

**Fotogeração de espécies reativas de oxigênio  
induzida por fullerenos e derivados: um estudo  
por EPR e captura de spins**

*Ana Sílvia Pereira Gonçalves*

Fevereiro de 2010

**Fotogeração de espécies reativas de oxigênio induzida por  
fullerenos e derivados: um estudo por ressonância  
paramagnética eletrônica e captura de spins**

Aluna: Ana Sílvia Pereira Gonçalves

Orientador: Maurício Veloso Brant Pinheiro

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em Física.

Fevereiro de 2010

# Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Wilian e Maria do Rosário, e à minha irmã, Thaís, pelo amor incondicional e por me apoiar em todas as minhas decisões.

Agradeço ao Breno pelo amor, o companheirismo, a cumplicidade e pelas noites mal dormidas me incentivando a escrever essa dissertação. Sua paixão pela física foi sempre muito inspiradora. Agradeço à família dele, por todo o carinho e atenção que me dedicaram e por me receberem tão bem em suas vidas.

A todos os meus amigos dedico sinceros agradecimentos pelo encorajamento e por depositarem em mim a confiança necessária para chegar até aqui. Um agradecimento especial para a Vanessa (embora ela odeie física) pelas confidencias e desabafos.

Ao meu orientador, Maurício, agradeço pela dedicação, motivação e disponibilidade, assim como pelos puxões de orelha. Agradeço ao Klaus, meu co-orientador de coração, por estar sempre presente no laboratório, afinal sem ele o espectrômetro não funciona.

Agradeço a todos do Laboratório de Ressonância, sem os quais esse trabalho não seria possível. Um agradecimento especial ao Lucas, ex-aluno de iniciação científica, cujos resultados muito bem registrados foram um pontapé inicial para esse trabalho.

Agradeço à Rossimiriam, à Rosemeire e ao Leandro, do Departamento de Química, pela síntese dos compostos estudados e pela paciência quanto à minha ignorância em

química.

Dirijo também um agradecimento à banca examinadora desta Dissertação. Há membros nela compreendidos que serão sempre meus eternos professores e amigos.

Agradeço, ainda, aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Física da UFMG, e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Por fim agradeço à CAPES pela bolsa de mestrado e ao CNPq e à FAPEMIG pelo suporte financeiro na montagem do laboratório de preparação de amostras.

# Resumo

As propriedades físicas e químicas dos fullerenos têm atraído grande interesse desde que o  $C_{60}$  se tornou disponível em quantidades macroscópicas, na década de 1990. Seus derivados vêm sendo aplicados em diversas áreas, da construção de células fotovoltaicas à biomedicina. A funcionalização de fullerenos modifica suas características, levando a moléculas com propriedades novas e muitas vezes mais interessantes, como por exemplo a hidrossolubilidade. As propriedades fotofísicas de novos derivados do fullereno foram estudadas por ressonância paramagnética eletrônica (*EPR*) pela metodologia de captura de spins, que possibilita a medição indireta dos radicais livres gerados. Mostrou-se que espécies reativas de oxigênio (*ROS*), altamente citotóxicas, são produzidas eficientemente pela fotossensibilização desses compostos. Através de uma curva de calibração com radicais estáveis, foi possível quantificar a geração de *ROS* para cada derivado e compará-los com o  $C_{60}$  puro e um derivado comercial, o  $C_{60} - PCBM$ . Além disso foi proposto um modelo cinético que explica a evolução temporal da produção de radicais e confirma que o radical produzido preferencialmente por fullerenos é o oxigênio singleto. Os resultados sugerem que fullerenos e seus derivados são candidato potenciais a serem usados como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica.

# Abstract

The physical and chemical properties of fullerenes have attracted considerable interest since  $C_{60}$  became available in macroscopic quantities some decades ago. Fullerene derivatives have been applied in several areas, from the construction of photovoltaic cells to biomedicine. The functionalization of fullerenes modifies their characteristics, leading to molecules with novel and often more interesting properties. The photophysical properties of new fullerene derivatives were studied by electron paramagnetic resonance (EPR) using the spin trapping technique, which allows the indirect measurement of free radical generation. It was shown that highly cytotoxic reactive oxygen species (ROS) are efficiently produced by these compounds through photosensitization. Using a calibration curve with stable radicals, it was possible to quantify the generation of ROS for each derivative and compare them with pure  $C_{60}$ . Moreover, a kinetic model was proposed to explain the time evolution of radical production and confirms that the radical produced preferably by fullerenes is singlet oxygen. The results suggest that fullerenes and their derivatives are potential candidates for the role of photosensitizers in photodynamic therapy (PDT).

# Sumário

Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 Fullerenos e suas propriedades fotofísicas</b>	<b>4</b>
2.1 Fullerenos . . . . .	4
<b>3 As espécies reativas de oxigênio e a terapia fotodinâmica</b>	<b>7</b>
3.1 Oxigênio Molecular . . . . .	7
3.2 Espécies reativas de oxigênio . . . . .	10
3.2.1 Radical Superóxido . . . . .	11
3.2.2 Oxigênio Singleto . . . . .	12
3.2.3 Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio . . . . .	12
3.2.4 Agentes fotossensibilizadores . . . . .	14
<b>4 Técnicas e Métodos</b>	<b>16</b>
4.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica - Teoria . . . . .	16
4.1.1 O elétron livre . . . . .	16
4.2 Hamiltoniano de Spin . . . . .	18

4.2.1	Interação Zeeman . . . . .	19
4.2.2	Interação Hiperfina Isotrópica . . . . .	21
4.2.3	Teoria Perturbativa . . . . .	22
4.3	Captura de Spins . . . . .	28
4.3.1	Quantificação de adutos de spin por <i>EPR</i> . . . . .	30
4.4	O experimento de <i>EPR</i> . . . . .	32
<b>5</b>	<b>Resultados experimentais e análise dos dados</b>	<b>35</b>
5.1	Derivados de Fullerenos . . . . .	35
5.2	Medidas . . . . .	37
5.2.1	Absorção óptica . . . . .	37
5.2.2	<i>EPR</i> . . . . .	39
5.3	Determinação do coeficiente de extinção molar . . . . .	42
5.4	Determinação do fator <i>g</i> . . . . .	43
5.5	Calibração do número de spins . . . . .	45
5.6	Análise dos Resultados . . . . .	47
5.6.1	Tratamento dos dados de <i>EPR</i> . . . . .	47
5.6.2	Curvas de iluminação . . . . .	48
5.6.3	Modelo cinético . . . . .	52
5.6.4	Interpretação dos resultados . . . . .	54
5.6.5	Sinais secundários . . . . .	56
<b>6</b>	<b>Conclusão</b>	<b>59</b>
<b>A</b>	<b>O Radical Nitróxido</b>	<b>61</b>



# Capítulo 1

## Introdução

A terapia fotodinâmica (PDT, *photodynamic therapy*) [1] é uma modalidade de tratamento clínico muito promissora. Embora seu princípio já seja conhecido a muitas décadas, ela ainda é pouco empregada. Seu uso depende do desenvolvimento e caracterização de substâncias com propriedades específicas conhecidos com fotossensibilizadores (FS). Dentre essas propriedades destaca-se a alta eficiência na geração, sob iluminação, de espécies reativas de oxigênio (*ROS, reactive oxygen species*), que são altamente citotóxicas. Esses FS devem ser também biocompatíveis, ou seja, apresentar baixa toxicidade, fácil eliminação, boa solubilidade em meio fisiológico, etc.

O desenvolvimento de novos fotossensibilizadores é essencial para que o uso da PDT possa ser expandido. Para suprir essa demanda, uma das linhas de pesquisa tem sido no desenvolvimento de derivados de fulerenos. O fullereno  $C_{60}$  é uma molécula fotossensível capaz de gerar grandes quantidades de radicais livres na presença de oxigênio e radiação [2]. Seus pontos fracos são sua baixa solubilidade em solventes polares e sua alta frequência de excitação, na faixa do ultra-violeta. A funcionalização do fullereno pode, em princípio, contornar esses problemas, mudando sua banda de absorção. Além disso, a adição de

grupos polares pode permitir sua solubilização em água.

Os novos derivados de fullereno recentemente sintetizados e analisados nesse trabalho são um primeiro passo nessa direção. Embora não solucionem nenhum dos dois problemas, as longas cadeias orgânicas ligadas à molécula do  $C_{60}$  reduzem o efeito de agregação e podem no futuro ser ligadas a grupos polares.

O objetivo desse trabalho é investigar o efeito da funcionalização de fulerenos sobre a eficiência na produção de espécies reativas de oxigênio, determinando os mecanismos envolvidos nesse processo. A espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica (*EPR*, do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*) é a técnica ideal para a detecção de radicais livres, já que estes por definição apresentam elétrons desemparelhados. O único obstáculo é o curto tempo de vida destes radicais, o que pode ser contornado com o uso da metodologia de captura de spin (*spin trapping*), na qual o radical livre é capturado por uma outra molécula formando um radical mais estável e portanto passível de detecção.

No segundo capítulo são apresentados os fullerenos, e suas propriedades fotofísicas são discutidas.

No terceiro capítulo é feito um apanhado geral sobre a molécula de oxigênio e os radicais que dela derivam, dentro do contexto da terapia fotodinâmica. Segue-se uma exposição dos dois possíveis mecanismos de geração de *ROS* induzidos pela fotoexcitação de uma outra molécula (o fotossensibilizador): transferência de energia com produção de oxigênio singleto ou transferência de elétrons com produção de superóxido. Por fim, são descritas as características de um fotossensibilizador ideal.

No quarto capítulo são apresentados as técnicas utilizadas: *EPR* e captura de spin. As

interações dos momentos magnéticos do sistema entre si e com o campo magnético externo quebram a degenerescência dos níveis eletrônicos, e a energia das transições induzidas entre os níveis fornece informação estrutural e eletrônica sobre o centro paramagnético e sua vizinhança na molécula. As interações mais relevantes nas medidas de *EPR* em soluções são descritas em maior detalhe.

No quinto capítulo são apresentados os derivados de fullereno estudados e as medidas realizadas. A caracterização inicial é feita através dos espectros de absorção óptica em solução. As medidas de *EPR* da geração de *ROS* induzida pelos fulerenos são descritas, incluindo as etapas de preparação de amostras e calibração dos sinais. A análise dos resultados não se resume a determinar o número absoluto de radicais produzidos, mas também a evolução desse número com o tempo de iluminação. Propõe-se então um modelo cinético, baseado no mecanismo predominante para fullerenos. A eficiência dos compostos é por fim discutida, tendo como ponto de partida a estrutura das moléculas envolvidas.

# Capítulo 2

## Fullerenos e suas propriedades fotofísicas

### 2.1 Fullerenos

Os fullerenos constituem uma classe de nanomoléculas esferoidais estáveis formadas exclusivamente por átomos de carbono. Eles foram descobertos por *Kroto et al* em 1985 [3]. Ao contrário das outras formas alotrópicas de carbono, como o grafite, o diamante e os nanotubos, os fullerenos são formas moleculares de carbono. Até hoje, oito fullerenos estáveis já foram isolados em quantidades significativas, sendo os mesmos denominados [60- $I_h$ ], [70- $D_{5h}$ ], [76- $D_2$ ], [78- $D_3$ ], [78- $C_{2v}(I)$ ], [78- $C_{2v}(II)$ ], [84- $D_2(IV)$ ] e [84- $D_{2d}(II)$ ] em função do número de carbonos que os formam, do grupo pontual de simetria da molécula e do número do possível regioisômero [4]. Dentre estes fullerenos, a molécula de simetria  $I_h$  formada por 60 átomos de carbono, o  $C_{60}$ , é a mais abundante e representativa. O  $C_{60}$  (figura 2.1) tem a estrutura de um icosaedro truncado apresentando 32 faces: 20 hexágonos e 12 pentágonos. As ligações nos vértices comuns a dois hexágonos tem características de ligações  $\pi$  e são mais curtas (1,38 Å) do que as ligações nos vértices comuns a um hexágonos e um pentágono (1,45 Å) que são melhores descritas como ligações simples [5].

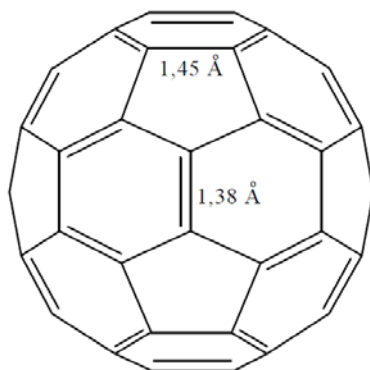


Figura 2.1: Molécula de  $C_{60}$  mostrando os comprimentos das ligações simples e duplas.

Desde a disponibilização macroscópica do  $C_{60}$  pelo método de *Krättschmer-Huffman* [6], as propriedades físicas desta fascinante forma alotrópica de carbono têm sido intensamente investigadas. Entre as descobertas mais surpreendentes, sabe-se que a molécula de  $C_{60}$ , embora rica em elétrons, comporta-se como uma espécie eletronegativa capaz de aceitar reversivelmente de um até seis elétrons formando os ânions correspondentes [7]. Isto foi comprovado por cálculos teóricos, sendo que o caráter eletrônico deficitário do  $C_{60}$  foi atribuído aos orbitais moleculares LUMO não-ligantes que estão num patamar de energia muito baixo [4]. Outra propriedade importante é que a molécula de  $C_{60}$  possui um estado excitado tripleto de longa duração [2]. Muitas das propriedades do  $C_{60}$  estão relacionadas com sua elevada simetria, na qual os 60 átomos de carbono são equivalentes. O espectro eletrônico de absorção do  $C_{60}$  é caracterizado por várias absorções fortes entre 190 e 410 nm bem como por algumas transições proibidas na parte visível do espectro, entre 410 e 620 nm, sendo essas últimas responsáveis pela cor púrpura intensa do  $C_{60}$  em solução (Figura 2.2)[8].

Ainda no início da década de 1990, *Arbogast et al* reportaram as interessantes propriedades fotofísicas do  $C_{60}$  [2]. A capacidade do fullereno de produzir oxigênio

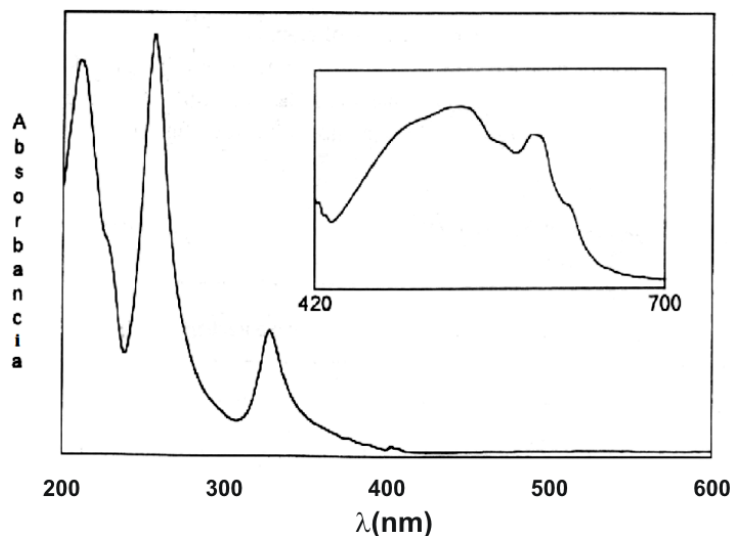


Figura 2.2: Espectro de Absorção Óptica do  $C_{60}$ .

singleto em altas quantidades, através da transferência de energia do estado tripleto do  $C_{60}$  para o oxigênio molecular, foi medida por luminescência de  $^1O_2$  a 1268nm. O  $C_{60}$  também se mostrou inerte à destruição fotooxidativa, o que juntamente com sua elevada eficiência na produção de oxigênio singleto, sugere um grande potencial para causar danos fotodinâmicos em meios biológicos [9].

Desde a sua descoberta, um dos principais problemas relacionados à molécula de  $C_{60}$  é a sua baixa solubilidade em solventes usuais, sendo essencialmente insolúvel em solventes polares como a água. Este é também um fator limitante para seu uso em aplicações biomédicas, tendo em vista que o meio fisiológico é essencialmente aquoso [10]. Para aplicação específica em PDT, outro fator limitante é a forte absorção óptica na região do ultravioleta. Como já foi dito, um agente fotossensibilizador deve absorver preferencialmente na região da luz visível.

# Capítulo 3

## As espécies reativas de oxigênio e a terapia fotodinâmica

O princípio em que se baseia a Terapia Fotodinâmica (PDT) foi reportado pela primeira vez por Raab em 1900 [11]. Ele observou a morte de microorganismos quando expostos à luz solar e ao ar, na presença de certos corantes. Hoje sabemos que a interação de luz com comprimento de onda adequado com um composto atóxico conhecido como fotossensibilizador e oxigênio resulta em espécies reativas de oxigênio, capazes de levar células à morte.

Devido à alta reatividade e curto tempo de vida dos ROS, apenas moléculas e estruturas próximas à região onde são produzidos são diretamente afetadas pela PDT. A meia vida do oxigênio singleto, por exemplo, em sistemas biológicos é menor de 40ns e portanto seu raio de ação é da ordem de 20nm [12].

### 3.1 Oxigênio Molecular

Na década de 1840, Michael Faraday descobriu que o oxigênio é atraído por magnetos. Quase um século mais tarde, em 1925, Robert Mulliken [13] explicou porque o oxigênio é magnético utilizando a recém desenvolvida teoria quântica. Sua análise mostra que

o oxigênio molecular tem dois elétrons desemparelhados em seu estado de mais baixa energia. O magnetismo intrínseco dos elétrons havia sido proposto por Goudsmit e Uhlenbeck no ano anterior. A existência de elétrons de valência desemparelhados numa molécula estável é muito rara na natureza e lhe confere alta reatividade química. [14]

Para explicar as propriedades singulares do oxigênio é preciso antes conhecer a ocupação dos seus orbitais moleculares no estado fundamental. A configuração eletrônica do átomo de oxigênio é

$$O : (1s)^2(2s)^2(2p)^4 \quad (3.1)$$

De acordo com a teoria dos orbitais moleculares, a ocupação dos orbitais da molécula de oxigênio no estado fundamental é

$$O_2 : (\sigma_{1s})^2(\sigma_{1s}^*)^2(\sigma_{2s})^2(\sigma_{2s}^*)^2(\sigma_{2p})^2(\pi_{2p})^4(\pi_{2p}^*)^2 \quad (3.2)$$

Essas configurações estão representadas na figura 3.1.



