

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Física

Programa de Pós-Graduação em Física

**Sistemas híbridos formados por nanobastões de  
ouro e porfirinas: fotossensibilizadores  
promissores para terapia fotodinâmica**

Daniele Cristina Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Klaus Krambrock

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Belo Horizonte

2018

## RESUMO

Nanoestruturas de ouro, esferas e bastões, foram sintetizadas para formar um sistema híbrido com a porfirina  $H_2TM_4PyP(OTs)_4$  (POR) para aplicações em terapia fotodinâmica (TFD) usando luz na região espectral do visível e ultravioleta próximo (UVA). Experimentos de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) combinados com a técnica de armadilha de spin (*spin trapping*) foram usados para detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e avaliação da eficiência destes novos híbridos como fotossensibilizadores (FS). Nossos resultados mostram que o sistema híbrido composto por nanobastões de ouro (AuNR) e POR é muito mais eficiente na geração de oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) que seus componentes isolados. Esta melhora significativa na eficiência do processo de geração de  $^1O_2$  sob luz visível é explicada por um efeito sinérgico entre AuNR e a porfirina, onde uma rápida transferência de energia dos nanobastões de ouro para a porfirina produz uma grande quantidade de  $^1O_2$  seguida por sua conversão em radicais hidroxila. O mecanismo de geração de EROs foi investigado usando-se diferentes armadilhas de spins (*spin traps*) e supressores para espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, nanopartículas esféricas de ouro (AuNP) não apresentaram efeito sinérgico quando nos sistemas híbridos. Este efeito presente no sistema híbrido composto por POR/AuNR é atribuído a um aumento mais pronunciado do campo elétrico local próximo à superfície dos nanobastões em comparação às AuNP esféricas, quando irradiados com luz visível. Sob luz UVA, o mecanismo de geração de oxigênio singleto, além de transferência de energia, envolve a excitação da porfirina e transferência de carga de seus estados excitados para oxigênio molecular, levando a formação de  $O_2\cdot^-$  e sua dismutação em  $H_2O_2$ , que em solução aquosa em pH básico produz oxigênio singleto. O sistema híbrido POR/AuNR foi também estudado como sensibilizador, numa metodologia que combina radioterapia e TFD. Radiação ionizante (raios gama,  $\sim$  MeV) foi utilizada para validar o modelo de amplificação da geração de EROs na presença de nanoestruturas com número atômico (Z) alto. Nossos resultados mostram que, sob raios gama, o efeito dominante é a radiólise da água formando principalmente radicais  $OH\cdot$ , sem melhora aparente mediada pelas nanoestruturas de Au. Por outro lado, a porfirina POR é capaz de gerar oxigênio singleto sob raios gama, mostrando-se assim como um possível radiosensibilizador (RS).

**PALAVRAS-CHAVE:** Terapia fotodinâmica (TFD), porfirinas, nanobastões de ouro, nanopartículas de ouro, espécies reativas de oxigênio, ressonância paramagnética eletrônica (RPE), radioterapia.

## ABSTRACT

Gold nanostructures, spheres and rods, were synthesized to form a hybrid system with porphyrin  $H_2TM_4PyP(OTs)_4$  (POR) for application in photodynamic therapy (PDT) using light in the visible and near UV (UVA) spectral region. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) experiments combined with the spin trapping technique were used to detect reactive oxygen species (ROS) and to evaluate the efficiency of these new hybrids as photosensitizers (FS). Our results show that the hybrid system composed of gold nanorods (AuNR) and POR is much more efficient in the generation of singlet oxygen ( $^1O_2$ ) than its isolated components. This significant improvement in the efficiency of the process of  $^1O_2$  generation under visible light is explained by a synergistic effect between AuNR and porphyrin, where a rapid transfer of energy from the gold nanorods to the porphyrin produces a large amount of  $^1O_2$  followed by its conversion into hydroxyl radicals. The mechanism of ROS generation was investigated using different spin traps and suppressors for reactive oxygen species. On the other hand, spherical gold nanoparticles (AuNP) did not present synergistic effect when in the hybrid systems. This synergetic effect present in the hybrid of POR/AuNR is attributed to an increase of the local electric field near the surface of the anisotropic nanorods in comparison to the spherical AuNP, when irradiated with visible light. Under UVA light, the mechanism of singlet oxygen generation, in addition to energy transfer, involves the excitation of POR and charge transfer of its excited states to molecular oxygen, leading to the formation of  $O_2^{\bullet}$  and its dismutation into  $H_2O_2$  which in aqueous solution and at basic pH produces singlet oxygen. The POR/AuNR hybrid system was also studied as a sensitizer in a methodology that combines radiotherapy and PDT. Ionizing radiation (gamma rays,  $\sim$  MeV) was used to validate the amplification model of ROS generation of in the presence of nanostructures with high atomic number (Z). Our results show that under gamma rays the dominant effect is the radiolysis of the water mainly forming  $OH^{\bullet}$  radicals, without apparent improvement by the Au nanostructures. On the other hand, porphyrin POR is capable of generating singlet oxygen under gamma rays, thus showing itself as a possible radiosensitizer (RS).

**KEY WORDS:** Photodynamic Therapy (PDT), porphyrins, gold nanorods, gold nanoparticles, reactive oxygen species, electron paramagnetic resonance (EPR), radiotherapy.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Marlene e Zilmar, ao meu irmão Rafael e ao meu noivo Heleno, pelo apoio incondicional, incentivo, carinho, companheirismo e confiança. Agradeço a Deus todos os dias por ter me presenteado com uma família tão abençoada e por me permitir chegar até aqui.

Agradeço ao meu orientador, professor Klaus Krambrock, pela paciência e dedicação. Muito obrigada pelos ensinamentos, conselhos, discussões e pelo apoio, essenciais para a minha formação como pesquisadora. A sua visão aplicada da ciência é uma fonte de inspiração para todos os seus alunos.

Agradeço aos Profs. Luiz Orlando Ladeira (meu co-orientador de coração) e Gustavo Sáfar pela colaboração e discussões, fundamentais para realização deste trabalho. À Prof.<sup>a</sup> Dayse C. S. Martins e à Camila Monteiro (Departamento de Química) por sintetizarem os compostos estudados neste trabalho. Ao Prof. Roberto Moreira pelas medidas realizadas e aos demais professores do Departamento de Física pela contribuição à minha formação.

Agradeço ao Jony Marques, André Lima e corpo técnico do Hospital São Francisco pela parceria estabelecida para realização dos experimentos.

Agradeço aos colegas de outros laboratórios onde pude realizar medidas, ao Érick e Loudiana do Laboratório de Nanomateriais pela ajuda e infraestrutura proporcionada, aos colegas do laboratório de espectroscopia Raman, em especial ao Rafael por sempre se prontificar em ajudar e ao Alexandre do Laboratório de Difração de raios X. Agradeço também ao Clóvis e Leandro da Criogenia pelo suporte, aos técnicos do Centro de Microscopia/UFMG e do Laboratório de Irradiação Gama do CDTN. Ao prof. Bira e às alunas do laboratório de Física Biológica pela disponibilização do espaço para realização de experimentos. Muito obrigada a nossa querida bibliotecária Shirley, sempre muito atenciosa e gentil, e a todos os demais funcionários do Departamento de Física por facilitarem nossa vida acadêmica.

A todos os colegas atuais e antigos do Laboratório de Ressonância Paramagnética, pelas boas conversas e pela disponibilidade em me ajudar sempre que precisei. Em especial, agradeço aos grandes amigos que fiz nesse período: Bruno, Daniel, Elias, Henrique, Luciano, Nina e Thiago. Muito obrigada pelas conversas, risadas e por terem me proporcionado momentos de extrema alegria. Agradeço aos amigos de longa data pela amizade duradoura: Karolline, Bárbara Costa, Helena, Bruno J. e Carlos. Muito obrigada a Claudilene por colaborar na síntese das amostras utilizadas e por se tornar uma grande amiga. Agradeço a Anna Carolina (Farmácia) pelo auxílio nas sínteses. A todos os colegas do Departamento de Física e a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para este trabalho.

Agradeço a CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro para realização da pesquisa.

## LISTA DE FIGURAS:

<b>Figura 2.1:</b> Diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado [5].	7
<b>Figura 2.2:</b> Distribuição de orbitais atômicos e moleculares para o oxigênio. Adaptado [54].	9
<b>Figura 2.3:</b> Ilustração dos processos de ionização causados pelos efeitos Compton (a) e fotoelétrico (b). No efeito Compton, o fóton incidente é espalhado por um elétron, transferindo parte de sua energia para o elétron, que é ejetado do átomo (a). No efeito fotoelétrico, o fóton incidente é absorvido por elétron da órbita mais interna, ejetando-o de sua órbita (b). Como resultado, elétrons das orbitas externas podem ocupar a vacância da órbita mais interna, de forma que mais elétrons podem ser ejetados. Extraído da referência [36].	14
<b>Figura 2.4:</b> (a) Estrutura geral das porfirinas (nomenclatura definida pela IUPAC). (b) Estrutura da porfirina Verteporfin, obtida comercialmente. (c) Estrutura da porfirina H <sub>2</sub> TM4PyP(OTs) <sub>4</sub> (POR) (fonte: <a href="http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4086.html">http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4086.html</a> ).	21
<b>Figura 2.5:</b> Esboço do mecanismo de crescimento dos nanobastões de ouro proposto por Orendorff e Murphy [92].	24
<b>Figura 2.6:</b> Interação de nanoestruturas de ouro com a luz incidente. O campo elétrico (E) da radiação (se propagando na direção K) promove a oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução em relação ao núcleo positivo. A oscilação dos dipolos elétricos é ressonante com a luz incidente em uma frequência específica que depende da forma e tamanho. Comparação entre os modos de oscilação dos dipolos elétricos gerados pela interação de nanopartículas (a) e nanobastões (b) de ouro com radiação eletromagnética. Adaptado [20].	26
<b>Figura 3.1:</b> Separação entre os níveis de energia para um elétron com $S = \frac{1}{2}$ em um campo magnético <b>B</b> . A quebra da degenerescência pelo campo magnético é chamado de Efeito Zeeman.	37
<b>Figura 3.2:</b> (a) Representação do campo magnético estático e oscilante penetrantes na amostra. (b) Níveis de energia Zeeman para uma amostra paramagnética na presença de um campo magnético estático e as transições induzidas por micro-ondas. (c) Ocupação dos níveis de energia Zeeman no equilíbrio térmico para $T > 0$ dada uma distribuição de Boltzmann. Retirado da referência [114].	38
<b>Figura 3.3:</b> Desdobramento dos níveis de energia para espécie com $S = \frac{1}{2}$ e $I = 1$ na presença de campo magnético.	52
<b>Figura 3.4:</b> Espectro RPE do radical nitróxido TEMPOL em solução aquosa.	52
<b>Figura 3.5:</b> (a) Projeção que define o ângulo diedral $\theta$ . Extraído da referência [118]. (b) Orientação da molécula do nitróxido no referencial do laboratório com os eixos principais associados aos tensores $g$ e $A$ em caso de anisotropia [117].	54
<b>Figura 3.6:</b> (a) Interação de <i>spin trap</i> do tipo nitroso com radical X e (b) interação de um <i>spin trap</i> nitrona com espécie radicalar, ambos resultando num radical nitróxido.	59
<b>Figura 3.7:</b> Interação do <i>spin trap</i> TEMP com oxigênio singleto, resultando num radical nitróxido.	59
<b>Figura 3.8:</b> Representação dos modos ressonantes dos campos magnético e elétrico numa cavidade retangular.	61
<b>Figura 3.9:</b> Componentes básicos de um espectrômetro de RPE.	62

<b>Figura 3.10:</b> Concentração de íons em relação à superfície de uma partícula de carga negativa em uma suspensão. ....	66
<b>Figura 3.11:</b> Preparação das amostras para medição de RPE. ....	72
<b>Figura 4.1:</b> Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de AuNP (síntese com citrato) (a) e AuNR (método com semente) (b). Histogramas com a distribuição dos tamanhos para o diâmetro de AuNP e comprimento e largura de AuNR. ....	73
<b>Figura 4.2:</b> Espectro de absorção UV-Vis: (a) AuNR (linha preta); porfirina $H_2TM_4PyP(OTs)_4$ (POR) em solução aquosa (linha vermelha); e sistema híbrido POR/AuNR (linha azul); (b) mesmos espectros gerados para nanopartículas esféricas de ouro (AuNP-cit e AuNP-cys) em substituição ao AuNR. ....	75
<b>Figura 4.3:</b> Espectros de absorção ótica para Verteporfin (linha azul) e em substituição à POR nos sistemas híbridos com AuNR (a). Em (b) podemos comparar as bandas Q das duas porfirinas testadas. Verteporfin foi solubilizada em DMSO e água deionizada, enquanto POR e AuNR estão em solução aquosa. ....	76
<b>Figura 4.4:</b> Espectro de absorção FTIR dos resíduos secos de 1 gota de solução aquosa de CTAB com diferentes concentrações (a) e curva de calibração obtida (absorbância absoluta da banda mais intensa em $2850\text{ cm}^{-1}$ em função da concentração molar x número de gotas) (b). ....	79
<b>Figura 4.5:</b> Espectro de absorção FTIR das amostras gotejadas sobre lâminas de vidro, usando suspensões de AuNR recobertas com CTAB não lavada e lavada. O espectro das amostras AuNR lavados foram multiplicados por 5 para permitir uma comparação visual com o espectro intenso da amostra não lavada. ....	79
<b>Figura 4.6:</b> Espectros de RPE típicos obtidos a temperatura ambiente após iluminação em 570 nm contendo porfirina POR e (a) solução aquosa de TEMP ou (b) PBN em etanol/água (1:1 v/v). Espectros experimentais são mostrados em preto e espectros simulados (usando Hamiltoniano de spin fornecido pela equação 3.38) em vermelho (aduto 1), verde (aduto 2) ou azul (aduto 1 + aduto 2). ....	81
<b>Figura 4.7:</b> (a) Curva de saturação do sinal de RPE do aduto de spin $TEMP-^{1}O_2$ . (b) Curva de concentração do radical (em mM) em função da integral dupla do sinal do TEMPOL. ....	83
<b>Figura 4.8:</b> Concentração absoluta dos adutos de spin do TEMP em função do tempo de iluminação de solução aquosa contendo porfirina (POR), <i>spin trap</i> TEMP, AuNP-cit, AuNR ou uma mistura deles (sistemas híbridos) irradiados com luz (a) amarela (570 nm) e (c) vermelha (630 nm). As concentrações de todos os reagentes foram mantidas constantes. Para comparação, os mesmos experimentos foram realizados com a porfirina comercial Verteporfin (VER) e seus híbridos sob iluminação com luz amarela (b) e vermelha (d). As curvas são apenas guias. ....	84
<b>Figura 4.9:</b> Espectros de RPE das soluções controle iluminadas com luz amarela (570 nm): TEMP em (a), TEMP+AuNR em (b) e TEMP+AuNP em (c). Nas soluções dos grupos controle, as concentrações de todos os reagentes foram mantidas constantes. ....	85
<b>Figura 4.10:</b> Concentração absoluta dos adutos de spin (em $\mu\text{M}$ ) para PBN (a) aduto 1 ( $PBN^{\bullet}$ ) e (b) aduto 2 ( $PBN-OH^{\bullet}$ ) em função do tempo de iluminação (570 nm). As curvas são apenas guias. ....	87

<b>Figura 4.11:</b> Concentrações absolutas dos adutos de spin 1 (PBN <sup>•</sup> ) e 2 (PBN-OH <sup>•</sup> ) para POR (a) e (b); sistema híbrido POR/AuNR (c) e (d), com PBN na presença dos supressores de OH <sup>•</sup> (D-manitol) e <sup>10</sup> O <sub>2</sub> (NaN <sub>3</sub> ) para as amostras iluminadas com luz de comprimento de onda 570 nm. ....	88
<b>Figura 4.12:</b> Concentração dos adutos de spin TEMP- <sup>10</sup> O <sub>2</sub> gerados sob iluminação com laser UV (375 nm) para porfirina POR, AuNR puro e híbrido POR/AuNR, em função do tempo de iluminação. ....	91
<b>Figura 4.13:</b> Concentração dos adutos de spin TEMP- <sup>10</sup> O <sub>2</sub> gerados sob iluminação com laser UV (375 nm) para porfirina POR em (a) e seu híbrido POR/AuNR em (b) na presença de supressores NaN <sub>3</sub> (200 mM) e D-manitol (200 mM). ....	92
<b>Figura 4.14:</b> Espectros de RPE gerados sob iluminação com laser UV (375 nm) com PBN (85 mM) para porfirina POR, AuNR, híbrido POR/AuNR e PBN puro após 120 minutos de iluminação. ....	93
<b>Figura 4.15:</b> Espectros RPE do aduto de spin TEMP- <sup>10</sup> O <sub>2</sub> para porfirina POR em função da dose de radiação gama. ....	95
<b>Figura 4.16:</b> Concentração do aduto de spin TEMP- <sup>10</sup> O <sub>2</sub> para porfirina POR, AuNR, híbrido POR/AuNR e TEMP puro em função da dose de radiação gama. ....	96
<b>Figura 4.17:</b> Comparação do efeito do supressor DMSO para o aduto de spin TEMP- <sup>10</sup> O <sub>2</sub> para porfirina POR pura em (a) e POR/ AuNR em (b). ....	97
<b>Figura 4.18:</b> Espectros RPE dos adutos de spin formados na presença de PBN (85 mM em solução de etanol e água 1:1 v/v) para porfirina POR, POR/AuNR, AuNR e PBN puro, em função da dose de radiação gama (a). Em (b) vemos a simulação do aduto de spin PBN-CH(OH)CH <sub>3</sub> <sup>•</sup> (curva em vermelho) em comparação com sinal gerado pelo híbrido POR/AuNR na presença do PBN irradiado com 100 Gy (curva em preto). ....	99
<b>Figura 4.19:</b> Quantificação dos adutos de spin com PBN gerados por radiação gama para porfirina POR, AuNR e híbrido nas doses 0, 30, 50, 70, 100 Gy. ....	100
<b>Figura 4.20:</b> Concentração dos adutos de spin com PBN gerados por radiação gama na presença de DMSO para (a) porfirina POR e (b) híbrido nas doses 0, 30, 50, 70, 100 Gy. ....	100
<b>Figura 4.21:</b> Espectros RPE dos adutos de spin formados na presença de PBN (85 mM em solução de etanol e água 1:1 v/v) para POR/AuNR para as doses de 70 Gy com e sem DMSO (a). Em (b) vemos a simulação do aduto de spin PBN-CH <sub>3</sub> <sup>•</sup> (curva em vermelho) em comparação com sinal gerado pelo híbrido POR/AuNR na presença de DMSO irradiado com 100 Gy (curva em preto). ....	101
<b>Figura 4.22:</b> Concentração absoluta de adutos de spin TEMP- <sup>10</sup> O <sub>2</sub> em função do tempo de iluminação com luz amarela (570 nm). Soluções aquosas contendo spin trap TEMP + porfirina (POR) e sistemas híbridos TEMP + POR/AuNP-cit, TEMP + POR/AuNP-cys e TEMP + POR/AuNR. A concentração de todos os reagentes é mantida constante. As curvas são apenas guias para os olhos. ....	106
<b>Figura 4.23:</b> Concentração absoluta dos adutos de spin TEMP- <sup>10</sup> O <sub>2</sub> para amostras iluminadas (570 nm) contendo concentrações diferentes de AuNR e concentração constante da porfirina POR (14,5 μM). Em (b) a concentração dos nanobastões se manteve constante (4,5(4) x 10 <sup>12</sup> NR/mL), enquanto variamos a concentração da porfirina POR. ....	107
<b>Figura 4.24:</b> Modelo proposto para mecanismo de transferência de energia para geração de oxigênio singlete pela porfirina via efeito de amplificação do campo causado pela presença de nanobastões de ouro. ....	109

- Figura 4.25:** Concentrações dos adutos de spin gerados com TEMP para POR (a) e POR/AuNR em (b) na presença dos supressores Tiron (200 mM) e piruvato de sódio (50 mM) para as espécies  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , respectivamente, sob iluminação com laser UVA (375 nm) em função do tempo de iluminação. .... 117
- Figura 4.26:** Estrutura do Tiron e radical formado após interação com radical superóxido. Adaptado [206]. .... 118
- Figura 4.27:** Espectros RPE dos adutos gerados com TEMP na presença de  $H_2O_2$  (3%) e em reação Fenton catalisada por íons  $Fe^{2+}$  ( $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  - 1 mM) em função do tempo de reação (a). Intensidade do sinal RPE em função do tempo de reação de  $H_2O_2$  (3%) na presença de TEMP em meio ácido (pH~1) e básico (pH~12) (b). .... 120
- Figura 4.28:** Concentrações dos adutos de spin gerados, utilizando-se TEMP, para POR sob iluminação com laser UVA (375 nm), em função do tempo de iluminação, em comparação com soluções degasadas com  $N_2$  dos mesmos reagentes. .... 124
- Figura 4.29:** Estrutura da alanina e de seus radicais. O radical R1 é conhecido como radical estável e o radical R3 apresenta 3 formas [235]. .... 132
- Figura 4.30:** (a) Espectros RPE de l-alanina em pó irradiado com radiação gama nas doses 30 Gy, 500 Gy e 1000 Gy. (b) Intensidade da linha central (altura pico a pico -  $A_{pp}$ ) em função da dose. .... 133

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Interação predominante entre fótons e tecido mole em função da energia do feixe de fótons [70]. .....	17
<b>Tabela 4.1:</b> Constantes de reação (em $s^{-1}$ ) dos supressores e <i>spin traps</i> usados com $^1O_2$ e $OH^\bullet$ , em solução aquosa [151-153] ou <i>in vitro</i> [154]. .....	89

## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

TFD - Terapia fotodinâmica

FS - Fotossensibilizador

RPE - Ressonância paramagnética eletrônica

AuNR - Nanobastões de ouro

AuNP-cit - Nanopartículas esféricas de ouro recobertas com citrato de sódio

AuNP-cys - Nanopartículas esféricas de ouro recobertas com cisteamina

EROs - Espécies reativas de oxigênio

$^1\text{O}_2$  - Oxigênio molecular no estado excitado singleto

$^3\text{O}_2$  - Oxigênio molecular no estado fundamental tripleto

$\text{OH}\cdot$  - Radical hidroxila

$\text{O}_2\cdot^-$  - Radical superóxido

$\text{HO}_2\cdot$  - Radical hidroperoxila

$\text{H}_2\text{O}_2$  - Peróxido de hidrogênio

RPSL - Ressonância de Plasmons de Superfície Localizados

SERS - Espalhamento Raman Amplificado por Superfície (do inglês *Surface Enhanced Raman Scattering*)

$\text{H}_2\text{TM4PyP}(\text{OTs})_4$  (POR) - *5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tosylate salt*

TEMP - *2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinol*

TEMPOL - *4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl*

PBN - *N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitron*

DMPO - *5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide*

DMSO - Dimetilsulfóxido

FDA - *Food and Drug Administration*

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2 – REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>6</b>
2.1 – TERAPIA FOTODINÂMICA .....	6
2.2 – RADIOTERAPIA AMPLIFICADA PELA PRESENÇA DE NANOESTRUTURAS DE OURO .....	11
2.2.1 – Efeito Fotoelétrico.....	14
2.2.2 – Espalhamento Compton.....	15
2.2.3 – Produção de pares.....	17
2.3 – PROPRIEDADES DAS PORFIRINAS.....	20
2.4 – SÍNTESE E PROPRIEDADES ÓTICAS DE NANOPARTÍCULAS METÁLICAS (NPM) .....	22
<b>3 – TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>33</b>
3.1 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	33
3.1.1 – Propriedades Magnéticas de Elétrons e Núcleos .....	33
3.1.2 – Interação Hiperfina .....	44
3.1.3 – O radical nitróxido (NO•).....	48
3.1.4 – Regra de seleção e taxas de transição em RPE.....	55
3.1.5 – Spin trapping ou metodologia de captura de spins .....	57
3.1.6 – Espectrômetro de RPE.....	60
3.2 – ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓTICA UV-VIS.....	64
3.3 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO .....	65
3.4 – POTENCIAL ZETA.....	65
3.5 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO .....	66
3.6 – PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	67
3.6.1 – Preparação das nanoestruturas de ouro e porfirina.....	67
3.6.2 – Preparação de amostras para RPE .....	70
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>73</b>
4.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	73
4.2 – ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS E POTENCIAL ZETA .....	74
4.3 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO .....	77
4.4 – RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA.....	80

4.4.1 – Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras irradiadas com luz na região do visível	80
4.4.2 – Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras irradiadas com luz ultravioleta (UVA)	90
4.4.3 – Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras irradiadas com raios gama	93
4.5 – DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	103
4.5.1 – Híbrido POR/AuNR irradiado com luz visível	103
4.5.2 – Híbrido POR/AuNR irradiado com ultravioleta (UVA)	111
4.5.3 – RPE de amostras irradiadas com raios gama	125
<b>5 – CONCLUSÕES</b>	<b>136</b>
<b>6 – REFERÊNCIAS</b>	<b>138</b>
<b>7 – ANEXOS</b>	<b>153</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

A palavra câncer vem do latim e significa caranguejo, tendo recebido este nome possivelmente em analogia a forma de crescimento incrustado das células, semelhante à forma como as pernas do crustáceo se infiltra na areia para se fixar [1]. Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que apresentam em comum um crescimento desordenado de células que invadem tecidos e partes adjacentes do corpo, podendo ainda se espalhar para outros órgãos, processo denominado metástase. Estas células se dividem rapidamente, podendo ser muito agressivas e levando à formação de tumores (acúmulo de células).

O tratamento ao câncer pode ser realizado por meio de cirurgia, quimioterapia, radioterapia ou transplante de medula óssea, sendo que em alguns casos duas ou mais modalidades podem ser combinadas para um tratamento mais efetivo.

Buscando-se novas alternativas ao tratamento do câncer, a terapia fotodinâmica (TFD) tem se mostrado uma boa opção para alguns tipos de câncer. A terapia fotodinâmica é uma ferramenta de tratamento minimamente invasiva que vem sendo usada desde o início do século XX e, desde 1993, alguns países da América do Norte e Europa possuem regulamentação de um composto derivativo de hematoporfirina, Photofrin®, para tratar pacientes com câncer de pulmão ou do trato digestivo [2]. O uso mais comum e aceito da TFD é para o tratamento de câncer de pele não-melanoma [3]. Entretanto, a TFD pode ser um aliado no tratamento aos cânceres de pulmão, bexiga, estômago e cervical [4] além de outras doenças não malignas em dermatologia, oftalmologia e cardiologia [5]. Outras lesões superficiais como foto-envelhecimento, acne, hidrosadenite, esclerodermia, psoríase, verrugas, leishmaniose são indicadas ao tratamento com TFD [6]. Inativação microbiana é também uma das aplicações encontradas para a terapia fotodinâmica, utilizando-se porfirinas e ftalocianinas na presença de nanopartículas metálicas para melhorar características foto-físicas e antimicrobinas [7].

A TFD se baseia na combinação de três componentes essenciais: luz, oxigênio molecular e um fotossensibilizador (FS). Seu funcionamento consiste na aplicação tópica ou intravenosa de uma substância não tóxica conhecida como fotossensibilizador. Estes compostos podem se acumular seletivamente em tecidos tumorais [2, 8] e, então, serem

ativados por luz para gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) na presença de oxigênio molecular, sobretudo oxigênio no estado singleto ( $^1O_2$ ) e radicais hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e superóxido ( $O_2^\bullet$ ), responsáveis pela morte celular [9]. A eficiência deste processo está associada à ativação do FS por luz visível preferencialmente na faixa do vermelho e infravermelho próximo (700 - 1350 nm), chamada de janela ótica para aplicações biológicas. Nesta região os tecidos são mais permeáveis à luz, pois gordura, água e hemoglobina absorvem pouca radiação, de forma que a luz consegue penetrar mais profundamente nos tecidos e células [8, 10]. Os fotossensibilizadores mais usados em TFD clínica são clorinas, ftalocianinas e porfirinas [5, 8, 11]. Neste trabalho focaremos nossos estudos no grupo de fotossensibilizadores formado por porfirinas.

As porfirinas são uma classe importante de compostos macrocíclicos de ocorrência natural em compostos biológicos, como o grupo heme (que contém ferro no interior de seu macrociclo) e a clorofila (que contém magnésio), que desempenham um importante papel no metabolismo de seres vivos. Porphirinas são fotossensibilizadores bem conhecidos por sua aplicação em TFD exibindo propriedades interessantes como altos coeficientes de absorção na região visível do espectro, alto rendimento quântico dos estados tripleto e estados excitados que apresentam vida relativamente longa ( $\sim 1 \mu s$ ), além de baixa toxicidade na ausência de luz. Estas características tornam estes compostos bons candidatos para terapia fotodinâmica [5, 12].

Atualmente, a combinação de nanomateriais e fotossensibilizadores tem se mostrado uma boa alternativa para superar algumas limitações da terapia fotodinâmica, podendo melhorar a solubilidade dos FS em água e conseqüentemente sua captação pelas células [13-15]. Os nanomateriais possuem grande razão superfície/volume, proporcionando assim um acúmulo maior de FS na superfície dos mesmos e, conseqüentemente, maior deposição no tecido alvo. Além disso, a superfície de nanomateriais pode ser modificada com certos grupos funcionais, o que pode levar a uma melhora na biodistribuição e captação celular destas nanoplataformas [16, 17]. Neste contexto, nanoestruturas metálicas, dentre elas, as nanoestruturas de ouro ganham destaque também por apresentarem como característica o fenômeno conhecido por Ressonância de Plasmons de Superfície Localizados (RPSL), responsável pela amplificação do campo elétrico na vizinhança das nanoestruturas [18-20].

Nanopartículas de ouro vêm sendo estudadas desde o século XIX quando Michael Faraday produziu nanoesferas de ouro (AuNP) a partir da redução do ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) por fosfato [21]. Há grande variedade de nanoestruturas de ouro descritas em termos do tamanho, forma e propriedades físicas. Nanoesferas, nanocascas, nanobastões têm sido reportados na literatura [22], sendo que suas propriedades físicas e químicas estão diretamente relacionadas à geometria e tamanho destas nanoestruturas. Dentre as propriedades destes sistemas podemos destacar o fenômeno de Ressonância de Plasmons de Superfície Localizados (RPSL), que consiste na oscilação coletiva dos elétrons livres da nanoestrutura metálica sob excitação ressonante [20].

Nanopartículas metálicas (NPM) têm sido utilizadas para diversos fins, dentre eles, podemos destacar seu uso como catalisador em reações químicas [23], métodos de imagem por fluorescência [24-26], sensores biológicos [27], em espectroscopia por meio do Espalhamento Raman Amplificado por Superfície, (SERS do inglês *Surface Enhanced Raman Scattering*) [28]. Estas nanoestruturas metálicas também são aplicadas para melhorar a atividade fotodinâmica para geração de oxigênio singleto, aumentando o rendimento dos estados tripleto do FS por meio de um efeito sinérgico gerado pela sobreposição das bandas de ressonância plasmônicas das estruturas metálicas e das bandas de absorção do FS [29, 30]. Nanoestruturas de ouro, como nanoesferas e nanobastões de ouro, tem sido amplamente usadas, pois apresentam biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e facilidade do ajuste das bandas de ressonância plasmônicas [10, 24, 30, 31]. Além disso, as nanoestruturas de ouro possuem a habilidade de se ligar a grupos funcionais como tióis e aminas, possibilitando mudanças na superfície do material (funcionalização), o que permite que estas estruturas sejam usadas para carrear substâncias para células de forma eficiente e com especificidade [32, 33].

Além da terapia fotodinâmica, a radioterapia é amplamente utilizada para o tratamento de tumores profundos. Essa estratégia se torna útil uma vez que a terapia fotodinâmica convencional limita-se ao tratamento de lesões superficiais, devido à baixa penetração da luz para comprimentos de onda menores que 700 nm [8, 10]. Neste sentido, nanoestruturas com número atômico ( $Z$ ) alto podem atuar também como

radiossensibilizadores potentes, melhorando o contraste entre tumor e tecido saudável, aumentando a dose localmente, uma vez que são excelentes absorvedores de raios X [34, 35]. O uso de radiossensibilizadores baseia-se no fato de que alguns materiais possuem alta seção de choque de absorção de raios X sendo capazes de produzir fotoelétrons, elétrons Auger e raios X fluorescentes que podem ionizar e sensibilizar moléculas em meio biológico [34, 36]. A absorção pode ser melhorada significativamente ajustando-se a energia do feixe de radiação à energia das camadas mais internas dos elementos usados como radiossensibilizadores, favorecendo o efeito fotoelétrico [37]. Dentre os elementos com Z alto utilizados como radiossensibilizadores, podemos citar o iodo (Z=53) [38, 39], usado inicialmente como contraste radiográfico e, o ouro (Z=79) [34, 40, 41] que será objeto de nossos estudos. Uma parte do nosso projeto foi dedicada ao estudo da atividade de nanoestruturas de ouro para geração de espécies reativas de oxigênio quando submetidas à radiação ionizante.

O objetivo deste trabalho consiste em sintetizar nanoestruturas de ouro estáveis para formar um sistema híbrido eficiente em conjunto com porfirinas para geração de EROs; identificar e quantificar as espécies geradas durante iluminação com luz visível, ultra violeta próximo (UVA) e radiação ionizante (raios gama), bem como estudar os mecanismos envolvidos nestes processos. Neste contexto, a Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) se torna uma técnica muito apropriada para o estudo dos sistemas propostos, uma vez que seus subprodutos possuem elétrons desemparelhados (radicais). Porém, como estas espécies são muito reativas e possuem tempo de vida relativamente curto, empregamos um método aplicado à Ressonância Paramagnética Eletrônica, conhecido por armadilha de spin (*spin trapping*), na qual o radical (ou oxigênio singleto) é capturado por um composto diamagnético (*spin trap*), tornando-se um composto paramagnético mais estável e passível de detecção. Esta é uma técnica muito sensível na detecção de radicais e espécies reativas de oxigênio, nos permitindo identificar e quantificar as concentrações de EROs geradas bem como dos outros possíveis radicais gerados durante a iluminação [42].

Avaliamos a atividade fotodinâmica da porfirina aquo-solúvel *5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tosylate salt* ( $H_2TM4PyP(OTs)_4$ ) (POR) em sistemas híbridos formados pela sua adição à nanoesferas ou nanobastões de ouro. Estas

porfirinas foram sintetizadas em colaboração com a professora Dayse C. S. Martins (Departamento de Química - UFMG). Os resultados obtidos foram comparados aos resultados dos híbridos formados pelas nanoestruturas de ouro e Verteporfin, uma porfirina comercial, aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*, EUA) [43].

O primeiro capítulo dedica-se a uma breve introdução sobre a terapia fotodinâmica e uso de nanomateriais em sistemas biológicos, enquanto que no capítulo 2 descrevemos os aspectos referentes à aplicações e bases físicas da terapia fotodinâmica, radioterapia e propriedades das porfirinas, bem como uma revisão sobre a utilização de nanoestruturas de ouro em combinação com as terapias citadas. Apresentamos também uma seção destinada à síntese e propriedades de nanoestruturas de ouro. Em seguida, no capítulo 3, mostramos os aspectos teóricos e experimentais envolvidos na técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica e *Spin Trapping* para detecção de radicais livres. Ainda no capítulo 3, descrevemos os processos de preparação das amostras utilizadas neste trabalho. O capítulo 4 é dedicado à apresentação e discussão dos resultados, sobretudo de RPE, obtidos para os sistemas híbridos formados pelas nanoestruturas de ouro e porfirinas irradiados com várias fontes de excitação (luz visível, luz UVA e raios gama). Por fim, no capítulo 5, os resultados obtidos são sumarizados e algumas perspectivas são traçadas para a continuação deste trabalho.

## 2 – REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – Terapia Fotodinâmica

O uso da luz como ferramenta terapêutica foi reportado pela primeira vez em 1900 por Raab [44] que relatou a morte de micro-organismos (paramécios) quando expostos à luz na presença do corante acridina laranja. Desde então outros exemplos de uso combinado de luz e corante foram relatados para aplicações *in-vitro* e *in-vivo*. Em 1903, Von Tappeiner e Jesionek relataram o uso tópico de solução aquosa de eosina e luz branca no tratamento de câncer de pele [45]. Em 1924, Policard observou que certos tumores malignos em ratos apresentavam uma fluorescência no vermelho graças à acumulação de porfirinas endógenas [46]. Estudos realizados posteriormente por Auler e Banzer, após injetar hematoporfirina em ratos com tumores implantados, confirmaram a acumulação seletiva de porfirinas em tecido maligno [47]. Nos anos 1970, Dougherty [48] se dedicou ao estudo da atividade fotodinâmica de vários corantes, dentre eles a fluoresceína e hematoporfirina, e mostrou a capacidade da hematoporfirina em destruir tecido onde está localizada quando ativada por luz. Em 1976, Weishaupt atribuiu o efeito tóxico da injeção de hematoporfirina em células mamárias de rato TA-3 e, subsequente iluminação com luz vermelha, à formação de oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) [49]. A terapia fotodinâmica resulta, então, da combinação de três elementos essenciais: fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular, que juntos levam à geração de espécies citotóxicas causando morte celular.

O mecanismo de geração de  $^1O_2$  é descrito a seguir: no estado fundamental o fotossensibilizador encontra-se num estado singlete, com dois elétrons emparelhados no orbital de mais baixa energia. Ao irradiar-se o FS há absorção de fótons e um dos elétrons é levado a um estado eletrônico de mais alta energia (o estado singlete excitado  $^1FS^*$ ) de tempo de vida curto ( $\sim 10^{-6}$  s), mas mantendo a orientação do spin. Neste estado, o  $^1FS^*$  pode retornar ao estado fundamental por processos radiativos de emissão fluorescente ou fosforescente, processo não radiativo de conversão interna (calor) ou por um processo de cruzamento intersistemas, caracterizado pela inversão do spin eletrônico. Esse processo de cruzamento intersistema é fundamental para a terapia

fotodinâmica e leva a molécula do FS a um estado excitado tripleto ( ${}^3\text{FS}^*$ , tempo de vida  $\sim 10^{-2}$  s) com spins eletrônicos paralelos e tempo de vida relativamente longo em razão desta transição de spin ser proibida [8].

Uma vez no estado tripleto excitado, o  ${}^3\text{FS}^*$  pode participar de dois mecanismos de geração de espécies reativas de oxigênio. No mecanismo tipo I o  ${}^3\text{FS}^*$  interage com substrato, como membrana celular ou moléculas biológicas, transferindo elétrons (ou hidrogênio) para formar radicais ânions como superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) [12]. Já no mecanismo tipo II, o  ${}^3\text{FS}^*$  pode transferir energia diretamente para a molécula de  $\text{O}_2$ , levando-a ao estado singleto excitado ( ${}^1\text{O}_2$ ) (fig. 2.1) [5]. Ambos os mecanismos podem ocorrer simultaneamente, dependendo do tipo de FS, substrato e concentração de oxigênio molecular [5].

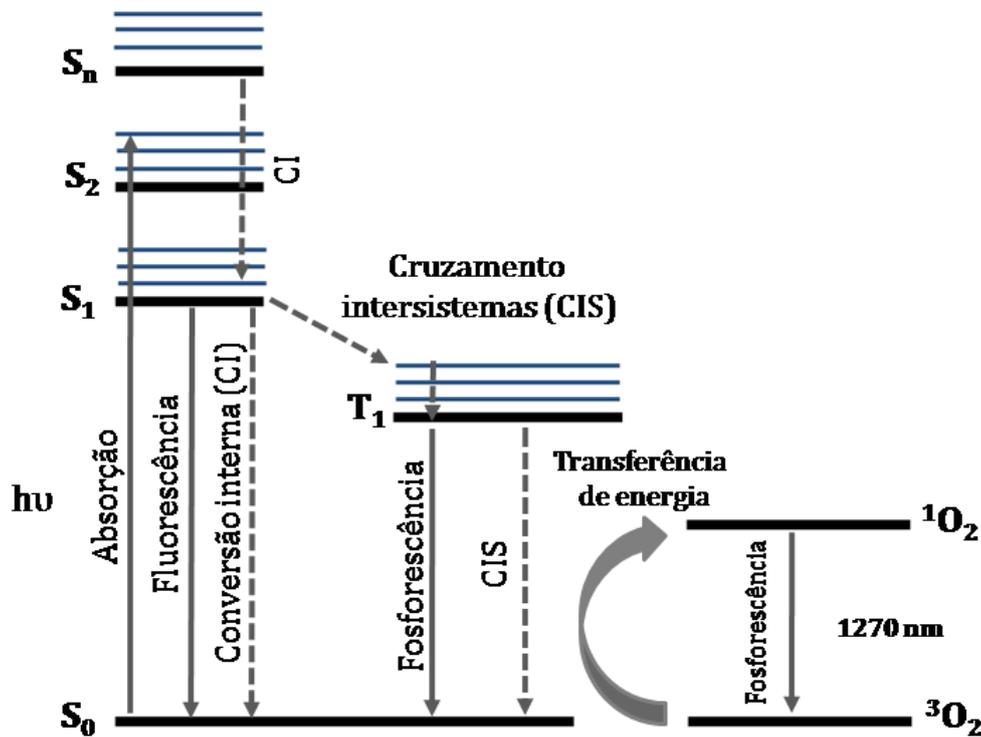
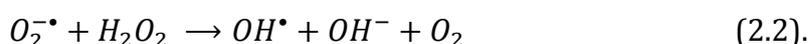
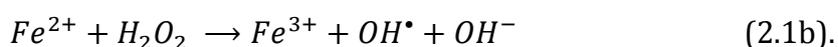
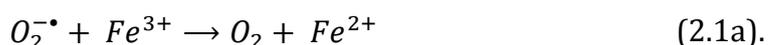


Figura 2.1: Diagrama de Jablonski simplificado. Adaptado [5].

O mecanismo tipo I envolve a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por meio da transferência de elétron do FS no estado tripleto para a molécula de oxigênio [8]. Apesar de não ser potencialmente reativo em sistemas biológicos, o radical superóxido participa da formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e oxigênio, numa reação catalisada pela enzima superóxido dismutase

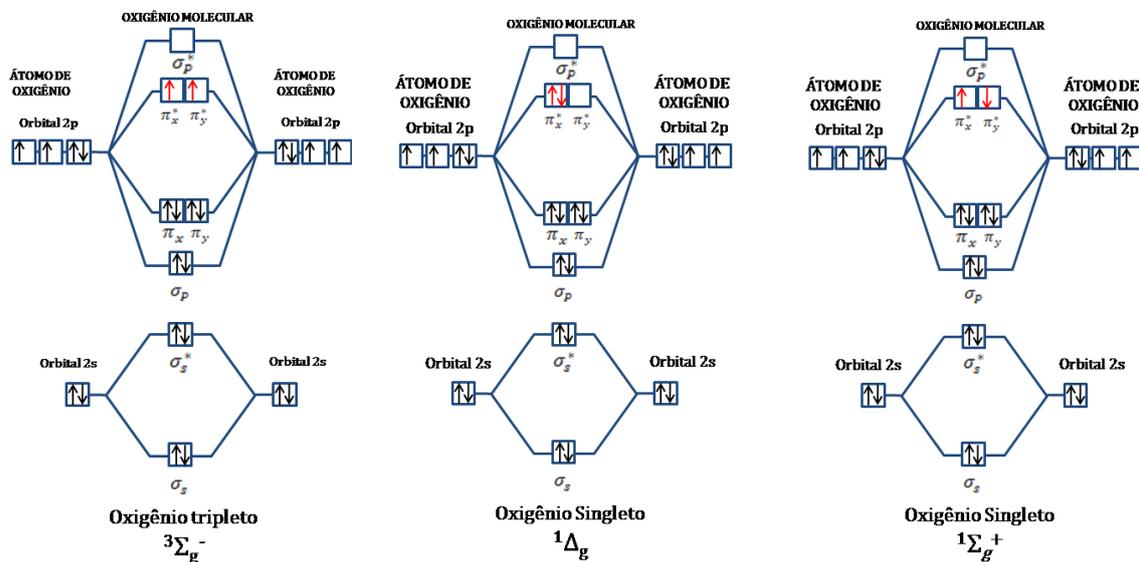
[8].  $H_2O_2$  é capaz de permear a membrana celular, sendo necessário para o funcionamento de enzimas, além de participar de outras reações como reação Fenton [8] e de Haber-Weiss (reações 2.1 e 2.2, respectivamente). O radical superóxido doa um elétron para um íon metálico, que pode ser  $Fe^{3+}$  ou  $Cu^{2+}$ , e o metal após sua redução catalisa a quebra da ligação O-O na molécula de  $H_2O_2$ , produzindo radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e íons  $OH^-$  [8]. Assim como o peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila pode passar pela membrana celular [8].



O mecanismo de morte celular envolvido em TFD pode incluir necrose, apoptose e dano ao DNA [3, 50]. Acredita-se que as espécies reativas geradas inicialmente podem matar as células tumorais via apoptose e/ou necrose quando o FS acumula-se no tecido tumoral. Além disso, a TFD danifica a vascularização do tumor levando a morte por falta de nutrientes e oxigênio [50]. Há também possibilidade de dano ao DNA por meio da oxidação das bases nucleicas e, apesar das células possuírem mecanismos de reparação de proteínas e DNA, dano excessivo pode causar mutação e morte celular [51, 52]. Segundo Dysart et al. são necessárias cerca de  $10^8$  -  $10^9$  moléculas de oxigênio singleto por célula para reduzir a fração de sobrevivida por  $1/e$  [53].

A molécula de oxigênio possui algumas características singulares. Uma delas é referente à sua configuração eletrônica no estado fundamental: a molécula possui dois elétrons desemparelhados em seu estado fundamental, característica que lhe confere alta reatividade química. A molécula de  $O_2$  possui seis elétrons nos orbitais moleculares  $\pi$ . O estado de mais baixa energia possui dois elétrons desemparelhados nos dois orbitais degenerados  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$ , sendo designado por  $^3\Sigma_g^-$ , numa configuração de tripleto [54]. Há três estados excitados chamados de singleto, sendo dois deles (degenerados) na configuração de menor energia, em que dois elétrons ocupam o mesmo orbital  $\pi_x^*$  ou  $\pi_y^*$ , sendo chamados  $^1\Delta_g$  [55]. Estes estados são denominados  $^1\Delta_x$  e  $^1\Delta_y$  e conferem reatividade à molécula de oxigênio [54]. No estado  $^1\Sigma_g^+$  mais energético, os dois elétrons

emparelhados ocupam cada um os orbitais  $\pi_x^*$  e  $\pi_y^*$  [55] (figura 2.2). Os estados excitados  $^1\Delta_g$  e  $^1\Sigma_g^+$  possuem, respectivamente, energias de 95 kJ/mol (22,5 kcal/mol) e 158 kJ/mol (31,5 kcal/mol) acima do estado fundamental [55]. As espécies reativas de oxigênio produzidas pela fotossensibilização do oxigênio molecular na presença de um corante constituem a base da TFD. Porém, estas espécies altamente reativas possuem tempo de vida curto e por esta razão apenas moléculas próximas à região onde o FS se encontra são afetadas. O curto tempo de vida do oxigênio singlete (10 - 40 ns) limita seu raio de ação ( $\sim 20$  nm) não permitindo que ele se difunda por mais de uma célula (diâmetro médio das células humanas 10 - 100  $\mu\text{m}$ ) [12, 56].



**Figura 2.2:** Distribuição de orbitais atômicos e moleculares para o oxigênio. Adaptado [54].

Apesar de seus benefícios, a terapia fotodinâmica convencional possui algumas limitações. Uma delas é que este tipo de terapia trata apenas áreas onde a luz pode penetrar, restringindo a técnica ao tratamento de lesões na pele ou em camadas superficiais da derme, ou tecidos que revestem órgãos que podem ser alcançados por uma fonte de luz. Além disso, as drogas usadas em TFD deixam as áreas de aplicação muito sensíveis à luz por um determinado período e precaução é necessária. Outro problema incomum, mas possível, é a uma reação alérgica ao grupo de FS de porfirinas, comumente usado em TFD [8]. A técnica mostra-se pouco eficaz quando aplicada ao

tratamento de tumores profundos. Nesse sentido, a radioterapia associada ao uso de um sistema híbrido composto por nanoestruturas de ouro e um FS pode ser uma alternativa a baixa penetração da luz em TFD [57].

Nesse contexto, uma nova modalidade de tratamento surge como uma alternativa ao tratamento de tumores profundos: a terapia fotodinâmica profunda mediada por raios X [57-60]. A radioterapia faz uso de radiação ionizante, incluindo raios X, raios gama e partículas de alta energia, sendo amplamente utilizada para o tratamento de quase todos os tumores sólidos. Porém, a radiação ionizante não é capaz de distinguir o tecido saudável do maligno [35]. A radioterapia promove dano ao DNA pela ionização direta ou, geração de radicais livres, pela ionização de moléculas de água ou oxigênio [61]. A aplicação de nanopartículas para tumores específicos tem por objetivo melhorar os efeitos da radioterapia por meio da indução de maior toxicidade aos tumores e redução dos danos para células normais [35]. A dose de radiação recebida pode ser amplificada pela presença de materiais com alto número atômico ( $Z$ ), como é o caso do ouro ( $Z=79$ ), pelo aumento do efeito fotoelétrico, dentre outros fenômenos de origem física [34, 61]. Desta forma, buscamos uma abordagem que nos permita ampliar o campo de aplicação da terapia fotodinâmica, abrangendo também tumores profundos ou ainda um tipo de câncer de pele severo, como o melanoma. O estudo das propriedades físico-químicas dos sistemas híbridos compostos por FS e nanoestruturas de ouro se faz necessário para que se possa aplicá-los em testes biológicos futuramente.

Elementos pesados tem seção de choque maior que tecidos moles, para energias abaixo de 0,5 MeV [34, 61]. Quando irradiados com raios X ou raios  $\gamma$ , elementos com  $Z$  alto podem produzir uma cascata de elétrons Auger de baixa energia que podem aumentar localmente a dose efetiva de radiação [61].

Uma nova possibilidade de junção de nanomateriais e fotossensibilizadores para aplicações biológicas foi proposta por Chen e Zhang [57]. Estes autores partiram do conceito da combinação de terapia fotodinâmica e radioterapia usando nanopartículas cintilantes ligadas a fotossensibilizadores de forma a reduzir a dose de radiação ionizante incidente. O mecanismo consiste em ligar covalentemente o FS às NPs cintiladoras e irradiá-las com radiação ionizante. O FS é ativado por meio da luminescência das NPs cintiladoras. NPs dopadas com lantanídeos podem ser usadas

para esta finalidade [57]. Fluoreto de lantânio dopado com cério, por exemplo, apresenta luminescência na região do UV-azul, região correspondente à banda de Soret das porfirinas, sendo, portanto, um bom candidato para terapia fotodinâmica associada à radioterapia [61]. Atualmente vários materiais cintiladores, compostos geralmente por terras raras, têm sido reportados para aplicações associadas ao conceito de terapia fotodinâmica induzida por raios X [58-60, 62-64].

O uso de nanopartículas de ouro em radioterapia baseia-se no fato do ouro possuir número atômico alto, amplificando a dose da radiação ionizante incidente, dependendo da energia da radiação, por meio do efeito fotoelétrico e geração de elétrons Auger. Os mecanismos envolvidos na morte celular incluem ionização direta do DNA promovendo danos ao mesmo e geração de espécies reativas de oxigênio. Na seção 2.2 discutiremos mais detalhadamente os mecanismos envolvidos na geração de EROs.

## **2.2 – Radioterapia amplificada pela presença de nanoestruturas de ouro**

A radioterapia convencional tem como objetivo entregar a maior dose de raios energéticos prescrita a um volume tumoral, enquanto o tecido saudável próximo ao tumor é poupado. A energia transferida ao tecido tumoral inicia uma cascata de eventos químicos, bioquímicos e biológicos letais ao tumor. Na teleterapia, a forma de radioterapia mais utilizada, a fonte de radiação situa-se na região externa ao corpo do paciente. O feixe de radiação pode ser composto por fótons (raios X, gama), ou partículas como elétrons, prótons, nêutrons ou íons (como carbono). Porém, feixes de fótons energéticos são os mais utilizados em radioterapia. O fator limitante para a entrega da dose é a radiosensibilidade do tecido vizinho saudável, uma vez que a dose máxima deve se concentrar no tecido tumoral, poupando o tecido normal.

Em tratamentos radioterápicos, raios X ou gama são colimados na forma do volume alvo (tumor). A radioterapia com intensidade modulada (IMRT- *intensity modulated radiation therapy*) representa um avanço neste campo, pois é um método capaz de conformar e modular a intensidade da radiação ao volume tumoral, por meio do uso de vários feixes produzidos por aceleradores lineares em qualquer ângulo, o que permite a entrega de uma dose maior no volume tumoral enquanto minimiza a dose nos

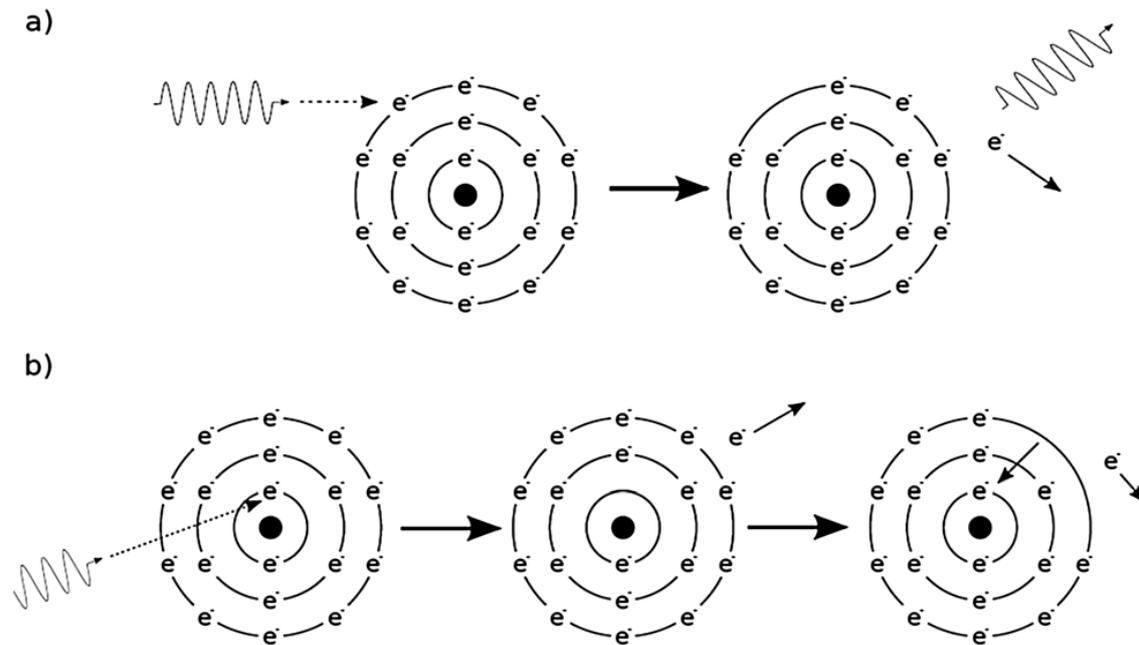
tecidos saudáveis adjacentes ao tumor [65]. Os fótons são partículas que podem promover ionização indireta do meio por meio da deposição de sua energia. Inicialmente ocorre transferência de energia do fóton para outra partícula, por exemplo, um elétron  $e$ , em seguida, esta partícula carregada pode depositar a energia no meio. A seção de choque pode ser entendida como a probabilidade de um destes eventos ocorrer e irá depender do número atômico e densidade do meio com o qual o fóton interage [66].

O uso de nanopartículas de ouro como radiosensibilizadores vem ganhando atenção desde o trabalho publicado por Hainfeld et al. [40] mostrando a maior sobrevivência de ratos implantados com células tumorais que receberam injeções de nanopartículas de ouro de 1,9 nm e tratamento com raios X, em comparação com grupo tratado apenas com raios X. A alta seção de choque de absorção de raios X do ouro é responsável por aumentar a absorção fotoelétrica nas proximidades do tumor e melhorar o contraste entre o tecido alvo e tecido saudável [34, 35, 67]. Para AuNP, em energias da ordem de keV, as NP interagem com raios X por meio do efeito fotoelétrico, onde o fóton é absorvido por um elétron das camadas mais internas e este elétron é ejetado do átomo [36]. Neste caso, um elétron da órbita mais externa preenche o buraco deixado pelo elétron ejetado, num processo conhecido como efeito Auger. Ao ocupar a vaga na órbita mais interna, a diferença de energia entre as duas órbitas é então liberada sob a forma de um fóton que pode excitar ou ejetar outros elétrons, que criarão novos buracos que serão preenchidos por outros elétrons Auger, num efeito cascata de emissão de elétrons Auger [36, 37]. No caso do Au, a energia de ligação dos elétrons da camada K é da ordem de 80,7 keV [34]. Como resultado é esperado um reforço na dose sobre tecidos que contêm as NP [37].

