

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Física "Gleb Wataghin"

TESE DE DOUTORADO

PROCESSOS PARA MONITORAÇÃO E OTIMIZAÇÃO
DA TERAPIA FOTODINÂMICA DE TUMORES

DENISE MARIA ZEZECC

Campinas, Dezembro de 1991



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE FÍSICA GLEB WATAGHIN

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida pela aluna Denise Maria
Zezell e aprovada pela comissão julgadora.
Campinas, 27/01/92

PROCESSOS PARA MONITORAÇÃO E OTIMIZAÇÃO
DA TERAPIA FOTODINÂMICA DE TUMORES

DENISE MARIA ZEZELL

Tese de Doutorado, sob orientação
do Prof. Dr. Jorge Humberto Nicola,
apresentada ao Instituto de Física
Gleb Wataghin como parte dos
requisitos necessários para obtenção
do Título de Doutora em Física.

Campinas, dezembro de 1991

Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq e pela UNICAMP

Aos meus queridos pais,
pela dedicação, amizade, carinho
e apoio.

Ao Silvério,

por me mostrar que Venezia
estará sempre conosco.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer nesta oportunidade à todos aqueles que com sua colaboração tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao prof. Jorge Humberto Nicola, pela orientação e incentivo durante este trabalho de tese e por propiciar que eu atingisse condições de autonomia em meu trabalho.

Ao prof. Geraldo Ferreira Mendes, por sua atenção, auxílio no laboratório, disponibilidade à toda prova; e também ao Jorge e Lauro, pela cessão do micro e da impressora-laser.

Àqueles professores do Grupo de Propriedades Ópticas que cederam equipamentos e seus laboratórios. Aos alunos do mesmo grupo.

Ao Maurício Cantão, pelo auxílio na obtenção dos espectros de absorção.

Ao Prof. Marcel Tabak e Hidetake pelo auxílio nas medidas de fluorescência e excitação de fluorescência.

Ao César de Oliveira, pela tentativa de realizar medidas de emissão por dupla excitação em sistema pulsado.

Ao Sebastião Claudino da Silva, pelo auxílio nas medidas de espalhamento Raman.

À professora Ester Danielli Nicola, por permitir a participação em um teste de fluorescência "in vivo", com cobaias e pela revisão do abstract.

Ao pessoal técnico e científico do GDAL: Edson, Mara, Mário, Marinalva, Milton, Nelson, Venerando e Wagner. Ao Palmeira e prof. Rosa Couto. Pela presteza e amizade.

Ao pessoal da Biblioteca, da Secretaria do Departamento, da Secretaria de Serviços Técnicos, da Secretaria de Graduação e da Secretaria de Pós-Graduação; ao pessoal do Desenho Técnico e da Gráfica, por todos os trabalhos (sempre de

última hora) destes nove anos. À Lori, Lene e Maria Ignêz, pela atenção e carinho.

Aos amigos Paulo e Carmen, Martha e Cláudio, Leide, Valéria e Carla.

À toda família Crestana pelo carinho e momentos de lazer.

Ao meu querido irmão Luiz e à Tica.

Finalmente, à todos meus amigos, e pensando bem, aos que não são tão amigos também, pois cada qual a sua maneira, me incetivaram cada vez mais.

À todos vocês, o meu Muito Obrigada!

RESUMO

A Terapia Fotodinâmica de Câncer, como um processo complexo, permite o desenvolvimento de estudos direcionados à diferentes áreas do conhecimento. No presente trabalho apresentamos inicialmente as bases da terapia ressaltando a sua forte dependência com a espectroscopia óptica. Apresentamos toda a "ferramenta" básica que possibilitou o entendimento dos nossos resultados experimentais em fluorescência e Raman, os quais acrescentam contribuições originais, experimental e teórica, para esta linha de pesquisa. Nosso objetivo principal foi o de utilizar resultados acadêmicos, como os de fluorescência e absorção óptica, para elaborar experimentos fronteiriços com a prática médica. Neste sentido demonstramos a viabilidade de um método capaz de monitorar o processo da terapia "in vivo", bem como mostramos que a eficiência da Terapia Fotodinâmica de câncer pode ser melhorada em condições hiperbáricas de oxigênio adequadas.

ABSTRACT

Photodynamic Therapy for the treatment of Cancer is a very complex process which led us in the study of different areas of knowledge. In this work we discuss all the basic concepts of the Photodynamic Therapy in strong connection to optical spectroscopy. The scientific tools indispensable for understanding of our results in fluorescence and Raman spectra were presented along with original experimental and theoretical contributions. The aim of this thesis was the use of academic results which could be useful in medicine. Therefore we have demonstrated the feasibility of a new method for monitoring the Photodynamic Therapy "in vivo". Besides these results we were able to demonstrate that in Hyperbaric Oxygen atmosphere the PDT process would probably be accelerated.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1- INTRODUÇÃO	5
2- TERAPIA FOTODINÂMICA DE TUMORES	11
2.1- Seletividade e Retenção de Fotossensibilizadores	12
2.2- Processos Físicos Envolvidos	14
2.2.1- Descrição dos Tipos e Processos de Ação Fotossensibilizadora	15
2.2.2- Descrição dos tipos de Reação de Fotossen- sibilização não Envolvendo Oxigênio Singlete ...	20
2.3- Ação Fotossensibilizadora da Hematoporfirina	22
2.3.1- Dependência da Presença de Oxigênio	24
3- PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA	28
3.1- Revisão dos Conceitos de Mecânica Quântica de Interesse para a Espectroscopia Óptica	28
3.1.1- Regras de Seleção	35
3.1.2- Transições	39
3.2- Fotoluminescência	42
3.2.1- Fluorescência	44
3.2.2- Fosforescência	48
3.3- Simetria Molecular e Teoria de Grupos	50
3.4- Espectroscopia Raman	57
3.5- Vibrações Moleculares	60
3.6- Espectro Eletrônico de Moléculas Poliatômicas	66

4- ESTUDO DAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DA HEMATOPORFIRINA	72
4.1- Espectros de Absorção e Emissão	74
4.1.1- Descrição Experimental e Resultados	74
4.1.2- Discussão	88
4.2- Espectros Raman	90
4.2.1- Descrição Experimental e Resultados	90
4.2.2- Discussão	95
4.3- Espectros de Emissão Excitados Simultaneamente por Dois Diferentes Comprimentos de Onda	102
4.3.1- Descrição Experimental	103
4.3.2- Resultados e Discussão	108
5- OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA PELA ADEQUAÇÃO DA PRESSÃO PARCIAL DE OXIGÊNIO	115
5.1- Condições de Oxigenação em Tecidos Normais e Tumorais	115
5.1.1- Avaliação Quantitativa em Tecidos	121
5.1.2- Avaliação Qualitativa	124
5.2- Proposta	126
6- CONCLUSÃO	127
APÊNDICE I- CONFIGURAÇÃO ATÔMICA E MOLECULAR DO OXIGÊNIO SINGLETE	129
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	132

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A Terapia Fotodinâmica de Tumores é um método alternativo de tratamento de câncer, onde uma reação de fotossensibilização localizada é provocada por uma substância exógena, o fotossensibilizador. Esta substância é injetada intravenosamente, seletivamente retida pelas áreas neoplásicas e após alguns dias é expelida pelo tecido normal. Irradia-se então a região afetada (por via direta, endoscópio ou fibra óptica) com comprimento de onda bem determinado, o que causa necrose tumoral.

Uma vez que câncer é um termo que abrange uma grande família de doenças com padrões clínicos muito diferentes, é difícil que apenas um fotossensibilizador possa ser eficiente em todos os casos. Os compostos da família das porfirinas têm sido particularmente empregados.

A propriedade óptica de emissão fluorescente na região do visível, característica de todas as porfirinas, e o fato de que estas encontram-se preferencialmente retidas no tecido neoplásico (que difere do tecido normal em pH, permeabilidade da membrana, etc.), proporciona não apenas possibilidade de destruição localizada dos tumores, mas também sua detecção e delimitação. Trabalhos recentes^(1,2) indicam que esta característica vem sendo utilizada no diagnóstico precoce de pequenos aglomerados tumorais nos bronquíolos, que não podem ser detectados pelas técnicas convencionais além de

possibilitar a prevenção de certos tipos de câncer, através da detecção de tumores ainda em sua fase benigna.

A figura 01 sumariza as etapas do processo de Terapia Fotodinâmica de Tumores (do inglês Photodynamic Therapy = PDT) com um particular derivado de hematoporfirina

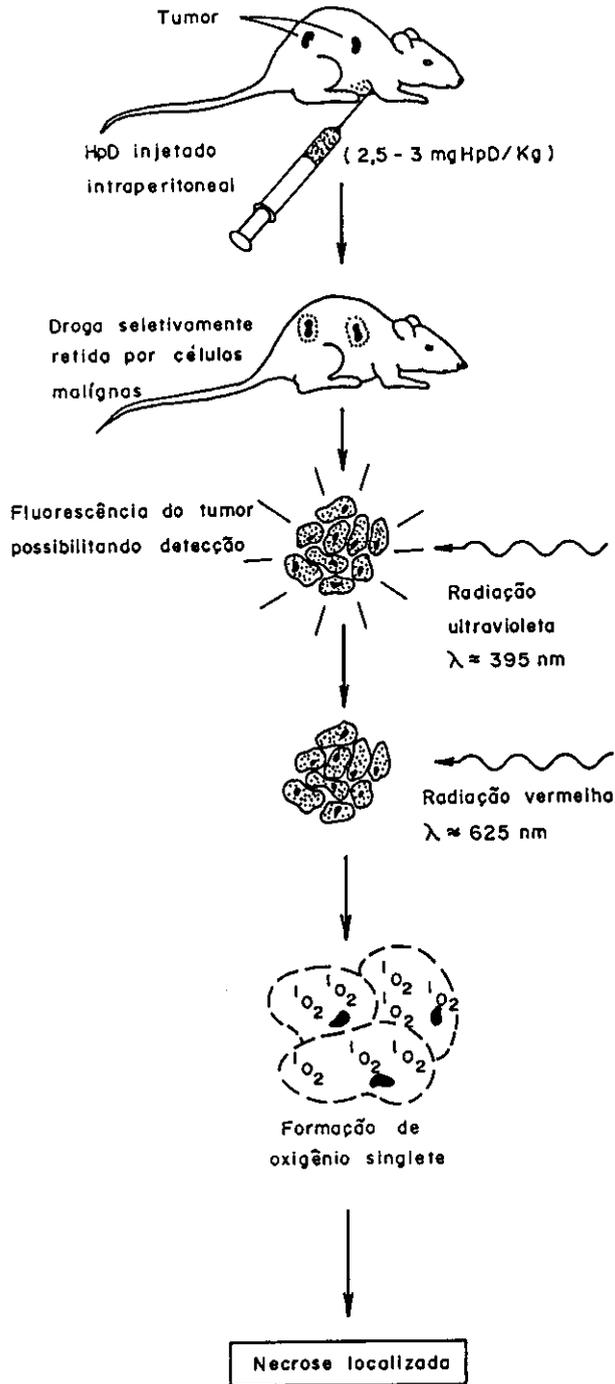


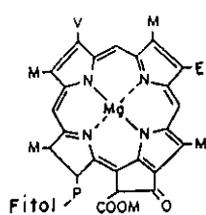
Figura 01- Diagrama esquemático do processo de Terapia Fotodinâmica de Tumores com Hematoporfirina.

Depois do primeiro trabalho em humanos publicado por Dougherty em 1978⁽³⁾, milhares de pacientes têm sido tratados por esta técnica. Os casos publicados incluem neoplasias originárias de diferentes órgãos, como carcinoma de células escamosas; adenocarcinoma; carcinoma de células basais, de transição e adenoma cístico; assim como tumores malignos de origem não epitelial como glioma, melanoma, retinoblastoma, liposarcoma, cromosarcoma e sarcoma de Kaposi. A maioria dos tipos de tumor responde ao tratamento e os resultados são promissores, entretanto órgãos altamente pigmentados e vísceras maciças (fígado, baço, rins e medula óssea) impedem a penetração da luz para o tratamento, o que os torna resistentes à Terapia Fotodinâmica de Tumores.

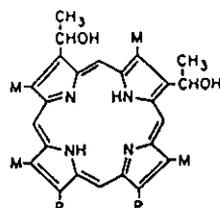
Entre os fotossensibilizadores usados, aquele que tem apresentado resultados mais promissores e maior eficiência é a Hematoporfirina e em particular um de seus derivados, o Dihematoporfirina Éter (DHE). A figura 02 apresenta a estrutura química dos sensibilizadores mais conhecidos.

Esta tese é uma continuação do trabalho iniciado no mestrado e é uma das linhas de pesquisa do Grupo de Desenvolvimento e Aplicações de Laser, que tem como objetivo não apenas estudar a nível acadêmico os diversos tópicos da Terapia Fotodinâmica de Tumores, mas também contribuir para a implantação desta terapia no Hospital das Clínicas da Unicamp. Esta tese tem o objetivo específico de estudar as propriedades ópticas da hematoporfirina, e através delas colaborar na compreensão de alguns fenômenos envolvidas na terapia, bem como propor um modelo de monitoração do processo de destruição tumoral e um modelo de otimização da Terapia Fotodinâmica de

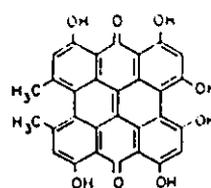
Tumores.



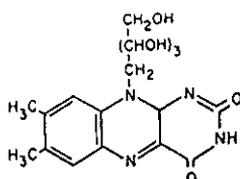
CLOROFILA



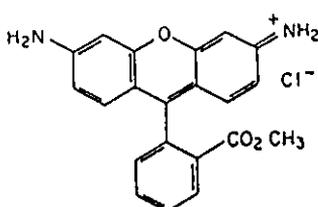
HEMATOPORFIRINA



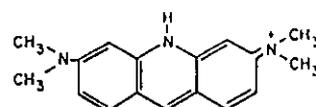
HIPERICINA



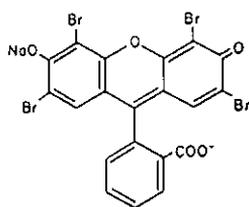
RIBOFLAVINA



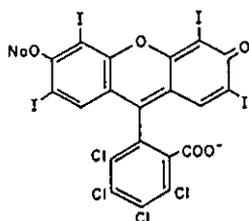
RODAMINA 123



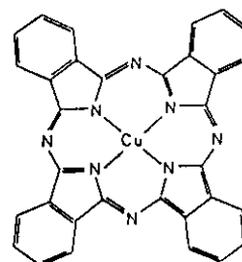
ACRIDINA LARANJA



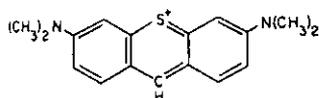
EOSINA Y



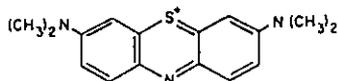
ROSA BENGALA



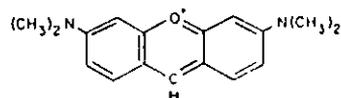
FTALOCIANINA



TIOPIRONINA



METILENO AZUL



PIRONINA Y

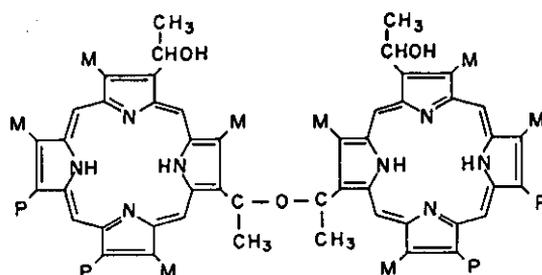
DIHEMATOPORFIRINA
ÉTER

Figura 02- Estrutura química dos sensibilizadores mais usados.

Para isto, apresentaremos no Capítulo II uma revisão descrevendo o processo de entrada e retenção seletiva das porfirinas nas células, bem como dos diferentes tipos de ação fotossensibilizadora que poderão ocorrer subsequentemente; em especial aquelas reações envolvendo a produção de oxigênio singlete. Finalizaremos este capítulo com a descrição do mecanismo de ação e parâmetros envolvidos utilizados na PDT com hematoporfirina.

No Capítulo III apresentaremos uma revisão dos conceitos básicos da física quântica necessários para a compreensão dos fenômenos observados na espectroscopia óptica.

A descrição dos resultados experimentais e uma discussão qualitativa dos mesmos é feita no Capítulo IV onde entre outros resultados apresentamos linhas Raman que ainda não tinham sido observadas.

Apesar do processo de PDT já estar em fase de uso clínico em vários países, se desconhece métodos capazes de monitorar a eficiência terapêutica durante a realização do tratamento. Somente após uma evolução temporal da doença é possível fazer esta avaliação. Neste sentido, a presente tese contribui, pelo menos academicamente, para a elaboração de um método avaliador do referido processo durante o tratamento, através da medida de intensidade relativa da fluorescência provocada simultaneamente com a PDT propriamente dita.

A otimização da PDT certamente ainda não foi alcançada, haja visto que não são encontrados na literatura muitos trabalhos com esta preocupação. No nosso trabalho, investigamos também as condições de oxigenação em tecido normal e tumoral, que relacionadas ao fato de que o O_2 é o principal

responsável pelo processo de destruição, levam à proposta de associar um tratamento Hiperbárico à PDT, proporcionando assim condições ótimas para um bom resultado da terapia.

CAPÍTULO II

TERAPIA FOTODINÂMICA DE TUMORES COM HEMATOPORFIRINA

A Terapia Fotodinâmica de tumores com hematoporfirina, como toda terapia, apresenta uma eficiência que depende da existência ou realização conjunta de alguns processos. Estes processos podem ser de natureza química, física ou biológica, possibilitando que diferentes áreas do conhecimento científico avancem independentemente apresentando descrições parciais do fenômeno. No presente trabalho estaremos concentrando esforços no entendimento daqueles fenômenos físicos que contribuem para o processo terapêutico sem deixar, entretanto, de dar uma visão abrangente do processo como um todo.