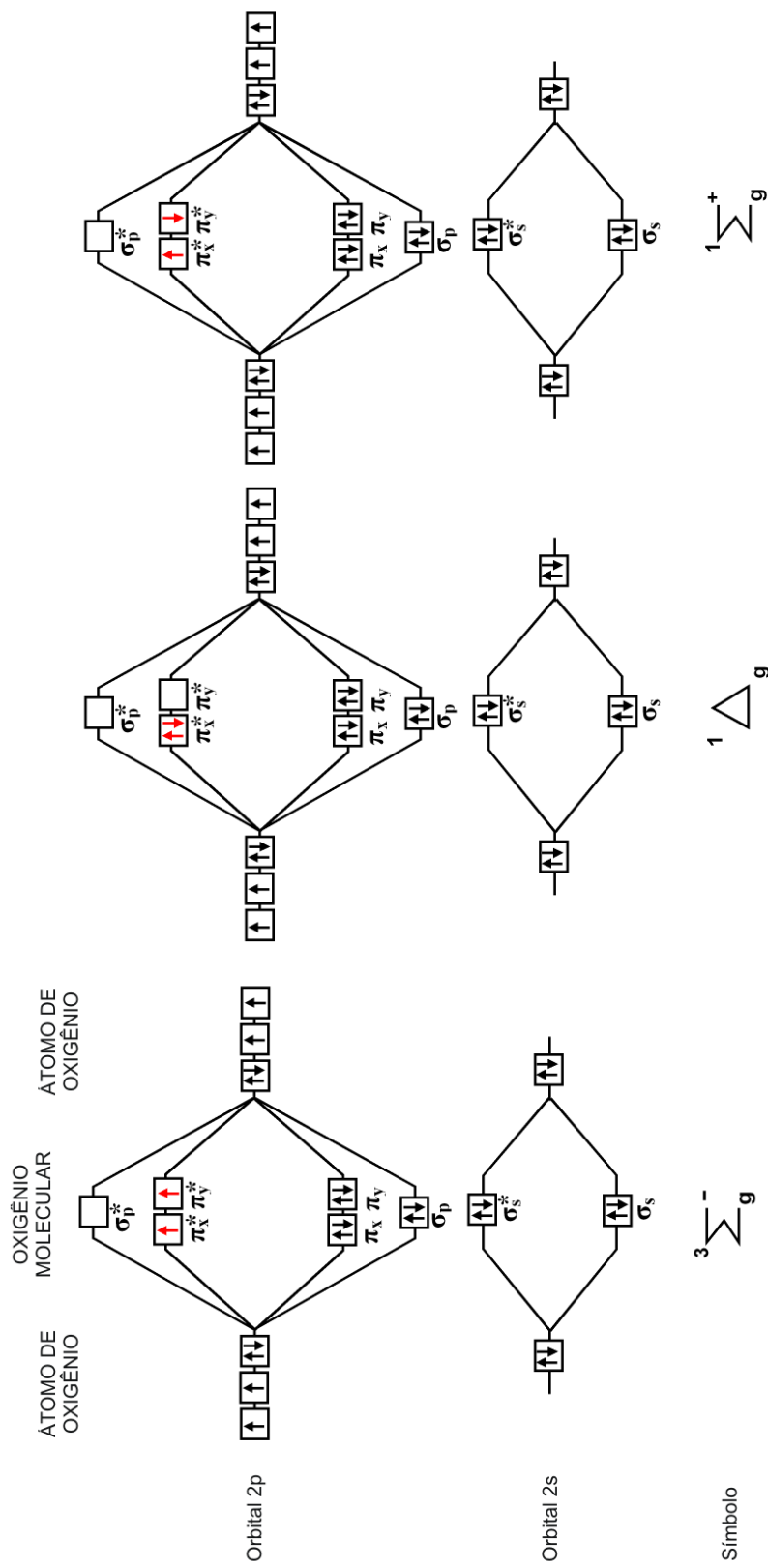


Figura 3.1: Orbitais atômicos e moleculares do Oxigênio. O orbital  $1s$  não é mostrado pois o nível  $1$  de cada átomo está completamente preenchido.

As propriedades eletrônicas do oxigênio são determinadas pelos 6 elétrons nos orbitais  $\pi$ . No estado de menor energia, a configuração de spin desses elétrons é  $\pi_x[\uparrow\downarrow] \pi_y[\uparrow\downarrow] \pi_x^*[\uparrow] \pi_y^*[\uparrow]$ . Esse estado, conhecido como  ${}^3\Sigma g^-$ , possui dois elétrons desemparelhados nos orbitais moleculares degenerados  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ . Esses elétrons tendem a possuir o mesmo spin, produzindo multiplicidade máxima ( $S = 1$  e  $2S + 1 = 3$ ) e assim seu estado de mais baixa energia é um tripleto.

Oxigênio singleto é como são conhecidos os três estados eletronicamente excitados imediatamente superiores ao oxigênio molecular no estado fundamental:  ${}^1\Delta x$ ,  ${}^1\Delta y$  e  ${}^1\Sigma g^+$  em que o spin total da molécula é nulo e a multiplicidade é 1.

Os estados com energia intermediária,  ${}^1\Delta x$  e  ${}^1\Delta y$  são degenerados e costumam ser denominados  ${}^1\Delta g$ . Eles são os responsáveis pela reatividade química do oxigênio singleto, e, por possuírem simetria distinta da do estado fundamental, seu tempo de vida é consideravelmente maior que o do estado de mais alta energia  ${}^1\Sigma g^+$ . O orbital molecular vazio no estado  ${}^1\Delta g$  garante ao oxigênio singleto caráter eletrofílico, o que favorece sua participação mais efetiva em reações químicas, principalmente no caso em que os substratos possuem sítios ricos em elétrons [15].

## 3.2 Espécies reativas de oxigênio

O oxigênio, como já foi dito, é uma molécula altamente reativa e pode ser parcialmente reduzido para formar um número de agentes quimicamente reativos. O processo de transferência de elétrons, ou a absorção de energia pode levar o oxigênio a gerar as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS do inglês *Reactive Oxygen Species*) [16], as quais abrangem:

- moléculas com um elétron desemparelhado no último orbital, também conhecidas como radicais livres, muito instáveis, extraordinariamente reativas, e com uma enorme capacidade para combinar-se com diversas moléculas integrantes da estrutura celular.
- algumas moléculas derivadas de  $O_2$  que embora não sejam radicais livres, são capazes de gerá-los, como por exemplo, o oxigênio singlete e o peróxido de hidrogênio [17].

O  $O_2$  envolvido no processo respiratório, em certas condições no organismo, pode ser transformado em ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) ou peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Estas formas de oxigênio são altamente prejudiciais para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lipídios, ácidos graxos e as proteínas [18] [19].

Os *ROS*s envolvidos diretamente nesse trabalho são o oxigênio singlete e o radical superóxido.

### 3.2.1 Radical Superóxido

Esse radical é o mais comum e abundante na célula [20] e pode ser gerado em eventos de transporte de elétrons ou por reações de auto oxidação do oxigênio molecular [21]. O radical superóxido é formado no organismo principalmente através da cadeia de transporte de elétrons ou por ação de células fagocitárias para defesa bactericida [22]. Entre as substâncias de interesse biológico que se auto-oxidam gerando o radical superóxido estão a hemoglobina e a mioglobina. O superóxido atua na maioria das reações bioquímicas como agente redutor, entretanto, em altas concentrações, ele é tóxico. Por isso, seres vivos

tem uma enzima específica para controlar o nível de superóxido no organismo, conhecida como Superóxido Dismutase (SOD) [23].

### 3.2.2 Oxigênio Singleto

A geração dessa espécie reativa de oxigênio em biosistemas é atribuída à fagocitose, às reações 'fotossensibilizadas', e à recombinação de radicais peróxido [24]. O  $^1O_2$  difere do oxigênio molecular por não apresentar restrição na recepção de elétrons, o que o torna altamente reativo, causando danos às proteínas devido à oxidação de grupos essenciais de aminoácidos, principalmente do triptofano, metionina, histidina e resíduos de cisteína [17].

### 3.2.3 Mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio

No estado fundamental, a molécula do fotossensibilizador FS está em um estado singleto  $^1FS$ , com dois elétrons com spins opostos em um orbital molecular de baixa energia. Ao absorver um fóton, um desses elétrons passa para um orbital molecular de alta energia (mantendo seu spin), levando ao estado excitado singleto  $^1FS^*$ . Essa espécie tem tempo de vida curta, da ordem de nanossegundos, e pode perder sua excitação emitindo luz (fluorescência) ou convertendo internamente em calor [25]. A molécula no estado excitado singleto pode também passar por um processo conhecido com cruzamento intersistemas (ISC do inglês *Intersystem Crossing* [25]) caracterizado pela inversão do spin eletrônico, levando a molécula a um estado excitado tripleto ( $^3FS^*$ ), com spins eletrônicos paralelos, de tempo de vida relativamente longa (microssegundos). A estabilidade desse estado tripleto é explicada pelo fato de a perda de energia por emissão de luz (fosforescência) ser

um processo proibido, pois levaria diretamente de um estado tripleto em um singlete [25].

A equação 3.3 mostra esse processo de excitação do fotossensibilizador.



Uma vez no estado excitado tripleto o fotossensibilizador pode participar de dois diferentes mecanismos de geração de ROS, representados na figura 3.2:

### Mecanismo tipo I: *transferência de elétrons*

O fotossensibilizador no estado  ${}^3FS^*$  pode reagir com componentes do sistema (doadores de elétrons), sendo reduzido a ânion radical  $FS^{\bullet-}$ , que por transferência de elétron à molécula de oxigênio gera o ânion radical superóxido  $O_2^{\bullet-}$ .

### Mecanismo tipo II: *transferência de energia*

O fotossensibilizador no estado  ${}^3FS^*$  pode transferir energia diretamente para a molécula de oxigênio, que no estado fundamental é um tripleto ( ${}^3O_2$ ), levando-a ao estado excitado singlete ( ${}^1O_2$ ). Posteriormente o  ${}^1O_2$  pode receber um elétron e ser reduzido em ânion superóxido.

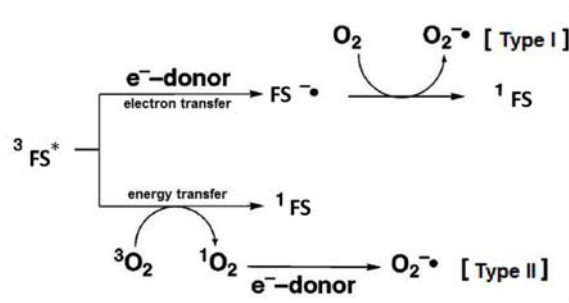


Figura 3.2: Mecanismos de produção de espécies reativas de oxigênio [9].

Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente, sendo que a razão de intensidade entre os dois processos depende do fotossensibilizador usado, do substrato/solvente, do pH do meio e das concentrações de doadores de elétrons e oxigênio molecular no sistema.

### 3.2.4 Agentes fotossensibilizadores

Para ser aplicado em tratamentos clínicos é ideal que o agente fotossensibilizador possua algumas características [26]:

- pureza química e composição conhecida;
- baixo nível de toxicidade no escuro;
- absorção preferencial pelo tecido alvo;
- rápida eliminação pelo organismo;
- alta eficiência na fotogeração de ROS;
- elevada absorvidade molar na faixa de 600 a 800nm. Fótons de comprimento de onda menor de 600nm tem baixa penetração nos tecidos e tem maior chance de levar a efeitos colaterais como hiperssensibilidade da pele à luz solar. A potência da luz solar tem pico em 550nm e é consideravelmente mais baixa para  $\lambda > 600nm$ . Fótons de comprimento de onda maior de 800nm não possuem energia suficiente para que o estado tripleto do fotossensibilizador transfira energia para o oxigênio molecular, levando-o ao estado excitado singleto.
- solubilidade em água e não-agregação em meios biológicos;

- tempo de vida de longa duração ( $\geq 500$  ns) do estado tripleto excitado, podendo reagir eficientemente com o oxigênio molecular.

A combinação de nanomateriais e oxigênio singleto tem se destacado como um novo campo de pesquisa interdisciplinar. Nanopartículas podem ser transportadoras ideais para moléculas fotossensibilizadoras para terapia fotodinâmica. Além disso, alguns materiais como o dióxido de titânio, o óxido de zinco e os fullerenos, bem como seus derivados podem eles próprios gerar oxigênio singleto. Embora suas aplicações biológicas tenham recebido muito menos atenção do que as aplicações em eletrônica e catálise, os nanomateriais, em especial os fullerenos, representam um caminho promissor para superar as várias dificuldades associadas à terapia fotodinâmica tradicional.

# Capítulo 4

## Técnicas e Métodos

### 4.1 Ressonância Paramagnética Eletrônica - Teoria

\* Baseado nas abordagens dos livros [27] e [28]

#### 4.1.1 O elétron livre

O elétron tem um momento angular intrínseco, chamado de spin  $\mathbf{S}$  ao qual está associado um momento magnético  $\boldsymbol{\mu}_e$  definido por:

$$\boldsymbol{\mu}_e = -g_e\beta\mathbf{S} \quad \beta = e\hbar/2m_e \quad (4.1)$$

onde  $g_e = 2,002322$  é fator  $g$  do elétron livre,  $\beta = 9.274 \times 10^{-24} JT^{-1}$  é o magneton de Bohr,  $\hbar = 1.0546 \times 10^{-34}$  é a constante reduzida de Planck,  $e = 1.6022 \times 10^{-19}$  e  $m_e = 9.1093 \times 10^{-22}$  são a carga e a massa do elétron. Na presença de um campo magnético  $\mathbf{B}$ , haverá uma interação entre  $\mathbf{B}$  e  $\boldsymbol{\mu}_e$  dada pelo Hamiltoniano de spin que descreve quanticamente a energia potencial magnética de um dipolo em um campo:

$$\mathcal{H} = -\boldsymbol{\mu}_e \cdot \mathbf{B} = g_e\beta\mathbf{S} \cdot \mathbf{B} \quad (4.2)$$

Considerando um campo magnético uniforme e definindo sua direção como a direção  $z$ , obtém-se as expressões para o Hamiltoniano (4.3a) e seus autovalores (4.3b).



$$\mathcal{H} = g_e \beta S_z B \quad (4.3a)$$

$$E = \pm \frac{1}{2} g_e \beta B \quad (4.3b)$$

Portanto, existem dois estados que são degenerados na ausência de campo, e cuja separação  $\Delta E$  aumenta linearmente com a magnitude de B:

$$\Delta E = g_e \beta B \quad (4.4)$$

Submetendo o sistema a um campo eletromagnético perpendicular a  $\mathbf{B}$ , pode-se induzir transições entre estes dois estados, desde que a frequência de oscilação obedeça à condição de ressonância dada pela equação 4.5 e representada na figura 4.1.

$$h\nu = \Delta E = g_e \beta B \quad (4.5)$$

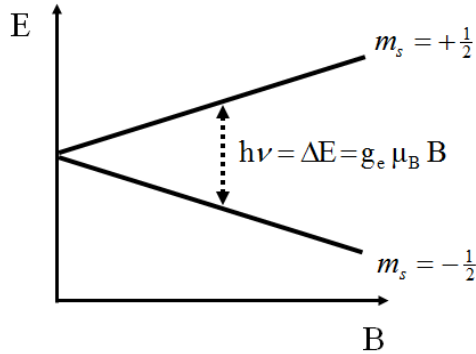


Figura 4.1: Representação da condição de ressonância. A quebra da degenerescência pela aplicação de um campo externo é chamada de efeito Zeeman.

Absorções e emissões estimuladas de fótons de energia  $h\nu$  são, de acordo com a teoria quântica, igualmente prováveis. A probabilidade de ocorrer uma transição a partir de

um estado, no entanto, é proporcional à população desse. De acordo com a distribuição estatística de Maxwell-Boltzmann a população  $N$  de elétrons nos estados  $+1/2$  e  $-1/2$  será:

$$\frac{N_{+1/2}}{N_{-1/2}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (4.6)$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura absoluta. Para valores “normais” de energia e temperatura há um número consideravelmente maior de elétrons no estado de menor energia do que no de maior energia. Assim, quando a condição de ressonância é satisfeita, o sistema absorve energia. A detecção dessa absorção de energia é a base da técnica de *EPR*.

## 4.2 Hamiltoniano de Spin

Na prática, o elétron não se encontra isolado. Ele é parte de uma sistema maior: um átomo, uma molécula, um cristal. O Hamiltoniano de spin a ser considerado é muito mais complexo do que o apresentado na expressão 4.3a. Isso porque o spin eletrônico  $\mathbf{S}$  interage não apenas com o campo magnético externo, mas também com seu momento angular orbital  $\mathbf{L}$ , o spin nuclear  $\mathbf{I}$  do núcleo do átomo ao qual pertence e com os spin nucleares e eletrônicos dos átomos vizinhos. Em um cristal, o Hamiltoniano de spin obedece a simetria do centro paramagnético e portanto apresenta características anisotrópicas, tendo seus parâmetros representados como tensores de segunda ordem. Em meios líquidos, no entanto, devido à mobilidade dos constituintes, as interações se tornam, em sua grande maioria, isotrópicas. As duas interações mais relevantes para o estudo de centros paramagnéticos moleculares em soluções são a interação Zeeman (proporcional a  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{B}$ ) e a interação hiperfina (proporcional a  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}$ ) que serão descritas em detalhes a

seguir.

### 4.2.1 Interação Zeeman

Em seu movimento ao redor do núcleo, um elétron apresenta um momento angular  $\mathbf{L}$  cujo momento de dipolo magnético  $\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{L}}$  associado é:

$$\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{L}} = -\beta\mathbf{L} \quad (4.7)$$

Somando  $\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{L}}$  ao momento magnético de spin  $\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{S}}$ , tem-se o momento magnético total do elétron:

$$\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{T}} = -\beta(g_e\mathbf{S} + \mathbf{L}) \quad (4.8)$$

Em materiais paramagnéticos  $g_e\mathbf{S} + \mathbf{L} \neq 0$ . O momento de dipolo magnético total interage, então, com o campo magnético externo  $\mathbf{B}$ . O termo do Hamiltoniano referente a esta interação é dado por:

$$\mathcal{H}_{Ze} = -\boldsymbol{\mu}_{\mathbf{T}} \cdot \mathbf{B} = \beta(g_e\mathbf{S} + \mathbf{L}) \cdot \mathbf{B} \quad (4.9)$$

Essa expressão vale também para átomos multieletrônicos desde que  $\mathbf{S}$  seja o spin total e  $\mathbf{L}$ , o momento angular total. Para um átomo livre os autoestados do Hamiltoniano  $\mathcal{H}_0$  apresentam degenerescência  $(2L+1)(2S+1)$ . Se a diferença entre os níveis de energia relativos ao número quântico principal  $n$  for grande comparada com a energia da interação spin-orbita, essa degenerescência é levantada. Tem-se então um momento angular total  $\mathbf{J} = \mathbf{S} + \mathbf{L}$ , que leva  $\mathcal{H}_{Ze}$  a possuir auto estados do tipo  $|L, S, J, mJ\rangle$  com degenerescência  $2J+1$ .

Ao aplicar um campo magnético externo a degenerescência é levantada e o

Hamiltoniano da interação Zeeman eletrônica total se torna:

$$\mathcal{H}_{Ze} = g_J \beta \mathbf{J} \cdot \mathbf{B} \quad (4.10)$$

onde  $g_J$  é o fator de Landé:

$$g_J = 1 + [J(J+1) + S(S+1) - L(L+1)]/2J(J+1) \quad (4.11)$$

Os autovalores de  $\mathcal{H}_{Ze}$ ,  $E_{Ze}$  são obtidos através da projecção de  $\mathbf{J}$  ao longo de  $\mathbf{B}$ .

$$E_{Ze}(m_J) = g_J \beta B m_J \quad (4.12)$$

Os valores possíveis de  $m_J$  são  $-J, -J+1, \dots, +J-1, +J$ . Sob a ação do campo o nível degenerado se desdobra em  $2J+1$  níveis separados por:

$$\begin{aligned} \Delta E_{Ze}(m_J, m_J - 1) &= E_{Ze}(m_J) - E_{Ze}(m_J - 1) \\ &= g_J \beta B \end{aligned} \quad (4.13)$$

O momento angular associado ao spin nuclear  $\mathbf{I}$ , assim como o associado ao spin eletrônico  $\mathbf{S}$ , interage com o campo magnético aplicado, dando origem a outro termo no Hamiltoniano, a interação Zeeman nuclear, expressa por:

$$\mathcal{H}_{Zn} = g_n \beta_n \mathbf{I} \cdot \mathbf{B} \quad (4.14)$$

onde  $g_n$  é o fator g nuclear que no caso do próton é  $g_n = 5,585486$ . Substituindo a massa do próton pela do elétron na expressão do magneton de Bohr  $\beta$  obtem-se  $\beta_n$ . Como a massa do próton é 1840 vezes maior que a do elétron,  $\beta_n$  é, aproximadamente, três ordens de grandeza menor que  $\beta$ .

