 - Aparato experimental para a medida de fluorescência induzida por duplo pulso, contendo laser de pulsos ultracurtos modelo PHAROS, medidor de potência, obturador de feixe (shutter), sistema de lentes, filtro vermelho, fotomultiplicadora (PMT) e sistema de aquisição de dados.

Fonte: Elaborada pela autora.

Utilizando o sistema devidamente calibrado, são realizadas várias medidas para cada amostra, aumentando a potência recebida pela amostra de passo a passo. Os dados obtidos por essas medidas são tratados a partir de um programa no software LabView, desenvolvido pelo Grupo da Fotônica. Devido a resposta instrumental do equipamento, uma convolução de sinais, como a realizada para a técnica de decaimento de fluorescência de pulso único, também se faz necessária.

A Figura 5 mostra dois exemplos de conjunto de dados de fluorescência por duplo pulso, sendo em (a) apresentadas as curvas normalizadas da fluorescência resolvida no tempo para a amostra duplamente excitada. Essas curvas são obtidas para diversas energias de pulso e em (b) são representadas as duas curvas referentes à fluorescência da primeira e segunda excitação que foram separadas pelo programa.

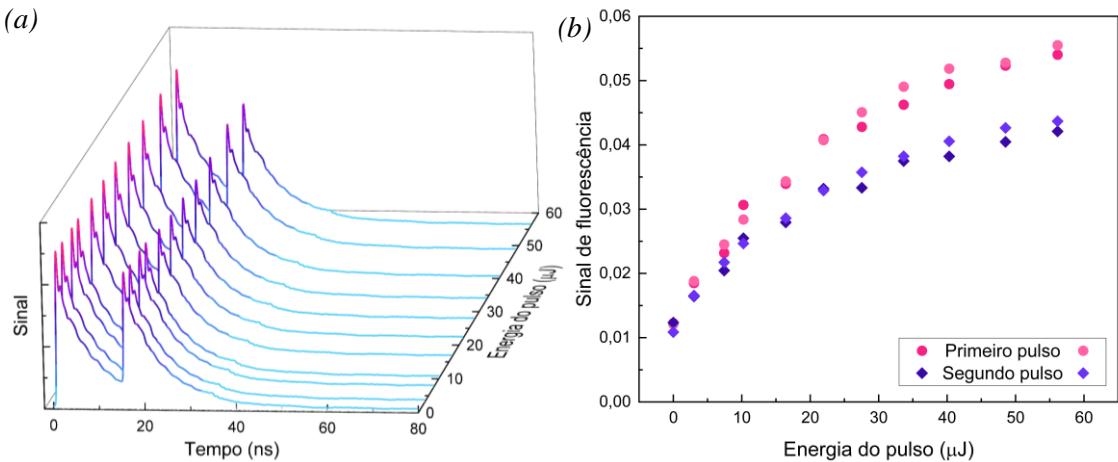


Figura 5 - (a) Evolução do sinal de fluorescência normalizado induzido pelo primeiro e segundo pulso em função do tempo e da energia do pulso. (b) Evolução da intensidade de fluorescência para cada pulso em função do aumento de energia do pulso.

Fonte: Elaborada pela autora.

A intensidade de fluorescência do segundo pulso será sempre inferior à intensidade do primeiro em razão da população deslocada do primeiro estado excitado e mantida no estado tripleto durante o regime de tempo das medidas. A partir dessas curvas, é possível calcular a eficiência quântica de formação de tripleto ϕ_T .

3 RESULTADOS

Utilizando os procedimentos descritos na sessão 2, as soluções para as cinco porfirinas foram preparadas e, em seguida, foram obtidas as curvas de absorvidade molar e de fluorescência normalizada de cada uma das amostras em DMSO, como pode-se observar na Figura 6.