De uma forma geral, a eficiência do processo da Terapia Fotodinâmica de Tumores depende dos seguintes fatores:

- | | | |
|------------|---|---|
| biológicos | { | a) seletividade e retenção do fotossensibilizador |
| físicos | { | b) intensidade da radiação eletromagnética específica que chega na região de tratamento |
| | { | c) eficiência da absorção dos fótons ativadores do processo |
| | { | d) eficiência da transferência de energia de excitação da molécula de hematoporfirina para o oxigênio intracelular. |
| químicos | { | e) efeito oxidante na molécula tumoral |

Nos itens seguintes deste capítulo discute-se cada um dos fatores que contribuem para a eficiência da Terapia Fotodinâmica de Tumores.

2.1- SELETIVIDADE E RETENÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES

Os fotossensibilizadores, como a hematoporfirina, são transportados principalmente pelas proteínas do plasma, em particular pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Estas lipoproteínas apresentam afinidade química por porfirinas e são responsáveis pela entrega das porfirinas (a hematoporfirina é um tipo particular de porfirinas) ligadas a elas para o tecido tumoral. Além disto, as porfirinas podem ser incorporadas pelas células por difusão passiva através da membrana, o que depende da hidrofobicidade e carga destas porfirinas, i.e. p.H⁽⁴⁾. Este é um processo tipicamente biológico.

No primeiro caso, as LDL são "tomadas" pelas células via endocitose mediada por receptores e digeridas por lisossomo hidrolase⁽⁵⁾ onde células tumorais possuem um número maior de receptores LDL que células normais.

No segundo caso, o tecido tumoral apresenta em geral pH mais baixo que o tecido normal, favorecendo a incorporação em particular de Hematoporfirina pura e de um derivado da mesma (HpD). Apesar disto, o pH intracelular é mais alto que do fluido intersticial⁽⁴⁾, e tal diferença parece ser uma importante força direcionadora.

A figura 03 representa uma membrana de eritrócito humano, constituída de uma bicamada lipídica e suas proteínas. O modelo do mosaico fluido mostrada na figura 04 é

universalmente aceito para descrever a fisiologia de uma membrana como esta. Em particular, o processo de entrada das porfirinas na célula e até mesmo em organelas, é explicado.

Enquanto as teorias que tentam explicar o fenômeno de seletividade e retenção de certos corantes como a hematoporfirina por tecidos tumorais não são bem definidas, a prática tem mostrado desde 1960⁽⁶⁻⁸⁾ que o fenômeno existe e mostrou-se útil para a diferenciação através da fluorescência, de tecidos malignos e benignos.

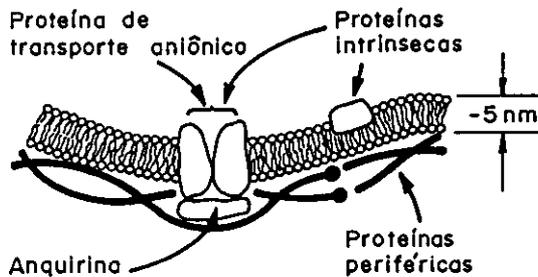


Figura 03- Membrana de um eritrócito humano⁽⁹⁾

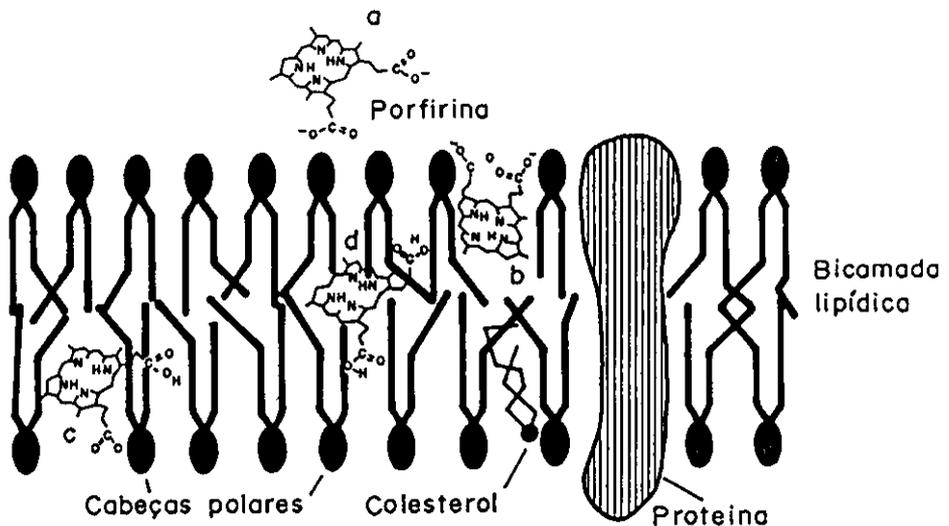


Figura 04- Hematoporfirina entrando na membrana segundo o modelo do mosaico fluido.⁽⁴⁾

2.2- PROCESSOS FÍSICOS ENVOLVIDOS

Na nossa listagem dos processos que definem a eficiência da Terapia Fotodinâmica, chamamos a atenção para a importância da intensidade da radiação (item b página 11). Em todo processo em que a energia dos fótons é absorvida para realizar o efeito esperado, o resultado será proporcional à intensidade da radiação que chega ao meio absorvedor. No caso da terapia fotodinâmica, o efeito ocorre em tecido que normalmente encontra-se abaixo da superfície da pele, assim é necessário considerar a absorção do tecido que se interpõe entre a fonte de luz e o próprio tumor. Para isto um conhecimento da absorção tecidual por diferentes comprimentos de onda se faz necessário. Na figura 05 mostramos que a radiação vermelha é a que mais consegue penetrar no tecido humano (pele). Este fato constitui uma feliz coincidência para a terapia fotodinâmica, pois como veremos adiante, a radiação vermelha é ideal para desencadear o processo de destruição tumoral.

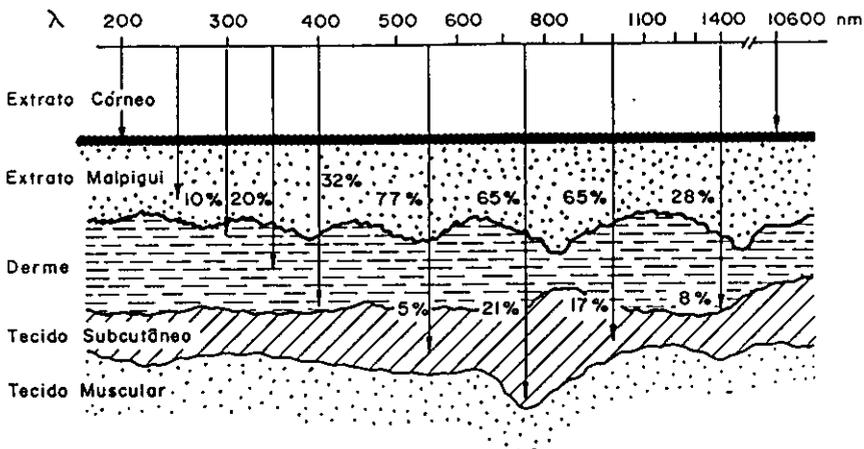


Figura 05- Representação esquemática de um corte de tecido humano e o percentual de penetração de diferentes comprimentos de onda.⁽¹⁰⁾

É claro que o efeito da intensidade no processo deverá apresentar caráter de saturação pois se todos os centros absorvedores já estiverem excitados não adiantará aumentar o aporte de fótons.

A eficiência de absorção dos fótons ativadores do processo (item c, página 11) e a eficiência de transferência de energia de excitação da molécula de hematoporfirina para o oxigênio intracelular (item d, página 07) podem ser entendidas como fatores que compõe a eficiência da terapia através das descrições que seguem nos próximos itens.

2.2.1- DESCRIÇÃO DOS TIPOS E PROCESSOS DE AÇÃO FOTOSSENSIBILIZADORA

Certamente são muitos os mecanismos moleculares que podem estar envolvidos em reações de fotossensibilização, entre eles destacamos:

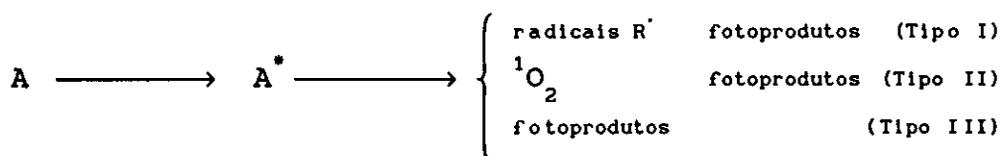
Absorção ressonante de um fóton pelo sensibilizador

Transferência de energia de excitação do sensibilizador

Ejeção de elétron ou íon

Formação de radicais livres e subsequente reação química

Podemos esquematizar o processo de excitação e subsequente desexcitação de uma molécula orgânica A como:



A figura 06 mostra o diagrama de energia de excitação e o processo de desexcitação de uma molécula orgânica A (diagrama de Jablonski) com um par de elétrons no estado

fundamental S_0 . A absorção de um fóton leva um dos elétrons a um orbital vazio, originando o primeiro estado excitado singlete S_1 , cujo tempo de vida é relativamente curto (ps-ns).

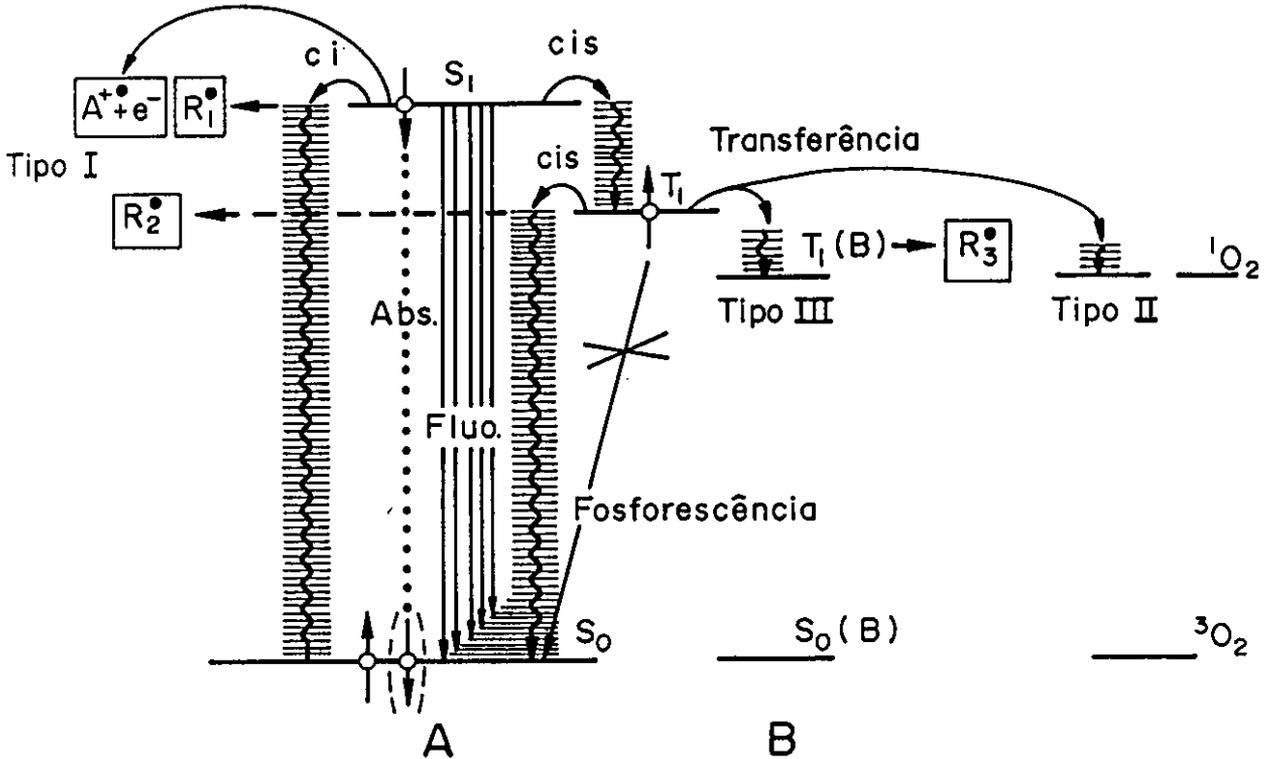


Figura 06- Diagrama de Jablonski⁽¹¹⁾ de uma molécula orgânica A
Os processos de desexcitação são descritos no texto.

Os quatro principais processos de desexcitação estão esquematizados na figura 06, onde A representa a molécula do fotossensibilizador, B representa uma molécula do meio, e O_2 presente no meio. Eles são:

- 1- Emissão (fluorescência, $S_1 \longrightarrow S_0$)
- 2- Conversão interna (C.I.) de energia eletrônica para

vibracional, levando à dissociação em radicais R_1^{\cdot} dando origem a fotossensibilização (Tipos I e II)

3- Ejeção de um elétron e formação de um cátion (A^+) (processo de baixo rendimento quântico mas de importância em alguns sistemas aquosos, contendo cromóforos indol em particular)

4- Cruzamento intersistemas (C.I.S.) para estado triplete T_1 .

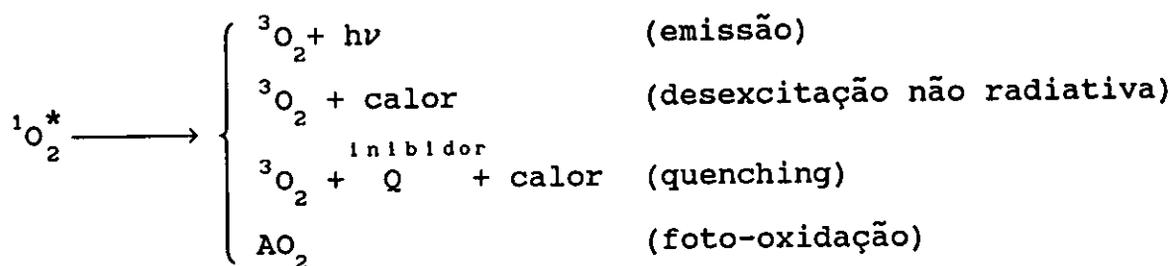
O estado T_1 tem tempo de vida longo (μs - ms) uma vez que os dois elétrons tem spins paralelos. A transferência de energia pode levar a gerar $^1\text{O}_2$ ou excitação de alguma molécula do substrato, dando origem ao chamado efeito fotodinâmico. Outras interações com O_2 ou substrato podem ocorrer uma vez que o estado triplete, devido aos seus dois elétrons desemparelhados, se comporta como birradical quimicamente ativo. Processos intramoleculares de importância fotoquímica também podem ocorrer, como por exemplo, cruzamento intersistemas levando a um nível de energia vibracional alto do estado fundamental que pode dissociar em radicais R_2^{\cdot} ou R_3^{\cdot} (tipos I e II). Devido a seu maior tempo de vida e reatividade, o estado triplete desempenha um papel muito importante em reações de fotossensibilização.

O processo de destruição tumoral por foto-oxidação provocada por oxigênio singlete, é conhecido como sensibilização do Tipo II, onde o sensibilizador transfere sua energia de excitação para o oxigênio molecular que passa do estado fundamental triplete para seu estado excitado singlete,

como esquematizado a seguir:



O oxigênio singlete uma vez formado pode sofrer vários processos de desexcitação:



O processo de desexcitação por emissão tem um rendimento quântico muito baixo, entretanto é detectável e é considerado como o melhor argumento para o envolvimento de ${}^1\text{O}_2$ em uma reação fotossensibilizadora ($1,27\mu\text{m}$).

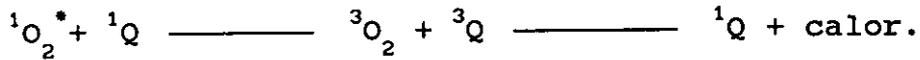
A desexcitação não radiativa é reduzida principalmente pelo efeito do momento de dipolo das moléculas do solvente nos elétrons do oxigênio, induzindo uma mistura de estados ${}^1\Delta_g$ e ${}^3\Sigma_g^- (T_0)$ [vide apêndice 1]. Na água o acoplamento entre ambos estágios é forte, a desexcitação é então eficiente e o tempo de vida curto ($4\mu\text{s}$ quando comparado a 2.700s em fase gasosa a baixa pressão). Em D_2O e em lipídeos (membrana celular) o acoplamento é fraco e o tempo de vida maior ($55\mu\text{s}$ e $100\mu\text{s}$ respectivamente).

No caso de desexcitação por inibidores específicos Q ("quenching") podem ocorrer:

a) transferência de carga [$\text{O}_2 \dots \text{Q}^*$] e subsequente desexcitação interna.

b) transferência de energia de uma molécula Q na qual um eficiente cruzamento intersistemas promove a relaxação

vibracional antes que a oxidação de ${}^3Q^*$ por 3O_2 possa ocorrer:



(É o bem conhecido caso do β -caroteno, eficiente e estável inibidor presente nas células, próximo a clorofila, que na ausência deste seria oxidada pelo ${}^1O_2^*$ produzido pela transferência de energia via clorofila triplete.)