O Hamiltoniano Zeeman é a soma das contribuições eletrônica e nuclear:

$$\mathcal{H}_Z = g\beta B J_z - g_n \beta_n B I_z \quad (4.15)$$

## 4.2.2 Interação Hiperfina Isotrópica

Os momentos magnéticos  $\mathbf{S}$  (eletrônico) e  $\mathbf{I}$  (nuclear) são acoplados através da chamada interação hiperfina. Essa interação representa a energia do momento nuclear no campo magnético produzido no núcleo por correntes elétricas associadas ao elétron em órbita. É descrita em termos do Hamiltoniano  $\mathcal{H}_{HF}$ :

$$\mathcal{H}_{HF} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{A} \cdot \mathbf{I} \quad (4.16)$$

onde  $\mathbf{A}$  é um tensor de segunda ordem chamado de tensor de acoplamento hiperfino que contém a magnitude do dipolo magnético nuclear, sua distância relativa ao centro da órbita do elétron desemparelhado e a sua orientação com relação aos eixos cristalinos. Pode ser dividido em uma parte isotrópica  $a$  e uma anisotrópica  $\mathbf{B}$

$$\mathbf{A} = a\mathbb{I} + \mathbf{B} \quad (4.17)$$

A constante de acoplamento hiperfino  $a$  (termo de contato de Fermi) é proporcional ao quadrado da amplitude da função de onda eletrônica no núcleo:

$$a = \frac{8\pi}{3} g\beta g_n \beta_n |\Psi(0)|^2 \quad (4.18)$$

Apenas os orbitais esféricos  $s$  contribuem para essa interação, já que são os únicos em que  $|\Psi(0)|^2 \neq 0$ . Em líquidos, a parte anisotrópica do tensor  $\mathbf{A}$  tem valor médio igual a zero devido à liberdade de orientação das moléculas. Assim, a expressão 4.16 se torna:

$$\mathcal{H}_{HF} = a\mathbf{S} \cdot \mathbf{I} = a(S_x I_x + S_y I_y + S_z I_z) \quad (4.19)$$

### 4.2.3 Teoria Perturbativa

O Hamiltoniano de spin, composto pelas três interações magnéticas proporcionais a  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{B}$ ,  $\mathbf{I} \cdot \mathbf{B}$  e  $\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}$  pode ser dividido em duas partes:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_1 \quad (4.20)$$

onde  $\mathcal{H}_0$  é a interação principal do hamiltoniano e  $\mathcal{H}_1$  uma pequena perturbação. A função de onda de spin pode então ser expressa como combinação linear de estados  $\phi_n$ , autofunções de  $\mathcal{H}_0$  com autovalores  $\epsilon_n$ . A perturbação  $\mathcal{H}_1$  modifica  $\phi_n$  e  $\epsilon_n$  levando a novas funções de onda  $\psi_n$  e energias  $E_n$  de acordo com as expressões:

$$\psi_n = \phi_n - \sum_{m \neq n} \frac{\langle m | \mathcal{H}_1 | n \rangle}{\epsilon_m - \epsilon_n} \phi_m \quad (4.21)$$

$$E_n = \epsilon_n + \langle n | \mathcal{H}_1 | n \rangle - \sum_{m \neq n} \frac{\langle m | \mathcal{H}_1 | n \rangle \langle n | \mathcal{H}_1 | m \rangle}{\epsilon_m - \epsilon_n} \quad (4.22)$$

A expressão 4.22 apresenta 3 termos, sendo o segundo e terceiro as correções em primeira e segunda ordem na energia. De forma geral, a interação Zeeman é muito mais intensa do que as demais interações do Hamiltoniano de spin e portanto  $\mathcal{H}_{Ze} = \mathcal{H}_0$ . O acoplamento hiperfino é tratado como uma perturbação,  $\mathcal{H}_{HF} = \mathcal{H}_1$

#### Átomo de hidrogênio

No átomo de hidrogênio (caso mais simples, mas que ilustra bem o método) tem-se um sistema constituído por um elétron de spin  $\mathbf{S} = 1/2$  e um núcleo de spin  $\mathbf{I} = 1/2$ . Para uma direção arbitrária  $z$  o spin tem autovetores  $|\alpha\rangle$  e  $|\beta\rangle$  com autovalores  $+1/2$  e  $-1/2$

respectivamente.

$$S_z|\alpha_e\rangle = +\frac{1}{2}|\alpha_e\rangle \quad S_z|\beta_e\rangle = -\frac{1}{2}|\beta_e\rangle \quad (4.23)$$

$$I_z|\alpha_N\rangle = +\frac{1}{2}|\alpha_N\rangle \quad I_z|\beta_N\rangle = -\frac{1}{2}|\beta_N\rangle \quad (4.24)$$

A função de onda de spin do átomo de hidrogênio terá então dois graus de liberdade: um do spin eletrônico e outro do nuclear. Os quatro estados possíveis para este sistema são:

$$|\phi_1\rangle = |\alpha_e\alpha_N\rangle \quad |\phi_2\rangle = |\alpha_e\beta_N\rangle \quad |\phi_3\rangle = |\beta_e\alpha_N\rangle \quad |\phi_4\rangle = |\beta_e\beta_N\rangle \quad (4.25)$$

Esses quatro estados são inicialmente degenerados. O efeito da aplicação de um campo externo, representado pelo Hamiltoniano  $\mathcal{H}_0$ , é a separação dos níveis de energia. Aplicando  $\mathcal{H}_0$  (dado pelo Hamiltoniano Zeeman da equação 4.15) no estado  $|\alpha_e\beta_N\rangle$  obtemos:

$$\begin{aligned} \mathcal{H}_0|\alpha_e\beta_N\rangle &= g\beta BS_z|\alpha_e\rangle \otimes |\beta_N\rangle - g_N\beta_N B|\alpha_e\rangle \otimes I_z|\beta_N\rangle \\ &= \frac{1}{2}g\beta B|\alpha_e\rangle|\beta_N\rangle + \frac{1}{2}g_N\beta_N B|\alpha_e\rangle|\beta_N\rangle \\ &= \left(\frac{1}{2}g\beta B + \frac{1}{2}g_N\beta_N B\right)|\alpha_e\beta_N\rangle \end{aligned} \quad (4.26)$$

De forma semelhante, obtem-se as energias  $\epsilon$  de ordem zero para os demais estados:

$$\begin{aligned} \epsilon_1 &= +\frac{1}{2}g\beta H - \frac{1}{2}g_N\beta_N H \quad |\alpha_e\alpha_N\rangle \\ \epsilon_2 &= +\frac{1}{2}g\beta H + \frac{1}{2}g_N\beta_N H \quad |\alpha_e\beta_N\rangle \\ \epsilon_3 &= -\frac{1}{2}g\beta H - \frac{1}{2}g_N\beta_N H \quad |\beta_e\alpha_N\rangle \\ \epsilon_4 &= -\frac{1}{2}g\beta H + \frac{1}{2}g_N\beta_N H \quad |\beta_e\beta_N\rangle \end{aligned} \quad (4.27)$$

Aplicando a perturbação  $\mathcal{H}_1$ , dado pela equação 4.19, até a primeira ordem, as funções de onda  $\phi_n$  ficam inalteradas. As energias, no entanto, são acrescidas de  $a\langle\phi_n|S_zI_z|\phi_n\rangle$ .

$$\begin{aligned}\langle\alpha_e\alpha_N|aS_zI_z|\alpha_e\alpha_N\rangle &= \frac{1}{4}a & \langle\alpha_e\beta_N|aS_zI_z|\alpha_e\beta_N\rangle &= -\frac{1}{4}a \\ \langle\beta_e\alpha_N|aS_zI_z|\beta_e\alpha_N\rangle &= -\frac{1}{4}a & \langle\beta_e\beta_N|aS_zI_z|\beta_e\beta_N\rangle &= \frac{1}{4}a\end{aligned}\quad (4.28)$$

Na base formada pelos autovetores de  $S_z$  e  $I_z$ , os termos da diagonal das matrizes dos operadores  $S_x$ ,  $I_x$ ,  $S_y$  e  $I_y$  são nulos, portanto  $\langle\phi_n|S_xI_x|\phi_n\rangle=\langle\phi_n|S_yI_y|\phi_n\rangle=0$ . Esses operadores são importantes no cálculo dos termos de segunda ordem da perturbação. Os estados  $\phi_1$  e  $\phi_4$  permanecem inalterados, assim como suas energias, e os estados  $\phi_2$  e  $\phi_3$  são misturados dando origem a dois novos estados. Essa mistura é responsável pela ocorrência de transições proibidas nos espectros de *EPR*.

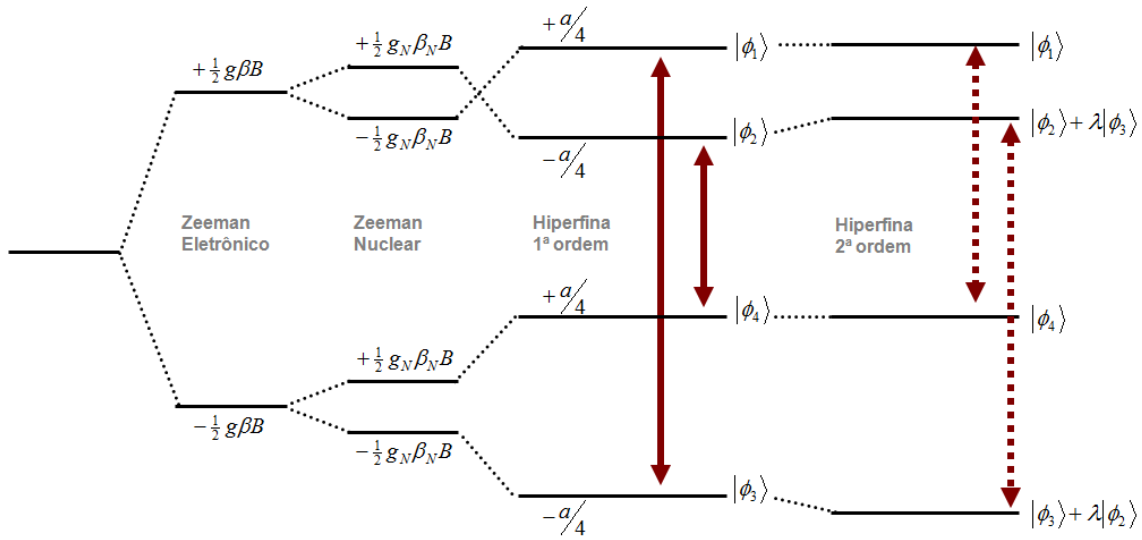


Figura 4.2: Diagrama representativo dos níveis energéticos de spin do átomo de hidrogênio. As setas contínuas representam transições permitidas e as tracejadas, transições proibidas.



## Regras de Seleção

Cosidere um campo magnético oscilante com amplitude  $2B_1$  e frequência  $\omega$ . Se a frequência angular  $\omega$  é ressonante várias transições podem ser induzidas. Transições do tipo  $\alpha_e\alpha_N \rightarrow \beta_e\alpha_N$  onde somente o spin do elétron muda são chamadas transições de *EPR*.

Um campo oscilante  $B_1$  ao longo da direção  $z$  (a mesma do campo estático  $\mathbf{B}$ ) apenas modula os níveis de energia do sistema de spins e não causa absorção de energia. Portanto ele deve ser aplicado perpendicular ao campo contante, por exemplo, na direção  $x$ . A perturbação dependente do tempo resultante  $V(t)$  no átomo de hidrogênio é

$$\begin{aligned} V(t) &= 2(g\beta B_1 S_x - g_N\beta_N B_1 I_x)\cos(\omega t) \\ &= 2V\cos(\omega t), \end{aligned} \tag{4.29}$$

e a probabilidade de transição de um estado  $n$  para um estado  $m$  é dado pela regra de ouro

$$P_{nm} = \frac{2\pi}{\hbar^2} |\langle n|V|m\rangle|^2 \delta(\omega_{mn} - \omega). \tag{4.30}$$

onde  $\omega_{mn}$  é a frequência correspondente à diferença de energia entre os estados  $m$  e  $n$ . O problema se reduz a achar quais elementos da matriz  $V$  são nulos.

Como as transição eletrônicas ressonantes são causada pelo efeito do campo  $H_1$  no elétron, pode-se omitir o operador de spin nuclear  $I_x$  da equação 4.29 e reescrever a probabilidade de transição

$$P_{nm} = \frac{2\pi}{\hbar} g^2 \beta^2 B_1^2 |\langle n|S_x|m\rangle|^2 \delta(\omega_{mn} - \omega). \tag{4.31}$$

É conveniente usar os operadores de transição

$$S_x = \frac{1}{2}(S^+ + S^-), \quad (4.32)$$

onde aplicados nos estados  $|\alpha_e\rangle$  e  $|\beta_e\rangle$  tem-se

$$S^+|\alpha_e\rangle = 0 \quad S^+|\beta_e\rangle = |\alpha_e\rangle \quad \text{então} \quad \langle\alpha_e|S^+|\beta_e\rangle = 1 \quad (4.33)$$

$$S^-|\beta_e\rangle = 0 \quad S^-|\alpha_e\rangle = |\beta_e\rangle \quad \text{então} \quad \langle\beta_e|S^-|\alpha_e\rangle = 1. \quad (4.34)$$

Os elementos de matriz são calculados como mostrado a seguir

$$\begin{aligned} \langle\alpha_e\alpha_N|S_x|\beta_e\alpha_N\rangle &= \langle\alpha_e|S_x|\beta_e\rangle\langle\alpha_N|\alpha_N\rangle \\ &= \frac{1}{2}\langle\alpha_e|S^+|\beta_e\rangle = \frac{1}{2}, \end{aligned} \quad (4.35)$$

e a probabilidade de transição é

$$P = \frac{\pi}{2\hbar^2}g^2\beta^2B_1^2\delta(\omega_{mn} - \omega). \quad (4.36)$$

Como o operador  $S_x$  atua somente no spin do elétron, a parte relativa ao spin nuclear pode ser fatorada. As relações de ortogonalidade  $\langle\alpha_N|\alpha_N\rangle = \langle\beta_N|\beta_N\rangle = 1$  e  $\langle\alpha_N|\beta_N\rangle = \langle\beta_N|\alpha_N\rangle = 0$  mostram que o spin nuclear não pode ser alterado por  $S_x$ . Agora é conveniente simplificar a equação 4.36 introduzindo a fator giromagnético  $\gamma$  no lugar de  $g\beta$  e generalizá-la considerando uma função geral da forma de linha  $g(\omega)$  ao invés da função  $\delta$ . Logo, a nova probabilidade é dada por

$$P = \frac{1}{2}\pi\gamma^2B_1^2g(\omega) \quad (\alpha_e\alpha_N \leftrightarrow \beta_e\alpha_N). \quad (4.37)$$

A outra única transição de *EPR* permitida é  $\alpha_e\beta_N \rightarrow \beta_e\beta_N$  e o elemento de matriz de  $S_x$  correspondente é o mesmo que na equação 4.35

$$\langle\alpha_e\beta_N|S_x|\beta_e\beta_N\rangle = \frac{1}{2}\langle\alpha_e|S^+|\beta_e\rangle = \frac{1}{2}. \quad (4.38)$$

Os outros elementos de  $S_x$  são nulos e correspondem a transições proibidas em *EPR*. As transições permitidas obedecem portanto as regras de seleção:

$$\Delta m_s = \pm 1 \quad \Delta m_I = 0. \quad (4.39)$$

A transição  $\alpha_e\alpha_N \leftrightarrow \beta_e\alpha_N$  e  $\alpha_e\beta_N \leftrightarrow \beta_e\beta_N$  tem igual probabilidade e mesma intensidade.

As energias de transição são:

$$h\nu_a = \left(\frac{1}{2}g\beta B - \frac{1}{2}g_N\beta_N H + \frac{1}{4}a\right) - \left(-\frac{1}{2}g\beta B - \frac{1}{2}g_N\beta_N H - \frac{1}{4}a\right) = g\beta B + \frac{1}{2}a \quad (4.40)$$

$$h\nu_b = \left(\frac{1}{2}g\beta B + \frac{1}{2}g_N\beta_N H - \frac{1}{4}a\right) - \left(-\frac{1}{2}g\beta B + \frac{1}{2}g_N\beta_N H + \frac{1}{4}a\right) = g\beta B - \frac{1}{2}a. \quad (4.41)$$

O espectro de *EPR* de primeira ordem do hidrogênio consiste em duas linhas de mesma intensidade separadas por  $a$ , a contante de acoplamento hiperfina e centradas em  $h\nu/g\beta$ .

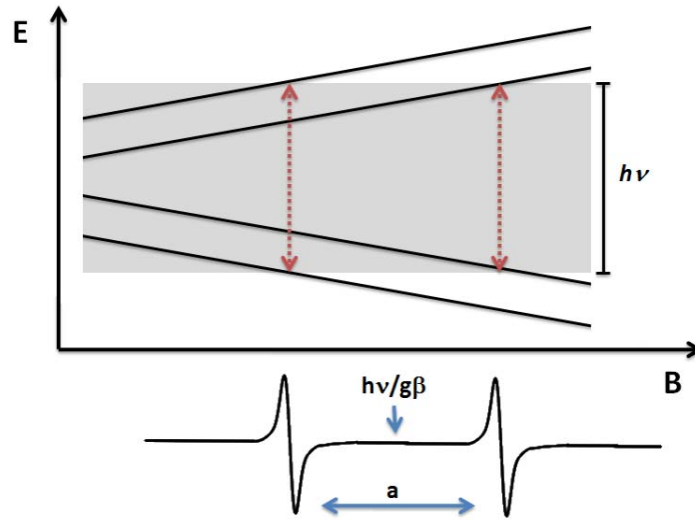


Figura 4.3: Representação da abertura dos níveis do átomo de hidrogênio pela variação de um campo magnético externo. Sempre que a energia entre os níveis corresponde a  $h\nu$  ocorrem transições, gerando uma linha no espectro de *EPR*.

Diferentemente de outras formas de espectroscopia, em *EPR* a frequência  $\nu$  da radiação incidente é mantida constante e o campo magnético aplicado é aumentado gradualmente

até que a diferença de energia entre dois níveis se iguale a  $h\nu$ , obedecendo as regras de seleção. Transições que violam a condição  $\Delta m_I = 0$  podem ser observadas em certos casos e dão origem a linhas pouco intensas ditas proibidas.

### 4.3 Captura de Spins

A identificação e quantificação de radicais livres por espectroscopia *EPR* depende da capacidade de se acumular radicais estáveis em quantidades mensuráveis. Concentrações de 0.1-10 $\mu$ M são necessárias para uma boa relação sinal ruído [29].