A aplicação de nanoestruturas de ouro como radiosensibilizadores reside no fato deste elemento possuir coeficiente de absorção de energia por massa maior que tecidos moles, o que aumenta a dose de energia depositada nos tecidos onde as nanopartículas se acumulam [36]. Fótons energéticos de raios X e gama depositam sua energia por meio de elétrons secundários gerados pelo efeito fotoelétrico e efeito Compton [34, 35]. O principal mecanismo no qual fótons perdem energia em tecidos moles é por meio de espalhamento Compton, processo no qual um fóton energético é

espalhado em processo inelástico por um elétron fracamente ligado [36]. O fóton espalhado transfere parte de sua energia para o elétron causando a ejeção do elétron do átomo (figura 2.3a) [36]. Para baixas energias, o efeito fotoelétrico aparece como um processo de competição. O efeito fotoelétrico consiste na emissão de um elétron de uma das camadas mais internas do átomo, após o elétron absorver completamente a energia do fóton da radiação incidente (figura 2.3b) [36]. O fotoelétron adquire energia cinética cujo valor irá determinar o alcance que ele terá no tecido, por exemplo, para um fotoelétron com 100 keV de energia cinética seu alcance será da ordem de 100  $\mu\text{m}$ , cerca de 10 células [34]. O efeito fotoelétrico varia com  $(Z/E^3)$ , onde E é a energia do fóton incidente e Z corresponde ao número atômico do material. Para elementos com número atômico alto, o efeito fotoelétrico é dominante na interação da radiação com a matéria para energias menores que 0,5 MeV [36]. Este efeito é fortemente dependente da relação entre as energias do fóton e de ligação do elétron, apresentando maior seção de choque de absorção quando o fóton possui energia suficiente para liberar o elétron [36].

Os fenômenos mencionados levam os átomos a estados excitados/ionizados devido à ejeção de elétrons. Estes elétrons são “restaurados” por elétrons das órbitas mais externas que podem mover-se para preencher o buraco deixada na órbita interna, liberando energia por meio fótons fluorescentes ou elétrons Auger (desexcitação) [37]. O processo de desexcitação Auger ocorre após a ionização e induz a emissão de elétrons Auger responsáveis pela amplificação da dose entregue ao tecido [37].



**Figura 2.3:** Ilustração dos processos de ionização causados pelos efeitos Compton (a) e fotoelétrico (b). No efeito Compton, o fóton incidente é espalhado por um elétron, transferindo parte de sua energia para o elétron, que é ejetado do átomo (a). No efeito fotoelétrico, o fóton incidente é absorvido por elétron da órbita mais interna, ejetando-o de sua órbita (b). Como resultado, elétrons das órbitas externas podem ocupar a vacância da órbita mais interna, de forma que mais elétrons podem ser ejetados. Extraído da referência [36].

Dentre os mecanismos físicos de interação da radiação com a matéria podemos citar o efeito fotoelétrico, efeito Compton e produção de pares. Descreveremos brevemente cada um destes processos nas próximas seções.

### 2.2.1 - Efeito Fotoelétrico

Como mencionado anteriormente, o efeito fotoelétrico ocorre quando há interação de um fóton com um elétron fortemente ligado, transferindo toda sua energia para o elétron de um orbital interno (geralmente da camada K), que é ejetado de sua órbita com energia cinética ( $E_c$ ) dada por [68,69]:

$$E_c = h\nu - W \quad (2.3).$$

onde  $h$  é a constante de Planck,  $\nu$  é a frequência da radiação incidente e  $W$  é a função trabalho que corresponde a energia de ligação do elétron. O efeito fotoelétrico é predominante a baixas energias e para elementos com número atômico alto, sendo sua probabilidade de ocorrência proporcional a  $(Z/E)^n$  sendo  $Z$  o número atômico do absorvedor e  $E$  a energia do fóton incidente. O expoente  $n$  varia de acordo com a energia do fóton, de forma que  $n \cong 3$  para  $h\nu < 0,35 \text{ MeV}$ ;  $n \cong 2$  para  $0,35 < h\nu < 1,5 \text{ MeV}$  e  $n \cong 1$  para  $h\nu > 1,5 \text{ MeV}$  [68].

A probabilidade de interação é máxima quando a energia do fóton é igual a energia de ligação,  $W$ , do elétron no átomo [68]. A probabilidade decresce com o aumento da energia do feixe [68]. Quando a energia do fóton não é suficiente para ejetar o elétron de sua órbita, este elétron passa a ocupar uma órbita mais externa e um buraco é deixada na órbita interna, ficando o átomo em estado excitado. Nesse caso, também pode haver emissão de fótons de radiação característica ou emissão de elétrons Auger [68].

### 2.2.2 - Espalhamento Compton

Neste processo, um fóton é espalhado por um elétron fracamente ligado, transferindo parte de sua energia para o elétron, supostamente em repouso, sendo este elétron ejetado de sua órbita, com certa energia  $E$  e o fóton espalhado em um ângulo  $\theta$  em relação à direção de incidência [69]. O elétron posto em movimento é chamado elétron de recuo. Como consequência, o fóton espalhado terá menor energia e maior comprimento de onda que o fóton incidente [69]. Compton partiu dos princípios de conservação de energia e momento para chegar aos comprimentos de onda do fóton espalhado em função do comprimento de onda do fóton incidente e do ângulo de espalhamento [69]. A energia do fóton espalhado ( $E'$ ) e do elétron de recuo ( $E$ ) pode ser dada respectivamente por [69]:

$$E'(\theta) = \frac{h\nu}{1 + \frac{h\nu}{mc^2}(1 - \cos \theta)} \quad (2.4).$$

$$E(\theta) = h\nu \frac{\frac{h\nu}{mc^2}(1 - \cos(\theta))}{(1 + \frac{h\nu}{mc^2}(1 - \cos \theta))} \quad (2.5).$$

onde  $mc^2$  corresponde a energia de repouso do elétron,  $h$  é a constante de Planck e  $\nu$  é a frequência do fóton incidente. A diferença entre os comprimentos de onda do fóton espalhado ( $\lambda'$ ) e incidente ( $\lambda$ ) será:

$$\lambda' - \lambda = \frac{h}{mc}(1 - (\cos \theta)) \quad (2.6).$$

Sabe-se que a seção de choque de absorção é maior para os orbitais mais internos. Na faixa de raios X a camada K é a que possui maior seção de choque de absorção. No efeito Compton um elétron também é ejetado de sua órbita após colisão inelástica com um fóton. Os elétrons emitidos pelo efeito fotoelétrico e Compton podem depositar sua energia na matéria até que sua energia cinética se extinga. O alcance dos elétrons Compton pode chegar a centenas de microns, enquanto que para fotoelétrons ou elétrons Auger de mais baixa energia o alcance se torna muito menor, por exemplo, o alcance para elétrons com 1 keV é da ordem de 0,05  $\mu\text{m}$  [37].

O efeito Compton é a interação mais importante entre a radiação e a matéria, pois o fóton espalhado pode continuar suas interações, com energia reduzida, enquanto o elétron pode ionizar outras moléculas [70]. Como a maior parte dos tratamentos de radioterapia ocorrem com aceleradores lineares com energias da ordem de MeV, o efeito Compton é a interação de maior ocorrência em modalidades clínicas [70].

### 2.2.3 – Produção de pares

A produção de pares ocorre pela interação do fóton com o campo elétrico do núcleo [68]. Para que este evento aconteça o fóton incidente deve ter energia maior que 1,022 MeV, correspondente a duas vezes a massa de repouso do elétron. A energia do fóton é convertida na geração de um par elétron-pósitron. O pósitron perde energia após colisão com átomos até atingir uma energia cinética suficientemente baixa, podendo sofrer interação com um elétron do meio num processo de aniquilação. Nesse ponto as duas partículas desaparecem dando origem a uma radiação eletromagnética de energia igual a 1,022 MeV (emissão de dois fótons com energia 0,511 MeV cada, em direções opostas) [68].

Em resumo, para energias baixas (até 500 keV) o efeito fotoelétrico é dominante na interação da radiação com a matéria. A partir do aumento na energia dos fótons incidentes (acima de 500 keV) o efeito Compton se torna mais provável na interação de fótons com átomos de número atômico alto. Para energias maiores que 10 MeV a produção de pares se torna dominante com seção de choque proporcional a  $Z^2$  [71]. Na tabela 2.1 vemos as faixas de energias onde as interações mencionadas se tornam predominantes para tecidos moles [70]. Para elementos com  $Z$  alto, o efeito fotoelétrico é dominante para energias menores que 500 keV e, para raios X na faixa de MeV, usada na maioria das máquinas de radioterapia, o efeito Compton prevalece [34]. Raios X da ordem de MeV são usados para o tratamento de lesões mais profundas, pois são capazes de atravessar a pele interagindo muito pouco com a pele [34].

**Tabela 2.1:** Interação predominante entre fótons e tecido mole em função da energia do feixe de fótons [70].

<b>Energia do fóton</b>	<b>Interação predominante (para tecidos moles)</b>
<b>10-25 keV</b>	Efeito fotoelétrico
<b>25 keV - 25 MeV</b>	Espalhamento Compton
<b>&gt; 25 MeV</b>	Produção de pares

Há muitos processos físicos, químicos e biológicos envolvidos quando utilizamos nanomateriais para melhorar o efeito da absorção de raios X. Inicialmente, acreditava-se que estas melhorias eram devido apenas ao aumento da absorção de raios X pela presença de nanomateriais, o que levaria a maior geração de elétrons, radicais e outras espécies químicas, que seriam responsáveis por quebra dos filamentos do DNA de forma mais eficiente. O aumento da absorção de raios X é sim responsável por um processo chamado de "melhoria física" (PE, do inglês *physical enhancement*) [72]. Dois tipos de melhoria física foram propostos por Lee et al. [72, 73]: o tipo 1 chamado T1PE (do inglês *type 1 physical enhancement*) e o tipo 2, T2PE (do inglês *type 2 physical enhancement*) [72]. O mecanismo T1PE é causado por fotoelétrons energéticos ( $> 5$  keV) que podem viajar distâncias até dezenas de microns em soluções aquosas, sendo distribuído de forma uniforme no volume da amostra. Este processo independe da localização do material na solução e possuiu dimensão maior que os fenômenos que ocorrem na escala nano, sendo por isso tratado como melhoria média. No mecanismo T2PE fotoelétrons de baixa energia ( $< 5$  keV), elétrons Auger e elétrons secundários podem gerar grandes densidades de deposição de energia, próximo à superfície do material absorvente, uma vez que os mesmos podem viajar curtas distâncias (alguns nanômetros) [72, 73]. Devemos ressaltar que, nos estudos realizados nos trabalhos de Lee et al. [72, 73], as energias dos feixes de fótons usados são da ordem de keV (40-200 keV).

Além destes dois exemplos, há também melhoria mediada por reações químicas catalisadas na superfície dos nanomateriais, chamada melhoria química (CE – do inglês, *chemical enhancement*) e um mecanismo contrário, de redução destes efeitos, chamado *anti-enhancement* (AE). Este último acontece, sobretudo, quando há grande concentração do material, devido a remoção de EROs pelos surfactantes ou pela superfície dos nanomateriais [74]. O conceito de melhoria química pode ser entendido como um aumento no rendimento de uma reação química na presença de alguns materiais, como proposto por Cheng et al. [74]. O trabalho destes autores mostrou que, para quantidades de AuNP maiores que 0,1% em peso, há uma redução no efeito de melhoria o que pode indicar que as AuNP ou a superfície das nanopartículas começam a remover  $\text{OH}\cdot$ .

O efeito de melhoria química proposto por Cheng e colaboradores requer a ativação dos nanomateriais por radicais superóxido produzidos sob raios X [74]. Uma das hipóteses é que o radical superóxido produzido sob raios X tem a função de transferir elétrons para a superfície do nanomaterial tornando-o aniônico [74]. Esses elétrons podem intermediar reações químicas. Outra possibilidade mencionada pelos autores é que o superóxido pode se converter em radicais hidroxila e hidroperoxila [74].

Sicard-Roselli e coautores propuseram um protocolo de referência baseado na oxidação de cumarina a 7-hidroxicumarina, pelo radical hidroxila, gerado em soluções contendo nanopartículas de ouro (com cerca de 32 nm de diâmetro) estabilizadas por citrato de sódio e irradiadas por raios X de 20 keV de energia [75]. Os autores sugeriram um mecanismo catalítico na superfície das nanopartículas metálicas, baseado na interação da radiação ionizante com moléculas de água da solução, de forma a produzir um número de espécies excitadas que podem difundir para a interface água-nanopartícula, onde a energia da interação é usada para produzir  $\text{OH}^\bullet$  [75]. Desta forma, a radiólise da água pode ser mais eficiente na vizinhança das nanopartículas. O principal requisito é a formação de uma camada de água estruturada na vizinhança da nanopartícula, causada possivelmente pela interação da carga superficial das NP e os dipolos da água [75]. Na interface água-nanopartícula camadas estruturadas de água podem ocorrer, assim há ligações de hidrogênio adicionais puxando a ligação H-OH numa direção dissociativa, enfraquecendo as ligações intermoleculares [75]. Uma vez que as ligações já estão enfraquecidas, a injeção de energia extra é passível de quebrar estas ligações levando a geração mais eficiente de  $\text{OH}^\bullet$  [75]. Para que a camada estruturada de água se forme é necessário apenas que a nanopartícula tenha carga suficiente para alinhar os dipolos das moléculas de água em sua vizinhança [75]. O alinhamento das ligações de hidrogênio entre as moléculas de água produzirá a camada estruturada de água bem como o enfraquecimento das ligações H-OH, favorecendo a formação de  $\text{OH}^\bullet$  [75]. De acordo ainda com estes autores, uma dose de 10 Gy, comumente usada em radioterapia, combinada a 1 nM de AuNP pode gerar aproximadamente 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{OH}^\bullet$ , quantidade pequena, porém capaz de gerar múltiplas quebras na cadeia de DNA [75].

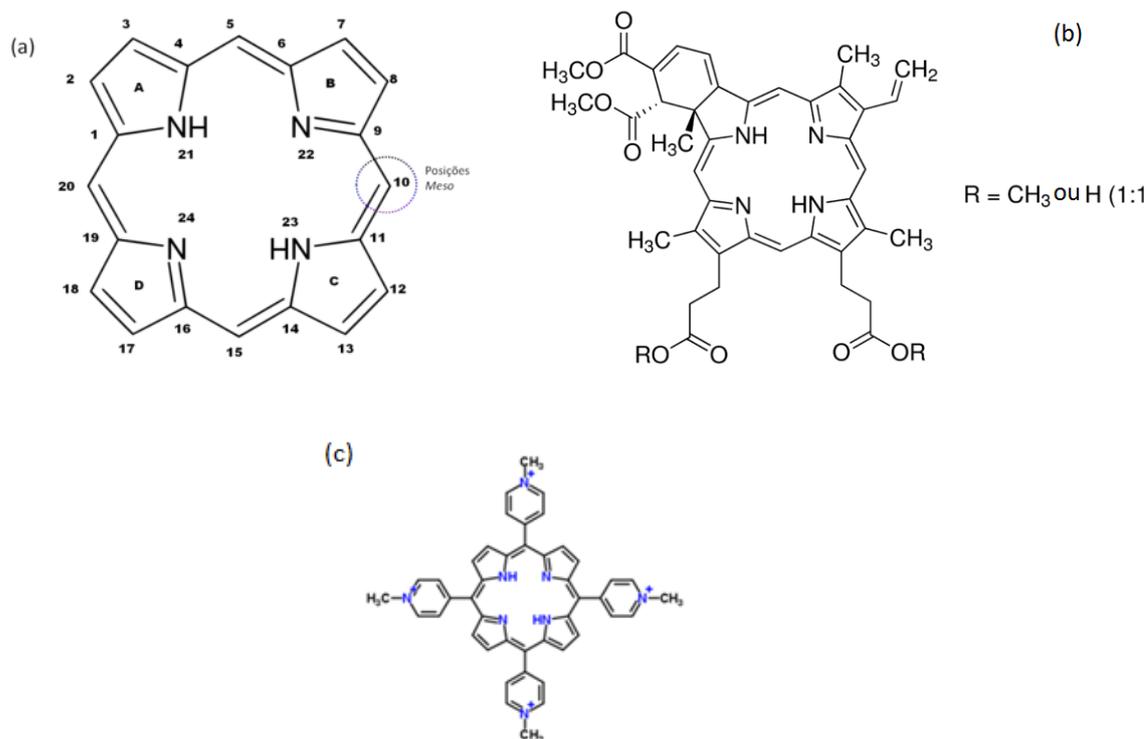
A síntese de nanomateriais em soluções aquosas facilita sua aplicação em sistemas biológicos. A água, quando submetida à radiação ionizante, pode gerar, sobretudo, radicais hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), num processo conhecido como radiólise da água [76]. Estes radicais, extremamente reativos e com alto poder de oxidação, podem ser identificados por meio da técnica de *spin trapping* [42], que pode nos fornecer informações importantes sobre as espécies reativas geradas na presença de nanoestruturas de ouro, sob radiação ionizante.

### 2.3 – Propriedades das porfirinas

Porfirinas são compostos macrocíclicos, aromáticos de alta conjugação, constituídas por quatro anéis pirrólicos ( $\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$ ) que se ligam por meio de átomos de carbono com ligações meso-metínicas (-CH-) (figura 2.4) [77]. Estas moléculas são constituídas por 22 elétrons  $\pi$ , com 18 elétrons  $\pi$  em conjugação direta. Cátions metálicos (porfirinas metaladas) podem ser inseridos no interior de seu macrociclo por meio da substituição dos dois átomos de hidrogênio. Estes compostos exibem uma intensa banda de absorção na região do UV próxima de 400 nm, chamada de banda de Soret, característica de sua estrutura de anel, tanto nas formas metalada quanto não metalada. As porfirinas não metaladas apresentam ainda outras bandas de absorção menos intensas entre 450-700 nm, chamadas de bandas Q [77], importantes para o seu uso em terapia fotodinâmica. As bandas de absorção observadas no espectro das porfirinas são características de seu macrociclo e ocorrem devido à transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ . A intensidade e número das bandas Q relacionam-se ao tipo e número de substituintes periféricos em seu macrociclo [78].

A estrutura do anel macrocíclico com 4 átomos de nitrogênio no centro permite acomodar um átomo metálico (porfirina metalada - metaloporfirina) ou dois átomos de hidrogênio (base livre). A porfirina dianiônica formada pela remoção dos prótons internos pode formar complexos eletricamente neutros com metais divalentes tais quais Zn, Mg, Cu, Fe, Co e Ni. A inserção de íon metálico na estrutura da porfirina leva a simplificação do espectro visível, mas mantém a banda de Soret próxima a 400 nm [77]. Mudanças na conjugação, como a redução de uma das duas ligações duplas periféricas,

não alteram a aromaticidade da molécula, porém, produzem um espectro caracterizado por intensa absorção na faixa entre 650 - 680 nm (clorinas) e, com a redução das duas ligações duplas periféricas, uma banda de absorção em 740 nm surge (bacterioclorinas) [77].



**Figura 2.4:** (a) Estrutura geral das porfirinas (nomenclatura definida pela IUPAC). (b) Estrutura da porfirina Verteporfin, obtida comercialmente. (c) Estrutura da porfirina  $H_2TM_4PyP(OTs)_4$  (POR) (fonte: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4086.html>).

Os derivados da hematoporfirina como, por exemplo, Photofrin® são chamados de fotossensibilizadores de primeira geração. Porphirinas, clorinas, bacterioclorinas e seus derivados são conhecidos como fotossensibilizadores de segunda geração e dentre suas características podemos destacar a existência de bandas de absorção próximas a 650 nm e menor fotossensibilidade da pele [79].

Um fotossensibilizador eficiente deve apresentar pureza química, estabilidade física e química, boa biocompatibilidade, baixa toxicidade no escuro, solubilidade em meio biológico e facilidade em sua eliminação do corpo humano, assim como afinidade pelo tecido alvo (células tumorais) [2, 3, 8, 50]. O FS deve apresentar também bandas de

absorção relativamente altas ( $> 20,000-30,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) de forma a minimizar a dose de FS necessária para que efeito desejado seja atingido [8]. Além destes pré-requisitos, o FS deve apresentar alto rendimento e tempos de vida longos para os estados tripletos. Em estados tripletos com energia menor que  $94 \text{ kJ/mol}$  ( $1270 \text{ nm}$ ) não ocorre transferência de energia de forma eficiente do estado tripleto do FS para o estado fundamental da molécula de oxigênio [12].

#### 2.4 – Síntese e Propriedades Óticas de Nanopartículas Metálicas (NPM)

De acordo com a IUPAC, o termo coloide refere-se ao grau de subdivisão. Num sistema coloidal, partículas dispersas em um meio devem possuir, em pelo menos uma direção, dimensões entre  $1 \text{ nm}$  e  $1 \mu\text{m}$ . Numa suspensão coloidal, partículas de dimensão coloidal estão dispersas em um líquido, como é o caso das suspensões coloidais de nanopartículas e nanobastões de ouro. Estes sistemas coloidais têm sido objeto de estudo desde Faraday [21]. De acordo com Turkevich, a síntese destes sistemas coloidais consiste em três estágios: nucleação, crescimento e possível coagulação [80]. A síntese de nanopartículas de ouro por meio da redução de ácido tetracloroáurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) por citrato de sódio é conhecida como método de Turkevich. Este método tem sido adaptado com a substituição do citrato de sódio por outros agentes redutores como hidroquinona [81] e glutatona [82]. A síntese de nanobastões de ouro pode ser realizada por diversos métodos, sendo o método mais comum conhecido por semente (*seed*) [83-86]. Neste método, pequenas sementes de ouro (esferas de  $3 - 4 \text{ nm}$ ) [87] são sintetizadas pela redução do ácido tetracloroáurico por um agente redutor forte,  $\text{NaBH}_4$ , e servem como pontos de nucleação para o crescimento dos bastões de ouro. Além do método de semente, outras metodologias podem ser empregadas para a síntese dos nanobastões, como síntese por redução eletroquímica [88] e método sem semente (*seedless*) [89-91].

O método por sementes baseia-se em duas etapas: inicialmente pequenas sementes são geradas pela redução do sal de ouro, na presença de surfactante (geralmente brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB) por um agente redutor forte, comumente  $\text{NaBH}_4$ , num ambiente de supersaturação química, o que leva a uma nucleação rápida; na segunda etapa, prepara-se uma solução de crescimento contendo o

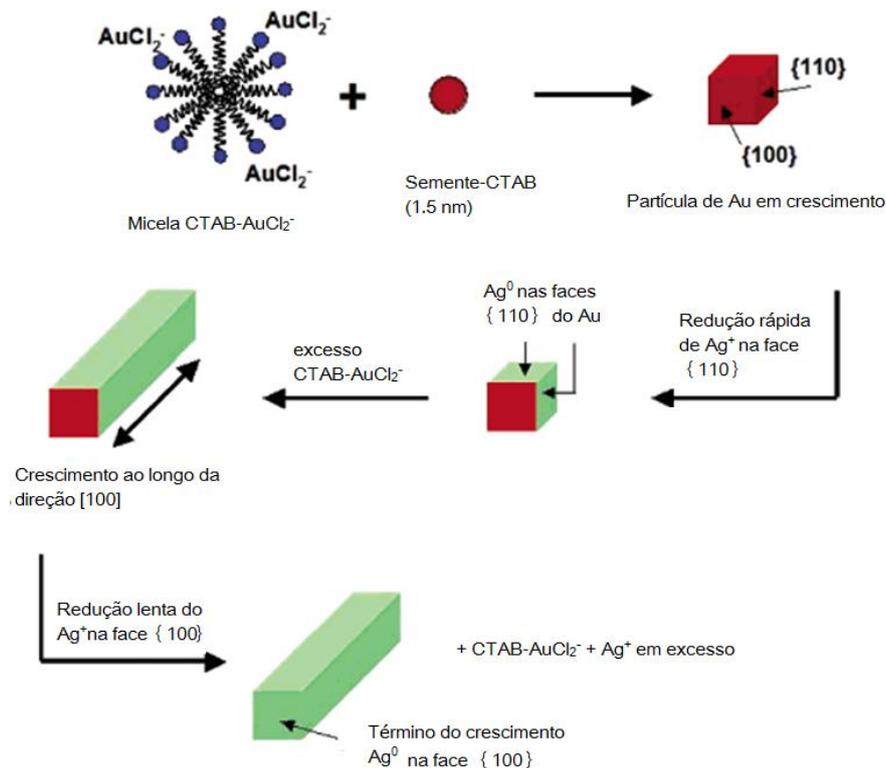
sal de ouro, surfactante, ácido ascórbico e nitrato de prata, onde o ouro é reduzido de  $\text{Au}^{3+}$  a  $\text{Au}^+$  [91]. O controle da forma e das facetas cristalográficas é importante na determinação das propriedades catalíticas e da superfície das NPM, sendo por isso desejável o controle destes parâmetros por meio da síntese [85].

De acordo com Nikoobakht e El-Sayed [85] dois mecanismos para o crescimento do bastão podem ser propostos: no primeiro deles, o surfactante (CTAB) forma um molde (*template*) e ao introduzir as sementes na solução de crescimento, a semente recoberta por CTAB se torna parte do *template*. Assim o crescimento começa com a difusão dos átomos de ouro para dentro do *template*. O tamanho do *template* irá depender da concentração do surfactante na solução [85]. No segundo mecanismo, as sementes recobertas com CTAB começam a crescer e, à medida que os átomos de ouro são adicionados à rede cristalina do material, eles são protegidos por monômeros do surfactante [85]. Segundo Nikoobakht e El-Sayed, o crescimento dos bastões ocorre simultaneamente em todas as direções, com crescimento longitudinal ao longo da direção [001], com formação de quatro facetas (110) e quatro facetas (111) [85]. O surfactante liga-se preferencialmente às facetas (110) protegendo-as e diminuindo a taxa de crescimento da largura do bastão [85].

Os métodos de síntese descritos necessitam da presença de surfactante e  $\text{AgNO}_3$ . A presença do surfactante cria um ambiente micelar capaz de direcionar o crescimento do material em forma de bastão, enquanto os íons de prata têm papel fundamental na variação da razão de aspecto dos nanobastões [84, 92]. A razão de aspecto (R) é definida pela razão entre comprimento e largura do nanobastão.

O surfactante mais usado na síntese de nanobastões é o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) que tem a função de estabilizante e agente direcionador do crescimento ao longo de uma direção por meio da formação de micelas [83]. Já na ausência de  $\text{AgNO}_3$  o rendimento de nanobastões é baixo e não há controle sobre a razão de aspecto [83]. Alguns autores discutem sobre o papel dos íons de prata na síntese de nanoestruturas metálicas. Jana e coautores acreditam que o  $\text{AgNO}_3$  forme complexo do tipo  $\text{AgBr}$ , sendo adsorvido na superfície das nanopartículas de ouro, restringindo o crescimento naquelas faces [83]. Nikoobakht e El-Sayed acreditam que os íons  $\text{Ag}^+$  formem pares  $\text{Ag-Br}$  entre os grupos da cabeça do surfactante, o que levaria a uma

menor repulsão entre os grupos vizinhos na superfície do ouro, por meio da diminuição da densidade de carga dos íons Br [85]. Isso auxiliaria no empacotamento de monômeros de CTAB nas facetas (110), já que o alongamento do bastão coincide com a formação destas facetas [85]. Orendorff e Murphy [92] baseados em trabalhos de Liu e Guyot-Sionnet [93] e Pérez-Juste et al. [94] propuseram um mecanismo diferente, onde a prata é reduzida a  $\text{Ag}^0$  e se deposita nas faces (110), formando uma monocamada que recobre o bastão, impedindo a deposição de ouro e, conseqüentemente, o crescimento das faces laterais do nanobastão. A figura 2.5 [92] mostra um esboço deste mecanismo. De acordo com Pérez-Juste et al.,  $\text{AuCl}_4^-$  liga-se às micelas de CTAB, sendo reduzido por ácido ascórbico de  $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^+$ , para formar um complexo  $\text{AuCl}_2^-$ -CTAB [94]. Numa segunda etapa, na presença de  $\text{AgNO}_3$ , íons  $\text{Ag}^+$  são reduzidos na superfície do ouro, que depositam-se preferencialmente nas facetas laterais (110) e, mais lentamente nas pontas (100), inibindo o crescimento das laterais do bastão [92].

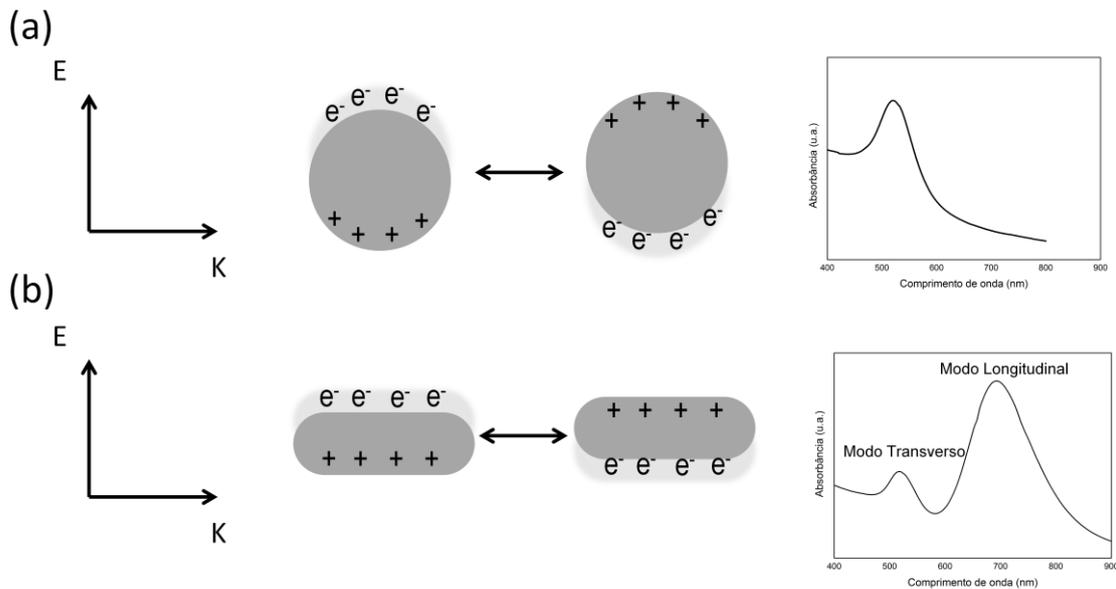


**Figura 2.5:** Esboço do mecanismo de crescimento dos nanobastões de ouro proposto por Orendorff e Murphy [92].

O método *seedless*, entretanto, não necessita de preparação de sementes, uma vez que a nucleação e o crescimento ocorrem na mesma solução. Neste caso,  $\text{NaBH}_4$  é usado como agente redutor forte na solução de crescimento (na ausência de semente), para aumentar a redução de  $\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^+$  [91].

A redução das dimensões de materiais à escala nanométrica acarreta no aparecimento de efeitos de quantização devido à restrição do movimento dos elétrons (confinamento). Isso leva à discretização dos níveis de energia, dependendo do tamanho da estrutura, cujo exemplo mais simples pode ser dado por uma partícula presa em um poço de potencial infinito. A estrutura de bandas em metais é resultado do arranjo periódico dos átomos, formando uma rede cristalina. A densidade de estados e o espaçamento entre os níveis de energia muda em função do tamanho.

As propriedades óticas de nanopartículas metálicas resultam de sua interação com a radiação eletromagnética incidente. Os metais possuem elétrons livres na banda de condução, influenciando a resposta destes materiais quando expostos a um campo eletromagnético. Quando expostos ao campo eletromagnético da luz, os elétrons da banda de condução oscilam coerentemente em ressonância com a frequência da luz incidente, fenômeno conhecido como ressonância de *plasmons* de superfície. A nuvem eletrônica se desloca em relação ao núcleo metálico, surgindo então uma força de atração restauradora (Coulomb) que faz com que os elétrons oscilem na superfície da partícula (fig. 2.6) [95, 96]. Esta oscilação coletiva resulta numa intensa absorção de luz, o que dá origem as cores das soluções coloidais [18]. As bandas de ressonância de *plasmons* são influenciadas por alguns fatores como a geometria das partículas (forma e tamanho) e as constantes dielétricas do metal e do meio [20].



**Figura 2.6:** Interação de nanoestruturas de ouro com a luz incidente. O campo elétrico ( $E$ ) da radiação (se propagando na direção  $K$ ) promove a oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução em relação ao núcleo positivo. A oscilação dos dipolos elétricos é ressonante com a luz incidente em uma frequência específica que depende da forma e tamanho. Comparação entre os modos de oscilação dos dipolos elétricos gerados pela interação de nanopartículas (a) e nanobastões (b) de ouro com radiação eletromagnética. Adaptado [20].

As propriedades óticas dos metais podem ser estudadas a partir da descrição da interação do metal com radiação eletromagnética proposta por Drude. A descrição a seguir está baseada no texto de Ashcroft e Mermin [97]. Drude aplicou a teoria cinética dos gases aos metais ao considerar que os elétrons num sólido tinham comportamento similar ao de um gás de partículas clássicas, se movendo contra um fundo de íons positivos fixos. Por meio desta consideração, Drude estudou a condutividade elétrica em metais. No modelo proposto, sob aplicação de um campo elétrico, os elétrons sofrem colisões com os íons da rede e, entre duas colisões, o elétron viaja em linha reta, por um tempo  $\tau$  antes de sofrer uma nova colisão. Sob ação de um campo elétrico dado por  $\vec{E}(t) = Re \{ \vec{E}(\omega) e^{-i\omega t} \}$ , os elétrons estarão sujeitos a uma força decorrente do campo elétrico e o movimento destes elétrons pode ser descrito pela equação de movimento (onde as colisões introduzem um termo dissipativo) [97]:

$$\frac{d\vec{p}}{dt} + \frac{\vec{p}(t)}{\tau} = -e\vec{E} \quad (2.7).$$

Procuramos uma solução da forma:  $\vec{p}(t) = \text{Re}\{p(\omega)e^{-i\omega t}\}$ . Assim, levando essa solução em 2.7, teremos:

$$-i\omega\vec{p}(\omega) = -\frac{\vec{p}(\omega)}{\tau} - e\vec{E}(\omega) \rightarrow \vec{p}(\omega) = -\frac{e\vec{E}(\omega)}{\frac{1}{\tau} - i\omega} \quad (2.8).$$

A densidade de corrente  $\vec{j}$  é dada por  $\vec{j} = -\frac{ne\vec{p}}{m}$ , onde  $n$  é a densidade de elétrons,  $m$  é a massa e  $e$  é a carga dos elétrons. Podemos escrever então:  $\vec{j}(t) = \text{Re}\{j(\omega)e^{-i\omega t}\}$ . Deste modo podemos obter uma relação entre  $\vec{j}$  e  $\vec{E}$ :

$$\vec{j} = \frac{\frac{ne^2}{m}\vec{E}(\omega)}{\frac{1}{\tau} - i\omega} = \sigma(\omega)\vec{E}(\omega) \quad (2.9).$$

onde  $\sigma(\omega)$  é a condutividade AC definida por  $\sigma(\omega) = \frac{ne^2\tau}{m} \frac{1}{(1-i\omega\tau)}$ .

Para conectarmos estes resultados às propriedades óticas do metal precisamos solucionar as equações de Maxwell para um meio material, na ausência de densidade de cargas induzidas ( $\rho = 0$ ) (sistema CGS):

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \quad (2.10a).$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{H} = 0 \quad (2.10b).$$

$$\vec{\nabla}_x \vec{E} = -\frac{1}{c} \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \quad (2.10c).$$

$$\vec{\nabla}_x \vec{H} = \frac{4\pi}{c} \vec{j} + \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad (2.10d).$$

Sabendo que  $\frac{\partial \vec{E}}{\partial t} = -i\omega\vec{E}$  e usando a propriedade  $\vec{\nabla}_x \vec{\nabla}_x \vec{E} = \vec{\nabla}(\vec{\nabla} \cdot \vec{E}) - \nabla^2 \vec{E}$ , a equação 2.10d (lei de Ampère-Maxwell) nos fornece uma equação que tem a forma de equação de onda:

$$-\nabla^2 \vec{E} = \frac{\omega^2}{c^2} \left[ 1 + \frac{4\pi i \sigma}{\omega} \right] \vec{E} \rightarrow -\nabla^2 \vec{E} = \frac{\omega^2}{c^2} \varepsilon(\omega) \vec{E} \quad (2.11).$$

de onde podemos identificar a função dielétrica complexa:

$$\varepsilon(\omega) = \left[ 1 + \frac{4\pi i \sigma}{\omega} \right] \quad (2.12).$$

Reescrevemos então a condutividade elétrica em função da frequência de *plasma* ( $\omega_p$ ), assumindo o limite para altas frequências ( $\omega\tau \gg 1$ ):

$$\varepsilon(\omega) = \left[ 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \right] \quad (2.13).$$

onde  $\omega_p^2 = \frac{4\pi n e^2}{m}$  é a frequência de *plasma*. Quando a função dielétrica é real e negativa ( $\omega < \omega_p$ ), as soluções para a equação 2.11 decaem exponencialmente no espaço, ou seja, a radiação não se propaga. Porém, se ( $\omega > \omega_p$ ), a função dielétrica será positiva e as soluções para 2.7 se tornam oscilatórias e a radiação se propaga pelo metal, o que é válido na condição de alta frequência para  $\omega = \omega_p$ . Uma consequência importante da equação 2.13 é que o gás de elétrons no metal pode sustentar oscilações de densidade de carga, uma vez que a densidade de corrente possui dependência oscilatória. Essa oscilação de densidade de carga pode ser entendida tomando como exemplo um elétron se deslocando por uma distância  $d$  em relação aos núcleos positivos fixos. A carga de superfície resultante dará origem a um campo constante, pois o sistema se comportará como um capacitor de placas paralelas. O campo resultante causa uma força restauradora que dá origem à oscilação da densidade de carga, chamada *plasmon*.

A resposta ótica de uma partícula metálica no regime quase-estático é válida quando o raio da partícula é muito menor que o comprimento de onda da onda incidente ( $R \ll \lambda$ ), de forma que o material sinta um campo elétrico uniforme a qualquer momento [96]. Neste regime o problema pode ser tratado como o de uma esfera metálica homogênea numa região de campo elétrico estático  $\vec{E} = E_0 \hat{z}$  [98]. O tratamento matemático não será mostrado aqui, mas podemos encontrar o campo elétrico por meio da resolução da equação de Laplace para os potenciais elétricos no interior,  $\Phi_{in}$  e exterior,  $\Phi_{ext}$  da esfera. As soluções para a equação de Laplace ( $\nabla^2 \Phi = 0$ ) em

coordenadas esféricas nos levam a uma expressão para o campo elétrico que possui duas contribuições: uma referente ao campo estático,  $\vec{E} = E_0 \hat{z}$ , e outra ao campo dipolar estático. Se o campo elétrico no qual a partícula está imersa é oscilante,  $\vec{E} = E e^{i\omega t} \hat{z}$ , os dipolos possuirão momento de dipolo também oscilante  $\vec{p} = p e^{i\omega t} \hat{z}$ . O tratamento detalhado pode ser encontrado no trabalho de Pereira [98].

Já a teoria apresentada por Mie descreve a solução das equações de Maxwell para uma partícula esférica submetida a uma onda eletromagnética plana. As descrições abaixo são baseadas nos trabalhos de Kelly et al. [95], Pereira [98] e Jain et. al [99]. É necessário um tratamento matemático envolvendo funções de Bessel para se obter as expressões da seção de choque de extinção ( $C_{ext}$ ) e espalhamento ( $C_{esp}$ ) para as nanopartículas de ouro. A seção de choque de extinção para uma partícula esférica homogênea é dada por [100]:

$$C_{abs} = 9 \frac{\omega}{c} \varepsilon_m^{3/2} V_0 \frac{\varepsilon_2}{[\varepsilon_1(\omega) + 2\varepsilon_m]^2 + \varepsilon_2(\omega)^2} \quad (2.14).$$

onde  $V_0$  é volume da partícula,  $\varepsilon_m$  e  $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$  são as funções dielétricas do meio e do material que compõe a partícula. Se a parte imaginária da função dielétrica for pequena ou fracamente dependente da frequência, a frequência de ressonância do dipolo é determinada pela condição  $\varepsilon_1(\omega) = -2\varepsilon_m$ .

No caso de partículas anisotrópicas, como nanobastões de ouro, as seções de choque de absorção  $C_{abs}$ , espalhamento  $C_{esp}$  e extinção  $C_{ext}$  podem ser derivados da Teoria de Gans [20]:

$$C_{abs} = \frac{2\pi}{3\lambda} \varepsilon_m^{3/2} V \sum_i \frac{\frac{\varepsilon_2}{(n_i)^2}}{(\varepsilon_1 + [(1 - n_i)/n_i]\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_2} \varepsilon_2 \quad (2.15).$$

$$C_{esp} = \frac{8\pi^3}{9\lambda^4} \varepsilon_m^2 V^2 \sum_i \frac{(\varepsilon_1 - \varepsilon_m)^2 + \frac{\varepsilon_2}{(n_i)^2}}{(\varepsilon_1 + [(1 - n_i)/n_i]\varepsilon_m)^2 + \varepsilon_2} \varepsilon_2 \quad (2.16).$$

$$C_{ext} = C_{abs} + C_{esp} \quad (2.17).$$

onde  $\lambda$  é o comprimento de onda da luz incidente,  $V$  é o volume de uma nanopartícula,  $\varepsilon_m$  é a constante dielétrica do meio e  $\varepsilon(\omega) = \varepsilon_1(\omega) + i\varepsilon_2(\omega)$  é a constante dielétrica do metal.  $n_i$  é o fator geométrico, definido por [20]:

$$n_a = \frac{2}{R^2 - 1} \left( \frac{R}{2\sqrt{R^2 - 1}} \ln \frac{R + \sqrt{R^2 - 1}}{R - \sqrt{R^2 - 1}} - 1 \right) \quad (2.18).$$

$$n_b = n_c = \frac{(1 - n_a)}{2} \quad (2.19).$$

$a, b$  e  $c$  são os três eixos da estrutura anisotrópica, com  $a > b = c$ . A razão de aspecto corresponde à  $a/b$ . Para esferas  $n_i = 1/3$ . As ressonâncias de *plasmon* ocorrem em [20]:

$$\varepsilon_1 = -[(1 - n_i)\varepsilon_m/n_i] \quad (2.20).$$

Na equação 2.20,  $i = a$  para o modo longitudinal e  $i = b, c$  para o modo transverso.

O espectro de absorção ótica de nanobastões de ouro apresenta dois modos ressonantes, dependendo da polarização da luz incidente: o modo transverso está associado à oscilação coletiva dos elétrons na direção transversa do nanobastão (eixo mais curto), induzindo absorção na região do visível, enquanto que o modo longitudinal associa-se à oscilação ao longo do maior eixo, o do comprimento do bastão de ouro, resultando numa banda de absorção em comprimentos de onda maiores [18]. O modo longitudinal pode ser ajustado de acordo com a variação da razão de aspecto (comprimento/largura) do nanobastão, indo do visível até o infravermelho próximo com o aumento da razão de aspecto [88]. O modo transverso não é sensível a essa variação.

De 2.21 podemos considerar a condição de ressonância para o modo longitudinal como [101, 102]:

$$\varepsilon_1 = -[(1 - n_a)\varepsilon_m/n_a] \quad (2.21).$$

De acordo com Link e coautores, a dependência da parte real da constante dielétrica do material é aproximadamente linear entre 500 - 800 nm, de forma que a relação abaixo pode ser obtida [101]:

$$\varepsilon_1(\lambda) = 34,66 - 0,07\lambda \quad (2.22).$$

Esboçando-se o gráfico de  $(1 - n_a)/n_a$  em função da razão de aspecto R (com R variando de 2 a 4) e linearizando, obtêm-se [103]:

$$\frac{1 - n_a}{n_a} = -2.95R + 3.75 \quad (2.23).$$

Combinando as equações 2.21 à 2.23, é possível determinar empiricamente uma relação linear entre o máximo da absorção do modo longitudinal e a razão de aspecto determinada dos nanobastões [102]:

$$\lambda_{max} = (53.71R - 42.29)\varepsilon_m + 495.14 \quad (2.24).$$

A partir da equação 2.24 é possível determinar também uma dependência da constante dielétrica com o tamanho. De acordo com Link e coautores, a mudança da constante dielétrica com a razão de aspecto do nanobastão significa que a estrutura da micela em torno dos bastões difere para cada tamanho de nanobastão [101].

A oscilação coletiva dos elétrons de superfície em nanopartículas metálicas sob aplicação de um campo eletromagnético (figura 2.6) resultam em amplificação de uma gama de processos óticos próximo à superfície da NP, como Espalhamento Raman Amplificado por Superfície (SERS), emissão fluorescente e fosforescente e geração amplificada de oxigênio singleto [28, 29, 104, 105].

Embora o efeito de amplificação via nanopartículas metálicas seja bem conhecido para aplicações em fluorescência (em inglês *Metal Enhanced Fluorescence* - MEF) [106, 107] este fenômeno não se limita apenas a fluorescência, mas também um aumento na geração de oxigênio singleto próximo à superfície metálica foi reportado na literatura [29, 104, 108-110]. Os estudos realizados utilizaram filmes metálicos em sua maioria, porém para aplicações biológicas estes materiais não são apropriados. Neste sentido, nanoestruturas metálicas, como nanopartículas esféricas e nanobastões, são mais adequadas. Mooi e Heyne sintetizaram nanopartículas do tipo *core-shell* (Ag-SiO<sub>2</sub>) covalentemente ligadas a um fotossensibilizador (Rosa de Bengala) para estudar a

geração de oxigênio singleto [110]. Planas et al. [111], utilizando um sistema também formado por nanopartículas *core-shell* (Ag-SiO<sub>2</sub>) ligadas a Rosa de Bengala, mostraram que há uma dependência na produção de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> em relação ao núcleo metálico da nanopartícula. Os autores observaram que o núcleo de Ag amplifica a produção de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por meio de aumento de absorção da luz e no decaimento radiativo do <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, resultando num aumento na emissão fosforescente e, conseqüentemente, em seus limites de detecção em sistemas biológicos.

A facilidade de mudança das bandas de absorção de nanoestruturas de ouro, bem como sua baixa citotoxicidade, tornam estas estruturas de grande interesse para aplicações em processos óticos e biológicos [10, 24]. Em TFD, nanopartículas de ouro (carregadas positivamente) conjugadas ao ácido-5-aminolevulínico têm sido usadas como carreadores para levar o FS (ácido-5-aminolevulínico) preferencialmente a células de fibrosarcoma acarretando em amplificação na geração de espécies reativas de oxigênio [31]. O primeiro relato de TFD mediada apenas por nanobastões de ouro foi feita por Vankayala e coautores [112]. Neste trabalho os autores demonstraram que nanobastões de ouro podem gerar oxigênio singleto e mediar TFD causando danos a células tumorais em ratos sob doses bem baixas de excitação por um fóton na região do infravermelho próximo (915 nm, <130 mW/cm<sup>2</sup>) na ausência de FS adicionais.

### 3 – TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.1 – Ressonância Paramagnética Eletrônica

A ressonância paramagnética eletrônica (RPE) é uma técnica espectroscópica aplicada a sistemas que apresentem elétrons desemparelhados, sendo por isso, muito utilizada no estudo de defeitos intrínsecos e extrínsecos de sólidos, bem como na investigação de metaloproteínas e radicais presentes em sistemas biológicos. A ressonância paramagnética eletrônica é uma técnica poderosa capaz de identificar concentrações muito baixas de espécies paramagnéticas ( $10^{13}$  -  $10^{15}$  cm<sup>-3</sup>). Em sólidos, a técnica nos fornece informação sobre sua estrutura, bem como a localização e simetria dos defeitos na rede e seu estado de valência. Em soluções, RPE pode fornecer informações sobre a dinâmica de moléculas em solventes, uma vez que alguns parâmetros importantes em RPE como a constante de acoplamento hiperfino são sensíveis ao ambiente local. Em um campo magnético externo os centros paramagnéticos adquirem momento magnético na direção do campo. Esse momento é em parte resultado da indução de dipolos, que surgem após a aplicação do campo magnético externo. Cada sistema com spin eletrônico total diferente de zero, tais como átomos, moléculas, radicais livres e outros sistemas com elétrons desemparelhados produzirá um espectro característico com parâmetros do Hamiltoniano de spin bem definidos. A análise detalhada dos espectros aliada à simulação, permite uma descrição das interações entre os átomos em cada estrutura e dos parâmetros do Hamiltoniano de spin do sistema. Uma descrição dos fundamentos teóricos e práticos para o entendimento desta técnica dada a seguir, será baseada nas obras de Carrington e McLachlan [113], Spaeth e coautores [114], Jackson e Hargreaves [115].

##### 3.1.1 – Propriedades Magnéticas de Elétrons e Núcleos

Para um sistema contendo centros paramagnéticos, o momento angular total possui contribuições do momento angular orbital e de spin. Na ausência da aplicação de um campo magnético externo **B**, o momento angular total dos centros está distribuído

aleatoriamente, de forma a anular-se. Com a aplicação do campo magnético externo, há um acoplamento entre os dipolos magnéticos e  $\mathbf{B}$ , produzindo assim, uma magnetização. Descreveremos a seguir cada uma das entidades físicas envolvidas nesse processo.

Cada elétron, descrevendo uma órbita em torno do núcleo, possui um momento angular devido a esse movimento. O momento de dipolo magnético ( $\boldsymbol{\mu}_L$ ) associado a esse momento angular ( $\mathbf{L}$ ) é dado por:

$$\boldsymbol{\mu}_L = -\beta\mathbf{L} \quad (3.1).$$

onde  $\beta = e\hbar/2m_e = 9,274015 \times 10^{-24} \text{ A}\cdot\text{m}^2$  representa o magnéton de Bohr,  $\hbar = 1,0546 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$  é a constante reduzida de Planck,  $e = 1,6022 \times 10^{-19} \text{ C}$  e  $m_e = 9,1093 \times 10^{-31} \text{ kg}$  são, respectivamente, a carga e a massa do elétron. Os elétrons também possuem um momento de dipolo ( $\boldsymbol{\mu}_S$ ) associado ao seu momento angular intrínseco, o spin eletrônico:

$$\boldsymbol{\mu}_S = -g\beta\mathbf{S} \quad (3.2).$$

$g$  corresponde ao fator  $g$  eletrônico com valor  $g_e = 2,002319$  para o elétron livre, e  $\mathbf{S}$  é o momento angular do spin eletrônico. O sinal negativo na equação 3.2 é devido à carga do elétron e indica que o momento de dipolo magnético e momento angular são antiparalelos.

A energia de interação entre o momento de dipolo magnético de spin eletrônico e o campo magnético externo  $\mathbf{B}$  é dada pelo Hamiltoniano de spin:

$$\mathcal{H} = -\boldsymbol{\mu}_S\mathbf{B} = g\beta\mathbf{S}\mathbf{B} \quad (3.3).$$

As grandezas  $\mathbf{S}$  e  $\mathcal{H}$  são operadores na mecânica quântica e representam os observáveis físicos dos sistemas (momento angular e energia). Esses operadores atuam sobre a função de onda que descreve o estado quântico do sistema. O momento angular é quantizado bem como o momento de dipolo magnético. Estes estados são caracterizados pelos números quânticos principal ( $n$ ) e orbitais ( $m_j$  e  $j$ ). O momento angular total do sistema,  $\mathbf{J}$ , inclui momento angular orbital,  $\mathbf{L}$  e momento angular de spin eletrônico  $\mathbf{S}$ , assim  $\mathbf{J}=\mathbf{L}+\mathbf{S}$ . Os operadores atuam em uma função fornecendo uma

autofunção associada a um autovalor. Escolhe-se geralmente a direção  $z$  para o campo magnético aplicado e esta será então a direção de quantização. Os operadores, ao atuarem na função de onda, irão fornecer seus autoestados e autovalores de acordo com as equações:

$$\mathcal{H}|\Psi\rangle = E|\Psi\rangle \quad (3.4).$$

$$J^2|\Psi\rangle = j(j+1)\hbar^2|\Psi\rangle \quad (3.5).$$

$$J_z|\Psi\rangle = m_j\hbar|\Psi\rangle \quad (3.6).$$

Na equação 3.4,  $E$  corresponde à energia de um dado estado,  $j$  pode assumir valores múltiplos de  $\frac{1}{2}$  e  $m_j$  assume valores  $-j, -j+1, \dots, j-1, j$ . Quando escrevemos um operador, seja ele  $\mathbf{S}$ ,  $\mathbf{L}$  ou  $\mathbf{J}$ , na base de seus autoestados, os autovalores desse operador fornecerão os valores esperados do observável físico, com autovalores dados pelas equações 3.4 - 3.6.

Por convenção adotamos o eixo  $z$  como direção para o campo magnético aplicado. Dada a energia de interação entre o momento de dipolo de spin e o campo magnético definida na equação 3.3, denominada interação Zeeman, na ausência de um campo magnético aplicado, um elétron livre apresenta dois níveis de energia degenerados, com  $\mathbf{S} = m_s\hbar$  e  $m_s$  possuindo  $2S+1$  valores possíveis. Logo, para um sistema com spin  $S=1/2$ , teremos dois estados associados aos números quânticos  $m_s = +1/2$  e  $m_s = -1/2$ , aos quais designaremos  $|\alpha_e\rangle$  e  $|\beta_e\rangle$ , respectivamente. Assim:

$$S_z|\alpha_e\rangle = \frac{\hbar}{2}|\alpha_e\rangle \quad (3.7).$$

$$S_z|\beta_e\rangle = -\frac{\hbar}{2}|\beta_e\rangle \quad (3.8).$$

A energia de cada nível (para elétron livre) é dada pelo Hamiltoniano de spin, de acordo com 3.4:

$$\mathcal{H}|\alpha_e\rangle = \frac{1}{2}g\beta B|\alpha_e\rangle \quad (3.9).$$

$$\mathcal{H}|\beta_e\rangle = -\frac{1}{2}g\beta B|\beta_e\rangle \quad (3.10).$$

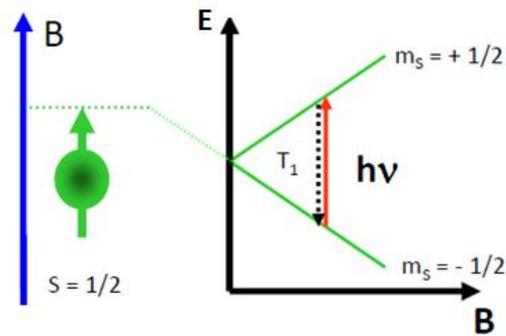
Com autovalores:

$$E = g\beta B m_s = \pm \frac{1}{2}g\beta B \quad (3.11).$$

A aplicação de um campo magnético oscilante perpendicular a  $\mathbf{B}$  induz transições entre os níveis de energia, causadas pela absorção de energia das ondas eletromagnéticas (com frequência  $\nu$ ) pelos elétrons, quando a condição de ressonância dada pela equação 3.12 for alcançada. Os níveis de energia terão sua degenerescência quebrada com a aplicação de campo magnético externo (figura 3.1). Nesse caso, a absorção de energia das ondas eletromagnéticas ocorrerá para um dado valor  $B_0$  do campo magnético.

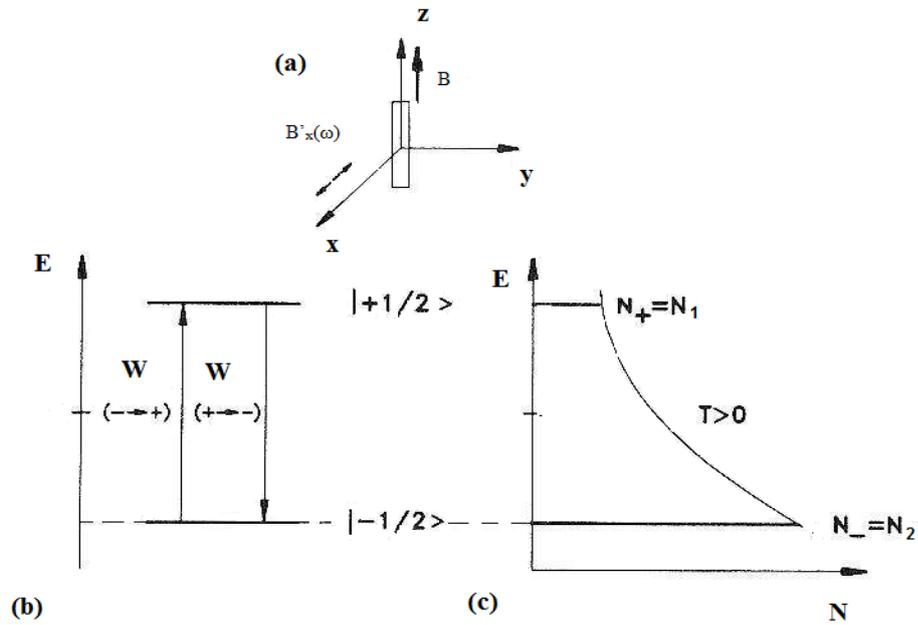
$$\Delta E = h\nu = g\beta B_0 \quad (3.12).$$

No caso em que o momento de dipolo magnético  $\boldsymbol{\mu}$  está sujeito a uma interação com um campo magnético e, sendo essa interação quantizada, dada por  $\mathcal{H} = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}$ , o momento de dipolo não poderá se orientar na direção do campo. O que ocorre é um movimento de precessão do momento de dipolo em torno do eixo associado ao campo magnético, onde o ângulo entre esses dois vetores e o módulo do vetor  $\boldsymbol{\mu}$  são mantidos constantes. Esse movimento de precessão é consequência do fato que o torque que age sobre o dipolo, dado por  $\boldsymbol{\tau} = \boldsymbol{\mu} \times \mathbf{B}$ , é perpendicular ao seu momento angular. A frequência angular de  $\boldsymbol{\mu}_L$  em torno do eixo paralelo ao campo magnético é conhecida como frequência de Larmor ( $\omega_L = \beta B$ ). Classicamente o fenômeno de ressonância paramagnética eletrônica ocorre quando o campo magnético externo provoca um torque no momento de dipolo eletrônico cuja frequência de oscilação (frequência de Larmor) é a mesma do campo magnético oscilante aplicado ( $\omega = 2\pi\nu$ ).