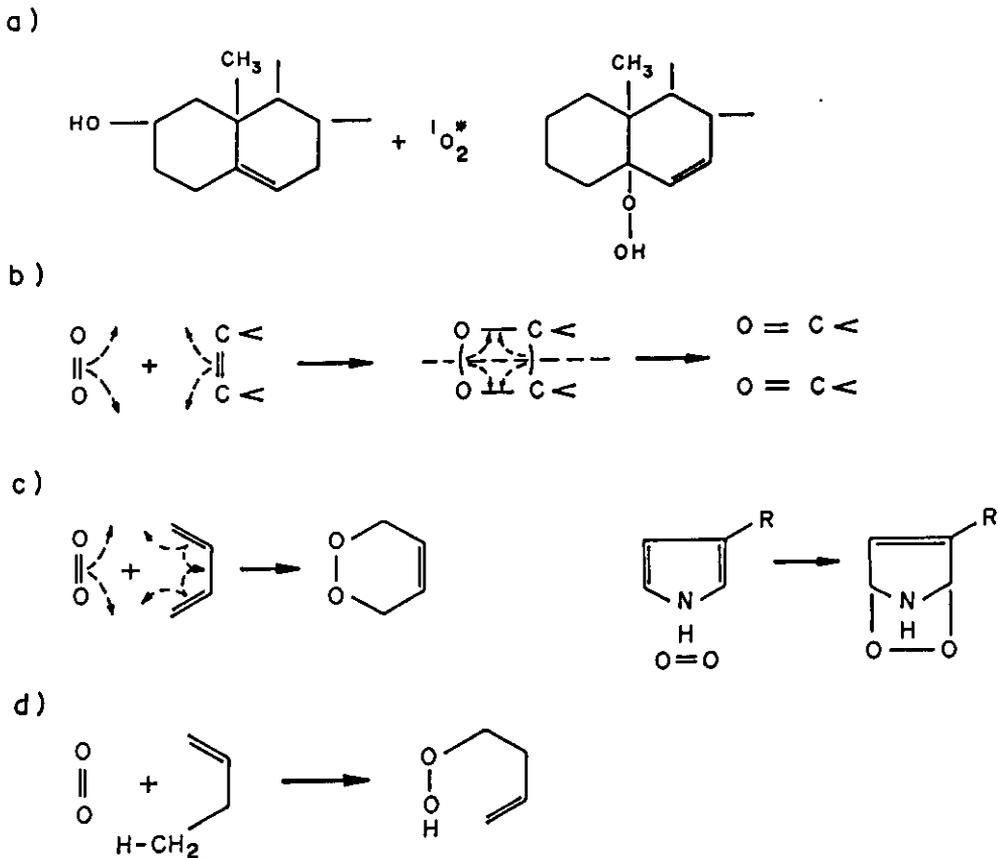


Figura 07- (a) Oxidação do colesterol

(b) a (d) outros tipos de reação de oxidação provocadas por oxigênio singlete

Varios tipos de reação podem ocorrer resultando do caráter duplo-ligante do ${}^1O_2^*$, e algumas estão representadas na

figura 07. Estas reações são de importância biológica, uma vez que elas afetam as membranas, podendo ocorrer adição sobre cadeias acila R-C=O insaturadas de fosfolipídeos, proteínas e enzimas (Oxidação de aminoácidos: triptofano, histina, cisteína e metionina) e ácido nucleico (guanosina)⁽¹¹⁾

2.2.2- REAÇÕES DE FOTOSSENSIBILIZAÇÃO QUE NÃO ENVOLVEM $^1\text{O}_2$

As reações de fotossensibilização por radicais, são conhecidas como reações do Tipo I (veja diagrama na figura 06) e podem ocorrer de uma das seguintes formas:

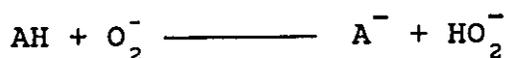
1- $^3\text{A}^*$ interage com O_2 através de transferência de carga onde O_2 é receptor de elétron. Em meio polar (aquoso) a solvatação (fixação de molécula do solvente por íon) estabiliza os 2 íons e permite sua dissociação dando origem ao íon superóxido O_2^- , o qual difunde e causa oxidação do substrato (esta reação é rara).

O O_2^- superóxido quando formado, pode promover oxidação por diferentes caminhos:

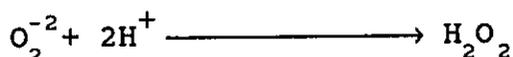
a) absorvendo H e formando peróxido de hidrogênio (muito reativo):



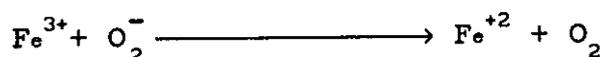
ou



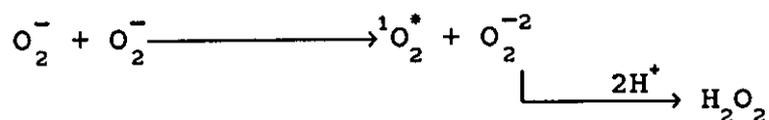
b) Tomando um segundo elétron, levando a O_2^{2-} e então a H_2O_2 :



c) Perdendo seu elétron em uma reação de redução:



d) Por dismutação dando $^1\text{O}_2$ e H_2O_2



2- $^3\text{A}^*$ primeiro interage com substrato B, perdendo ou ganhando elétrons, e o ânion subsequentemente formado, reage com O_2 dando O_2^- ativo.

3- A reação com o substrato também pode consistir de abstração de hidrogênio (levando a H_2O_2).

4- $^3\text{A}^*$ sofre dissociação molecular em radicais que podem reagir com algumas moléculas do substrato para produzir radicais das mesmas e estes radicais serem oxidados por O_2 .

Alguns poucos tipos de moléculas que absorvem luz implicam na fotoalteração de biomoléculas na ausência de oxigênio, mas em certos casos a reação é até inibida pela presença deste. Em geral estas reações necessitam de condições específicas, i.e, sistemas anaeróbicos com alta concentração local de reagentes e ocorre por transferência de carga e ejeção de prótons.

2.3-AÇÃO FOTOSSENSIBILIZADORA DA HEMATOPORFIRINA

No ítem (e) da página 11 listamos "efeitos químicos" como co-participantes do processo de sensibilização como um todo. Para entender isto basta levar em consideração alguns aspectos observados anteriormente. O derivado da hematoporfirina, HpD, tem sido o composto usado apresentando maior eficiência fotossensibilizadora. O HpD é uma mistura de mais de 100 porfirinas (comercializado sob o nome de Photofrin), sendo que destas, o composto mais ativo "in vivo" é o Dihematoporfirina Éter, DHE (comercializado sob o nome de Photofrin II)[figura 02].

Assim, embora a absorção máxima ocorra para a banda do Soret (no ultra-violeta), a profundidade de penetração deste comprimento de onda em tecidos é muito pequena, ao contrário do que acontece com $\lambda = 619\text{nm}$ (figura 05). Além disto, quando a porfirina na célula é excitada na região do vermelho temos um processo de absorção ressonante exatamente na região de interesse para a transferência de energia não radiativa ao oxigênio. Esta é uma coincidência muito positiva, já comentada na página 14.

Para o HpD, uma incidência de luz com comprimento de onda $\lambda \approx 630\text{nm}$ com densidade de energia $50 \longrightarrow 250 \text{ J/cm}^2$ depois de 48 horas de injeção endovenosa de 2,5 - 3 mg HpD/Kg de massa tem sido os parâmetros clinicamente determinados e usados⁽³⁾.

O espectro de absorção óptica do HpD em solução salina apresenta picos em $\lambda = 372, \text{nm}$, $\lambda = 504,9\text{nm}$, $\lambda = 538,5\text{nm}$, e $\lambda = 619\text{nm}$ (figura 08), mas testes "in vivo" em tecido tumoral

com HpD mostram que o comprimento de onda mais eficiente na destruição do tecido neoplásico é de $\lambda \approx 630\text{nm}$ ⁽²⁾.

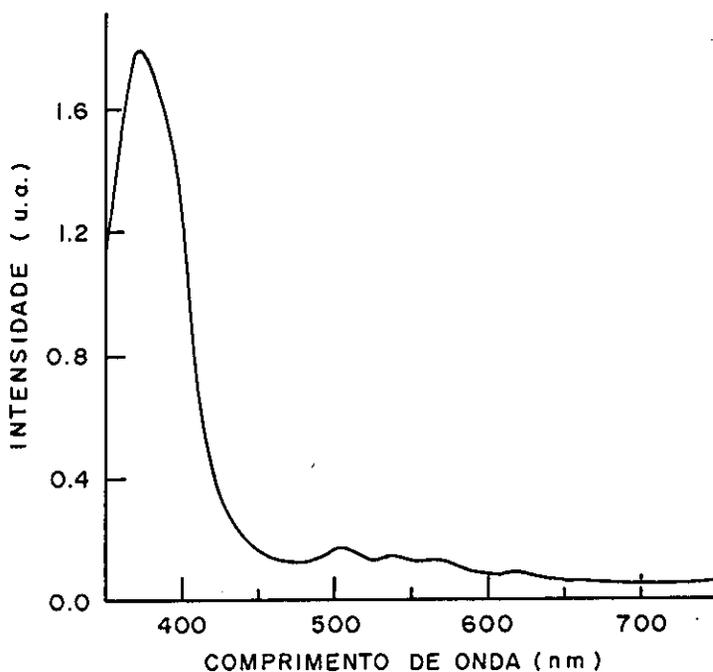


Figura 08- Espectro de Absorção do HpD, que medimos em solução salina 0,9%.

No caso do HpD, trabalhos publicados na literatura mostram que o processo de sensibilização predominante tem sido do tipo II⁽¹²⁻¹⁶⁾ através da detecção da produção de $^1\text{O}_2^*$ (pelo pico de emissão $\lambda = 1,27\mu\text{m}$ pelo produto oxidado do colesterol, etc.) embora alguns autores tenham encontrado um pequeno percentual de formação de radicais livres (Tipo I)^(17,18).

O processo de sensibilização da PDT com hematoporfirina "in vivo" ocorre em 3 fases a saber: *Oxidativa, Hipóxica e Isquêmica*.

Todos estes processos dependem principalmente da localização do HpD e da concentração de O_2 nos capilares e tecidos do tumor.

2.3.- DEPENDÊNCIA DA PRESENÇA DE OXIGÊNIO

A eficiência de fotoinativação de células malignas diminui com a diminuição da concentração de oxigênio no meio celular.

Testes "in vivo"⁽¹³⁾ mostram que quando o meio celular (carcinoma) foi submetido à atmosfera com 1% de O₂, a eficiência de desexcitação se reduz a 50% comparada aquela do meio saturado. Já com atmosfera de N₂ puro, nenhuma fotoinativação é observada. Um outro grupo⁽¹⁹⁾ encontrou que a redução na pO₂ para 70% faz com que a desexcitação caia de 50%.

Na fase oxidativa ocorre a geração de ¹O₂ às custas de O₂ molecular, causando alterações na funcionabilidade ou integridade da membrana e componentes celulares (devido à hidrofobicidade).

O HpD incorporado à fase lipídica da membrana leva à oxidação do colesterol⁽²⁰⁾, provocando ruptura da membrana. A foto-oxidação de proteínas da membrana induzem aumento na permeabilidade catiônica e hemólise⁽²¹⁾.

O HpD ao redor da mitocondria modifica a integridade da cadeia de transporte de elétrons, afetando a respiração e fosforilação oxidativa. Há uma diminuição no nível de ATP e reversão no movimento de Ca²⁺ e diminuição na atividade do citocromo-C-oxidase⁽²²⁾.

Além disto o HpD, provoca fotooxidação de aminoácidos; triptofano, histidina, cisteína e metionina; levando à quebra das proteínas^(11,23) peroxidação de ácidos graxos insaturados e alteração no DNA (oxidação da guanossina)[vide figura 07].

Na fase hipóxica o oxigênio induz alterações patofisiológicas levando a oclusão dos vasos sanguíneos e hipoxia. Nesta fase há uma redução de oxigênio nos tecidos devido à diminuição de fornecimento.

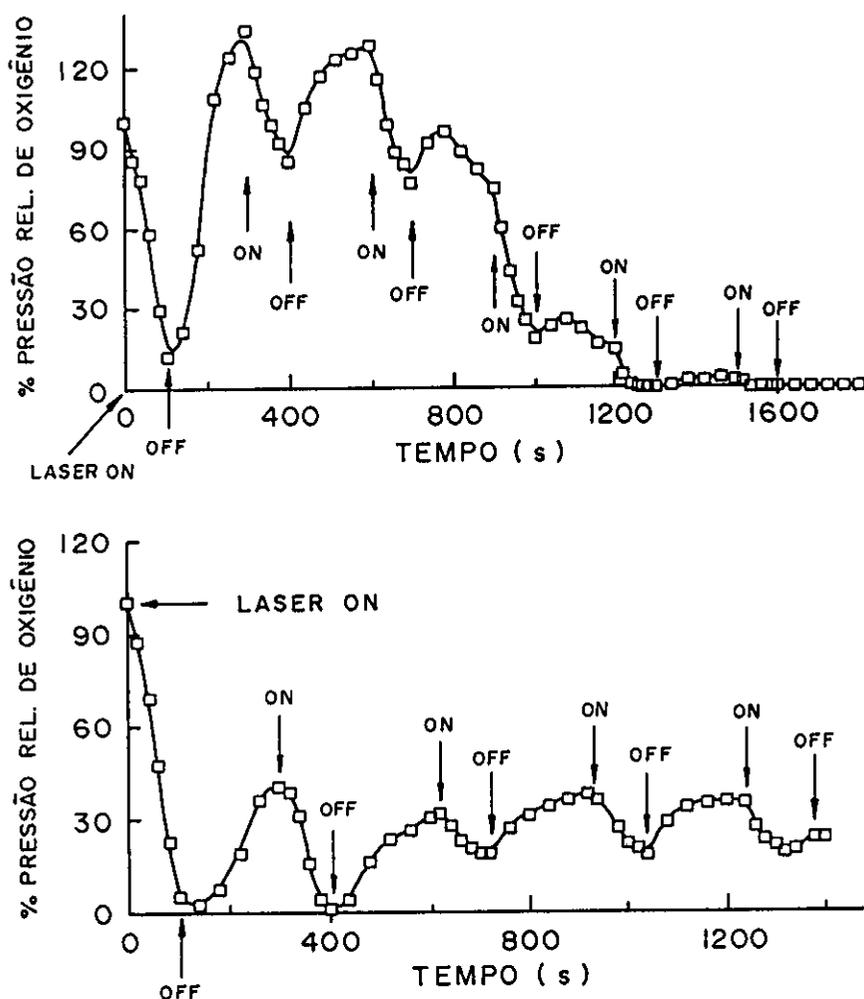
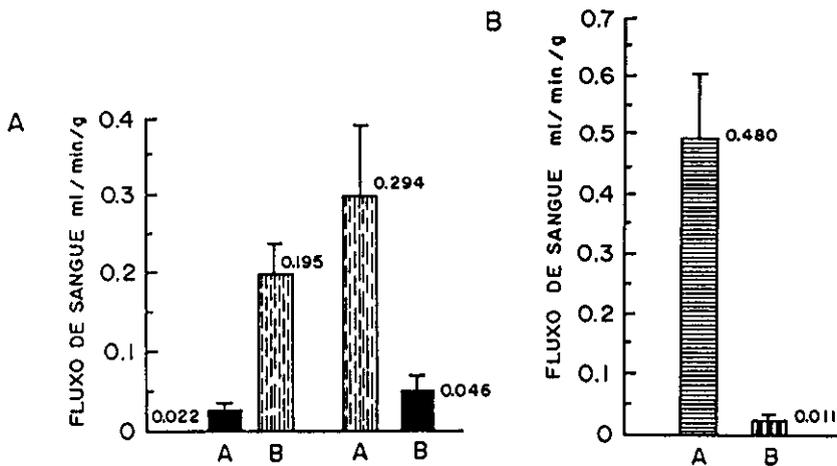


Figura 09⁽²⁴⁾ - Dependência temporal da pressão de oxigênio no local de irradiação em animal (50 kJ/m^2 , $\lambda=630\text{nm}$ durante 100s e desligado por um período de 200s)
 (a) tecido tumoral (b) tecido normal

Na figura (09) podemos observar os resultados de experimentos⁽²⁴⁾ que através da medida relativa da pressão de oxigênio transcutâneo mostram a diminuição da pressão de O₂ durante a irradiação laser em tecidos tumorais com hematoporfirina. A incidência de luz laser é interrompida após um intervalo de 100s, ficando suspensa por 200s, depois do qual o processo se reinicia. Para irradiações repetidas, nos primeiros períodos a pressão retorna a valores iniciais, mas com doses cumulativas a pressão cai a zero. Para irradiação de tecido normal, figura 09(b) a pressão de oxigênio sempre retorna aos mesmos níveis após repetidas irradiações laser.



(25)

Figura 10- Determinação do fluxo sanguíneo em tumores após PDT.

(a) após 10 min (b) após 24hs do tratamento

■ e ▨ controle (sem luz, com HpD)

■ e ▩ fototratadas ($\lambda > 590\text{nm}$, 360 J/cm^2)

Na fase isquêmica há um esgotamento regional da entrega de O₂ e de nutrientes devido ao colapso vascular, ou

seja, ocorre destruição da microvasculatura causando necrose. Este fato está ilustrado na figura (10), que apresenta os resultados de Selman (1984)⁽²⁵⁾.

Neste caso a redução dos níveis de O_2 é irreversível.

Podemos então sumarizar as etapas da Terapia Fotodinâmica de Tumores com hematoporfirina, na seguinte sequência:

Após a transferência de energia para o oxigênio singlete, ocorre um consumo do mesmo, seguido de alterações estruturais da vasculatura local e conseqüente redução no fluxo sanguíneo. Isto leva a uma isquemia do tumor e finalmente à sua necrose.

CAPITULO III

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

No capítulo anterior descrevemos o processo da Terapia Fotodinâmica através dos diferentes passos que transitam pela química, física e biologia. Se nos restringirmos aos aspectos físicos do problema, iremos deparar inicialmente com a necessidade de conhecer os espectros ópticos das moléculas de Hematoporfirina e derivados. Certamente tal conhecimento possibilitará maior desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica propriamente dita.

A espectroscopia óptica é um ramo da física que para o seu bom entendimento exige um conhecimento de mecânica quântica profundo. Assim, estudaremos a seguir a teoria de tal técnica explanatória.

3.1- REVISÃO DOS CONCEITOS DE MECÂNICA QUÂNTICA DE INTERESSE PARA A ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Os conceitos básicos para o entendimento da espectroscopia óptica são aqueles da física quântica fundamental, assim sendo, nesta fase apresentaremos apenas uma revisão dos mesmos ^(28-33, 58 e 59), com a intenção de registrar o estudo necessário ao entendimento do conteúdo principal da tese.