Espécies reativas de oxigênio, tais quais  $O_2^{\bullet-}$ , têm vida muito curta, dificultando a sua detecção. Uma forma de contornar esse problema é diminuir a taxa de eliminação baixando abruptamente a temperatura da solução onde são gerados os radicais. Tal método, embora bem sucedido, apresenta limitações quando se quer estudar reações que ocorrem em meios biológicos.

A técnica de captura de spins surge como uma alternativa de medida indireta de radicais livres. Proposta por Janzen e Blackburn em 1968 [30], baseia-se na reação de uma substância diamagnética, o *spin trap* (armadilha de spin), com o radical livre de vida curta, gerando um produto paramagnético estável conhecido como *spin adduct* (aduto de spin), que pode ser medido por espectroscopia *EPR*.

Existem essencialmente dois tipos de compostos orgânicos usados como armadilha de spins: compostos nitronas e compostos nitrosos. Ambos formam adutos de spin nitróxidos.

Os armadilha de spins nitronas são os mais comumente usados e estudados, pois são ideais para identificar  $O_2^{\bullet-}$  e  $HO^{\bullet}$ , espécies de grande importância biológica. Eles formam

adutos de spin consideravelmente estáveis com uma grande gama de radicais, incluindo radicais de carbono, oxigênio, enxofre e nitrogênio. O radical reativo se liga ao átomo de carbono adjacente ao grupo nitróxido incipiente (carbono  $\alpha$ ), e fica portanto mais distante do orbital molecular contendo o elétron desemparelhado como ilustrado na figura 4.4. Esse fenômeno freqüentemente resulta na dificuldade em distinguir pelos acoplamentos hiperfinos quais são os radicais ligados ao grupo nitróxido, embora em alguns casos essa distinção pode ser feita através das interações superhiperfinas com prótons vizinhos. Dentre as armadilhas de spins nitrona se destacam o PBN ( $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl-nitrona) e o DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide).

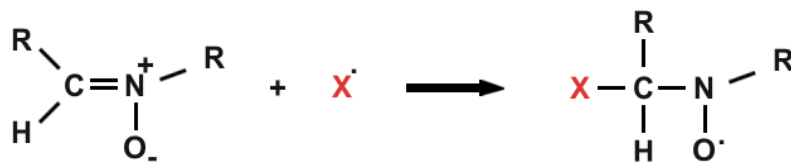


Figura 4.4: Armadilha de spins nitrona.

Nas armadilhas de spin baseadas em compostos nitrosos o radical realiza um ataque direto ao átomo de nitrogênio, e fica portanto mais próximo do elétron desemparelhado do radical nitróxido formado, como ilustrado na figura 4.5. Geralmente, isso permite a detecção de acoplamentos hiperfinos dos prótons presentes no radical adicionado. O tamanho e a natureza destes acoplamentos permitem a identificação mais precisa do radical capturado no aduto de spin. A desvantagem dessas armadilhas de spins é que elas formam adutos de spin estáveis com um grupo limitado de radicais (geralmente radicais orgânicos). Além disso, eles são freqüentemente instáveis térmica e fotoquimicamente.

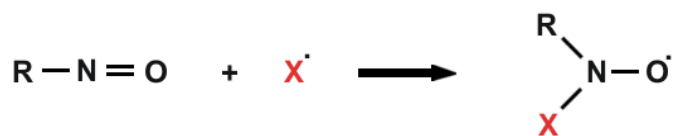


Figura 4.5: Armadilha de spins nitrosos.

### 4.3.1 Quantificação de adutos de spin por *EPR*

Em algumas aplicações analíticas, deseja-se conhecer a concentração de espécies paramagnéticas que dão origem ao sinal de *EPR* observado. Na prática, determinações absolutas sobre uma única amostra raramente são executadas, pois podem implicar em muitos erros. Padrões de concentração são geralmente empregados para minimizar estes erros. As seguintes condições devem ser aplicadas tanto à amostra padrão quanto à amostra com concentração desconhecida [31]:

- mesmo solvente ou matriz, a fim de garantir que o campo magnético da microonda seja o mesmo para ambas as amostras;
- não deve haver saturação nos sinais de *EPR* do padrão ou da amostra (amplitude dos sinais de *EPR* proporcional à raiz quadrada da potência da microonda incidente na cavidade) e a potência da fonte de microondas deve ser a mesma;
- modulação do campo magnético pequena o suficiente para resolver as interações hiperfinas, porém adequada à uma alta relação sinal-ruído;
- mesma temperatura.

Sob essas condições a expressão para a concentração desconhecida  $[X]$  é:

$$[X] = [std] \frac{A_X R_X (scan_X)^2}{G_X M_X (g_X)^2 [S(S+1)]_X} \frac{G_{std} M_{std} (g_{std})^2 [S(S+1)]_{std}}{A_{std} R_{std} (scan_{std})^2} \quad (4.42)$$

Os índices  $X$  e  $std$  indicam a amostra e o padrão.  $A$  é a área sob a curva de absorção,  $scan$  é a escala horizontal,  $G$  é o ganho relativo do amplificador de sinal,  $M$  é a amplitude de modulação do campo, e  $R$  é definido pela expressão:

$$R = \frac{\sum D_j}{D_k} \quad (4.43)$$

onde  $D_k$  é a degenerescência da linha mais intensa e  $\sum D_j$  é a soma das degenerescências de todas as linhas do espectro.

Um padrão de concentração muito utilizado na quantificação de adutos de spin nítróxido é o radical estável 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPO) [32], já que as espécies desse grupo são quimicamente similares às dos adutos do PBN e exibem sinais de *EPR* semelhantes a esses. A expressão 4.42 é consideravelmente simplificada já que  $S$ ,  $R$ ,  $scan$ ,  $G$  e  $M$  serão os mesmos para o padrão e a amostra. Assim,

$$[X] = [std] \frac{A_X}{A_{std}} \quad (4.44)$$

A determinação precisa do fator  $g$  de um centro paramagnético também requer o uso de uma substância padrão. O  $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH) é muito utilizado por apresentar um espectro de uma única linha muito forte com fator  $g=2,0037$ . Usando a condição de ressonância 4.5 temos:

$$\frac{h\nu}{\beta} = g_x B_x = g_{std} B_{std} \quad \Rightarrow \quad g_x = g_{std} \frac{B_{std}}{B_x} \quad (4.45)$$

## 4.4 O experimento de *EPR*

Em um espectrometro de *EPR*, esquematizado na figura 4.6, a geração de microondas ocorre em uma fonte Klystron(VARIAN) com potência de 500mW e frequência de microondas na faixa de 9,4GHz (banda X). As microondas são conduzidas por guias de onda retangulares para a cavidade ressonante, no centro da qual a amostra é posicionada.

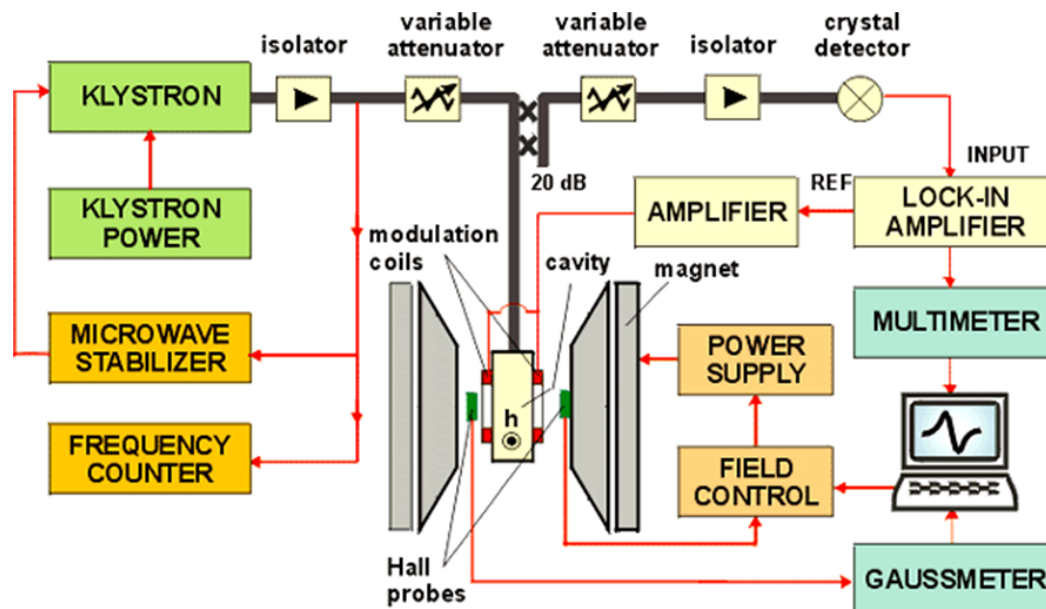


Figura 4.6: Diagrama do espectrômetro de EPR.

A cavidade ressonante possui geometria definida para que ondas estacionárias se formem em seu interior, como ilustrado na figura 4.7. O campo magnético oscilante ( $B_1$ ) das microondas possui valor máximo no centro da cavidade e é perpendicular ao campo uniforme  $B$ . Uma fonte de corrente alimenta um eletroímã que produz o campo magnético  $B$  variando de 0 a 800mT. O espectrômetro opera com uma frequência fixa de microondas e varre o espectro variando linearmente o campo estático.

Um controle automático de frequência (CAF) é usado para manter acopladas a



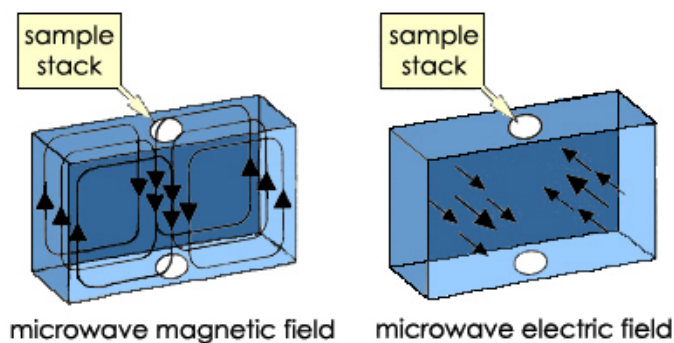


Figura 4.7: Modos de ressonância dos campos elétricos e magnéticos das microondas na cavidade.

frequência das microondas e a frequência de ressonância da cavidade. É necessário, no entanto, ajustá-lo para cada nova amostra inserida na cavidade, pois elas alteram o acoplamento e a fase das ondas refletidas. O CAF é feito modulando a microonda com um sinal de 8 kHz, cuja fase será comparada em um amplificador Lock-in com a fase do sinal refletido. Se os sinais estiverem fora de fase, o sistema gera uma voltagem, proporcional à diferença de frequências, que é aplicada ao refletor do Klystron. Dessa forma, ele corrige a frequência da microonda produzida.

Na cavidade acoplada, as microondas que chegam pelo guia de onda são minimamente refletidas. Quando  $B$  atinge um valor tal que diferença de energia entre os níveis seja  $h\nu$ , a amostra absorve microondas e destrói o acoplamento, levando a um aumento no sinal da onda refletida. Essa variação é detectada pelo diodo detector, pré-amplificada e alimentadas ao Lock-in que gera uma tensão proporcional à variação do nível de microondas na cavidade. Essa tensão é lida pelo computador onde se pode visualizar a medida.

Para aumentar a qualidade do sinal, utiliza-se uma modulação de 100kHz no campo

estático. Antes de chegar à cavidade, o sinal passa por um circulador onde é dividido em duas partes. Uma delas irá para a cavidade e a outra será levada a dois diodos detectores, o primeiro para o CAF e o segundo para o sinal. O circulador tem a importante propriedade de permitir que a onda passe em apenas um sentido. Dessa forma, o sinal refletido volta da cavidade para o circulador pelo mesmo guia de onda mas a partir daí segue por um caminho diferente para os diodos detectores. As fases dos sinais são então comparadas e o sinal é amplificado no Lock-in.

A curva de absorção de microondas geralmente apresenta a forma de uma gaussiana ou uma lorentziana, mas devido à modulação de 100kHz o sinal detectado é a derivada primeira da absorção. A forma de lorentziana geralmente ocorre em sistemas líquidos com baixa concentração de centros paramagnéticos e com poucas interações hiperfinas. A linha se aproxima da forma gaussiana se for uma superposição de vários componentes, devido a inúmeras interações hiperfinas não resolvidas no espectro.

# Capítulo 5

## Resultados experimentais e análise dos dados

### 5.1 Derivados de Fullerenos

A difícil manipulação da molécula de  $C_{60}$  devido à sua baixa solubilidade em água foi, desde a sua descoberta, um sério obstáculo para a sua aplicação prática. Este obstáculo tem sido superado, nos últimos anos, seguindo duas vertentes principais de pesquisa: a modificação química da superfície da esfera de carbono para obtenção de fullerenos funcionalizados covalentemente com grupos polares [33] e a complexação do  $C_{60}$  ou derivados com moléculas como ciclodextrinas [34] dentre outros. A enorme maioria dos trabalhos da literatura consiste na síntese de derivados covalentemente modificados, com o objetivo de se produzir novos compostos com solubilidade adequada e/ou propriedades intrínsecas.

Seguindo essa tendência, estabeleceu-se uma colaboração com um grupo de pesquisa do Departamento de Química da UFMG, o qual foi o responsável pela síntese dos derivados de  $C_{60}$  estudados. Seis novas espécies de fullereno (figura 5.1), contendo unidades tetrazole ou oxadiazole, foram preparadas para investigar sua eficiência na produção de ROS.

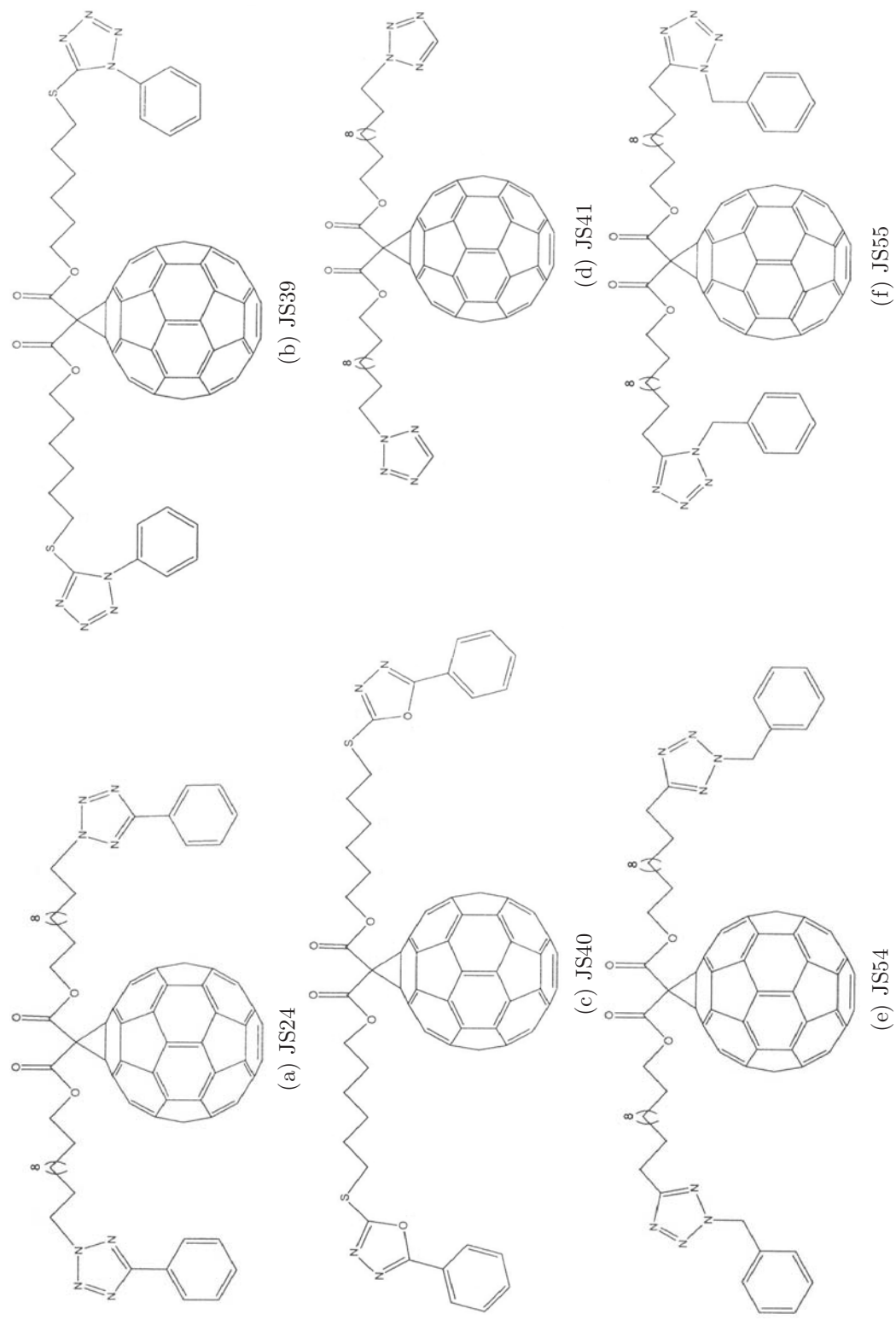


Figura 5.1: Estrutura das moléculas dos seis novos derivados de fullereno analisados nesse trabalhos.

As duas longas cadeias carbônicas ligadas ao  $C_{60}$  têm por objetivo reduzir os efeitos de agregação dos fullerenos em solução. Embora ainda pouco hidrossolúveis, estes compostos são potenciais agentes fototerapêuticos e poderiam ser aplicados em formulações farmacêuticas de cremes para terapia fotodinâmica tópica. Além disso, a partir dessas moléculas pode-se obter derivados anfipáticos, tais como sais ou complexos com resíduos hidrofílicos, tornando possível estudar também suas propriedades em solventes polares como a água ou até meios fisiológicos. Detalhes sobre a síntese e caracterização destes compostos podem ser encontrados em [35] e [36].

Para efeito de comparação, todas as medidas e análises feitas com os novos derivados foram realizadas também com o  $C_{60}$  puro e com um derivado comercialmente disponível, o  $C_{60}$ -PCBM ([6,6]-phenyl  $C_{61}$  butyric acid methyl ester), ilustrado na figura 5.2.

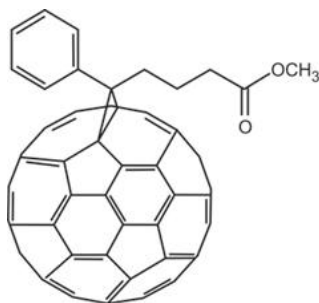


Figura 5.2: Estrutura do  $C_{60}$ -PCBM.

## 5.2 Medidas

### 5.2.1 Absorção óptica

Antes de realizar os experimentos de geração de ROS sob iluminação, foi necessário conhecer as propriedades ópticas de cada derivado. Soluções dos fullerenos em tolueno, todas com concentração de 0,02mM, foram preparadas e acondicionadas em cubetas de

quartzo de 10mm espessura. As medidas dos espectros de absorção óptica (figura 5.3), no intervalo de 300nm a 1100nm, foram feitas à temperatura ambiente e usando uma amostra de tolueno puro para a linha de base.