**Figura 3.1:** Separação entre os níveis de energia para um elétron com  $S = 1/2$  em um campo magnético  $\mathbf{B}$ . A quebra da degenerescência pelo campo magnético é chamado de Efeito Zeeman.

O experimento de ressonância consiste em promover transições entre os níveis desdobrados por meio da aplicação de um campo magnético estático  $\mathbf{B} \parallel \mathbf{z}$ , aplicando-se um campo magnético oscilante  $B_1 = B_{1x} \cos \omega t$ , com frequência fixa. No caso de experimentos RPE, esta frequência está na faixa de micro-ondas (9-10 GHz) cujo comprimento de onda é  $\sim 3,4$  cm, enquanto que para experimentos de ressonância magnética nuclear estas frequências são da ordem de MHz. O campo elétrico oscilante  $\mathbf{B}'$  é aplicado de forma que ele seja perpendicular à  $\mathbf{B} = B_0 \mathbf{z}$ .



**Figura 3.2:** (a) Representação do campo magnético estático e oscilante penetrantes na amostra. (b) Níveis de energia Zeeman para uma amostra paramagnética na presença de um campo magnético estático e as transições induzidas por micro-ondas. (c) Ocupação dos níveis de energia Zeeman no equilíbrio térmico para  $T > 0$  dada uma distribuição de Boltzmann. Retirado da referência [114].

Vemos na figura 3.2 as componentes do campo magnético estático e oscilante. Se  $B' \perp B$ , o campo magnético total terá componentes nas direções  $x$  e  $z$ . Portanto, o Hamiltoniano de spin será dado por:

$$\mathcal{H}(t) = g\beta[S_z B_z + S_x B_{1x} \cos \omega t] \quad (3.13).$$

No equilíbrio térmico e, sob influência do campo magnético externo, a população de spins é desdobrada entre os dois níveis Zeeman. A absorção ressonante pode ser detectada apenas se houver uma diferença na população entre os dois níveis de energia. Consideramos um sistema com  $N$  spins totais,  $N = N_\alpha + N_\beta$ , onde  $N_\alpha$  é o número de spins no nível mais alto e  $N_\beta$  é o número de spins no estado menos energético. A taxa de ocupação é dada pela distribuição de Boltzmann:

$$N_i = e^{-E_i/k_B T} \quad (3.14).$$

A diferença na população dos níveis será dada por:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = e^{\Delta E/k_B T} \quad (3.15).$$

onde  $\Delta E$  é a diferença de energia entre os dois níveis e obedece à condição de ressonância dada pela equação 3.15.  $T$  é a temperatura absoluta e  $k_B$  é a constante de Boltzmann.  $N_\alpha$  e  $N_\beta$  são as populações dos níveis caracterizados por  $m_s = 1/2$  e  $m_s = -1/2$ .

À temperatura ambiente e em um campo de 300 mT, sendo  $g\beta B \ll k_B T$ , a distribuição se torna:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{-\Delta E/k_B T} = e^{-g_e\beta B/k_B T} = 0,9986 \quad (3.16).$$

Portanto, à temperatura ambiente as populações dos níveis são quase iguais. Porém, o pequeno excesso no nível menos energético dá origem a uma absorção pouco intensa. Este processo é cessado quando os níveis estiverem igualmente populados, atingindo assim a condição chamada saturação. A condição de saturação depende de alguns parâmetros como a temperatura do sistema, potência da micro-onda (considerando-se que as probabilidades de transição são proporcionais à amplitude das ondas eletromagnéticas), e de processos de dissipação da energia do sistema, chamados de relaxação.

Se os elétrons são continuamente levantados do nível menos energético para o mais energético, as populações destes níveis se igualarão, e não haverá, portanto, mais absorção. Para que se mantenha o excesso de elétrons no nível mais baixo, os elétrons do nível mais alto liberam um quantum de energia  $h\nu$  para retornar ao estado fundamental. Essa liberação ocorre via processos de relaxação de spin, podendo ser de dois tipos: relaxação spin-rede e relaxação spin-spin.

No primeiro caso, essa energia é dissipada dentro da rede por meio de fônons, ou seja, energia vibracional (translacional e rotacional). O processo de relaxação spin-rede é caracterizado por um decaimento exponencial da energia em função do tempo.

Vamos analisar novamente a equação 3.15. Sendo  $g\beta B \ll k_B T$ , podemos expandir a exponencial:

$$e^{\Delta E/kT} = \left[ 1 + \left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)^1 + \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta E}{k_B T}\right)^2 - \dots \right] \approx 1 + \frac{\Delta E}{k_B T} \quad (3.17).$$

Vamos introduzir uma nova variável  $\Delta N = N_\beta - N_\alpha$  e expressar  $N_\alpha$  e  $N_\beta$  como:

$$N_\alpha = \frac{1}{2}(N - \Delta N) \quad (3.18a).$$

$$N_\beta = \frac{1}{2}(N + \Delta N) \quad (3.18b).$$

Assim:

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \frac{N + \Delta N}{N - \Delta N} = 1 + \frac{\Delta E}{k_B T} \quad (3.19).$$

De onde temos:

$$\frac{\Delta N}{N} = \frac{\Delta E}{2k_B T + \Delta E} \quad (3.20).$$

Para transições estimuladas, a taxa de variação na população do estado correspondente a  $m_s = -1/2$  é:

$$\frac{dN_\beta}{dt} = N_\alpha P_{\alpha\beta} - N_\beta P_{\beta\alpha} = P(N_\alpha - N_\beta) \quad (3.21).$$

onde  $P_{\alpha\beta}$  é a probabilidade de transição estimulada do estado  $|\beta\rangle$  correspondente a  $m_s = -1/2$  para o estado de  $m_s = 1/2$ ,  $|\alpha\rangle$ . Sob aplicação de um campo magnético oscilante  $\mathbf{B}'$ ,  $P_{\alpha\beta} = P_{\beta\alpha}$ , uma vez que  $|\langle \alpha | B' | \beta \rangle|^2 = |\langle \beta | B' | \alpha \rangle|^2$ , teremos:

$$\begin{aligned}\frac{dN_\beta}{dt} &= P(N_\alpha - N_\beta) = \left\{ P\left[\frac{1}{2}(N - \Delta N) - \frac{1}{2}(N + \Delta N)\right] \right\} \\ &= -P\Delta N\end{aligned}\quad (3.22).$$

Desta forma, podemos escrever:

$$\frac{d}{dt} \left\{ \frac{1}{2} (N + \Delta N) \right\} = \frac{1}{2} \frac{d(\Delta N)}{dt} = -P\Delta N \quad (3.23a).$$

$$\frac{d(\Delta N)}{dt} = -2P\Delta N \quad (3.23b).$$

A solução para a equação 3.23b é:

$$\Delta N = \Delta N(0)e^{-2Pt} \quad (3.24).$$

$\Delta N(0)$  é a diferença de população entre níveis no tempo  $t=0$ . Já a taxa de absorção da energia do campo,  $\frac{dE}{dt}$ , é dada por:

$$\begin{aligned}\frac{dE}{dt} &= N_\alpha P_{\alpha\beta} (E_\beta - E_\alpha) + N_\beta P_{\beta\alpha} (E_\alpha - E_\beta) = \Delta N P \Delta E \\ &= P \Delta E \Delta N(0) e^{-2Pt}\end{aligned}\quad (3.25).$$

As equações 3.24 e 3.25 estabelecem que a aplicação do campo ressonante resulta num decaimento exponencial na população dos níveis e estes níveis estarão, eventualmente, com populações iguais (saturação). A constante de tempo exponencial é chamada de  $T_1$ .  $T_1$  fornece a medida de tempo que a energia leva para ser transferida para outros graus de liberdade da rede. Esse processo de relaxação não radiativa, onde o elétron transfere energia para a rede ou vizinhança, é importante para que o fenômeno de RPE seja observado. Neste caso as probabilidades de transições não serão iguais ( $W_{\alpha\beta} \neq W_{\beta\alpha}$ ). De maneira análoga podemos escrever:

$$\frac{dN_\beta}{dt} = N_\alpha W_{\alpha\beta} - N_\beta W_{\beta\alpha} \quad (3.26).$$

Utilizando as equações 3.18 em 3.26 obtemos:

$$\frac{dN_\beta}{dt} = \frac{1}{2}(N - \Delta N)W_{\alpha\beta} - \frac{1}{2}(N + \Delta N)W_{\beta\alpha} = \frac{1}{2} \frac{d\Delta N}{dt} \quad (3.27).$$

$$\frac{d\Delta N}{dt} = -\Delta N(W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}) + N(W_{\alpha\beta} - W_{\beta\alpha}) \quad (3.28).$$

No equilíbrio térmico  $\frac{d\Delta N}{dt} = 0$ , e assim:

$$-\Delta N(W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha}) + N(W_{\alpha\beta} - W_{\beta\alpha}) = 0 \quad (3.29a).$$

$$\Delta N(0) = \frac{N(W_{\alpha\beta} - W_{\beta\alpha})}{(W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha})} \quad (3.29b).$$

Definimos desta forma, o tempo de relaxação spin-rede  $T_1$ :

$$T_1 = \frac{1}{(W_{\alpha\beta} + W_{\beta\alpha})} \quad (3.30).$$

$T_1$  pode ser entendido como o tempo necessário para que a energia absorvida pelos spins seja transferida para outros graus de liberdade, isto é, o tempo necessário para que o sistema de spin atinja o equilíbrio térmico. Valores altos para  $T_1$  (minutos ou até horas) indicam processos de relaxação lentos. Reescrevemos então a equação 3.28:

$$\frac{d\Delta N}{dt} = -\frac{(\Delta N - \Delta N(0))}{T_1} \quad (3.31).$$

Para uma descrição mais completa do sistema de spins, combinamos as equações 3.23b, que representa o efeito do campo oscilante, e 3.31, que representa o efeito da relaxação, de forma que:

$$\frac{d\Delta N}{dt} = -2P\Delta N - \frac{(\Delta N - \Delta N(0))}{T_1} \quad (3.32).$$

Na situação de equilíbrio térmico ( $\frac{d\Delta N}{dt} = 0$ ) e sob campo oscilante:

$$\Delta N = \frac{\Delta N(0)}{(1 + 2PT_1)} \quad (3.33).$$

O que nos permite descrever a taxa de absorção de energia do campo oscilante, combinando 3.33 e 3.25:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{\Delta N(0) P \Delta E}{(1 + 2PT_1)} \quad (3.34).$$

De acordo com 3.34, se  $2PT_1 \ll 1$ , é relativamente fácil evitar a saturação. A probabilidade de transição  $P$  é proporcional ao quadrado da amplitude do campo oscilante, de forma que o experimento opera-se geralmente com baixas potências para evitar saturação.

Agora é possível esclarecer que a largura e a forma de linha não podem ser representadas por uma função  $\delta$ . Devido à relaxação de spin, os estados de spin terão tempo de vida finito, resultando em um alargamento das linhas. A relaxação spin-rede não é o único mecanismo responsável por esse alargamento.

No segundo caso de relaxação, o equilíbrio inicial é alcançado sem que haja transferência de energia para a rede. Muitos processos que ocorrem em sólidos e líquidos possuem o efeito de variar as energias relativas dos níveis de spin, ao invés de seus tempos de vida. Esses processos são caracterizados pelo tempo de relaxação spin-spin ( $T_2$ ) e influenciam também a largura de linha.

Em geral,  $T_1 > T_2$  e a largura da linha dependerá, sobretudo, do valor de  $T_2$ .  $T_2$  está relacionado à distância spin-spin do sistema. Porém, quando  $T_1$  se torna muito pequeno, a linha pode sofrer um alargamento além do detectável. Em muitos casos, o resfriamento da amostra leva a um aumento de  $T_1$ , de forma a tornar o sinal detectável. Entretanto, se  $T_1$  é muito longo, os spins não tem tempo suficiente para voltar ao seu estado fundamental, ocorrendo então, a saturação do sistema. Nesse caso, a saturação pode ser evitada diminuindo-se a potência da micro-onda incidente na amostra. Os dois processos de relaxação contribuem para a largura da linha de ressonância ( $\Delta B$ ).

$$\Delta B \propto \frac{1}{T_1} + \frac{1}{T_2} \quad (3.35).$$

### 3.1.2 - Interação Hiperfina

O Hamiltoniano de um centro paramagnético deve conter a informação sobre todas as interações do sistema. Os termos deste Hamiltoniano para o caso mais geral são:

$$\mathcal{H} = \mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_{LS} + \mathcal{H}_{ZE} + \mathcal{H}_{HF} + \mathcal{H}_{FS} + \mathcal{H}_{SHF} + \mathcal{H}_{ZN} + \mathcal{H}_Q \quad (3.36).$$

onde  $\mathcal{H}_0$  corresponde à interação Coulombiana;  $\mathcal{H}_{LS}$  é a interação spin-órbita que mostra a interação entre o momento angular orbital e o spin eletrônico do defeito;  $\mathcal{H}_{ZE}$  e  $\mathcal{H}_{ZN}$  são termos da interação Zeeman eletrônica e nuclear respectivamente, causadas pela interação entre campo magnético externo e spins eletrônico e nuclear do defeito;  $\mathcal{H}_{HF}$  é o termo da interação hiperfina, que descreve o acoplamento de  $S$  com o spin nuclear  $I$  do defeito;  $\mathcal{H}_{FS}$  está relacionado à estrutura fina (que mostra a interação entre os spins eletrônicos do defeito para sistemas com  $S > 1/2$ ) e  $\mathcal{H}_{SHF}$  corresponde à estrutura super hiperfina responsável pelo acoplamento de spin eletrônico do defeito com o spin nuclear, agora dos átomos da vizinhança.  $\mathcal{H}_Q$  é o termo quadrupolar que descreve a interação entre os spin nucleares do próprio defeito (para sistemas com  $I > 1/2$ ).

O fator  $g$  por si só, não nos fornece uma informação sobre a estrutura dos compostos. Entretanto, o elétron desemparelhado é muito sensível ao seu ambiente local. Em espécies que possuem momento angular de spin nuclear  $I$ , há também a influência de um campo magnético local no elétron, o que altera as condições de ressonância. A interação entre o momento de spin eletrônico e o nuclear é chamada de interação hiperfina e ela nos fornece informações sobre a espécie química e o número de átomos ou moléculas do complexo. Daremos ênfase à interação hiperfina, que estará presente em nossas amostras.

O momento magnético associado a  $I$  é:

$$\boldsymbol{\mu}_I = g_n \beta_n I \quad (3.37).$$

Na equação 3.37,  $g_n$  é fator  $g$  nuclear (do próton),  $\beta_n = e\hbar/2m_p$  é o magnéton nuclear. Sendo a massa do próton cerca de 1840 vezes maior que a do elétron, o magnéton nuclear é aproximadamente três ordens de grandeza menor que  $\beta$ . Para o átomo de  $^1\text{H}$ , por exemplo,  $g_n = 5,58569$ . O momento magnético nuclear  $\boldsymbol{\mu}_I$  produz um campo magnético  $\boldsymbol{B}_I$ , que irá se somar ou se opor ao campo magnético aplicado  $\boldsymbol{B}$ , dependendo do alinhamento do núcleo.

Para um sistema com  $S = 1/2$  e  $I \neq 0$  teremos o termo relacionado à interação hiperfina somado ao Hamiltoniano Zeeman:

$$\mathcal{H} = g\beta\boldsymbol{B} \cdot \boldsymbol{S} - g_n\beta_n\boldsymbol{B} \cdot \boldsymbol{I} + \boldsymbol{A} \boldsymbol{S} \cdot \boldsymbol{I} \quad (3.38).$$

Nota-se que a interação hiperfina é descrita por um tensor de segunda ordem ( $\boldsymbol{A}$ ) (equação 3.39) que reflete o seu caráter anisotrópico para alguns sistemas. A anisotropia é consequência da mistura dos orbitais eletrônicos na vizinhança do núcleo em questão. Para um elétron num orbital puramente tipo “s”, o tensor se reduz a uma constante de acoplamento isotrópica ( $a$ ) que é proporcional à densidade eletrônica no sítio do núcleo. A constante característica da parte isotrópica do acoplamento hiperfino ( $a$ ) é conhecida como termo de contato de Fermi e é descrita pela equação 3.40a.

O tensor de acoplamento hiperfino pode ser dividido em duas partes: uma isotrópica,  $a$ , e outra anisotrópica  $\mathbf{T}$ . A parte anisotrópica é contabilizada pela matriz  $\mathbf{T}$  de traço nulo em 3.39 (nos eixos principais do sistema):

$$\mathbf{A} = \begin{bmatrix} A_1 & & \\ & A_2 & \\ & & A_3 \end{bmatrix} = \mathbf{1}a + \begin{bmatrix} T_{xx} & & \\ & T_{yy} & \\ & & T_{zz} \end{bmatrix} \quad (3.39).$$

$$a = \frac{8\pi}{3} g\beta g_n \beta_n |\psi(0)|^2 \quad (3.40a).$$

$$T_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi} g_e \mu_B g_N \mu_N \int \left( \frac{3x_i x_j}{r^5} - \frac{\delta_{ij}}{r^3} \right) |\psi(r)|^2 dV \quad (3.40b).$$

Os elementos do tensor  $\mathbf{T}$  ( $T_{xx}$ ,  $T_{yy}$  e  $T_{zz}$ ) estão, por sua vez, relacionados à interação dipolo-dipolo entre o elétron desemparelhado (em orbitais tipo “p”, “d” ou “f”) e o núcleo em questão. Eles são dados pela equação 3.40b, onde  $x_i$  e  $x_j$  descrevem as componentes do vetor posição do spin eletrônico e nuclear, respectivamente; e  $\psi(r)$  é a função de onda eletrônica. Vale lembrar que, na maioria dos casos, a função de onda do elétron é composta de uma mistura de orbitais que faz com que haja na interação hiperfina, tanto uma contribuição isotrópica devido ao Termo de Contato de Fermi, quanto devido à interação dipolar.

Em líquidos, a parte anisotrópica de  $\mathbf{A}$  tem valor médio igual a zero em função das reorientações moleculares rápidas devido ao movimento térmico. Assim, o Hamiltoniano associado à interação hiperfina terá a forma:

$$\mathcal{H}_{HF} = a_0 (S_x I_x + S_y I_y + S_z I_z) \quad (3.41a).$$

$$a_0 = \frac{1}{3} (A_1 + A_2 + A_3) \quad (3.41b).$$

Em geral, a interação hiperfina será anisotrópica devido à interação dipolar, exceto para sistemas onde a parte anisotrópica é tomada como uma média (por

exemplo, pelo movimento de moléculas em solução) [116]. Para orbitais  $s$ , o elétron tem uma probabilidade finita de residir no núcleo. Se o elétron está localizado em um orbital molecular que apresenta um nó no núcleo, a interação será puramente dipolar [116].

Assumindo um sistema isotrópico com  $S = 1/2$  e  $I = 1/2$  (átomo de hidrogênio, por exemplo), esta interação será responsável pelo desdobramento das linhas do espectro, tendo agora quatro níveis possíveis de energia. A interação do elétron desemparelhado com  $n$  núcleos equivalentes de spin  $I$ , produzirá  $(2nI+1)$  linhas espaçadas no espectro.

A interação hiperfina é uma ferramenta importante na identificação da espécie química, pois os elementos químicos são tabelados de acordo com seus isótopos que contem spin nuclear juntamente com o seu spin nuclear  $I$ , o fator  $g_N$  e abundância natural dos isótopos. Além disso, o acoplamento hiperfino fornece informação sobre o número de sítios em posições equivalentes na estrutura. Em *spin trapping*, os compostos formados possuem um grupo radicalar nitróxido ( $\text{NO}\cdot$ ) e a interação hiperfina é um importante parâmetro na determinação da espécie radicalar capturada.

Os termos mais energético na equação 3.36 são  $\mathcal{H}_0 + \mathcal{H}_{LS}$ , com energia de  $\sim 1$  eV. As demais interações possuem energias entre 0,1 eV (para o termo Zeeman eletrônico) e 0,1  $\mu\text{eV}$  (para o termo Zeeman nuclear). Podemos então, calcular as energias dos níveis eletrônicos do defeito por meio de teoria perturbativa. Desconsiderando os primeiros dois termos da equação 3.36 chegamos ao conceito do Hamiltoniano de spin. Vamos considerar  $\mathcal{H}_{ZE} = H_0$  o termo não perturbado, por possuir a contribuição mais significativa para o Hamiltoniano de spin. Desta forma, consideramos como perturbação  $H'$  os demais termos:

$$\mathcal{H} = H' + H_0 \quad (3.42).$$

A função de onda de spin poderá então ser expressa em termos dos autoestados  $|\varphi_n\rangle$  de  $H_0$  com autovalores  $\varepsilon_n$ . A perturbação  $H'$  provoca mudanças em  $|\varphi_n\rangle$  e  $\varepsilon_n$ , gerando novas funções de onda  $|\psi_n\rangle$  com energias  $E_n$  corrigidas por:

$$|\psi_n\rangle = |\varphi_n\rangle + \sum_{m \neq n} \frac{\langle \varphi_m | H' | \varphi_n \rangle | \varphi_m \rangle}{\varepsilon_m - \varepsilon_n} \quad (3.43).$$

$$|E_n\rangle = |\varepsilon_n\rangle + \langle\varphi_m|H'|\varphi_m\rangle + \sum_{m \neq n} \frac{|\langle\varphi_m|H'|\varphi_n\rangle|^2}{\varepsilon_m - \varepsilon_n} \quad (3.44).$$

A equação 3.44 fornece as correções em primeira e segunda ordem na energia do sistema. Esse tratamento deve ser considerado ao estudarmos o caso do radical nitróxido, uma vez que a interação hiperfina existente neste sistema pode ser tratada com uma pequena perturbação independente do tempo.

### 3.1.3 - O radical nitróxido (NO•)

Num radical nitróxido, a presença de um núcleo de  $^{14}\text{N}$  ( $I=1$ , abundância natural 99,63%) é responsável pelo desdobramento hiperfino presente nos espectros RPE destes radicais. O sistema é então composto por um elétron desemparelhado com spin  $S=1/2$ , interagindo com um núcleo de nitrogênio, cujo spin nuclear é  $I=1$ . O Hamiltoniano de spin que representa o sistema é dado pela equação 3.38. Se  $S=1/2$ , com a aplicação de um campo magnético externo numa direção z teremos duas configurações possíveis para o elétron desemparelhado, representados pelos estados  $|\alpha\rangle$  e  $|\beta\rangle$  associados aos números quânticos  $m_s = 1/2$  e  $m_s = -1/2$ , respectivamente. Temos que:

$$S_z|\alpha_e\rangle = \frac{1}{2}|\alpha_e\rangle \quad S_z|\beta_e\rangle = -\frac{1}{2}|\beta_e\rangle \quad (3.45).$$

De forma análoga, o spin nuclear, terá três estados possíveis  $|\alpha\rangle$ ,  $|\beta\rangle$ ,  $|\gamma\rangle$  associados aos números  $m_I = +1$ ,  $m_I = 0$ ,  $m_I = -1$ . Assim:

$$I_z|\alpha_n\rangle = +|\alpha_n\rangle \quad I_z|\beta_n\rangle = 0|\beta_n\rangle \quad I_z|\gamma_n\rangle = -|\gamma_n\rangle \quad (3.46).$$

As funções da base são escritas como o produto das partes eletrônica e nuclear, fornecendo seis estados possíveis para o sistema:

$$\begin{aligned}\Phi_1 &= |\alpha_e \alpha_N \rangle & \Phi_2 &= |\alpha_e \beta_N \rangle & \Phi_3 &= |\alpha_e \gamma_N \rangle \\ \Phi_4 &= |\beta_e \alpha_N \rangle & \Phi_5 &= |\beta_e \beta_N \rangle & \Phi_6 &= |\beta_e \gamma_N \rangle\end{aligned}\quad (3.47).$$

Em campo zero, estes estados estão degenerados, mas ao aplicarmos um campo magnético a degenerescência é quebrada e os níveis de energia se desdobram. O conjunto de funções em 3.47 é autoestado de  $H_0 = g_e \beta B S_z - g_n \beta_n B I_z$ , cujas energias serão dadas utilizando-se 3.4. Por exemplo, aplicando-se  $H_0$  ao estado  $\Phi_2 = |\alpha_e \beta_N \rangle$  teremos:

$$\begin{aligned}H_0 |\alpha_e \beta_N \rangle &= g \beta B S_z |\alpha_e \rangle |\beta_N \rangle - g_n \beta_n B |\alpha_e \rangle I_z |\beta_N \rangle = \\ &= \frac{1}{2} g \beta B |\alpha_e \beta_N \rangle + g_n \beta_n B |\alpha_e \beta_N \rangle\end{aligned}\quad (3.48).$$

Assim, as energias em ordem zero do sistema serão:

$$\varepsilon_1 = \frac{1}{2} g \beta B - g_n \beta_n B \Rightarrow \Phi_1 \quad (3.49a).$$

$$\varepsilon_2 = \frac{1}{2} g \beta B \Rightarrow \Phi_2 \quad (3.49b).$$

$$\varepsilon_3 = \frac{1}{2} g \beta B + g_n \beta_n B \Rightarrow \Phi_3 \quad (3.49c).$$

$$\varepsilon_4 = -\frac{1}{2} g \beta B - g_n \beta_n B \Rightarrow \Phi_4 \quad (3.49d).$$

$$\varepsilon_5 = -\frac{1}{2} g \beta B \Rightarrow \Phi_5 \quad (3.49e).$$

$$\varepsilon_6 = -\frac{1}{2} g \beta B + g_n \beta_n B \Rightarrow \Phi_6 \quad (3.49f).$$

Consideramos agora a interação hiperfina como perturbação  $H' = a \mathbf{S} \cdot \mathbf{I}$ , de forma que:

$$H' = a (S_z I_z + S_x I_x + S_y I_y) \quad (3.50).$$

As perturbações de segunda ordem são muito pequenas se comparadas ao termo de energia Zeeman, de forma que apenas as contribuições em primeira ordem serão consideradas. As perturbações de segunda ordem são introduzidas pelos termos  $a(S_x I_x + S_y I_y)$ . Em primeira ordem os termos associados a  $a(S_x I_x + S_y I_y)$  serão nulos. Aqui, utilizamos os operadores aniquilação ( $S^-, I^-$ ) e criação ( $S^+, I^+$ ) para descrever os operadores  $S_x, I_x, S_y, I_y$ . Eles são definidos como:

$$S^+ = S_x + iS_y \quad S^- = S_x - iS_y \quad (3.51).$$

Podemos, então reescrever  $(S_x I_x + S_y I_y) = \frac{1}{2}(S^+ I^- + S^- I^+)$ . A atuação destes operadores se dá:

$$\begin{aligned} S^+ |\alpha_e\rangle &= 0 & S^- |\alpha_e\rangle &= |\beta_e\rangle \\ S^+ |\beta_e\rangle &= |\alpha_e\rangle & S^- |\beta_e\rangle &= 0 \end{aligned} \quad (3.52).$$

Desta forma, os termos  $\langle \phi_n | a(I_x S_x + I_y S_y) | \phi_n \rangle = \langle \phi_n | \frac{a}{2}(S^+ I^- + S^- I^+) | \phi_n \rangle$  serão nulos na correção de primeira de ordem.

Os termos relevantes da correção serão associados à componente z. Utilizando a equação 3.45 - 3.47, teremos:

$$\begin{aligned} \langle \Phi_1 | a I_z S_z | \Phi_1 \rangle &= \frac{1}{2} a & \langle \Phi_4 | a I_z S_z | \Phi_4 \rangle &= -\frac{1}{2} a \\ \langle \Phi_2 | a I_z S_z | \Phi_2 \rangle &= 0 & \langle \Phi_5 | a I_z S_z | \Phi_5 \rangle &= 0 \\ \langle \Phi_3 | a I_z S_z | \Phi_3 \rangle &= -\frac{1}{2} a & \langle \Phi_6 | a I_z S_z | \Phi_6 \rangle &= \frac{1}{2} a \end{aligned} \quad (3.53).$$

As energias corrigidas serão, portanto:

$$E_1 = \frac{1}{2}g\beta B - g_n\beta_n B + \frac{1}{2}a \Rightarrow \Phi_1 = |\alpha_e\alpha_N \rangle \quad (3.54a).$$

$$E_2 = \frac{1}{2}g\beta B \Rightarrow \Phi_2 = |\alpha_e\beta_N \rangle \quad (3.54b).$$

$$E_3 = \frac{1}{2}g\beta B + g_n\beta_n B - \frac{1}{2}a \Rightarrow \Phi_3 = |\alpha_e\gamma_N \rangle \quad (3.54c).$$

$$E_4 = -\frac{1}{2}g\beta B - g_n\beta_n B - \frac{1}{2}a \Rightarrow \Phi_4 = |\beta_e\alpha_N \rangle \quad (3.54d).$$

$$E_5 = -\frac{1}{2}g\beta B \Rightarrow \Phi_5 = |\beta_e\beta_N \rangle \quad (3.54e).$$

$$E_6 = -\frac{1}{2}g\beta B + g_n\beta_n B + \frac{1}{2}a \Rightarrow \Phi_6 = |\beta_e\gamma_N \rangle \quad (3.54f).$$

No diagrama de níveis presente na figura 3.3 vemos as transições permitidas pelas regras de seleção (apenas transições entre estados com  $\Delta m_s = \pm 1$  e  $\Delta m_l = 0$  são permitidas). Como resultado teremos três transições em RPE, de mesma intensidade, com as energias de transição dadas por:

$$\Delta E_1 = \left( \frac{g\beta B}{2} - g_n\beta_n B + \frac{a}{2} \right) - \left( -\frac{g\beta B}{2} - g_n\beta_n B - \frac{a}{2} \right) \quad (3.55a).$$

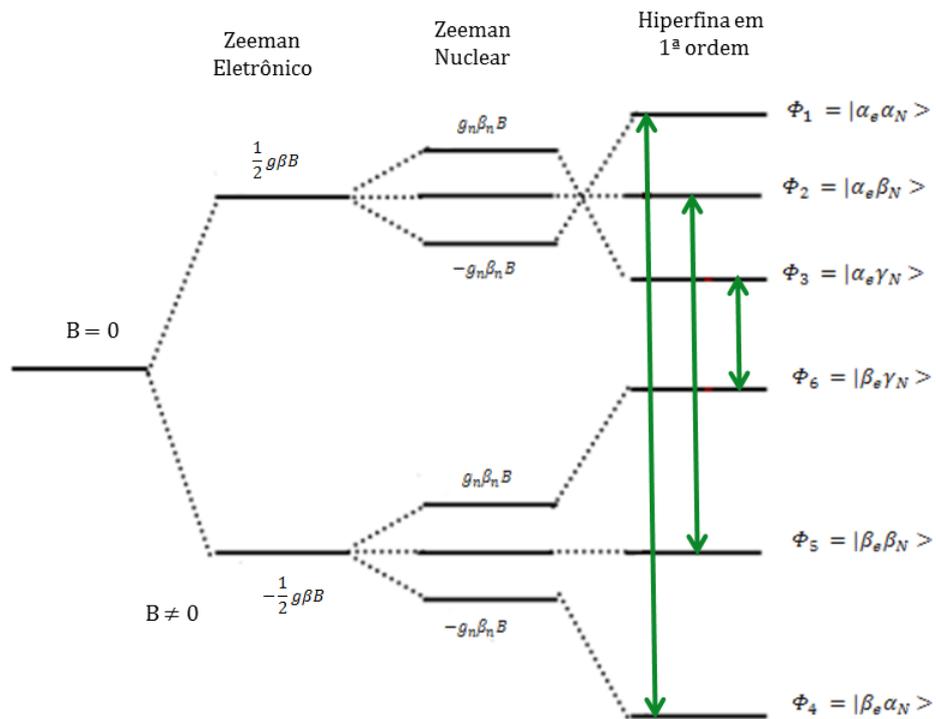
$$\Delta E_1 = g\beta B + a \Rightarrow |\Phi_4 \rangle \rightarrow |\Phi_1 \rangle$$

$$\Delta E_2 = \left( \frac{g\beta B}{2} \right) - \left( -\frac{g\beta B}{2} \right) = g\beta B \quad (3.55b).$$

$$\Delta E_2 \Rightarrow |\Phi_5 \rangle \rightarrow |\Phi_2 \rangle$$

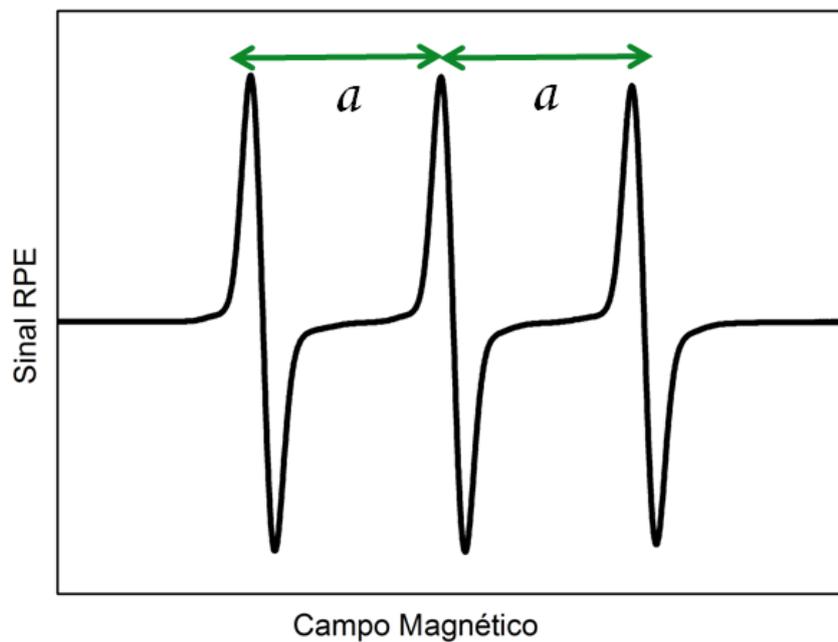
$$\Delta E_3 = \left( \frac{g\beta B}{2} + g_n\beta_n B - \frac{a}{2} \right) - \left( -\frac{g\beta B}{2} + g_n\beta_n B + \frac{a}{2} \right) \quad (3.55c).$$

$$\Delta E_3 = g\beta B - a \Rightarrow |\Phi_6 \rangle \rightarrow |\Phi_3 \rangle$$



**Figura 3.3:** Desdobramento dos níveis de energia para espécie com  $S = \frac{1}{2}$  e  $I = 1$  na presença de campo magnético.

O espectro RPE de um nitróxido em solução aquosa é mostrado na figura 3.4.



**Figura 3.4:** Espectro RPE do radical nitróxido TEMPOL em solução aquosa.

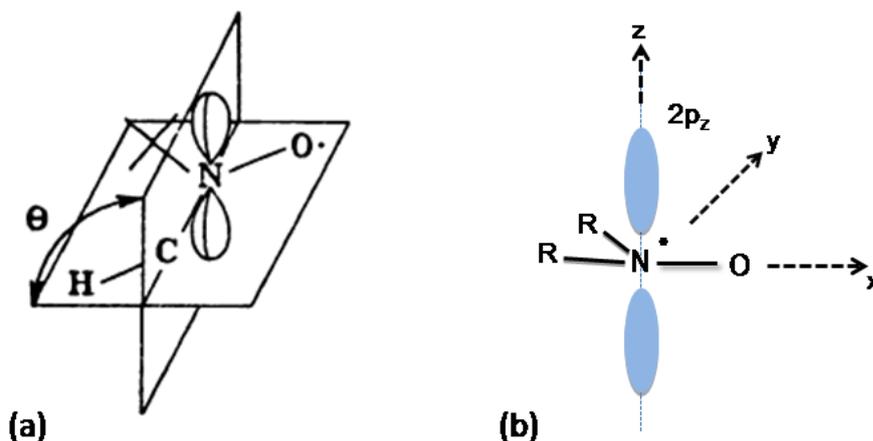
O valor aproximado da constante de acoplamento hiperfino  $a$  pode ser obtido a partir do espectro, medindo-se a distância pico a pico.

Nos nitróxidos, de acordo com a teoria dos orbitais moleculares, o elétron desemparelhado localiza-se no orbital  $\pi$ , formado pelos orbitais atômicos do nitrogênio e oxigênio, mais especificamente no orbital antiligante  $\pi_z^*$ , que será descrito como orbital  $2p_z$  por simplicidade (figura 3.5) [117]. O elétron desemparelhado irá interagir com os núcleos de N e O, mas apenas o N possui spin nuclear diferente de zero, influenciando o espectro de RPE.

Janzen [118] também discute a importância de se avaliar a dinâmica dos grupos ligados ao grupo NO. De acordo com o autor, alguns grupos da molécula podem rotacionar livremente, enquanto outros não. No caso do nitróxido de metil-terc-butilo tanto o grupo metil quanto terc-butilo podem rotacionar livremente na molécula. Substituindo-se um átomo de H na posição  $\beta$  (figura 3.5a), por grupos metil, benzil ou 1-feniletil, nota-se uma redução nos valores da constante hiperfina para o  $H_\beta$  (11.3, 8.25 e 3.73 G, respectivamente). Como teoricamente os grupos são livres para rotacionar, concluímos que a função nitróxido de terc-butil apresenta um impedimento à rotação dos grupos ligados a ela. Desta forma, espera-se que o radical capturado influencie a rotação de todos os grupos ligados ao grupo NO, o que inclui o  $H_\beta$ , de tal maneira que o desdobramento seja único para cada tipo de radical capturado. Além disso, a magnitude da constante de acoplamento hiperfino para o  $H_\beta$  depende do ângulo diedral entre a ligação C-H e o orbital p no N (figura 3.5a). Se este ângulo é grande o desdobramento é pequeno e, inversamente, se o ângulo é pequeno, o valor de  $a$  é grande. A relação entre esses parâmetros é dada pela equação 3.56 [118]:

$$a_\beta^H = [B_0 + B(\cos \theta)^2]\rho_n \quad (3.56).$$

onde  $\theta$  é o ângulo diedral,  $\rho_n$  é a densidade de spin no átomo de nitrogênio do grupo NO,  $B$  é uma constante de proporcionalidade para cada radical e  $B_0$  é a mesma constante se  $\theta = 90^\circ$ . Para nitróxidos  $B_0 \approx 0$ ,  $\rho_n = 0.5$  e  $B = 52G$ .



**Figura 3.5:** (a) Projeção que define o ângulo diedral  $\theta$ . Extraído da referência [118]. (b) Orientação da molécula do nitróxido no referencial do laboratório com os eixos principais associados aos tensores  $g$  e  $A$  em caso de anisotropia [117].

A interação hiperfina mapeia a função de onda no núcleo, tendo caráter altamente anisotrópico devido à localização do elétron desemparelhado num orbital  $p$ . Analisando a figura 3.5 (b) podemos definir os eixos principais do tensor  $\hat{A}$  do acoplamento hiperfino: o eixo principal  $z$  está o paralelo ao orbital  $2p_z$ , o eixo  $x$  encontra-se paralelo ao eixo da ligação N-O. Por meio das variações da constante de acoplamento hiperfino, podemos obter informações sobre o deslocamento da função de onda no núcleo de N, em função da polaridade do solvente em que a molécula do nitróxido se encontra [119].

A polaridade dos solventes é um fator importante na obtenção dos valores da constante  $a$ . Mudanças na polaridade dos solventes podem gerar efeitos mais significativos no desdobramento hiperfino que mudanças na estrutura do aduto [42]. O aumento na polaridade do solvente leva a um aumento no valor das constantes hiperfinas, sobretudo do átomo de N, devido ao aumento da densidade de spin neste átomo [117]. A constante de acoplamento hiperfino isotrópica em meio aquoso pode ser definida por  $a_{iso} = \frac{1}{3} (A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$  [117]. Além disso, a forma de linha dos espectros de RPE em soluções fornece informação sobre a dinâmica de rotação do centro paramagnético. O efeito da restrição do movimento do radical em solução pode ser observado pela variação das larguras de linhas e intensidades relativas das três

linhas em nitróxidos [117]. Mais detalhes sobre o assunto podem ser encontrados na referência [120].

### 3.1.4 - Regra de seleção e taxas de transição em RPE

Em RPE a aplicação do campo magnético estático é responsável pela quebra da degenerescência dos estados de spin. As transições estimuladas são causadas pela aplicação de um campo magnético oscilante na direção x, digamos,  $B_1 = 2B_{1x} \cos \omega t$ .

Transições onde ocorrem mudanças dos estados de spin eletrônico, por exemplo,  $|\alpha_e \alpha_n \rangle \rightarrow |\beta_e \alpha_n \rangle$  são chamadas transições de RPE, enquanto as transições onde ocorre mudança dos estados de spin dos núcleos ( $|\alpha_e \alpha_n \rangle \rightarrow |\alpha_e \beta_n \rangle$ ) são chamadas de transições de ressonância magnética nuclear (RMN). Há ainda transições onde ambos os estados de spin mudam. Transições do tipo  $|\alpha_e \beta_n \rangle \rightarrow |\beta_e \alpha_n \rangle$  possuem baixa probabilidade de ocorrência, sendo chamadas de transições proibidas.

Um campo oscilante aplicado ao longo da direção z apenas modula os níveis de energia do sistema não promovendo absorção de energia. Portanto, o campo oscilante aplicado deve ser perpendicular ao campo estático  $\mathbf{B}$ . Assim, o Hamiltoniano de spin possuirá um termo de perturbação dependente do tempo:

$$\begin{aligned} \mathcal{H} &= g\beta B S - g_n \beta_n B I = \\ &= g\beta B S_z B_z + 2(g\beta S_x B_{1x} - g_n \beta_n I_x B_{1x}) \cos \omega t \end{aligned} \quad (3.57).$$

A perturbação dependente do tempo no centro paramagnético será:

$$V(t) = 2(g\beta S_x B_{1x} - g_n \beta_n I_x B_{1x}) \cos \omega t = 2V \cos \omega t \quad (3.58).$$

Seja  $P_{nm}$  a probabilidade de transição do nível  $n$  para o nível  $m$ , causada por uma perturbação dependente do tempo  $V(t)$  aplicada ao sistema.  $P_{nm}$  é dada por:

$$P_{nm} = \frac{2\pi}{\hbar^2} |\langle n|V|m\rangle|^2 \delta(E_m - E_n - hv) \quad (3.59).$$

Na equação 3.59 o elemento da matriz  $\langle n|V|m\rangle$  exige que  $V$  se acople a todos os estados  $m$  e  $n$ . Devemos encontrar quais os termos da matriz  $V$  são nulos ou não. A função Delta de Dirac impõe a condição de que  $P_{nm}$  seja nula a menos que a diferença de energia  $E_m - E_n$  seja igual a  $hv$ . A solução detalhada da teoria de perturbação dependente do tempo que leva a 3.59 pode ser encontrada no capítulo 12 da referência [121].

Como as transições eletrônicas são causadas pela interação do campo  $B_1$  com o spin do elétron, podemos omitir a parte referente ao spin nuclear em 3.57. Então:

$$P_{nm} = \frac{2\pi}{\hbar^2} (g\beta B_{1x})^2 |\langle n|S_x|m\rangle|^2 \delta(E_m - E_n - hv) \quad (3.60).$$

Podemos escrever o operador  $S_x$  em função de  $S^+$  e  $S^-$ :

$$S_x = \frac{1}{2}(S^+ + S^-) \quad (3.61).$$

Os elementos da matriz de  $V$  terão então a forma:

$$\begin{aligned} \langle \alpha_e \alpha_n | S_x | \beta_e \alpha_n \rangle &= \frac{1}{2} \langle \alpha_e \alpha_n | (S^+ + S^-) | \beta_e \alpha_n \rangle = \\ &= \frac{1}{2} \langle \alpha_e | (S^+ + S^-) | \beta_e \rangle \langle \alpha_n | \alpha_n \rangle = \frac{1}{2} \langle \alpha_e | (S^+) | \beta_e \rangle = \frac{1}{2} \end{aligned} \quad (3.62).$$

É conveniente expressarmos a probabilidade em termos de uma função genérica para a largura de linha  $g(\omega)$  e não da função  $\delta$ . A probabilidade de transição será dada por 3.63a com forma de linha descrita pela função Lorentziana  $g(\omega)$  (para sistemas em soluções) (3.63b):

$$P_{nm} = \frac{\pi}{2\hbar^2} (g\beta B_{1x})^2 g(\omega) \quad (3.63a).$$

$$g(\omega) = \frac{T_2}{\pi} \frac{1}{1 + T_2^2(\omega - \omega_0)^2} \quad (3.63b).$$

Os únicos termos não nulos na matriz de  $V(t)$  são termos similares ao da equação 3.62, onde há mudança apenas no estado de spin eletrônico. Os demais termos desaparecem e as transições correspondentes são ditas proibidas em RPE. Resumindo-se, chegamos às regras de seleção para transições em RPE:

$$\Delta m_s = \pm 1, \Delta m_l = 0 \quad (3.64).$$

### 3.1.5 - *Spin trapping* ou metodologia de captura de spins

Radicais livres são de grande interesse em sistemas biológicos, pois estão envolvidos em muitos aspectos relativos ao metabolismo e desempenham um papel importante em muitas doenças degenerativas e envelhecimento. A molécula de oxigênio, por ser um aceitador, participa de reações onde há transferência de cargas aceitando elétrons para dar origem a uma série de espécies parcialmente reduzidas, chamadas de EROs [122]. A detecção direta de radicais em reações bioquímicas é um processo difícil, uma vez que estes radicais possuem tempos de vida relativamente curtos ou muitas vezes as concentrações produzidas nas reações estão abaixo do limite de detecção dos espectrômetros de RPE ( $\sim 10^{-8}$  M). Além disso, alguns radicais possuem um tempo de relaxação de spin muito curto à temperatura ambiente ou fisiológica, o que provoca alargamento da linha de RPE, tornando o sinal não detectável. Como exemplos destes podemos citar os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ) [42]. A ressonância paramagnética eletrônica pode ser considerada uma das técnicas mais confiáveis e menos ambígua para a identificação e quantificação de radicais livres [42, 123]. A técnica de captura de spins (*spin trapping*) surge para ajudar a solucionar este problema.

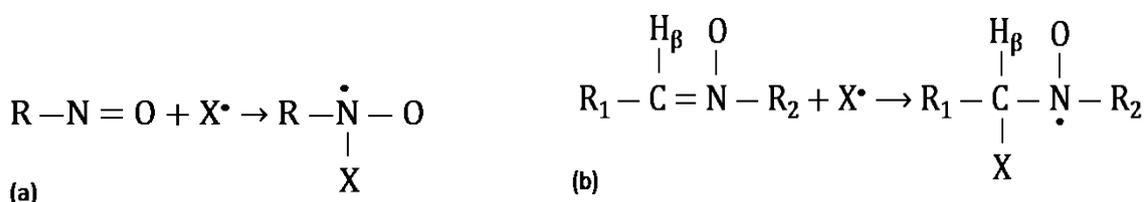
Desenvolvido por Janzen e Blackburn [124] o método baseia-se numa reação de adição entre uma espécie radicalar e um composto diamagnético denominado *spin trap*.

Nessa metodologia, utiliza-se um composto diamagnético (*spin trap*) que é capaz de se ligar a um radical de interesse, formando um produto paramagnético estável e de tempo de vida relativamente longo para ser detectado por RPE, conhecido por aduto de spin (*spin adduct*). Estes adutos são geralmente do tipo nitróxido. Nitróxidos são radicais relativamente estáveis porque o elétron desemparelhado em sua estrutura é estabilizado por ressonância [125]. O elétron desemparelhado ocupa o orbital  $2p_z$ , isto é, um orbital  $\pi$  que está delocalizado sobre, pelo menos dois átomos, N e O [125]. Se os grupos substituintes em ambos os lados do átomo de N contém ligações  $\pi$ , a delocalização dos elétrons  $\pi$  se espalha por toda estrutura molecular, de forma que o radical ganha estabilidade considerável [125]. A ressonância estrutural no nitróxidos é possível porque os átomos de N e O são elementos vizinhos que possuem números ímpar e par de elétrons de valência [125]. Se a concentração dos adutos gerados é alta o suficiente, a detecção do radical por ser quantificada. A análise das constantes de acoplamento hiperfino, como intensidade e multiplicidade das linhas no espectro, fornece informação específica sobre a espécie capturada. A maior parte dos *spins traps* é solúvel em água e solventes polares e podem capturar vários tipos de radicais. Por esta razão, atribuir corretamente o aduto de spin ao radical capturado é um dos maiores desafios da técnica [118].

Existem dois tipos principais de compostos orgânicos usados como *spin traps*: nitroso e nitronas. Nos compostos do tipo nitroso, o radical  $X^\bullet$  se liga diretamente ao átomo de nitrogênio do grupo NO, ficando mais próximo do elétron desemparelhado (figura 3.6a). Assim, a informação do radical capturado é obtida mais facilmente do espectro. Porém alguns destes compostos possuem certas desvantagens, como instabilidade de alguns adutos, além de sofrerem fotodegradação e não serem termicamente estáveis (acima da temperatura ambiente podem gerar radicais secundários) [126]. Como exemplo, podemos citar o MNP (*2-methyl-2-nitrosopropane*).

Os compostos do tipo nitrona (figura 3.6(b)) possuem cadeia aberta ou cíclica. São os compostos mais utilizados na captura de radicais presentes em sistemas biológicos como  $O_2^\bullet$  e  $OH^\bullet$ . Neste caso, o radical se liga ao átomo de carbono adjacente ao nitrogênio do grupo NO ( $C_\alpha$ ). Desta forma, alguma informação é perdida, pois o radical se encontra mais distante do orbital que contém o elétron desemparelhado.

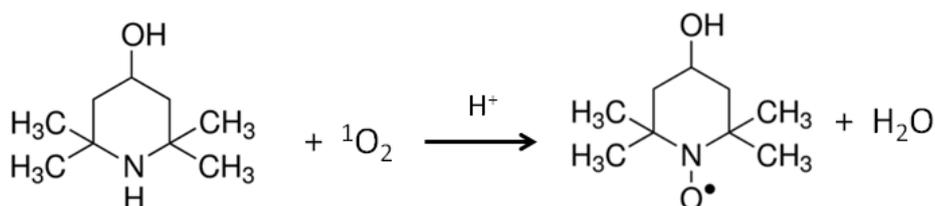
Entretanto, a maioria dos *spin traps* nitrona, como PBN (*N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitrone*) e DMPO (*5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide*), possuem um átomo de hidrogênio na posição  $\beta$ , o que fornece informação sobre o radical capturado.



**Figura 3.6:** (a) Interação de *spin trap* do tipo nitroso com radical X e (b) interação de um *spin trap* nitrona com espécie radicalar, ambos resultando num radical nitróxido.

Se os grupos ligados à molécula do nitróxido possuem spin nuclear, mas estes grupos estão muito distantes do orbital que contém o elétron, o espectro consistirá em três linhas (fig. 3.4). Núcleos com spin que estão a mais de três ligações de distância do grupo  $\text{NO}\cdot$  geralmente não contribuem para o espectro de RPE <sup>118</sup>. No caso de *spin traps* nitrona, por exemplo, há um átomo de hidrogênio numa posição  $\beta$  e o elétron desemparelhado interage com este núcleo de spin  $I = \frac{1}{2}$ . O espectro mostrado na figura 3.4 é então desdobrado em seis linhas.

Para detectar espécies reativas de oxigênio, empregamos o uso de dois compostos distintos. O primeiro deles, TEMP (*2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidino*) é um composto usado para detecção de oxigênio no estado singleto <sup>123, 127</sup>. A molécula de oxigênio em seu estado excitado singleto é diamagnética, entretanto, ao ligar-se ao composto TEMP, a molécula do TEMP se torna um radical do tipo nitróxido (figura 3.7). Também usamos PBN para detectar radicais hidroxila e/ou superóxido.



**Figura 3.7:** Interação do *spin trap* TEMP com oxigênio singleto, resultando num radical nitróxido.

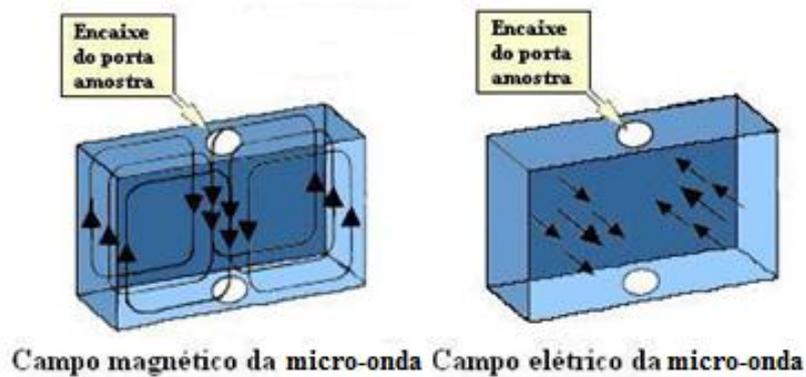
A quantificação dos adutos de spin é feita utilizando-se uma amostra padrão de concentração conhecida e cuja estrutura química característica seja similar ao grupo nitróxido, em nosso caso. O composto *4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl* (TEMPOL) é muito conhecido por ser um radical nitróxido estável. A quantificação das espécies pode ser feita por meio da dupla integração do sinal RPE e comparação com a área da amostra padrão de TEMPOL. Alguns cuidados devem ser tomados durante o processo de quantificação. Alguns parâmetros experimentais devem ser mantidos constantes durante a quantificação, como utilizar o mesmo solvente para o padrão e as demais amostras, mesma modulação do campo magnético (que deve ser pequena o suficiente para resolver a interação hiperfina no espectro e da ordem de cerca de 1/3 da largura de linha), mesma temperatura, mesma potência de micro-ondas e evitar saturação dos sinais (a intensidade do sinal RPE é proporcional à raiz da potência de micro-ondas que incide na cavidade).

### 3.1.6 – Espectrômetro de RPE

A seguir descreveremos os princípios gerais para o funcionamento de um espectrômetro básico de RPE e seus componentes.

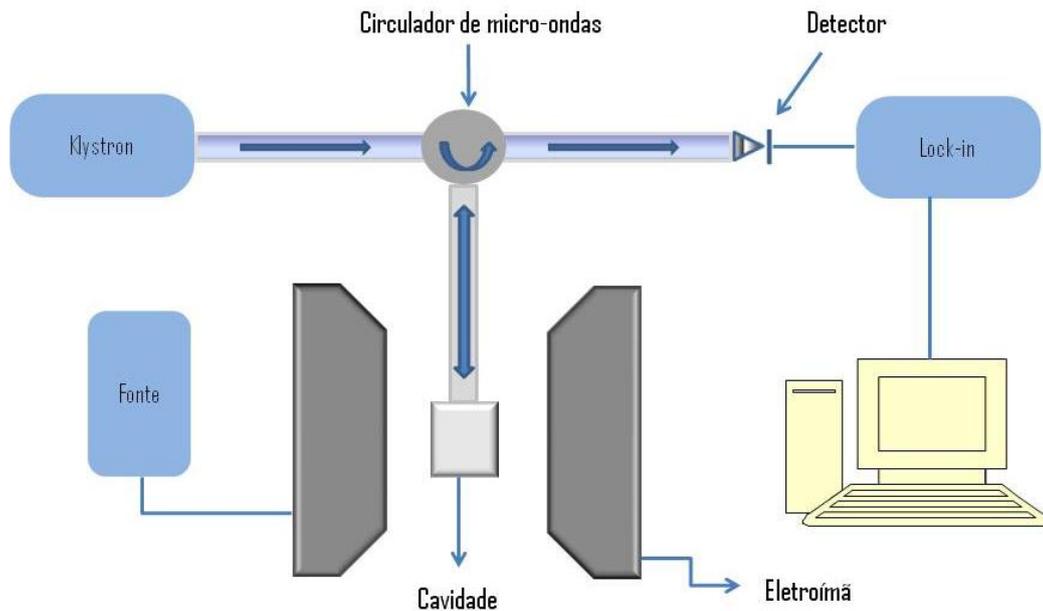
O espectro de RPE é um diagrama em que a derivada primeira da absorção da radiação de micro-ondas em relação ao campo magnético é traçada em função da intensidade do campo magnético. Num experimento de RPE por questões técnicas, a medida é realizada variando-se o campo magnético estático e mantendo-se fixa a frequência da micro-onda. A micro-onda é levada por meio de guias de onda retangulares ou cabos coaxiais especiais até a cavidade ressonante, na qual a amostra é posicionada no centro. As micro-ondas são produzidas por uma fonte de micro-ondas, por exemplo, um *Klystron*, com frequência na faixa de 9,4 GHz (banda X). A micro-onda (com frequência  $\nu$ ) incide na cavidade de modo que o campo magnético das ondas eletromagnéticas geradas ( $B_x(\nu)$ ) seja perpendicular ao campo magnético estático  $B$ , paralelo ao eixo z por convenção aqui (figura 3.2).

A cavidade ressonante é uma caixa metálica oca, retangular ou cilíndrica, cujas dimensões são comparáveis ao comprimento de onda da micro-onda. A cavidade é construída de modo que ondas estacionárias se formem em seu interior, assim ela armazena a energia da micro-onda e, portanto, na frequência de ressonância da cavidade, não há reflexão das micro-ondas para o exterior. O campo magnético oscilante das micro-ondas ( $\mathbf{B}_1$ ) é perpendicular ao campo estático  $\mathbf{B}$  gerado por um eletroímã e tem seu valor máximo no centro da cavidade (figura 3.8), onde posicionamos as amostras. Este eletroímã, por sua vez, é alimentado por uma fonte de corrente capaz de produzir campos magnéticos da ordem de  $\sim 1$  T.



**Figura 3.8:** Representação dos modos ressonantes dos campos magnético e elétrico numa cavidade retangular.

Na figura 3.9 vemos os componentes principais de um dos espectrômetros de RPE localizados no laboratório de Ressonância Magnética do Departamento de Física da UFMG.