Podemos definir uma onda eletromagnética como sendo

CAPITULO III

PRINCÍPIOS BÁSICOS DE ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

No capítulo anterior descrevemos o processo da Terapia Fotodinâmica através dos diferentes passos que transitam pela química, física e biologia. Se nos restringirmos aos aspectos físicos do problema, iremos deparar inicialmente com a necessidade de conhecer os espectros ópticos das moléculas de Hematoporfirina e derivados. Certamente tal conhecimento possibilitará maior desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica propriamente dita.

A espectroscopia óptica é um ramo da física que para o seu bom entendimento exige um conhecimento de mecânica quântica profundo. Assim, estudaremos a seguir a teoria de tal técnica explanatória.

3.1- REVISÃO DOS CONCEITOS DE MECÂNICA QUÂNTICA DE INTERESSE PARA A ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

A espectroscopia estuda a interação da radiação eletromagnética com a matéria. Os conceitos básicos para o entendimento da espectroscopia óptica são aqueles da física quântica fundamental, assim sendo, nesta fase apresentaremos apenas uma revisão dos mesmos ^(28-33, 58 e 59), com a intenção de registrar o estudo necessário ao entendimento do conteúdo principal da tese.

Podemos definir uma onda eletromagnética como sendo

formada por uma componente de campo elétrico e uma de campo magnético e portanto estudar as interações entre as propriedades elétricas e magnéticas dos átomos e moléculas com estas componentes da onda incidente. Através dos espectros atômico e molecular podemos obter informações detalhadas à respeito da estrutura molecular e propriedades químicas das substâncias em estudo.

Os estudos de Plank (1900) sobre a radiação do corpo negro levou à hipótese de que a absorção e emissão de radiação pela matéria ocorre em finitos quanta de energia. A energia é proporcional à frequência do oscilador harmônico responsável pela absorção e emissão da radiação:

$$E = h\nu \quad (1)$$

onde h é a constante de Plank.

Einstein (1905) durante as experiências sobre o efeito fotoelétrico observou que quando a luz de um determinado comprimento de onda incidia sobre uma superfície metálica no vácuo, a superfície se tornava positivamente carregada e eram lançados elétrons. Nenhum efeito era observado para luz de comprimento de onda maior que determinado valor, e abaixo deste o número de elétrons lançados era proporcional à intensidade da luz. Entretanto a velocidade dos elétrons dependia somente da frequência da luz e não de sua intensidade. Einstein sugeriu então que luz consiste de quanta de energia $h\nu$, chamados fótons, que viajam com a velocidade da luz. Assim quando um fóton de energia $h\nu$ atinge uma superfície, um elétron é lançado com velocidade v , e com energia cinética dada por:

$$\frac{m_e v^2}{2} = h\nu - W \quad (2)$$

onde m_e é a massa do elétron e W uma constante característica do metal.

Em 1913 Bohr fez um grande avanço aplicando a teoria quântica ao estudo de espectros atômicos. Para explicar o fato de que o hidrogênio emite somente certas frequências características, Bohr postulou que os elétrons nos átomos ocupam estados ou níveis com valores definidos de energia. A emissão de luz é causada pelo decaimento de um elétron de um estado de energia mais alto para um mais baixo, e escrevemos;

$$E_m - E_n = \Delta E = h\nu \quad (3)$$

Um fóton de energia $h\nu$ é emitido quando ocorre uma transição eletrônica, e inversamente, o átomo pode absorver um fóton indo de um estado eletrônico mais baixo para um mais alto. A Equação (3) forma a base de todos os estudos quantitativos de espectroscopia.

Bohr obteve a fórmula correta para os níveis de energia eletrônicos do hidrogênio, e assim explicou as linhas espectrais observadas, aplicando a teoria quântica de Plank e usando conceitos macroscópicos. Entretanto sua teoria tinha limitações devido a restrições arbitrárias, e experimentos mais refinados mostraram que seus postulados não eram adequados para explicar todos os fenômenos observados.

Os trabalhos de Plank, Einstein e Bohr apresentaram um dilema com respeito à natureza da luz. O postulado de que luz consiste de fótons, implica em um conceito de partícula. Por outro lado, os fenômenos de difração e interferência podem

ser explicados somente em termos de uma teoria ondulatória. Infelizmente não há solução simples para esta dualidade. Estamos acostumados a pensar em termos de sistemas macroscópicos, e esperamos que todos os sistemas tenham um conjunto de propriedades bem definidas. Mas não há razão para acreditarmos que estas suposições devam ser aplicadas também a sistemas microscópicos. Assim, podemos dizer que a luz possui as propriedades, tanto de onda como de partícula, sendo que a teoria de Maxwell descrevendo a propagação da luz e a teoria quântica descreve a interação da luz com a matéria. Em 1924 de Broglie sugeriu que a propriedade de natureza corpuscular da matéria, ou seja, o momento p , está relacionado com sua propriedade ondulatória, o comprimento de onda λ , pela constante de Plank. Então temos:

$$p = mv = \frac{h}{\lambda} \quad (4)$$

De fato um número muito grande de experimentos tem confirmado a natureza dual de fótons.

Outro postulado fundamental muito importante da mecânica quântica foi dado por Heisenberg (1927), que estabeleceu ser impossível determinar precisamente duas variáveis correlacionadas de um sistema físico ao mesmo tempo. Exemplos deste tipo de variáveis em mecânica clássica são energia e tempo, posição e momento, ângulo e momento angular, etc.

De acordo com o princípio da incerteza de Heisenberg, a incerteza na determinação simultânea de quaisquer 2 conjugados X e Y é:

$$\Delta X \cdot \Delta Y \approx \hbar \quad (5)$$

onde $\hbar = h/2\pi$. Então:

$$\Delta E \cdot \Delta t \approx \hbar \quad (6)$$

e

$$\Delta p \cdot \Delta q \approx \hbar \quad (7)$$

onde p e q denotam momento e posição.

Uma equação de movimento que descreve o comportamento de sistemas microscópicos e que incorpora ambas propriedades de onda e partícula foi dada por Schrödinger em 1926.

Em mecânica clássica a energia total E de um sistema conservativo é igual a sua energia cinética T mais energia potencial V . Então:

$$E = T + V \quad (8)$$

Para uma partícula de massa m se movendo com velocidade v ao longo do eixo x em um potencial $V(x)$ temos:

$$T = \frac{m}{2} \left(\frac{dx}{dt} \right)^2, \quad \text{onde} \quad \frac{dx}{dt} \quad (9)$$

$$E = \frac{m}{2} \left(\frac{dx}{dt} \right)^2 + V(x) = \frac{p^2}{2} + V(x) \quad (10)$$

A conversão da equação (10) na equação de onda de Schrödinger é obtida substituindo-se o momento p com um operador $(\hbar/i)(d/dx)$, onde $i = (-1)^{1/2}$. Assim,

$$p \longrightarrow \frac{\hbar}{i} \frac{d}{dx}$$

$$p^2 \longrightarrow \left(\frac{\hbar}{i} \frac{d}{dx} \right)^2 = -\hbar^2 \frac{d^2}{dx^2}$$

e com a equação (10) obtemos:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2}{dx^2} + V(x) = E \quad (11)$$

Podemos notar que $(-\hbar/2m)(d^2/dx^2)$ é somente um operador, ou seja, um símbolo matemático que nos indica especificamente o que fazer com uma função Ψ . A forma completa com que a equação (11) deve ser escrita é:

$$-\frac{\hbar^2}{2m} \frac{d^2\Psi}{dx^2} + V\Psi = E\Psi \quad (12)$$

A equação (12) é a equação de Schrödinger independente do tempo em uma dimensão, se Ψ for a função que descreve as propriedades de onda de uma partícula com massa m . Em três dimensões podemos escrever:

$$\nabla^2\Psi + \frac{2m}{\hbar^2} (E - V)\Psi = 0 \quad (13)$$

onde o operador laplaciano ∇^2 é dado por:

$$\nabla^2 \equiv \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}$$

Podemos ainda escrever a equação (13) como;

$$\left(-\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V \right) \Psi = E\Psi$$

ou $\mathcal{H}\Psi = E\Psi \quad (14)$

onde o operador Hamiltoniano \mathcal{H} é dado por:

$$\mathcal{H} = -\frac{\hbar^2}{2m} \nabla^2 + V$$

Uma função de onda mais fundamental deve incluir a parte dependente do tempo, então a equação de onda se torna:

$$\mathcal{H}\Psi(\mathbf{q}, t) = i\hbar \frac{\partial\Psi(\mathbf{q}, t)}{\partial t} \quad (15)$$

Esta é a equação de Schrödinger dependente do tempo.

A variável dinâmica clássica, que é a quantidade observável E , é convertida no operador quântico $i\hbar(\partial/\partial t)$ e Ψ é substituída por $\Psi(q,t)$, onde q denota as coordenadas de posição. Para ter significado físico, $\Psi(q,t)$ deve ter as seguintes propriedades:

- a) $\Psi(q,t)$ com valor único e finito
- b) $\Psi(q,t)$ e $\partial\Psi(q,t)/\partial q$ são funções contínuas
- c) $\Psi(q,t)$ é normalizada, ou seja:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} \Psi^*(q,t)\Psi(q,t) dq = 1$$

onde $\Psi^*(q,t)$ é o complexo conjugado de $\Psi(q,t)$.

- d) Em geral uma quantidade observável α tem um operador quântico α_{op} tal que: $\alpha_{op}\Psi(q,t) = \alpha\Psi(q,t)$

e o valor médio de α é dado por

$$\langle \alpha \rangle = \int_{-\infty}^{+\infty} \Psi^*(q,t)\alpha_{op}\Psi(q,t) dq = \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{N} \sum_1^N \alpha_i \quad (15b)$$

onde N é o número de observações feitas. $\Psi(q,t)$ pode ser escrito como um produto de duas funções f e ϕ , se considerarmos q e t como variáveis independentes:

$$\Psi(q,t) = f(q)\phi(t) \quad (16)$$

Substituindo a equação (16) na equação (15) teremos

$$\frac{1}{f(q)} \mathcal{H}f(q) = i\hbar \frac{1}{\phi(t)} \frac{\partial\phi(t)}{\partial t} \quad (17)$$

Cada lado da equação (17) pode ser igualado a um constante C , já que q e t são independentes. Então:

$$\frac{1}{f(q)} \mathcal{H}f(q) = C \quad (18)$$

e

$$i\hbar \frac{1}{\phi(t)} \frac{\partial \phi(t)}{\partial t} = C \quad (19)$$

Obviamente a constante C é a energia E [veja a eq.(14)]. Assim:

$$i\hbar \frac{1}{\phi(t)} \frac{\partial \phi(t)}{\partial t} = E \quad (20)$$

A solução da equação (20) resulta em:

$$\phi(t) = e^{-iEt/\hbar} \quad (21)$$

A função de onda total $\Psi(q,t)$ é dada por:

$$\Psi(q,t) = f(q)e^{-iEt/\hbar} \quad (22)$$

3.1.1- REGRAS DE SELEÇÃO

Através da resolução de problemas simples, como o de uma partícula em uma caixa ou de um oscilador harmônico, podemos verificar que a energia dos sistemas é quantizada. Então, dado um conjunto de níveis de energia quantizado, esperaríamos que se fornecêssemos quantidades apropriadas de energia para uma molécula seria possível se conseguir a transição entre dois níveis de energia quaisquer. Entretanto, dos resultados experimentais, sabe-se que os espectros atômicos e moleculares contêm muito menos linhas que aquelas previstas pela condição de ressonância, ou seja $\Delta E = h\nu$. Isto deve significar que somente certas transições são permitidas ou preferidas.

Consideremos uma transição entre os estados estacionários m e n (que permanecem invariáveis na ausência de distúrbios externos) descritos pelas funções de estado Ψ_m e Ψ_n . Uma vez que ambas Ψ_m e Ψ_n são soluções da equação (15), segue

que sua combinação linear deve ser também uma solução da mesma equação. Assim:

$$\Psi = c_m \Psi_m(q, t) + c_n \Psi_n(q, t) \quad (23)$$

onde c_m e c_n são constantes. Se a transição do estado mais baixo m para o estado mais alto n for provocada por radiação, o hamiltoniano \mathcal{H} na equação (15) deve ser substituído por :

$$\mathcal{H} \longrightarrow \mathcal{H} + \mathcal{H}'$$

onde \mathcal{H}' , o hamiltoniano de perturbação, descreve a interação entre o sistema e o campo de radiação. Assumiremos que $\mathcal{H} \gg \mathcal{H}'$. Uma vez que podem ocorrer transições entre os estados m e n a equação (23) será:

$$\Psi = c_m(t) \Psi_m(q, t) + c_n(t) \Psi_n(q, t) \quad (24)$$

A equação (15) então se torna:

$$\begin{aligned} (\mathcal{H} + \mathcal{H}') [c_m(t) \Psi_m(q, t) + c_n(t) \Psi_n(q, t)] = \\ = i\hbar \frac{\partial [c_m(t) \Psi_m(q, t) + c_n(t) \Psi_n(q, t)]}{\partial t} \end{aligned} \quad (25)$$

O que resulta em:

$$\mathcal{H} [c_m(t) \Psi_m(q, t) + c_n(t) \Psi_n(q, t)] = i\hbar \left[c_m \frac{\partial \Psi_m(q, t)}{\partial t} + c_n \frac{\partial \Psi_n(q, t)}{\partial t} \right] \quad (26)$$

e

$$\begin{aligned} \mathcal{H}' [c_m(t) \Psi_m(q, t) + c_n \Psi_n(q, t)] \\ = i\hbar \left[\Psi_m(q, t) \frac{\partial c_m(t)}{\partial t} + \Psi_n(q, t) \frac{\partial c_n(t)}{\partial t} \right] \end{aligned} \quad (27)$$

Assumindo que Ψ_m e Ψ_n são ortonormais, isto é:

$$\int \Psi_n^* \Psi_n dq = 1 \qquad \int \Psi_n^* \Psi_m dq = 0$$

Multiplicando ambos lados da equação (27) por $\Psi_n^*(q,t)$ e integrando sobre todo espaço teremos:

$$c_m(t) \int \Psi_n^*(q,t) \mathcal{H}' \Psi_m(q,t) dq + \int \Psi_n^*(q,t) \mathcal{H}' \Psi_n(q,t) dq = i\hbar \frac{\partial c_n(t)}{\partial t}$$

Se o sistema está inicialmente em um estado mais baixo do que m , teremos:

$$c_n(t) = 0$$

Quando o campo é aplicado, a taxa inicial de transição é dada por:

$$\frac{dc_n(t)}{dt} = \frac{c_m(t)}{dt} \int \Psi_n^*(q,t) \mathcal{H}' \Psi_m(q,t) dq \quad (29)$$

No caso particular de um oscilador harmônico unidimensional, consideremos uma partícula de carga e na posição x e $-e$ na posição de equilíbrio. Em um determinado instante o momento de dipolo elétrico μ será dado por:

$$\mu = ex \quad (30)$$

e na presença de um campo elétrico, o hamiltoniano de perturbação representando a interação entre o campo elétrico e o momento de dipolo elétrico é dado por:

$$\mathcal{H}' = \epsilon \cdot \mu \quad (31)$$

o que implica que a probabilidade de transição do momento de dipolo é dada por:

$$\mu_{nm} = \int \Psi_n^*(x) \mu \Psi_m(x) dx \quad (32)$$

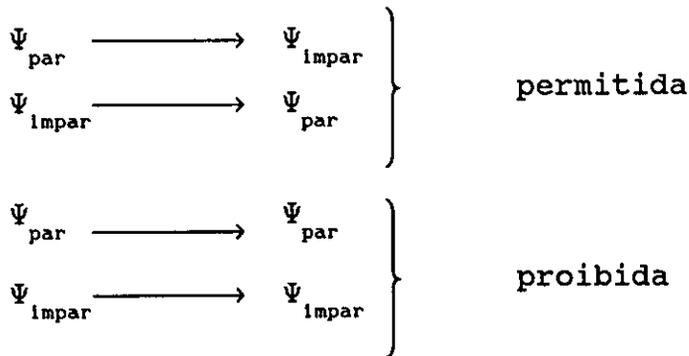
que escrito como uma integral definida fornece:

$$\mu_{nm} = e \int_{-\infty}^{+\infty} \Psi_n^*(x) \mu \Psi_m(x) dx \quad (32a)$$

Esta integral será zero se a função $\Psi^*(x)x\Psi(x)$ for ímpar e será diferente de zero se a função for par. Isto se deve ao fato de que:

$$\int_{-\infty}^{+\infty} F(x) dx = \int_{-\infty}^0 F(x) dx + \int_0^{+\infty} F(x) dx = \int_0^{\infty} F(-x) dx + \int_0^{\infty} F(x) dx$$

Esta integral é diferente de zero se $F(x)$ for par, isto é, $F(x)=F(-x)$, e zero se $F(x)$ for ímpar, isto é, $F(x)=-F(-x)$. Uma vez que a função $g(x)=x$ é ímpar, segue que $\Psi_n(x)$ e $\Psi_m(x)$ devem ter paridades contrárias tal que μ_{nm} seja diferente de zero.



Isto estabelece que para o oscilador harmônico unidimensional as transições devem obedecer a regra geral acima; mas além disto, estão restritas somente a níveis vizinhos, onde $m = n - 1$.

Até este ponto, por simplicidade, consideramos apenas a interação entre a componente do campo elétrico da radiação e o momento de dipolo elétrico. Sabemos entretanto que existem outras interações cuja ordem de magnitude decresce na seguinte ordem:

interação de dipolo elétrico » interação de dipolo magnético >
 interação de quadrupolo elétrico.

3.1.2- TRANSIÇÕES

A absorção e a emissão que ocorrem na presença de um campo externo são chamadas de absorção e emissão induzidas. Além disto, o sistema no estado n pode perder espontaneamente uma certa quantidade de energia E dada por:

$$E = E_n - E_m = h\nu$$

De acordo com a lei de distribuição de Boltzmann, a razão entre as populações do estado n e m , N_n e N_m é dada por:

$$\frac{N_n}{N_m} = e^{-(E_n - E_m)/kT} \quad (33)$$

onde k é a constante de Boltzmann.