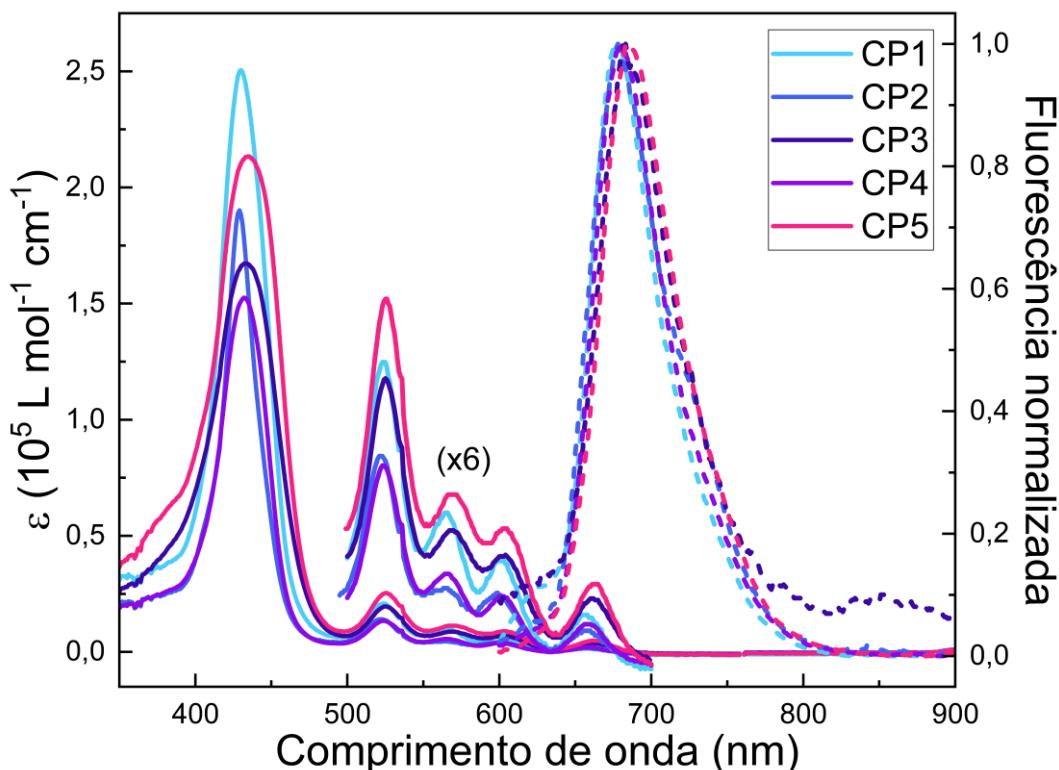


Figura 6 - Espectros de absorvidade molar (linha sólida), com aumento de 6x para região de bandas Qs, e emissão de fluorescência normalizada (linha tracejada) em função do comprimento de onda para as amostras CP1, CP2, CP3, CP4 e CP5.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os espectros de absorvidade molar mostrados na Fig. 6 apresentam um comportamento típico de uma porfirina base livre. Uma banda de Soret (banda B) de um pico bem enunciado em aproximadamente 425nm e quatro bandas Qs definidas, entre 500 e 700nm, podendo ser vistas com maior distinção no aumento de 6 vezes do sinal representado. Já a emissão de fluorescência presente no mesmo gráfico ilustra o comportamento típico de porfirinas.

Observando os comprimentos de onda máximo para cada uma das bandas, é notável que não houve grande mudança nesses valores entre as porfirinas estudadas, mostrando que os ligantes de chalconas, mesmo sendo distintos entre si, não influenciaram significativamente no

deslocamento das bandas. Entretanto, é possível notar que as porfirinas apresentam um alargamento espectral da banda de Soret e os valores da absorvidade molar máximos (no pico de Soret) diminuíram consideravelmente se comparados com a da tetrafenilporfirina, com um valor de $\epsilon = 5,34 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$.²¹ Isso se deve ao fato de que os grupos de chalcona ligados ao anel porfirínico diminuem a sua simetria.²²

Os espectros de fluorescência foram pouco influenciados quanto a posição, isso pode ser entendido pelo fato de que as bandas Qs também não sofreram influência significativa com as chalconas, mantendo assim a emissão de estados com aproximadamente mesma energia. Entretanto a eficiência quântica de fluorescência (ϕ_f), veja Tabela 1, apresentou valores menores do que a tetrafenilporfirina base livre dissolvida em DMSO (13%)²³, sendo de aproximadamente duas vezes para a molécula **CP3**. As chalconas ligadas a porfirina podem ser a causa principal da redução da ϕ_f . É conhecido que a estrutura molecular não rígida das chalconas favorece o canal não radiativo de relaxação, tornando-as não fluorescentes.²² No presente caso, a adição das chalconas às porfirinas provavelmente cria novas vias de decaimento não radiativo se comparado a TPP de base livre sem grupos laterais.