**Figura 3.9:** Componentes principais de um espectrômetro de RPE.

A fonte de micro-ondas gera o campo magnético oscilante conduzido até a cavidade por meio de guias de onda. A potência das micro-ondas pode ser variada usando-se um atenuador, cuja função é bloquear o fluxo da radiação incidente na cavidade. O atenuador é responsável por controlar a potência de micro-onda que chega a cavidade. Um circulador permite o direcionamento do fluxo das micro-ondas. As micro-ondas refletidas não voltam para a fonte, elas são direcionadas para o diodo detector. O diodo detector converte a potência da micro-onda em corrente elétrica. Para manter acopladas a frequência das micro-ondas e a frequência de ressonância da cavidade usa-se um controle automático de frequência (CAF). O CAF mantém estas frequências iguais modulando a micro-onda com um sinal de 8 kHz, cuja fase será comparada por um amplificador *lock-in* com a fase do sinal refletido. Se os sinais estiverem fora de fase, o sistema irá gerar uma voltagem proporcional à diferença de fase, corrigindo a frequência da micro-onda. Esse procedimento é realizado sempre que se introduz uma nova amostra na cavidade, pois esse processo altera o acoplamento e a fase das ondas refletidas.

A qualidade do sinal detectável pode ser melhorada utilizando-se uma modulação de 100 kHz para o campo estático **B**. Esse sinal é detectado por um amplificador *lock-in*

que compara o sinal da onda refletida em fase com o sinal de referência, amplificado e modulado. Quando o sistema atinge a condição de ressonância, isto é, quando o valor do campo  $\mathbf{B}$  equivale à diferença de energia  $h\nu$  entre dois níveis de spin, a amostra absorve radiação e o acoplamento é destruído, refletindo num aumento no sinal refletido. Essa mudança é detectada pelo diodo e pelo amplificador *lock-in* que gera uma tensão proporcional a essa variação, enviando-a ao computador onde a medida é salva. O sinal detectado, devido à absorção, possui geralmente a forma de uma função Gaussiana ou Lorentziana, mas devido à modulação de 100 kHz do campo, o que é visualizado é a derivada primeira da absorção.

A intensidade do sinal de RPE é proporcional ao número de transições (proporcional à concentração de spins) entre o estado fundamental e um nível mais energético do centro paramagnético. A diferença na população desses níveis pode ser controlada por dois fatores: a temperatura de medida e a potência de micro-onda que incide na amostra. A variação destes dois fatores favorece que a condição de saturação seja evitada.

As medidas de RPE foram realizadas em espectrômetro MiniScope MS400 (Magnettech, Alemanha) operando na frequência de 9,4 GHz (banda X) e à temperatura ambiente. Para medir as soluções, utilizamos capilares de vidro (1,0 mm de diâmetro interno) posicionados dentro de tubo de quartzo. Os parâmetros usados foram: potência de micro-onda de 1 mW, amplitude do campo de modulação de 0,2 mT, frequência de modulação de 100 kHz e campo central 337 mT. Os espectros simulados foram feitos utilizando-se o programa EPR-NMR desenvolvido na Universidade de Saskatchewan, Canadá, pelo grupo de Ressonância do Professor John A. Weil. Este programa é capaz de simular espectros de amostras, calculando os níveis de energia por meio das transições inseridas num arquivo de entrada, que contem a informação sobre as interações de cada sistema. O Hamiltoniano de spin é introduzido por meio de matrizes, onde cada matriz refere-se a um tipo de interação. O programa diagonaliza esse Hamiltoniano e fornece o espectro desejado com seus parâmetros.

### 3.2 – Espectroscopia de absorção ótica UV-Vis

A absorção ótica na região do UV - visível de átomos e moléculas está associada a transições eletrônicas entre os níveis eletrônicos do material, causada pela transferência de energia eletromagnética da radiação incidente para o material iluminado. Por ser dependente da estrutura eletrônica das moléculas, a absorção ótica é uma importante técnica de caracterização. Em transições eletrônicas, as moléculas absorvem um quanta de energia provida pelos fótons, excitando elétrons em seu estado fundamental, que saltam para um estado de maior energia.

Quando um feixe de radiação atravessa uma substância absorvedora sua intensidade é atenuada por processo de absorção, reflexão nas paredes da célula e devido a fenômenos de dispersão. Considerando-se apenas a absorção, podemos relacionar a intensidade do feixe incidente ( $I_0$ ), paralelo, monocromático e de comprimento de onda  $\lambda$ , com o feixe transmitido ( $I$ ):

$$I = I_0 10^{-\varepsilon(\lambda)CL} \quad (3.65).$$

onde  $C$  é a concentração do absorvedor,  $L$  é o caminho ótico percorrido pela radiação,  $\varepsilon(\lambda)$  é o coeficiente de absorção molar. A transmitância ( $T$ ) é definida pela razão entre a intensidade do feixe incidente e transmitido:

$$T = \frac{I}{I_0} = 10^{-\varepsilon(\lambda)CL} \quad (3.66).$$

A absorbância é definida pela lei de Lambert-Beer:

$$A = -\log T = \varepsilon(\lambda)CL \quad (3.67).$$

Em um experimento padrão a luz de uma lâmpada incide em uma rede de difração e variando o ângulo da rede de difração o comprimento de onda é variado. O espectrofotômetro utilizado neste trabalho é da companhia Shimadzu modelo UV-3600 e as amostras em solução aquosa foram medidas em temperatura ambiente utilizando-

se cubetas de quartzo de 10 mm de caminho ótico. A luz é colimada por uma lente em um feixe e direcionada à amostra. O feixe atravessa a amostra e é capturado por um sistema de diodos detectores. As informações são então enviadas ao computador por um sistema eletrônico.

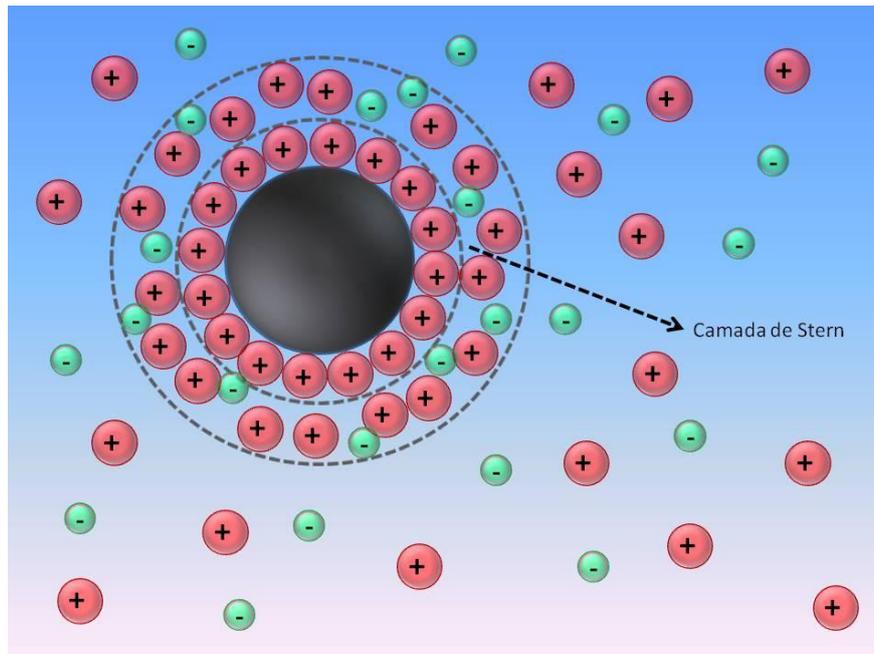
### **3.3 – Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A microscopia eletrônica é uma técnica útil na caracterização morfológica de estruturas, na identificação de estruturas cristalinas, defeitos e contornos de grão. A técnica pode ainda ser acoplada a espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) para fornecer informação sobre a composição química de materiais. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas em microscópio Tecnai G2-20 - Super Twin FEI - 200 kV no Centro de Microscopia da UFMG.

### **3.4 – Potencial Zeta**

Nanopartículas em meio líquido adquirem uma carga elétrica em sua superfície devido à adsorção de grupos iônicos presentes na solução. A carga líquida na superfície da nanoestrutura afeta a distribuição de íons na vizinhança, aumentando a concentração de contra-íons junto à superfície da estrutura, o que leva à formação de uma dupla camada na interface partícula/solução [128]. Na região mais interna (camada de Stern) desta dupla camada os íons estão fortemente ligados à superfície da partícula e, na camada exterior, a concentração de íons é determinada pelo equilíbrio de forças eletrostáticas e movimento térmico (figura 3.10). O potencial Zeta pode ser visto como uma medida da atração/repulsão eletrostática entre partículas carregadas, sendo útil para prever a estabilidade de soluções coloidais. Maior o valor absoluto do potencial Zeta, maior será a estabilidade da solução coloidal, devido à repulsão eletrostática entre as partículas. A medida de potencial Zeta não pode ser feita diretamente. Ela é feita indiretamente por meio da aplicação de uma tensão a dois eletrodos em uma cubeta onde se encontra a suspensão coloidal. As partículas carregadas irão mover-se na direção do eletrodo de carga contrária. A mobilidade eletroforética ( $m^2/Vs$ ) pode ser

definida pela razão entre a velocidade do deslocamento das partículas e o campo elétrico. A partir da mobilidade eletroforética é possível calcular o potencial Zeta [128]. Os dados de potencial Zeta foram obtidos em sistema Malvern Zeta Sizer Nano ZS (Departamento de Química, UFMG).



**Figura 3.10:** Concentração de íons em relação à superfície de uma partícula de carga negativa em uma suspensão.

### 3.5 – Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é uma técnica muito utilizada para determinar a composição química de substâncias por meio de absorção de radiação na região do infravermelho (IV) ( $100 - 10000 \text{ cm}^{-1}$ ). A espectroscopia de infravermelho fornece informação sobre os níveis vibracionais de espécies poliátômicas. Os modos de vibração associados com mudanças no momento de dipolo elétrico das moléculas podem ser diretamente excitados por radiação eletromagnética no infravermelho. Espécies químicas absorvem um quantum de energia da radiação eletromagnética, dando origem a uma transição vibracional fundamental para um estado vibracional excitado. A análise da energia da radiação absorvida pela

espécie e daquela que foi transmitida fornece informações sobre a estrutura química dos compostos e de sua geometria. As ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração bem características, residindo na faixa do IV, tornando a espectroscopia de infravermelho uma importante técnica para caracterização química. Regras de seleção permitem que as transições ocorram apenas entre estados vibracionais mais próximos (do estado vibracional fundamental para o primeiro estado vibracional excitado, por exemplo) e que estas transições devem estar associadas a mudanças no momento de dipolo das espécies poliatômicas.

Os espectros de IV de transmissão (ou absorção) presentes neste trabalho foram realizados em espectrômetro FTIR Nicolet-Nexus 470 (64 scans, resolução espectral de  $4\text{ cm}^{-1}$ ). As amostras em solução foram preparadas por meio de gotejamento das mesmas em lâminas de vidro e, secas em estufa em atmosfera de  $\text{O}_2$ , à temperatura de  $50^\circ\text{C}$ .

### **3.6 - Preparação de amostras**

#### **3.6.1 - Preparação das nanoestruturas de ouro e porfirina**

A síntese de nanoestruturas de ouro de forma simples e que permita modificar forma e tamanho de maneira controlada tem sido um objeto desafiador de pesquisa.

O método de crescimento de nanobastões mediado por sementes de Au na presença do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) têm sido melhorado continuamente desde sua publicação por Jana et al. [83, 84] e Nikoobakht e El-Sayed [85]. Neste trabalho, serão utilizadas duas metodologias de síntese baseadas nos trabalhos de Jana et al. [83, 84] e Nikoobakht e El-Sayed [85] (método de semente) adaptadas por trabalhos de Ye et al. [86, 129] e outra síntese baseada no trabalho de Lai et al. [90] (método sem semente). Isso se deve à facilidade de síntese pelo método sem semente em comparação ao método com semente. O rendimento final em relação ao número de nanobastões de ambas as sínteses também é muito parecido, sendo da ordem de  $10^{12}$  nanobastões por mL de solução.

**Preparação de nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato de sódio (AuNP-cit):** As nanopartículas de ouro foram preparadas pelo método de Turkevich [80]. Em um Erlenmeyer, 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (0,1 M) (Sigma-Aldrich) foram adicionados a 50 mL de água deionizada a 80  $^\circ\text{C}$  sob agitação vigorosa. A solução foi mantida sob aquecimento até a solução entrar em ebulição. Em seguida, 5 mL de uma solução aquosa de citrato de sódio (Sigma-Aldrich) (1% em massa) foi imediatamente adicionada à solução de íons de Au. Após alguns minutos a coloração da solução mudou de roxo escuro para vinho, indicando a formação das nanopartículas de ouro.

**Preparação de nanopartículas de ouro com carga superficial positiva (AuNP-cys):** Para sintetizar nanopartículas com carga superficial positiva utilizamos um protocolo descrito por Jv et al. [130] com uma adaptação do método proposto inicialmente por Niidome e colaboradores [131] baseado na redução de  $\text{HAuCl}_4$  por  $\text{NaBH}_4$  na presença de cisteamina ( $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ ) (Sigma-Aldrich). De forma resumida, a síntese se inicia com a adição de 570  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (0,1 M) a 40 mL de água deionizada sob agitação, em temperatura ambiente e, em seguida 400  $\mu\text{L}$  de solução aquosa de cisteamina (213 mM) foi acrescentada à esta solução de íons Au ainda sob agitação. Após 20 minutos em agitação, 10  $\mu\text{L}$  de uma solução fresca e refrigerada de  $\text{NaBH}_4$  (10 mM) foi adicionada sob agitação vigorosa e mantida sob agitação por mais 10 minutos. O diâmetro médio das AuNP-cys é de 34 nm [130, 131].

**Preparação de nanobastões de ouro (método com semente - seed):**  $\text{HAuCl}_4$  é reduzido a temperatura ambiente por um agente redutor forte, como borohidreto de sódio, para produzir partículas esféricas de cerca de 3 nm, que servem como sementes. Para isso, 10 mL de uma solução de  $\text{HAuCl}_4$  (0,01 mM) é misturada com 0,2 M de CTAB (Sigma-Aldrich). Em seguida, sob agitação, 0,5 mL de uma solução fresca de  $\text{NaBH}_4$  (0,01M) (Sigma-Aldrich) é adicionada à solução contendo íons  $\text{Au}^{3+}$  e CTAB. A coloração da solução varia de amarelo para um tom marrom-amarelo. A solução semente é mantida sob agitação a temperatura ambiente por 1 hora antes de ser usada. Para preparar a solução de crescimento 1,8 g de CTAB e 1 mL oleato de sódio (0,1 M) foram dissolvidos em 50 mL de água deionizada aquecida a 60  $^\circ\text{C}$ , de acordo com o reportado

por Ye et al. [86, 129]. A solução foi resfriada naturalmente até atingir 30 °C, quando então, 2,4 mL de uma solução aquosa de  $\text{AgNO}_3$  (4 mM) (Sigma-Aldrich) foi adicionada. A mistura foi mantida sem perturbações a 30 °C por 15 minutos, em seguida 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (1 mM) foi adicionado. O pH deve ser ajustado para 1,5 adicionando-se HCl (37 %). Na sequência 400  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) (64 mM) (Sigma-Aldrich) foi adicionado. A solução foi agitada vigorosamente durante 30 segundos até se tornar incolor. Finalmente, 160  $\mu\text{L}$  da solução semente são injetados na solução de crescimento. A mistura final foi agitada por 30 segundos e mantida sem perturbação num banho térmico a 30 °C por 24 horas para crescimento dos nanobastões. Após 24 horas, a reação é interrompida por centrifugação (8000 rpm por 15 minutos) e o produto final é coletado e redispersado em 50 mL de água deionizada. Para remover o excesso de CTAB, três lavagens foram feitas sem risco de agregação dos nanobastões.

**Preparação de nanobastões de ouro (método sem sementes - *seedless*):** Este método de síntese foi adaptado dos trabalhos de Lai et al. [90] e Ye et al. [86, 129]. Em um béquer aquecemos 50 mL de água deionizada até atingir 50°C. Em seguida, adicionamos 0,7 g de CTAB e mantemos a solução sob agitação (não vigorosa) até que o CTAB solubilize completamente. Após o CTAB estar completamente solubilizado, ainda sob agitação, adiciona-se 1 mL de oleato de sódio (0,1 M) até que solubilize. Em seguida, a solução é resfriada até atingir 30°C aproximadamente e adiciona-se 250  $\mu\text{L}$  de  $\text{HAuCl}_4$  (0,1 M). Após alguns minutos de ultrassonificação a solução se torna incolor. Adiciona-se em seguida 1,25 mL de  $\text{AgNO}_3$  (4 mM) agitando-se gentilmente. O pH da solução é ajustado para 1,5 usando-se HCl. Após, 75  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico (64 mM) são adicionados à solução que é levada novamente ao ultrassom para homogeneizar. Finalmente, adiciona-se 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaBH}_4$  (10 mM) (sem agitação) e a solução é mantida sem perturbação por cerca de 12 horas. Após esse período, a suspensão coloidal é centrifugada a 8000 rpm por 15 minutos com remoção do precipitado e rediluição em 50 mL de água DI. Após duas lavagens para remoção do excesso de CTAB, a suspensão ainda permanece estável.

**Síntese das porfirinas:** As porfirinas foram sintetizadas em colaboração com a professora Dayse Carvalho do Departamento de Química da UFMG. Brevemente, *5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin tosylate salt* [ $H_2TM_4PyP(OTs)_4$ ] (POR) foi preparada via alquilação de *meso-tetrakis(4-pyridyl)porphyrin* de acordo com adaptação do método de síntese reportado por Safar et al. [132]. Verteporfin (VER), um derivativo de benzoporfirina, aprovado para uso comercial em TFD pelo FDA [43], foi utilizado para fins comparativos (Sigma-Aldrich).

### 3.6.2 – Preparação de amostras para RPE

Como mencionado na seção 3.1.5, na metodologia de captura de spins utiliza-se um composto diamagnético capaz de ligar-se a um radical de interesse, formando um produto paramagnético estável e de vida longa suficiente para ser detectado por RPE, o aduto de spin. De acordo com as discussões anteriores, as espécies reativas de oxigênio geradas durante a fotossensibilização de porfirinas são majoritariamente  $^1O_2$ ,  $OH^\bullet$  e  $O_2^\bullet$ . Para detectar espécies reativas de oxigênio, empregamos o uso de dois compostos distintos: TEMP e PBN.

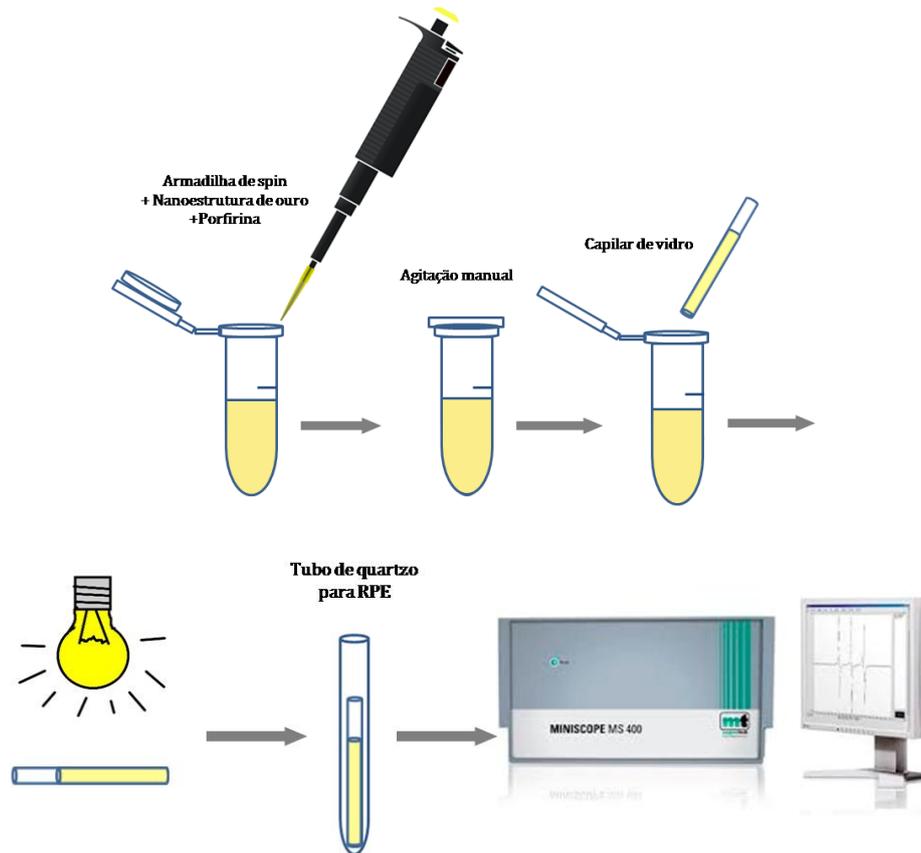
Os *spin traps* TEMP (*2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinol*) e PBN (*N-tert-Butyl- $\alpha$ -phenylnitrone*), o radical livre TEMPOL (*4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl*), D-manitol ( $C_6H_{14}O_6$ ), azida de sódio ( $NaN_3$ ), dimetilsulfóxido (DMSO) e *4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid dissodium salt monohydrate* (Tiron) foram adquiridos de Sigma Aldrich.

Para realização das medições de ressonância paramagnética eletrônica, uma solução aquosa de TEMP (1 M) foi preparada na ausência de luz. PBN possui baixa solubilidade em água e por esta razão foi preparado em uma mistura de água deionizada e etanol (VETEC) na razão em volumes 1:1 v/v, atingindo uma concentração final de 85 mM. As concentrações dos *spin traps* utilizados são altas, pois é necessário que haja moléculas suficientes das armadilhas de spin para capturar as espécies reativas geradas. A concentração absoluta de spins foi estimada por meio de dupla integração do sinal RPE de um radical nítróxido conhecido, TEMPOL. Utilizamos uma solução estoque

de TEMPOL na concentração 1 mM. A porfirina  $H_2TM_4PyP(OTS)_4$  (POR) é solúvel em água e foi preparada em água deionizada na concentração 14,5  $\mu M$ . Outro fotossensibilizador comumente usado em TFD, Verteporfin (VER), foi usado para comparação da atividade fotodinâmica. Verteporfin apresenta baixa solubilidade em água e foi primeiramente diluída em DMSO e então em água deionizada (1:8 v/v) com concentração final de 14,5  $\mu M$ .

Com o intuito de manter a padronização das séries de medições realizadas em RPE/*spin trapping*, as amostras foram preparadas da seguinte forma: em um microtubo cônico adicionamos 50  $\mu L$  de *spin trap* TEMP (1 M) ou *spin trap* PBN (85 mM), 25  $\mu L$  de porfirina (14,5  $\mu M$ ) e 25  $\mu L$  de AuNP ou AuNR. Nas soluções controle, água deionizada foi usada para substituir as porfirinas, AuNP ou AuNR. Para compor os sistemas híbridos, as porfirinas foram misturadas manualmente às nanoestruturas de ouro em um microtubo e em seguida adicionamos os compostos de armadilhas de spin. As soluções foram colocadas em capilares de vidro que são posicionados no interior de tubos de quartzo para realização da leitura dos espectros RPE (figura 3.11). Todas as amostras são preparadas na ausência de luz e iluminadas por uma lâmpada LED usando filtros amarelo (570 nm) ou vermelho (630 nm). A radiância integrada, medida sob as mesmas condições experimentais, para a fonte de luz com comprimentos de onda 570 e 630 nm, foi 16 e 6  $mW\ cm^{-2}$  respectivamente, calibradas por um medidor de potência Coherent Lasermate/D.

Para os testes com luz UVA, utilizamos um laser (375 nm) com spot de  $1,74 \pm 0,15$  mm. As amostras foram irradiadas em cubeta de quartzo com 1 mm de caminho ótico, de forma que uma lente divergente foi utilizada para espalhar o feixe por uma área de cerca de 2  $cm^2$  da cubeta de quartzo utilizada para irradiação das amostras. A potência do feixe incidente nas amostras é de 5 mW. A cada tempo de iluminação, um volume de cerca de 50  $\mu L$  foi aliquoteado em tubos capilares e os mesmos são posicionados dentro do tubo de quartzo para as medidas de RPE.



**Figura 3.11:** Preparação das amostras para medição de RPE.

Para as irradiações com raios gama as amostras foram irradiadas no Centro de Tecnologia Nuclear (CDTN) numa instalação comercial da MDS Nordion, Canadá, com fonte radioativa de  $^{60}\text{Co}$ . As soluções foram misturadas em tubos cônicos, conforme descrito, e irradiadas nos mesmos. Após, as soluções são aliqüotadas e medidas em capilares de vidro posicionados em tubo de quartzo.

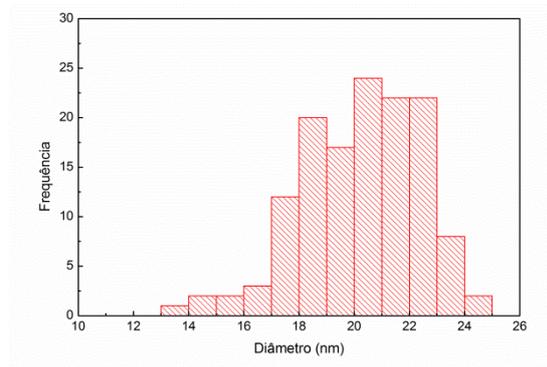
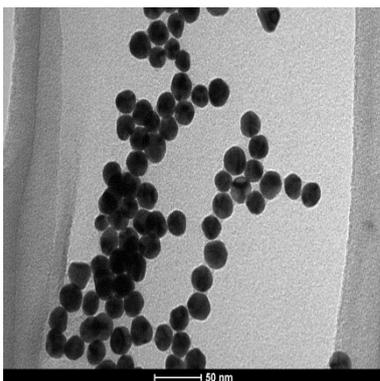
A proporção entre os volumes dos componentes dos sistemas e concentrações foram mantidos constantes em todos os testes:  $\frac{1}{2}$  do volume corresponde à solução do *spin trap*,  $\frac{1}{4}$  do volume é de AuNR e  $\frac{1}{4}$  do volume é de POR. No caso das amostras controle,  $\frac{1}{4}$  do volume de AuNR ou POR é substituído por  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada. Para os testes com supressores, além dos volumes descritos, adiciona-se  $\frac{1}{4}$  em volume de solução do supressor, nas concentrações determinadas. Todos os resultados apresentados são referentes à nanobastões de ouro produzidos pelo método com semente.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

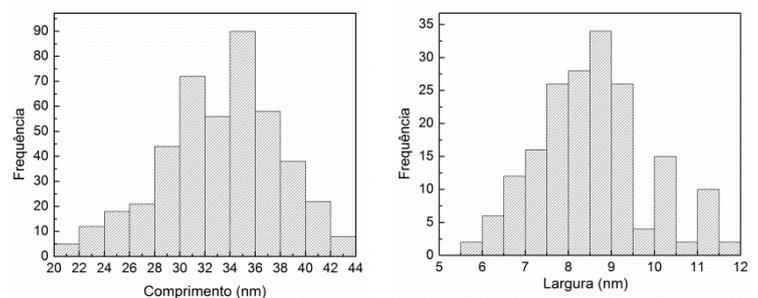
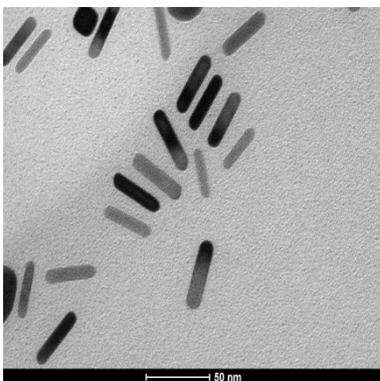
### 4.1 – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Por meio das imagens obtidas por MET de alta resolução (200 kV), obtivemos a morfologia (tamanho e forma) das nanoestruturas de ouro sintetizadas. As imagens obtidas para as nanopartículas de ouro (AuNP) e nanobastões de ouro (AuNR) são mostradas nas figuras 4.1, respectivamente. O software ImageJ [133] foi usado para estimar o tamanho médio das nanoestruturas. O comprimento e largura médios dos nanobastões de ouro sintetizados pelo método de semente são  $33 \pm 4$  nm e  $8,5 \pm 1,2$  nm, respectivamente. Já o diâmetro médio de AuNP-cit é  $20 \pm 2$  nm, de acordo com imagens de microscopia eletrônica.

(a)



(b)

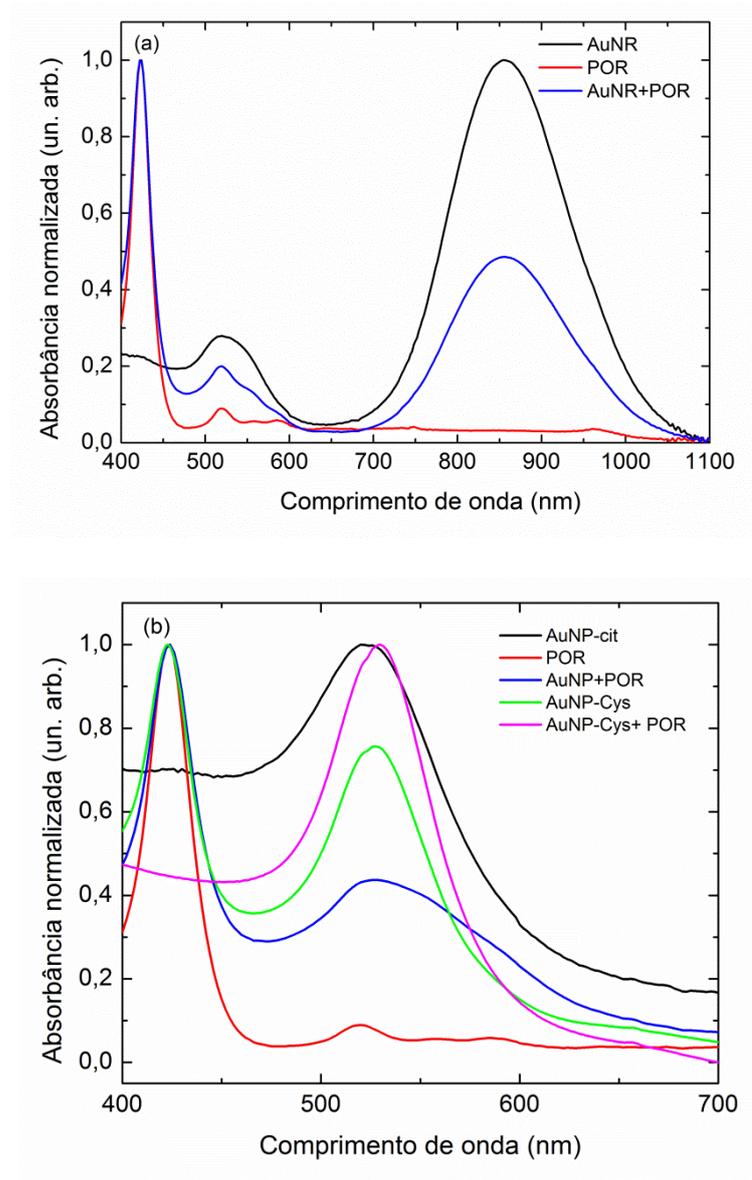


**Figura 4.1:** Imagens de microscopia eletrônica de transmissão de AuNP (síntese com citrato) (a) e AuNR (método com semente) (b). Histogramas com a distribuição dos tamanhos para o diâmetro de AuNP e comprimento e largura de AuNR.

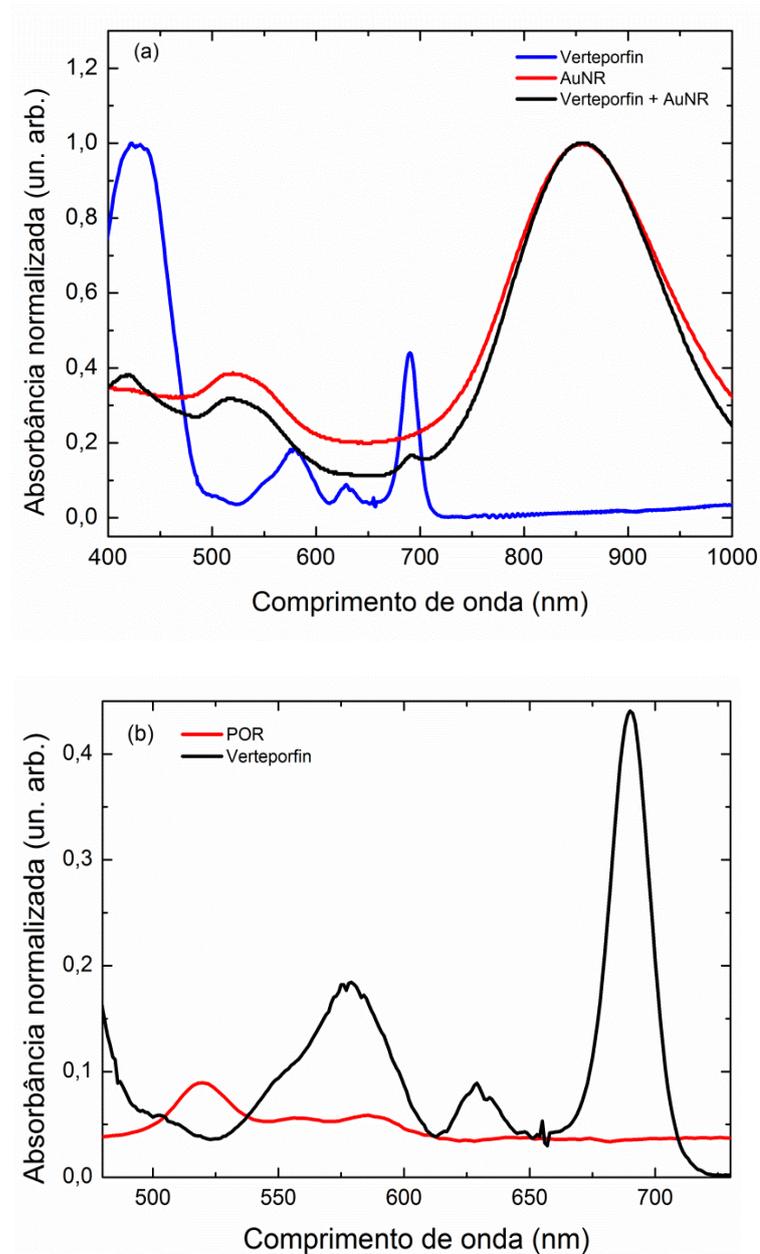
## 4.2 – Espectroscopia de absorção UV-Vis e Potencial Zeta

Nanoestruturas de ouro apresentam propriedades óticas e químicas muito interessantes. Dentre estas propriedades podemos citar a facilidade de funcionalização de sua superfície e bandas de absorção intensas devido ao fenômeno de ressonância de *plasmons* de superfície, que promove oscilação coletiva de elétrons de condução na presença de campo eletromagnético [20, 134, 135]. A figura 4.2 (a) mostra o espectro de absorção ótica de nanobastões de ouro das duas bandas características observadas em 519 nm (modo transversal) e 863 nm (modo longitudinal). Em contraste, as nanopartículas de ouro apresentam apenas um modo de ressonância plasmônica centrado em 520 nm (figura 4.2 (b)). As concentrações estimadas das soluções preparadas de nanoestruturas são  $4,5(4) \times 10^{12}$  NR/mL para AuNR,  $5,0(5) \times 10^{13}$  NP/mL para AuNP-cit e  $1,0(1) \times 10^{14}$  NP/mL para AuNP-cys.

O espectro de absorção da porfirina POR em solução aquosa é mostrado na figura 4.2 (a) e (b) (linha vermelha). Este espectro é caracterizado pela presença de uma banda de absorção intensa na região do UV (422 nm), a banda de Soret, e outras bandas menos intensas na região do espectro visível, chamadas bandas Q (figura 4.3 (b)). A Vertepofin também apresenta a característica banda de Soret e bandas Q (figura 4.3 (a)). Não foi observada nenhuma mudança nas posições do modo longitudinal de ressonância para AuNR nos sistemas híbridos formado por POR/AuNR (figura 4.2 (a) – linha azul) ou VER/AuNR (figura 4.3 (a) – linha azul). O espectro de absorção das porfirinas é característica de seus macrociclos e ocorrem devido a transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ . A intensidade e número das bandas Q estão relacionadas ao tipo e gênero de substituintes periféricos no macrociclo e qualquer mudança nesses substituintes pode ser observada por uma variação nas bandas Q da porfirina [136]. A mudança nas bandas Q de porfirinas pode estar relacionada à interação entre FS e nanoestrutura. Lin e colaboradores atribuíram um desvio para o vermelho em uma das bandas Q da Clorina e6 (Ce6) à interação entre os componentes do híbrido, num sistema composto por vesículas de ouro carregadas com o FS [137]. Devemos notar que nenhum desvio nas bandas Q do FS ou do modo longitudinal dos nanobastões de Au foi evidenciado pelas nossas medidas.



**Figura 4.2:** Espectro de absorção UV-Vis: (a) AuNR (linha preta); porfirina  $H_2TM_4PyP(OTs)_4$  (POR) em solução aquosa (linha vermelha); e sistema híbrido POR/AuNR (linha azul); (b) mesmos espectros gerados para nanopartículas esféricas de ouro (AuNP-cit e AuNP-cys) em substituição ao AuNR.



**Figura 4.3:** Espectros de absorção ótica para Verteporfin (linha azul) e em substituição à POR nos sistemas híbridos com AuNR (a). Em (b) podemos comparar as bandas Q das duas porfirinas testadas. Verteporfin foi solubilizada em DMSO e água deionizada, enquanto POR e AuNR estão em solução aquosa.

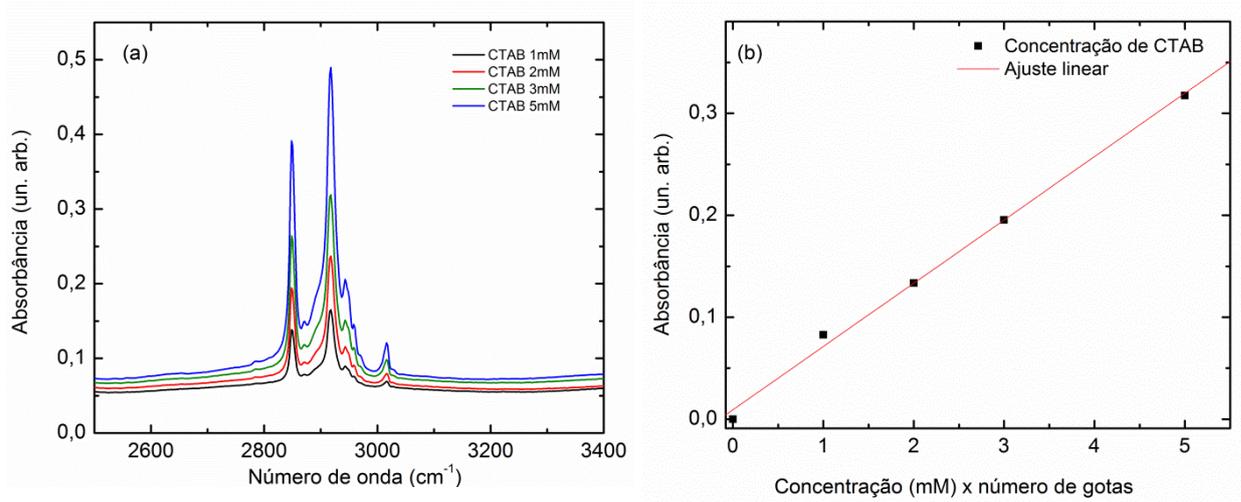
Medidas de potencial Zeta foram realizadas para avaliar a carga superficial das nanoestruturas nas soluções de porfirinas e suspensões coloidais com o objetivo de investigar em mais detalhes a interação da porfirina e nanoestruturas metálicas nos sistemas híbridos. Para os nanobastões de ouro (AuNR), nanopartículas de ouro AuNP-

cit e AuNP-cys, o potencial Zeta medido foi +19,2(5) mV, -15,8(5) mV e +42,2(4) mV, respectivamente. Estes resultados estão em acordo com modelos apresentados na literatura [10, 138-140] e são consistentes com modelo em que os nanobastões recobertos com CTAB possuem carga superficial positiva devido à bicamada de CTAB. O CTAB é um surfactante anfifílico que dispõem sua cabeça hidrofílica (grupos trimetilamônio catiônicos) para o meio aquoso, conferindo carga positiva à superfície de AuNR [10, 138]. Por outro lado, AuNPs possuem carga superficial negativa, devido à presença de citrato de sódio, usado como agente redutor e estabilizante [139, 140]. A adsorção de grupos  $-NH_2$  positivamente carregados da cisteamina usada na síntese de AuNP-cys é responsável pela carga superficial positiva destas nanopartículas [130]. É importante notar que o potencial Zeta fornece também informação sobre a estabilidade das soluções coloidais. Podemos perceber pelos valores absolutos do potencial Zeta distantes de zero, que as soluções coloidais são bem estáveis, não experimentando agregação. A porfirina POR possui potencial Zeta -2,4(2) mV, uma carga superficial levemente negativa. Verteporfin apresentou carga de superfície -11,8(2) mV.

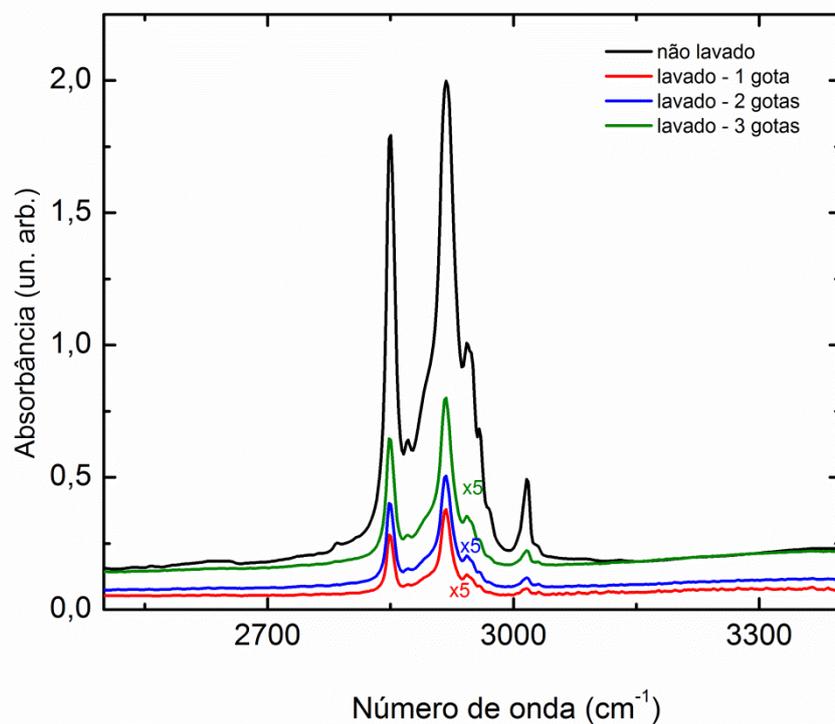
### 4.3 – Espectroscopia de Infravermelho

A concentração do surfactante CTAB em nanobastões de ouro foi determinada por meio de espectroscopia de infravermelho. As amostras foram gotejadas sobre lâminas de vidro e secas sob atmosfera de  $O_2$ . Inicialmente, obtivemos curvas de absorção de uma gota de CTAB puro em solução aquosa em diferentes concentrações (figura 4.4 (a)). Os espectros obtidos nos permitiram determinar a concentração de CTAB, por meio de uma curva de calibração, i.e., absorbância (concentração molar x número de gotas) para a banda em  $2850\text{ cm}^{-1}$  (figura 4.4 (b)). Desta forma, a concentração de CTAB, antes e após a lavagem, na suspensão de AuNR foi determinada. A figura 4.5 nos fornece o espectro das amostras (lavada e não lavada) gotejadas sobre a lâmina de vidro, que nos permitiram estimar a concentração de CTAB em cada amostra por meio da curva de calibração. O CTAB ( $C_{16}H_{33}N(CH_3)_3^+Br^-$ ) é uma molécula anfifílica que contém em sua estrutura uma cadeia de metileno de 16 carbonos (cauda hidrofóbica) e uma cabeça hidrofílica (grupo amônio quaternário) [141]. As duas bandas

intensas em 2917 e 2850  $\text{cm}^{-1}$  são, respectivamente, características do estiramento (*stretching*) assimétrico e simétrico do C-H na cadeia C-CH<sub>2</sub> do grupo metileno. O pico em 2871  $\text{cm}^{-1}$  é atribuído a estas vibrações de estiramento nas ligações CH<sub>3</sub>. As outras bandas menos intensas em 2943 e 2958  $\text{cm}^{-1}$  pertencem à vibração de estiramento assimétrico do C-CH<sub>3</sub> e estiramento simétrico do N-CH<sub>3</sub>, respectivamente [141]. A banda presente em 3017  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída ao modo vibracional tesoura (*scissoring*) assimétrico da ligação C-H presente no CH<sub>3</sub>-N [142]. A concentração final de CTAB presente nas amostras foi determinada por meio de ajuste linear da curva de absorção em função da concentração de CTAB (curva de calibração) para diferentes concentrações de CTAB (1 mM, 2 mM, 3 mM e 5 mM) de amostras secas gotejadas em lâmina de vidro (figura 4.4). A intensidade da banda de absorvância em 2850  $\text{cm}^{-1}$  correspondendo a 1 gota de CTAB (1 mM) é  $0,062 \pm 0,002$ . A absorvância segue a Lei de Lambert-Beer. Podemos ver pela figura 4.4 (b) que a absorvância aumenta linearmente com a concentração da solução e em função do número de gotas (figura 4.5). A figura 4.5 fornece o espectro de absorção no infravermelho das amostras de AuNR lavada e não lavada. O espectro mostra claramente que a lavagem remove uma grande quantidade de CTAB das suspensões de nanobastões de ouro. As concentrações de CTAB encontradas para as amostras de AuNR são 25,0 mM para a amostra não lavada e 0,5 mM após lavagem para remover o excesso de CTAB nas suspensões. O CTAB, por ser uma molécula anfifílica forma uma bicamada que recobre os nanobastões de ouro na suspensão coloidal aquosa.



**Figura 4.4:** Espectro de absorção FTIR dos resíduos secos de 1 gota de solução aquosa de CTAB com diferentes concentrações (a) e curva de calibração obtida (absorbância absoluta da banda mais intensa em 2850 cm<sup>-1</sup> em função da concentração molar x número de gotas) (b).



**Figura 4.5:** Espectro de absorção FTIR das amostras gotejadas sobre lâminas de vidro, usando suspensões de AuNR recobertas com CTAB não lavada e lavada. O espectro das amostras AuNR lavados foram multiplicados por 5 para permitir uma comparação visual com o espectro intenso da amostra não lavada.

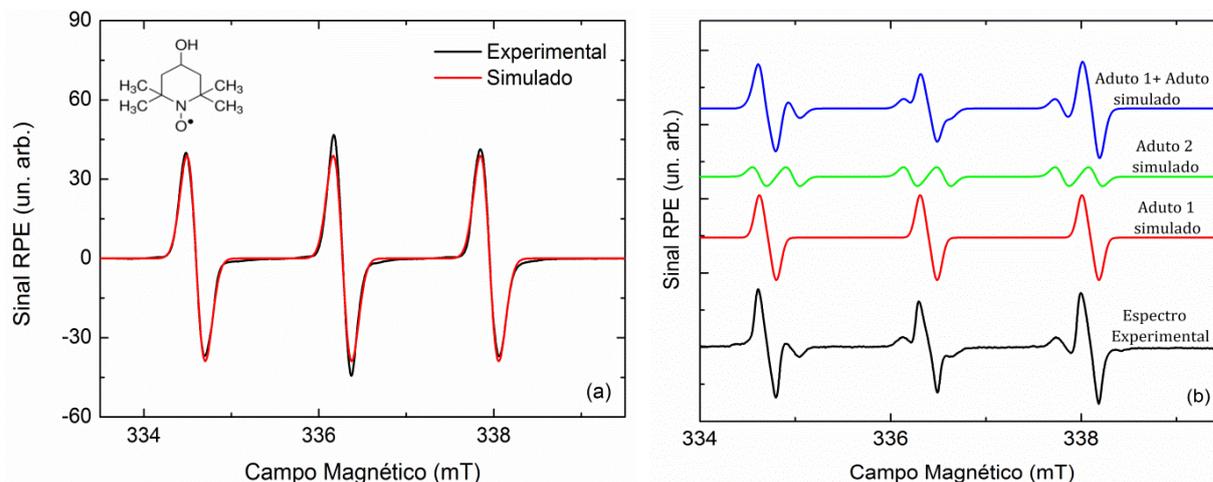
## 4.4 – Ressonância Paramagnética Eletrônica

### 4.4.1 – Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras irradiadas com luz na região do visível

A fim de avaliar as propriedades fotoquímicas das porfirinas e dos híbridos, foram realizados experimentos de ressonância paramagnética eletrônica utilizando-se a metodologia de armadilha de spin (*spin trapping*). Quando o *spin trap* TEMP e porfirinas são misturados em solução aquosa, a irradiação das amostras com luz de comprimentos de onda 570 nm (amarelo) ou 630 nm (vermelho) produz um sinal de RPE composto por três linhas típico do radical nitróxido (figura 4.6 (a)). As três linhas do sinal do TEMPOL são originadas pela interação hiperfina entre um elétron desemparelhado e o átomo de nitrogênio da molécula ( $^{14}\text{N}$ , spin nuclear  $I = 1$ , 99,63% abundância).

O fator  $g$  eletrônico e a constante de acoplamento hiperfino  $a$  podem ser obtidos por meio de simulações usando-se o Hamiltoniano de spin descrito pela equação 3.38. Os valores obtidos para o fator  $g$  e constante hiperfina foram respectivamente,  $g = 2,0056(2)$  e  $a_N = 1,68(2)$  mT. Estes valores estão de acordo com os valores obtidos para o TEMPOL comercial [143]. A pequena diferença nas intensidades dos espectros calculado e experimental ocorre em razão dos desvios gerados pelo regime de estreitamento do movimento (*motional narrowing*) da molécula do nitróxido no solvente [120]. Devido ao movimento da molécula no solvente, o espectro obtido é resultado de uma média entre as orientações das moléculas do nitróxido. A teoria que descreve o movimento de moléculas radicalares em solução [120] prevê tempos de relaxação spin-spin ( $T_2$ ) distintos para cada uma das transições envolvendo o spin nuclear de  $^{14}\text{N}$ , portanto, a largura de linha, que é dependente de  $T_2$ , irá variar para cada uma destas transições [113]. O movimento de um *spin-label* ou marcador de spin (geralmente um radical nitróxido ligado covalentemente a um substrato) pode ser caracterizado pelos tempos de correlação,  $\tau_C$ , que é análogo à frequência de rotação da molécula [144]. No regime chamado “*fast motion*”, caracterizados por tempos de correlação entre  $10^{-9}$  –  $10^{-11}$  s, a molécula possui maior liberdade para rotacionar em

torno do eixo da ligação N-O [144, 145], mostrando um espectro RPE formado por três linhas de intensidades muito próximas.

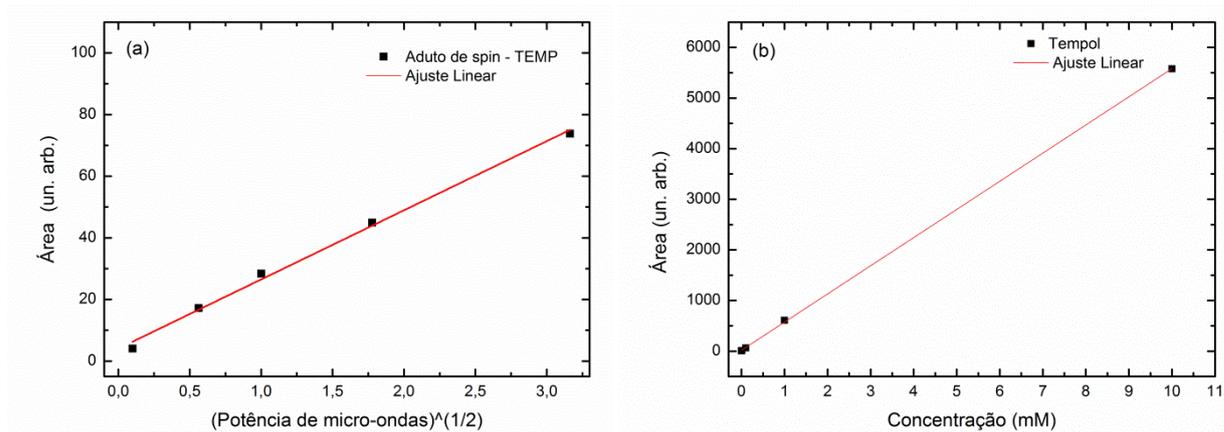


**Figura 4.6:** Espectros de RPE típicos obtidos a temperatura ambiente após iluminação em 570 nm contendo porfirina POR e (a) solução aquosa de TEMP ou (b) PBN em etanol/água (1:1 v/v). Espectros experimentais são mostrados em preto e espectros simulados (usando Hamiltoniano de spin fornecido pela equação 3.38) em vermelho (aduto 1), verde (aduto 2) ou azul (aduto 1 + aduto 2).

Os experimentos de RPE associados à metodologia de armadilhas de spin realizados com PBN juntamente com as porfirinas mostraram a existência de duas espécies distintas de adutos, chamados aduto 1 e aduto 2, após a iluminação das amostras com luz de comprimentos de onda 570 nm e 630 nm (figura 4.6 (b)). O aduto de spin 1 (linha vermelha na figura 4.6 (b)), é referente as três linhas de RPE características de radicais nitróxido, similar ao espectro obtido para o TEMPOL, devido à interação hiperfina do elétron desemparelhado com o spin nuclear do  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ , 100% abundância). A simulação dos espectros pode incluir também outra interação hiperfina relativamente pequena não resolvida com o átomo de H, da ordem de 0,021 mT para o caso do aduto do radical  $\text{OH}^\bullet$  com PBN [146]. Os parâmetros do Hamiltoniano de spin que melhor se ajustam ao espectro experimental para o aduto 1 são  $g = 2,0056(2)$ ,  $a_N = 1,69(2)$  mT e  $a_H = 0,09(5)$  mT. O aduto de spin 1 pode ser atribuído à forma desprotonada da molécula de PBN. De acordo com Hensley et al. [147], se a interação entre PBN e o radical capturado for suficiente para decompor a molécula de PBN, um

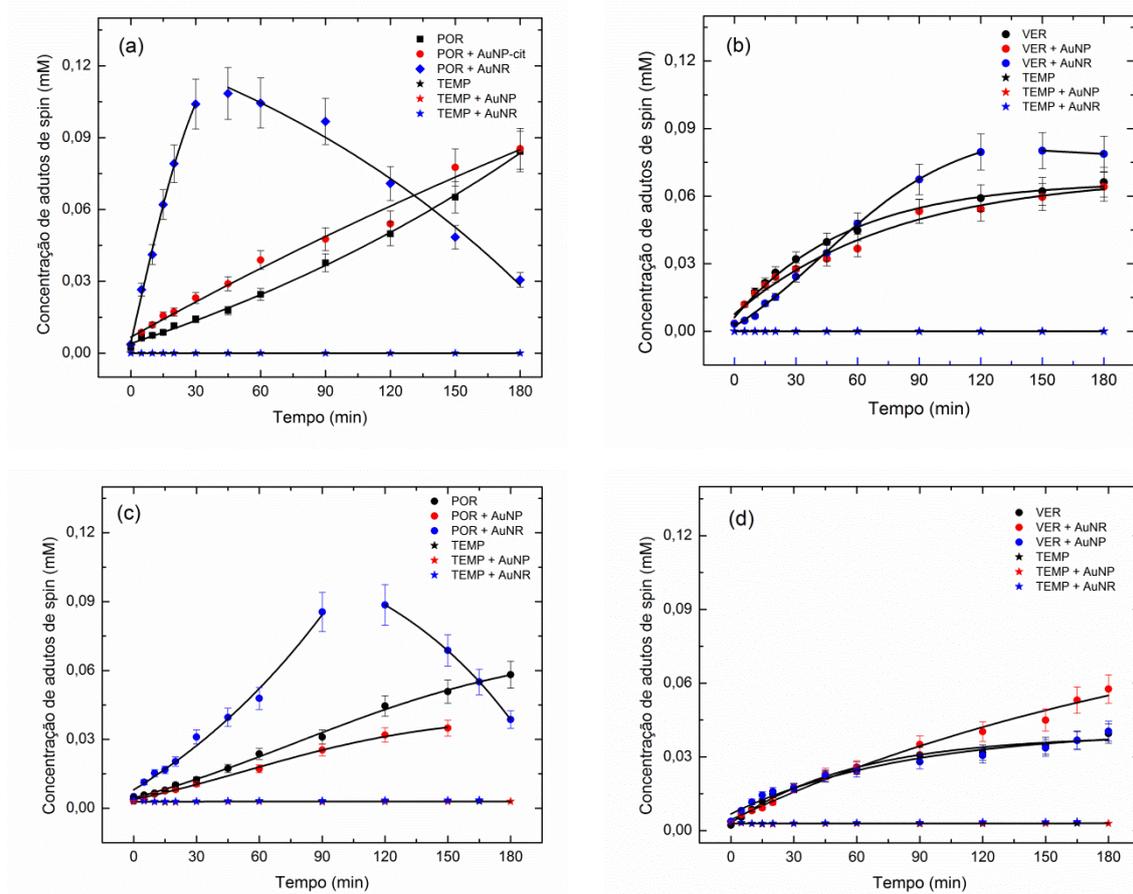
sinal característico de nitróxidos é esperado. Em contraste, o espectro de RPE do aduto de spin 2, consiste em seis linhas, originadas pelo acoplamento hiperfino entre spin eletrônico e spin nuclear do átomo de  $^{14}\text{N}$  ( $I = 1$ ) próximo. Cada uma das três linhas referentes ao acoplamento hiperfino entre spin nuclear do N e o elétron desemparelhado é desdobrada em duas linhas em razão da interação hiperfina com o spin nuclear de um próton adjacente, referente ao átomo de hidrogênio na posição  $\beta$  na molécula de PBN ( $^1\text{H}_\beta$ ,  $I = 1/2$ ). Esta interação hiperfina devido ao  $\text{H}_\beta$  é maior que a observada para o aduto 1, que é desprezível [42]. A simulação dos espectros experimentais nos forneceu os seguintes valores para o Hamiltoniano do aduto 2:  $g = 2,0057(1)$ ,  $a_N = 1,59(2)$  mT e  $a_H = 0,35(5)$  mT (linha verde na figura 4.6 (b)). Estes parâmetros são típicos para o aduto  $\text{PBN-CH(OH)CH}_3^\bullet$ , resultado da interação de radicais hidroxila com o etanol [42].