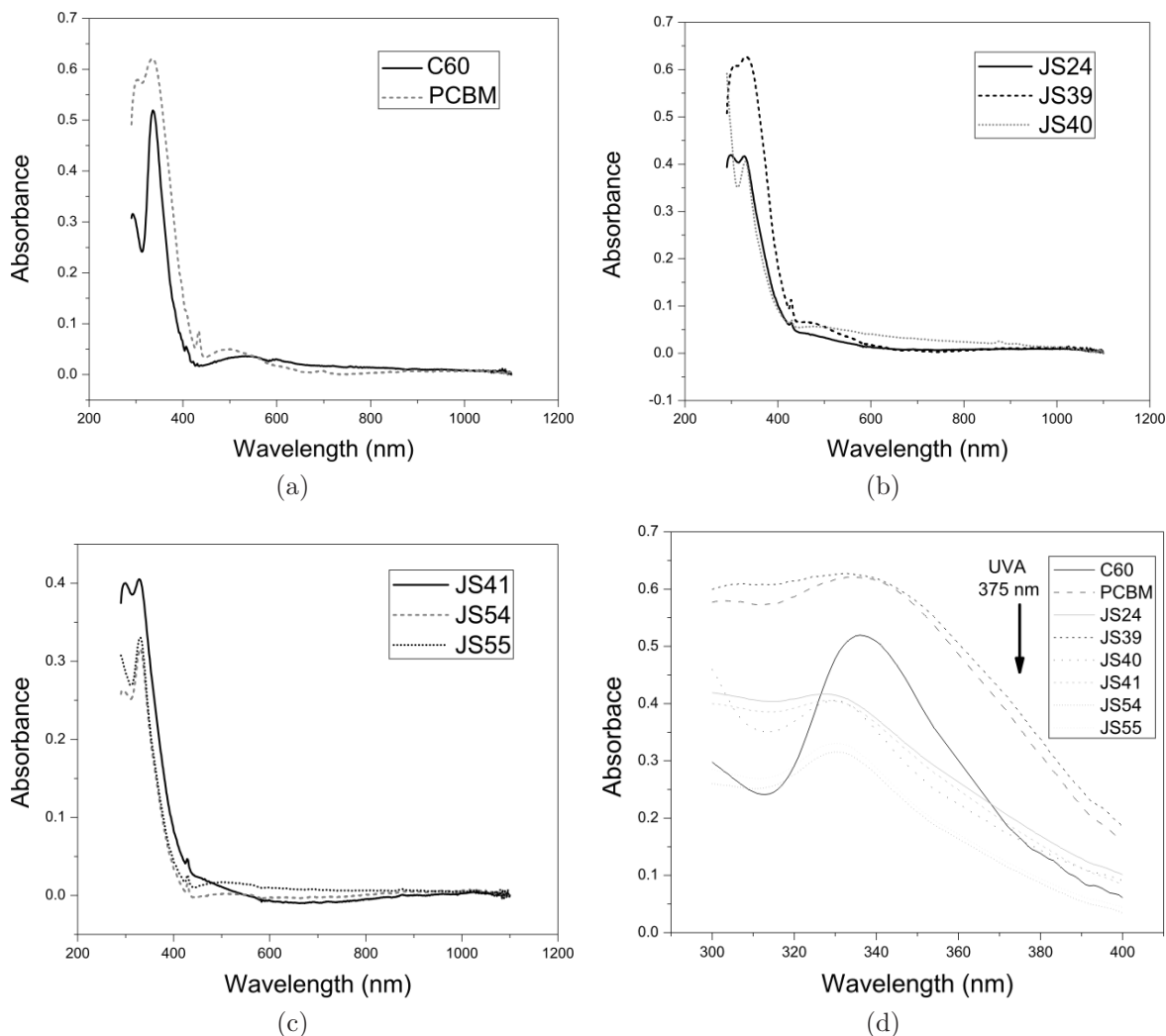


Figura 5.3: (a),(b) e (c) Espectros de absorção óptica de soluções de fullerenos em tolueno (0,02mM) à temperatura ambiente. (d) Em maior detalhe a região dos espectros próximas ao comprimento de onda do laser utilizado nos experimentos de captura de spin.

Todos os espectros foram muito semelhantes, apresentando fraca absorção para comprimentos de onda na faixa do visível (acima de 400nm) e um aumento drástico na faixa do ultravioleta A (400 a 320 nm) e UVB (320 a 280nm). Os resultados dessas medidas serão analisados na sessão 5.3.

## 5.2.2 EPR

A geração de ROS induzida por  $C_{60}$  e seus derivados sob iluminação UVA foi estudada por EPR usando a técnica de captura de spins. Para tanto, preparou-se uma série de amostras em tolueno (P.A. ACS 99.5%, Vetec Química Fina), cada uma contendo dois compostos: a armadilha de spin PBN ( $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl-nitrone 98+%, Sigma Aldrich) e um fullereno ou derivado, com concentrações de 300mM e 1mM respectivamente. As amostras foram preparadas sob iluminação ambiente, mas protegidas da luz imediatamente após o preparo. Um volume de 100 $\mu$ L de solução foi colocado em um tubo de EPR de borosilicato, com diâmetro interno de 3mm, que por sua vez foi posicionado no interior da cavidade ressonante de EPR. Um laser de estado sólido, de comprimento de onda 375nm e potencia nominal de 16mW, foi montado sobre a abertura da cavidade, iluminando a amostra em seu interior, como representado na figura 5.4.

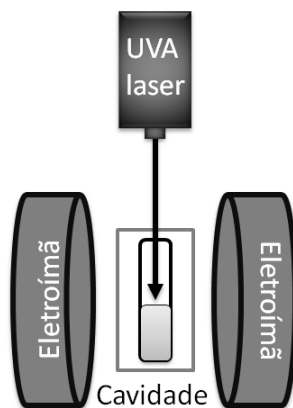


Figura 5.4: Representação esquemática da montagem utilizada para iluminar as amostras.

Medidas de EPR de cada amostra foram feitas para vários tempos de iluminação UVA e à temperatura ambiente. Os espectros de EPR das amostras antes de serem iluminadas (escuro) e após 150 minutos de iluminação estão registrados nas figuras 5.5 e 5.6.

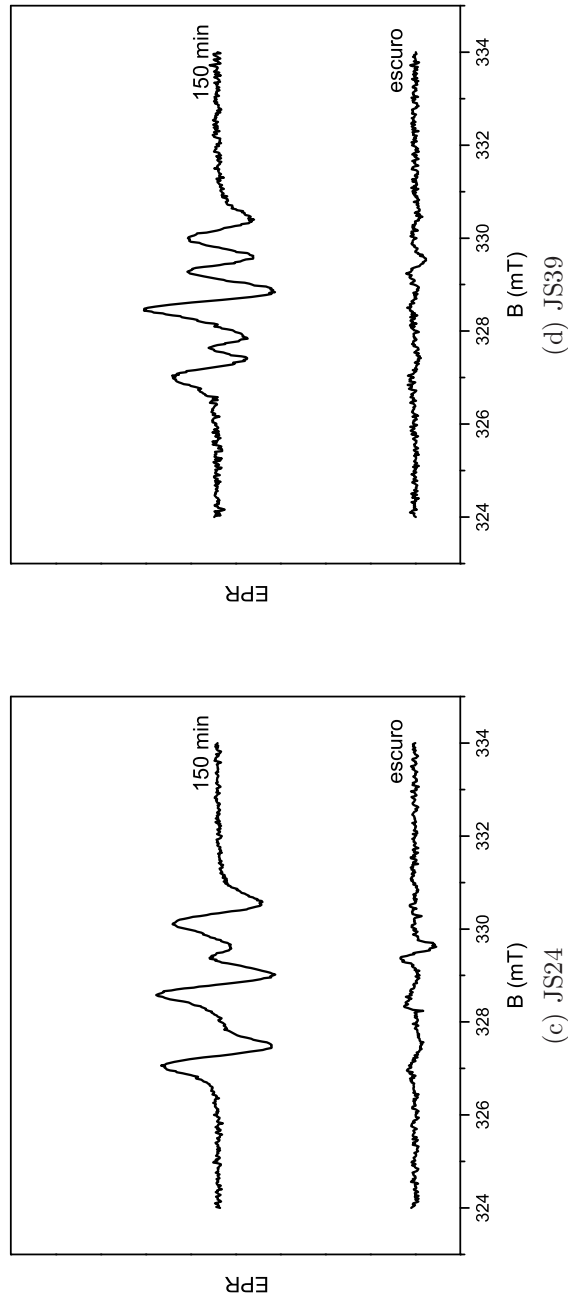
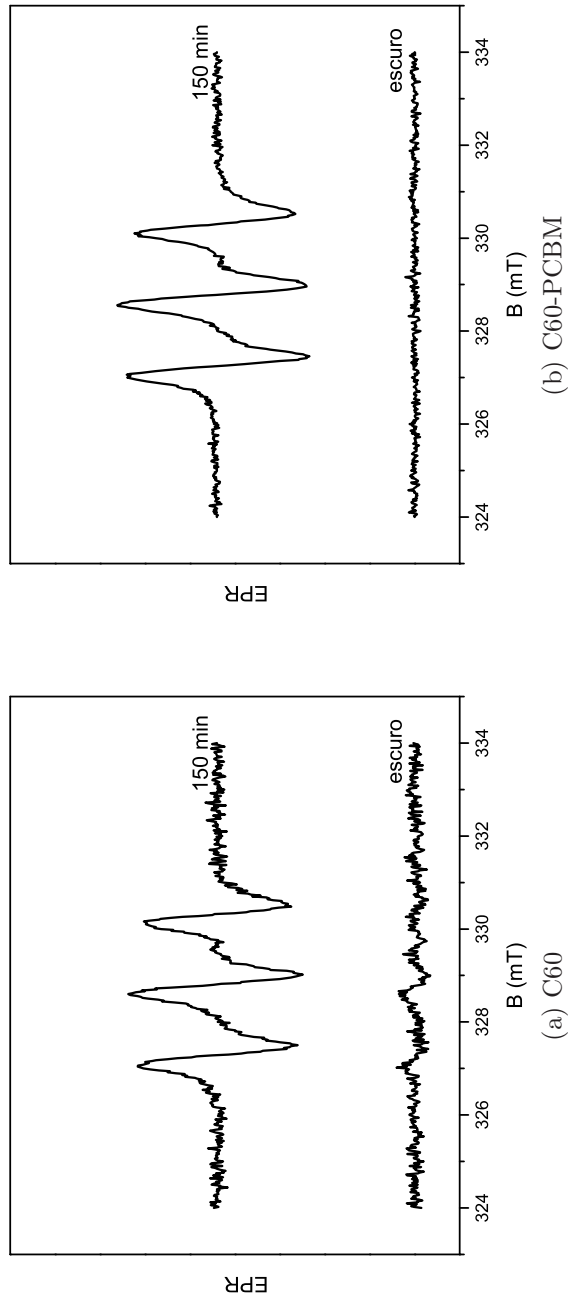


Figura 5.5: Espectros das soluções de fullereno e PBN em tolueno antes e após iluminação com UVA.



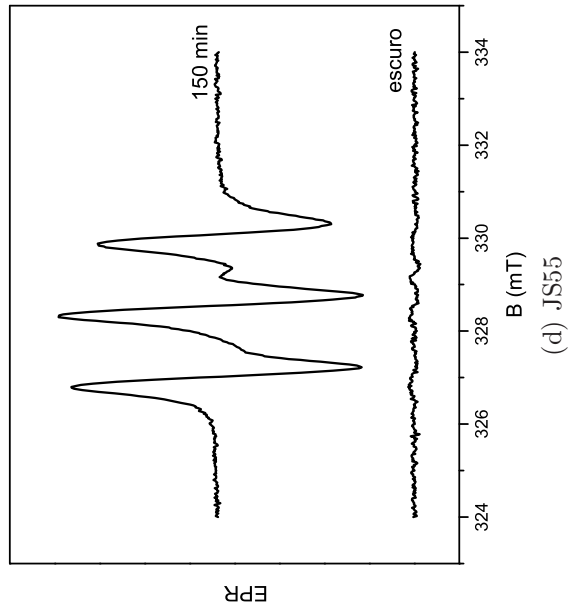
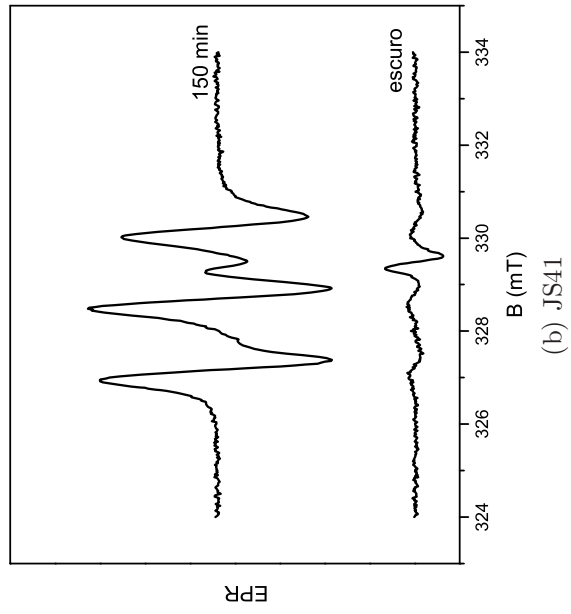
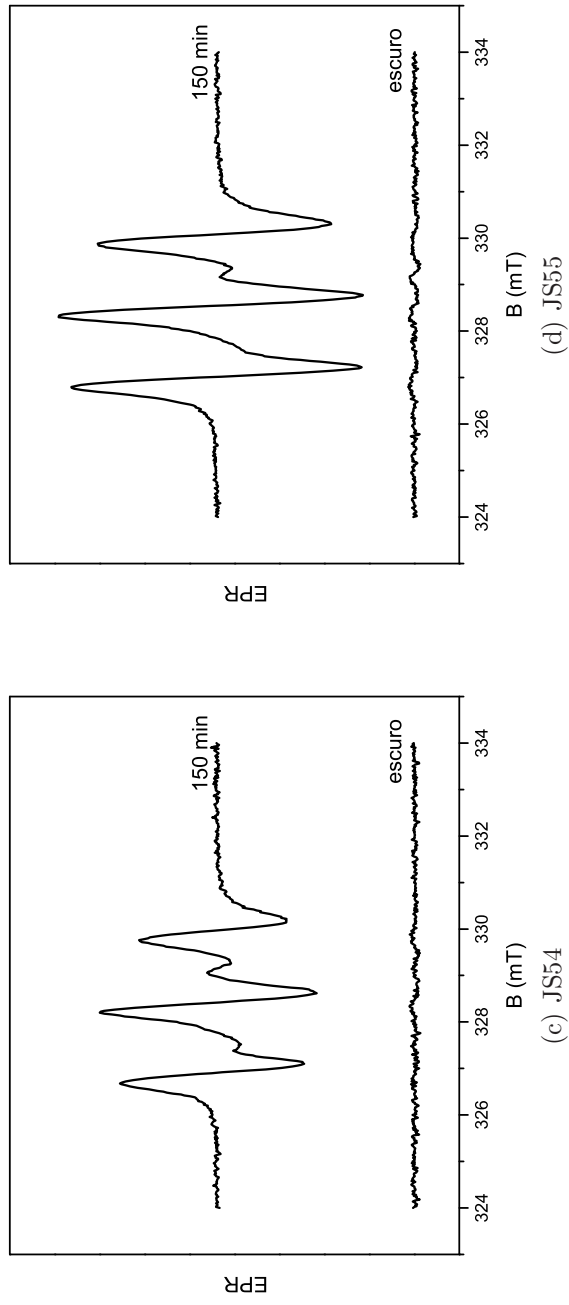
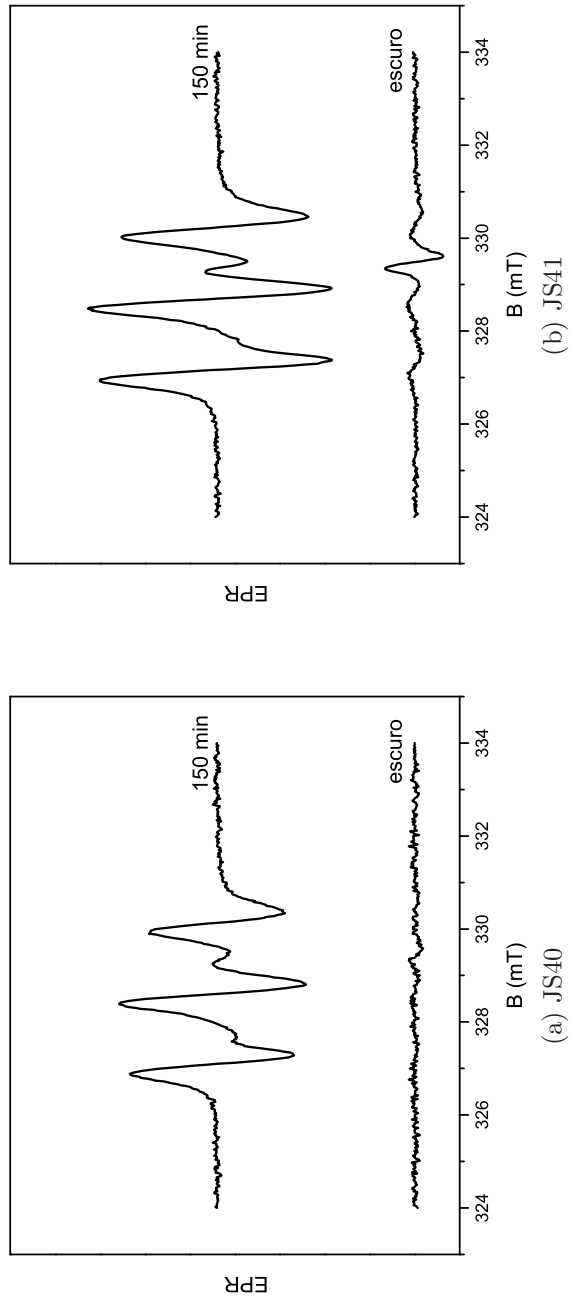


Figura 5.6: Espectros das soluções de fullereno e PBN em tolueno antes e após iluminação com UVA.

Nos espectros de EPR das soluções de  $C_{60}$  e de todos os derivados estudados sobressai o mesmo sinal: um tripleto com constante de desdobramento hiperfina  $a=1,54\text{mT}$  devido à presença do grupo nitróxido na molécula do aduto de spin do PBN ( $^{14}\text{N}$ ,  $I=1$  e  $\approx 100\%$  de abundância natural).