Definindo a probabilidade de transição por unidade de tempo para a absorção e emissão induzidas e emissão espontânea como sendo B_{mn} , B_{nm} , e A_{nm} , o número de emissões induzidas por segundo é proporcional a $N_n B_{nm}$ e é dado por $N_n B_{nm} \rho(\nu)$, onde $\rho(\nu)$ é a densidade da radiação com frequência ν , o número de absorções induzidas por segundo é dado por $N_m B_{mn} \rho(\nu)$. Para estados estacionários, as taxas de absorção e emissão são iguais, então:

$$N_m B_{mn} \rho(\nu) = N_n B_{nm} \rho(\nu) + N_n A_{nm} \quad (34)$$

Uma vez que $B_{mn} = B_{nm}$, podemos escrever:

$$\rho(\nu) = \frac{N_n A_{nm}}{B_{nm} (N_m - N_n)} = \frac{A_{nm}}{B_{nm}} \frac{1}{e^{-(E_m - E_n)/kT} - 1} \quad (35)$$

De acordo com a lei de Plank:

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1} \quad (36)$$

Uma vez que $\nu = \nu_{nm}$ temos que:

$$\frac{A_{nm}}{B_{nm}} = \frac{8\pi h\nu_{nm}^3}{c^3} \quad (37)$$

Então em geral, a intensidade das linhas de absorção é proporcional à população do estado mais baixo, e, quando uma amostra é irradiada haverá também emissão induzida e espontânea. Poderíamos esperar que este efeito diminuísse a intensidade das linhas de absorção. Entretanto, uma vez que somente a emissão induzida é coerente com a radiação incidente, ou seja, ela se propaga na mesma direção do campo de radiação, a intensidade de absorção líquida é dada por:

$$N_m B_{mn} \rho(\nu) - N_n B_{nm} \rho(\nu) = B_{mn} \rho(\nu) (N_m - N_n) \quad (38)$$

Assim, a intensidade de uma dada absorção depende da diferença entre as populações nos estados m e n se $\rho(\nu)$ for mantida constante.

Ao realizar qualquer tipo de medida espectroscópica existe em geral o interesse por apenas um tipo de troca de energia.

Se assumirmos que os vários tipos de interação de energia são independentes umas das outras, poderemos expressar a energia total da molécula como a seguinte soma:

$$E_T = E_{rot} + E_{vib} + E_e + \dots \quad (41)$$

Isto significa que a função de onda molecular total Ψ_T pode ser escrita como um produto das funções de onda individuais:

$$\Psi_T = \Psi_{rot} \Psi_{vib} \Psi_e \cdot \dots \quad (42)$$

A tabela 01 apresenta um sumário dos vários intervalos de energia das diferentes áreas de interesse espectroscópico.

Embora esta aproximação não seja exatamente verdadeira, ela pode ser usada em muitos casos com resultados satisfatórios.

Tabela 01

REGIÃO	FENÔMENO	FREQUÊNCIA Hz	COMPRIMENTO DE ONDA
Rádio-frequência	NMR , ressonância de quadrupolo nuclear	10^6 a 10^8	300 a 3m
Frequência de microondas	EPR , rotação molecular	10^{10} a 10^{12}	30 a 0,3m
Infravermelho	Rotação molecular e vibração molecular	10^{12} a $3 \cdot 10^{14}$	300 a $1\mu\text{m}$
Visível e Ultra-Violeta	Transições eletrônicas (elétrons externos)	$3 \cdot 10^{14}$ a 10^{16}	$1\mu\text{m}$ a 300A
Raios-X	Transições eletrônicas (elétrons internos)	$3 \cdot 10^{16}$ a 10^{19}	100 a 0,3A
Raios- γ	Transições Nucleares	10^{19} a 10^{22}	0,3-0,003A

3.2- FOTOLUMINESCÊNCIA

O termo genérico fotoluminescência é usado para indicar que a incidência de fótons excita a emissão de luz, e portanto inclui os fenômenos de fluorescência, fosforescência, assim como os espalhamentos Rayleigh e Raman.

A excitação de uma molécula por luz pode provocar uma reação química, transferência de energia por colisão ou então a molécula poderá eventualmente retornar ao estado fundamental com liberação de energia, isto é, o processo de desativação seria o de emissão luminescente.

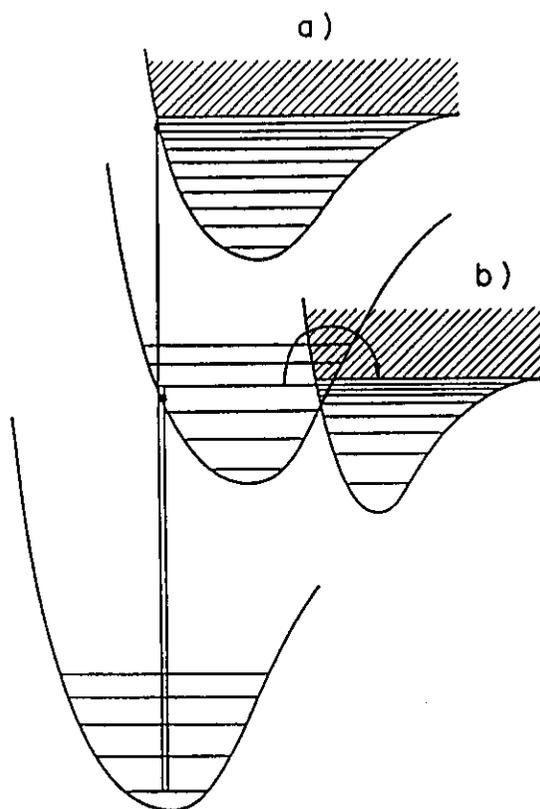


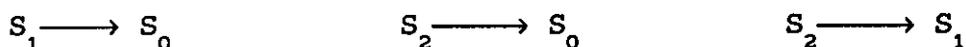
Figura 11- (A) Dissociação e (B) Pré-dissociação molecular

A parte (A) da figura 11 esquematiza o processo onde a excitação de um elétron o leva a um estado não ligado,

provocando a dissociação da molécula. A parte (B) representa o processo de pré-dissociação, onde se excita um elétron de um estado eletrônico para outro, ambos ligados, porém o estado eletrônico excitado tem um modo vibracional coincidente com um potencial não ligado da molécula e portanto esta se dissocia.

Existem dois caminhos mais eficientes para a molécula excitada alcançar o estado fundamental no processo de emissão, eles dão origem aos fenômenos de fluorescência e fosforescência. O primeiro é uma emissão de vida curta, durando de 10^{-8} a 10^{-5} segundos, enquanto que o outro é uma emissão de vida longa, durando de 10^{-3} até a ordem de segundos.

O processo de emissão fluorescente ocorre depois de uma absorção singlete-singlete, e parte do estado excitado para um estado de energia mais baixa, sem que haja troca na multiplicidade de spin.



Assim como a absorção singlete-singlete é o inverso da fluorescência, a absorção singlete-triplete é o inverso da fosforescência e dá origem a linhas muito fracas, como o esperado. Analogamente aos estados singlete, os estados triplete são denominados como fundamental, primeiro e segundo estados excitados, etc. O decaimento fosforescente ocorre sempre do estado triplete fundamental para o estado singlete. Entretanto, ao manter uma concentração permanente no estado triplete é possível induzir uma transição do estado fundamental triplete para um outro estado triplete mais alto. A análise vibracional das absorções triplete-triplete tem fornecido muitas informações com respeito à geometria da molécula e sua interação com o meio.

3.2.1- FLUORESCÊNCIA

Quando moléculas são irradiadas com luz de frequência apropriada, elas podem sofrer absorção de um estado eletrônico fundamental para o primeiro estado excitado. Ainda que a maioria das moléculas em temperatura ambiente estejam no seu nível vibracional fundamental, depois da excitação elas podem terminar em qualquer um dos níveis vibracionais do primeiro estado eletrônico excitado. Uma vez que todos estes estados excitados são instáveis, as moléculas podem retornar diretamente para o estado eletrônico fundamental com a emissão de luz e então pode-se registrar os espectros de fluorescência. Podemos assim pensar na fluorescência como sendo o inverso da absorção. Entretanto a comparação dos espectros de absorção e fluorescência do mesmo composto mostra que eles não se sobrepõem ao outro como esperado, mas eles são uma imagem refletida do outro, com o espectro de emissão deslocado na direção de comprimentos de onda maior. Isto ocorre porque o tempo necessário para executar uma vibração (cerca de 10^{-13} s) é muito menor que o tempo de decaimento ou tempo de vida médio (cerca de 10^{-9} s). Nestes caso, a maior parte do excesso de energia vibracional será dissipado para as vizinhanças, e as moléculas excitadas só então decairão para seus níveis vibracionais fundamentais.

Definimos a eficiência de fluorescência ϕ como a razão dos fótons emitidos por fluorescência sobre o total de fótons absorvidos. A intensidade da radiação emitida após a fonte de luz de excitação ser interrompida por um tempo t é dada por:

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (41)$$

onde τ é o período de decaimento médio. Note que quando $t=\tau$, $I(t) = I_0/e$. I_0 é a intensidade de luz emitida em $t=0$. O tempo de decaimento é dado por:

$$\tau = \frac{1,5}{f\nu^2} \text{ [s]} \quad (42)$$

onde f é o elemento de matriz da transição.

Se a fluorescência não for o único caminho disponível para o decaimento, ϕ será menor que um e dizemos que a fluorescência é inibida. Alguns mecanismos de inibição são:

1-Relaxação Vibracional

É a passagem de uma distribuição de energia vibracional fora do equilíbrio, em um dado estado eletrônico, para a distribuição termicamente equilibrada de energia vibracional relativa à energia de ponto zero daquele mesmo estado. Este processo ocorre um tempo da ordem de 10^{-12} a 10^{-13} s.

2- Conversão interna

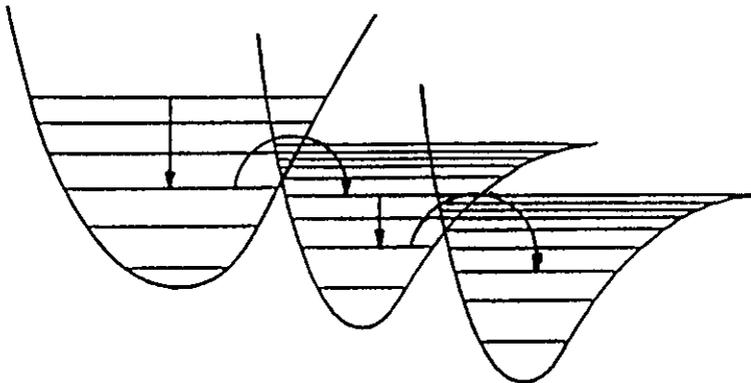


Figura 12- Representação do processo de conversão interna

A conversão interna representada na figura 12 é uma desativação da molécula excitada entre dois estados eletrônicos de mesma multiplicidade de spin. A Absorção de luz pode levar à

pré-dissociação se a energia de ligação for menor que aquela para a transição (como já exemplificado anteriormente). Por esta razão a fluorescência normalmente não ocorre nas regiões do Ultra-Violeta de vácuo uma vez que a energia envolvida é muito grande. Este processo ocorre em um tempo da ordem de 10^{-12} a 10^{-13} s.

3- Conversão Externa

Colisões entre soluto-solvente e soluto-soluto são formas alternativas para desativação. Em soluções, este tipo de inibição deve obviamente depender da densidade das mesmas. A concentração do soluto fluorescente pode proporcionar também um mecanismo de inibição conhecido como inibição de concentração, como na situação na qual as moléculas do soluto formam dímeros ou agregados maiores não fluorescentes e ϕ diminui com o aumento da concentração.

4-Cruzamento intersistemas

É um processo análogo à conversão interna. A diferença consiste na mudança da multiplicidade do spin eletrônico.

(a) O processo depende da sobreposição entre as duas hipersuperfícies de energia potencial quasi-degeneradas dos dois estados quânticos eletrônicos.



O caso (c) corresponde a um torque no movimento orbital do elétron (uma mudança no estado de momento angular orbital).

5- Transferência de energia

Este é um efeito quântico que envolve a transferência de

energia sem radiação ou colisão. Depende da sobreposição da banda de emissão da molécula excitada e da banda de absorção da molécula inibidora de fluorescência. Quando a molécula inibidora dissipa a energia como forma de luz, podemos denominá-la de fluorescência sensibilizada.

Observamos ainda que quando ocorre a luminescência, o estado excitado já está em equilíbrio, pois os processos de relaxação vibracional e cruzamentos intersistemas são da ordem de 10^4 vezes mais rápidos que o de fluorescência. Antes que a molécula excitada emita, ela encontra-se no nível de ponto zero de energia no mais baixo estado excitado. A regra de Kasha estabelece exatamente que a fluorescência ocorre sempre do mais baixo estado excitado para o fundamental.

Uma forma alternativa de observar a fluorescência experimentalmente consiste na obtenção do espectro de excitação de fluorescência. Em geral a intensidade da fluorescência é proporcional à intensidade da luz de excitação, ao coeficiente de extinção ϵ da correspondente absorção, e ϕ (que é aproximadamente independente da frequência de excitação). Se a intensidade da luz de excitação for mantida constante e a frequência for variada, a intensidade de fluorescência será proporcional a ϵ . Assim, o espectro de excitação obtido corresponde aproximadamente ao espectro de absorção. O espectro de excitação tem algumas vantagens sobre o de fluorescência: (a) É mais sensível, concentrações menores que 10^{-8} M podem ser detectadas. (b) Em uma mistura de compostos absorvedores o espectro de absorção de um composto particular pode ser separado monitorando-se a banda de fluorescência apropriada.

3.2.2-FOSFORESCÊNCIA

A fosforescência é um processo pelo qual a molécula excitada pode retornar ao estado fundamental também com emissão de luz. É facilmente distinguido da fluorescência porque em geral tem um tempo de decaimento muito maior (10^2 a 10^{-4} s); não é observável em soluções à temperatura ambiente, raramente é observado em gases e não é uma imagem especular do espectro de absorção.

O mecanismo de decaimento fosforescente foi dado primeiramente por Lewis e Kasha em 1944, que mostrou que o decaimento da molécula neste caso ocorre via um estado metaestável, o estado triplete.

O decaimento de um estado singlete de mais alta energia para um triplete ocorre por transição não radiativa, em geral conversão interna de energia. O decaimento do estado triplete para o estado fundamental é proibido por simetria de spin e portanto lento. Na realidade existe sempre alguma interação spin-órbita para "misturar" os estados, tal que transições triplete \longleftrightarrow singlete são permitidas embora se esperasse que fossem mais fracas que as transições singlete-singlete. De acordo com a regra de Hund, um nível triplete sempre permanece mais baixo que o correspondente nível singlete e por esta razão o espectro de fosforescência ocorre em comprimentos de onda maiores que aqueles dos espectros de absorção e fluorescência.

Existem também outros mecanismos que podem desativar o estado triplete, como:

1- Colisões

2- Inversão de spin

Transferência de energia eletrônica de uma molécula no estado triplete para outra molécula no estado singlete.



(Este é exatamente o processo envolvido entre a hematoporfirina no estado excitado triplete e o oxigênio molecular atuando como inibidor).

3- Ion inibidor paramagnético

A fosforescência é inibida na presença de íons paramagnéticos. Acredita-se que estes íons favoreçam as transições não radiativas do estado triplete para o estado singlete através da formação de um complexo.

3.3- SIMETRIA MOLECULAR E TEORIA DE GRUPOS

Em geral o tratamento quântico de átomos e moléculas pode ser muito complexo mesmo quando métodos aproximados são empregados. Entretanto, as propriedades de simetria de uma molécula podem nos fornecer informações qualitativas a respeito de suas funções de onda e energia. Da simetria destas funções de onda podemos prever rapidamente a probabilidade de transições espectroscópicas. Todas estas simplificações são possíveis porque o uso das propriedades de simetria pode ser representado pela técnica matemática denominada Teoria de Grupos.

Se efetuarmos um movimento em um corpo tal que a nova configuração seja indistinguível da inicial, podemos chamar esta operação de operação de simetria. Se for possível realizar uma operação de simetria em uma molécula, dizemos que a mesma possui um elemento de simetria. Devemos fazer uma distinção entre operação e elemento de simetria.

Uma *operação de simetria* é um movimento de um corpo após o qual cada ponto do corpo irá coincidir com outro equivalente (ou ele mesmo). Ou seja, se a posição e a orientação do corpo antes e após o movimento forem indistinguíveis, ter-se-á realizado uma operação de simetria.

Um *elemento de simetria* é uma entidade geométrica. Por exemplo, uma linha, plano ou ponto, por meio da qual uma ou mais operações de simetria podem ser efetuadas.

As operações de simetria são:

1) *Operação identidade*, representada por (E) (do alemão "einheit" = unidade) existe para todas moléculas, já que a

aplicação de E a um ponto leva o mesmo a uma posição idêntica.

2) *Rotação própria* (C_n). Uma molécula possui um eixo de rotação de ordem n se a rotação sobre o eixo de $\alpha = 2\pi/n$ leva a molécula para uma configuração indistinguível da original. A notação C_n^k é usada para indicar que o eixo de rotação foi aplicado sucessivamente k vezes.

3) *Inversão ou centro de simetria*, indicado por (i) . Se as coordenadas (x,y,z) de cada átomo de uma molécula forem trocadas por $(-x,-y,-z)$ e a molécula permanecer em uma configuração indistinguível da original, então o ponto de origem $(0,0,0)$ será o centro de simetria da molécula.

4) *Plano de simetria*, representado por (σ) . Uma molécula possui um plano de simetria se uma reflexão através do plano deixar a molécula inalterada. A notação σ_h indica que o plano de reflexão é perpendicular ao eixo de rotação e σ_v indica que o plano contém o eixo de rotação, como exemplificado na figura 13.