A análise da saturação do sinal de RPE foi avaliada. O sinal RPE é obtido enquanto o nível de energia mais baixo tiver maior ocupação. Dizemos que o sistema está saturado quando os níveis de spin estão igualmente populados. Quanto maior a potência de micro-ondas usada maior a chance de energia ser absorvida e, se o processo relaxação é lento, o uso excessivo de potência de micro-ondas promoverá a igualdade na população dos níveis, saturando o sistema. A saturação pode causar alargamento do espectro RPE. A intensidade do sinal RPE deve ser proporcional à raiz quadrada da potência de micro-ondas incidente na cavidade, sendo linear a relação entre estas grandezas. Como vemos na figura 4.7, esta condição é obedecida. Na figura 4.7 (b) observamos os valores para a área obtida por meio da dupla integração do sinal RPE do TEMPOL em função da concentração, utilizada para quantificar o sinal RPE dos adutos de spin gerados.



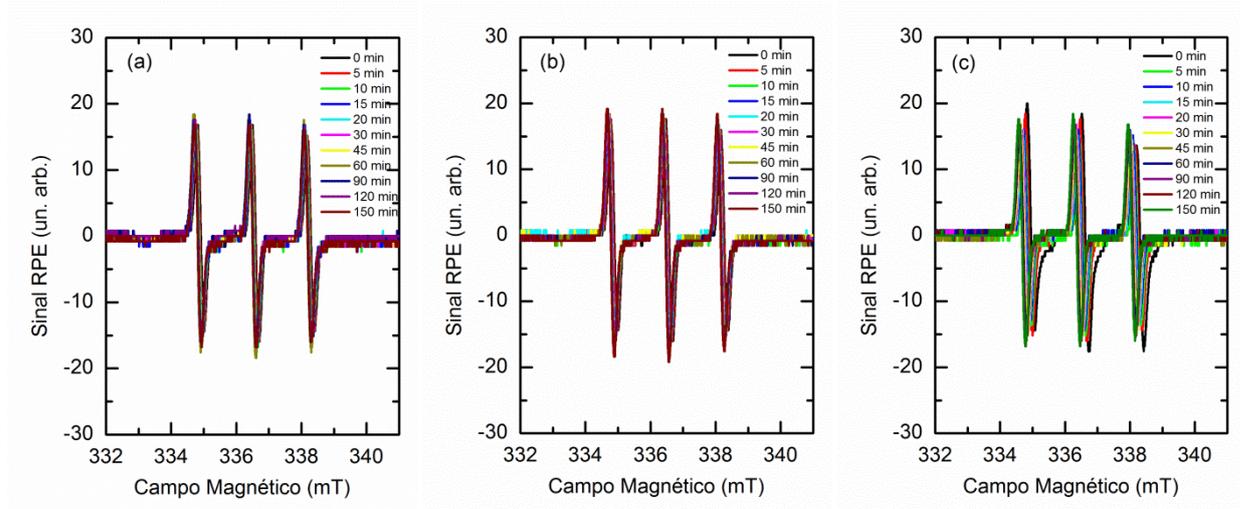
**Figura 4.7:** (a) Curva de saturação do sinal de RPE do aduto de spin TEMP-<sup>1</sup>O<sub>2</sub>. (b) Curva de concentração do radical (em mM) em função da integral dupla do sinal do TEMPOL.

Com o objetivo de obter a concentração absoluta dos adutos de spin em função do tempo de iluminação, os espectros de ressonância paramagnética eletrônica são integrados duas vezes e a área é, em seguida, comparada à área calibrada a partir do espectro RPE de uma solução aquosa do radical TEMPOL em concentração conhecida (1 mM). As concentrações absolutas dos adutos de spin relativos ao TEMP em função do tempo de iluminação são mostradas na figura 4.8 ((a)-(d)). Foi estimado um erro nas concentrações absolutas de cerca de 10%, atribuído aos fatores experimentais durante preparação de amostras e erro instrumental. TEMP é uma armadilha de spin muito específica para detecção de oxigênio singleto, como mostraremos durante a discussão. Os espectros de RPE para iluminação com luz amarela (570 nm) e vermelha (630 nm) indicam que o processo de geração de EROs é do tipo II, isto é, transferência de energia entre o FS e oxigênio molecular sob iluminação, levando à formação de oxigênio molecular no estado singleto. As figuras 4.8 (a) e (c) mostram a concentração dos adutos de spin formados com *spin trap* TEMP em função do tempo de iluminação para iluminação com comprimentos de onda 570 nm e 630 nm, durante 3 horas de iluminação, para a porfirina POR (H<sub>2</sub>TM4PyP(OTs)<sub>4</sub>) e os dois sistemas híbridos contendo POR/AuNP-cit ou POR/AuNR. Para critérios de comparação, as figuras 4.8 (b) e (d) mostram a concentração dos adutos de TEMP para soluções aquosas contendo a porfirina comercial Verteporfin, na concentração 14,5 μM, em água e DMSO (1:8 v/v) em substituição à POR.



**Figura 4.8:** Concentração absoluta dos adutos de spin do TEMP em função do tempo de iluminação de solução aquosa contendo porfirina (POR), *spin trap* TEMP, AuNP-cit, AuNR ou uma mistura deles (sistemas híbridos) irradiados com luz (a) amarela (570 nm) e (c) vermelha (630 nm). As concentrações de todos os reagentes foram mantidas constantes. Para comparação, os mesmos experimentos foram realizados com a porfirina comercial Verteporfin (VER) e seus híbridos sob iluminação com luz amarela (b) e vermelha (d). As curvas são apenas guias.

As curvas de referência das soluções contendo apenas TEMP, TEMP+AuNP ou TEMP+AuNR não mostraram formação de aduto mesmo após 3 horas de iluminação (figura 4.9). O sinal existente mesmo sem iluminação é, provavelmente, devido às impurezas presentes no *spin trap*, que foi utilizado sem purificação.



**Figura 4.9:** Espectros de RPE das soluções controle iluminadas com luz amarela (570 nm): TEMP em (a), TEMP+AuNR em (b) e TEMP+AuNP em (c). Nas soluções dos grupos controle, as concentrações de todos os reagentes foram mantidas constantes.

Dos dados obtidos na figura 4.8 podemos observar que para ambas as porfirinas, a iluminação com luz amarela (570 nm) é mais eficiente na geração de  $^1O_2$  que a iluminação com luz vermelha (630 nm). Isso é esperado uma vez que o espectro de absorção de ambas as porfirinas mostra bandas de absorção mais intensas na região do espectro correspondente ao amarelo. A porfirina sintetizada POR é também mais eficiente que a porfirina comercial Verteporfin.

A partir das curvas mostradas na figura 4.8 podemos inferir que apenas as soluções constituídas por AuNR e POR apresentam um forte efeito híbrido sob luz amarela. A reação que mostra a eficiência da conversão  $^3O_2 \rightarrow ^1O_2$  pode ser obtida pela inclinação das curvas durante o intervalo inicial de iluminação. A reação para formação dos adutos de spin é dada por:



onde  $O^S$  refere-se ao oxigênio molecular no estado singleto,  $S^{TRAP}$  é o *spin trap*,  $POR$  é porfirina,  $k$  é a constante de reação e  $S^{AD}$  é o aduto de spin formado após reação de adição do  $^1O_2$  ao TEMP. Se tivermos uma concentração relativamente baixa de  $O^S$  no

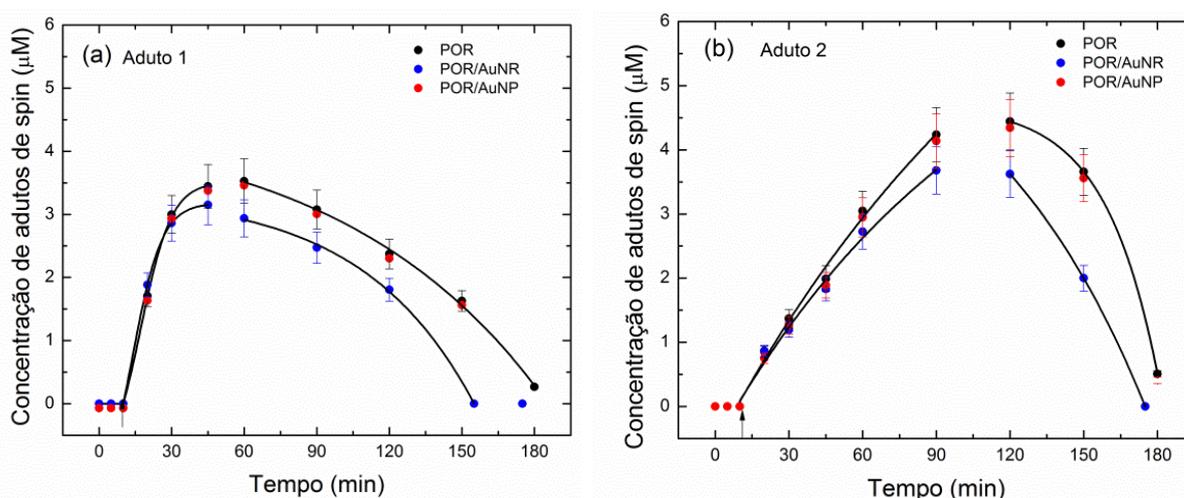
início do processo de iluminação, podemos aproximar a concentração dos adutos de spin em função do tempo [127]:

$$[S^{AD}](t) \cong k [O^S]t \quad (4.2).$$

onde  $[S^{AD}](t)$  é a concentração do aduto de spin no tempo  $t$ ,  $[O^S]$  é a concentração de oxigênio singleto. De fato, as curvas de concentração dos adutos são quase lineares para os 30 minutos iniciais de iluminação. As constantes de reação para o híbrido AuNR/POR e porfirina pura são, respectivamente,  $34,0(2) \times 10^{-4}$  e  $3,8(2) \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$  sob iluminação com luz amarela, mostrando que o híbrido é cerca de uma ordem de grandeza mais eficiente que a porfirina pura. Inicialmente, a Verteporfin não mostra um efeito híbrido sob luz vermelha. Já o processo de geração de oxigênio singleto para o híbrido AuNR/VER, sob luz amarela, pode ser ajustado por curva do tipo sigmoidal para este híbrido (figura 4.8 (b)), o que nos leva a crer que o mecanismo é diferente daquele observado para POR/AuNR. Curvas sigmoidais estão associadas a processos onde há autocatálise [148]. O mesmo comportamento é observado para o híbrido POR/AuNP-cys sob luz amarela (seção 4.5.1). Para tempos de iluminação longos vemos uma diminuição expressiva na concentração de adutos para o sistema híbrido POR/AuNR. Já foi discutido anteriormente que este efeito ocorre devido ao ataque do aduto de spin por concentrações altas de oxigênio singleto [127]. A figura 4.8 mostra que para ambos os casos (iluminação com luz amarela e vermelha) o híbrido POR/AuNR produz oxigênio singleto em maior concentração que a porfirina pura e também em maior concentração que o híbrido VER/AuNR. Além disso, o híbrido formado por AuNP e POR não apresentou nenhum efeito de sinergia.

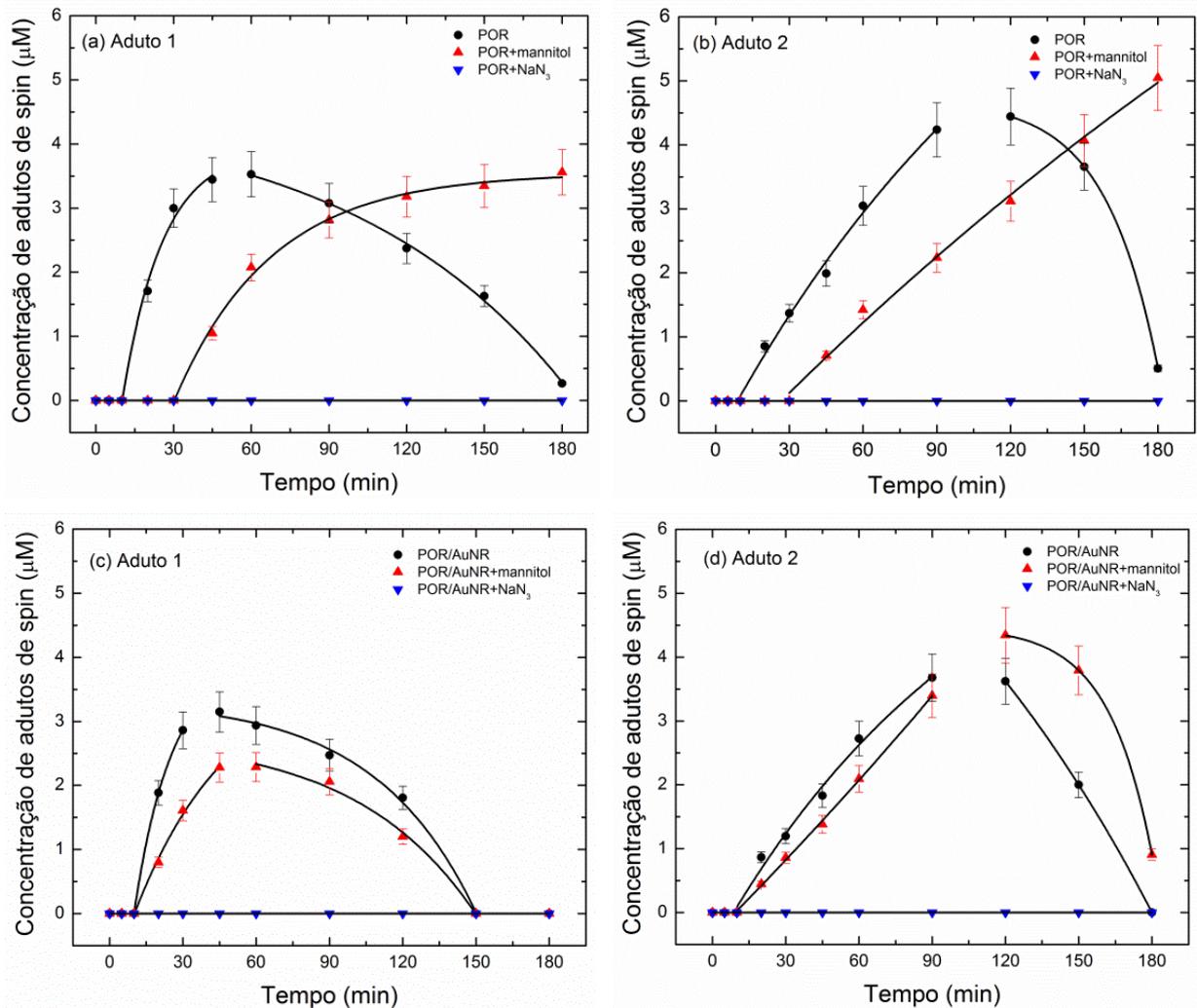
A terapia fotodinâmica pode envolver a formação de outras espécies reativas de oxigênio, como radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ). Este processo, entretanto, é um processo secundário que ocorre devido à transferência de carga de um substrato para a molécula de oxigênio [149]. Esta hipótese de geração de diferentes EROs, foi avaliada por meio do uso do *spin trap* PBN, sob as mesmas condições experimentais em que o *spin trap* TEMP foi utilizado. Como mostrado na figura 4.6 (b), ao utilizarmos PBN dois tipos de adutos foram detectados. O aduto 1 foi atribuído a forma desprotonada do PBN ( $PBN^{\bullet-}$ ), enquanto o aduto 2 é característico do aduto formado entre PBN e o radical

$\text{CH(OH)CH}_3^\bullet$ , resultado da interação entre radicais hidroxila e o etanol, utilizado como solvente para o PBN. Este aduto será identificado como  $\text{PBN-OH}^\bullet$ . As concentrações absolutas destas duas espécies em função do tempo de iluminação (570 nm) para a porfirina POR e para os sistemas híbridos POR/AuNP-cit e POR/AuNR são mostradas na figura 4.10 (a) e (b), respectivamente. Podemos observar que a porfirina POR e o sistema híbrido formado por POR/AuNR produzem concentrações similares de adutos de spin. Para o híbrido formado por POR/AuNP-cit, a formação de adutos do PBN não apresenta nenhuma melhoria se comparado à porfirina pura. Devemos notar também que a concentração absoluta de adutos gerados com PBN é cerca de duas ordens de magnitude menor quando comparada aos adutos gerados com TEMP (figura 4.8), indicando que o mecanismo dominante é, de fato, do tipo II, com formação direta de oxigênio no estado singleto. A partir da figura 4.10, é possível ver que a formação de adutos inicia-se após 10 minutos de iluminação, corroborando o fato de que a formação de adutos com PBN é um processo secundário. O aduto de spin 1 ( $\text{PBN}^\bullet$ ) é produzido inicialmente, e num segundo passo, ocorre formação do aduto 2 ( $\text{PBN-OH}^\bullet$ ). Entre 150 e 180 minutos, os adutos do PBN são destruídos, de forma similar ao que ocorre com o TEMP para tempos de iluminação longos. Isto se deve provavelmente ao ataque ao *spin trap* por concentrações altas de oxigênio singleto [127].



**Figura 4.10:** Concentração absoluta dos adutos de spin (em  $\mu\text{M}$ ) para PBN (a) aduto 1 ( $\text{PBN}^\bullet$ ) e (b) aduto 2 ( $\text{PBN-OH}^\bullet$ ) em função do tempo de iluminação (570 nm). As curvas são apenas guias.

Com o objetivo de confirmar que a transferência de energia entre o FS e a molécula de oxigênio com formação de  $^1O_2$  é, de fato, o processo dominante, foram realizados experimentos com supressores de espécies reativas de oxigênio, como D-manitol e  $NaN_3$ , ambos na concentração 100 mM [150]. Estes compostos são sequestradores de radicais (*radical scavengers*)  $OH^\bullet$  e  $^1O_2$ , respectivamente.



**Figura 4.11:** Concentrações absolutas dos adutos de spin 1 ( $PBN^\bullet$ ) e 2 ( $PBN-OH^\bullet$ ) para POR (a) e (b); sistema híbrido POR/AuNR (c) e (d), com PBN na presença dos supressores de  $OH^\bullet$  (D-manitol) e  $^1O_2$  ( $NaN_3$ ) para as amostras iluminadas com luz de comprimento de onda 570 nm.

A figura 4.11 mostra a concentração dos adutos de spin para os testes com armadilha de spin PBN para a porfirina POR ((a) e (b)) e o sistema híbrido formado com AuNR ((c) e (d)), irradiados com luz de comprimento de onda 570 nm na presença de

NaN<sub>3</sub> e D-manitol. Os testes realizados com PBN e D-manitol revelam que mesmo na presença do supressor para radicais hidroxila, o sistema híbrido é capaz de gerar ambos os adutos após 10 minutos de iluminação com luz amarela (570 nm). O mesmo comportamento é observado para a porfirina pura, porém a geração dos adutos se inicia após 30 minutos de iluminação. Estes atrasos podem ser explicados da seguinte maneira: uma vez que há uma quantidade suficiente de supressor nas soluções, a captura de radicais pelo *spin trap* será afetada. Os supressores sequestram os radicais mais rapidamente, mas assim que o supressor é consumido nas reações com as espécies reativas, os sistemas estarão aptos a gerar radicais novamente e adutos de spin surgirão. As constantes de reação para os *spin traps* usados e alguns supressores para <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e OH• são dadas na tabela 4.1.

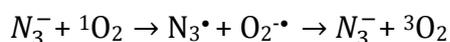
**Tabela 4.1:** Constantes de reação  $k$  (em s<sup>-1</sup>) dos supressores e *spin traps* usados com <sup>1</sup>O<sub>2</sub> e OH•, em solução aquosa [151-153] ou *in vitro* [154].

Espécie	TEMP	NaN <sub>3</sub>	PBN	D-manitol	DMSO
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	4,0x10 <sup>7</sup> (em pH 8,0) [151]	2,2x10 <sup>9</sup> [154]	1,4x10 <sup>8</sup> [152]	< 10 <sup>3</sup> [154]	3,4x10 <sup>7</sup> [154]
OH•	-	1,1x10 <sup>10</sup> (em pH 9,0) [154]	6,1x10 <sup>9</sup> [153]	2,7x10 <sup>9</sup> (em pH 7,0) [154]	7,1x10 <sup>9</sup> (em pH 7,0) [154]

O sistema híbrido, por ser mais eficiente que a porfirina isolada para gerar as espécies reativas, começa a produzir adutos com radical hidroxila de forma mais rápida. É importante notar que ao usarmos o supressor de oxigênio singlete NaN<sub>3</sub> (200 mM) não observamos a formação de nenhum tipo de aduto com TEMP ou PBN. De acordo com a literatura [155-158], o anion azida (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) reage com oxigênio singlete por meio de mecanismo de transferência de carga, gerando o radical azida (N<sub>3</sub>•) e superóxido (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>),

que reagem novamente recuperando a sua forma aniônica ( $N_3^-$ ) e levando a molécula de oxigênio para seu estado tripleto fundamental ( $^3O_2$ ) [155]:

(4.3).



Quando  ${}^1O_2$  é removido do processo, nenhuma outra espécie é gerada em quantidades mensuráveis. Ao usarmos  $NaN_3$  (100 mM) em combinação com TEMP, a concentração de oxigênio singleto é reduzida a quase zero. Este resultado é esperado, uma vez que  $NaN_3$  é um inibidor apropriado para  ${}^1O_2$ .

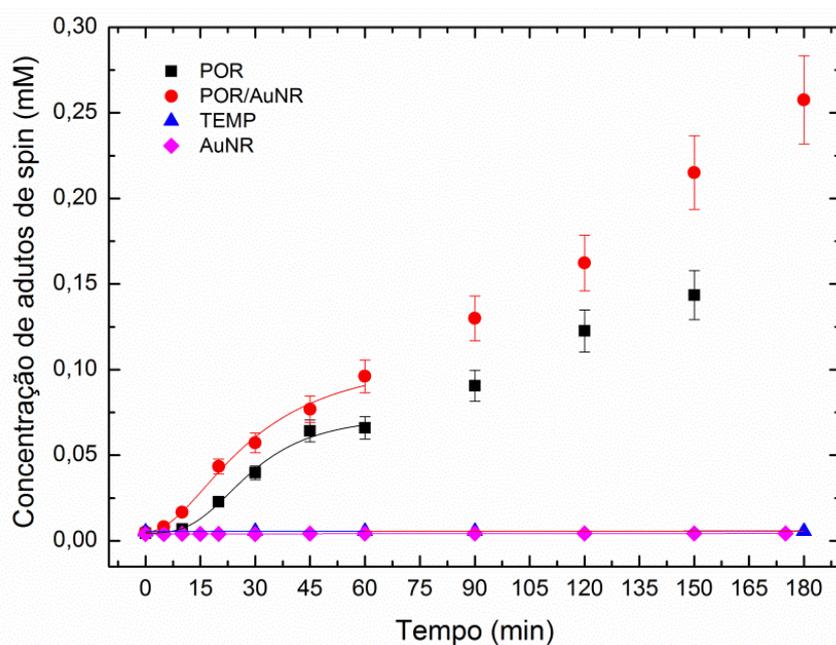
#### 4.4.2 – Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras irradiadas com luz ultravioleta (UVA)

Até o presente momento, nossos estudos estão associados a processos fotoquímicos envolvendo porfirinas, em que iluminação na faixa do visível foi utilizada para promover a excitação das moléculas do fotossensibilizador no estado singleto fundamental ( $S_0$ ) para o estado singleto excitado  $S_1$  (estado excitado de menor energia). A molécula do FS em seu estado  $S_1$  pode sofrer emissão fluorescente ao retornar ao seu estado fundamental ou passar por cruzamento intersistemas, decaindo para um estado tripleto excitado ( $T_1$ ), que participa das reações envolvidas nos mecanismos tipo I e II em TFD (veja figura 2.1).

Na literatura não há muitos trabalhos associados ao uso de radiação fora da região visível/infravermelho para excitação de porfirinas em TFD. Uma das razões possíveis é a dificuldade de penetração de radiação com comprimentos de onda menores que 750 nm em tecidos [10]. Para avaliar a atividade da porfirina POR sob excitação UVA, iluminamos amostras contendo porfirina e híbrido com nanobastões de ouro com laser UVA (375 nm).

Na figura 4.12 vemos a concentração de oxigênio singleto gerado sob radiação UVA em função do tempo de iluminação. A porfirina POR pura é capaz de gerar oxigênio

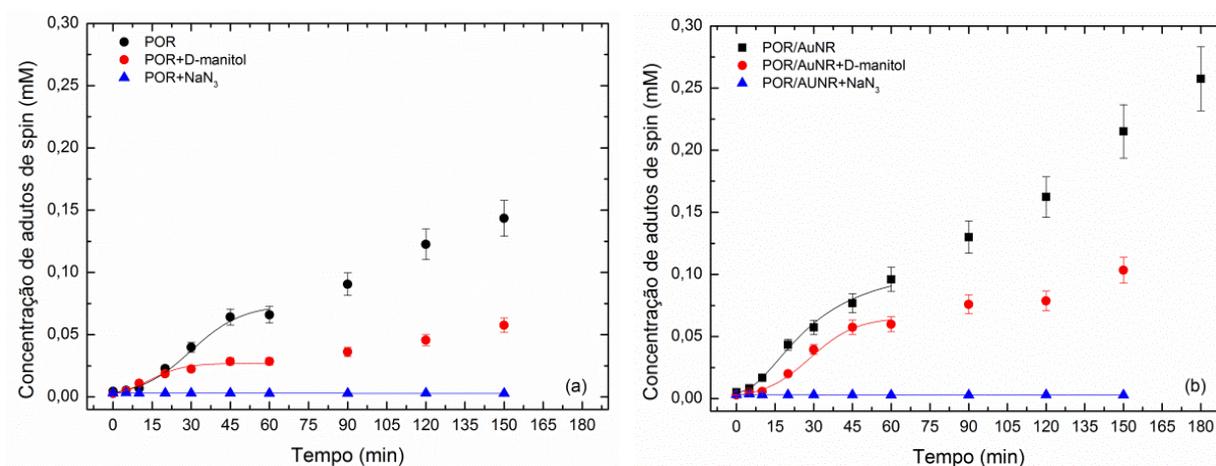
singleto e esse efeito é amplificado na presença dos nanobastões de ouro (figura 4.12). Porém, o efeito da adição de AuNR não é tão significativo em comparação à porfirina pura. Nas concentrações utilizadas em solução aquosa (TEMP (1M), AuNR ( $4,5 \times 10^{12}$  NR/mL) e POR ( $14,5 \mu\text{M}$ )) TEMP e AuNR puros não geram espécies reativas de oxigênio. Devemos notar que o comprimento de onda utilizado para iluminação (375 nm) encontra-se distante das bandas de ressonância plasmônica dos nanobastões de ouro e da banda de Soret da porfirina, de forma que o efeito de amplificação do campo na presença dos nanobastões de ouro não deve ser o responsável pela leve melhoria do sistema híbrido na geração de oxigênio singleto. Além disso, vemos que a geração de oxigênio singleto obedece a uma cinética diferente daquela observada sob iluminação com luz visível (570 nm). Há inicialmente um crescimento mais lento, seguido por crescimento rápido após 60 minutos de iluminação.



**Figura 4.12:** Concentração dos adutos de spin  $\text{TEMP-}^1\text{O}_2$  gerados sob iluminação com laser UV (375 nm) para porfirina POR, AuNR puro e híbrido POR/AuNR, em função do tempo de iluminação.

A fim de avaliar quais espécies reativas de oxigênio estão envolvidas na geração de oxigênio singleto, utilizamos novamente os supressores  $\text{NaN}_3$  (para  $^1\text{O}_2$ ) e D-manitol (para eliminar  $\text{OH}^\bullet$ ). Na figura 4.13 são mostrados as concentrações dos adutos de spin

com TEMP para POR (figura 4.13 (a)) e o híbrido POR/AuNR (figura 4.13 (b)) na presença de supressores  $\text{NaN}_3$  (200 mM), D-manitol (200 mM). Vemos que  $\text{NaN}_3$  reduz a concentração dos adutos de forma eficiente, corroborando nossos resultados de que  $^1\text{O}_2$  é a espécie capturada pelo TEMP, no sistema iluminado com luz UVA. Para POR, durante os 20 minutos iniciais, o D-manitol não causa redução drástica na geração dos adutos, porém, após 20 minutos há redução mais acentuada nestas concentrações, o que pode indicar a formação de radicais hidroxila durante o processo de iluminação que, por meio de reações secundárias, poderiam gerar oxigênio singlete (figura 4.13 (a)). Se radicais hidroxila são gerados a partir de iluminação com UVA, de alguma forma estes radicais são convertidos a oxigênio singlete, num mecanismo que será discutido na próxima sessão. O uso de D-manitol e, conseqüentemente, eliminação de possíveis radicais hidroxila do processo, afeta a formação dos aduto TEMP- $^1\text{O}_2$ . D-manitol pode reagir com  $^1\text{O}_2$  (tabela 4.1), mas de forma mais lenta que o TEMP.

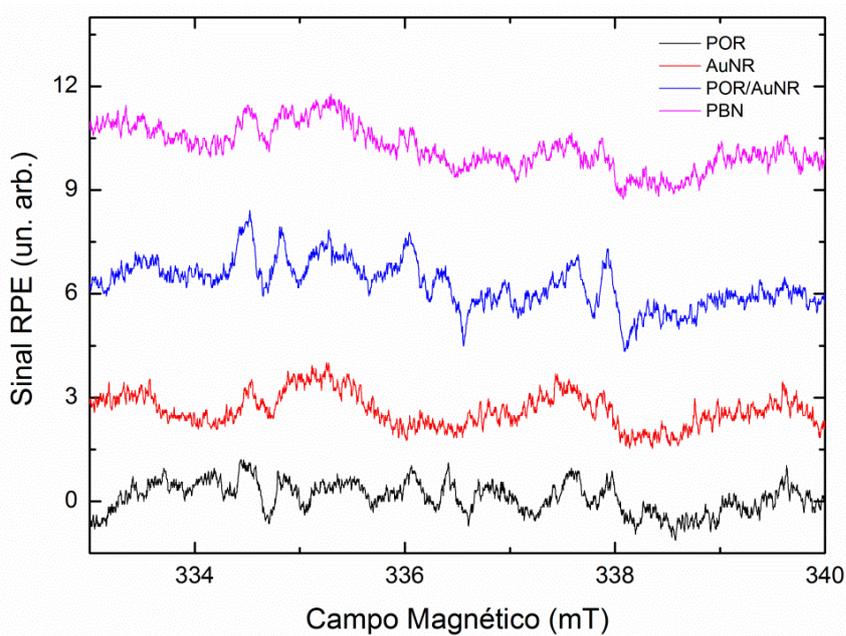


**Figura 4.13:** Concentração dos adutos de spin TEMP- $^1\text{O}_2$  gerados sob iluminação com laser UV (375 nm) para porfirina POR em (a) e seu híbrido POR/AuNR em (b) na presença de supressores  $\text{NaN}_3$  (200 mM) e D-manitol (200 mM).

É possível observar pelas figuras 4.12 e 4.13 que durante os 60 minutos iniciais de iluminação, as curvas concentração x tempo apresentam forma sigmoidal. Esse tipo de função geralmente descreve sistemas onde há reações de autocatálise [148, 159, 160]. As reações de autocatálise envolvem um passo inicial de indução de uma dada espécie química que ajuda a catalisar a sua própria formação. Inicialmente a curva

apresenta um crescimento lento, etapa onde a espécie de interesse começa a ser gerada e, em seguida, as espécies geradas podem catalisar a formação de mais espécies [160]. Reações que envolvem autocatálise serão discutidas adiante.

Para detectar a existência de radicais hidroxila, utilizamos a armadilha de spin PBN (85 mM) solubilizado em etanol e água deionizada (1:1 v/v). Durante 120 minutos sob luz UVA não verificamos a formação de radicais hidroxila mensuráveis para nenhum dos sistemas (figura 4.14): PBN puro, PBN+POR, PBN+AuNR ou PBN+POR/AuNR.



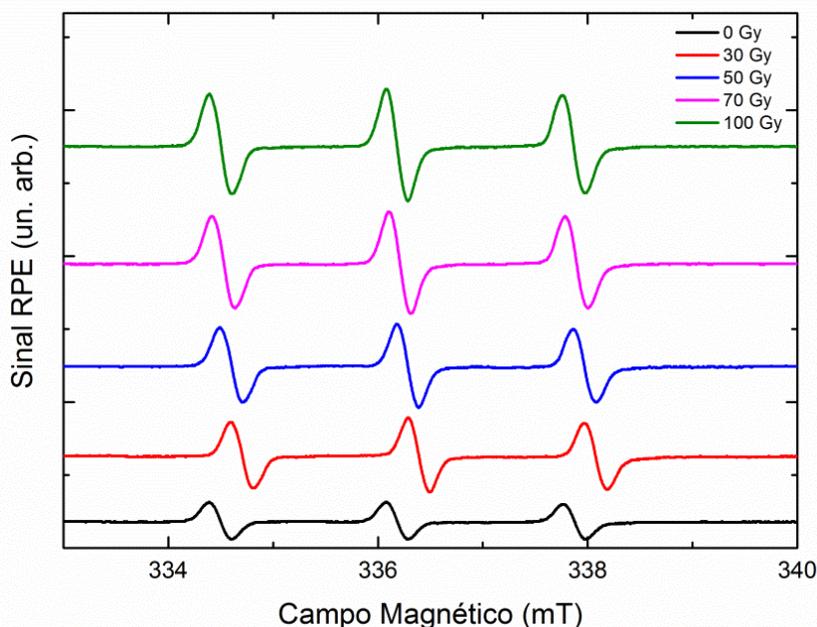
**Figura 4.14:** Espectros de RPE gerados sob iluminação com laser UV (375 nm) com PBN (85 mM) para porfirina POR, AuNR, híbrido POR/AuNR e PBN puro após 120 minutos de iluminação.

#### 4.4.3 - Ressonância Paramagnética Eletrônica das amostras irradiadas com raios gama

Um dos objetivos do nosso trabalho é determinar o papel desempenhado por nanoestruturas de ouro na geração de EROs sob radiação ionizante. Muitos trabalhos existentes na literatura indicam um aumento na geração de EROs em sistemas onde há presença de nanopartículas de ouro sob raios X ou gama [40, 67, 75, 161]. Neste sentido,

nos propusemos a investigar a geração de EROs do sistema híbrido sob radiação ionizante, num possível efeito sinérgico. Os resultados foram obtidos irradiando-se soluções aquosas do *spin trap* TEMP (1 M), AuNR e POR (nas mesmas concentrações utilizadas com iluminação no visível e UVA) e supressores NaN<sub>3</sub> (200 mM) para oxigênio singleto e DMSO para hidroxila [162]. O PBN (85 mM) foi preparado numa mistura de etanol e água (1:1 v/v). As amostras para irradiação com raios gama foram preparadas como descrito na seção 3.6.2 e as mesmas foram irradiadas no Laboratório de Irradiação Gama (LIG) pertencente ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). Foram utilizados raios gama produzidos por fonte de <sup>60</sup>Co com feixe de fótons com energias de 1,17 MeV e 1,33 MeV e doses de 0 a 100 Gy.

Espectros RPE dos adutos de spin com TEMP para a porfirina (POR) pura em função da dose de irradiação gama são mostrados na figura 4.15. O sinal de três linhas característico do radical TEMPOL, gerado pela reação de adição entre TEMP e <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, pode ser visto. De acordo com nossas simulações, este aduto possui os seguintes parâmetros do Hamiltoniano de spin:  $g = 2,0056(2)$ ,  $a_N = 1,69(2)$  mT. Estes parâmetros são idênticos aos encontrados para os sistemas contendo TEMP sob iluminação no visível. Atribuímos este aduto à captura pelo TEMP de oxigênio singleto gerado sob radiação ionizante. O provável mecanismo será discutido adiante.



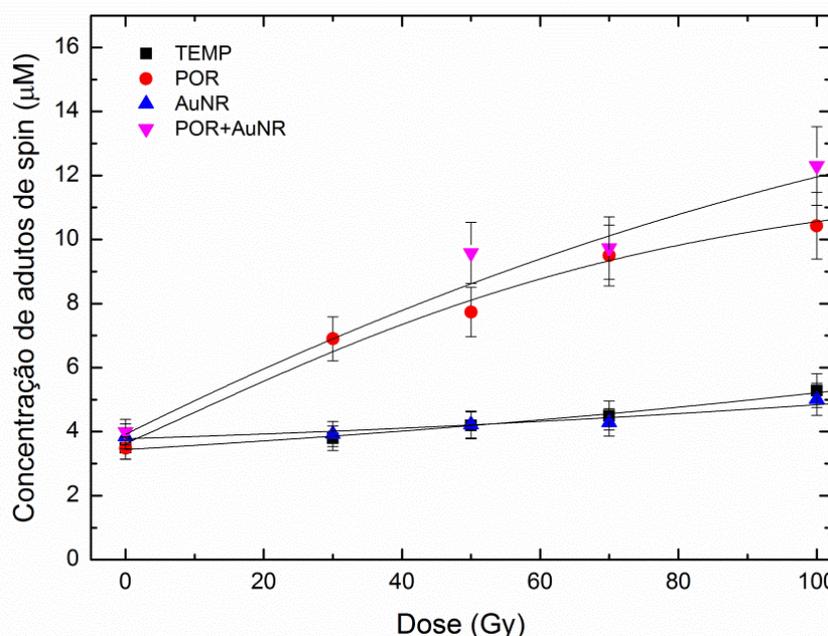
**Figura 4.15:** Espectros RPE do aduto de spin TEMP- $^1\text{O}_2$  para porfirina POR em função da dose de radiação gama.

Na figura 4.16, observa-se a concentração dos adutos de spin TEMP- $^1\text{O}_2$  em função da dose de radiação (raios gama) a que as amostras de AuNR, POR e POR/AuNR foram submetidas (30 a 100 Gy). Podemos perceber que a concentração dos adutos de spin é dependente da dose para todas as amostras irradiadas: TEMP puro e na presença do híbrido POR/AuNR ou de seus componentes individuais. A concentração dos adutos de spin detectados para POR e híbrido é semelhante, com somente um leve aumento para o híbrido, o que sugere que a porfirina pura e o híbrido POR/AuNR podem ser usados como radiosensibilizadores.

O próprio TEMP puro é capaz de produzir adutos de spin que aumentam em função da dose. Porém, esse efeito não é dominante, uma vez que as concentrações detectadas para TEMP puro são mais baixas em comparação às demais amostras. O fato de que a solução contendo TEMP puro é capaz de gerar adutos sugere que outros mecanismos, além do mecanismo tipo II em TFD, estão envolvidos na geração de oxigênio singlete. É possível que  $^1\text{O}_2$  esteja sendo gerado por meio de reações entre outras espécies geradas a partir da radiólise da água, como radicais hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ),

radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidropoxila ( $HO_2^{\cdot}$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) [163].

Os nanobastões de ouro podem gerar adutos com concentrações que aumentam em função da dose, mas em menor concentração que as demais amostras, incluindo o TEMP puro. É difícil afirmar quais reações ocorrem, pois sob radiação ionizante, além de formação de radicais a partir do oxigênio molecular e da radiólise da água, o surfactante CTAB dos AuNR e a porfirina podem atuar de maneira diferente daquela observada quando iluminados com luz UVA ou no visível. Ao comparar as concentrações de oxigênio singlete geradas pelo híbrido e por seus componentes individuais, vemos que é possível que a porfirina seja responsável pela geração de  $^1O_2$  capturado pelo TEMP, ou de outras espécies que podem reagir levando a  $^1O_2$  como produto final.

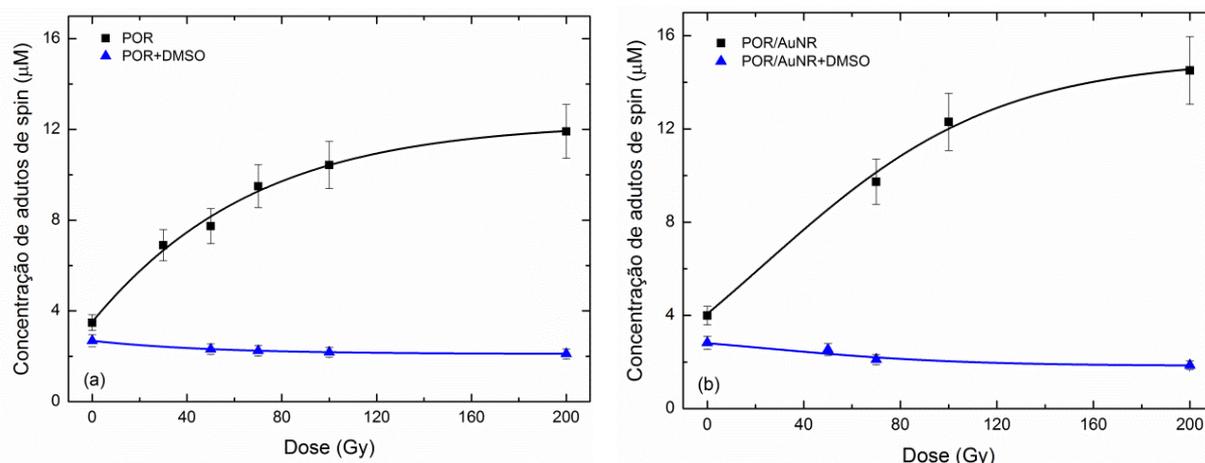


**Figura 4.16:** Concentração do aduto de spin TEMP- $^1O_2$  para porfirina POR, AuNR, híbrido POR/AuNR e TEMP puro em função da dose de radiação gama.

A influência dos supressores foi analisada adicionando-se 25  $\mu$ L de  $NaN_3$  (concentração inicial de 200 mM) ou DMSO às soluções, de forma semelhante à realizada para irradiação no visível/UVA. Sob radiação gama, o uso de  $NaN_3$  não nos permitiu chegar a resultados conclusivos. A adição de  $NaN_3$  (dados não mostrados aqui) mostrou-

se pouco influente na redução da concentração do aduto para a porfirina pura, enquanto que para o híbrido este efeito foi mais efetivo. Ainda assim foi possível detectar  $^1\text{O}_2$ . Isso é um fator de estranhamento, uma vez que  $\text{NaN}_3$  mostrou-se extremamente eficiente na supressão de oxigênio singleto gerado sob luz visível. Considerando-se que a concentração dos adutos gerados é agora cerca de uma ordem de grandeza menor se comparado à iluminação com 570 nm (figura 4.8), a quantidade de azida de sódio usada deveria ser suficiente para suprimir tal concentração de oxigênio singleto. Além disso, não conhecemos o comportamento deste composto sob raios gama e não há relatos na literatura sobre a eficiência do azida de sódio na supressão de oxigênio singleto gerado por radiação gama. Já o DMSO possui alta reatividade com radicais hidroxilas [162], sendo utilizado como supressor nos testes com radiação gama.

A substituição do D-manitol pelo DMSO como supressor de radicais  $\text{OH}^\bullet$ , se deve ao fato de que a molécula do D-manitol possui seis grupos OH por molécula, cujas ligações poderiam ser quebradas pela radiação ionizante o que levaria a um aumento indesejado na concentração de radicais  $\text{OH}^\bullet$ . Na figura 4.17 vemos o efeito de supressão causado pelo DMSO, onde se percebe que os adutos de spin formados para os sistemas contendo a porfirina pura e híbrido são fortemente suprimidos pelo DMSO (figuras 4.17 (a) e (b)).



**Figura 4.17:** Comparação do efeito do supressor DMSO para o aduto de spin  $\text{TEMP-}^1\text{O}_2$  para porfirina POR pura em (a) e POR/ AuNR em (b).

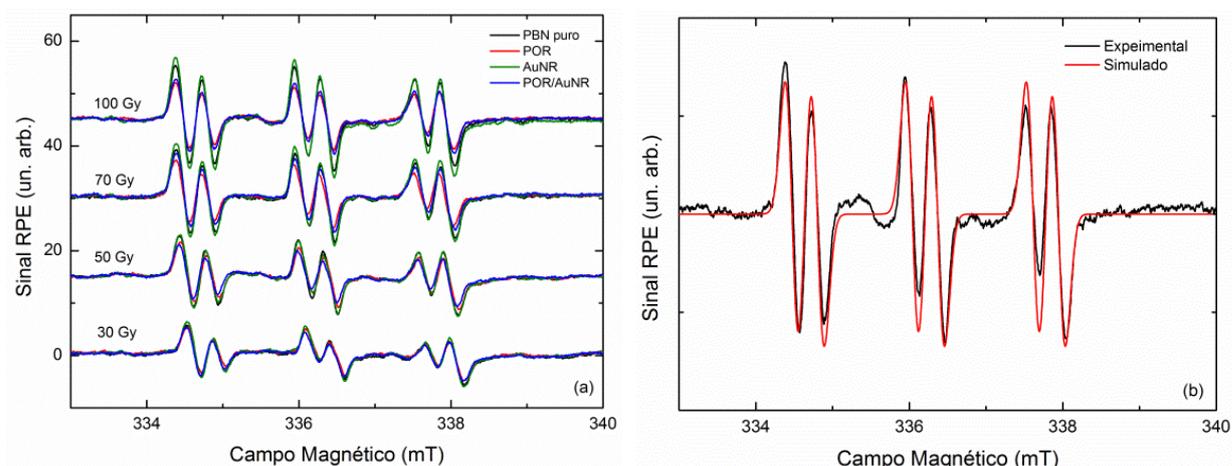
Duas hipóteses são possíveis para o caso da porfirina pura sob radiação gama: (i) a porfirina é excitada pelos fótons e elétrons Compton espalhados, considerando-se que a energia do feixe (na ordem de MeV) favorece este processo, o que aumentaria a eficiência da porfirina em gerar  $^1\text{O}_2$  ou, até mesmo,  $\text{O}_2\cdot$  por meio de transferência de carga característico do mecanismo tipo I em TFD; (ii) não muito provável, o TEMP poderia sofrer desprotonação causada pela quebra da ligação com o grupo OH na posição 4 no anel piperidina da molécula do *spin trap*, tornando-o radicalar. A primeira hipótese pode ser justificada, pois as amostras contendo híbrido e POR apresentam a mesma quantidade de porfirina e apresentam rendimentos semelhantes na geração do aduto. A segunda hipótese, entretanto, não deve ocorrer, pois a concentração de TEMP usada é a mesma para todas as amostras irradiadas, porém as quantidades de aduto geradas variam entre os sistemas testados.

O DMSO, por sua vez, tem um efeito muito forte na supressão do sinal do aduto TEMP- $^1\text{O}_2$ , o que nos indica que a radiólise da água é responsável pela formação dominante de radicais hidroxila e sua captura eficiente pelo DMSO, impedindo que estes radicais reajam posteriormente para gerar  $^1\text{O}_2$ , capturado pelo TEMP na sequência. Pela tabela 4.1 podemos perceber que a taxa de reação entre DMSO e radicais hidroxila é bem rápida ( $k = 7,1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) e, apesar do mesmo interagir com  $^1\text{O}_2$ , a reação é mais lenta ( $k = 3,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [154].

O DMSO é responsável pela supressão de radicais  $\text{OH}\cdot$ , o que nos leva a acreditar (a partir da figura 4.17) que, sob radiação ionizante, a geração de oxigênio singlete é um processo secundário, de forma que  $^1\text{O}_2$  é gerado após a produção de radicais  $\text{OH}\cdot$ , num mecanismo indireto.

A figura 4.18 (a) mostra os espectros RPE das amostras irradiadas com *spin trap* PBN para avaliar a geração de radicais hidroxila. Devido à radiólise da água, o PBN puro, que está dissolvido numa mistura de etanol e água, é capaz de gerar adutos de spin cujos parâmetros do Hamiltoniano de spin foram encontrados por meio de simulação (figura 4.18 (b)):  $g = 2,0060(1)$ ,  $a_N = 1,575(2) \text{ mT}$  e  $a_H = 0,33(2) \text{ mT}$ . Esses parâmetros são semelhantes àqueles obtidos para a captura do radical  $\alpha$ -hidroxietila pelo PBN num sistema onde  $\text{H}_2\text{O}_2$  sofre fotólise na presença de água e etanol [164]. Radicais  $\text{OH}\cdot$  reagem com etanol para formar o radical  $\alpha$ -hidroxietila ( $\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3\cdot$ ) [165, 166] que é

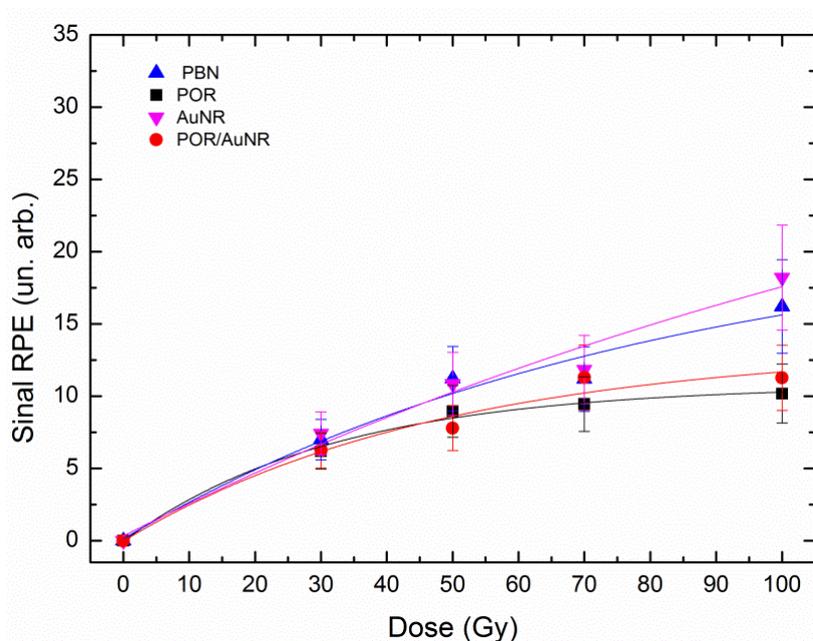
posteriormente capturado pelo PBN. As amostras não irradiadas (0 Gy) não apresentam sinal RPE.



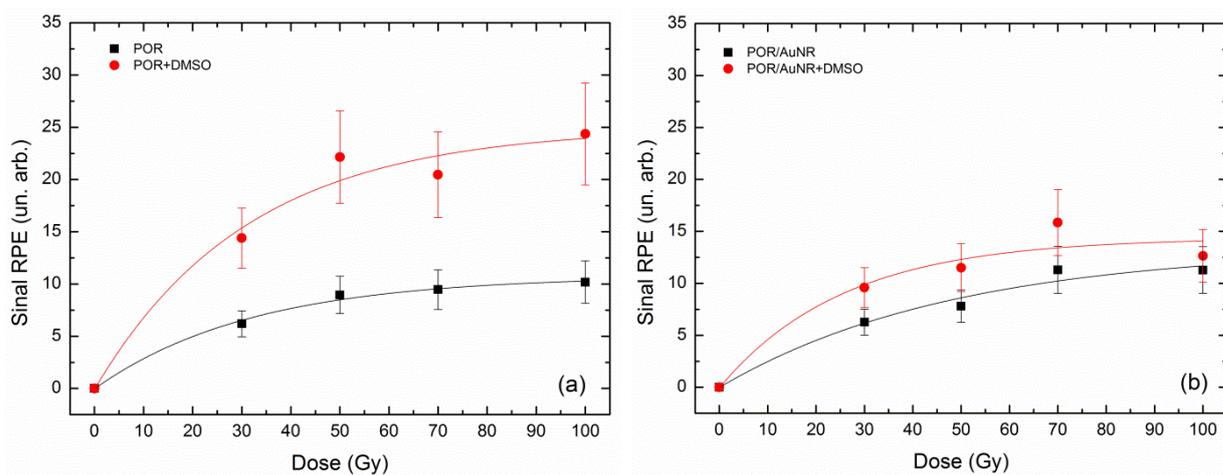
**Figura 4.18:** Espectros RPE dos adutos de spin formados na presença de PBN (85 mM em solução de etanol e água 1:1 v/v) para porfirina POR, POR/AuNR, AuNR e PBN puro, em função da dose de radiação gama (a). Em (b) vemos a simulação do aduto de spin PBN-CH(OH)CH<sub>3</sub>• (curva em vermelho) em comparação com sinal gerado pelo híbrido POR/AuNR na presença do PBN irradiado com 100 Gy (curva em preto).

A concentração de radicais detectados com PBN são relativamente baixas (da ordem de  $\mu\text{M}$ ). Como pode ser visto na figura 4.18, os espectros de RPE dos adutos com PBN são ruidosos, o que dificulta uma análise quantitativa deste grupo de amostras. Neste caso, utilizamos um método que se baseia na média da soma das intensidades pico a pico dos espectros de cada amostra em função da dose de irradiação. Assim, é possível comparar a eficiência na geração de adutos com PBN das diferentes amostras. As quantidades de adutos obtidos com PBN, por esse método, são mostradas nas figuras 4.19 e 4.20. Na figura 4.19 percebemos que, na presença de AuNR, a concentração dos adutos de spin PBN-CH(OH)CH<sub>3</sub>• é ligeiramente maior que nos demais sistemas (PBN puro, POR e híbrido). Vale notar que a concentração dos adutos gerados pela porfirina e híbrido POR/AuNR são ligeiramente menores que para o PBN puro (figura 4.19). A figura 4.20 mostra a evolução dos adutos de spin na presença de DMSO. Há um aumento (não esperado) na concentração dos adutos em relação à porfirina pura e híbrido. Este aduto está associado à adição do radical CH<sub>3</sub>•, gerado pela interação entre DMSO e OH•, à

molécula de PBN, com taxa de reação  $k \sim 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [167], como discutido anteriormente.



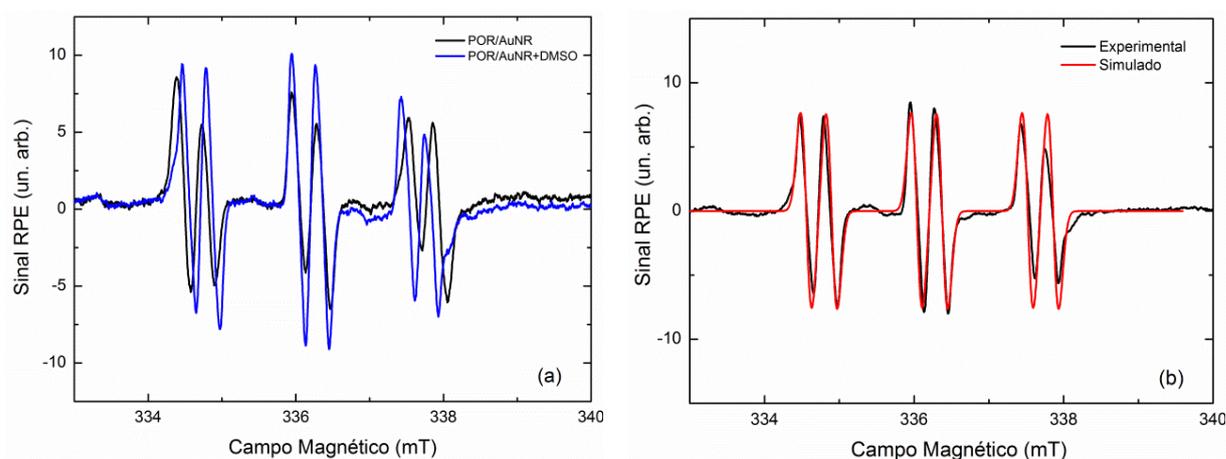
**Figura 4.19:** Quantificação dos adutos de spin com PBN gerados por radiação gama para porfirina POR, AuNR e híbrido nas doses 0, 30, 50, 70, 100 Gy.



**Figura 4.20:** Quantificação dos adutos de spin com PBN gerados por radiação gama na presença de DMSO para (a) porfirina POR e (b) híbrido nas doses 0, 30, 50, 70, 100 Gy.

Por meio de simulações podemos perceber que com DMSO, os parâmetros de acoplamento hiperfino do aduto de spin mudam. Em solução aquosa as constantes hiperfinas são  $a_N = 1,57(2)$  mT e  $a_H = 0,33(2)$  mT. Na presença de DMSO, a simulação fornece os valores das constantes de acoplamento hiperfino:  $a_N = 1,48(2)$  mT e  $a_H = 0,33(2)$  mT. A redução no valor de  $a_N$  com a adição de DMSO é devido à captura de outro radical na solução, mas também pode ser associado à redução da polaridade da mistura de solvente, uma vez que a constante hiperfina é um parâmetro afetado pela polaridade [117, 168].