### 5.3 Determinação do coeficiente de extinção molar

A partir dos espectros de absorção óptica da figura 5.3 determinou-se o coeficiente de extinção molar  $\epsilon$  em  $375\text{nm}$  (comprimento de onda do laser utilizado nos experimentos de captura de spin) para todos os fullerenos, através da lei de Beer-Lambert:

$$I = I_0 e^{(-\epsilon \ell c)} \quad (5.1a)$$

$$A = \epsilon \ell c \quad (5.1b)$$

onde  $I$  e  $I_0$  são as intensidades luminosas inicial e final,  $A$  é a absorbância medida,  $c$  é a concentração da amostra e  $\ell$  é a distância percorrida dentro da amostra (figura 5.7). Com o coeficiente de extinção  $\epsilon$  a potência do laser absorvida por cada amostra nos

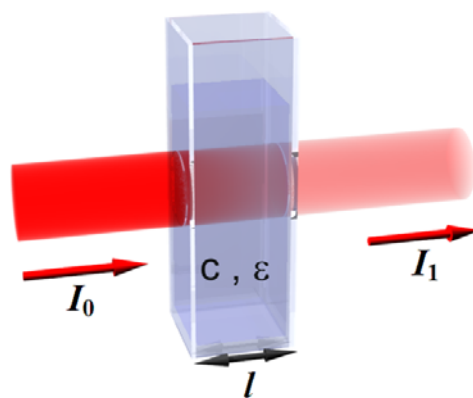


Figura 5.7: A diferença de intensidade entre o feixe incidente  $I$  e transmitido  $I_0$  depende de características da amostra (concentração  $C$  e absorvidade molar  $\epsilon$ ) e da distância  $\ell$  percorrida dentro dela.

experimentos de EPR pôde ser calculada, levando-se em conta o diâmetro de spot do laser ( $1,74 \pm 0,15$ ) mm e a altura da coluna de solução no tubo de EPR ( $14,0 \pm 0,5$ ) mm, o que dá um volume efetivamente iluminado de  $(33,3 \pm 2,9) \mu\text{L}$ . A potência do laser incidente na amostra foi 16mW. A tabela 5.1 registra os valores, para cada amostra, da absorbância em 375nm, do coeficiente de extinção e da potência absorvida.

Tabela 5.1: Dados de absorção óptica de fullerenos e derivados.

Amostra	Absorbância a 375nm	$\epsilon$ ( $\times 10^3 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ )	Potência absorvida (mW)
JS24	$0,1919 \pm 0,0096$	$9,59 \pm 0,48$	$3,771 \pm 0,087$
JS39	$0,384 \pm 0,019$	$19,20 \pm 0,96$	$6,65 \pm 0,31$
JS40	$0,1616 \pm 0,0081$	$8,08 \pm 0,40$	$3,247 \pm 0,063$
JS41	$0,1758 \pm 0,0088$	$8,78 \pm 0,44$	$3,494 \pm 0,074$
JS54	$0,1040 \pm 0,0052$	$5,20 \pm 0,26$	$2,168 \pm 0,027$
JS55	$0,1118 \pm 0,0056$	$5,59 \pm 0,28$	$2,322 \pm 0,031$
$C_{60}$	$0,1656 \pm 0,0083$	$8,28 \pm 0,41$	$3,318 \pm 0,066$
$C_{60}$ -PCBM	$0,356 \pm 0,018$	$17,78 \pm 0,89$	$6,28 \pm 0,27$

## 5.4 Determinação do fator g

Para determinar o fator g dos adutos de spin gerados nas soluções dos novos derivados de fullereno, as mesmas soluções iluminadas anteriormente foram medidas novamente alguns dias depois, desta vez com uma pequena quantidade de DPPH afixada na parte externa do tubo de EPR. O DPPH possui um sinal forte com fator g bem definido ( $g=2,0035$ ). Outras medidas sem o padrão também foram feitas, para servir como base, já que o sinal do DPPH ocultou parte do espectro dos adutos de PBN. Essas medidas estão registradas na figura 5.8

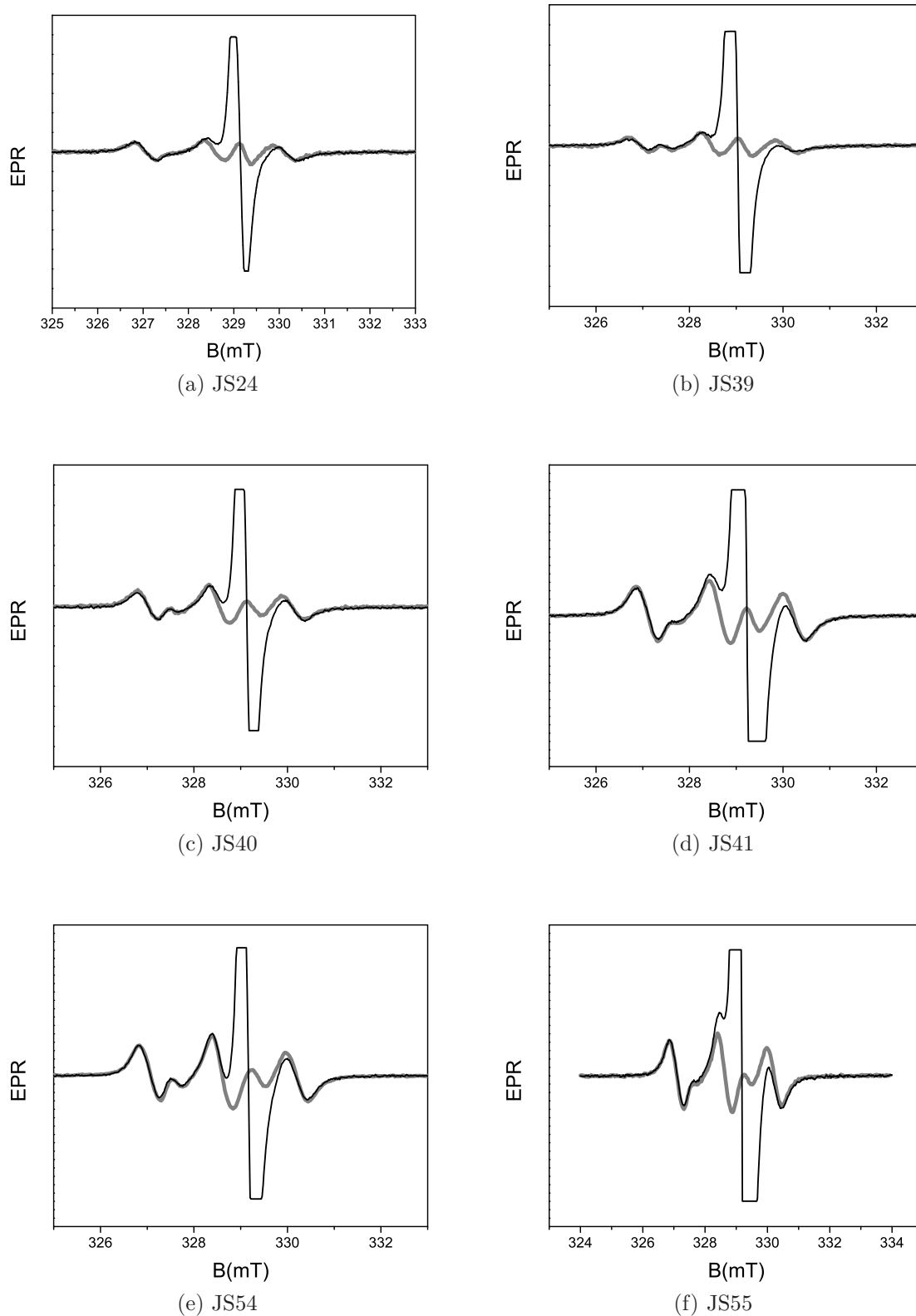


Figura 5.8: Espectros das soluções de fullereno e PBN com DPPH (linha preta) e sem DPPH(linha cinza) para determinação do fator g.

O sinal do DPPH é muito forte comparado ao da solução, e mesmo utilizando uma quantidade bem pequena do padrão o sinal saturou. Embora não seja o ideal, não impede a determinação do campo  $B_{std}$  onde a derivada do sinal de absorção corta o eixo B.

Pelo valor de B no centro do tripleto, e usando a expressão dada em 4.45 pode-se calcular o fator g do sinal do aduto de PBN em cada solução:

$$g_{JS24} = 2.0067 \pm 0.0006 \quad g_{JS39} = 2.0069 \pm 0.0006 \quad g_{JS40} = 2.0067 \pm 0.0006$$

$$g_{JS41} = 2.0069 \pm 0.0006 \quad g_{JS54} = 2.0064 \pm 0.0006 \quad g_{JS55} = 2.0066 \pm 0.0006$$

## 5.5 Calibração do número de spins

O TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetremethylpiperidine-N-oxyl) é um radical livre estável que possui o mesmo grupo paramagnético nitróxido que os adutos do PBN, como ilustrado na figura 5.9, e por isso é amplamente utilizado como padrão em experimentos de captura de spin. Esse grupo nitróxido é o responsável pela presença de três linhas no espectro de spin. Esse grupo nitróxido é o responsável pela presença de três linhas no espectro de EPR (ver figura 5.10a), devido à interação hiperfina entre o núcleo do  $^{14}N$ , cujo spin nuclear é  $I=1$ , e o elétron desemparelhado.

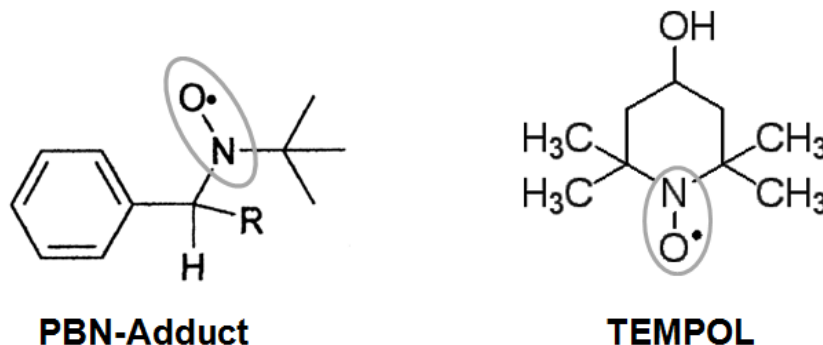


Figura 5.9: As moléculas do aduto do PBN e do padrão TEMPOL, destacando o grupo nitróxido em comum.

O mesmo tratamento dado ao átomo de hidrogênio no capítulo 4 é feito para o radical nítróxido no Apêndice A. Foram feitas medidas de várias soluções de TEMPOL em tolueno, com concentrações entre 1 e  $10\mu\text{M}$ , juntamente com uma amostra de tolueno puro.

Os espectros foram então integrados para se obter a curva de absorção de EPR, cuja área depende da concentração de radicais presentes. Assim, contrui-se uma curva de calibração da área da curva de absorção de EPR (integral dupla do sinal de EPR) em função da concentração de adutos de spin.

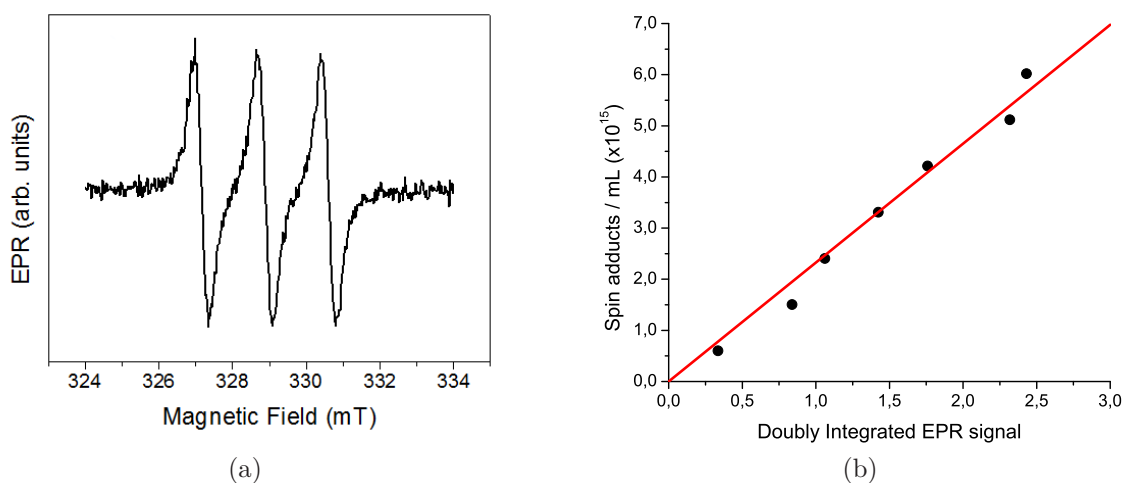


Figura 5.10: (a) Espectro de EPR do grupo nítróxido no radical livre TEMPOL em tolueno ( $10\mu\text{M}$ ). (b) Curva de calibração mostrando a dependencia quadrática da concentração de spins como função do sinal de EPR duplamente integrado.

Os dados foram ajustados por regressão linear segundo a expressão:

$$N_{spins} = A * I_{EPR} \quad (5.2)$$

onde  $N_{spins}$  é o número de spin por mL de solução de TEMPOL e  $I_{EPR}$  é o sinal de EPR duplamente integrado. Os valor de A obtido foi:

$$A = (2,325 \pm 0,064) \times 10^{15} \text{mL}^{-1}$$

## 5.6 Análise dos Resultados

### 5.6.1 Tratamento dos dados de EPR

A análise dos sinais de EPR das soluções de fullereno segue o mesmo método usado com o espectro do TEMPOL: integra-se o sinal para obter a curva de absorção EPR, cuja área é proporcional ao número de spins na amostra.

Mas, como pode ser observado nas figuras 5.5 e 5.6, alguns espectros apresentam linhas adicionais além das três linhas típicas do radical nitróxido que eram esperadas. Embora no final do processo de iluminação o sinal de EPR do aduto de PBN seja dominante, no início da iluminação esses sinais secundários apresentam intensidades comparáveis, como pode ser visto para um dos compostos (o JS24) na figura 5.11. Aos 15 minutos de iluminação uma linha se destaca das demais mas aos 150 minutos ela parece pouco relevante perto do sinal forte do tripleto. Em outras amostras um tripleto de menor intensidade e constante hiperfina pequena ( $a=0,85\text{mT}$ ) foi observado.

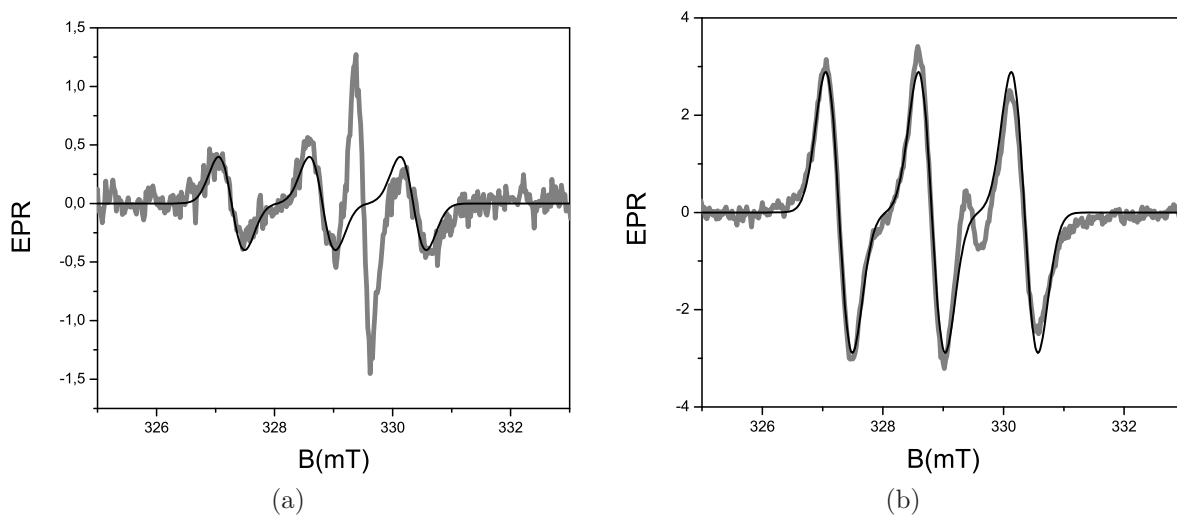


Figura 5.11: Espectros medidos para a solução contendo JS24 e sinal simulado do aduto de PBN aos (a) 15 e (b) 150 minutos de iluminação UV.

Esses sinais secundário, presentes na maioria dos espectros das soluções de todos os derivados, estão sobrepostos ao sinal do aduto do PBN. A dupla integração do espectro como um todo levaria a valores superiores aos reais.

Para isolar o sinal de interesse foi necessário simular o espectro do aduto de PBN considerando a presença de um elétron desemparelhado ( $S=1/2$ ) nas proximidades de um núcleo de nitrogênio ( $I=1$ ). Os parâmetros da simulação foram: fator  $g = 2,007$ , largura de linha  $w = 0,52\text{mT}$ , constante de acoplamento hiperfina  $a = 1,54\text{mT}$  e forma de linha gaussiana. O espectro foi simulado para valores de campo magnético entre 320 e 340mT, usando a frequência de microondas de 9,23GHz. A intensidade das linhas simuladas foi, a princípio, arbitrária.

Nos espectros medidos, a primeira das três linhas aparentemente não está sobreposta aos sinais secundários, portanto foi usada para determinar a altura dos picos, completando assim a simulação. Cada espectro simulado foi duplamente integrado para, usando a curva de calibração, obter o número de adutos de spin para determinado tempo de iluminação.

### 5.6.2 Curvas de iluminação

Os gráficos das figura 5.12, 5.13 e 5.14 apresentam as curvas do número de adutos de PBN formados em função do tempo de exposição à radiação UV.

Na figura 5.12 estão registradas as curvas referentes à solução de  $C_{60}$  e  $C_{60}$ -PCBM em tolueno. A figura 5.13 mostra a curva dos derivados com menor eficiência na geração de ROS e a figura 5.14, os com maior eficiência.

A produção de ROS na presença de um fotossensibilizador ocorre por um dos dois mecanismos explicados no capítulo 3. Já está bem estabelecido que o  $^1O_2$  é o principal



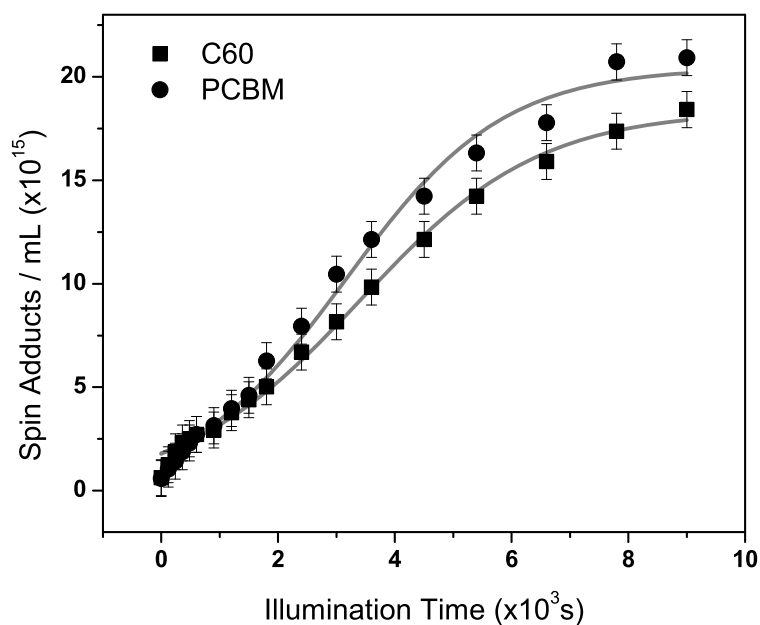


Figura 5.12: Evolução temporal da concentração absoluta do aduto do PBN sob iluminação, em soluções de tolueno contendo 300mM de PBN e 0,1mM de C<sub>60</sub> ou C<sub>60</sub>-PCBM.