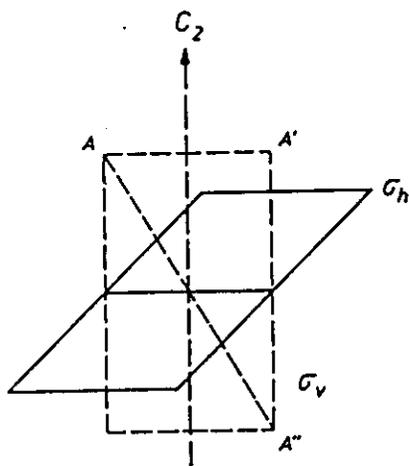


Figura 13- Operações de reflexão, planos horizontal e vertical.

5) *Rotação imprópria*, representada por (S_n) . É uma operação

composta de rotação e reflexão ou rotação e inversão. Por exemplo, uma molécula possui um eixo de rotação imprópria de ordem n se a rotação deste eixo por $2\pi/n$ seguida por reflexão em um plano perpendicular ao eixo levar a molécula a uma configuração indistinguível.

Do ponto de vista matemático, a noção de grupos é muito ampla e definida por um conjunto de propriedades que se aplicam às operações de simetria. Estas operações são definidas através dos elementos de simetria discutidos acima. Basicamente são quatro as propriedades exigidas para que um certo número de elementos, digamos A , B e C , constitua um grupo:

- 1) possuir um elemento E , que comuta com todos do grupo, tal que $EA=AE$, $EB = BE$, etc.;
- 2) o produto de dois elementos do grupo (incluindo o quadrado de qualquer um deles) resulta em outro elemento também pertencente ao grupo: $AB = C$, então C pertence ao grupo;
- 3) A combinação é associativa: $A(BC) = (AB)C$;
- 4) Cada elemento do grupo deve possuir um inverso tal que: $AA^{-1} = A^{-1}A = E$, $BB^{-1} = B^{-1}B$, etc..

A ordem de um grupo é definida como o número de elementos no grupo. Se um conjunto de alguns elementos de um grupo satisfizer a definição de grupo, então eles serão considerados subgrupo do primeiro.

Consideraremos a seguir alguns grupos de ponto na chamada notação de Schoenflies que serão de nosso interesse:

C_s - Possui os elementos de simetria E e σ .

C_n - São grupos com um eixo principal de simetria, onde n indica o ordem do eixo.

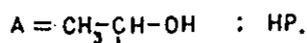
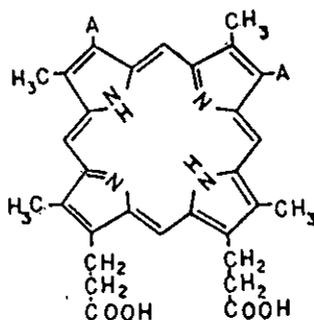
D_n - No grupo C_n acrescenta-se ao eixo principal de rotação um

eixo binário perpendicular ao mesmo. Isto resultará na existência de n eixos binários que interceptam o eixo principal num mesmo ponto, formando entre sí ângulos de π/n .

D_{nh} - O plano horizontal que contém o eixo binário é também um plano de simetria, como consequência, existem n planos verticais.

D_{2h} - Possui os elementos de simetria $E, C_2(z), C_2(y), C_2(x), i, \sigma(x,y), \sigma(xz), \sigma(yz)$.

D_{4h} - Possui os elementos de simetria $E, 2C_4, C_2, 2C_2', 2C_2'', i, 2S_4, \sigma, 2S_4, \sigma_h, 2\sigma_v$ e $2\sigma_d$.



Se tomarmos a hematóporfirina que é a molécula objeto de estudo desta tese (figura 02, capítulo I e representada novamente aqui), e considerarmos seus substituintes laterais como massas pontuais e não levarmos em conta a presença dos 2 hidrogênios centrais, teremos então que ela pode ser representada pelo grupo D_{4h} . Ao considerarmos os hidrogênios centrais teremos uma redução de simetria para D_{2h} . Devido ao posicionamento assimétrico dos substituintes laterais, a

simetria rigorosa é então ainda mais baixa, C_s .

Uma representação matemática de um grupo é definida como um conjunto de matrizes onde a cada uma delas corresponde um elemento de simetria do grupo e estas matrizes se combinam matematicamente da mesma forma que os elementos se combinam na prática. Embora estas matrizes se combinem da mesma forma que os elementos, elas certamente não são únicas. Podem existir outros conjuntos de matrizes que se combinem da mesma forma para representar um dado grupo. Existe um conjunto fundamental do qual as outras matrizes podem ser derivadas, e que é chamado de representação irredutível daquele grupo. O conjunto de traços das matrizes que constituem a representação irredutível de um dado grupo serve perfeitamente para o estudo de propriedades de transformações observáveis em um certo sistema frente a dada transformação de simetria. Estes traços são chamados, na teoria de grupos, de caracteres. Em geral são apresentados em forma de tabela. Não abordaremos nesta tese os detalhes da construção das tabelas de caracteres, pois isto está extensamente desenvolvido em livros especializados^(30,31), mas apenas trataremos do nosso particular caso de interesse.

A tabela 02 abaixo lista os traços das representações irredutíveis para o grupo D_{2h} . A primeira linha descreve os elementos do grupo separados em classes de simetria. As oito linhas seguintes descrevem os caracteres das representações irredutíveis deste grupo, cuja notação está indicada na primeira coluna e está descrita abaixo da tabela. As duas últimas colunas fornecem informações sobre a absorção da radiação no infravermelho (penúltima coluna), e na

espectroscopia Raman (última coluna). Estas informações foram obtidas através de análise qualitativa da probabilidade de ocorrência das transições infravermelhas (proporcional ao momento de dipolo elétrico - "M", com $\vec{M} = \sum_i e_i \vec{r}_i$) e Raman (proporcional ao momento de dipolo induzido - "P", $\vec{P} = \alpha |\vec{E}|$, sendo portanto um termo em $\nu_1 \cdot \nu_2$).

$$I_{IR} = \int_v \Psi_f \vec{M} \Psi_i dV$$

$$I_R = \int_v \Psi_f \vec{P} \Psi_i dV$$

onde M e \vec{P} são operadores como no caso definido em

(31a).

Tabela 2- Tabela de caracteres para o grupo D_{2h}

D_{2h}	E	$C_2(z)$	$C_2(y)$	$C_2(x)$	i	$\sigma(xy)$	$\sigma(xz)$	$\sigma(yz)$	IV	Raman
A_g	1	1	1	1	1	1	1	1		$x^2; y^2; z^2$
B_{1g}	1	1	-1	-1	1	1	-1	-1	R_z	xy
B_{2g}	1	-1	1	-1	1	-1	1	-1	R_y	xz
B_{3g}	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	R_x	yz
A_u	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1		
B_{1u}	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	T_z	
B_{2u}	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	T_y	
B_{3u}	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	T_x	

Notação para as representações unidimensionais

A_s e B_s indicam representações unidimensionais.

A_1 representação totalmente simétrica

A_2 representação onde pelo menos um elemento, em geral plano de reflexão, possui caracter (-1)

B indica uma representação onde o caracter do eixo principal de rotação é igual a (-1) e os sufixos 1,2, 3 etc., são usados para distinguir os caracteres dos outros elementos.

E indica uma representação bidimensional

T ou F indicam representações tridimensionais

Uma grande vantagem no uso da teoria de grupos para análise de espectroscopias Infravermelho e Raman reside no fato de que uma simples análise da tabela, no nosso caso, a referente ao grupo D_{2h} , onde já constam os cálculos das colunas Infravermelho e Raman, permite dizer que somente os estados cujas funções de onda são base das representações irreduzíveis A_g , B_{1g} , B_{2g} e B_{3g} correspondem a efeito Raman e que B_{1g} , B_{2g} , B_{3g} , B_{1u} , B_{2u} , B_{3u} correspondem à absorção infravermelha.

3.4- ESPECTRO RAMAN

Quando um feixe de luz monocromática incide em uma amostra, os fótons de energia $h\nu$ colidem com as moléculas da amostra (excluiremos deste exemplo as reações fotoquímicas já descritas nos itens 2.2 e 3.2) e esta colisão poderá ser elástica ou inelástica. Se a colisão for elástica os fótons defletidos terão a mesma energia que os fótons incidentes. Por outro lado, se a colisão for inelástica, a radiação espalhada poderá ter energia maior ou menor que a incidente. Como aproximação podemos dizer que a energia do fóton e da molécula permanece a mesma, antes e depois da colisão. A lei de conservação de energia requer então que:

$$h\nu + E = h\nu' + E' \quad (43)$$

onde E representa a energia rotacional, vibracional e eletrônica da molécula antes da colisão e E' representa os mesmos valores depois da colisão. Rearranjando a equação (43) teremos:

$$\frac{E - E'}{h} = \nu - \nu'$$

A radiação espalhada é classificada como:

$$\left. \begin{array}{l} E = E' (\nu = \nu') \\ E > E' (\nu < \nu') \\ E < E' (\nu > \nu') \end{array} \right\} \begin{array}{l} \text{Espalhamento Rayleigh} \\ \text{Espalhamento Raman} \end{array}$$

Assim, no caso do espalhamento Raman, o resultado da interação poderá ser fornecimento ou retirada de energia da molécula, como representado na figura 14(a).

Quando uma molécula é levada pela radiação incidente do estado fundamental para um estado virtual mais alto, o retorno pode se dar tanto para o estado original quanto para um estado energeticamente diferente (vibracional, rotacional, eletrônico ou combinação). O primeiro caso dá origem ao espalhamento Rayleigh e o último ao espalhamento Raman, que no caso origina as linhas Stokes. Se a molécula está inicialmente em um estado digamos, vibracional excitado, ela pode ser promovida para um estado mais alto, instável e então retornar ao estado fundamental. Este também é um espalhamento Raman, que dá origem às linhas Raman Anti-Stokes. Demonstra-se que a intensidade do espalhamento Rayleigh é muito maior que a das linhas Stokes que por sua vez é muito maior que as das linhas Anti-Stokes. Naturalmente também ocorrerão mudanças nos níveis rotacionais além das transições vibracionais, como exemplificado pela estrutura fina da figura 14(b).

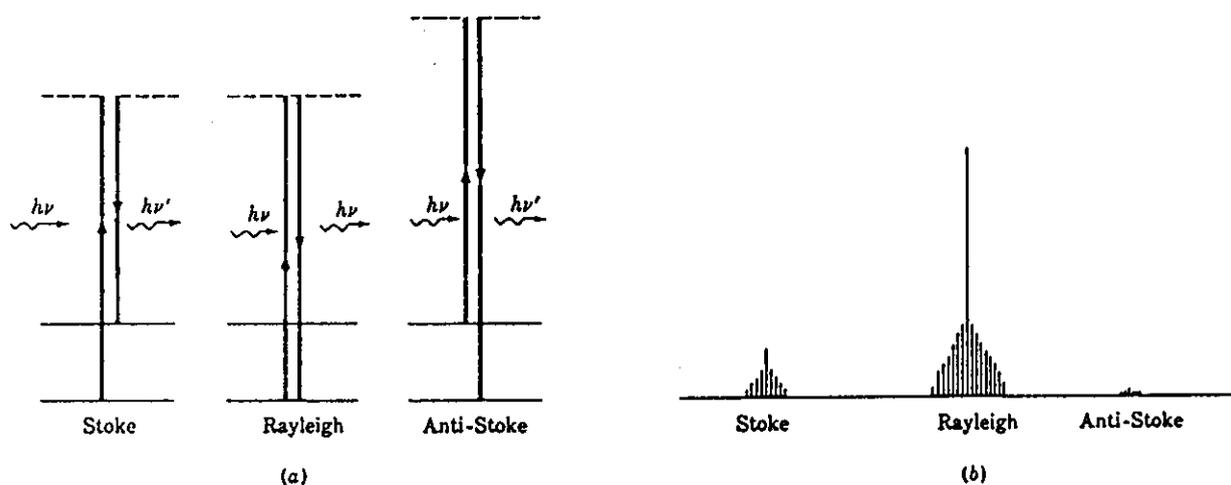
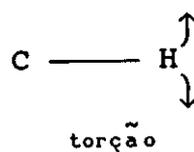
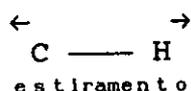


Figura 14- (a) Diagrama de níveis de energia para os espalhamentos Rayleigh e Raman
(b) Espectro Teórico.

Uma característica dos espectros Infra-Vermelho ou Raman de muitos compostos é que certos grupos como $>\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$, $>\text{C}=\text{O}$, etc., tem mais ou menos as mesmas frequências características, independente do ambiente molecular. Isto significa que qualquer um destes grupos deve vibrar relativamente independentemente do resto da molécula. Assim poderemos dizer que estas frequências de grupo são uma forma de identificar a presença destes grupos.

Para uma ligação simples C-H podemos ter somente vibrações de estiramento e torção:



Para grupos como meteno e metil a situação não é tão simples, uma vez que os átomos podem se mover de forma muito mais complexa e o problema deve ser novamente tratado com a teoria de grupos.

3.5- VIBRAÇÕES MOLECULARES

As vibrações dos átomos em uma molécula poliatômica são em geral muito complexas, porém todas podem ser obtidas por combinação linear de um número reduzido de simples vibrações independentes, chamadas vibrações normais, ou modos normais de vibração. Em um modo normal, todos os átomos oscilam com a mesma frequência, porém as amplitudes podem ser diferentes.

Uma molécula que possua N átomos, terá $3N$ graus de liberdade. Desse total, 3 graus de liberdade são translacionais (o centro de massa pode mover-se independentemente nas direções x, y e z) e 3 são rotacionais, cujos eixos de rotações coincidem com os eixos x, y e z . Caso a molécula seja linear, as rotações podem ser efetuadas somente em dois eixos perpendiculares ao eixo da molécula. Logo, os modos de vibrações puras de uma molécula poliatômica são em número de $3N-6$ para moléculas não lineares e $3N-5$ para moléculas lineares.

A aplicação da teoria de grupos no estudo das vibrações moleculares baseia-se nas seguintes considerações:

1- O Hamiltoniano quântico \mathcal{H} deve permanecer inalterado, sempre que átomos equivalentes na molécula trocarem de posições. Como a troca de posições atômicas é efetuada mediante as operações de simetria (que formam um grupo de ponto), isto significa que o hamiltoniano do sistema deve ser invariante em relação a todas as operações de simetria da molécula. Além disto, a cada modo normal de vibração está associado um nível de energia vibracional da molécula que é descrito por uma ou mais autofunções vibracionais. O conjunto destas, associado a determinado nível de energia vibracional, forma uma base para a

respectiva Representação Irredutível (RI) do grupo de ponto da molécula. Estas RI's vibracionais são chamadas de espécies de simetria.

2- As espécies de simetria e seus respectivos elementos de matriz (absorção da radiação eletromagnética) nos espectros Raman e Infravermelho podem ser determinadas para qualquer molécula, sem necessidade de que se conheça a forma exata das autofunções vibracionais.

O procedimento para determinar os modos normais de uma molécula consiste em escolher um sistema cartesiano de $3N$ coordenadas ortogonais e, a partir do grupo de ponto ao qual a molécula pertence, determina-se a representação redutível Γ_0 . É possível efetuar uma transformação desta representação para a representação normal (uma soma de representações irredutíveis).

Na prática, esta mudança de coordenadas não é necessária, nem é necessário que se escreva explicitamente a forma das matrizes redutíveis, mas apenas que se determine o traço de cada matriz Γ_0 . Para isto é necessário determinar qual o efeito das diversas operações de simetria sobre um conjunto de coordenadas de determinado átomo A. O sistema de coordenadas é constituído de 3 vetores unitários $\vec{i}_1, \vec{i}_2, \vec{i}_3$ conforme mostra a figura 15 abaixo.

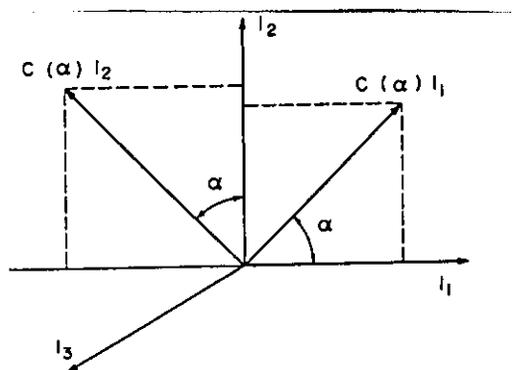


Figura 15- Efeito de uma rotação em torno do eixo i_3

a) Operação E:

$$[E] \begin{bmatrix} \vec{l}_1 \\ \vec{l}_2 \\ \vec{l}_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \vec{l}_1 \\ \vec{l}_2 \\ \vec{l}_3 \end{bmatrix}, \text{ logo } E = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \chi(E) = 3$$

b) Rotação de um ângulo α em torno de um eixo paralelo a l_3 . Da figura 15 obtemos que:

$$C(\alpha)\vec{l}_1 = \cos\alpha\vec{l}_1 + \text{sen}\alpha\vec{l}_2 + 0\vec{l}_3$$

$$C(\alpha)\vec{l}_2 = -\text{sen}\alpha\vec{l}_1 + \cos\alpha\vec{l}_2 + 0\vec{l}_3$$

$$C(\alpha)\vec{l}_3 = 0\vec{l}_1 + 0\vec{l}_2 + 1\vec{l}_3$$

$$\text{Logo } [C(\alpha)] = \begin{bmatrix} \cos\alpha & \text{sen}\alpha & 0 \\ -\text{sen}\alpha & \cos\alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \chi[C(\alpha)] = 1 + 2\cos\alpha$$

c) Reflexão em um plano. Na figura 15 consideremos por exemplo o plano formado por \vec{l}_1 e \vec{l}_2 . Neste caso, o efeito da operação consiste em mudar o sinal do vetor \vec{l}_3 . Logo, a matriz que representa σ será:

$$[\sigma] = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad \text{e} \quad \chi(\sigma) = 1$$

Este resultado $\chi(\sigma) = 1$, embora obtido mediante um caso particular, tem validade geral.

d) Rotação imprópria:

$$S(\alpha) = \sigma_h C(\alpha), \quad \text{como } [\sigma_h] = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

$$\text{segue } [S(\alpha)] = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos\alpha & \text{sen}\alpha & 0 \\ -\text{sen}\alpha & \cos\alpha & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos\alpha & -\text{sen}\alpha & 0 \\ -\text{sen}\alpha & \cos\alpha & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix}$$

portanto

$$\chi|S(\alpha)| = -1 + 2\cos\alpha$$

e) *Inversão na origem* 1. É claro que o efeito desta operação é inverter todos os sinais de $\tilde{\Gamma}_1$, $\tilde{\Gamma}_2$ e $\tilde{\Gamma}_3$.