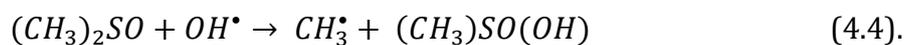
Na figura 4.21 (a) podemos comparar os sinais RPE do aduto do PBN na presença do híbrido POR/AuNR irradiado sem supressor e na presença de DMSO. Na solução contendo água e uma pequena fração de etanol (utilizado para dissolver o PBN) a espécie capturada é o radical  $\alpha$ -hidroxietila (linhas pretas, figura 4.21 (a)), enquanto percebe-se uma mudança nos parâmetros RPE na presença de DMSO (linhas azuis, figura 4.21 (a)).



**Figura 4.21:** Espectros RPE dos adutos de spin formados na presença de PBN (85 mM em solução de etanol e água 1:1 v/v) para POR/AuNR para as doses de 70 Gy com e sem DMSO (a). Em (b) vemos a simulação do aduto de spin PBN-CH<sub>3</sub>• (curva em vermelho) em comparação com sinal gerado pelo híbrido POR/AuNR na presença de DMSO irradiado com 100 Gy (curva em preto).

A decomposição radiolítica do DMSO pode produzir radicais CH<sub>3</sub>• [161], além de produzir esta mesma espécie devido à interação com radicais hidroxila descrita pela

equação 4.4. Na presença de DMSO, radicais hidroxila interagem com este solvente para gerar radicais  $CH_3^\bullet$  que são capturados por PBN para formar um aduto  $PBN-CH_3^\bullet$ , de acordo com as reações 4.4 e 4.5 [169]:



Os parâmetros do Hamiltoniano de spin do aduto  $PBN-CH_3^\bullet$  obtidos por meio de simulação estão bem próximos dos valores reportados por Polyakov e colaboradores ( $a_N = 1,49$  mT e  $a_H = 0,34$  mT) [169].

## 4.5 – Discussão dos Resultados

A seguir, discutiremos os resultados obtidos nas sessões anteriores, com elucidação das espécies reativas de oxigênio formadas, bem como os mecanismos de formação envolvidos. Iniciaremos nossa discussão com os resultados obtidos com luz visível (570 e 630 nm), seguidos pelos resultados obtidos utilizando-se fontes de iluminação mais energéticas (UVA e raios gama).

### 4.5.1 – Híbrido POR/AuNR irradiado com luz visível

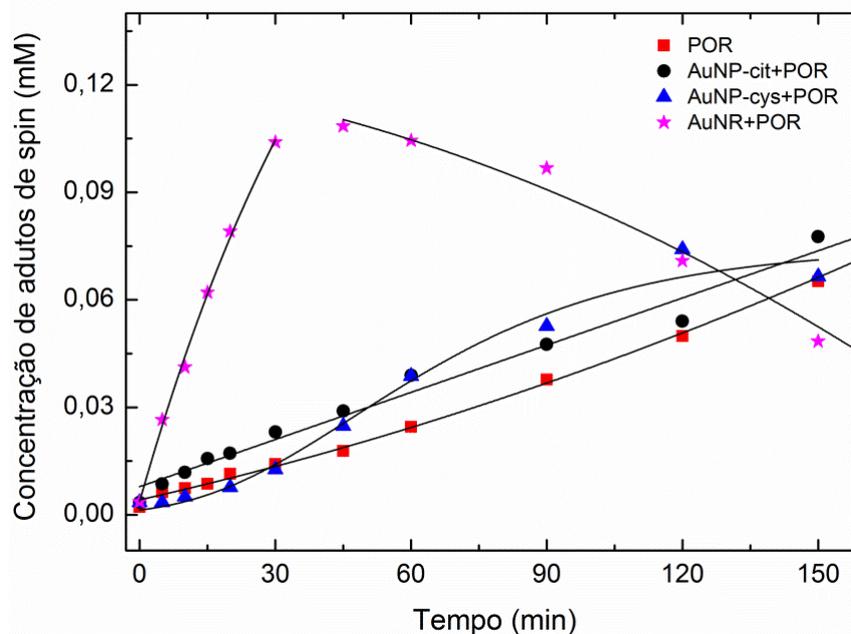
Nanopartículas metálicas (NPM), como as nanoestruturas de ouro, possuem a capacidade de aumentar o campo elétrico próximo a sua superfície<sup>18, 29, 170</sup>. O aumento na geração de oxigênio singleto pela presença de metais foi descrito anteriormente<sup>29</sup> por meio do aumento da emissão fluorescente do corante Rosa de Bengala quando usado entre filmes de prata bem próximos excitados por UV. O aumento na geração de oxigênio singleto pelo FS chega a ser três vezes maior se comparado a um controle onde o Rosa de Bengala se encontra entre lâminas de vidro sem prata. Por outro lado, é conhecido que fluoróforos, quando muito próximos de nanopartículas metálicas, apresentam um aumento na fluorescência devido ao aumento do campo local próximo à superfície da nanoestrutura metálica [25, 171]. A explicação para este efeito se deve a existência da ressonância plasmônica de superfície das NPM que aumentam a intensidade do campo eletromagnético em torno do fluoróforo, promovendo o acoplamento com o campo da luz incidente e aumentando a emissão fluorescente [171]. De maneira semelhante, para sistemas híbridos, a sobreposição das bandas de absorção do FS e de ressonância plasmônica das nanopartículas metálicas, aumenta a atividade fotodinâmica do FS [19], conduzindo a um aumento na geração de oxigênio singleto [19, 170, 172, 173]. Zuloaga e coautores mostraram um efeito anisotrópico de amplificação do campo para nanobastões de Ag de diferentes razões de aspecto (razão entre comprimento e diâmetro) usando cálculos teóricos baseados na mecânica quântica e usando teoria eletromagnética clássica [174]. Embora haja uma discrepância nos resultados fornecidos pelas duas teorias para distâncias menores que 0,5 nm, há uma

concordância nos cálculos que indicam que para nanopartículas esféricas (razão de aspecto = 1) de Ag a amplificação do campo é menos pronunciada quando comparada às nanoestruturas de maior razão de aspecto. Lin et al. [175] simularam a dependência do campo elétrico local com a razão de aspecto para nanobastões de ouro. Seus resultados mostraram que nanobastões de ouro menores ( $85,6 \pm 5,5$  nm por  $22,4 \pm 2,1$  nm), produzem um campo elétrico mais forte em sua vizinhança e o campo local diminui com o aumento do tamanho dos bastões (comprimento e diâmetro) [175].

Para o sistema híbrido formado pela porfirina POR e AuNR, propomos um mecanismo no qual há transferência de energia da nanoestrutura de ouro para o FS. O comprimento de onda de excitação (570 nm) se encontra na faixa de sobreposição das bandas de absorção da POR e AuNR. Então, a energia de desexcitação do FS pode ser transferida para o oxigênio molecular na vizinhança do híbrido, aumentando a eficiência do FS para gerar EROs. Devemos notar que, em nosso caso, nenhum tipo de funcionalização química foi realizada para ligar a porfirina à superfície da nanoestrutura. Mecanismo semelhante foi proposto por Oo et al. [31, 170] num sistema formado por nanopartículas esféricas de diferentes tamanhos conjugadas ao ácido 5-aminolevulínico e protoporfirina IX. Os autores confirmaram uma dependência entre o tamanho das nanopartículas de ouro e a geração de espécies reativas de oxigênio com o campo localizado das nanopartículas. Este efeito foi mais pronunciado para partículas esféricas maiores, levando a um campo elétrico mais forte e aumento da absorção das moléculas da vizinhança [170]. Para partículas esféricas de diâmetros 19, 66 e 106 nm o aumento na geração de espécies reativas de oxigênio foi 1 : 2,5 : 4,7, valores que estão em acordo com simulações para distribuição do campo elétrico em 530 nm em função do tamanho das nanopartículas [170]. Em um sistema similar composto por AuNR recobertos com sílica e indocianina verde [173], os resultados obtidos com RPE aliada à *spin trapping*, mostraram um aumento de 6,3 vezes na geração de  $^1\text{O}_2$  após 3 minutos de iluminação quando comparados com a indocianina verde pura, para iluminação das amostras com laser de comprimento de onda 808 nm (radiância =  $8 \text{ W/m}^2$ ). Nossos resultados mostraram um aumento de 10 vezes na produção de  $^1\text{O}_2$  para o híbrido POR/AuNR após 20 minutos de irradiação utilizando uma fonte de radiação com radiância muito menor (da ordem de  $\text{mW/cm}^2$ ). Mooi e Heyne encontraram um aumento de 3,8 vezes na produção de oxigênio singleto, utilizando um híbrido formado

por um núcleo de AgNP recoberto com sílica e Rosa de Bengala, em comparação com o mesmo sistema após remoção do núcleo metálico [110]. Neste sistema as moléculas de Rosa de Bengala foram ligadas covalentemente à superfície de sílica que recobre o núcleo de Ag. Em nosso híbrido assumimos uma atração eletrostática entre os componentes do sistema, como evidenciado pelas medidas de potencial Zeta (seção 4.2). Embora a atração eletrostática favoreça a otimização da distância para uma transferência de energia eficiente, o principal responsável pelo efeito sinérgico na geração de oxigênio singlete é o efeito de amplificação do campo elétrico na vizinhança do nanobastão metálico.

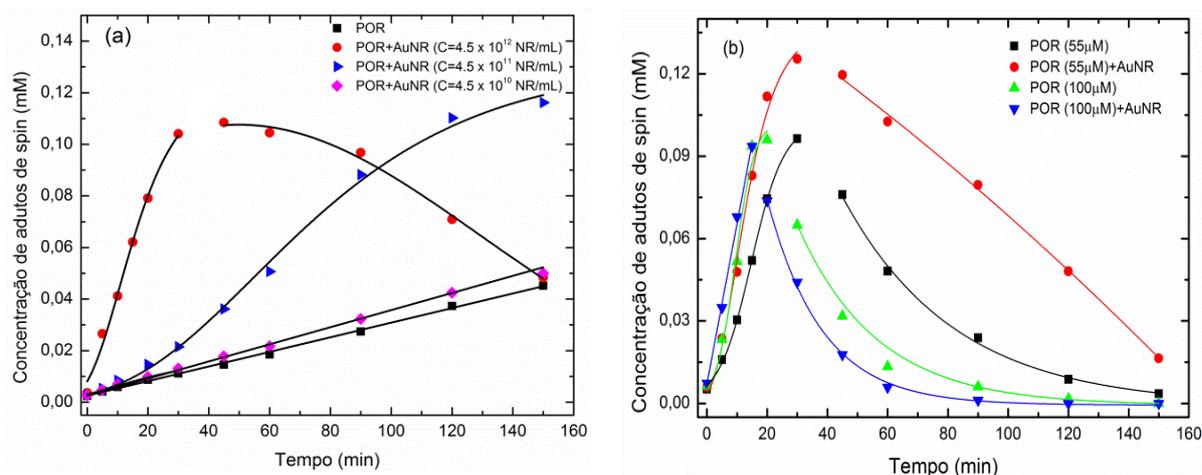
Nossos resultados, entretanto, mostram um efeito sinérgico desprezível para o híbrido formado por AuNP-cit (20 nm) e POR. Além de um campo menos intenso em torno das AuNP quando comparadas à AuNR, este fato pode ser explicado, por meio dos resultados obtidos para o potencial Zeta das AuNP-cit e POR. Ambas possuem carga superficial negativa, levando a repulsão eletrostática entre os componentes do híbrido. Os resultados do potencial Zeta obtidos para as nanoestruturas sugerem uma atração eletrostática entre AuNR e POR, já que ambos apresentam cargas de superfície opostas. Este híbrido é, de fato, mais eficiente na produção de  $^1\text{O}_2$  que o outro formado por AuNP-cit e POR, ambos de carga superficial negativa. A fim de estudar se esta interação é o fator limitante deste híbrido para o aumento observado na produção de  $^1\text{O}_2$  por POR/AuNR, sintetizamos nanopartículas esféricas carregadas positivamente (AuNP-cys) para comparar os resultados com aqueles obtidos para o híbrido POR/AuNR. A figura 4.22 mostra a concentração de adutos obtidos para o híbrido POR/AuNP-cys em comparação aos híbridos POR/AuNR e POR/AuNP-cit, quando iluminados com luz amarela (570 nm). A concentração de AuNP-cit e AuNP-cys foi mantida constante em todos os experimentos ( $10^{12}$  NP/mL). Os resultados utilizando-se o *spin trap* TEMP mostram que a quantidade de  $^1\text{O}_2$  gerada pelo híbrido com as nanopartículas positivamente carregadas é ligeiramente maior se comparado à porfirina pura. A constante de reação estimada foi aproximadamente uma ordem de grandeza menor ( $5,8(6) \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ) para o híbrido POR/AuNP-cys em comparação à POR/AuNR. Estes resultados corroboram nossa hipótese de que o efeito de amplificação do campo é mais pronunciado próximo à superfície dos nanobastões de ouro. Isto sugere que o processo de geração de oxigênio singlete é dependente da forma da nanoestrutura metálica.



**Figura 4.22:** Concentração absoluta de adutos de spin  $\text{TEMP-}^1\text{O}_2$  em função do tempo de iluminação com luz amarela (570 nm). Soluções aquosas contendo spin trap TEMP + porfirina (POR) e sistemas híbridos TEMP + POR/AuNP-cit, TEMP + POR/AuNP-cys e TEMP + POR/AuNR. A concentração de todos os reagentes é mantida constante. As curvas são apenas guias para os olhos.

Outra série de medições foi realizada variando-se a concentração de nanobastões de ouro (figura 4.23) e mantendo-se constante a concentração da porfirina. Os resultados sugerem que os nanobastões de ouro na concentração  $4,5(4) \times 10^{11}$  NR/mL no sistema híbrido com POR ( $14,5 \mu\text{M}$ ) e sob irradiação com comprimento de onda (570 nm), mesmo num sistema diluído 10 vezes, apresentam um efeito sinérgico no híbrido (constante de reação  $6,26 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ ). Efeito semelhante ao observado para a concentração maior de AuNR ocorre, porém há um atraso até que a concentração máxima de aduto gerado seja atingida. Para concentrações mais baixas ( $4,5(4) \times 10^{10}$  NR/mL, *i.e.*, diluição de 100x) este efeito não foi observado durante 150 minutos de iluminação. Quando aumentamos a concentração da porfirina POR ( $55 \mu\text{M}$  e  $100 \mu\text{M}$ ) e mantemos a concentração inicial de AuNR em  $4,5(4) \times 10^{12}$  NR/mL, a eficiência do híbrido não apresenta grandes variações para tempos curtos de iluminação (figura 4.23 (b)), mas é importante notar que concentrações altas de  $^1\text{O}_2$  causam uma destruição mais rápida do aduto de spin com TEMP (após 10 minutos de iluminação para a

concentração mais alta de POR (100  $\mu\text{M}$ ). Este fato confirma o ataque ao TEMP por altas concentrações de  $^1\text{O}_2$ .



**Figura 4.23:** Concentração absoluta dos adutos de spin TEMP- $^1\text{O}_2$  para amostras iluminadas (570 nm) contendo concentrações diferentes de AuNR e concentração constante da porfirina POR (14,5  $\mu\text{M}$ ). Em (b) a concentração dos nanobastões se manteve constante (4,5(4) x 10<sup>12</sup> NR/mL), enquanto variamos a concentração da porfirina POR.

A geração de EROs durante a TFD pode ocorrer por meio de dois mecanismos: transferência de carga [149] ou transferência de energia Förster ressonante [176, 177]. Os resultados de ressonância paramagnética eletrônica confirmam a existência de oxigênio no estado singleto devido ao mecanismo de transferência de energia. Nossa interpretação é suportada por experimentos com um supressor para  $^1\text{O}_2$  ( $\text{NaN}_3$ ), que reduz fortemente a intensidade do sinal de RPE das amostras iluminadas. Além de oxigênio singleto, radicais hidroxila foram detectados por medições de RPE com PBN, devido a um mecanismo de transferência de carga. A adição de D-manitol não afeta fortemente a intensidade do espectro característico do aduto PBN-  $\text{OH}^\bullet$ , mas aumenta o atraso do início da geração dos radicais para a porfirina POR pura (figura 4.11). Acreditamos que o D-manitol atue como um sequestrador de  $\text{OH}^\bullet$  para tempos curtos de iluminação. Uma vez que o supressor é completamente consumido na reação com radicais hidroxila, ocorre geração e subsequente formação de adutos PBN- $\text{OH}^\bullet$ . Para o sistema híbrido POR/AuNR, a adição de D-manitol não afeta o tempo inicial de geração

dos adutos (figura 4.11). Outro fato importante é a influência do supressor azida de sódio. Quando  $\text{NaN}_3$  está presente, não observamos a formação de radical hidroxila. Nossos resultados confirmam que a geração de radicais  $\text{OH}\cdot$  é, de fato, um processo secundário na geração de EROs, sendo gerado pela iluminação após a formação de oxigênio singlete.

Resultados similares foram reportados na literatura usando-se outros *spin traps* [178, 179]. Feix e Kalyanaramam [178] relataram que a produção de radicais hidroxila durante a fotossensibilização de merocianina 540 com *spin trap* DMPO era fortemente afetada na presença de íons azida, sugerindo que oxigênio singlete era uma espécie intermediária na geração de  $\text{OH}\cdot$ . Estes autores sugeriram um mecanismo no qual  $^1\text{O}_2$  reage com o *spin trap* para formar uma espécie intermediária que decai formando aduto  $\text{DMPO-OH}\cdot$  e  $\text{OH}\cdot$  livre. Porém, quando íons azida estão presentes há um efeito de extinção do aduto de spin, que é um indicativo da mediação feita por  $^1\text{O}_2$ .

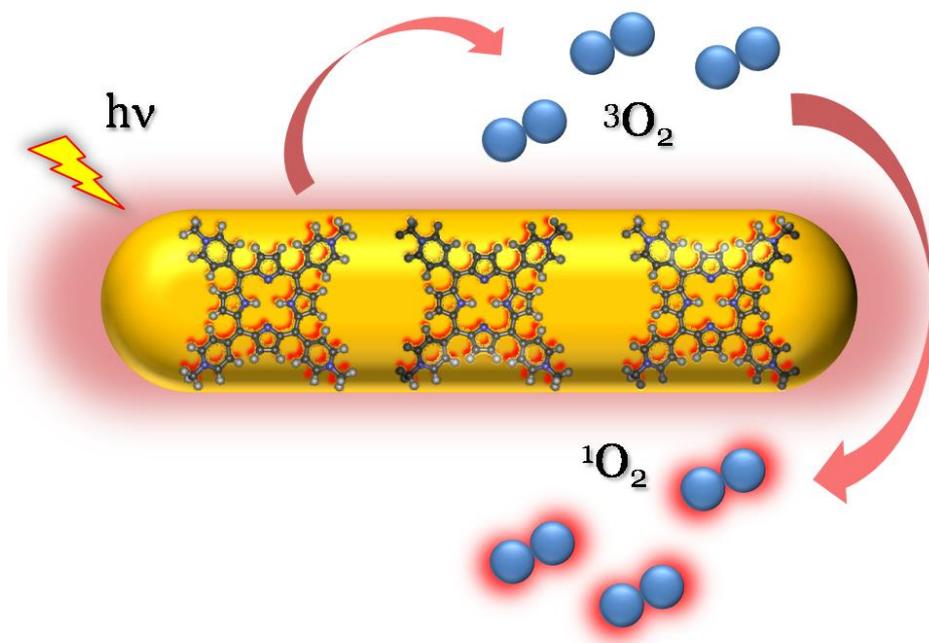
Ueda e colaboradores [179] encontraram indícios da contribuição de  $^1\text{O}_2$  para geração do aduto  $\text{DMPO-OH}\cdot$  durante a fotossensibilização de hematoporfirina com luz na região do ultravioleta próxima (UVA). Aparentemente  $^1\text{O}_2$  interage com DMPO e então a espécie intermediária é decomposta, levando a radicais hidroxila. Neste estudo verificou-se que há interação entre oxigênio singlete e o *spin trap* DMPO. Acreditamos que uma reação similar ocorra entre PBN e  $^1\text{O}_2$ , uma vez que ao adicionarmos azida de sódio à reação não observamos a formação de adutos com PBN. Esta hipótese é discutida por Harbour et al. [152] em um trabalho que revelou, por meio do monitoramento da captura de  $\text{O}_2$  durante a fotossensibilização de uma solução de azul de metileno, que  $^1\text{O}_2$  pode interagir com PBN, com uma constante de reação  $1,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . A adição de azida de sódio causava redução na captação de  $\text{O}_2$  [152]. Embora os produtos da reação entre  $^1\text{O}_2$  e nitronas sejam desconhecidos, a reação entre oxigênio singlete e PBN fornece produtos diamagnéticos, sem formação de adutos de spin. De fato, para todas as amostras testadas, há um atraso inicial no surgimento do sinal de RPE com PBN. A interação entre  $^1\text{O}_2$  com PBN pode levar inicialmente a espécies diamagnéticas, que decaem para espécies radicalares mais tarde.

Por meio dos resultados obtidos sugerimos que a transferência de energia tipo FRET (*Förster resonance energy transfer* - FRET) seja o principal mecanismo de

transferência de energia entre os componentes do híbrido. A transferência de energia Förster é um fenômeno dependente da distância cuja eficiência é dada por [180]:

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{r_0}\right)^6} \quad (4.6).$$

onde  $r$  é distância doador-aceitador,  $r_0$  é a distância na qual metade da energia é transferida do doador para o aceitador. Considerando-se a espessura da camada de CTAB que recobre a superfície dos nanobastões de ouro (3-5 nm) [138, 181, 182], o FS se encontra próximo suficiente à superfície do nanobastão para que o mesmo transfira energia para a porfirina, aumentando sua eficiência para gerar oxigênio singleto (figura 4.24).



**Figura 4.24:** Modelo proposto para mecanismo de transferência de energia para geração de oxigênio singleto pela porfirina via efeito de amplificação do campo causado pela presença de nanobastões de ouro.

Embora o surfactante seja responsável por estabilizar a superfície dos nanobastões de ouro e prevenir agregação e, durante a síntese o CTAB forme micelas,

direcionando o crescimento longitudinal do nanobastão [18], grandes esforços são realizados na tentativa de diminuir a concentração de CTAB presente nas soluções coloidais de nanobastões de ouro, devido a sua citotoxicidade [183-185]. A concentração de CTAB nas amostras sintetizadas foi determinada por meio de espectroscopia de infravermelho (figura 4.4). Nossas suspensões de nanobastões lavadas duas vezes apresentavam CTAB na concentração 0,5 mM, valor abaixo da concentração micelar crítica para o CTAB em água (0,92 – 1,0 mM) [186], porém acima da concentração considerada tóxica. Devemos notar também que a concentração de CTAB após as lavagens é cerca de 50 vezes menor que a concentração presente nas suspensões não lavadas (25 mM). A recobertura da bicamada de CTAB com materiais biocompatíveis tem se mostrado uma boa alternativa para reduzir o efeito citotóxico do CTAB como recobrimento com polialilamina hidrocloreada (PAH) e polietilenoglicol (PEG), [10, 24, 183-185]. Estudos devem ser realizados no futuro, para investigar a influência do tipo de interação (eletrostática ou covalente) e seu alcance para o processo de transferência de energia.

A respeito da interação entre o surfactante (CTAB) e a porfirina, POR possui quatro grupos substituintes catiônicos, o que previne auto-agregação via repulsão eletrostática, independentemente do pH da solução [187]. Apesar disso, agregação pode ocorrer com a adição de surfactante, o que pode causar mudanças no espectro de absorção, rendimento fluorescente e geração de oxigênio singlete [187].

Outro fator importante a ser destacado é a não existência de adutos de spin para os sistemas contendo apenas *spin trap* (TEMP e PBN) e as nanoestruturas de ouro (AuNP e AuNR), indicando que a transferência de cargas resulta de uma reação secundária entre a porfirina e PBN. O mecanismo proposto é:



onde POR\* é a porfirina em seu estado excitado. A partir dos nossos resultados percebemos que a adição de D-manitol afeta o híbrido de forma menos contundente se comparado à porfirina pura, devido à alta eficiência do híbrido para geração oxigênio singlete. Oxigênio singlete em altas concentrações induz a formação de radicais hidroxilas num processo secundário que reagem com D-manitol, consumindo-o mais rapidamente.

Finalmente, a partir dos resultados de potencial Zeta, podemos concluir que a interação eletrostática entre a porfirina (POR) e nanobastões de ouro não é responsável pela maior eficiência do híbrido POR/AuNR, uma vez que este comportamento não foi observado para o híbrido POR/AuNP-cys em que AuNP-cys apresenta carga de superfície oposta a da porfirina POR. O efeito anisotrópico de amplificação do campo elétrico na vizinhança dos nanobastões de ouro promove um aumento na absorção das moléculas de porfirina próximas à superfície dos nanobastões devido ao acoplamento entre os dipolos das moléculas e campo elétrico local dos nanobastões metálicos [110].

#### **4.5.2 - Híbrido POR/AuNR irradiado com ultravioleta (UVA)**

As porfirinas possuem uma banda de absorção intensa na região do UVA-azul (banda de Soret ~ 420 nm). Embora se saiba que o uso de luz em comprimentos de onda fora da faixa do visível e infravermelho não é de grande utilidade para tratamento de tumores mais profundos, devido a baixa penetração da radiação nesse comprimento de onda [188], o uso radiação na faixa do UVA-azul pode ser utilizado no tratamento de lesões superficiais na pele. Além disso, a possibilidade de processos associados à transferência de carga, são de grande valia para estudarmos a geração de radicais sob radiação UVA [189].

A irradiação de porfirinas com luz violeta ou UV absorvida por suas bandas de absorção mais energéticas popula seus estados excitados de maior energia [189]. De acordo com Tokumaru, estes estados excitados ( $S_2$ ) de maior energia para as porfirinas não atraem muita atenção para reações que ocorrem a partir deles devido, provavelmente, à necessidade de se utilizar luz com comprimentos de onda menores (na

região do violeta) para popular estes estados, em contraste com os comprimentos de onda maiores (na região do visível) utilizados para popular os estados excitados  $S_1$  [189]. Os estados excitados de maior energia tendem a ser rapidamente dissipados (tempo de vida da ordem de ps), mas processos de competição com essa desativação, mostram comportamento diferente do observado para os estados excitados de menor energia, como emissão característica e reatividade em processos de transferência de elétrons e energia [189]. No trabalho de Tokumaru [189] é possível encontrar uma revisão contendo uma gama de processos de excitação dos estados excitados  $S_2$  de algumas porfirinas e sua desativação via transferência de carga ou energia.

Arakane e coautores identificaram a geração de um tipo de porfirina (coproporfirina) por *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*), um habitante microbiano normal da pele. Sob excitação UVA (320-400 nm), os autores mostraram uma alta fluorescência atribuída à presença de porfirina, produzida por *P. acnes* [190]. Ainda neste trabalho, os autores mediram a emissão no infravermelho correspondente à transição do oxigênio molecular no estado singleto para o seu estado tripleto, produzido via excitação da coproporfirina. Assim, é possível utilizar fotossensibilizadores excitados na região UV para produzir EROs.

Nossos resultados (figura 4.12) indicam que sob excitação UVA (375 nm) a porfirina pode gerar oxigênio singleto com constantes de reação menores num mecanismo de autocatálise e, para tempos mais longos de iluminação, as concentrações superam aquelas detectadas sob luz visível (570 nm e 630 nm), não mostrando a destruição do próprio aduto de spin do TEMP. O híbrido POR/AuNR apresenta maior geração de  $^1O_2$ , mostrando novamente um efeito sinérgico entre os componentes. A figura 4.13 mostra também que  $NaN_3$  (supressor de oxigênio singleto) pode reduzir o números de espécies reativas capturadas pelo TEMP por meio da reação 4.3, de forma similar ao que foi observado na iluminação em 570 nm. D-manitol (supressor de radicais hidroxila) não suprime a geração do aduto TEMP- $^1O_2$  de forma eficiente, apesar de causar uma leve redução nas concentrações detectadas, com efeito de supressão maior para a porfirina pura comparado ao híbrido. Isso é um indício de que podem existir outras espécies envolvidas na geração de EROs quando luz UVA é utilizada.

Percebemos que as curvas que descrevem a cinética dos sistemas apresentam forma sigmoidal, característico de sistemas autocatalíticos. O mecanismo de autocatálise direto pode ser descrito por uma reação do tipo [159]:



O efeito autocatalítico também pode ser indireto, com reagentes e produtos não interagindo diretamente. Neste caso, não há interação direta entre as espécies A e B, nem formação de 2B diretamente, mas há a presença de outro composto intermediário C [159]:



As curvas de iluminação (60 minutos iniciais) foram ajustadas por função sigmoidal do tipo:

$$f(x) = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} + A_2 \quad (4.15).$$

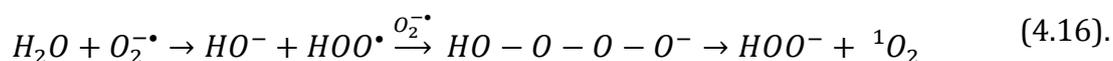
onde  $x_0$  é o valor de x no ponto médio da curva sigmóide,  $A_1$  é o ponto inicial da curva,  $A_2$  é o ponto final e p é a declividade/potência da curva. Na literatura não há muitos relatos de reações onde o oxigênio singleto é capaz de catalisar sua própria formação. Deste modo, o processo autocatalítico presente em nossos sistemas deve envolver compostos intermediários. Nossa tarefa consistiu em identificar estas espécies.

É sugerido por alguns autores que sob radiação UV, as moléculas de água podem sofrer ionização e gerar espécies radicalares como  $H^\bullet$ ,  $OH^\bullet$ ,  $e^-_{aq}$ ,  $O_2^\bullet$ ,  $HO_2^\bullet$ ,  $H_2O_2$ ,  $H_3O^+$ , sendo a energia necessária para ionização da ordem de 6,5 eV [191, 192]. Porém, de acordo com Novakovskaya [193], a energia necessária para ionizar as moléculas de água é da ordem de 9,5 eV, o que corresponderia ao comprimento de onda de excitação de 130,5 nm. Considerando-se a fotólise da água pouco provável com o laser utilizado por nós (375 nm, 3,3 eV), as espécies reativas devem ser geradas pela porfirina, uma vez que

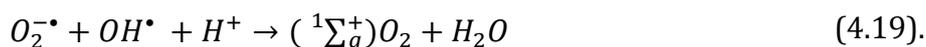
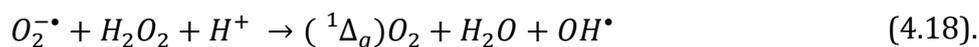
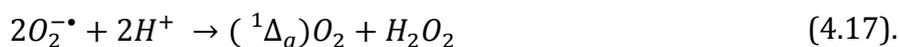
as soluções contendo TEMP e AuNR não apresentam concentrações apreciáveis de aduto de spin. Desta forma, as soluções aquosas contendo POR ou POR/AuNR podem produzir espécies reativas de oxigênio, devido à excitação das moléculas do fotossensibilizador, cujo produto final é oxigênio singleto.

Takahashi e Misawa demonstraram que Protoporfirina IX é capaz de gerar radicais superóxido e/ou  $^1O_2$  sob radiação UV [194]. Porém, os autores sugerem mecanismo em que oxigênio molecular no estado fundamental é excitado pelos fótons UV, gerando  $^1O_2$  por meio da excitação dos elétrons da molécula de  $O_2$  [194]. Como detectamos oxigênio singleto em nossos experimentos partimos em busca de radicais superóxido e sua possível conversão em  $^1O_2$ .

De acordo com Corey e colaboradores, oxigênio singleto foi observado em soluções orgânicas contendo  $KO_2$  após adição de água [195]. Nestes sistemas contendo radicais  $O_2^{\cdot-}$ , o ânion pode ser hidratado por moléculas de água, sendo protonado ao radical  $HO_2^{\cdot}$  para formar, em seguida,  $HO_4^-$  cuja dissociação leva à  $HO_2^-$  e  $^1O_2$  (reação 4.16) [195]. Outro mecanismo envolve a interação de  $HO_2^{\cdot}$  e  $H_2O$ , resultando em  $H_2O_2$  e  $^1O_2$  [195].

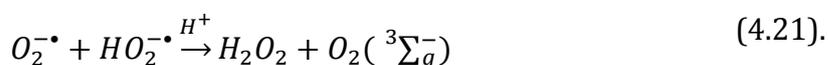


Koppenol demonstrou que algumas reações entre  $O_2^{\cdot-}$  e  $^1O_2$  são termodinamicamente possíveis (reações 4.17-4.20) [196, 197]:



Oxidação de 4-(4-hydroxyphenyl)-2-butanol (*rhododendrol*) e 4-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-butanol (*rhododendrol-catechol*) na presença de tirosinase em solução tampão fosfato (pH 7,4) resultou na geração de oxigênio singleto, detectado via RPE com 4-oxo-TEMP e DMPO, com formação de OH• ou O<sub>2</sub>• como espécies intermediárias [198]. Khan e Kasha mostraram que a reação de Haber-Weiss gerada por adição de KO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em CCl<sub>4</sub> pode produzir oxigênio singleto [199].

Já Aubry e Rigaudy estudaram a reação de dismutação do radical ânion O<sub>2</sub>• por meio de radiólise de solução tampão fosfato (pH 7,6) [200]. De acordo com estes autores, a reação de desproporcionamento, dada pela reação 4.21, não gera oxigênio no estado singleto:



A existência de radicais hidroperoxila, HO<sub>2</sub>•, que corresponde à forma protonada do radical superóxido deve ter papel menos significativo na reação descrita por 4.21. Em pH acima do pKa (4,88) é improvável que o superóxido esteja em sua forma protonada [201].

Draper e Crosby detectaram O<sub>2</sub>• gerado fotoquimicamente (lâmpada de Xe de amplo espectro 290 - 450 nm) em soluções aquosas contendo diferentes sensibilizadores (anilina, triptofano, p-cresol) [202]. Seus resultados sugerem que a produção de O<sub>2</sub>• no UV próximo envolve a fotoionização do sensibilizador ou transferência de elétron durante a extinção dos estados excitados do sensibilizador ou oxigênio molecular.

Porém, O<sub>2</sub>• pode atuar tanto como um gerador eficiente de oxigênio singleto ou como eliminador de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> (cuja constante de reação é 3,6 x 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) de acordo com a reação 4.22, o que pode dificultar sua detecção [196]:



O mecanismo onde há transferência de carga (tipo I) não é o mecanismo dominante sob luz visível. Porém, sob iluminação UVA, acreditamos que esse mecanismo

seja mais pronunciado. De fato, os mecanismos tipo I e II devem ocorrer simultaneamente em nossos sistemas, com a geração de oxigênio singlete o efeito dominante, proporcionado pela geração de  $O_2^{\bullet}$  paralelamente ao mecanismo tipo II.

Em concordância com os trabalhos da literatura citados, acreditamos que a geração de radical superóxido e, sua decomposição em outras espécies como peróxido de hidrogênio, pode levar a geração de oxigênio singlete. Nos sistemas contendo porfirina, a excitação da porfirina, levando-a ao seu estado singlete/triplete excitado (por meio de cruzamento intersistemas) pode levar a um mecanismo tipo I, devido à abstração de átomo de hidrogênio ou transferência de carga da porfirina para substrato ou para oxigênio molecular, levando à produção de  $O_2^{\bullet}$ . De fato, ao compararmos as figuras 4.8 e 4.12, o mecanismo tipo I deve ser dominante sob luz UVA quando comparado com o mesmo sistema sob luz no visível, onde o tipo II é dominante.

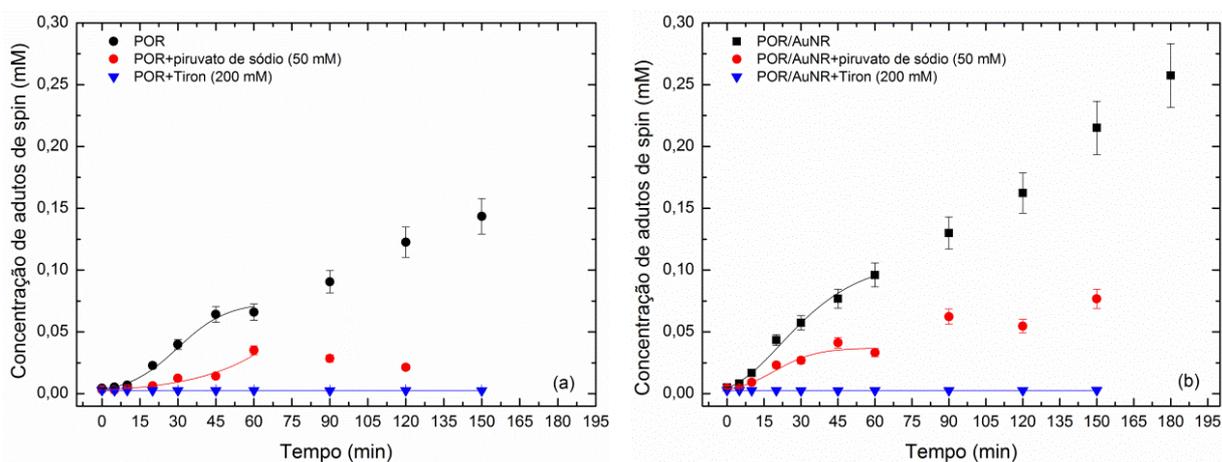
A geração de radical superóxido foi detectada em um sistema compostos por diferentes porfirinas adsorvidas na superfície de  $TiO_2$  [203, 204]. No caso dos sistemas contendo  $TiO_2$ , a porfirina (irradiada com luz visível) em seu estado excitado ( $S_1$  ou  $T_1$ ) pode transferir elétrons diretamente para a banda de condução do  $TiO_2$ , que posteriormente transfere carga para  $O_2$  adsorvido em sua superfície; ou o radical superóxido pode ser formado pela transferência de carga dos estados excitados da porfirina diretamente para a molécula de  $O_2$  na superfície do  $TiO_2$  [204]. A habilidade da porfirina foto-excitada transferir carga para o  $TiO_2$  depende da diferença de energia entre a banda de condução do  $TiO_2$  e o estado excitado da porfirina [204].

Além do processo de dismutação do radical superóxido em  $^1O_2$ , peróxido de hidrogênio pode ser produzido de acordo com as reações 4.16-4.20. Robl e coautores mostraram a geração de  $H_2O_2$  durante fotólise da água sob radiação ultravioleta de vácuo (*vacuum-ultraviolet*, VUV), num mecanismo que negligencia a recombinação de radicais hidroxila como precursores de peróxido de hidrogênio [205]. Na ausência de oxigênio molecular  $H_2O_2$  não é produzido, levando os autores a concluir que outras espécies, como  $H^{\bullet}$  e  $HO_2^{\bullet}$ , são as espécies primárias necessárias à produção de peróxido de hidrogênio.

Com o objetivo de identificar quais são as espécies primárias geradas, realizamos experimentos que nos possibilitassem avaliar a existência de  $O_2^{\bullet}$  e  $H_2O_2$ , reconhecidos

na literatura como possíveis intermediários na produção de  $^1O_2$ . Para isso, utilizamos novos supressores: Tiron (*4,5-dihydroxy-1,3-benzenedisulfonic acid dissodium salt monohydrate*) conhecido como supressor para  $O_2^{\bullet-}$  [206] e piruvato de sódio ( $CH_3COCOONa$ ) utilizado como supressor para peróxido de hidrogênio [207, 208].

A figura 4.25 mostra os resultados obtidos para a porfirina pura e híbrido POR/AuNR, sob luz UVA na presença de Tiron (concentração inicial 200 mM) e piruvato de sódio (concentração inicial 50 mM). Devemos nos lembrar que as amostras foram preparadas como descrito na seção 3.6.2, de forma que as concentrações iniciais indicadas para todos os reagentes sofrem diluição ao serem misturados aos demais componentes das soluções para medidas de RPE.

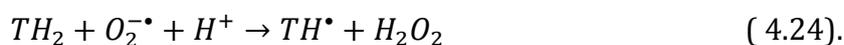


**Figura 4.25:** Concentrações dos adutos de spin gerados com TEMP para POR (a) e POR/AuNR em (b) na presença dos supressores Tiron (200 mM) e piruvato de sódio (50 mM) para as espécies  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$ , respectivamente, sob iluminação com laser UVA (375 nm) em função do tempo de iluminação.

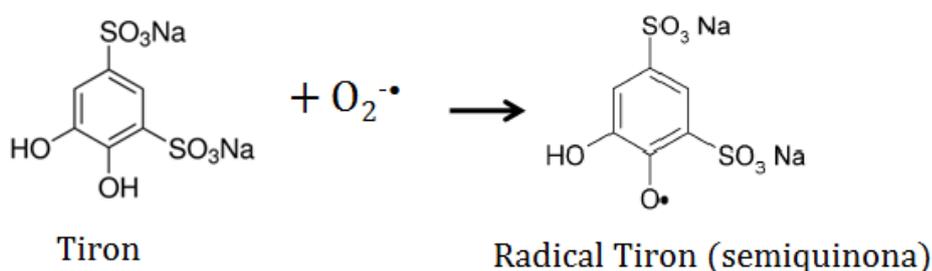
De acordo com os dados mostrados na figura 4.25, na presença do Tiron, não há formação do sinal referente ao aduto de spin TEMP- $^1O_2$ . Vemos que o supressor para superóxido (Tiron) causa redução drástica na concentração dos adutos de spin gerados com TEMP tanto para a porfirina pura (figura 4.25 (a)) quanto para o híbrido POR/AuNR (figura 4.25 (b)). Isso indica que a eliminação do radical superóxido interfere fortemente no rendimento final de  $^1O_2$  gerado sob luz UVA. Piruvato de sódio, utilizado como supressor para peróxido de hidrogênio, também reduz as concentrações dos

adutos para POR e POR/AuNR, mas em menor escala. A redução é mais acentuada inicialmente para a porfirina pura, uma vez que sua eficiência para geração de EROs é menor em comparação ao híbrido. O sistema híbrido gera radicais e oxigênio singlete com maior eficácia, sendo menos afetado pela presença de piruvato de sódio. O mecanismo de ação dos supressores é similar àquele encontrado para iluminação no visível: o supressor impede a formação da espécie de interesse e após seu consumo nas reações, as espécies reativas são geradas novamente.

O mecanismo de interação do Tiron com o radical superóxido é descrito por Peskin e colaboradores [209]:



O mecanismo de supressão do superóxido envolve a oxidação do Tiron diretamente pelo superóxido, formando o radical semiquinona e peróxido de hidrogênio (figura 4.26) [206]. Este radical semiquinona é detectado via EPR cujo espectro é produzido pela interação do elétron desemparelhado com dois átomos de hidrogênio que possuem densidades de spin diferentes [206].



**Figura 4.26:** Estrutura do Tiron e radical formado após interação com radical superóxido. Adaptado [206].

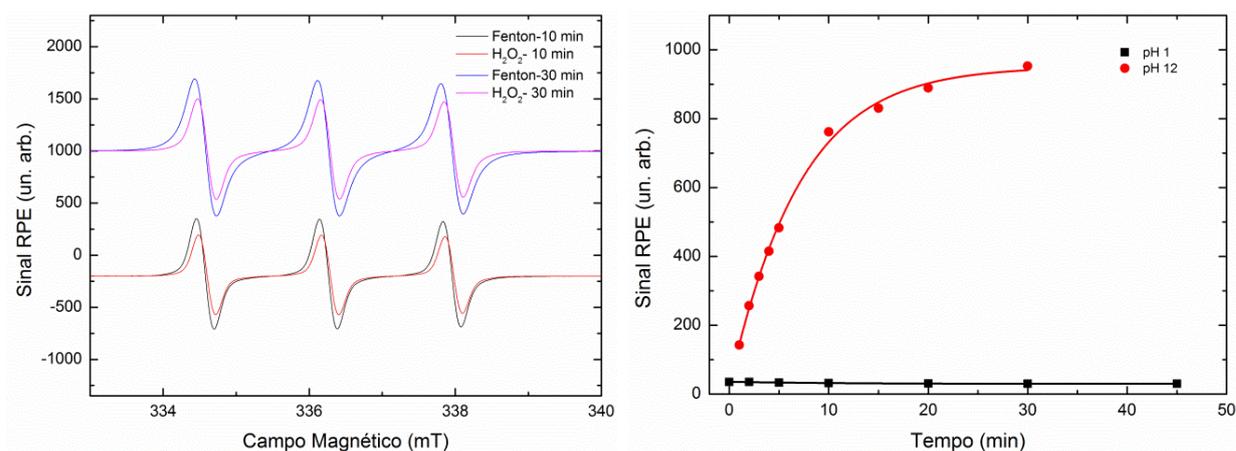
Estes resultados corroboram nossa hipótese de que o oxigênio singlete capturado pelo TEMP sob luz UVA é gerado num processo secundário a partir da geração de radical superóxido nas soluções aquosas e sua subsequente dismutação em peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete. O peróxido de hidrogênio também sofre dismutação gerando  $^1\text{O}_2$  e água em meio básico e radicais  $\text{OH}^\bullet$  em meio ácido [210, 211]. O pH das soluções iluminadas varia entre 11 e 13, logo a captura de oxigênio singlete se deve ao mecanismo de decomposição de peróxido de hidrogênio em pH alto, além da dismutação do superóxido, como mostrado nas reações 4.16-18. Este processo pode ser visto como um mecanismo indireto de autocatálise, uma vez que a dismutação do superóxido gera  $^1\text{O}_2$  e também  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cuja decomposição em meio alcalino produz mais  $^1\text{O}_2$ .

O mecanismo de decomposição do peróxido de hidrogênio em meio básico foi avaliado, bem como a seletividade do TEMP para captura de oxigênio singlete, uma vez que alguns relatos da literatura sugeriram que aminas cíclicas de forma *2,2,6,6-tetramethyl piperidine* podem capturar radicais hidroxila [212, 213]. Rosenthal e colaboradores relataram que TEMP e TEMPone (molécula similar ao TEMP porém, com substituição do grupo OH da posição 4 no anel piperidina por um átomo de O) podem capturar  $\text{OH}^\bullet$  gerado pela irradiação com raios gama de suas soluções aquosas [212].

Apesar do uso de TEMP como armadilha de spin seletiva para oxigênio singlete ser bem estabelecido na literatura [123, 204, 214], utilizamos uma metodologia baseada na geração de radicais hidroxila por meio de reação Fenton, com TEMP (1 M) na presença de peróxido de hidrogênio (3%) (DINÂMICA, 30%) e ferrocianeto de potássio na concentração 1 mM ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ). As amostras foram preparadas em tubos cônicos (*eppendorf*) contendo: 50  $\mu\text{L}$  de TEMP (1M) + 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) e 30  $\mu\text{L}$  de água deionizada para a amostra controle ou 30  $\mu\text{L}$  de ferrocianeto de potássio (1 mM). A figura 4.23 mostra os resultados para o teste controle em comparação com a reação Fenton na presença de  $\text{Fe}^{2+}$ . Este mesmo experimento, na ausência do metal de transição em estado reduzido, nos permite avaliar o processo de decomposição do peróxido em meio básico, fornecendo resultados que podem corroborar nossa hipótese de geração indireta de  $^1\text{O}_2$  por meio das dismutações de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A amostra controle (sem ferrocianeto) contendo TEMP e  $\text{H}_2\text{O}_2$  gera adutos de spin com TEMP em concentrações similares à reação catalisada pelo ferro, como pode

ser observado na figura 4.27. Se o TEMP for uma armadilha de spin eficiente para captura de  $\text{OH}\cdot$  o sistema Fenton renderia um sinal RPE muito mais intenso que a amostra controle, uma vez que a reação é catalisada pelos íons  $\text{Fe}^{2+}$  (reação 2.1b). Como a intensidade dos sinais RPE das amostras com  $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$  e apenas  $\text{H}_2\text{O}_2$  são semelhantes, podemos concluir que apenas o peróxido de hidrogênio é responsável pelo aduto detectado, pois no sistema onde ocorre reação Fenton a geração de radicais hidroxila deveria ser relativamente maior. Além disso, na ausência de peróxido de hidrogênio, o ferrocianeto não é capaz de produzir adutos (espectros não mostrados aqui).



**Figura 4.27:** Espectros RPE dos adutos gerados com TEMP na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) e em reação Fenton catalisada por íons  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 1 mM) em função do tempo de reação (a). Intensidade do sinal RPE em função do tempo de reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3%) na presença de TEMP em meio ácido (pH~1) e básico (pH~12) (b).

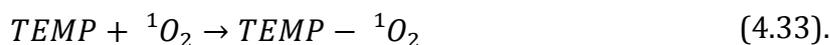
As reações envolvendo peróxido de hidrogênio incluindo sua ionização, dissociação e atividade oxidante/redutora são dependentes do pH do meio [215]. A medição do pH das soluções contendo TEMP e os demais componentes dos sistemas testados nos fornece valores de pH que variam entre 11 - 13. A decomposição do peróxido de hidrogênio é acompanhada pela formação de radicais  $\text{OH}\cdot$  em pH baixo e oxigênio molecular em pH alto [211, 216]. Böhme e Brauer mostraram que a decomposição do peróxido catalisada por molibdato de sódio produz oxigênio molecular no estado singleto (solução aquosa, pH 10,5) [210]. De acordo com Böhme e Brauer

[210] a dismutação do peróxido de hidrogênio em meio básico leva a formação de  $^1O_2$ , de acordo com a reação 4.27 [210]:



Em pH ácido, a decomposição de  $H_2O_2$  deve levar à formação de  $OH^\bullet$  e  $OH^-$ . Deste modo, não haverá formação de aduto de spin com TEMP, como mostrado na figura 4.27 (b).

De posse destas informações, nosso modelo baseia-se na formação de  $O_2^\bullet$ , por meio da excitação do fotossensibilizador pelos fótons UVA, com reações que envolvem a produção de oxigênio singleto e peróxido de hidrogênio, seguido pela decomposição do peróxido de hidrogênio, de forma a gerar mais oxigênio molecular (em estado singleto) e água em meio alcalino, em concordância com os resultados de Böhme e Brauer [210]. Nosso modelo pode ser descrito pelas reações descritas abaixo:



onde  $^0FS$  corresponde à porfirina em seu estado fundamental,  $^*FS$  é o estado excitado singleto que após passar por cruzamento intersistemas é levado ao estado excitado tripleto  $^3FS$ . No estado tripleto a porfirina pode transferir energia para formar oxigênio singleto e, paralelamente, transferir um elétron para a molécula de  $O_2$ , formando  $O_2^\bullet$ , tornando-se um cátion  $FS^+$ . Na sequência, a dismutação de  $O_2^\bullet$  leva a produção de  $^1O_2$  e  $H_2O_2$ . O peróxido de hidrogênio se decompõe, então, para formar  $^1O_2$  (em meio básico) que será capturado pelo TEMP.

Desta forma foi possível testar a eficiência do TEMP como armadilha de spin seletiva para oxigênio singleto e estabelecer um modelo onde a decomposição de peróxido de hidrogênio pode levar a produção de  $^1\text{O}_2$  em meio básico. Considerando-se que peróxido de hidrogênio pode ser gerado via irradiação com UVA ou fotólise/radiólise dos nossos sistemas em meio aquoso, esta conclusão é de grande importância para interpretação dos resultados. Assim, foi possível saber que o aduto final gerado sob UVA é resultado da captura de  $^1\text{O}_2$  pela molécula do *spin trap* TEMP. A cinética de formação do aduto, que ocorre de forma mais lenta sob UV, nos levou a concluir que havia outras espécies reativas sendo geradas inicialmente. A geração de oxigênio singleto por meio de iluminação UVA pode ocorrer via transferência de energia do FS para a molécula de  $\text{O}_2$ , mas também pode resultar de um processo indireto onde há transferência de carga do FS excitado para oxigênio molecular dissolvido no meio.

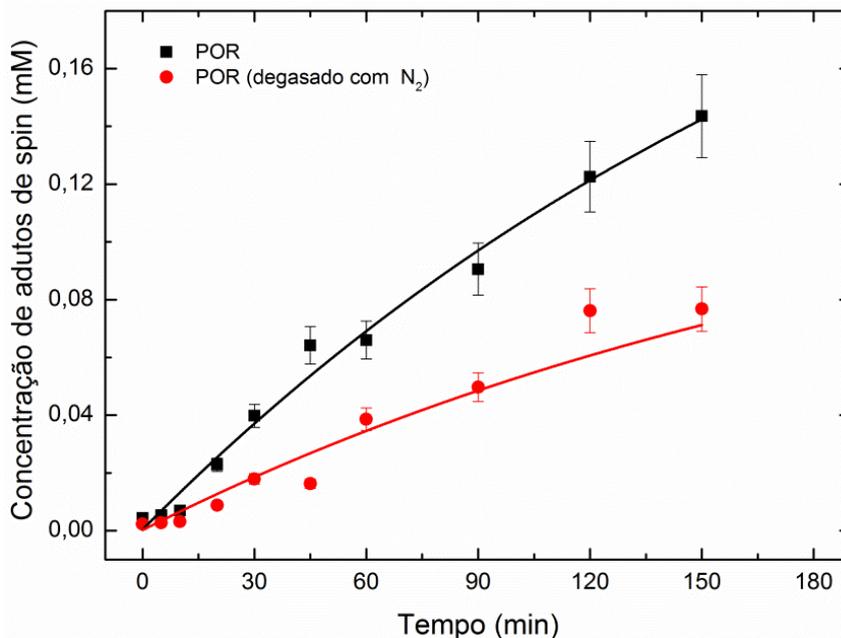
Acreditamos que o sistema híbrido seja mais eficiente devido a propriedade catalítica desempenhada por nanopartículas de ouro [211]. Catalisadores formados por nanopartículas de ouro tem sido reportados para processos de oxidação [217, 218] onde as nanopartículas de ouro interagem com  $\text{H}_2\text{O}_2$  para produzir radicais hidroxila, num mecanismo semelhante ao processo Fenton [219]. O trabalho de Novalon et al. mostrou que o mecanismo mais provável para descrever a atividade fotocatalítica de nanopartículas de ouro suportadas em vários compostos ( $\text{CeO}_2$ , nanodiamantes,  $\text{TiO}_2$ ) envolve a transferência de elétron fotoinduzida (por laser 532 nm ou luz solar) do ouro para  $\text{H}_2\text{O}_2$  [219]. De acordo com Chang e Liu, o ouro pode atuar como um bom doador de elétrons em ligações com adsorbatos eletronegativos [220]. Portanto, este efeito não deve ser creditado à amplificação do campo elétrico em torno dos nanobastões de ouro.

Em concordância com os relatos citados, He e coautores apontaram que soluções aquosas de AuNP (revestidas com diferentes compostos) podem catalisar a decomposição de peróxido de hidrogênio, acompanhado pela formação de radicais  $\text{OH}^\bullet$  em pH baixo (menor que 4,6) [211]. Para soluções com  $\text{pH} > 6,0$ , na presença das AuNP o peróxido de hidrogênio se decompõe formando oxigênio molecular [211]. O mesmo comportamento foi identificado pelos autores quando nanopartículas de prata são usadas, onde a geração de radicais hidroxila foi baseada em reações do tipo Fenton em meio ácido [216]. Em ambos os casos, a geração de radicais  $\text{OH}^\bullet$  é extremamente

dependente do pH. De acordo com os resultados de He e coautores, não foi possível identificar o estado do oxigênio molecular detectado. Nossos resultados indicam que a molécula de oxigênio, que resulta da decomposição do peróxido em meio básico, está no estado singleto excitado.

Levando em consideração estas informações, é possível que os nanobastões de ouro catalisem a decomposição do peróxido de hidrogênio (formado pela dismutação do  $O_2^{\bullet}$ ) em água e  $^1O_2$ , em concordância com os resultados de He et al. [211]. Uma vez que a solução aquosa de TEMP possui pH extremamente básico, o caminho de decomposição do peróxido de hidrogênio nestas condições leva a  $^1O_2$ . Isso promove um aumento na concentração dos adutos detectados por meio de RPE.

Os processos de geração de espécies reativas envolvem a presença de oxigênio molecular dissolvido nos solventes usados. Essa hipótese é validada quando comparamos soluções de TEMP e POR irradiados com UVA, feitos a partir de soluções aquosas degasadas com  $N_2$  por cerca de 60 min, com as soluções aquosas de POR e TEMP onde não foi feito nenhum processo de purga. Os resultados são mostrados na figura 4.28. É possível perceber que as soluções saturadas com  $N_2$  apresentam uma redução na concentração dos adutos de spin por um fator 2.



**Figura 4.28:** Concentrações dos adutos de spin gerados, utilizando-se TEMP, para POR sob iluminação com laser UVA (375 nm), em função do tempo de iluminação, em comparação com soluções degasadas com N<sub>2</sub> dos mesmos reagentes.