Os tempos de vida de fluorescência (veja Tabela 1), obtidos das curvas de decaimento de fluorescência da Figura 7, foram de aproximadamente 9 ns para a maioria dos compostos. Entretanto para a **CP3**, esse tempo fica em ~3 ns, três vezes mais curto. O grupo NO₂ presente nessa amostra pode ser o responsável pela diminuição tanto do valor da ϕ_f quanto do τ_f , como já foi observado em diversas ocasiões na literatura.²⁴ Essa extinção da fluorescência e encurtamento do tempo de vida pode ser, possivelmente, atribuído ao processo de transferência de carga da porfirina para o NO₂ devido a sua alta eletronegatividade. A alta polaridade do grupo NO₂ também pode impactar no processo de transferência de energia entre molécula e solvente, visto que haverá forte interação com o solvente polar criando um novo caminho de decaimento não radiativo. A diminuição de ambos fatores é um forte indicativo de que a taxa de conversão interna aumentou.

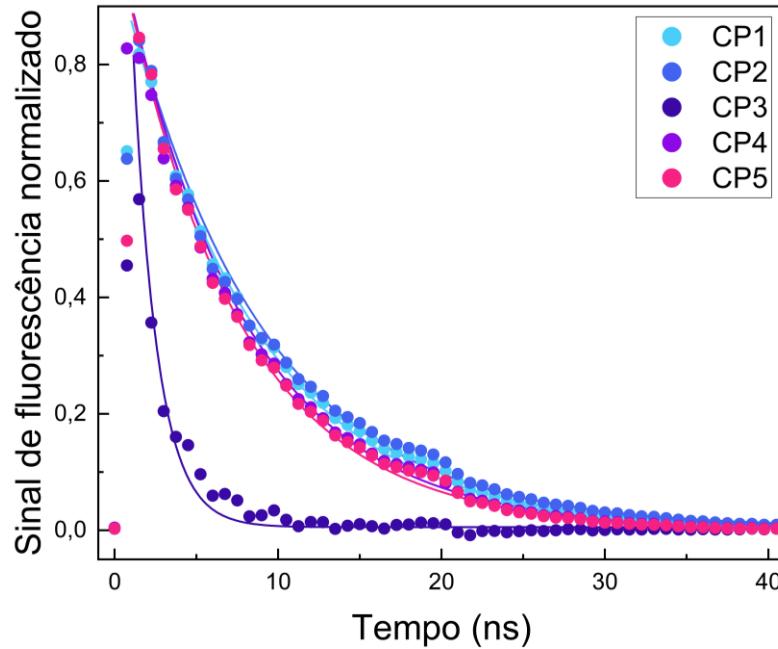


Figura 7 - Curvas de decaimento do sinal de fluorescência em função do tempo das amostras.

Fonte: Elaborada pela autora.

Por fim, para a determinação da ϕ_T com a técnica de duplo pulso, exposta na sessão anterior, foram escolhidos como parâmetros para as medidas: passos de 5% entre cada potência, variando-a de 10 a 80%, com esse limite superior para evitar a degradação da amostra. Com isso, foram realizadas baterias, em diferentes dias, de duas aquisições para cada passo de potência, totalizando 30 curvas para cada amostra por dia de medida. O tempo de exposição para cada potência foi de 1s, fazendo com que a amostra recebesse 10 ciclos da repetição do laser, já que a frequência utilizada foi de 10Hz, e cada curva obtida é uma média desses ciclos. Essas baterias foram feitas para determinar o desvio padrão do ϕ_T .

Tabela 1 - Valores de eficiência quântica, tempo de vida de fluorescência e taxas de relaxação para as amostras dissolvidas em DMSO.