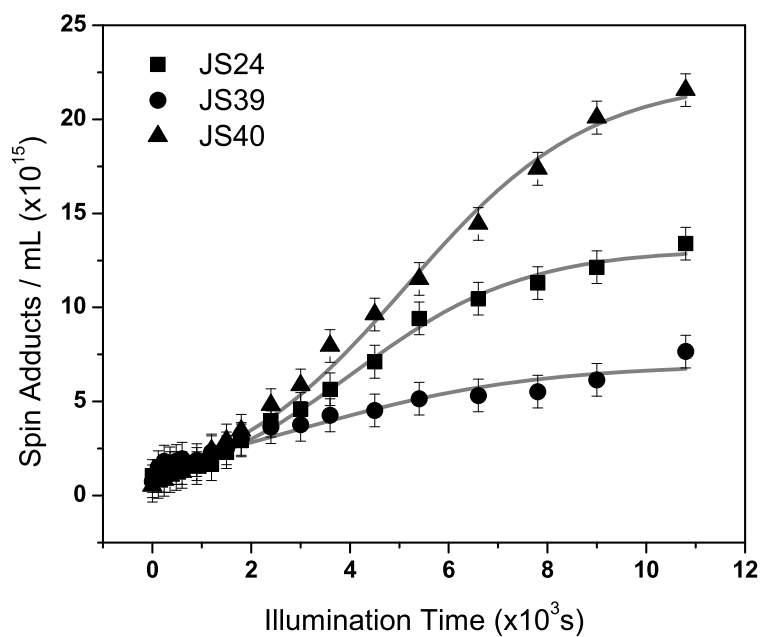


Figura 5.13: Evolução temporal da concentração absoluta do aduto do PBN sob iluminação, em soluções de tolueno contendo 300mM de PBN e 0,1mM de JS24, JS39 ou JS40.

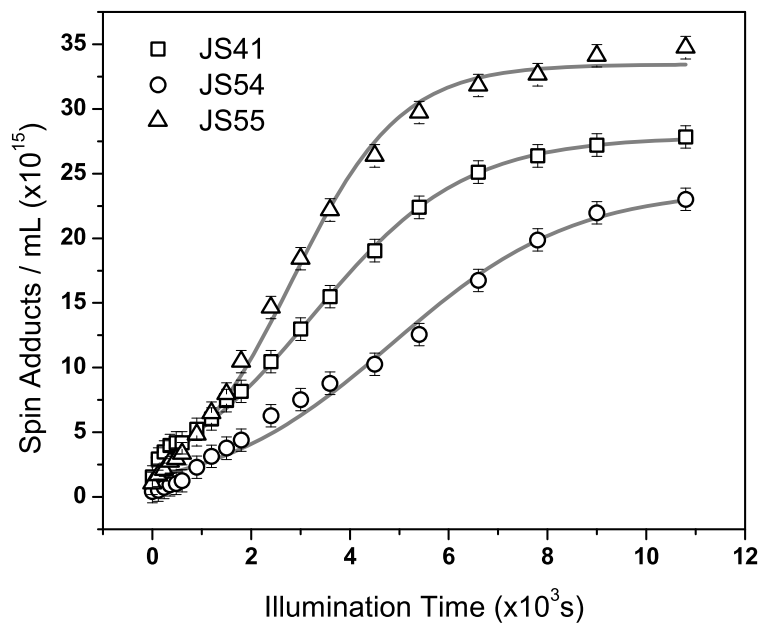


Figura 5.14: Evolução temporal da concentração absoluta do aduto do PBN sob iluminação, em soluções de tolueno contendo 300mM de PBN e 0,1mM de JS41, JS54 ou JS55.

ROS produzido na fotoexcitação de fullerenos [37]. No entanto, a formação de adutos de spin nesses experimentos é induzida por radicais superóxido, que podem se formar pelo mecanismo tipo I (ocorrendo paralelamente ao mecanismo tipo II predominante) ou pela redução do  $^1O_2$  em  $O_2^{\bullet-}$ , processo já observado em meios biológicos [38].

Em um trabalho anterior [39], a produção de  $^1O_2$  seguida de sua redução em  $O_2^{\bullet-}$  já foi observada para um derivado de fullereno semelhante, indentificado como composto 5 (figura 5.15). Na ocasião experimentos de captura de spin com PBN foram realizados na presença de dois inibidores: superóxido dismutase (SOD) para o  $O_2^{\bullet-}$  e betacaroteno para o  $^1O_2$ . Uma considerável redução no sinal foi observada na presença de ambos os inibidores, como mostra a figura 5.16.

A redução do sinal na presença de betacaroteno indica que esse ROS está sendo produzido em grandes quantidades, indicando a ocorrência do mecanismo tipo II. A

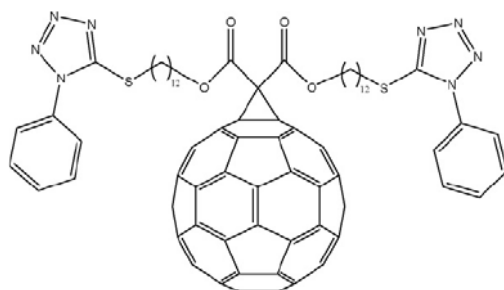


Figura 5.15: Estrutura do composto 5, da mesma família dos derivados aqui analisados.

redução do sinal na presença de SOD, no entanto, não é conclusiva, já que o superóxido pode ser gerado diretamente pelo mecanismo tipo I ou pela redução do oxigênio singlete após o mecanismo tipo II. Esses resultados são consistentes com a predominância do mecanismo tipo II seguida de conversão em superóxido.

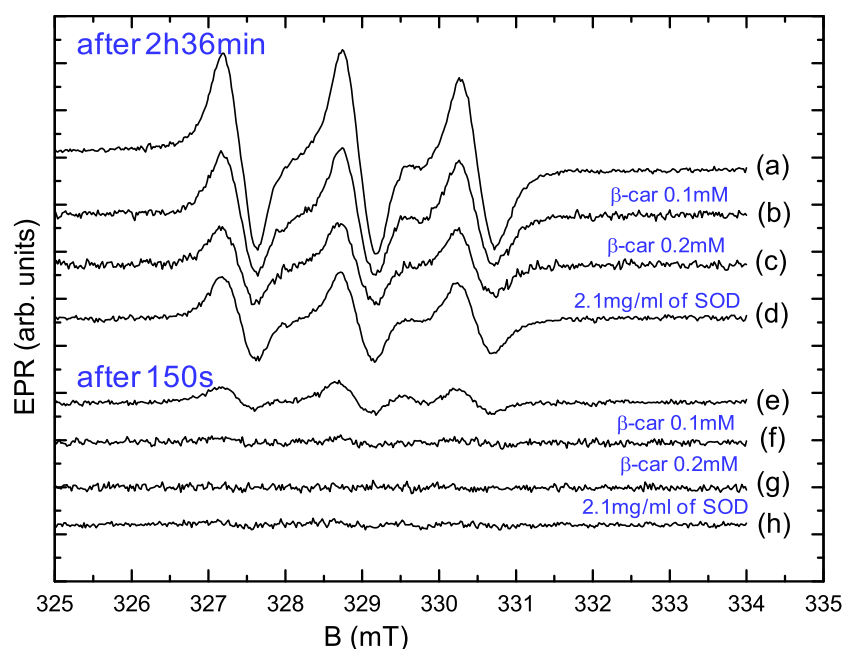


Figura 5.16: Espectros de EPR dos adutos de spin foto-gerados na presença de um derivado de fullereno: (a)-(d) após 2 horas e 36 minutos de iluminação e (e)-(h) após 150 segundos. Os inibidores de ROS usados foram betacaroteno (inibidor de  $^1O_2$ ) 0,1mM em (b) e (f) e 0,2mM em (c) e (g); e 2,1mg/mL de SOD (inibidor de  $O_2^{\bullet-}$ ) em (d) e (h).

### 5.6.3 Modelo cinético

As curvas de iluminação foram ajustadas com uma curva sigmoideal, característica de reações autocatalítica irreversíveis  $A + B \rightarrow 2B$  [40]. A redução do oxigênio singlete em superóxido em um sistema fechado pode ser vista como um processo de autocatálise, onde os reagentes estão limitados pela quantidade de oxigênio dissolvido em tolueno (solubilidade de 2,8mg/mL a 20°C [41]), assim como pela quantidade de fotossensibilizadores. A reação autocatalítica é dada por:



Nesse modelo, assume-se que inicialmente a produção de oxigênio singlete pelo mecanismo tipo II é o processo dominante, mas que uma pequena quantidade de superóxido seja paralelamente produzida pelo mecanismo tipo I. Esse superóxido catalisa a redução do oxigênio singlete, produzindo mais superóxido, aumentando cada vez mais a velocidade da reação. A medida que o oxigênio singlete se esgota, a velocidade da reação diminui até atingir um patamar constante, quando todo o oxigênio singlete é convertido em superóxido, e todo o superóxido gera adutos com o PBN.

A velocidade da reação é dada pela equação cinética:

$$\frac{d[O_2^{\bullet-}]}{dt} = K[O_2^1][O_2^{\bullet-}] = K[O_2^{\bullet-}][N - O_2^{\bullet-}] \quad (5.4)$$

onde K é a constante de tempo da reação e N é o número total de espécies reativas de oxigênio, constante em um sistema fechado:

$$N = [O_2^1] + [O_2^{\bullet-}] = [O_2^1]_0 + [O_2^{\bullet-}]_0 \quad (5.5)$$

A evolução temporal da concentração de superóxido é dada pela solução da equação

5.4:

$$[O_2^{\bullet-}] = \frac{N}{1 + R_0 e^{-KNt}} \quad (5.6)$$

onde  $R_0 = [O_2^1]_0/[O_2^{\bullet-}]_0$  é a razão entre a quantidade de oxigênio singlete e superóxidos produzidos no início da reação de redução. Os parâmetro dos ajustes estão registrados na tabela 5.2.

Tabela 5.2: Parâmetros do ajuste das curvas de iluminação pela curva de autocatálise e eficiência monocromática (EM).

Composto	N $10^{16}$ adutos/mL	K $10^2$ mL/mol.s	$R_0$	EM a 375nm $10^{-6}$ mW $^{-1}$	$r_2$
JS24	$1,310 \pm 0,025$	$2,68 \pm 0,16$	$10,77 \pm 0,72$	$0,577 \pm 0,024$	0,99462
JS39	$0,699 \pm 0,044$	$3,59 \pm 0,74$	$3,39 \pm 0,38$	$0,175 \pm 0,019$	0,98853
JS40	$2,219 \pm 0,073$	$1,46 \pm 0,13$	$15,8 \pm 1,6$	$1,135 \pm 0,059$	0,99553
JS41	$2,785 \pm 0,030$	$1,404 \pm 0,055$	$8,10 \pm 0,35$	$1,323 \pm 0,042$	0,94955
JS54	$2,383 \pm 0,094$	$1,39 \pm 0,16$	$14,4 \pm 1,9$	$1,825 \pm 0,095$	0,99172
JS55	$3,345 \pm 0,045$	$1,640 \pm 0,092$	$13,1 \pm 1,2$	$2,392 \pm 0,064$	0,99777
$C_{60}$	$1,838 \pm 0,039$	$2,13 \pm 0,14$	$9,16 \pm 0,62$	$0,920 \pm 0,038$	0,98657
$C_{60}$ -PCBM	$2,044 \pm 0,057$	$2,19 \pm 0,21$	$10,4 \pm 1,2$	$0,541 \pm 0,038$	0,99561

\* $r^2$  é o coeficiente de determinação do ajuste

O número total de espécies reativas de oxigênio produzidas sob iluminação foi, para todos os compostos, da ordem de  $10^{16}$ mL $^{-1}$  (coluna N, tabela 5.2). Esse número, no entanto, não reflete a eficiência individual de cada fotossensibilizador, uma vez que as amostras foram iluminadas com luz monocromática de 375nm e o coeficiente de extinção molar para esse comprimento de onda difere entre os fullerenos (tabela 5.1). Assim, o número de ROS produzidos (N) deve ser normalizado pela potência absorvida por cada amostra no volume efetivamente iluminado pelo laser. Uma figura de mérito pode ser

definida dividindo  $N_{norm}$  pelo número de moléculas do composto (concentração x volume iluminado). Essa figura de mérito, chamada eficiência monocromática (EE na tabela 5.2), é a quantidade de ROS produzida por cada molécula de fullereno por mW de luz monocromática de 375nm.

#### 5.6.4 Interpretação dos resultados

A partir dos valores da eficiência monocromática pode-se fazer algumas constatações:

- o fullereno puro não é o fotossensibilizador mais eficiente, dentre as moléculas estudadas;
- os compostos JS55, JS54 e JS41, nessa ordem, apresentam as maiores eficiências;
- o composto JS39 apresenta a mais baixa eficiência.

Pode-se observar que os compostos com maior eficiência também foram aqueles com menor constante cinética, indicando maior rapidez em produzir ROS e alcançar a saturação. A razão  $R_0$  entre as concentrações iniciais de oxigênio singleto e superóxido teve um valor alto para os compostos JS55 e JS54 e um valor baixo para JS39, sugerindo uma relação entre a maior produção inicial de  $^1O_2$  e maior eficiência monocromática.

Analisando a estrutura química dos derivados, a explicação desses resultados não é clara, mas algumas hipóteses podem ser levantadas e futuramente testadas.

1. O  $C_{60}$  puro é conhecido pela sua alta eficiência em gerar oxigênio singleto [2]. O fato de sua eficiência monocromática não ser a mais alta dentre os fotossensibilizadores estudados pode ser atribuída ao alto grau de agregação dessas moléculas em solução,

que mesmo em solventes orgânicos limita o contato com as moléculas de oxigênio dissolvidas. As duas longas cadeias ligadas aos fullerenos funcionalizados reduz a agregação, aumentando a exposição dos fullerenos ao oxigênio.

2. Os compostos JS55 e JS54 têm estruturas bastante similares, ambos apresentando grupos benzil ligados ao tetrazol por um carbono exposto. Aparentemente a presença desse grupo benzil é importante para o aumento da eficiência na geração de ROS, o que pode ocorrer devido a um aumento na solubilidade do composto, ou à maior reatividade do grupo benzil.
3. Os resultados para o composto JS39, consideravelmente menos eficiente e mais lento que os demais, são difíceis de explicar com base na sua estrutura. Possivelmente, um alto potencial de ionização faz dele um mal doador de elétrons, o que dificultaria a redução do oxigênio singlete em superóxido. Para elucidar essas questões estudos adicionais são necessários, como por exemplo uma caracterização eletroquímica por voltametria cíclica, para esclarecer o papel dos derivados de fullereno enquanto doadores de elétrons, o que pode ser decisivo na etapa de redução do oxigênio singlete em superóxido.
4. Para todos os derivados de fullerenos estudados, o processo fotofísico predominante em solvente apolar é, claramente, a produção de oxigênio singlete pelo mecanismo tipo II. Foi mostrado, recentemente, que em soluções aquosas predomina a produção de superóxido pelo mecanismo tipo I [9]. De qualquer forma, o radical superóxido é o produto final mesmo em solventes orgânicos, devido à redução autocatalítica

do oxigênio singlete em superóxido identificada nesse trabalho, que é fortemente influenciada pelo caráter doador de elétrons dos grupos funcionais presentes. Devido à alta eficiência em geração de ROS, os compostos estudados são candidatos potenciais a agentes fotossensibilizadores em PDT com formulações farmacêuticas especiais.

### 5.6.5 Sinais secundários

Como já foi mencionado, alguns sinais além do sinal esperado do aduto de PBN foram observados nos espectros de EPR medidos. Eles se apresentaram de duas formas:

- sinal (I) Uma única linha com  $g = 2,0028 \pm 0,0006$
- sinal (II) Um tripleto com  $g = 2,0077 \pm 0,0006$  e  $a = 0,85 \pm 0,05$  mT

Os espectros das diversas soluções apresentaram um ou ambos os sinais. Eles também foram simulados e somados ao sinal do aduto, levando a um ajuste final bastante satisfatório, como pode ser visto nas figuras 5.17b, 5.17d e 5.17f.

Para ilustrar cada caso, espectros da solução de três compostos (1 hora de iluminação) são mostrados na figura 5.16: o JS24 que apresenta apenas o sinal(I), o JS54 que apresenta apenas o sinal (II) e o JS39 que apresenta ambos.

Algumas possibilidades podem ser levantadas sobre a origem desses sinais:

O sinal (I) aparece, ainda que fracamente, no espectro de soluções do  $C_{60}$  puro, e portanto pode-se descartar origens ligadas diretamente à funcionalização. Além disso, o valor do fator  $g$  dessa linha é bastante próximo ao relatado por Kukolish e Huffman [42] para cátions  $C_{60}^+$  ( $g=2,0030$ ). Essa hipótese seria condizente com os resultados até então



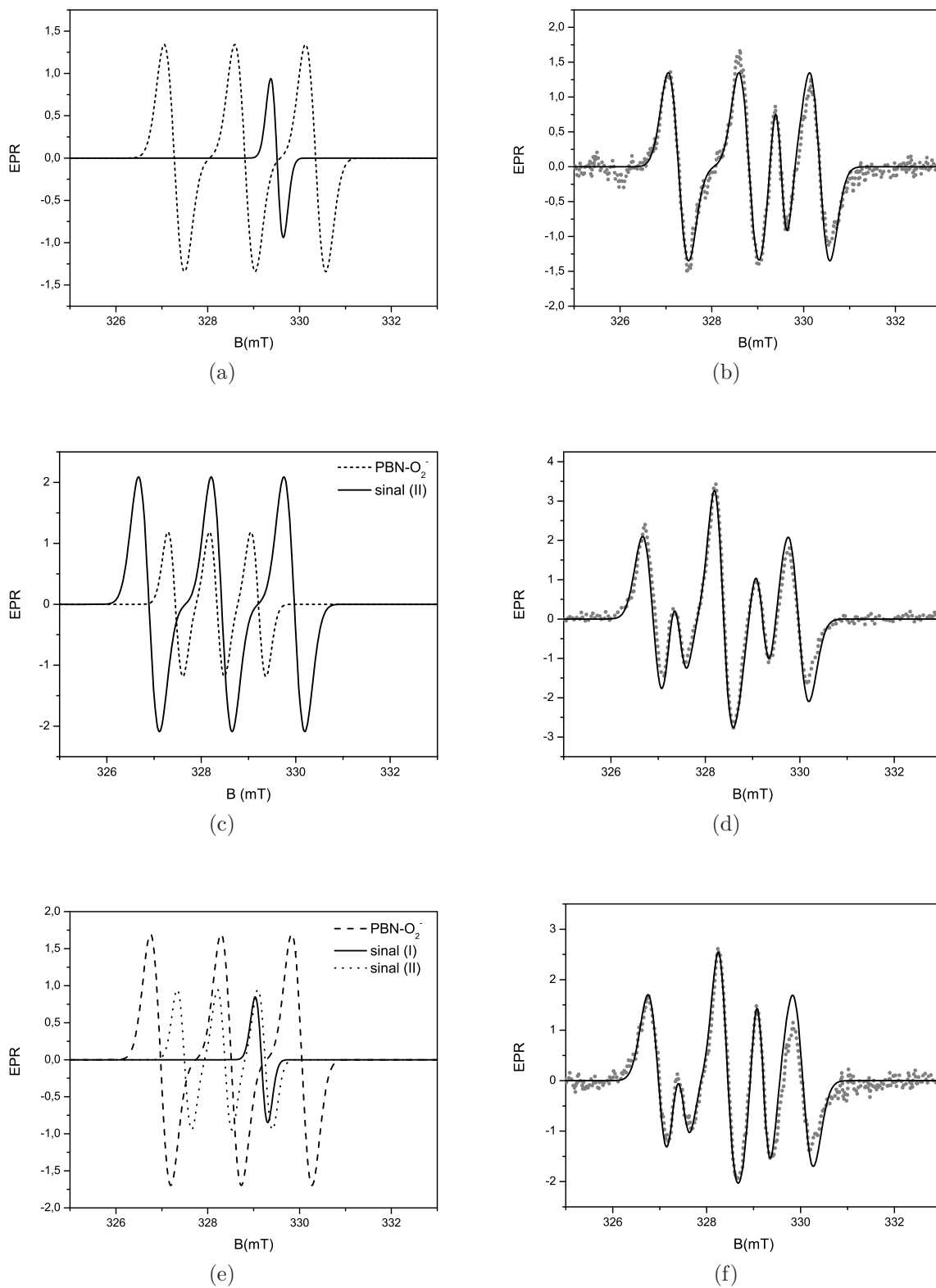


Figura 5.17: Os três gráficos da esquerda mostram as linhas simuladas para cada sinal desconhecido, juntamente com a simulação do espectro do aduto de PBN. Os gráficos à direita mostram o espectro de EPR medido (1 hora de iluminação) e o ajuste, dado pela soma dos dois ou três sinais presentes. Os fullerenos presentes são o JS24 (a)-(b), JS54(c)-(d) JS39 (e)-(f).

obtidos, já que a redução do oxigênio singlete em superóxido depende da presença de um doador de elétrons.