Podemos concluir que a porfirina funciona como um sensibilizador eficiente para gerar oxigênio singlete sob luz UVA. O mecanismo de geração de  $^1\text{O}_2$  envolve transferência de carga dos estados excitados da porfirina (por luz UVA) para oxigênio molecular dissolvido no solvente. Isso pode ser percebido pela redução da concentração dos adutos de spin gerados sob UVA, quando as soluções são previamente degasadas com N<sub>2</sub>. As medidas utilizando-se os supressores Tiron (para  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e piruvato de sódio (para  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) indicam que estas espécies estão, de fato, envolvidas nesse mecanismo. De acordo com as reações 4.17-4.19,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pode gerar diretamente  $^1\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Além disso, em pH básico, o peróxido de hidrogênio pode se decompor, produzindo mais oxigênio singlete e água. Essas reações autocatalíticas produzem  $^1\text{O}_2$ , que é posteriormente capturado pelo TEMP. Sob luz UVA, não detectamos a presença de radicais  $\text{OH}^{\cdot}$  em concentrações mensuráveis (figura 4.14), o que nos leva a creditar que as reações 4.18 e 4.19 tem pouca participação no mecanismo de produção de oxigênio singlete. Devemos deixar claro que estas reações dependem do pH e, portanto, os resultados obtidos com *spin trapping* também irão depender do pH das soluções. Com exceção dos dados apresentados na figura 4.27 (b), não foram feitas mudanças no pH das soluções dos *spin*

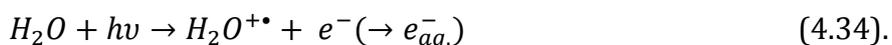
*traps* utilizados. Em solução aquosa, o pH do TEMP é ~12 e a solução do PBN (na mistura de etanol e água 1:1 v/v) possui pH ~6.

#### 4.5.3 – RPE de amostras irradiadas com raios gama

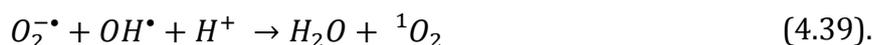
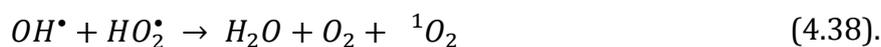
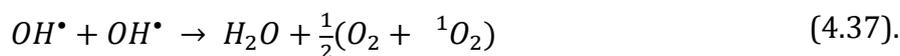
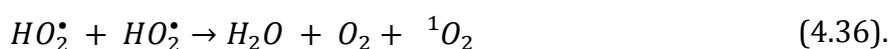
A possibilidade de uso de radiação mais energética em conjunto com nanopartículas de ouro já vem sendo estudada há alguns anos, desde que Hainfeld mostrou em 2004 que, utilizando-se nanopartículas de ouro, a taxa de sobrevivência de ratos que receberam nanopartículas de ouro (1,9 nm) chegou a 86% quando associados a raios X de 250 kVp, contra 20% para o grupo de animais que recebeu apenas radiação [40].

Embora não seja esperado que radiação ionizante seja capaz de produzir oxigênio singlete, testes com TEMP indicaram a geração de aduto característico TEMP-<sup>1</sup>O<sub>2</sub> (figura 4.15). É possível que na presença da porfirina, raios X fluorescentes, fótons e elétrons Compton gerados durante a irradiação possam excitar o fotossensibilizador que, em seguida, pode transferir sua energia de excitação para oxigênio molecular. Num sistema híbrido formado por AuNP conjugadas a Verteporfin, Clement e colaboradores obtiveram resultados semelhantes, irradiando as amostras com fótons gerados por acelerador linear de elétrons com energia de 6 MeV [221]. Ficou evidenciado que Verteporfin puro é mais eficiente na geração de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> que o conjugado Verteporfin-AuNP quando submetido a raios X, enquanto que sob iluminação no visível (690 nm) o conjugado é mais eficiente que a porfirina pura [221].

A armadilha de spin PBN nos permite identificar a existência de radicais hidroxila, uma vez que o mecanismo de excitação de moléculas de água por radiação ionizante (radiólise) é responsável pela formação de radicais [161, 222]:



A presença de oxigênio singleto pode ser um subproduto da radiólise da água, produzido pela interação entre radicais hidroxilas ou superóxido gerados no processo. As reações envolvidas neste processo indireto podem ser encontradas em trabalho de Ermolin et al. [163]. Apesar do modelo proposto por Ermolin et al., onde  $Fe^{2+}$  reage com  $H_2O_2$ , ser diferente das reações envolvidas na radiólise, os produtos das reações envolvem  $OH^\bullet$ ,  $O_2^{\bullet-}$  e elétrons. Estas espécies podem gerar oxigênio singleto indiretamente por meio das reações abaixo [163]:



Considerando-se que a radiólise é o efeito dominante, como observado na figura 4.18 para os resultados do PBN puro sob raios gama, a equação 4.37 é a reação mais provável de ocorrer. Porém as demais reações também são possíveis. Embora a hipótese de geração de oxigênio singleto via radiação ionizante seja plausível, o mecanismo de radiólise da água deve ser o dominante. Os resultados obtidos com TEMP e os supressores indicam que a supressão do aduto é mais eficiente na presença de DMSO, um supressor conhecido para radicais hidroxila.

A dose de radiação da amostra pode ser um fator determinante na geração de EROs em concentrações detectáveis por RPE. Halpern e colaboradores utilizaram uma fonte de  $^{60}Co$  produzindo taxas de 2,1 Gy/s para irradiar *in situ* um modelo tumoral de células NFSa de fibrosarcoma em rato com dose total de 3000 Gy [222]. Os autores injetaram uma solução aquosa do *spin trap* 4-POBN ( $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butyl nitron) e etanol em tumores presentes na perna do rato. A técnica de RPE associada a *spin trapping* usando-se 4-POBN na presença de etanol mostrou a interação de radicais hidroxila produzidos com etanol, gerando o radical  $\alpha$ -hidroxietila e sua

posterior captura pelo 4-POBN (4-POBN-CH(OH)CH<sub>3</sub>•). A concentração de radicais hidroxila gerada por minuto é de 36 μM para detecção em RPE. Porém, a dose usada para permitir a detecção é três ordens de magnitude maior que a fração de dose terapêutica diária. Ou seja, para produzir grandes concentrações são necessárias altas doses de radiação. Neste caso, a alta dose aplicada se deve, provavelmente, a baixa sensibilidade do espectrômetro de RPE utilizado (250 MHz) [161]. O espectrômetro de baixa frequência permite a detecção de radicais existentes a 7 cm de profundidade em tecido, onde são gerados [222].

Takeshita e coautores [161] também demonstraram a geração de radicais hidroxila *in vivo* em ratos com doses muito menores (78 Gy) que as utilizadas por Halpern et al. (3000 Gy) [222]. Os dados de Takeshita et al. indicam que a interação de OH• com o DMSO, solvente usado para solubilizar o *spin trap* PBN, leva à formação do aduto com radical metila (CH<sub>3</sub>•) responsável por seis linhas no espectro RPE para as amostras irradiadas. Há ainda a presença do aduto PBN-OCH<sub>3</sub>• que é gerado pela oxidação do CH<sub>3</sub>• sob condições aeróbicas [161].

Podemos perceber que as concentrações de oxigênio singleto produzidas por radiação ionizante são cerca de uma ordem de grandeza menores (figura 4.16) quando comparadas as amostras iluminadas com luz amarela (570 nm, figura 4.8 (a)). Isso é esperado, uma vez que a faixa de energia usada nas irradiações é bem superior à energia necessária para produção de oxigênio singleto (94 kJ/mol) [12]. Nossa hipótese é que o mecanismo principal de geração espécies reativas de oxigênio ocorra por meio de transferência de carga, geradas por meio do espalhamento Compton. Estes processos são relevantes para geração de superóxido, além de raios X fluorescentes envolvidos na radiólise da água e produção de OH• [67].

Alguns parâmetros são importantes na determinação da eficiência da radiosensibilização por NP. Dentre eles podemos citar o tamanho das NP e a energia do feixe da radiação. De acordo com Cooper e colaboradores, AuNP menores amplificam ainda mais a dose na região onde estão depositadas por se acumularem próximas ao núcleo, onde podem causar grandes danos [61]. Além disso, espera-se que a amplificação da dose seja maior quando a energia do feixe encontra-se próxima da

banda K do elemento [61], permitindo geração de fotoelétrons, elétrons Auger e raios-X fluorescentes [71].

Misawa e Takahashi [67] mostraram que nanopartículas de ouro com diâmetros menores e, conseqüentemente, maior área superficial tiveram um maior rendimento para geração de EROs sob raios X, o que sugere uma atividade catalítica da superfície das AuNP, como evidenciado por Cheng et al. [74] e Sicard-Roselli et al. [75].

A geração de espécies reativas pela ionização de nanopartículas de ouro com raios X foi estudada por Misawa e Takahashi utilizando nanopartículas de diâmetros entre 5 e 250 nm [67]. Dentre as espécies reativas detectadas, houve aumento na geração de  $\text{OH}^\bullet$  e  $\text{O}_2^{\bullet-}$  em função da concentração das AuNP e da energia absorvida pelas amostras. As nanopartículas menores (5 nm) apresentaram uma eficiência maior na geração destas espécies em função do aumento da dose de energia absorvida. O método usado por estes autores consiste em avaliar a fluorescência de sondas específicas para estes radicais.

Além do uso de nanopartículas de ouro, a adição da porfirina  $\text{H}_2\text{TM4PyP}(\text{OTs})_4$  (POR) pode ter um efeito positivo na geração de EROs sob raios X. Takahashi e Misawa [194] estudaram a geração de espécies reativas de oxigênio por Protoporfirina IX (PpIX) sob radiação UVA (3-4 eV) e raios X de baixa energia (~50 keV). Os resultados foram obtidos com base no uso de dois reagentes: aminofenil-fluoresceína (*2-[6-(4-amino)phenoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid* - APF) e hidroetidina (*dihydroethidium* - DHE) na presença de etanol como supressor para  $\text{OH}^\bullet$ . APF e o DHE são compostos não fluorescentes que, ao interagirem com EROs, se convertem em fluoresceína e etidina respectivamente, espécies altamente fluorescentes [194]. APF reage principalmente com  $\text{OH}^\bullet$ , enquanto que DHE é um indicador para  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , mas também pode reagir com peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e  $\text{OH}^\bullet$  em menor proporção [223]. De acordo com Takahashi e Misawa [194] a presença do fotossensibilizador aumentou a geração de  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $^1\text{O}_2$  por um fator maior que 2 na concentração de PpIX de 1,50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , em adição aqueles gerados por meio de radiólise da água. É importante mencionar que mesmo na ausência do FS, estas espécies reativas são geradas devido à radiólise da água.

Estudos realizados mostram que APF também apresenta sensibilidade a  $^1\text{O}_2$ , o que dificulta a identificação de EROs sem ambigüidade quando estas sondas

fluorescentes são empregadas, sobretudo porque apenas supressor para  $\text{OH}^\bullet$  foi utilizado [224]. Na presença de PpIX a geração de EROs sob raios X e irradiação com UV é dependente da absorção de energia, aumentando em função da energia absorvida. Sob raios X, o etanol apresenta o efeito esperado de redução da geração de  $\text{OH}^\bullet$ , causando diminuição na fluorescência do APF [194]. Já a fluorescência com DHE não foi afetada pelo etanol sob raios X ou UV, o que sugere a existência de outras espécies reativas como  $^1\text{O}_2$ , além de  $\text{OH}^\bullet$ . A conclusão é que diferentes espécies reativas de oxigênio são geradas por meio de raios X na presença de PpIX, sobretudo  $\text{OH}^\bullet$  e  $^1\text{O}_2$ , enquanto que sob radiação UV,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e/ou  $^1\text{O}_2$  são produzidos [194].

Nossos resultados são similares aos apresentados por Takahashi e Misawa [194]. Fica evidenciado que a irradiação das amostras aquosas produz oxigênio singleto, mesmo na ausência de fotossensibilizador ou ouro, como observado nas soluções contendo TEMP irradiadas com raios gama (1,17 e 1,33 MeV) (figuras 4.15 e 4.16). A reação de radiólise da água tem como principal produto a geração de  $\text{OH}^\bullet$ , porém, observa-se que oxigênio singleto também pode ser gerado. O mecanismo, apesar de pouco entendido, é descrito por Takahashi e Misawa [194]. De acordo com estes autores, fótons de raios X podem gerar radicais primários como  $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{H}^\bullet$ ,  $e_{\text{aq}}^-$  durante o processo de radiólise. Fótons espalhados de baixa energia podem produzir elétrons secundários e excitar o oxigênio molecular em seu estado tripleto ( $^3\text{O}_2$ ). Os radicais/espécies reativas excitados podem, então, transferir energia para o FS levando-o ao seu estado excitado e, durante o processo de desexcitação do FS,  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e  $\text{OH}^\bullet$  podem ser produzidos [194].

Em nossos testes de terapia fotodinâmica convencional, irradiando-se as amostras com luz amarela (570 nm), detectamos quantidades semelhantes de  $\text{OH}^\bullet$  às encontradas utilizando-se radiação ionizante. Porém, as concentrações de oxigênio singleto são bem menores. Quando sob excitação com raios gama, os valores das concentrações dos adutos obtidos com PBN são relativamente pequenos para detecção via RPE e, apesar de usarmos doses maiores, na presença de nanoestruturas metálicas não observamos uma maior geração de  $\text{OH}^\bullet$ . A radiólise da água produz uma quantidade relativamente grande de radicais, o que pode mascarar o efeito de amplificação da produção de radicais pelo ouro, uma vez que pouca ou nenhuma variação na intensidade do sinal RPE é observada na presença das nanoestruturas de ouro.

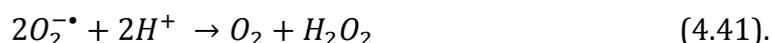
Um sistema híbrido composto por AuNP conjugadas a Verteporfin foi irradiado com doses de 0-6 Gy por acelerador linear de elétrons de 6 MeV [221]. Assim como nossos resultados, Verteporfin sozinha foi capaz de produzir mais oxigênio singleto sob raios X que seu conjugado com AuNP. Entretanto, este mecanismo não está claro.

O fato de que porfirinas sozinhas podem ser radiosensibilizadores potentes é conhecido na literatura [225-227]. Porém, não se sabe ao certo qual é o mecanismo da geração de EROs pelas porfirinas quando expostas à raios X.

Podemos propor uma hipótese em que ocorre um mecanismo semelhante ao que ocorre sob UV, quando o sistema é excitado por raios X/gama. É possível a geração de oxigênio singleto por meio da transferência direta de energia da porfirina excitada por fótons espalhados de menor energia, elétrons Compton ou pelos processos de desexcitação dos demais radicais formados em consequência da radiólise da água [194]. Além disso, o envolvimento de espécies radicalares como  $O_2^{\bullet}$  e  $OH^{\bullet}$  pode levar a produção de peróxido de hidrogênio, cuja decomposição produz  $^1O_2$  em meio básico. O fato da adição de DMSO (supressor para  $OH^{\bullet}$ ) afetar a geração dos adutos com o TEMP (figura 4.17) é um indício de que os radicais hidroxila desempenham um papel importante na geração de  $^1O_2$ . As reações 4.37-4.39 são, provavelmente, as que melhor descrevem o nosso sistema. Conclui-se que a porfirina POR é um bom FS para uma ampla região do espectro eletromagnético. É importante notar que as quantidades dos adutos PBN- $CH_3^{\bullet}$  gerados por meio de radiação gama são maiores na presença de DMSO. Isso se deve à captura de radicais  $OH^{\bullet}$  pelo DMSO, levando ao surgimento de radicais  $CH_3^{\bullet}$  (reação 4.4). Além disso, o próprio DMSO pode sofrer decomposição radiolítica e produzir radicais  $CH_3^{\bullet}$  [161]. É possível que a quantidade de DMSO usada seja suficiente para promover a captura dos radicais hidroxila e ainda sofrer decomposição gerando mais radicais  $CH_3^{\bullet}$ . Estes fatores devem ser os responsáveis pelo aumento do sinal do aduto PBN- $CH_3^{\bullet}$  quando DMSO é usado como supressor.

No mesmo trabalho em que He e colaboradores demonstraram o poder das AuNP em catalisar a decomposição do peróxido, os autores demonstraram também que em reações envolvendo a geração de  $O_2^{\bullet}$  por xantina/xantina oxidase (pH 7,4) na presença de *spin trap* BMPO, a adição de AuNP às soluções causa redução da intensidade do sinal RPE relativo ao aduto do BMPO com  $O_2^{\bullet}$  (BMPO- $OOH^{\bullet}$ ), de forma semelhante a exercida

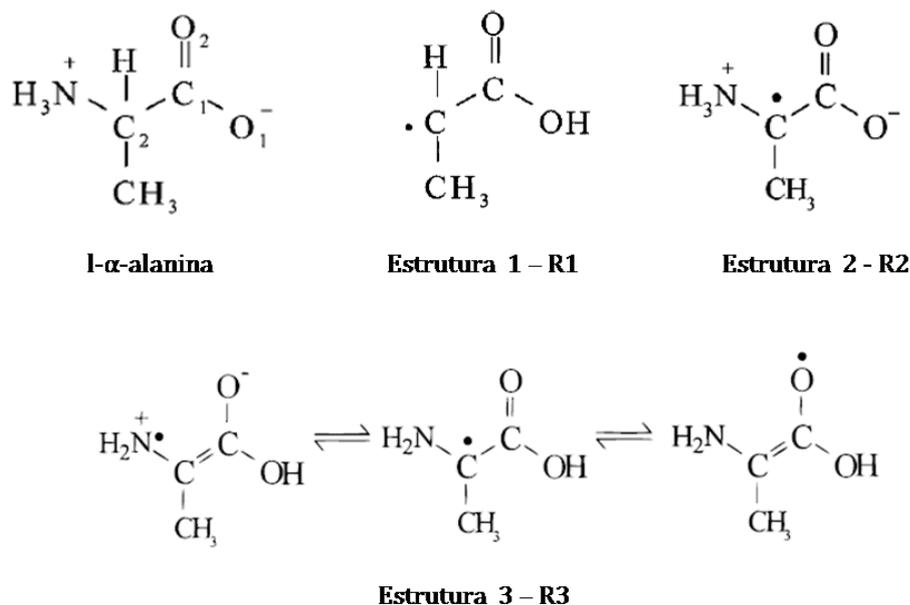
pela enzima superóxido dismutase (SOD) [211]. Desta forma, os autores concluíram que as nanopartículas de ouro também são capazes de catalisar a decomposição de  $O_2^{\cdot-}$ , de acordo com a reação 4.41 [211]. É importante ressaltar que o composto que recobre a superfície das nanopartículas têm grande influência no efeito de redução nas quantidades de  $O_2^{\cdot-}$  geradas. Por exemplo, nanopartículas recobertas com ácido tânico tiveram melhor desempenho na catalisação da dismutação do superóxido (reação 4.41) se comparadas as nanopartículas recobertas com polivinil-pirrolidona [211]. O ácido tânico é um polifenol com atividade antioxidante demonstrada [228, 229].



Em adição aos resultados previstos teoricamente via simulação de Monte Carlo [36, 230] e obtidos por meio de sondas fluorescentes como a reação de hidroxilação do ácido cumarino-3-carboxílico [73, 74] alguns estudos avaliam a amplificação da dose por meio de dosimetria utilizando-se o aminoácido alanina ( $C_3H_7NO_2$ ) [231-233]. Este é um método de dosimetria que baseia-se na análise dos radicais estáveis induzidos em aminoácidos por radiação ionizante por meio de RPE [234]. A alanina é um composto orgânico que pode ser irradiado em sua forma cristalina ou em pó. A estrutura da alanina e dos radicais gerados sob radiação ionizante são mostrados na figura 4.29 [235].

Guidelli e Baffa [236] utilizaram um nanocompósito contendo alanina e nanopartículas de ouro/prata para avaliar o fator de aumento da dose (DEF - *dose enhancement factor*) no meio pela presença de nanopartículas metálicas em função do tamanho, concentração e energia do feixe de radiação. Por meio da comparação da intensidade do sinal RPE da alanina pura e dos nanocompósitos irradiados com feixes de diferentes energias foi possível verificar que os maiores valores DEF são obtidos para raios X com energias da ordem de 30-40 keV. O fator de aumento da dose também aumenta linearmente com a quantidade (percentual em massa) de metal presente nos nanocompósitos [236]. Em relação ao tamanho das nanopartículas, os autores observaram aumento na dose para nanopartículas de até 280 nm. Partículas maiores

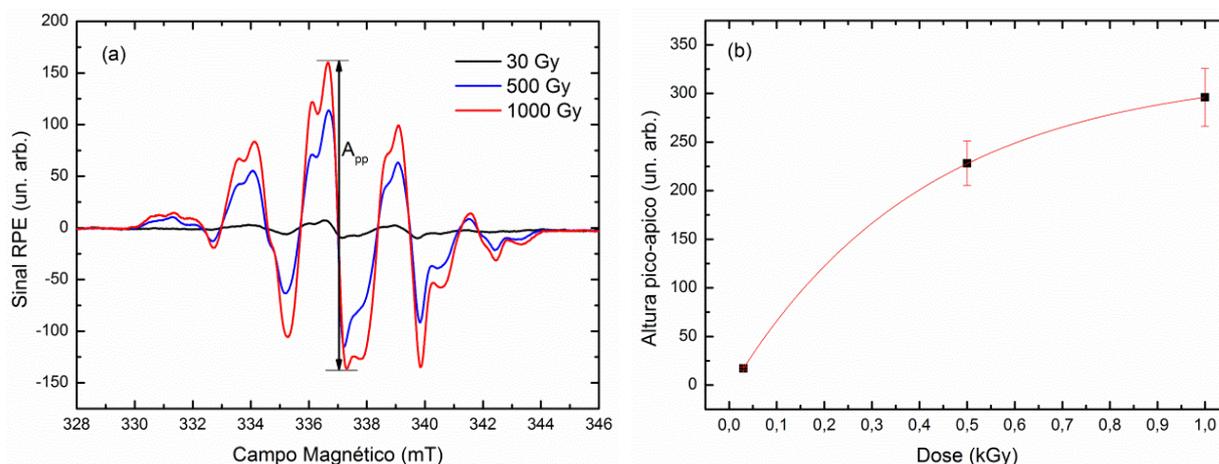
podem sofrer agregação o que as impede de adentrar na matriz de alanina, de forma que ao serem expostas à radiação ionizante estas partículas depositam os elétrons ejetados dentro do próprio aglomerado e não no meio em que está imersa [236]. Essa auto-absorção causa redução no valor de DEF [236].



**Figura 4.29:** Estrutura da alanina e de seus radicais. O radical R1 é conhecido como radical estável e o radical R3 apresenta 3 formas [235].

A forma mais estável do radical alanina, chamada R1, é formada pela desaminação da alanina em sua forma protonada enquanto que o radical R2 é formado pela abstração de um átomo de H ligado ao C na posição 2 (figura 4.29) [235]. O sinal RPE é composto por cinco linhas de intensidades 1: 4: 6: 4: 1 devido a interação hiperfina entre o spin do elétron desemparelhado com os spins nucleares de quatro átomos equivalentes de H [237]. O radical R1 fornece a maior contribuição para a linha central do espectro RPE à temperatura ambiente para a alanina irradiada (cerca de 55% do espectro é composto pelo sinal referente à R1) e R2 contribui com 35% para o espectro de RPE [238]. A altura pico a pico da linha central é usada para determinar a quantidade de radicais de alanina produzidos pela radiação. Amostras de l-alanina policristalinas (em forma de pó) foram irradiadas com radiação gama e os espectros RPE são mostrados na figura 4.30 em função da dose de radiação. A curva apresentada na

figura 4.30 (b) não apresenta a linearidade esperada, porém a alanina é um dosímetro utilizado para doses menores que 1 kGy com sensibilidade de 1 Gy [234].



**Figura 4.30:** (a) Espectros RPE de l-alanina em pó irradiado com radiação gama nas doses 30 Gy, 500 Gy e 1000 Gy. (b) Intensidade da linha central (altura pico a pico -  $A_{pp}$ ) em função da dose.

A estratégia utilizada por Guidelli e Baffa [236] é uma tentativa de avaliar o efeito do aumento da dose local, próximo à superfície da nanoestrutura. Porém, o aumento efetivo da dose local poderia ser mensurado corretamente se a alanina estivesse ligada à superfície da nanoestrutura, pois elétrons responsáveis por esse efeito local de alta deposição da dose viajam curtas distâncias (alguns nm) [72, 73].

Concluimos que a porfirina, por si só, apresenta um efeito positivo na geração de oxigênio singleto sob raios gama, enquanto a adição de AuNR causa redução na produção de oxigênio singleto, como mostrado pelos estudos utilizando-se TEMP. Nossos resultados com PBN mostram aduto característico da captura de  $\text{OH}^\bullet$ , sendo que as concentrações dos adutos gerados é semelhante para todas as amostras, PBN puro, POR pura e POR/AuNR. A adição de DMSO produz um novo aduto de spin, cujos parâmetros se referem ao aduto  $\text{PBN-CH}_3^\bullet$ , com  $\text{CH}_3^\bullet$  sendo produzido pela ionização direta do DMSO e também pela reação entre DMSO e  $\text{OH}^\bullet$  (reações 4.4 e 4.5). A utilização de  $\text{NaN}_3$  nos testes com raios gama não nos permitiu chegar a uma análise conclusiva. A radiação ionizante pode afetar a estrutura molecular deste supressor, incapacitando-o de sequestrar oxigênio singleto.

Em resumo, os resultados obtidos neste trabalho usando radiação ionizante para o estudo da produção de espécies reativas de oxigênio não são bem claros. De fato, a radiação ionizante (raios gama com energias da ordem de MeV) produz espécies reativas a partir do oxigênio molecular dissolvido no solvente, como é o caso da terapia fotodinâmica usando luz na região do visível e ultravioleta próxima, e também um efeito pronunciado é esperado a partir da radiólise da água ou dissociação de outros solventes envolvidos na metodologia de *spin trapping*, como por exemplo, o uso de etanol para dissolução de PBN. Outra questão está ligada a própria metodologia de *spin trapping* sob radiação ionizante. Existem poucas informações na literatura de como os *spin traps*, em nosso estudo o TEMP e o PBN, ou os supressores de radicais como  $\text{NaN}_3/\text{D-manitol}$ , se comportam sob radiação ionizante.

Os resultados com o *spin trap* PBN mostram que há formação de radicais hidroxila (figura 4.18) sob radiação ionizante, e a adição de porfirina leva a um pequeno aumento. Porém, os resultados com o híbrido formado por POR e AuNR são basicamente os mesmos observados para a porfirina sozinha. Desta forma, não observamos um efeito sinérgico entre POR e AuNR. Por outro lado, as experiências com o *spin trap* TEMP mostram que também sob radiação ionizante temos a formação de oxigênio singleto, porém, em escala bem menor se comparada com a iluminação na região do visível. Como as reações de formação de radicais são múltiplas, sob radiação ionizante, fica difícil chegar a uma conclusão definitiva sobre os mecanismos envolvidos. Uma conclusão mais afirmativa é que a porfirina sozinha usada neste estudo é sim um radiosensibilizador sob radiação ionizante.

A medida de *spin trapping* nos fornece uma média do efeito esperado pela adição das nanoestruturas no meio, pois as moléculas da armadilha de spin (TEMP ou PBN) estão distribuídas uniformemente nas soluções. Como a energia dos fótons usados por nós é da ordem de MeV, acreditamos que os elétrons do metal e meio sejam espalhados com energias maiores que 5 keV, evidenciando o efeito do tipo T1PE proposto na literatura [72, 73]. Para que pudéssemos detectar o efeito que ocorre próximo da superfície da nanoestrutura metálica, a armadilha de spin deveria estar ligada à superfície do material, uma vez que fotoelétrons gerados com baixa energia (menor que 5 keV) percorrem distâncias curtas (cerca de alguns nanômetros). Desta forma,

acreditamos que o efeito observado pela técnica de *spin trapping* corresponde a uma média global da geração de EROs no meio, de forma que a captura de espécies geradas próximo à superfície da nanoestrutura de ouro fica negligenciada. Desta forma, o efeito T2PE é mascarado pelo efeito T1PE [72, 73].

Sob radiação ionizante, nossos resultados sugerem que a geração de espécies reativas ocorre, sobretudo, por meio da radiólise da água, gerando OH• primariamente. Um estudo mais detalhado variando-se parâmetros como concentração, tamanho das nanoestruturas e energia do feixe de radiação incidente ainda se faz necessário.

O efeito dos nanobastões e nanopartículas de ouro na geração de EROs é insignificante e não justifica o seu uso em radioterapia de câncer sob radiação ionizante na ordem de MeV, como usado neste estudo, em que o efeito predominante da radiação ionizante é o efeito de espalhamento Compton. Na realidade esperaríamos um efeito significativo do ouro, se usássemos uma fonte de radiação ionizante de energia ligeiramente maior que 80,7 keV (banda K do ouro). Infelizmente, não conseguimos uma fonte de radiação com esta energia. Por outro lado, radioterapia convencional aplicada em hospitais em geral usa fontes de aceleradores lineares com radiação da ordem de MeV. Para excitar significativamente a porfirina e ver um efeito sinérgico entre radioterapia e terapia fotodinâmica, seria necessário um sistema composto de um material cintilante que pode transferir efetivamente a energia da radiação ionizante para a região do visível onde a porfirina ou até o híbrido formado pela POR e as nanobastões de ouro se mostraram eficientes na formação de oxigênio singleto.

## 5 – CONCLUSÕES

O sistema híbrido formado por nanobastões de ouro e porfirina (POR/ AuNR) é um fotossensibilizador promissor para uso em terapia fotodinâmica (TFD), muito mais eficiente para geração de oxigênio singleto, se comparado à porfirina pura, mostrando um aumento de cerca de uma ordem de grandeza na geração de  $^1O_2$ . Este efeito pode ser explicado pelo aumento do campo elétrico localizado em torno do nanobastão de ouro, que é responsável por uma absorção de luz mais intensa pelo fotossensibilizador (FS), seguida por transferência de energia do FS para a molécula de oxigênio produzindo, desta forma,  $^1O_2$ . O ligante presente na superfície da nanoestrutura, que confere carga superficial a mesma, é um parâmetro relevante para aplicações biológicas destes materiais, mas não mostra influência no mecanismo de geração de oxigênio singleto, como mostrado em experimentos de *spin trapping* usando partículas de diferentes cargas de superfície. Os diferentes experimentos de *spin trapping* sob iluminação na região do amarelo e do vermelho revelaram que o mecanismo dominante para o híbrido POR/AuNR é a formação de oxigênio singleto devido à transferência de energia da porfirina excitada para a molécula de  $O_2$  (mecanismo tipo II). Em um segundo passo, radicais hidroxilas são gerados, induzidos pela desprotonação do *spin trap* PBN e subsequente transferência de carga, resultando na formação de  $OH\cdot$ . A geração de EROs constitui a base da terapia fotodinâmica e o sistema híbrido apresentado pode se tornar uma ótima alternativa ao tratamento de câncer, levando a uma diminuição da dose de FS administrado e, conseqüentemente, menos custos e efeitos colaterais ao tratamento. Apesar da eficiência do sistema híbrido formado por POR/AuNR com iluminação com luz de comprimentos de onda no visível (570 nm e 630 nm), este tipo de terapia fotodinâmica continua limitada a lesões ou tumores superficiais.

Com uso de radiação UVA em nossos sistemas, pudemos perceber que o mecanismo de geração oxigênio singleto envolve a participação de outras espécies reativas de oxigênio. Os testes realizados com *spin trapping* na presença de TEMP e supressores Tiron e piruvato de sódio nos permitiram identificar a presença de  $O_2\cdot^-$  e  $H_2O_2$ , produzidos paralelamente ao oxigênio singleto. De fato, conseguimos comprovar que a porfirina é responsável pelo mecanismo que envolve transferência de elétron, além de energia, de seus estados excitados para oxigênio molecular dissolvido nas

soluções aquosas. As reações apresentam caráter autocatalítico, uma vez que a dismutação de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  (em meio básico) leva à geração de mais oxigênio singleto, com pouca participação de radicais  $OH^{\bullet}$ . O sistema híbrido POR/AuNR é mais eficiente na geração destas espécies reativas devido a atividade catalítica dos nanobastões de ouro, sendo capazes de auxiliar na conversão de  $O_2^{\bullet-}$  e  $H_2O_2$  a  $^1O_2 + H_2O$  em soluções aquosas com pH alcalino.

A falta de resultados expressivos em nossas medidas de *spin trapping* nos sistemas contendo nanobastões de ouro irradiados com radiação ionizante (energias da ordem de MeV) sugere que o mecanismo principal de geração de EROs consiste na radiólise da água, gerando  $OH^{\bullet}$  primariamente. A energia da radiação ionizante utilizada por nós está muito acima da energia da camada K do Au (80,7 keV). Desta forma o efeito fotoelétrico é insignificante, e o efeito dominante é o espalhamento Compton, que não se mostrou eficaz em excitar o Au para geração de EROs. Por outro lado, verificamos que a porfirina pode ser usada como um radiosensibilizador, uma vez que a interação da porfirina com radiação ionizante é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio em adição às geradas por meio de radiólise. Porém, nestas condições, a porfirina é notavelmente menos eficiente na geração de  $^1O_2$  se comparada ao sistema irradiado com luz visível. Outro fato interessante é a geração de  $^1O_2$  por meio de radiação ionizante, provavelmente num mecanismo secundário de interação de radicais  $OH^{\bullet}$ , levando a produção de  $H_2O_2$  e sua decomposição em água e  $^1O_2$ , assim como ocorre sob luz UVA.

Em resumo, o sistema híbrido POR/AuNR é um fotossensibilizador promissor em TFD e testes com modelos celulares *in-vitro* devem ser avaliados, nos permitindo responder questões referentes à toxicidade e estabilidade do sistema em meio biológico.

## 6 – REFERÊNCIAS

1. Almeida, V. L. d.; Leitão, A.; Reina, L. d. C. B.; Montanari, C. A.; Donnici, C. L.; Lopes, M. T. P. U., Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova* **2005**, *28*, 118-129.
2. Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q., Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute* **1998**, *90* (12), 889-905.
3. Juarranz, A.; Jaen, P.; Sanz-Rodriguez, F.; Cuevas, J.; Gonzalez, S., Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clinical & Translational Oncology* **2008**, *10* (3), 148-154.
4. Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E., Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today* **1999**, *4* (11), 507-517.
5. Sternberg, E. D.; Dolphin, D.; Bruckner, C., Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron* **1998**, *54* (17), 4151-4202.
6. Issa, M. C. A.; Manela-Azulay, Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **2010**, *85*, 501-511.
7. Mondal, D.; Bera, S., Porphyrins and phthalocyanines: promising molecules for light-triggered antibacterial nanoparticles. *Advances in Natural Sciences-Nanoscience and Nanotechnology* **2014**, *5* (3), 033002.
8. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1* (4), 279-293.
9. MacDonald, I. J.; Dougherty, T. J., Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5* (2), 105-129.
10. Wang, J.-H.; Wang, B.; Liu, Q.; Li, Q.; Huang, H.; Song, L.; Sun, T.-Y.; Wang, H.; Yu, X.-F.; Li, C.; Chu, P. K., Bimodal optical diagnostics of oral cancer based on Rose Bengal conjugated gold nanorod platform. *Biomaterials* **2013**, *34* (17), 4274-4283.
11. Allison, R. R.; Downie, G. H.; Cuenca, R.; Hu, X.-H.; Childs, C. J. H.; Sibata, C. H., Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2004**, *1* (1), 27-42.
12. Pushpan, S. K.; Venkatraman, S.; Anand, V. G.; Sankar, J.; Parmeswaran, D.; Ganesan, S.; Chandrashekar, T. K., Porphyrins in photodynamic therapy-a search for ideal photosensitizers. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* **2002**, *2* (2), 187-207.
13. Eshghi, H.; Sazgarnia, A.; Rahimizadeh, M.; Attaran, N.; Bakavoli, M.; Soudmand, S., Protoporphyrin IX-gold nanoparticle conjugates as an efficient photosensitizer in cervical cancer therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2013**, *10* (3), 304-312.
14. Calavia, P. G.; Marín, M. J.; Chambrier, I.; Cook, M. J.; Russell, D. A., Towards optimisation of surface enhanced photodynamic therapy of breast cancer cells using gold nanoparticle-photosensitiser conjugates. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2018**.
15. Camerin, M.; Moreno, M.; Marin, M. J.; Schofield, C. L.; Chambrier, I.; Cook, M. J.; Coppellotti, O.; Jori, G.; Russell, D. A., Delivery of a hydrophobic phthalocyanine photosensitizer using PEGylated gold nanoparticle conjugates for the in vivo photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2016**, *15* (5), 618-625.

16. Lucky, S. S.; Soo, K. C.; Zhang, Y., Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews* **2015**, *115* (4), 1990-2042.
17. Versiani, A. F.; Andrade, L. M.; Martins, E. M. N.; Scalzo, S.; Geraldo, J. M.; Chaves, C. R.; Ferreira, D. C.; Ladeira, M.; Guatimosim, S.; Ladeira, L. O.; da Fonseca, F. G., Gold nanoparticles and their applications in biomedicine. *Future Virology* **2016**, *11* (4), 293-309.
18. Chen, H.; Shao, L.; Li, Q.; Wang, J., Gold nanorods and their plasmonic properties. *Chemical Society Reviews* **2013**, *42* (7), 2679-2724.
19. Hayden, S. C.; Austin, L. A.; Near, R. D.; Ozturk, R.; El-Sayed, M. A., Plasmonic enhancement of photodynamic cancer therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2013**, *269*, 34-41.
20. Huang, X. H.; Neretina, S.; El-Sayed, M. A., Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications. *Advanced Materials* **2009**, *21* (48), 4880-4910.
21. Faraday, M., The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145-181.
22. Cai, W.; Gao, T.; Hong, H.; Sun, J., Applications of gold nanoparticles in cancer nanotechnology. *Nanotechnol Sci Appl* **2008**, (1), 17-32.
23. Fenger, R.; Fertitta, E.; Kirmse, H.; Thunemann, A. F.; Rademann, K., Size dependent catalysis with CTAB-stabilized gold nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2012**, *14* (26), 9343-9349.
24. Jang, B.; Park, J.-Y.; Tung, C.-H.; Kim, I.-H.; Choi, Y., Gold Nanorod-Photosensitizer Complex for Near-Infrared Fluorescence Imaging and Photodynamic/Photothermal Therapy In Vivo. *Acs Nano* **2011**, *5* (2), 1086-1094.
25. Fu, Y.; Zhang, J.; Lakowicz, J. R., Plasmonic enhancement of single-molecule fluorescence near a silver nanoparticle. *Journal of Fluorescence* **2007**, *17* (6), 811-816.
26. Gao, J.; Huang, X. Y.; Liu, H.; Zan, F.; Ren, J. C., Colloidal Stability of Gold Nanoparticles Modified with Thiol Compounds: Bioconjugation and Application in Cancer Cell Imaging. *Langmuir* **2012**, *28* (9), 4464-4471.
27. Sperling, R. A.; Rivera gil, P.; Zhang, F.; Zanella, M.; Parak, W. J., Biological applications of gold nanoparticles. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37* (9), 1896-1908.
28. Gabudean, A. M.; Focsan, M.; Astilean, S., Gold Nanorods Performing as Dual-Modal Nanoprobes via Metal-Enhanced Fluorescence (MEF) and Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (22), 12240-12249.
29. Zhang, Y.; Aslan, K.; Previte, M. J. R.; Geddes, C. D., Metal-enhanced singlet oxygen generation: A consequence of plasmon enhanced triplet yields. *Journal of Fluorescence* **2007**, *17* (4), 345-349.
30. Zhao, T.; Shen, X.; Li, L.; Guan, Z.; Gao, N.; Yuan, P.; Yao, S. Q.; Xu, Q.-H.; Xu, G. Q., Gold nanorods as dual photo-sensitizing and imaging agents for two-photon photodynamic therapy. *Nanoscale* **2012**, *4* (24), 7712-7719.
31. Oo, M. K. K.; yang, X.; Du, H.; Wang, H., 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine* **2008**, *3* (6), 777-786.
32. Eghtedari, M.; Liopo, A. V.; Copland, J. A.; Oraevsly, A. A.; Motamedi, M., Engineering of Hetero-Functional Gold Nanorods for the in vivo Molecular Targeting of Breast Cancer Cells. *Nano Letters* **2009**, *9* (1), 287-291.
33. Wang, J.; Zhu, G.; You, M.; Song, E.; Shukoor, M. I.; Zhang, K.; Altman, M. B.; Chen, Y.; Zhu, Z.; Huang, C. Z.; Tan, W., Assembly of Aptamer Switch Probes and Photosensitizer on Gold

Nanorods for Targeted Photothermal and Photodynamic Cancer Therapy. *Acs Nano* **2012**, *6* (6), 5070-5077.

34. Hainfeld, J. F.; Dilmanian, F. A.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M., Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2008**, *60* (8), 977-985.

35. Mesbahi, A., A review on gold nanoparticles radiosensitization effect in radiation therapy of cancer. In *Rep Pract Oncol Radiother*, 2010; Vol. 15, pp 176-80.

36. Butterworth, K. T.; McMahon, S. J.; Currell, F. J.; Prise, K. M., Physical basis and biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Nanoscale* **2012**, *4* (16), 4830-4838.

37. Kobayashi, K.; Usami, N.; Porcel, E.; Lacombe, S.; Le Sech, C., Enhancement of radiation effect by heavy elements. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **2010**, *704* (1-3), 123-131.

38. Matsudaira, H.; Ueno, A. M.; Furuno, I., IODINE CONTRAST-MEDIUM SENSITIZES CULTURED MAMMALIAN-CELLS TO X-RAYS BUT NOT TO GAMMA-RAYS. *Radiation Research* **1980**, *84* (1), 144-148.

39. Iwamoto, K. S.; Cochran, S. T.; Winter, J.; Holburt, E.; Higashida, R. T.; Norman, A., RADIATION-DOSE ENHANCEMENT THERAPY WITH IODINE IN RABBIT VX-2 BRAIN-TUMORS. *Radiotherapy and Oncology* **1987**, *8* (2), 161-170.

40. Hainfeld, J. F.; Slatkin, D. N.; Smilowitz, H. M., The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Physics in Medicine and Biology* **2004**, *49* (18), N309-N315.

41. Hainfeld, J. F.; Dilmanian, F. A.; Zhong, Z.; Slatkin, D. N.; Kalef-Ezra, J. A.; Smilowitz, H. M., Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Physics in Medicine and Biology* **2010**, *55* (11), 3045-3059.

42. Buettner, G. R., Spin trapping: ESR parameters of spin adducts. *Free Radical Biology and Medicine* **1987**, *3* (4), 259-303.

43. Simplicio, F. I.; Maionchi, F.; Hioka, N., Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova* **2002**, *25* (5), 801-807.

44. Raab, O. Ueber die Wirkung fluorescirender Stoffe auf Infusorien. 1900.

45. Von Tappeiner, H.; Jesionek, A., Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffen. *Münch Med Wochenschr* **1903**, *47*, 2042-2044.

46. Policard, A., Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *CR Soc Biol* **1924**, *91*, 1423-1424.

47. Auler, H.; Banzer, G., Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* **1942**, *53* (2), 65-68.

48. Dougherty, T. J., Activated dyes as antitumor agents. *Journal of the National Cancer Institute* **1974**, *52* (4), 1333-1336.

49. Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J., Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Research* **1976**, *36* (7 Part 1), 2326-2329.

50. Robertson, C. A.; Evans, D. H.; Abrahamse, H., Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **2009**, *96* (1), 1-8.

51. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2* (2), 91-106.
52. Castano, A. P.; Demidova, T. N.; Hamblin, M. R., Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2* (1), 1-23.
53. Dysart, J. S.; Singh, G.; Patterson, M. S., Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. *Photochemistry and Photobiology* **2005**, *81* (1), 196-205.
54. Gonçalves, A. S. P. Fotogeração de espécies reativas de oxigênio induzida por fullerenos e derivados: um estudo por EPR e captura de spins. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, **2010**.
55. DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J., Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews* **2002**, *233*, 351-371.
56. Moan, J.; Berg, K., THE PHOTODEGRADATION OF PORPHYRINS IN CELLS CAN BE USED TO ESTIMATE THE LIFETIME OF SINGLET OXYGEN. *Photochemistry and Photobiology* **1991**, *53* (4), 549-553.
57. Chen, W.; Zhang, J., Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2006**, *6* (4), 1159-1166.
58. Clement, S.; Deng, W.; Camilleri, E.; Wilson, B. C.; Goldys, E. M., X-ray induced singlet oxygen generation by nanoparticle-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy: determination of singlet oxygen quantum yield. *Scientific Reports* **2016**, *6*.
59. Bulin, A.-L.; Truillett, C.; Chouikrat, R.; Lux, F.; Frochet, C.; Amans, D.; Ledoux, G.; Tillement, O.; Perriat, P.; Barberi-Heyob, M.; Dujardin, C., X-ray-Induced Singlet Oxygen Activation with Nanoscintillator-Coupled Porphyrins. *Journal of Physical Chemistry C* **2013**, *117* (41), 21583-21589.
60. Kascakova, S.; Giuliani, A.; Lacerda, S.; Pallier, A.; Mercere, P.; Toth, E.; Refregiers, M., X-ray-induced radiophotodynamic therapy (RPDT) using lanthanide micelles: Beyond depth limitations. *Nano Research* **2015**, *8* (7), 2373-2379.
61. Cooper, D. R.; Bekah, D.; Nadeau, J. L., Gold nanoparticles and their alternatives for radiation therapy enhancement. *Frontiers in Chemistry* **2014**, *2*.
62. Tang, Y. a.; Hu, J.; Elmenoufy, A. H.; Yang, X., Highly Efficient FRET System Capable of Deep Photodynamic Therapy Established on X-ray Excited Mesoporous LaF<sub>3</sub>:Tb Scintillating Nanoparticles. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2015**, *7* (22), 12261-12269.
63. Wang, G. D.; Nguyen, H. T.; Chen, H.; Cox, P. B.; Wang, L.; Nagata, K.; Hao, Z.; Wang, A.; Li, Z.; Xie, J., X-Ray Induced Photodynamic Therapy: A Combination of Radiotherapy and Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2016**, *6* (13), 2295-2305.
64. Zou, X.; Yao, M.; Ma, L.; Hossu, M.; Han, X.; Juzenas, P.; Chen, W., X-ray-induced nanoparticle-based photodynamic therapy of cancer. *Nanomedicine* **2014**, *9* (15), 2339-2351.
65. Taylor, A.; Powell, M. E. B., Intensity-modulated radiotherapy—what is it? *Cancer Imaging* **2004**, *4* (2), 68.
66. Yoshimura, E. M., Física das Radiações: interação da radiação com a matéria. *Revista Brasileira de Física Médica* **2009**, *3* (1), 57-67.

67. Misawa, M.; Takahashi, J., Generation of reactive oxygen species induced by gold nanoparticles under x-ray and UV Irradiations. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* **2011**, *7* (5), 604-614.
68. Salvajoli, J. V.; Souhami, L.; Faria, S. L., *Radioterapia em Oncologia*. Medsi: **1999**.
69. Eisberg, R. e Resnick, R., *Física Quântica: Átomos, Moléculas, Sólidos, Núcleos e Partículas*, **1979**.
70. Gazda, M. J.; Coia, L. R., Principles of radiation therapy. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach* **2001**.
71. Kuncic, Z.; Lacombe, S., Nanoparticle radio-enhancement: principles, progress and application to cancer treatment. *Physics in Medicine & Biology* **2018**, *63* (2), 02TR01 (27pp).
72. Lee, C.; Cheng, N. N.; Davidson, R. A.; Guo, T., Geometry Enhancement of Nanoscale Energy Deposition by X-rays. *Journal of Physical Chemistry C* **2012**, *116* (20), 11292-11297.
73. Davidson, R. A.; Guo, T., Average Physical Enhancement by Nanomaterials under X-ray Irradiation. *Journal of Physical Chemistry C* **2014**, *118* (51), 30221-30228.
74. Cheng, N. N.; Starkewolf, Z.; Davidson, R. A.; Sharmah, A.; Lee, C.; Lien, J.; Guo, T., Chemical Enhancement by Nanomaterials under X-ray Irradiation. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (4), 1950-1953.
75. Sicard-Roselli, C.; Brun, E.; Gilles, M.; Baldacchino, G.; Kelsey, C.; McQuaid, H.; Polin, C.; Wardlow, N.; Currell, F., A New Mechanism for Hydroxyl Radical Production in Irradiated Nanoparticle Solutions. *Small* **2014**, *10* (16), 3338-3346.
76. Le Caër, S., Water radiolysis: influence of oxide surfaces on H<sub>2</sub> production under ionizing radiation. *Water* **2011**, *3* (1), 235-253.
77. Wijesekera, T. P.; Dolphin, D., Synthetic aspects of porphyrin and metalloporphyrin chemistry. *Metalloporphyrins in catalytic oxidations* **1994**, 193-239.
78. Gouterman, M., SPECTRA OF PORPHYRINS. *Journal of Molecular Spectroscopy* **1961**, *6* (1), 138-&.
79. Bonnett, R., Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews* **1995**, *24* (1), 19-33.
80. Turkevich, J.; Stevenson, P. C.; Hillier, J., THE FORMATION OF COLLOIDAL GOLD. *Journal of Physical Chemistry* **1953**, *57* (7), 670-673.
81. Sirajuddin; Mechler, A.; Torriero, A. A. J.; Nafady, A.; Lee, C. Y.; Bond, A. M.; O'Mullane, A. P.; Bhargava, S. K., The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of HAuCl<sub>4</sub>. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, *370* (1-3), 35-41.
82. Mao, X.; Li, Z. P.; Tang, Z. Y., One pot synthesis of monodispersed L-glutathione stabilized gold nanoparticles for the detection of Pb<sup>2+</sup> ions. *Frontiers of Materials Science* **2011**, *5* (3), 322-328.
83. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials* **2001**, *13* (18), 1389-1393.
84. Jana, N. R.; Gearheart, L.; Murphy, C. J., Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods. *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105* (19), 4065-4067.
85. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M. A., Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (10), 1957-1962.

86. Ye, X.; Gao, Y.; Chen, J.; Reifsnnyder, D. C.; Zheng, C.; Murray, C. B., Seeded Growth of Monodisperse Gold Nanorods Using Bromide-Free Surfactant Mixtures. *Nano Letters* **2013**, *13* (5), 2163-2171.
87. Gole, A.; Murphy, C. J., Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed. *Chemistry of Materials* **2004**, *16* (19), 3633-3640.
88. Yu, Y. Y.; Chang, S. S.; Lee, C. L.; Wang, C. R. C., Gold nanorods: Electrochemical synthesis and optical properties. *Journal of Physical Chemistry B* **1997**, *101* (34), 6661-6664.
89. Xu, X. L.; Zhao, Y. Y.; Xue, X. D.; Huo, S. D.; Chen, F.; Zou, G. Z.; Liang, X. J., Seedless synthesis of high aspect ratio gold nanorods with high yield. *Journal of Materials Chemistry A* **2014**, *2* (10), 3528-3535.
90. Lai, J. P.; Zhang, L.; Niu, W. X.; Qi, W. J.; Zhao, J. M.; Liu, Z. Y.; Zhang, W.; Xu, G. B., One-pot synthesis of gold nanorods using binary surfactant systems with improved monodispersity, dimensional tunability and plasmon resonance scattering properties. *Nanotechnology* **2014**, *25* (12).
91. Ali, M. R. K.; Snyder, B.; El-Sayed, M. A., Synthesis and Optical Properties of Small Au Nanorods Using a Seedless Growth Technique. *Langmuir* **2012**, *28* (25), 9807-9815.
92. Orendorff, C. J.; Murphy, C. J., Quantitation of metal content in the silver-assisted growth of gold nanorods. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (9), 3990-3994.
93. Liu, M. Z.; Guyot-Sionnest, P., Mechanism of silver(I)-assisted growth of gold nanorods and bipyramids. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (47), 22192-22200.
94. Perez-Juste, J.; Liz-Marzan, L. M.; Carnie, S.; Chan, D. Y. C.; Mulvaney, P., Electric-field-directed growth of gold nanorods in aqueous surfactant solutions. *Advanced Functional Materials* **2004**, *14* (6), 571-579.
95. Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C., The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment. *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (3), 668-677.
96. Schuller, J. A.; Barnard, E. S.; Cai, W. S.; Jun, Y. C.; White, J. S.; Brongersma, M. L., Plasmonics for extreme light concentration and manipulation. *Nature Materials* **2010**, *9* (3), 193-204.
97. Ashcroft, N. W.; Mermin, N. D., *Física do Estado Sólido*. **2011**.
98. Pereira, M. K., Ressonância de Plasmon de superfície localizado e espalhamento Raman em soluções coloidais de ouro. Dissertação de Mestrado. **2009**.
99. Jain, P. K.; Lee, K. S.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A., Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: Applications in biological imaging and biomedicine. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (14), 7238-7248.
100. Hovel, H.; Fritz, S.; Hilger, A.; Kreibig, U.; Vollmer, M., WIDTH OF CLUSTER PLASMON RESONANCES - BULK DIELECTRIC FUNCTIONS AND CHEMICAL INTERFACE DAMPING. *Physical Review B* **1993**, *48* (24), 18178-18188.
101. Link, S.; Mohamed, M. B.; El-Sayed, M. A., Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant. *Journal of Physical Chemistry B* **1999**, *103* (16), 3073-3077.
102. Link, S.; El-Sayed, M. A.; Mohamed, M. B., Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant (vol 103B, pg 3073, 1999). *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (20), 10531-10532.

103. Yan, B. H.; Yang, Y.; Wang, Y. C., Comment on "Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant". *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (34), 9159-9159.
104. Karolin, J.; Geddes, C. D., Metal-enhanced fluorescence based excitation volumetric effect of plasmon-enhanced singlet oxygen and super oxide generation. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2013**, *15* (38), 15740-15745.
105. Zhang, Y. X.; Aslan, K.; Previte, M. J. R.; Malyn, S. N.; Geddes, C. D., Metal-enhanced phosphorescence: Interpretation in terms of triplet-coupled radiating plasmons. *Journal of Physical Chemistry B* **2006**, *110* (49), 25108-25114.
106. Geddes, C. D.; Lakowicz, J. R., Metal-enhanced fluorescence. *Journal of Fluorescence* **2002**, *12* (2), 121-129.
107. Dragan, A. I.; Geddes, C. D., Metal-enhanced fluorescence: The role of quantum yield, Q<sub>0</sub>, in enhanced fluorescence. *Applied Physics Letters* **2012**, *100* (9), 093115.
108. Zhang, Y.; Aslan, K.; Previte, M. J. R.; Geddes, C. D., Plasmonic engineering of singlet oxygen generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105* (6), 1798-1802.
109. Toftegaard, R.; Arnbjerg, J.; Cong, H. P.; Agheli, H.; Sutherland, D. S.; Ogilby, P. R., Metal nanoparticle-enhanced radiative transitions: Giving singlet oxygen emission a boost. *Pure and Applied Chemistry* **2011**, *83* (4), 885-898.
110. Mooi, S. M.; Heyne, B., Amplified Production of Singlet Oxygen in Aqueous Solution Using Metal Enhancement Effects. *Photochemistry and Photobiology* **2014**, *90* (1), 85-91.
111. Planas, O.; Macia, N.; Agut, M.; Nonell, S.; Heyne, B., Distance-Dependent Plasmon-Enhanced Singlet Oxygen Production and Emission for Bacterial Inactivation. *Journal of the American Chemical Society* **2016**, *138* (8), 2762-2768.
112. Vankayala, R.; Huang, Y.-K.; Kalluru, P.; Chiang, C.-S.; Hwang, K. C., First Demonstration of Gold Nanorods-Mediated Photodynamic Therapeutic Destruction of Tumors via Near Infra-Red Light Activation. *Small* **2014**, *10* (8), 1612-1622.
113. Reynolds, G. F., Introduction to magnetic resonance (Carrington, A.; McLachlan, AD). *J. Chem. Educ* **1981**, *58* (3), A114.
114. Spaeth, J.-M.; Niklas, J. R.; Bartram, R. H., *Structural analysis of point defects in solids: an introduction to multiple magnetic resonance spectroscopy*. Springer Science & Business Media: **2012**; Vol. 43.
115. Jackson, S. D.; Hargreaves, J. S. J., *Metal oxide catalysis*. Wiley Online Library: **2009**; Vol. 1.
116. Schosseler, P. M. Electron paramagnetic resonance study of the copper (II) complexation with carbonate ligands in aqueous solution and at calcium carbonate surfaces. ETH Zurich, 1998.
117. Akdogan, Y.; Heller, J.; Zimmermann, H.; Hinderberger, D., The solvation of nitroxide radicals in ionic liquids studied by high-field EPR spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2010**, *12* (28), 7874-7882.
118. Janzen, E. G.; Stronks, H. J.; Dubose, C. M.; Poyer, J. L.; McCay, P. B., CHEMISTRY AND BIOLOGY OF SPIN-TRAPPING RADICALS ASSOCIATED WITH HALOCARBON METABOLISM INVITRO AND INVIVO. *Environmental Health Perspectives* **1985**, *64*, 151-170.
119. Knauer, B. R.; Napier, J. J., The nitrogen hyperfine splitting constant of the nitroxide functional group as a solvent polarity parameter. The relative importance for a solvent polarity parameter of its being a cybotactic probe vs. its being a model process. *Journal of the American Chemical Society* **1976**, *98* (15), 4395-4400.