Logo,

$$i = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 \\ 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \quad \text{portanto} \quad \chi(i) = -3$$

Notando-se que $\chi(E) = 3$ é um caso particular de

$$\chi[C(\alpha = 2\pi)] \text{ e que } \chi(\sigma) = \chi[S(\alpha = 2\pi)] \text{ e também}$$

$$\chi[i] = \chi[S(\alpha = \pi)],$$

conclui-se que, das 5 operações descritas acima, basta que se considerem apenas rotações próprias e impróprias.

Outra observação importante é que sempre que um átomo, como resultado de uma operação de simetria R, mudar de posição, sua contribuição para $\chi(R) = 0$.

Na representação configuracional, se η_r for o número de átomos que permanecem nas posições originais após a aplicação da operação de simetria R, a contribuição para o caracter $\chi(R)$ de $\Gamma_0(R)$ é

$$\Gamma_0(R) = \eta_r \chi(R) \text{ onde } \chi(R) = \begin{cases} 1 + 2\cos\alpha & \text{para } R = C(\alpha) \\ -1 + 2\cos\alpha & \text{para } R = S(\alpha) \end{cases} \quad (44)$$

Como rotações e translações são independentes das vibrações puras, segue-se que $\Gamma_{\text{vib}} = \Gamma_0 - \Gamma_{\text{t,r}}$ onde $\Gamma_{\text{t,r}}$ é uma

representação que contém somente translações e rotações. $\Gamma_{t,r}$ é uma representação redutível e prova que $\Gamma_{t,r} = \Gamma_t + \Gamma_r$, onde suas componentes estão associada às coordenados translacionais e rotacionais respectivamente.

Por outro lado, $\chi_t(R) = \chi(R)$, pois numa translação pura os deslocamentos dos átomos são todos iguais a certo valor \vec{p} e o efeito de R sobre a translação é dado pela expressão (44). As representações irredutíveis translacionais são obtidas diretamente da tabela de caracteres e são indicadas por T_x , T_y e T_z na penúltima coluna.

Para rotações puras, mostra-se que

$$\chi_r[C(\alpha)] = \chi_t[C(\alpha)]$$

e

$$\chi_r[S(\alpha)] = -\chi_t[S(\alpha)]$$

As representações irredutíveis rotacionais são descritas também na tabela de caracteres, na última coluna com a notação R_x , R_y e R_z .

As considerações acima permitem concluir que o efeito de determinada operação de simetria R, na representação configuracional Γ_0 é dada por:

$$\chi_{0,vib}(R) = \begin{cases} (\eta_r - 2)\chi(R) & \text{para } R = C(\alpha) \\ \eta_r\chi(R) & \text{para } R = S(\alpha) \end{cases} \quad (45)$$

Para uma molécula não linear, podemos construir a Tabela 03 que fornece os traços das operações de simetria de ponto.

Tabela 03- Valores de $\chi(R)$

$R = C_n^k$	$\chi(R)$	$R = S_n^k$	$\chi(R)$
$E = C_1$	3	$\sigma = S_1$	1
C_2	-1	$i = S_1$	-3
C_3, C_3^2	0	$S_3 = S_3^5$	-2
C_4, C_4^3	1	S_4, S_4^3	-1
C_5, C_5^4	$1 + 2\cos 72^\circ$	S_5, S_5^9	$-1 + 2\cos 72^\circ$
C_5^2, C_5^3	$1 + 2\cos 144^\circ$	S_5, S_5^7	$-1 + 2\cos 144^\circ$
C_6, C_6^5	2	S_6, S_6^5	0

3.6- ESPECTRO ELETRÔNICO DE MOLÉCULAS POLIATÔMICAS

O espectro eletrônico fornece em geral informações a respeito da estrutura eletrônica das moléculas. O momento de inércia de moléculas poliatômicas é muito maior que para o caso de moléculas diatômicas, fazendo com que os níveis de energia rotacionais estejam muito pouco espaçados. Este fato implica que a estrutura fina rotacional não pode, em geral, ser observada e as estruturas vibracionais de moléculas poliatômicas estão usualmente perturbadas pelas bandas rotacionais, apresentando larguras consideravelmente maiores do que as larguras reais.⁽⁵⁹⁾

Em contraste aos problemas de rotação e vibração molecular, não há um modelo teórico simples que explique satisfatoriamente as posições e as intensidades das linhas presentes nos espectros eletrônicos observáveis.

A maior parte dos trabalhos teóricos está baseada na teoria do orbital molecular. De acordo com esta teoria, os elétrons nas moléculas estão em orbitais que podem estar associados a vários núcleos. Em uma aproximação simples, os orbitais moleculares são considerados como uma combinação linear de orbitais atômicos. Assumindo que um elétron em uma molécula esteja perto de um núcleo particular, a função de onda molecular é aproximadamente um orbital atômico centrado naquele núcleo. Isto significa que os orbitais moleculares podem ser formados pela simples adição e subtração de orbitais atômicos.

Os orbitais atômicos que estão no intervalo de estabilidade apropriado para serem usados nas ligações são os orbitais de valência. Por exemplo, o orbital de valência de um átomo de hidrogênio é o 1s; os orbitais 2s e 2p neste caso tem

energia alta demais para serem usados em ligações fortes.

Consideremos a mais simples molécula que podemos imaginar, o H_2^+ , com dois prótons e um elétron. Cada átomo de hidrogênio na molécula tem um orbital de valência $1s$ e como podemos observar na figura 16(a), os dois orbitais atômicos se sobrepõem na região entre os dois núcleos. É exatamente esta região de sobreposição que será afetada pela adição ou subtração dos orbitais atômicos para construir os orbitais moleculares.

Na representação do orbital molecular da figura 16(b) podemos ver que o elétron passa a maior parte do tempo na região de sobreposição entre os núcleos, o que maximiza a força atrativa entre o elétron e os dois núcleos. Um elétron neste orbital molecular (denominado ligante) é mais estável que em qualquer dos orbitais atômicos isolados. Este orbital com simetria cilíndrica é definido com orbital σ .

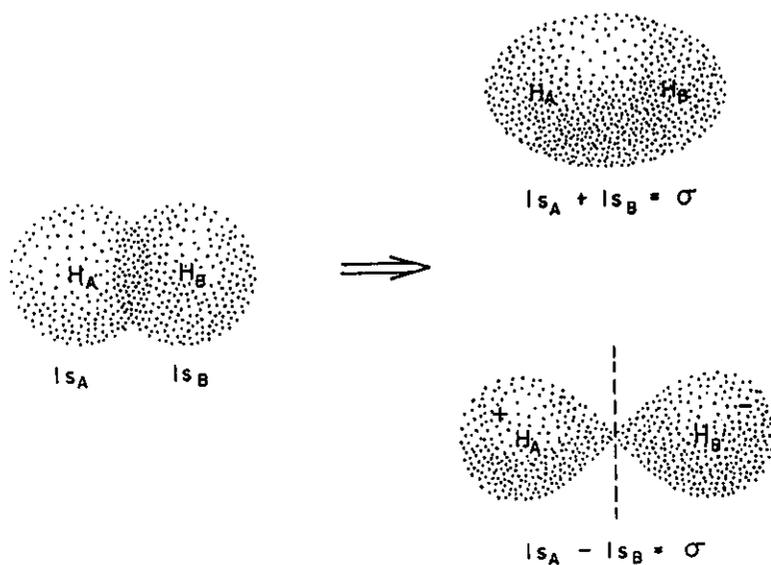


Figura 16- (a) Orbitais atômicos do H_2^+ e formação de
 (b) Orbital molecular σ
 (c) Orbital molecular σ^*

A figura 16(c) mostra a combinação linear resultante da subtração entre os orbitais atômicos $1s$. Este orbital molecular tem um nó na região entre os núcleos e o elétron nunca será encontrado neste ponto; ao contrário, permanecerá principalmente confinado no espaço externo à região de sobreposição. Um elétron neste orbital molecular é menos estável que em um orbital atômico $1s$ isolado (denominado antiligante). Este orbital também tem simetria cilíndrica e é definido com sendo um orbital molecular σ^* .

De forma mais geral, numa molécula diatômica os orbitais com simetria cilíndrica serão: s , p_z e d_z , que para um dado valor da coordenada z e a uma certa distância do eixo z , qualquer que seja o ângulo ϕ em volta do eixo, tem funções de mesmo valor. A dependência angular ϕ está relacionada com o número quântico m através de:

$\Phi_m(\phi) = [\exp(i m \phi)] / \sqrt{2\pi}$, de forma que os orbitais σ correspondem a $m = 0$.

O mesmo não acontece para os orbitais atômicos p_x , p_y , d_{xz} , e d_{yz} , que têm um plano nodal que contém o eixo z , e são combinações lineares de funções com número quântico $m = \pm 1$. Como exemplo tomemos os dois orbitais $2p_x$ de uma molécula hipotética A_2 , como na figura 17(a). Estes orbitais moleculares têm um lóbulo positivo de um lado do eixo z e um lóbulo negativo do outro lado. Se rodarmos o orbital molecular de 180° , ele simplesmente trocaria de sinal. A multiplicação por -1 restitui o orbital original, ou seja, neste caso existe um nó no plano yz . Um orbital molecular com estas características é denominado orbital molecular π . Os orbitais π têm uma concentração de densidade eletrônica entre os dois

núcleos A [figura 17(b)] , enquanto que o orbital menos estável, π^* , terá um nó entre os dois núcleos [figura 17(c)].

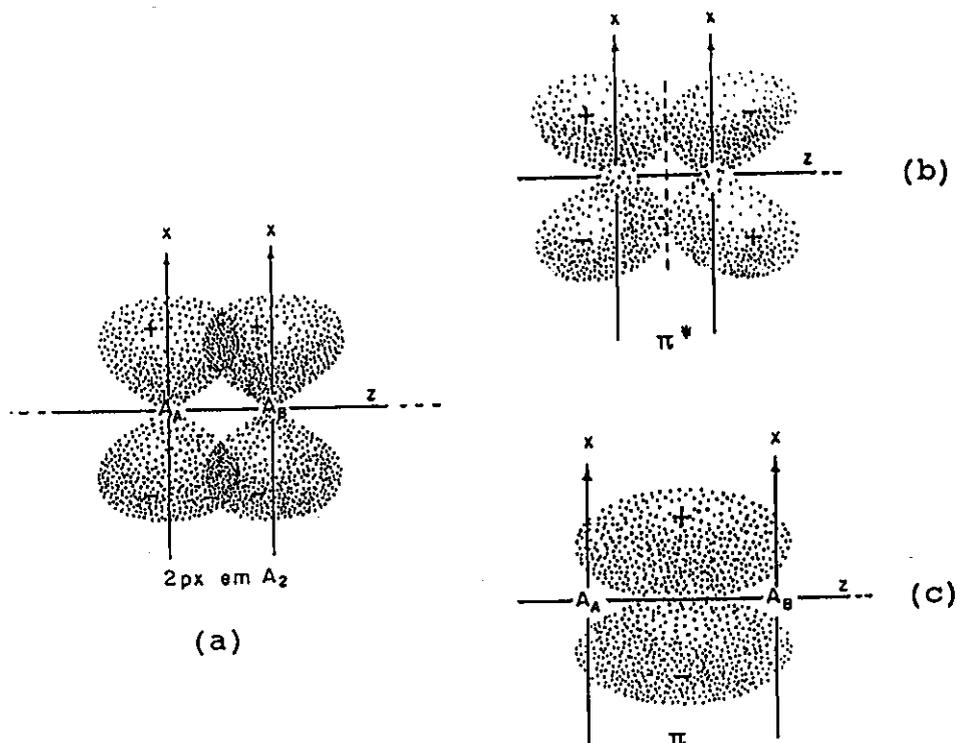


Figura 17- (a) Orbitais atômicos $2p_x$ de A_2 e formação de
 (b) Orbital π_x^*
 (c) Orbital π_x

Uma vez que as transições eletrônicas podem envolver elétrons nos orbitais σ , π ou n (orbitais não ligantes), é possível em princípio ter os seguintes tipos de transições:



Transições do tipo $\pi \longrightarrow \sigma^*$ e $\sigma \longrightarrow \pi^*$ são proibidas por simetria, embora elas ocorram em alguns compostos. Infelizmente não existe uma notação padrão aceita para descrever as transições. Além da notação de orbitais moleculares e teoria de grupos acima descritas, poderão ser usados os símbolos de Mulliken, onde N é usado para denotar o estado fundamental, e V , Q , R , etc., para estados excitados.

$N \longrightarrow V$ corresponde à transição $\pi \longrightarrow \pi^*$, e $N \longrightarrow Q$ corresponde à $n \longrightarrow \pi^*$. Na classificação de Platt, o símbolo A é usado para denotar o estado fundamental, B para estados excitados envolvendo transições de intensidade muito alta, L e C para transições parcialmente proibidas.

Um grupo especial de moléculas poliatômicas, com elétrons π , tem sido tratado com grandes aproximações por mecânica quântica desde 1931. As propriedades mais características dos sistemas conjugados são justamente devidas aos elétrons π , enquanto que a estrutura σ da molécula parece se alterar pouco durante os processos. Este ponto sugeriu a Hückel um método de cálculo simples que trata só dos elétrons π , como se os elétrons σ formassem parte da estrutura rígida nuclear. Embora se baseie num conjunto de aproximações drásticas e até dificilmente aceitáveis teoricamente, os resultados mesmo que qualitativos de Hückel tem tido grande utilidade em química orgânica, farmacologia e bioquímica.⁽²⁶⁾

Existem ainda uma variedade de métodos semi-empíricos para tratar sistemas conjugados com mais precisão, como para moléculas pequenas, o de Pariser-Parr-Pople, CNDO, INDO, o método de Hückel extendido (que também leva em consideração os elétrons σ), etc. Entretanto um estudo de moléculas como as porfirinas e seus derivados por métodos teóricos ou semi-empíricos que levem em conta, não apenas os orbitais do núcleo central, mas também a influencia dos ligantes laterais ainda não foi feita.^(34,35)

Nas discussões dos resultados experimentais do capítulo IV, faremos portanto uma análise comparativa dos dados

obtidos e apresentados nesta tese em relação a dados apresentados na literatura , e que tratam de porfirinas na sua forma mais simplificada, ou seja, as porfinas, nos quais utilizaremos os conceitos teóricos apresentados neste capítulo.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DA HEMATOPORFIRINA

Neste capítulo apresentaremos os dados espectroscópicos obtidos e as discussões qualitativas dos mesmos, através das quais poderemos sugerir um método de monitoração do processo de transferência de energia da hematoporfirina para o oxigênio singlete.

Descreveremos a seguir a preparação das amostras utilizadas no estudo espectroscópico da hematoporfirina e do seu derivado (HpD) para uso em Terapia Fotodinâmica de Tumores.

Foram preparadas 12 soluções para estudo de absorção e emissão fluorescente cujos solutos foram:

1-Hematoporphyrin Free-Base - ($C_{34}H_{38}N_4O_6$)

Sigma Chemical- USA - Peso Molecular = 598,7

2-Hematoporphyrin Dihydrochloride ($C_{34}H_{38}N_4O_6 \cdot 2HCl$)

Sigma Chemical- USA - Peso Molecular = 671,6

3-Hematoporphyrin D

Porphyrin Products, Inc.- USA

A procedência dos solventes foi:

1-Acetona RPE - Carlo Erba- (CH_3COCH_3)

2-Metanol Absoluto - Merk- (CH_3OH)

3-Ácido Acético Glacial - Merk- (CH_3COOH)

4-Trisma base- Sigma Chemical - USA- ($C_4H_{11}NO_3$)

5-Solução Salina 0,9%, preparada com NaCl Merk e Água bidestilada, bideionizada; fornecida pelo Departamento de

Patologia Clínica do Hospital das Clínicas- UNICAMP

A concentração mais adequada para obtenção de um bom sinal nos espectros das amostras em solução (para evitar dimerização⁽⁴⁶⁾) é menor que 10^{-4} M. Escolhemos então 1.10^{-5} M, e calculamos a massa de sólido como sendo:

$$m = \text{Peso Molecular} \cdot \text{Molalidade} \cdot V[\ell]$$

No caso das soluções com HpD, utilizamos a preparação química do derivado segundo Dougherty⁽³⁾ e revista por Zezell⁽⁴⁷⁾, que nos fornece 5mg(HpD)/ml de solução salina. Para o solvente TRIS, fizemos uma solução TRIS 0,1M.