Propriedade	CP1	CP2	CP3	CP4	CP5
$\phi_f(\%)$	$8,1 \pm 0,4$	$8,2 \pm 0,4$	$5,0 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,5$	$6,7 \pm 0,3$
$\tau_f(ns)$	$9,0 \pm 0,5$	$9,9 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,4$	$8,4 \pm 0,4$
$\phi_T(\%)$	31 ± 2	26 ± 1	10 ± 1	31 ± 2	31 ± 2
$k_r(\mu s^{-1})$	$9,0 \pm 0,7$	$8,3 \pm 0,6$	19 ± 1	$10,6 \pm 0,8$	$8,0 \pm 0,5$
$k_{cis}(\mu s^{-1})$	34 ± 3	26 ± 2	37 ± 4	36 ± 3	37 ± 3
$k_{nr}(\mu s^{-1})$	68 ± 7	67 ± 6	310 ± 10	68 ± 6	74 ± 6

Fonte: Elaborada pela autora.

Possuindo as medidas, o tratamento das curvas experimentais de dupla excitação foi feito com a Eq. (15), obtendo-se assim o valor de eficiência quântica de formação de triplete buscado. A partir desses valores, veja Tabela 1, conclui-se que a amostra **CP3** é a que apresenta a menor ϕ_T . Já as outras quatro amostras apresentam, dentro do erro experimental, valores similares de ϕ_T . É interessante notar que o ϕ_T para a **CP3**, assim como o ϕ_f , é aproximadamente 3 vezes menor que o das outras amostras, o que pode ser dado em razão da alta eletronegatividade do dióxido de nitrogênio presente na **CP3**.

Com a determinação dos parâmetros fotofísicos descritos anteriormente, torna-se possível determinar as taxas de decaimento radiativo ($k_r = \frac{\phi_f}{\tau_f}$), de cruzamento intersistema ($k_{cis} = \frac{\phi_T}{\tau_f}$) e a dos processos não radiativos de conversão interna ($k_{nr} = \frac{1}{\tau_f} - k_r - k_{cis}$). Todos esses valores podem ser observados na Tabela 1. Nesta, é possível ver que as taxas de cruzamento intersistemas não são muito diferentes entre as moléculas. Entretanto, o que torna o ϕ_T para a **CP3** muito menor que o das outras é o aumento exorbitante da taxa de relaxação não radiativo, tornando esse o caminho preferencial de desativação do primeiro estado excitado. Esse aumento é dado em virtude do dióxido de nitrogênio presente na extremidade da chalcona, que desativa o fenil e meta-direciona os elétrons.²⁵

Enquanto a alta k_{nr} ocorre para **CP3**, o mesmo não é observado para **CP4**, que substitui o dióxido de nitrogênio da primeira pelo grupo metil. Como o grupo metil é apolar, diferente do grupo NO₂, a amostra **CP4** não sofre o aumento da via de transferência de energia observada na **CP3**. A porfirina **CP2** é idêntica a **CP3** e **CP4** com exceção de sua extremidade, que termina no fenil, e assim como a **CP4** possui característica mais apolar. No entanto, diferenciando das outras porfirinas, ela apresentou um pequeno decaimento na taxa de cruzamento intersistema, o que pode significar uma diminuição do acoplamento spin-órbita do macrociclo tetrapirrólico em razão da proximidade com o derivado de chalcona.

Tendo em vista a notabilidade da molécula **CP3** para relaxação não radiativa, pode-se especular que ela seria uma forte candidata para terapia fototérmica²⁶, um modelo de tratamento similar a terapia fotodinâmica, mas que se baseia na inativação celular por calor.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante o decorrer do projeto, foi realizado o preparo de cinco amostras de tetrafenilporfirinas com ligantes chalcona distintos, para que pudessem ser analisadas a sua absorção, fluorescência estacionária e resolvida no tempo. Estudando a absorção e fluorescência estacionária conseguiu-se calcular a eficiência quântica de fluorescência de cada porfirina. Sabendo estes valores e obtendo os tempos de vida de fluorescência a partir da técnica de excitação com múltiplos pulsos de laser, foi possível encontrar as taxas e tempos de decaimento radiativo e não radiativo que indicaram uma preferência pelos processos não radiativos em todas as amostras. Utilizando uma técnica de fluorescência induzida por duplo pulso (DPF) foi possível determinar a eficiência quântica de formação de triplete de cada porfirina. A partir desse valor e dos outros dados obtidos, calculou-se as taxas de relaxação por cruzamento intersistema e conversão interna, que possibilitaram uma melhor análise para as porfirinas estudadas, indicando a preferência de todas pelo decaimento não radiativo, com destaque para CP3, que apresentou o maior valor dentre elas e com um estudo mais minucioso pode se tornar um candidato para terapia fototérmica.