120. Atherton, N. M., *Principles of electron spin resonance*. Ellis Horwood Limited: 1993.
121. Ballentine, L. E., *Quantum Mechanics: A Modern Development* 2014.
122. Riley, P. A., FREE-RADICALS IN BIOLOGY - OXIDATIVE STRESS AND THE EFFECTS OF IONIZING-RADIATION. *International Journal of Radiation Biology* **1994**, *65* (1), 27-33.
123. He, W.; Liu, Y.; Wamer, W. G.; Yin, J.-J., Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis* **2014**, *22* (1), 49-63.
124. Janzen, E. G.; Blackburn, B., DETECTION AND IDENTIFICATION OF SHORT-LIVED FREE RADICALS BY AN ELECTRON SPIN RESONANCE TRAPPING TECHNIQUE. *Journal of the American Chemical Society* **1968**, *90* (21), 5909-&.
125. Likhtenshtein, G. I.; Yamauchi, J.; Nakatsuji, S. i.; Smirnov, A. I.; Tamura, R. X., *Nitroxides: applications in chemistry, biomedicine, and materials science*. John Wiley & Sons: 2008.
126. Janzen, E. G., SPIN TRAPPING. *Accounts of Chemical Research* **1971**, *4* (1), 31-40.
127. Safar, G. A. M.; Gontijo, R. N.; Fantini, C.; Martins, D. C. S.; Idemori, Y. M.; Pinheiro, M. V. B.; Krambrock, K., Enhanced Oxygen Singlet Production by Hybrid System of Porphyrin and Enriched (6,5) Single-Walled Carbon Nanotubes for Photodynamic Therapy. *Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119* (8), 4344-4350.
128. Bhattacharjee, S., DLS and zeta potential-What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **2016**, *235*, 337-351.
129. Ye, X.; Jin, L.; Caglayan, H.; Chen, J.; Xing, G.; Zheng, C.; Vicky, D.-N.; Kang, Y.; Engheta, N.; Kagan, C. R.; Murray, C. B., Improved Size-Tunable Synthesis of Monodisperse Gold Nanorods through the Use of Aromatic Additives. *Acs Nano* **2012**, *6* (3), 2804-2817.
130. Jv, Y.; Li, B. X.; Cao, R., Positively-charged gold nanoparticles as peroxidase mimic and their application in hydrogen peroxide and glucose detection. *Chemical Communications* **2010**, *46* (42), 8017-8019.
131. Niidome, T.; Nakashima, K.; Takahashi, H.; Niidome, Y., Preparation of primary amine-modified gold nanoparticles and their transfection ability into cultivated cells. *Chemical Communications* **2004**, (17), 1978-1979.
132. Safar, G. A. M.; Idemori, Y. M.; CarvalhoDa-Silva, D.; Reboucas, J. S.; Mazzoni, M. S. C.; Righi, A., Nanometrological porphyrins. *Nanotechnology* **2012**, *23* (27).
133. Rasband, W. S., ImageJ. US National Institutes of Health; Bethesda, Maryland, USA: 1997-2012. *There is no corresponding record for this reference* **2014**.
134. Murphy, C. J.; San, T. K.; Gole, A. M.; Orendorff, C. J.; Gao, J. X.; Gou, L.; Hunyadi, S. E.; Li, T., Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. *Journal of Physical Chemistry B* **2005**, *109* (29), 13857-13870.
135. Yeh, Y.-C.; Czeran, B.; Rotello, V. M., Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. *Nanoscale* **2012**, *4* (6), 1871-1880.
136. Gouterman, M., Optical spectra and electronic structure of porphyrins and related rings. *The porphyrins* **1978**, *3*.
137. Lin, J.; Wang, S.; Huang, P.; Wang, Z.; Chen, S.; Niu, G.; Li, W.; He, J.; Cui, D.; Lu, G.; Chen, X.; Nie, Z., Photosensitizer-Loaded Gold Vesicles with Strong Plasmonic Coupling Effect for Imaging-Guided Photothermal/Photodynamic Therapy. *Acs Nano* **2013**, *7* (6), 5320-5329.
138. Jana, N. R.; Gearheart, L. A.; Obare, S. O.; Johnson, C. J.; Edler, K. J.; Mann, S.; Murphy, C. J., Liquid crystalline assemblies of ordered gold nanorods. *Journal of Materials Chemistry* **2002**, *12* (10), 2909-2912.

139. Park, J.-W.; Shumaker-Parry, J. S., Structural Study of Citrate Layers on Gold Nanoparticles: Role of Intermolecular Interactions in Stabilizing Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society* **2014**, *136* (5), 1907-1921.
140. Zhou, J.; Ralston, J.; Sedev, R.; Beattie, D. A., Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, structure and colloid stability. *Journal of Colloid and Interface Science* **2009**, *331* (2), 251-262.
141. Kung, K. H. S.; Hayes, K. F., FOURIER-TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPIC STUDY OF THE ADSORPTION OF CETYLTRIMETHYLAMMONIUM BROMIDE AND CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE ON SILICA. *Langmuir* **1993**, *9* (1), 263-267.
142. Sui, Z. M.; Chen, X.; Wang, L. Y.; Chai, Y. C.; Yang, C. J.; Zhao, J. K., An improved approach for synthesis of positively charged silver nanoparticles. *Chemistry Letters* **2005**, *34* (1), 100-101.
143. Windle, J. J., Hyperfine coupling constants for nitroxide spin probes in water and carbon tetrachloride. *Journal of Magnetic Resonance (1969)* **1981**, *45* (3), 432-439.
144. Chechik, V.; Wellsted, H. J.; Korte, A.; Gilbert, B. C.; Caldararu, H.; Ionita, P.; Carageorgheopol, A., Spin-labelled Au nanoparticles. *Faraday Discussions* **2004**, *125*, 279-291.
145. Stone, T. J.; Buckman, T.; Nordio, P. L.; McConnell, H. M., Spin-labeled biomolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **1965**, *54* (4), 1010-1017.
146. Janzen, E. G.; Kotake, Y.; Hinton, R. D., STABILITIES OF HYDROXYL RADICAL SPIN ADDUCTS OF PBN-TYPE SPIN TRAPS. *Free Radical Biology and Medicine* **1992**, *12* (2), 169-173.
147. Hensley, K.; Aksenova, M.; Carney, J. M.; Harris, M.; Butterfield, D. A., Amyloid [beta]-peptide spin trapping II: evidence for decomposition of the PBN spin adduct. *NeuroReport* **1995**, *6* (3), 493-496.
148. Arslan, E.; Laurenzi, I. J., Kinetics of autocatalysis in small systems. *Journal of Chemical Physics* **2008**, *128* (1), 11.
149. Yamakoshi, Y.; Umezawa, N.; Ryu, A.; Arakane, K.; Miyata, N.; Goda, Y.; Masumizu, T.; Nagano, T., Active oxygen species generated from photoexcited fullerene (C60) as potential medicines: O2-versus 1O2. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125* (42), 12803-12809.
150. Granados-Oliveros, G.; Alberto Paez-Mozo, E.; Martinez Ortega, F.; Piccinato, M.; Silva, F. N.; Barbosa Guedes, C. L.; Di Mauro, E.; da Costa, M. F.; Ota, A. T., Visible light production of superoxide anion with MCarboxyphenylporphyrins (M = H, Fe, Co, Ni, Cu, and Zn) free and anchored on TiO2: EPR characterization. *Journal of Molecular Catalysis a-Chemical* **2011**, *339* (1-2), 79-85.
151. Lion, Y.; Gandin, E.; Vandevorst, A., ON THE PRODUCTION OF NITROXIDE RADICALS BY SINGLET OXYGEN REACTION - AN ELECTRON-PARAMAGNETIC-RES STUDY. *Photochemistry and Photobiology* **1980**, *31* (4), 305-309.
152. Harbour, J. R.; Issler, S. L.; Hair, M. L., SINGLET OXYGEN AND SPIN TRAPPING WITH NITRONES. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102* (26), 7778-7779.
153. Shridhar, R.; Beamont, P. C.; Powers, E. L., A pulse radiolysis study of the addition of hydroxyl free radicals to nitron spin traps. *J. Radioanal. Nucl. Chem* **1986**, *101*, 227-232.
154. Basumodak, S.; Tyrrell, R. M., SINGLET OXYGEN - A PRIMARY EFFECTOR IN THE ULTRAVIOLET-A/NEAR-VISIBLE LIGHT INDUCTION OF THE HUMAN HEME OXYGENASE GENE. *Cancer Research* **1993**, *53* (19), 4505-4510.
155. Hasty, N.; Merkel, P. B.; Radlick, P.; Kearns, D. R., ROLE OF AZIDE IN SINGLET OXYGEN REACTIONS - REACTION OF AZIDE WITH SINGLET OXYGEN. *Tetrahedron Letters* **1972**, *13* (1), 49-52.

156. Miyoshi, N. e Tomita, G., Quenching of Singlet Oxygen by Sodium Azide in Reversed Micellar Systems. *Zeitschrift für Naturforschung B* **2014**, *34* (2), 339-343.
157. Harbour, J. R.; Issler, S. L., INVOLVEMENT OF THE AZIDE RADICAL IN THE QUENCHING OF SINGLET OXYGEN BY AZIDE ANION IN WATER. *Journal of the American Chemical Society* **1982**, *104* (3), 903-905.
158. Li, M. Y.; Cline, C. S.; Koker, E. B.; Carmichael, H. H.; Chignell, C. F.; Bilski, P., Quenching of Singlet Molecular Oxygen (1O<sub>2</sub>) by Azide Anion in Solvent Mixtures. *Photochemistry and Photobiology* **2001**, *74* (6), 760-764.
159. Plasson, R.; Brandenburg, A.; Jullien, L.; Bersini, H., Autocatalyses. *Journal of Physical Chemistry A* **2011**, *115* (28), 8073-8085.
160. Santos, L. J.; Goncalves, A. S. P.; Krambrock, K.; Pinheiro, M. V. B.; Eberlin, M. N.; Vaz, B. G.; de Freitas, R. P.; Alves, R. B., Synthesis of 60 fullerene derivatives bearing five-membered heterocyclic wings and an investigation of their photophysical kinetic properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2011**, *217* (1), 184-190.
161. Takeshita, K.; Fujii, K.; Anzai, K.; Ozawa, T., In vivo monitoring of hydroxyl radical generation caused by x-ray irradiation of rats using the spin trapping/EPR technique. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, *36* (9), 1134-1143.
162. Jeynes, J. C. G.; Merchant, M. J.; Spindler, A.; Wera, A. C.; Kirkby, K. J., Investigation of gold nanoparticle radiosensitization mechanisms using a free radical scavenger and protons of different energies. *Physics in Medicine and Biology* **2014**, *59* (21), 6431-6443.
163. Ermolin, S. V.; Ivanova, I. P.; Knyazev, D. I.; Trofimova, S. V.; Piskarev, I. M., Mechanism of water luminescence upon radiolysis under the effect of background radiation. *Russian Journal of Physical Chemistry A* **2012**, *86* (6), 1029-1032.
164. Buettner, G. R., Spin trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V. *Free Radical Biology and Medicine* **1987**, *3* (4), 259-303.
165. Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J., Production of hydroxyl radical by decomposition of superoxide spin-trapped adducts. *Molecular Pharmacology* **1982**, *21* (2), 262-265.
166. Finkelstein, E.; Rosen, G. M.; Rauckman, E. J., Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1980**, *200* (1), 1-16.
167. Greenstock, C. L.; Wiebe, R. H., Substituent effects in the kinetic analysis of free radical reactions with nitron spin traps. *Canadian Journal of Chemistry* **1982**, *60* (12), 1560-1564.
168. Janzen, E. G.; Coulter, G. A.; Oehler, U. M.; Bergsma, J. P., Solvent effects on the nitrogen and  $\beta$ -hydrogen hyperfine splitting constants of aminoxyl radicals obtained in spin trapping experiments. *Canadian Journal of Chemistry* **1982**, *60* (21), 2725-2733.
169. Polyakov, N. E.; Kruppa, A. I.; Leshina, T. V.; Konovalova, T. A.; Kispert, L. D., Carotenoids as antioxidants: spin trapping EPR and optical study. *Free Radical Biology and Medicine* **2001**, *31* (1), 43-52.
170. Oo, M. K. K.; Yang, Y.; Hu, Y.; Gomez, M.; Du, H.; Wang, H., Gold Nanoparticle-Enhanced and Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species from Protoporphyrin IX. *Acs Nano* **2012**, *6* (3), 1939-1947.
171. Stranik, O.; Nooney, R.; McDonagh, C.; MacCraith, B. D., Optimization of nanoparticle size for plasmonic enhancement of fluorescence. *Plasmonics* **2007**, *2* (1), 15-22.

172. Vankayala, R.; Sagadevan, A.; Vijayaraghavan, P.; Kuo, C.-L.; Hwang, K. C., Metal Nanoparticles Sensitize the Formation of Singlet Oxygen. *Angewandte Chemie-International Edition* **2011**, *50* (45), 10640-10644.
173. Li, Y.; Wen, T.; Zhao, R.; Liu, X.; Ji, T.; Wang, H.; Shi, X.; Shi, J.; Wei, J.; Zhao, Y.; Wu, X.; Nie, G., Localized Electric Field of Plasmonic Nanoplatfrom Enhanced Photodynamic Tumor Therapy. *Acs Nano* **2014**, *8* (11), 11529-11542.
174. Zuloaga, J.; Prodan, E.; Nordlander, P., Quantum Plasmonics: Optical Properties and Tunability of Metallic Nanorods. *Acs Nano* **2010**, *4* (9), 5269-5276.
175. Lin, K.-Q.; Yi, J.; Hu, S.; Liu, B.-J.; Liu, J.-Y.; Wang, X.; Ren, B., Size Effect on SERS of Gold Nanorods Demonstrated via Single Nanoparticle Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C* **2016**, *120* (37), 20806–20813.
176. Zenkevich, E. I.; Sagun, E. I.; Knyukshto, V. N.; Stasheuski, A. S.; Galievsky, V. A.; Stupak, A. P.; Blaudeck, T.; von Borczyskowski, C., Quantitative analysis of singlet oxygen ( $^1O_2$ ) generation via energy transfer in nanocomposites based on semiconductor quantum dots and porphyrin ligands. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (44), 21535-21545.
177. Steponkiene, S.; Valanciunaite, J.; Skripka, A.; Rotomskis, R., Cellular uptake and photosensitizing properties of quantum dot-chlorin e6 complex: in vitro study. *Journal of biomedical nanotechnology* **2014**, *10* (4), 679-686.
178. Feix, J. B.; Kalyanaraman, B., PRODUCTION OF SINGLET OXYGEN-DERIVED HYDROXYL RADICAL ADDUCTS DURING MERCYANINE-540-MEDIATED PHOTOSENSITIZATION - ANALYSIS BY ESR-SPIN TRAPPING AND HPLC WITH ELECTROCHEMICAL DETECTION. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1991**, *291* (1), 43-51.
179. Ueda, J. i.; Takeshita, K.; Matsumoto, S.; Yazaki, K.; Kawaguchi, M.; Ozawa, T., Singlet Oxygen-mediated Hydroxyl Radical Production in the Presence of Phenols: Whether DMPO- $\cdot$ OH Formation Really Indicates Production of  $\cdot$ OH? *Photochemistry and photobiology* **2003**, *77* (2), 165-170.
180. Yun, C. S.; Javier, A.; Jennings, T.; Fisher, M.; Hira, S.; Peterson, S.; Hopkins, B.; Reich, N. O.; Strouse, G. F., Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (9), 3115-3119.
181. Gomez-Grana, S.; Hubert, F.; Testard, F.; Guerrero-Martinez, A.; Grillo, I.; Liz-Marzan, L. M.; Spalla, O., Surfactant (Bi)Layers on Gold Nanorods. *Langmuir* **2012**, *28* (2), 1453-1459.
182. Yu, C.; Irudayaraj, J., Quantitative evaluation of sensitivity and selectivity of multiplex nanoSPR biosensor assays. *Biophysical Journal* **2007**, *93* (10), 3684-3692.
183. Alkilany, A. M.; Nalaria, P. K.; Hexel, C. R.; Shaw, T. J.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D., Cellular Uptake and Cytotoxicity of Gold Nanorods: Molecular Origin of Cytotoxicity and Surface Effects. *Small* **2009**, *5* (6), 701-708.
184. Grabinski, C.; Schaeublin, N.; Wijaya, A.; D' Couto, H.; Baxamusa, S. H.; Hamad-Schifferli, K.; Hussain, S. M., Effect of Gold Nanorod Surface Chemistry on Cellular Response. *Acs Nano* **2011**, *5* (4), 2870-2879.
185. Wang, L.; Jiang, X.; Ji, Y.; Bai, R.; Zhao, Y.; Wu, X.; Chen, C., Surface chemistry of gold nanorods: origin of cell membrane damage and cytotoxicity. *Nanoscale* **2013**, *5* (18), 8384-8391.
186. Guo, L., Side-chain-controlled H- and J-aggregation of amphiphilic porphyrins in CTAB micelles. *Journal of Colloid and Interface Science* **2008**, *322* (1), 281-286.
187. Santiago, P. S.; Gandini, S. C. M.; Moreira, L. M.; Tabak, M., Interaction of cationic water-soluble meso-tetrakis(4-N-methylpyridiniumyl)porphyrin (TMPyP) with ionic and nonionic

- micelles: aggregation and binding. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2008**, *12* (8), 942-952.
188. Meinhardt, M.; Krebs, R.; Anders, A.; Heinrich, U.; Tronnier, H., Wavelength-dependent penetration depths of ultraviolet radiation in human skin. *Journal of Biomedical Optics* **2008**, *13* (4).
189. Tokumaru, K., Photochemical and photophysical behaviour of porphyrins and phthalocyanines irradiated with violet or ultraviolet light. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5* (01), 77-86.
190. Arakane, K.; Ryu, A.; Hayashi, C.; Masunaga, T.; Shinmoto, K.; Mashiko, S.; Nagano, T.; Hirobe, M., Singlet Oxygen ( $^1\Delta_g$ ) Generation from Coproporphyrin in *Propionibacterium acnes* on Irradiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, *223* (3), 578-582.
191. Nikogosyan, D. N.; Angelov, D. A., FORMATION OF FREE-RADICALS IN WATER UNDER HIGH-POWER LASER UV IRRADIATION. *Chemical Physics Letters* **1981**, *77* (1), 208-210.
192. Azrague, K.; Bonnefille, E.; Pradines, V.; Pimienta, V.; Oliveros, E.; Maurette, M. T.; Benoit-Marquie, F., Hydrogen peroxide evolution during V-UV photolysis of water. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2005**, *4* (5), 406-408.
193. Novakovskaya, Y. V., Theoretical estimation of the ionization potential of water in condensed phase. II. Superficial water layers. *Protection of Metals* **2007**, *43* (1), 22-33.
194. Takahashi, J.; Misawa, M., Characterization of reactive oxygen species generated by protoporphyrin IX under X-ray irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* **2009**, *78* (11), 889-898.
195. Corey, E. J.; Mehrotra, M. M.; Khan, A. U., WATER INDUCED DISMUTATION OF SUPEROXIDE ANION GENERATES SINGLET MOLECULAR-OXYGEN. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1987**, *145* (2), 842-846.
196. Koppenol, W. H.; Butler, J., Mechanism of reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *FEBS letters* **1977**, *83* (1), 1-6.
197. Koppenol, W. H., Reactions involving singlet oxygen and the superoxide anion. *Nature* **1976**, *262* (5567), 420-421.
198. Miyaji, A.; Gabe, Y.; Kohno, M.; Baba, T., Generation of hydroxyl radicals and singlet oxygen during oxidation of rhododendrol and rhododendrol-catechol. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **2017**, *60* (2), 86-92.
199. Khan, A. U.; Kasha, M., SINGLET MOLECULAR-OXYGEN IN THE HABER-WEISS REACTION. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, *91* (26), 12365-12367.
200. Aubry, J. M.; Rigaudy, J.; Ferradini, C.; Pucheault, J., A SEARCH FOR SINGLET OXYGEN IN THE DISPROPORTIONATION OF SUPEROXIDE ANION. *Journal of the American Chemical Society* **1981**, *103* (16), 4965-4966.
201. Behar, D.; Czapski, G.; Rabani, J.; Dorfman, L. M.; Schwarz, H. A., Acid dissociation constant and decay kinetics of the perhydroxyl radical. *The Journal of Physical Chemistry* **1970**, *74* (17), 3209-3213.
202. Draper, W. M.; Crosby, D. G., PHOTOCHEMICAL GENERATION OF SUPEROXIDE RADICAL-ANION IN WATER. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1983**, *31* (4), 734-737.
203. Yu, J. H.; Chen, J. R.; Li, C.; Wang, X. S.; Zhang, B. W.; Ding, H. Y., ESR signal of superoxide radical anion adsorbed on TiO<sub>2</sub> generated at room temperature. *Journal of Physical Chemistry B* **2004**, *108* (9), 2781-2783.

204. Diaz-Uribe, C. E.; Daza, M. C.; Martinez, F.; Paez-Mozo, E. A.; Guedes, C. L. B.; Di Mauro, E., Visible light superoxide radical anion generation by tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin/TiO<sub>2</sub>: EPR characterization. *Journal of Photochemistry and Photobiology a-Chemistry* **2010**, *215* (2-3), 172-178.
205. Robl, S.; Worner, M.; Maier, D.; Braun, A. M., Formation of hydrogen peroxide by VUV-photolysis of water and aqueous solutions with methanol. *Photochemical & Photobiological Sciences* **2012**, *11* (6), 1041-1050.
206. Taiwo, F. A., Mechanism of tiron as scavenger of superoxide ions and free electrons. *Spectroscopy-an International Journal* **2008**, *22* (6), 491-498.
207. Jagtap, J. C.; Chandele, A.; Chopde, B. A.; Shastry, P., Sodium pyruvate protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated apoptosis in human neuroblastoma cell line-SK-N-MC. *Journal of Chemical Neuroanatomy* **2003**, *26* (2), 109-118.
208. Ramakrishnan, N.; Chen, R.; McClain, D. E.; Bünger, R., Pyruvate prevents hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Free Radical Research* **1998**, *29* (4), 283-295.
209. Peskin, A. V.; Labas, Y. A.; Tikhonov, A. N., Superoxide radical production by sponges *Sycon* sp. *Febs Letters* **1998**, *434* (1-2), 201-204.
210. Bohme, K.; Brauer, H. D., GENERATION OF SINGLET OXYGEN FROM HYDROGEN-PEROXIDE DISPROPORTIONATION CATALYZED BY MOLYBDATE IONS. *Inorganic Chemistry* **1992**, *31* (16), 3468-3471.
211. He, W. W.; Zhou, Y. T.; Warner, W. G.; Hu, X. N.; Wu, X. C.; Zheng, Z.; Boudreau, M. D.; Yin, J. J., Intrinsic catalytic activity of Au nanoparticles with respect to hydrogen peroxide decomposition and superoxide scavenging. *Biomaterials* **2013**, *34* (3), 765-773.
212. Rosenthal, I.; Krishna, C. M.; Yang, G. C.; Kondo, T.; Riesz, P., A new approach for EPR detection of hydroxyl radicals by reaction with sterically hindered cyclic amines and oxygen. *FEBS letters* **1987**, *222* (1), 75-78.
213. Dekok, T.; Vanmaanen, J. M. S.; Lankelma, J.; Tenhoor, F.; Kleinjans, J. C. S., ELECTRON-SPIN-RESONANCE SPECTROSCOPY OF OXYGEN RADICALS GENERATED BY SYNTHETIC FECAPENTAENE-12 AND REDUCTION OF FECAPENTAENE MUTAGENICITY TO SALMONELLA-TYPHIMURIUM BY HYDROXYL RADICAL SCAVENGING. *Carcinogenesis* **1992**, *13* (7), 1249-1255.
214. Lion, Y.; Delmelle, M.; Van de Vorst, A., New method of detecting singlet oxygen production. *Nature* **1976**, *263* (5576), 442.
215. Rabai, G.; Kustin, K.; Epstein, I. R., A systematically designed pH oscillator: the hydrogen peroxide-sulfite-ferrocyanide reaction in a continuous-flow stirred tank reactor. *Journal of the American Chemical Society* **1989**, *111* (11), 3870-3874.
216. He, W. W.; Zhou, Y. T.; Wamer, W. G.; Boudreau, M. D.; Yin, J. J., Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33* (30), 7547-7555.
217. Jawale, D. V.; Gravel, E.; Geertsen, V.; Li, H. Y.; Shah, N.; Namboothiri, I. N. N.; Doris, E., Aerobic Oxidation of Phenols and Related Compounds using Carbon Nanotube-Gold Nanohybrid Catalysts. *Chemcatchem* **2014**, *6* (3), 719-723.
218. Lorencon, E.; Ferreira, D. C.; Resende, R. R.; Krambrock, K., Amphiphilic gold nanoparticles supported on carbon nanotubes: Catalysts for the oxidation of lipophilic compounds by wet peroxide in biphasic systems. *Applied Catalysis a-General* **2015**, *505*, 566-574.

219. Navalon, S.; de Miguel, M.; Martin, R.; Alvaro, M.; Garcia, H., Enhancement of the Catalytic Activity of Supported Gold Nanoparticles for the Fenton Reaction by Light. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (7), 2218-2226.
220. Shang, C.; Liu, Z. P., Origin and Activity of Gold Nanoparticles as Aerobic Oxidation Catalysts in Aqueous Solution. *Journal of the American Chemical Society* **2011**, *133* (25), 9938-9947.
221. Clement, S.; Chen, W. J.; Anwer, A. G.; Goldys, E. M., Verteprofin conjugated to gold nanoparticles for fluorescent cellular bioimaging and X-ray mediated photodynamic therapy. *Microchimica Acta* **2017**, *184* (6), 1765-1771.
222. Halpern, H. J.; Yu, C.; Barth, E.; Peric, M.; Rosen, G. M., IN-SITU DETECTION, BY SPIN-TRAPPING, OF HYDROXYL RADICAL MARKERS PRODUCED FROM IONIZING-RADIATION IN THE TUMOR OF A LIVING MOUSE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1995**, *92* (3), 796-800.
223. Price, M.; Kessel, D., On the use of fluorescence probes for detecting reactive oxygen and nitrogen species associated with photodynamic therapy. *Journal of Biomedical Optics* **2010**, *15* (5).
224. Price, M.; Reiners, J. J.; Santiago, A. M.; Kessel, D., Monitoring Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical Formation with Fluorescent Probes During Photodynamic Therapy. *Photochemistry and Photobiology* **2009**, *85* (5), 1177-1181.
225. Evensen, J. F.; Moan, J., Photodynamic action and chromosomal damage: a comparison of haematoporphyrin derivative (HpD) and light with X-irradiation. *British journal of cancer* **1982**, *45* (3), 456.
226. Luksiene, Z.; Juzenas, P.; Moan, J., Radiosensitization of tumours by porphyrins. *Cancer Letters* **2006**, *235* (1), 40-47.
227. Ohara, J. A.; Duple, E. B.; Abrams, M. J.; Picker, D. J.; Giandomenico, C. M.; Vollano, J. F., POTENTIATION OF RADIATION-INDUCED CELL KILL BY SYNTHETIC METALLOPORPHYRINS. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **1989**, *16* (4), 1049-1052.
228. Andrade, R. G.; Dalvi, L. T.; Silva, J. M. C.; Lopes, G. K. B.; Alonso, A.; Hermes-Lima, M., The antioxidant effect of tannic acid on the in vitro copper-mediated formation of free radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2005**, *437* (1), 1-9.
229. Gulcin, I.; Huyut, Z.; Elmastas, M.; Aboul-Enein, H. Y., Radical scavenging and antioxidant activity of tannic acid. *Arabian Journal of Chemistry* **2010**, *3* (1), 43-53.
230. Douglass, M.; Bezak, E.; Penfold, S., Monte Carlo investigation of the increased radiation deposition due to gold nanoparticles using kilovoltage and megavoltage photons in a 3D randomized cell model. *Medical Physics* **2013**, *40* (7).
231. Guidelli, E. J.; Ramos, A. P.; Zaniquelli, M. E. D.; Nicolucci, P.; Baffa, O., Synthesis and Characterization of Gold/Alanine Nanocomposites with Potential Properties for Medical Application as Radiation Sensors. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2012**, *4* (11), 5844-5851.
232. Wolfe, T.; Guidelli, E. J.; Gomez, J. A.; Baffa, O.; Nicolucci, P., Experimental assessment of gold nanoparticle-mediated dose enhancement in radiation therapy beams using electron spin resonance dosimetry. *Physics in Medicine and Biology* **2015**, *60* (11), 4465-4480.
233. Smith, C. L.; Ackerly, T.; Best, S. P.; Gagliardi, F.; Kie, K.; Little, P. J.; McCorkell, G.; Sale, C. A.; Tsunei, Y.; Tominaga, T.; Volaric, S. S.; Geso, M., Determination of dose enhancement caused by gold-nanoparticles irradiated with proton, X-rays (kV and MV) and electron beams, using alanine/EPR dosimeters. *Radiation Measurements* **2015**, *82*, 122-128.

234. Regulla, D. F.; Deffner, U., Dosimetry by ESR spectroscopy of alanine. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1982**, *33* (11), 1101-1114.
235. Sagstuen, E.; Hole, E. O.; Haugedal, S. R.; Nelson, W. H., Alanine radicals: Structure determination by EPR and ENDOR of single crystals X-irradiated at 295 K. *Journal of Physical Chemistry A* **1997**, *101* (50), 9763-9772.
236. Guidelli, E. J.; Baffa, O., Influence of photon beam energy on the dose enhancement factor caused by gold and silver nanoparticles: An experimental approach. *Medical Physics* **2014**, *41* (3).
237. Regulla, D. F.; Deffner, U., Dosimetry by ESR spectroscopy of alanine. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes* **1982**, *33* (11), 1101-1114.
238. Heydari, M. Z.; Malinen, E.; Hole, E. O.; Sagstuen, E., Alanine radicals. 2. The composite polycrystalline alanine EPR spectrum studied by ENDOR, thermal annealing, and spectrum simulations. *Journal of Physical Chemistry A* **2002**, *106* (38), 8971-8977.

## 7 – ANEXOS

### **Mecanismos envolvidos na formação de espécies reativas de oxigênio em um nanohíbrido composto por nanotubos de carbono semicondutores enriquecidos (6,5) e porfirinas**

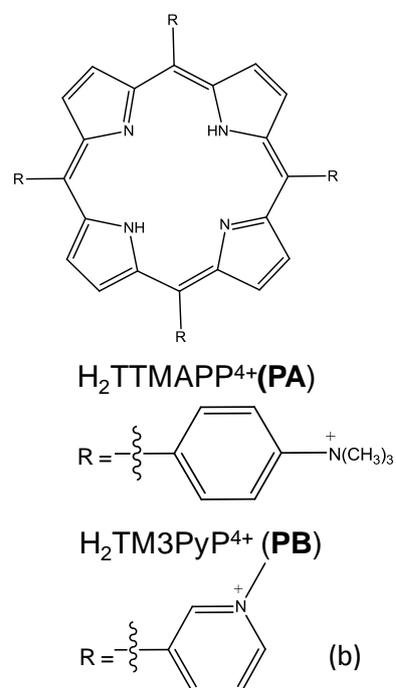
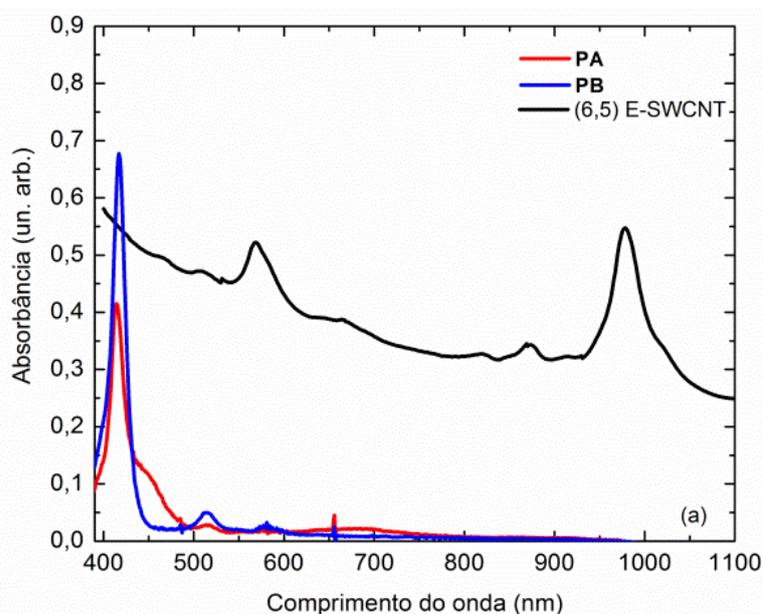
Nanotubos de carbono (NTCs) são formados pelo enrolamento de folhas de grafeno no formato de tubos. O grafeno é um material bidimensional composto por átomos de carbono com hibridização  $sp^2$  numa estrutura hexagonal, com espessura de um átomo. NTCs também têm sido testados como possíveis fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica [1-3]. Nanotubos de carbono de paredes simples (SWCNTs, do inglês *single-walled carbon nanotubes*) possuem bandas de absorção próximas ao infravermelho (650-900 nm) que permitem sua utilização em terapia fotodinâmica e foto-térmica [3]. Nanotubos de parede simples são compostos por uma mistura de nanotubos metálicos (m-SWCNT) e semicondutores (s-SWCNT). Para os NTCs metálicos, a densidade de estados no nível de Fermi possui um valor finito, de forma que a energia de excitação é rapidamente convertida em calor por meio de decaimento não radiativo rápido, enquanto que para NTCs semicondutores a densidade de estados no nível de Fermi é nula, o que permite que a energia de excitação seja usada para gerar espécies reativas de oxigênio [3]. Desta maneira m-SWCNT e s-SWCNT podem ser úteis para terapia foto-térmica e fotodinâmica, respectivamente [3].

A combinação de NTCs com quiralidade definida (6,5) (semicondutores) e porfirinas mostrou-se um sistema híbrido eficiente na geração de oxigênio singlete quando iluminados com luz visível e de comprimento de onda próximo ao infravermelho [1].

Em colaboração com a professora Dayse C. S. Martins e a aluna Camila S. Monteiro do Departamento de Química da UFMG, avaliamos os processo de transferência de energia e/ou carga envolvidos na fotossensibilização de soluções de nanotubos de carbono enriquecidos, chamados (6,5) E-SWCNT [4]. Neste trabalho foram utilizadas duas porfirinas diferentes, *5,10,15,20-tetrakis(4-trimethylammoniumphenyl)porphyrin* [PA ou  $H_2TTMAPP(OTs)_4$ ] (Sigma Aldrich) e *5,10,15,20-tetrakis(N-methylpyridinium-3-*

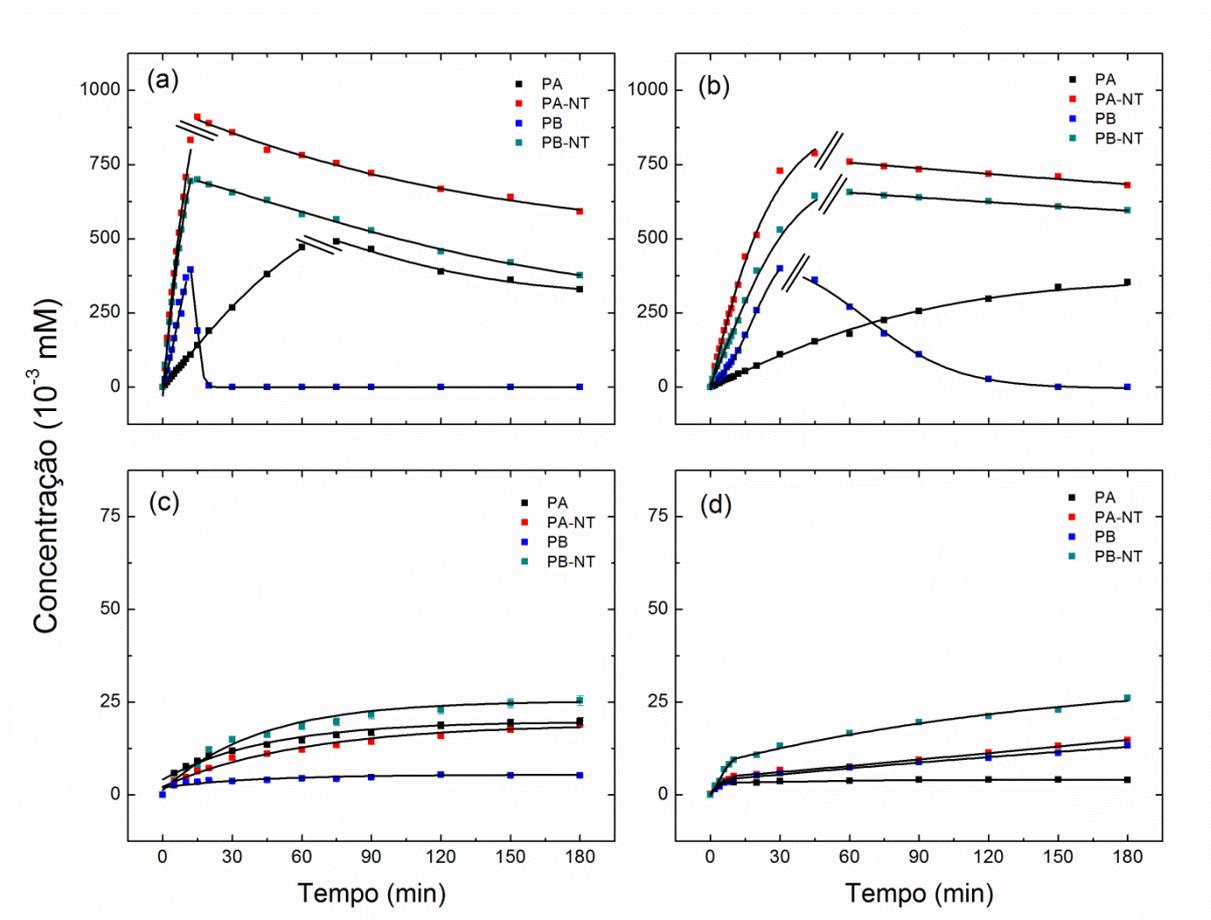
*yl)porphyrin (chloride salt) [PB ou H<sub>2</sub>TM3PyP(Cl)<sub>4</sub>]* sintetizada de acordo com protocolo estabelecido [5]. Apesar de alguns trabalhos mostrarem que SWCNT são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio por si só [1-3], as porfirinas são usadas devido ao fato de que elas podem transferir carga para SWCNT [6]. Os mecanismos de transferência de energia e/ou carga para oxigênio molecular com formação de EROs são pouco entendidos. Entretanto, neste trabalho de colaboração, foi possível observar que as suspensões de NTCs enriquecidas são capazes de gerar radicais hidroxila, além de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quando combinados à moléculas de porfirinas. A técnica de armadilhas de spin também foi utilizada para detecção destas espécies reativas. Os *spin traps* TEMP e PBN foram utilizados nas concentrações descritas na seção 3.2.6. A preparação das amostras foi feita de forma semelhante, com a substituição das nanoestruturas de ouro por NTCs enriquecidos (E-SWCNT).

Na figura 1 (a) são mostrados os espectros de absorção ótica das porfirinas **PA** e **PB** e dos NTCs semicondutores com quiralidade (6,5). Na figura 1 (b) pode-se observar a estrutura das porfirinas catiônicas utilizadas, **PA** e **PB**. Os nanotubos foram enriquecidos por meio de processo de separação descrito de forma detalhada na literatura [4]. Descreveremos brevemente alguns dos resultados obtidos neste trabalho.



**Figura 1:** Espectros de absorção óptica das porfirinas **PA** e **PB** e do E-SWCNT (a). Estrutura das porfirinas catiônicas  $H_2TTMAPP^{4+}$  (**PA**) e  $H_2TM3PyP^{4+}$  (**PB**).

As porfirinas **PA** e **PB** foram utilizadas na concentração  $55 \mu M$ . O híbrido formado por E-SWCNT/porfirinas e as porfirinas puras foram irradiados com comprimentos de onda 570 nm, 630 nm, 760 nm e 940 nm com radiâncias integradas 16, 6, 4 e  $9 \text{ mW cm}^{-2}$ , respectivamente. As concentrações dos adutos de spin  $TEMP^{-1}O_2$  são mostradas na figura 2, para os comprimentos de onda utilizados para irradiação das amostras.

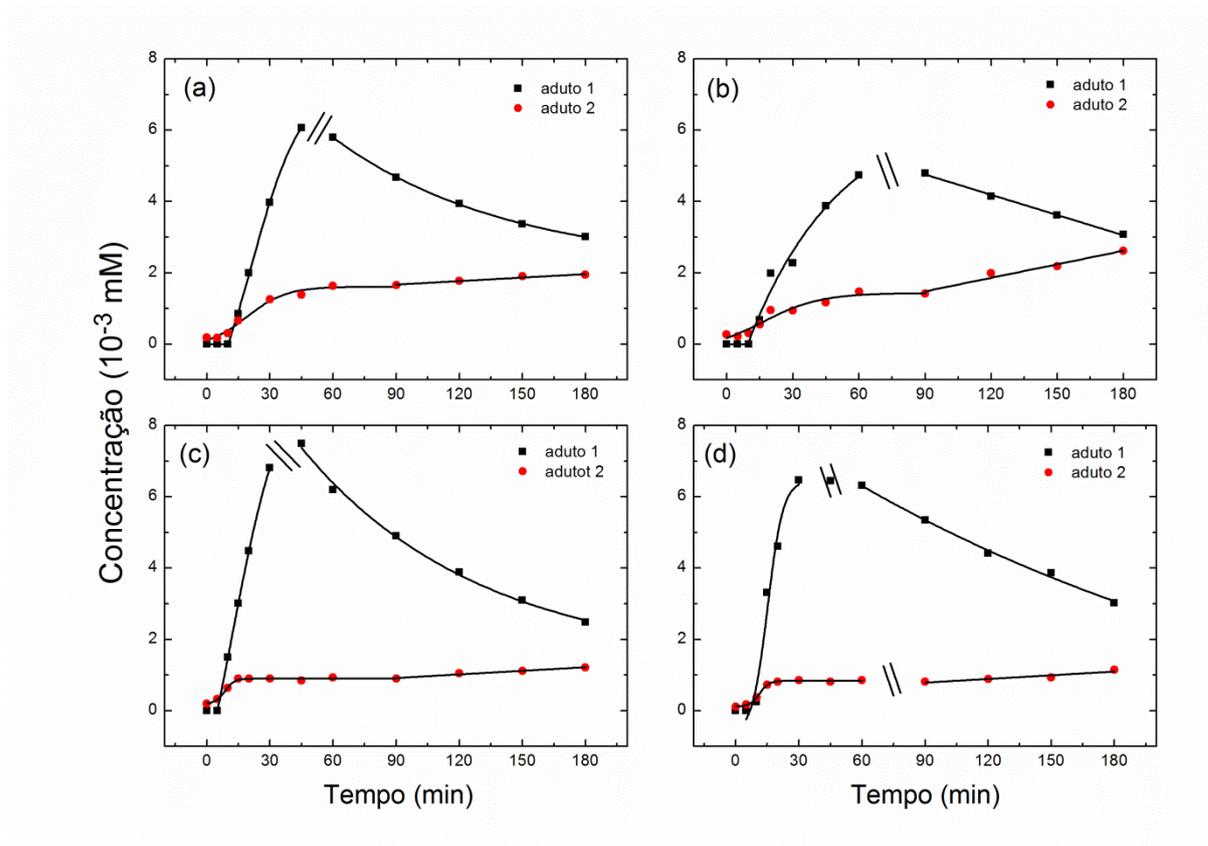


**Figura 2:** Concentração dos adutos de spin  $TEMP^{-1}O_2$  após iluminação de diferentes soluções aquosas contendo **PA** ou **PA/E-SWCNT** em função da iluminação com (a) 570 nm, (b) 630 nm, (c) 760 nm e (d) 940 nm. A concentração de todos os reagentes é mantida constante em todos os experimentos: TEMP (1M), **PA** e **PB** ( $55 \mu M$ ).

A formação do aduto com TEMP, característico do TEMPOL, indica que o mecanismo dominante é o do tipo II, num mecanismo de transferência de energia

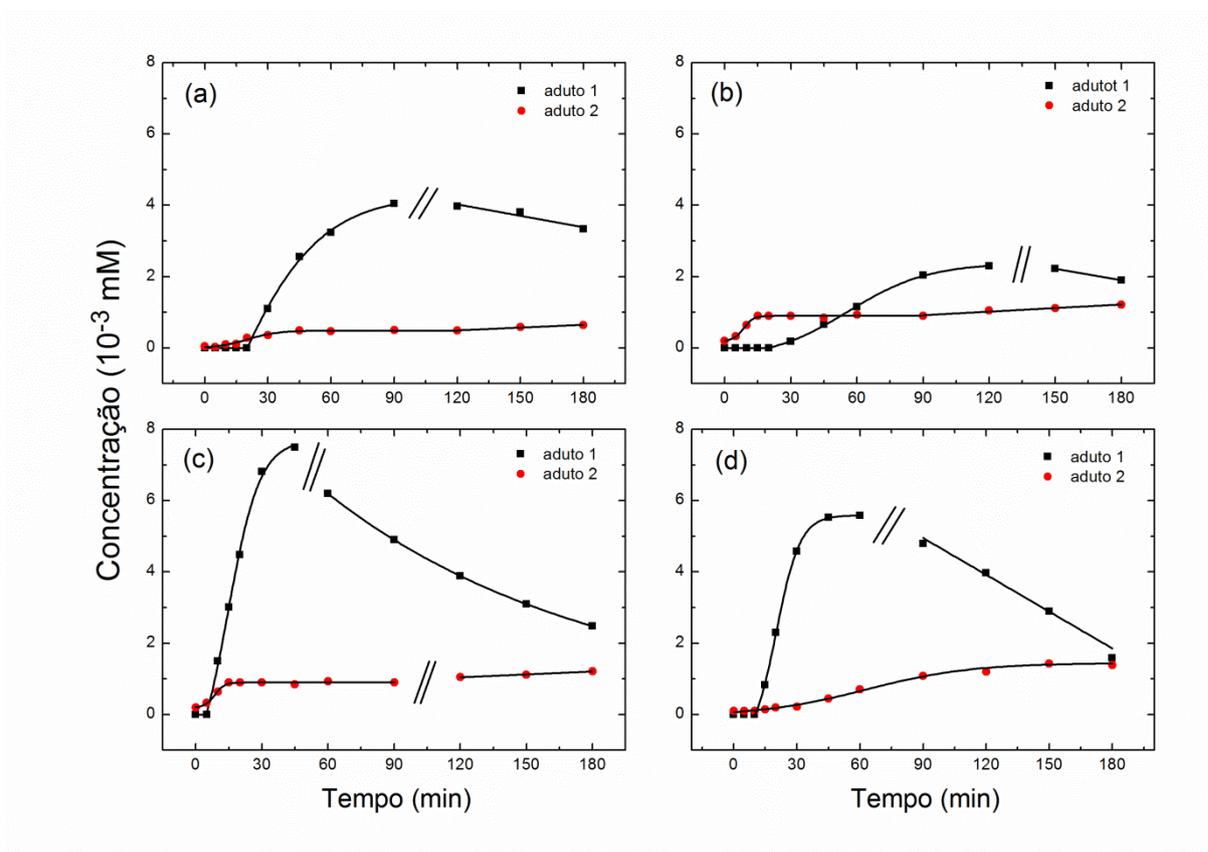
levando à formação de  $^1\text{O}_2$ , corroborado pelas medidas de *spin trapping* com TEMP e supressores. Pode-se notar a degradação do aduto para tempos de iluminação longos. A concentração dos adutos gerados pode ser descrita pela equação 4.2, para os minutos iniciais do processo de iluminação. Nota-se que o híbrido **PA**/E-SWCNT é o mais eficiente na geração de oxigênio singleto quando irradiado com luz de 570 e 630 nm de comprimento de onda. As constantes de reação para iluminação com luz amarela (570 nm) são:  $k(\text{PA-NT}) = 69,4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $k(\text{PA}) = 9,3 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $k(\text{PB}) = 36,8 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ,  $k(\text{PB-NT}) = 59,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Um mecanismo, onde há transferência de energia entre nanotubo e porfirina, foi confirmado, mostrando um aumento na geração de oxigênio singleto para o sistema híbrido formado pelas porfirinas e E-SWCNT.

Além da geração de  $^1\text{O}_2$ , medidas com PBN (figura 3) indicaram a geração de dois adutos, PBN-OH•(aduto 1) e PBN• (aduto 2). O aduto 1 possui seis linhas, geradas pelo desdobramento de cada uma das três linhas, (interação hiperfina do elétron desemparelhado com o átomo de N ( $a_N = 1,55(5) \text{ mT}$ ) em um dubleto, resultado da interação com um átomo de hidrogênio  $\beta$  ( $a_H = 0,31(5) \text{ mT}$ ). Nestes sistemas, também é possível identificar a presença de três linhas referente ao aduto PBN• ( $a_N = 1,68 \text{ mT}$ ), causado provavelmente pela desprotonação da molécula do PBN. Os híbridos **PA**/E-SWCNT e **PB**/E-SWCNT também são mais eficientes na geração de radicais hidroxila. Porém, estes radicais são gerados com um atraso em relação ao início da iluminação das amostras. Isso também ocorre nas amostras contendo POR/AuNR, sendo um indício de que a geração destes radicais OH• também está diretamente associada à produção inicial de  $^1\text{O}_2$ .



**Figura 3:** Concentração dos adutos de spin PBN-OH• (aduto 1) e PBN• (aduto 2) após iluminação de diferentes soluções aquosas em função da iluminação com 570 nm, contendo PBN e (a) **PA**, (b) **PB**, (c) **PA/E-SWCNT** e (d) **PB/E-SWCNT**. A concentração de todos os reagentes é mantida constante em nos experimentos.

De forma semelhante à empregada com o híbrido formado por POR/ AuNR, os supressores NaN<sub>3</sub> (100mM) para oxigênio singleto e D-manitol (100 mM) para radicais hidroxila forma utilizados. A adição de D-manitol aos sistemas contendo PBN pode ser vista na figura 4. Em comparação à figura 2, nota-se uma redução nas concentrações dos adutos de spin na presença do supressor, para as porfirinas puras. Já para o híbrido **PA/E-SWCNT** é possível ver que há um aumento no atraso da geração de adutos. Parece que o D-manitol é consumido inicialmente e, em seguida, os radicais são gerados novamente e capturados pelo *spin trap*. Como os híbridos são mais eficientes na geração de EROs em comparação às porfirinas puras, o atraso na geração dos adutos é menor quando D-manitol é adicionado aos sistemas. A adição de NaN<sub>3</sub> levou a concentração dos adutos com PBN a zero.



**Figura 4:** Concentração dos adutos de spin PBN-OH• (aduto 1) e PBN• (aduto 2) após iluminação de diferentes soluções aquosas em função da iluminação com 570 nm, contendo PBN e (a) PA+D-manitol, (b) PB+D-manitol, (c) PA/E-SWCNT+D-manitol e (d) PB/E-SWCNT+D-manitol. A concentração de todos os reagentes é mantida constante em todos os experimentos.

O mecanismo proposto envolve a geração de radicais hidroxila a partir da geração de oxigênio singlete, uma vez que a adição de NaN<sub>3</sub> foi capaz de suprimir os adutos de spin com PBN para todos os sistemas testados. Este processo é atribuído à transferência de carga da porfirina para a molécula de oxigênio num processo intermediário, antes da formação dos adutos dos radicais OH• com PBN [7]. Dois caminhos são propostos:



A concentração do aduto 2 cresce enquanto que a do aduto 1 (PBN- OH•) decresce (figura 4), a partir de 60 minutos, em concordância com ao mecanismo A2. Quando D-manitol é adicionado aos sistemas, a concentração dos adutos PBN- OH• decresce. Porém, os híbridos são menos afetados, de forma que o mecanismo descrito em A2 é o caminho que leva à formação de radicais hidroxila para os híbridos, enquanto A1 descreve o mecanismo de geração de OH• para a porfirina pura ou E-SWCNT.

Na ausência de porfirinas ou E-SWCNT não obtemos sinal RPE do aduto PBN-OH•, o que sugere que este aduto é formado a partir da reação entre fotossensibilizador e PBN e não por um processo fotoquímico direto. Acreditamos que oxigênio singleto atue como mediador na formação de radical OH•.

A razão pela qual o sistema híbrido é mais eficiente para a geração de radicais hidroxila, sobretudo o híbrido **PA**/E-SWCNT é devido ao fato de que a porfirina serve de ponte para os portadores de cargas através da camada do surfactante SDS que recobre os NTCs, permitindo a transferência de elétrons para o oxigênio dissolvido no meio aquoso e prevenção da recombinação de éxcitons nos E-SWCNT. As porfirinas apresentam alta condutividade eletrônica ao longo ou através do anel [8] devido a sua ligação de caráter conjugado (interações  $\pi - \pi^*$ ). Na ausência da porfirina o transporte de elétrons não é possível, pois o surfactante que recobre o E-SWCNT isola eletricamente o NTC da solução aquosa, devido à longa cadeia do surfactante ou, menos provável, forneça caminhos de recombinação não radiativa. Desta forma, a porfirina participa do processo de transferência de carga fotoinduzida [4]. A geração de oxigênio singleto pode ser explicada por um mecanismo de transferência de energia do tipo FRET ou transferência de carga fotoinduzida, onde os NTC, devido a sua alta densidade de estados acima do *gap*, absorvem luz mais eficientemente que as porfirinas [9]. Consequentemente, os NTCs podem transferir sua energia para as porfirinas, que a transfere para oxigênio molecular. Esta transferência é mais eficiente quando as bandas de absorção da porfirina se sobrepõem às bandas de emissão dos NTCs. Para a porfirina, as bandas de absorção ocorrem entre 400 nm e 700 nm, portanto, a formação de oxigênio singleto na região do infravermelho (760 nm e 940 nm) é menos eficiente.

Nossos resultados mostram que os híbridos são mais eficientes na geração de oxigênio singleto em comparação às porfirinas puras. O híbrido **PA**/E-SWCNT é oito

vezes mais eficiente que **PA** pura quando irradiados com luz amarela (570 nm) e seis vezes mais eficiente quando usa-se luz de comprimento de onda 630 nm. Dentre as razões para o melhor rendimento da porfirina **PA** podemos destacar a distância entre os grupos carregados periféricos e o macrociclo da porfirina. A carga líquida de **PB** está mais próxima do centro do seu anel macrocíclico em comparação à **PA**, o que pode confinar a função de onda do éxciton em **PB**. A configuração mais provável, devido à hidrofobicidade do macrociclo considerando-se a porfirina voltada para a parede do E-SWCNT, é que a sobreposição das funções de onda do éxciton de **PB** e E-SWCNT seja menor em comparação à **PA**. Em relação à geração de hidroxila, concluímos que estes radicais são gerados a partir de oxigênio singleto. A porfirina atua como condutor entre os nanotubos e água, o que possibilita que o elétron atravesse a micela do surfactante.

O mecanismo responsável pela eficiência dos sistemas é baseado na transferência de energia por ressonância de Förster (FRET), em que E-SWCNT transferem parte da energia de excitação para a porfirina que, na sequência, é capaz de transferir energia para a molécula de oxigênio, excitando-a.

## REFERÊNCIAS

1. Safar, G. A. M.; Gontijo, R. N.; Fantini, C.; Martins, D. C. S.; Idemori, Y. M.; Pinheiro, M. V. B.; Krambrock, K., Enhanced Oxygen Singlet Production by Hybrid System of Porphyrin and Enriched (6,5) Single-Walled Carbon Nanotubes for Photodynamic Therapy. *Journal of Physical Chemistry C* **2015**, *119* (8), 4344-4350.
2. Wang, L.; Shi, J. J.; Liu, R. Y.; Liu, Y.; Zhang, J.; Yu, X. Y.; Gao, J.; Zhang, C. F.; Zhang, Z. Z., Photodynamic effect of functionalized single-walled carbon nanotubes: a potential sensitizer for photodynamic therapy. *Nanoscale* **2014**, *6* (9), 4642-4651.
3. Murakami, T.; Nakatsuji, H.; Inada, M.; Matoba, Y.; Umeyama, T.; Tsujimoto, M.; Isoda, S.; Hashida, M.; Imahori, H., Photodynamic and Photothermal Effects of Semiconducting and Metallic-Enriched Single-Walled Carbon Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134* (43), 17862-17865.
4. Monteiro, C. S.; Ferreira, D. C.; Safar, G. A. M.; Gontijo, R. N.; Fantini, C.; Martins, D. C. S.; Idemori, Y. M.; Pinheiro, M. V. B.; Krambrock, K., Unravelling the mechanisms of reactive oxygen species formation in nanohybrid systems of porphyrins and enriched (6,5) single-walled carbon nanotubes for photosensitization. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2016**, *18* (30), 20459-20465.

5. Batinic-Haberle, I.; Spasojevic, I.; Hambright, P.; Benov, L.; Crumbliss, A. L.; Fridovich, I., Relationship among redox potentials, proton dissociation constants of pyrrolic nitrogens, and in vivo and in vitro superoxide dismutating activities of manganese(III) and iron(III) water-soluble porphyrins. *Inorganic Chemistry* **1999**, *38* (18), 4011-4022.
6. Safar, G. A. M.; Ribeiro, H. B.; Malard, L. M.; Plentz, F. O.; Fantini, C.; Santos, A. P.; de Freitas-Silva, G.; Idemori, Y. M., Optical study of porphyrin-doped carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters* **2008**, *462* (1-3), 109-111.
7. Ueda, J. i.; Takeshita, K.; Matsumoto, S.; Yazaki, K.; Kawaguchi, M.; Ozawa, T., Singlet Oxygen-mediated Hydroxyl Radical Production in the Presence of Phenols: Whether DMPO- $\cdot$ OH Formation Really Indicates Production of  $\cdot$ OH? *Photochemistry and photobiology* **2003**, *77* (2), 165-170.
8. Liu, Q.; Zhu, J.; Sun, T.; Zhou, H.; Shao, Q.; Li, G.; Liu, X.; Yin, Y., Porphyrin nanotubes composed of highly ordered molecular arrays prepared by anodic aluminum template method. *RSC Advances* **2013**, *3* (8), 2765-2769.
9. Wang, F.; Dukovic, G.; Brus, L. E.; Heinz, T. F., The optical resonances in carbon nanotubes arise from excitons. *Science* **2005**, *308* (5723), 838-841.