O sinal (II) apresenta desdobramento hiperfino em três linhas, indicando a presença de um núcleo de spin  $I=1$ . Devido à composição dos solventes e solutos utilizados, pode-se concluir que se trata de um núcleo do  $^{14}\text{N}$  que está presente nas moléculas dos derivados sintetizados e também no PBN. Nenhuma dessas possibilidades deve ser desprezada, mas parece mais provável que a origem do sinal seja o PBN, que se combina facilmente com diversos radicais formando diferentes adutos. Em um artigo recente [43] é mencionada a presença de linhas do PBN oxidado (PBN<sub>ox</sub>) cuja constante hiperfina é de 0,795mT valor consideravelmente próximo ao do sinal (II).

Essas hipóteses e sua relação com a eficiência de fullerenos e derivados na geração de ROS precisa ser analisada em mais detalhes.

# Capítulo 6

## Conclusão

Na busca por novos agentes fotossensibilizadores para aplicação em terapia fotodinâmica (PDT), derivados do fullereno  $C_{60}$  recentemente sintetizados foram, neste trabalho, caracterizados. Utilizando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (*EPR*) com a metodologia de spin trapping, a eficiência dos derivados na geração de espécies reativas de oxigênio (*ROS*) foi determinada e comparada com o  $C_{60}$  puro e o  $C_{60}$ -PCBM.

O espectro de absorção óptica dos derivados mostra que, assim como o  $C_{60}$ , eles absorvem fortemente na região do ultravioleta próximo (UVA). Usando radiação de comprimento de onda de 375nm para iluminar soluções dos compostos em tolueno na presença de um spin trap, promove-se a formação de adutos de PBN a partir do superóxido, detectados por *EPR*.

Os compostos produziram entre 0,2 e 5 *ROS* por  $10^6$  moléculas de fullereno por mW de potência absorvida em 375nm, indicando que a funcionalização não provocou grandes mudanças nas propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos derivados.

A evolução temporal da produção de adutos de PBN foi explicada por um modelo de autocatálise na conversão de oxigênio singlete em superóxido, corroborado por resultados

anteriores que indicavam a predominância da produção de *ROS* por transferência de energia (mecanismo tipo II) após a foto excitação de fullerenos em solventes apolares.

A alta eficiência espectral de alguns derivados, superiores à eficiência do  $C_{60}$  pode ser atribuída à menor agregação, devido à presença das longas cadeias laterais, ou às características dos compostos como doadores de elétrons.

Os resultados obtidos mostram que todos os compostos hidrofóbicos estudados são potenciais agentes fotossensibilizadores a serem aplicados em PDT tópica. O próximo passo será o estudo da evolução da intensidade dos sinais secundários observados com o tempo de iluminação, o que pode ajudar a determinar suas origens e sua relação com a eficiência de fullerenos e derivados na geração de *ROS*.

# Apêndice A

## O Radical Nitróxido

O radical nitróxido ( $NO^{\bullet-}$ ), presente nos adutos de spin estudados, possui  $S = \frac{1}{2}$  e  $I=1$ .

Nesse caso existem seis estados de spin sendo eles:

$$\begin{aligned}\phi_1 &= |\alpha_e, \alpha_N\rangle & \phi_2 &= |\alpha_e, \beta_N\rangle & \phi_3 &= |\alpha_e, \gamma_N\rangle \\ \phi_6 &= |\beta_e, \alpha_N\rangle & \phi_5 &= |\beta_e, \beta_N\rangle & \phi_4 &= |\beta_e, \gamma_N\rangle\end{aligned}\quad (\text{A.1})$$

onde suas energias são dadas por:

$$\begin{aligned}E_{\phi_1} &= +\frac{1}{2}g_e\beta_e B - g_N\beta_N B + \frac{1}{2}ha & E_{\phi_4} &= -\frac{1}{2}g_e\beta_e B - g_N\beta_N B - \frac{1}{2}ha \\ E_{\phi_2} &= +\frac{1}{2}g_e\beta_e B & E_{\phi_5} &= -\frac{1}{2}g_e\beta_e B \\ E_{\phi_3} &= +\frac{1}{2}g_e\beta_e B + g_N\beta_N B - \frac{1}{2}ha & E_{\phi_6} &= -\frac{1}{2}g_e\beta_e B + g_N\beta_N B + \frac{1}{2}ha\end{aligned}\quad (\text{A.2})$$

Em virtude da regra de seleção  $\Delta m_S = \pm 1$  e  $\Delta m_I = 0$  o sistema apresenta somente três transições possíveis, como mostrado na figura A.1.

Em condições onde a frequência da microonda  $\nu$  é constante, transições podem ocorrer quando o campo ressonante for:

$$B_k = \frac{h\nu}{g\beta} - a \quad B_l = \frac{h\nu}{g\beta} \quad B_m = \frac{h\nu}{g\beta} + a \quad (\text{A.3})$$

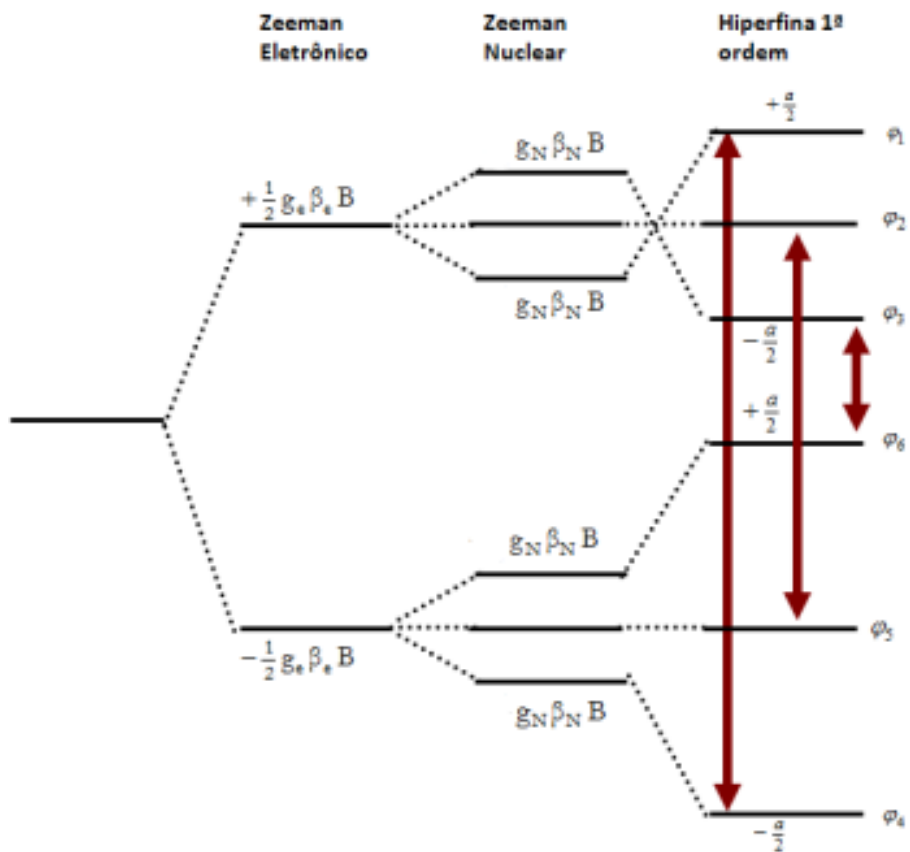


Figura A.1: Típica divisão dos níveis de energia e possíveis transições na presença de um campo magnético externo para uma sistema com  $S = \frac{1}{2}$  e  $I = 1$ ; O espectro para frequência constante é mostrado na parte inferior indicando o centro do espectro e a constante hiperfina.

Essas três linhas apresentam mesma intensidade. A figura A.2 mostra a abertura dos níveis de energia com o aumento do campo externo  $B$  e as linhas de *EPR* quando a condição de ressonância é satisfeita, respeitando as regras de seleção.

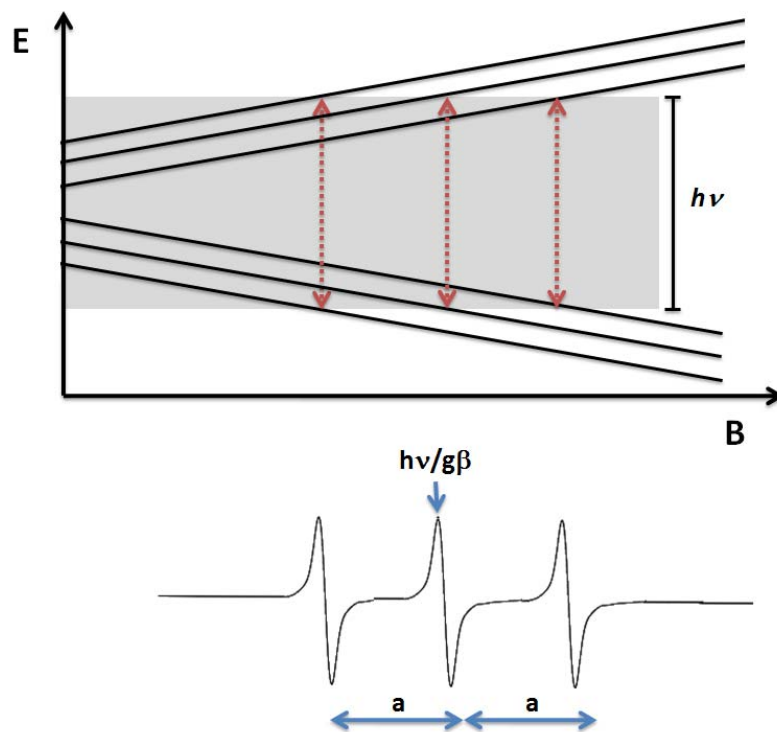


Figura A.2: Sinais de *EPR* para cada transição permitida quando se aumenta o campo externo  $B$ . As linhas são visualizadas quando o campo ressonante é dado pelas equações A.3

# Referências Bibliográficas

- [1] Thomas J. Dougherty, Charles J. Gomer, Barbara W. Henderson, Giulio Jori, David Kessel, Mladen Korbélik, and Johan Moan and Qian Peng. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 90, No. 12, 1998.
- [2] J. W. Arbogast, A. P. Darmanyan, C. S. Foote, Y. Rubin, F. N. Diederich, M. M. Alvarez, S. J. Anz, and R. L. Whetten. Photophysical properties of c60. *J. Phys. Chem.*, 95(11), 1991.
- [3] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, and R. E. Smalley. C60: Buckminsterfullerene. *Nature*, 318: 162163, 1985.
- [4] H. W. Powell, F. Cozzi, C. Moss, G. P. and Thilgen, J. R. Hwu, and A. Yerin. Nomenclature for the c60-ih and c70-d5h(6) fullerenes. *Pure Appl. Chem.*, 74, 629, 2002.
- [5] LJ dos Santos, G P Rocha, R B Alves, and R P de Freitas. Fulereno[c60]: química e aplicações. *Química Nova*, v. 33, p. 680-693, 2010.
- [6] Krätschmer W, Fostiropoulos K, and Huffman DR. The infrared and ultraviolet absorption spectra of laboratory-produced carbon dust: evidence for the presence of the c60 molecule. *Chem. Phys. Lett.*, 170, 167170, 1990.
- [7] L. E. Echegoyen, L.; Echegoyen. Electrochemistry of fullerenes and their derivatives. *Acc. Chem. Res.*, 31(9), pp 593601, 1998.
- [8] A. Hirsch and M. Brettreich. *Fullerenes Chemistry and Reactions*, 1st ed. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [9] Y Yamakoshi, N Umezawa, A Ryu, K Arakane, N Miyata, and et al. Goda, Y. Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (c60) as potential medicines: O2- versus 1o2. *J Am Chem Soc*;125:12803-9, 2003.
- [10] S Foley, S Bosi, C Larroque, M Prato, and JM Janot. Photophysical properties of water soluble fullerene derivatives, 2001.
- [11] O. Raab. Ober die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien. *Z. Biol.* 39:524-546, 1900.
- [12] J. Moan and K. Berg. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol*, 53, 1991.
- [13] Robert S Mulliken. Spectroscopy, molecular orbitals, and chemical bonding. *Nobel Lecture*, 1966.



- [14] Leonard I. Grossweiner. Singlet oxygen: Generation and properties, 2003. [On-line] <http://www.photobiology.com/educational/len2/singox.html> - acessado em dezembro de 2009.
- [15] Antonio E. H. Machado. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23(2), 2000.
- [16] Z. Oga. *Fundamentos de toxicologia*. Editora Atheneu, São Paulo, 2ª edição, 2003.
- [17] B. Halliwell and J.C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, 3ª edição, 2003.
- [18] H. Sies G. Storz, M. F. Christan and B. N. Ames. *Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in Salmonella typhimurium*. Proceedings of the National Academy of Science. USA, v. 84, p. 8917-8921, 1987.
- [19] A. Garder R. T. Dean S. P. Wolff. *Free radicals, lipids and protein degradation*. Trends in Biochemical Sciences , v. 11, p. 27-31, 1986.
- [20] A. Boveris. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina (Buenos Aires)*, 58, 350-356, 1998.
- [21] N. Santoro and D.J. Thiele. *Oxidative stress responses in the yeast Saccharomyces cerevisiae*, In: *Yeast Stress Responses*. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH and Co. KG, 1997.
- [22] J. Diaz, E. Serrano, F. Acosta, and L.F. Carbonell. References intervals for four biochemistry analyttes in plasma for evaluating oxidase stress and lipid peroxidation in human plasma. *Clinical Chemistry*, 44, 2215-2217, 1998.
- [23] Howard J. Halpern Gerald M. Britigan and Sovitj Pou. *Free Radicals; Biology and Detection by Spin Trapping*. Oxford University Press, 1999.
- [24] E. Cadenas. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annual Review of Biochemistry*, 58, 79-110, 1989.
- [25] A.P. Castano, T.N. Demidova, and M.R. Hamblin. Mechanisms in photodynamic therapy: part one photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, 279-293, 2004.
- [26] M.R. Detty, S.L. Gibson, and S.J. Wagner. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(16), 2004.
- [27] J. R. Niklas J.-M. Spaeth and R. H. Bartram. *Structural Analysis of Point Defects in Solids: An introduction to multiple magnetic resonance spectroscopy*. Springer-Verlag, 1992.
- [28] Alan Carrington and Andrew D. MacLachlan. *Introduction to Magnetic Resonance with application to chemistry and chemical physics*. Harper and Row, New York, Evanston and London and John Weatherhill, inc., Tokyo, 1969.
- [29] D.c. Borg. *Application of electron spin resonance in biology*, In: *Free Raicals in Biology, Vol. I*. Academic Press, New York, 1976.

- [30] E.G. Janzen and B.J. Blackburn. Detection and identification of short lived free radicals by an electron spin resonance trapping technique. *J. Am. Chem. Soc.*, *90*, 1968.
- [31] J E Wertz and J R Bolton. *Electron Spin Resonance - Elementary teory and practical applications*. McGraw-Hill, 1972.
- [32] David Barr, JinJie Jiang, and Ralph T Weber. How to quantitate nitroxide spin adducts using tempol. [On-line] <http://www.bruker-biospin.com/brukerepr/pdf/spinquantitation.pdf> - acessado em janeiro de 2007.
- [33] F. Diederich and C. Thilgen. Covalent fullerene chemistry. *Science*, *271(5247)*, pp.317-324, 1996.
- [34] J. Yang, Y. Wang, A. Rassat, Y. Zhang, and P. Sinay. Synthesis of novel highly water-soluble 2:1 cyclodextrin/fullerene conjugates involving the secondary rim of  $\beta$ -cyclodextrin. *Tetrahedron*, *60(52)*, p.12163-12168, 2004.
- [35] Leandro J. dos Santos, Ana S. P. Gonçalves, Klaus Krambrock, Maurício V. B. Pinheiro, Marcos N. Eberlin, Boniek G. Vaz, Rossimiriam P. de Freitas, and Rosemeire B. Alves. Synthesis and photophysical properties of [60]fullerene derivatives bearing five-membered heterocyclic wings and investigation of their photophysical kinetic properties. a ser publicado.
- [36] Leandro J. dos Santos. Síntese de derivados do fulereno-c60. Tese de Doutorado em Química Orgânica - Universidade Federal de Minas Gerais, Ano de Obtenção: 2010.
- [37] J. W. Arbogast, A. P. Darmanyam, C. S. Foote, Y. Rubin, F. N. Diederich, M. M. Alvarez, S. J. Anz, and R. L. Whetten. Photophysical properties of sixty atom carbon molecule (c60). *J. Phys. Chem.*, 1991.
- [38] G Peters and MAJ Rodgers. On the feasibility of electron transfer to singlet oxygen from mitochondrial components. *Biochem Biophys Res Commun*, *96(2)*, 1980.
- [39] LJ Santos, RB Alves, RP Freitas, JF Nierengarten, LEF Magalhães, and et al. Krambrock, K. Production of reactive oxygen species induced by a new [60]fullerene derivative bearing a tetrazole unit and its possible biological applications. *J Photochem Photobiol A Chem*, *200(2-3)*, 2008.
- [40] E Arslan and IJ Laurenzi. Kinetics of autocatalysis in small systems. *J Chem Phys*; *128(1)*, 2008.
- [41] R. Battino, T. R. Rettich, and T. Tominaga. The solubility of oxygen and ozone in liquids. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, *12*, 163, 1983.
- [42] S G Kukolich and D R Huffman. Epr spectra of c60 anion and cation radicals. *Chemical Physics Letter*, *182(3,4)*, 1991.
- [43] Adrien Criqui, Jacques Laleve, Xavier Allonas, and Jean-Pierre Fouassier. Electron spin resonance spin trapping technique: Application to the cleavage process of photoinitiators. *Macromol. Chem. Phys.*, *209*, 22232231, 2008.