5 REFERÊNCIAS

- 1 DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 58, n. 6, p. 895–900, 1993.
- 2 CORREIA, J. H. *et al.* Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1332, 2021.
- 3 DAI, T. *et al.* Photodynamic therapy for *Acinetobacter Baumannii* Burn Infections in mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3929–3934, 2009.
- 4 MAGIORAKOS, A.-P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
- 5 GOUTERMAN, M. Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. *In:* DOLPHIN, D. The porphyrins. Amsterdam, Elsevier, 1978. p. 1–165.
- 6 MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. Beer–Lambert law (or Beer–Lambert–Bouguer law). *In: The IUPAC compendium of chemical terminology*. Research Triangle Park: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014.
- 7 VALEUR, B.; BERBERAN-SANTOS, M. N. **Molecular fluorescence**. 2nd ed. Weinheim, Wiley-VCH Verlag, 2012.
- 8 LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3rd ed. New York, Springer, 2006.
- 9 HOLLAS, J. M. **Modern spectroscopy**. 4nd ed. Chichester, John Wiley, 2003.
- 10 SCHULMAN, S. G.; DI, Q. Q.; JUCHUM, J. Organic Chemistry Applications of Fluorescence Spectroscopy. *In: LINDON, J. C. (ed.) Encyclopedia of spectroscopy and spectrometry*. 2nd ed , Oxford: Academic Press, 1999. p.2040–2046.
- 11 GOTARDO, F. *et al.* Investigating the intersystem crossing rate and triplet quantum yield of Protoporphyrin IX by means of pulse train fluorescence technique. **Chemical Physics Letters**, v. 674, p. 48–57, 2017.
- 12 MOURA, N. M. M. *et al.* A new synthetic approach to benzoporphyrins and Kröhnke type porphyrin-2-ylpyridines. **Chemical Communications**, v. 48, n. 49, p. 6142, 2012.
- 13 MOURA, N. M. M. *et al.* Porphyrin-Oligopyridine triads: synthesis and optical properties. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 83, n. 9, p. 5282–5287, 2018.
- 14 Kasha, M. Kasha rule. *In: The IUPAC compendium of chemical terminology*. Research Triangle Park: International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2014.
- 15 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, 2011.
- 16 ZHDANOVA, K. A. *et al.* Synthesis and photodynamic antimicrobial activity of

amphiphilic meso-arylporphyrins with pyridyl moieties. **Dyes and Pigments**, v. 181, p. 108561, 2020.

17 DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO). **Catálogo #D2650**. Missouri: Sigma Aldrich, 2023.

18 TOLUENE. **Catálogo #244511**. Missouri: Sigma Aldrich, 2023.

19 SMITH, S. W. The scientist and engineer's guide to digital signal processing. San Diego: California Technical Publishing, 1997.

20 LEMMETYINEN, H. *et al.* Time-resolved fluorescence methods: IUPAC technical report. **Pure and Applied Chemistry**, v. 86, n. 12, p. 1969–1998, 2014.

21 KEMPA, M. *et al.* Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy. **Spectrochimica A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 146, p. 249–254, 2015.

22 BATISTA, A. S. *et al.* Targeting chalcone binding sites in living Leishmania using a reversible fluorogenic benzochalcone probe. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 149, p. 112784, 2022.

23 HSIAO, J.-S. *et al.* Soluble synthetic multiporphyrin Arrays. 2. photodynamics of energy-transfer processes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11181–11193, 1996.

24 FARLEY, C. *et al.* A Structural Model of Nitro-Porphyrin Dyes Based on Spectroscopy and Density Functional Theory. **Journal of Computational Chemistry**, v. 39, n. 18, p. 1129–1142, 2018.

25 STASYUK, O. A. *et al.* How amino and nitro substituents direct electrophilic aromatic substitution in benzene: an explanation with Kohn–Sham molecular orbital theory and Voronoi deformation density analysis. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 17, p. 11624–11633, 2016.

26 ZHAO, L. *et al.* Recent advances in selective photothermal therapy of tumor. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 335, 2021.

‡

‡ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 6023:2018.