		CONCENTRAÇÃO
AMOSTRA 01	HpD em solução salina 0,9%	≈ 0,2ml/50ml
AMOSTRA 02	HpD em solução de metanol	≈ 0,2ml/50ml
AMOSTRA 03	HpD em solução de acetona	≈ 0,2ml/50ml
AMOSTRA 04	HpD em solução de ácido acético	≈ 0,2ml/50ml
AMOSTRA 05	HpD em água bidestilada/deionizada	≈ 0,2ml/50ml
AMOSTRA 06	HpD em TRIS 0,1M	≈ 0,2ml/50ml
AMOSTRA 07	Hp.2HCl em solução salina 0,9%	≈ $1,5.10^{-5}$ M
AMOSTRA 08	Hp.2HCl em solução de metanol	≈ $1,5.10^{-5}$ M
AMOSTRA 09	Hp.2HCl em solução de acetona	≈ $1,5.10^{-5}$ M
AMOSTRA 10	Hp.2HCl em solução de ácido acético	≈ $1,5.10^{-5}$ M
AMOSTRA 11	Hp.2HCl em água bidestilada/deionizada	≈ $1,5.10^{-5}$ M
AMOSTRA 12	Hp.2HCl em TRIS 0,1M	≈ $1,5.10^{-5}$ M

4.1- ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO

4.1.2- DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Para obtenção dos espectros de absorção utilizamos um espectrofotômetro comercial PerKin-Elmer -USA- modelo Lambda 9 UV/Vis/NIR Spectrophotometer, do Instituto de Física Gleb Wataghin/UNICAMP, com os seguintes parâmetros:

Absc mode	wavelenght
Slit/Sens	2,00 nm/2
Scan Speed	60 nm/min
Response	0,5s
Lamp/Det	319.2/960,8nm
Cycles/times	1/0.05min
Peak Threshold	0,001 a 0,004A
Abscissa Format	20nm/cm

Para os espectros de emissão fluorescente e excitação de fluorescência, utilizamos um espectrofluorímetro comercial JASCO -JAPAN- modelo FP-777 e plotter de mesma procedência modelo PTL 3965, no laboratório do Grupo do Prof. Marcel Tabak do Departamento de Química, Instituto de Física e Química USP - São Carlos. Os parâmetros usados foram:

λ range	500 - 700nm
Vscale	80%
Scan speed	100nm/min
Slit	1,5nm
PMT gain	Medium - High
Cycles/times	1/0,2nm

Registramos inicialmente os espectros dos solventes para verificar se os mesmos apresentariam absorção óptica ou emissão fluorescênte na região de interesse, implicando na necessidade de uma subtração de espectros, que não foi necessária.

Apresentaremos a seguir os conjuntos de espectros de absorção, emissão fluorescente e excitação de fluorescência para cada amostra, acompanhados dos respectivos comprimentos de onda de máxima absorção e emissão.

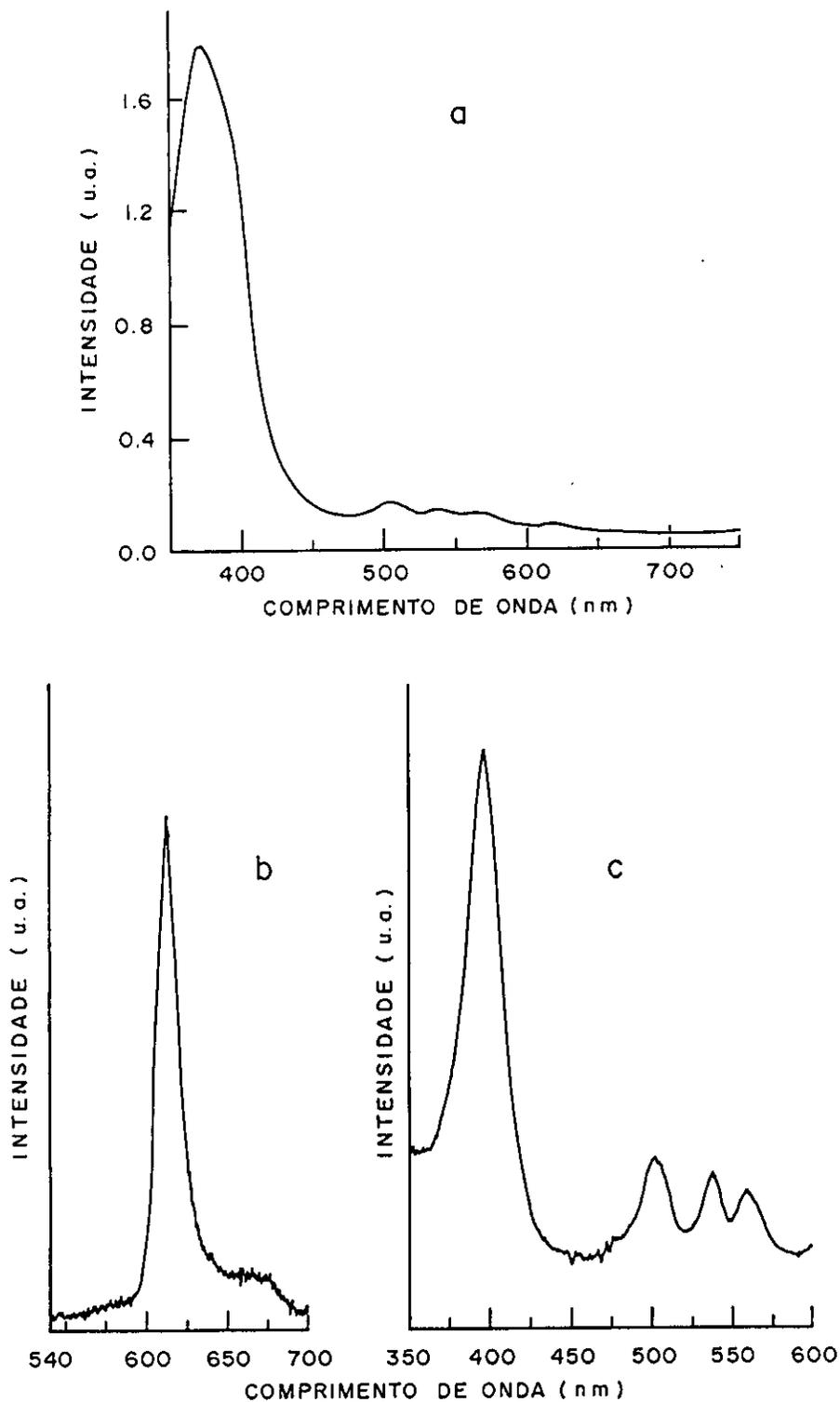


Figura 18- (a) Espectro de absorção - AMOSTRA 01
 $\lambda_{\text{absorção}} = 372\text{nm}$ 504,9nm 538,5nm 567,8nm 619nm
 (b) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 613\text{nm}$
 (c) Espectro de excitação de fluorescência

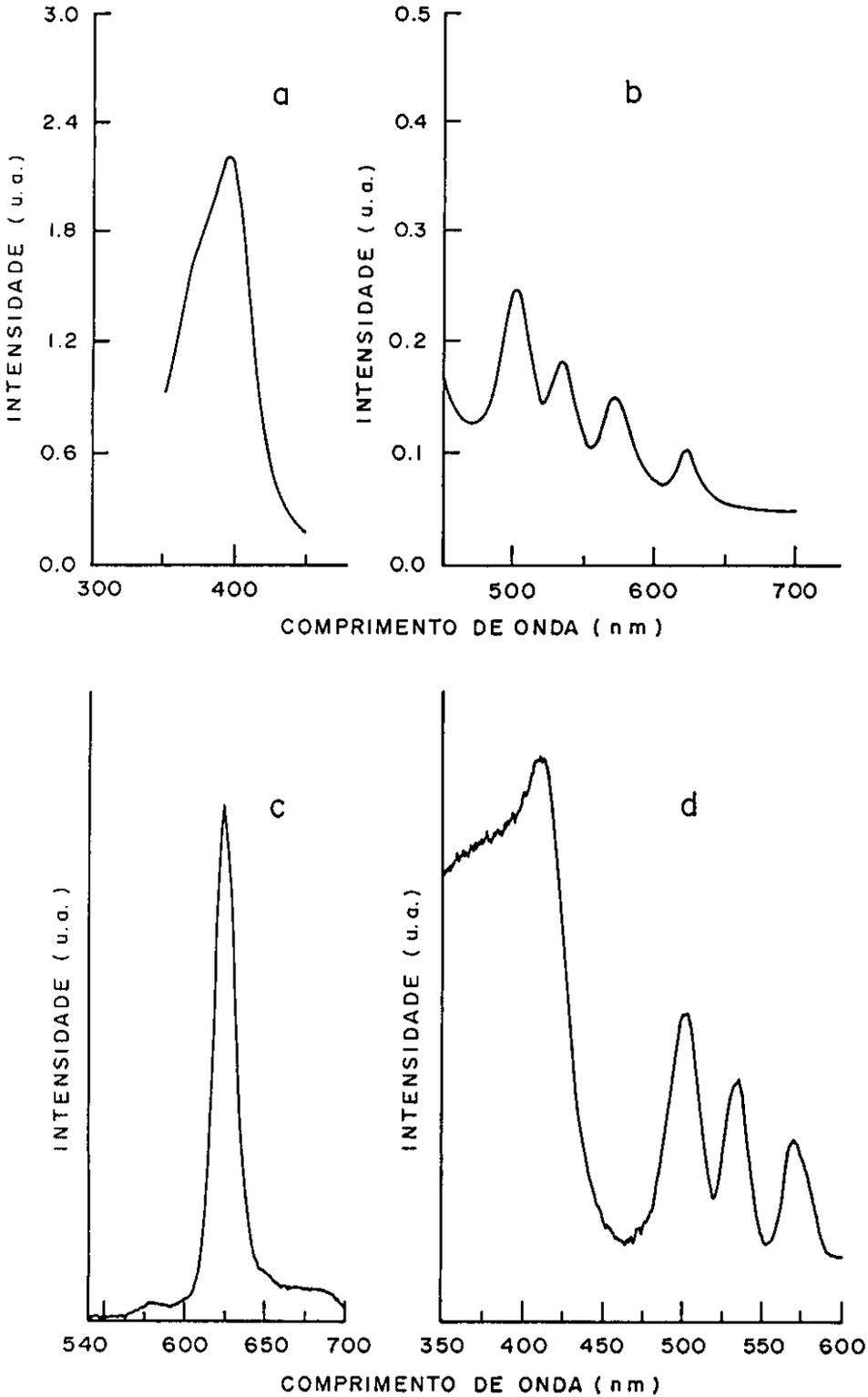


Figura 19- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 02

$\lambda_{\text{absorção}} = 395,1\text{nm}$ 501nm 533nm 569,5nm 623nm

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 624\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

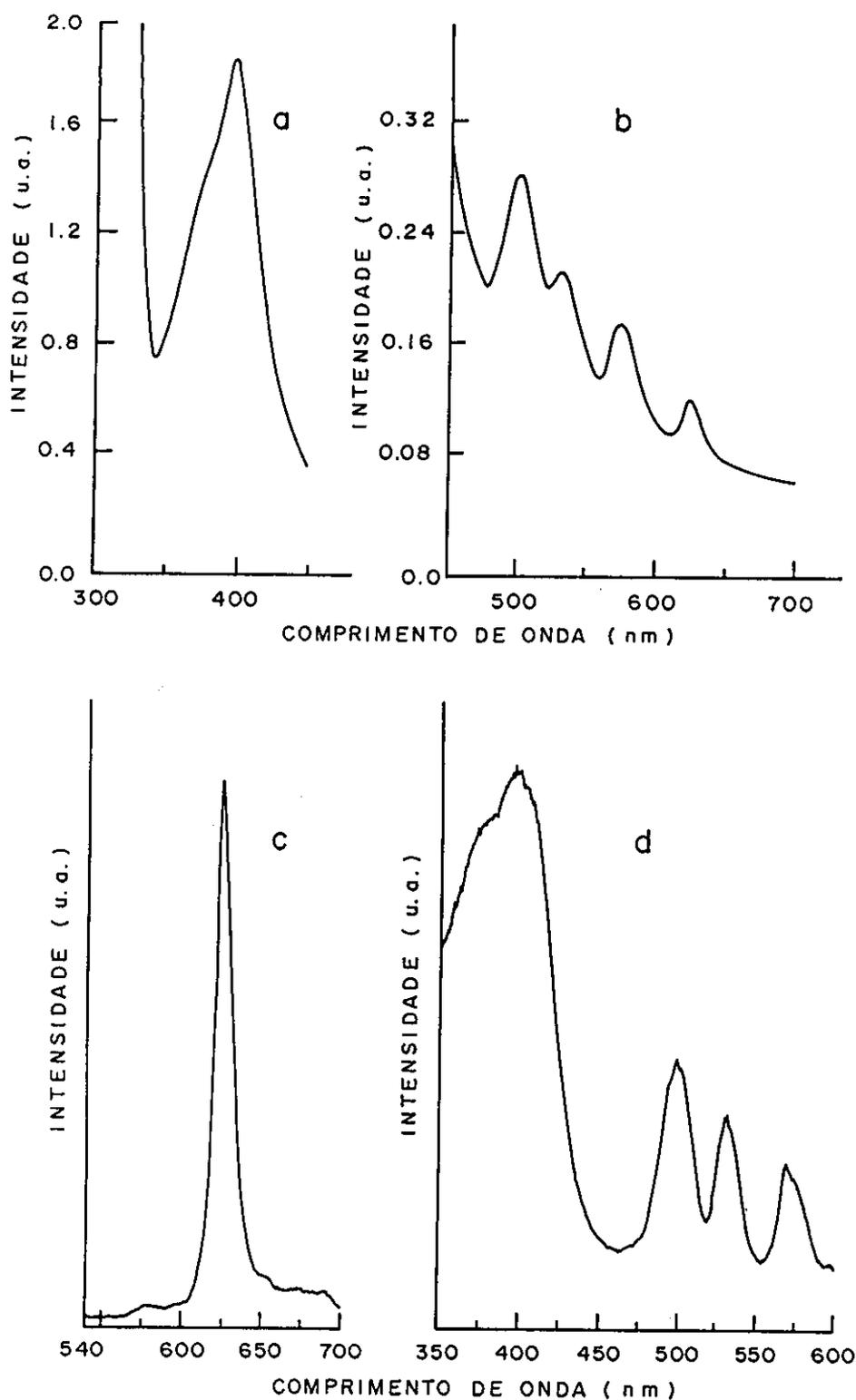


Figura 20- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 03

$\lambda_{\text{absorção}} = 396,5\text{nm} \quad 500,6\text{nm} \quad 530,5\text{nm} \quad 573,5\text{nm} \quad 623,5\text{nm}$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 624\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

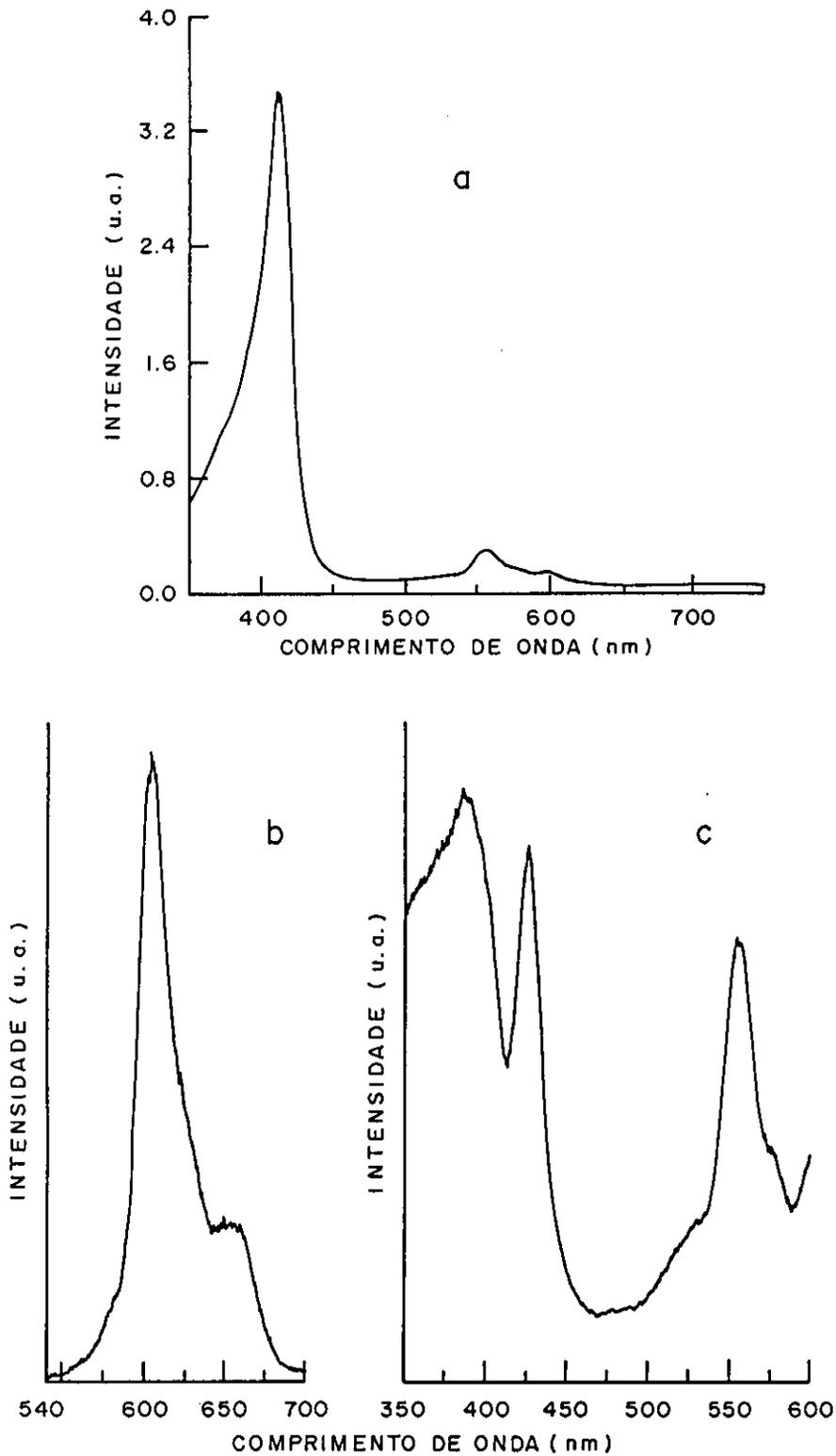


Figura 21- (a) Espectro de absorção - AMOSTRA 04

$$\lambda_{\text{absorção}} = 369,9\text{nm} \quad 505,4\text{nm} \quad 538,0\text{nm}$$

(b) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 603,5\text{nm}$

(c) Espectro de excitação de fluorescência

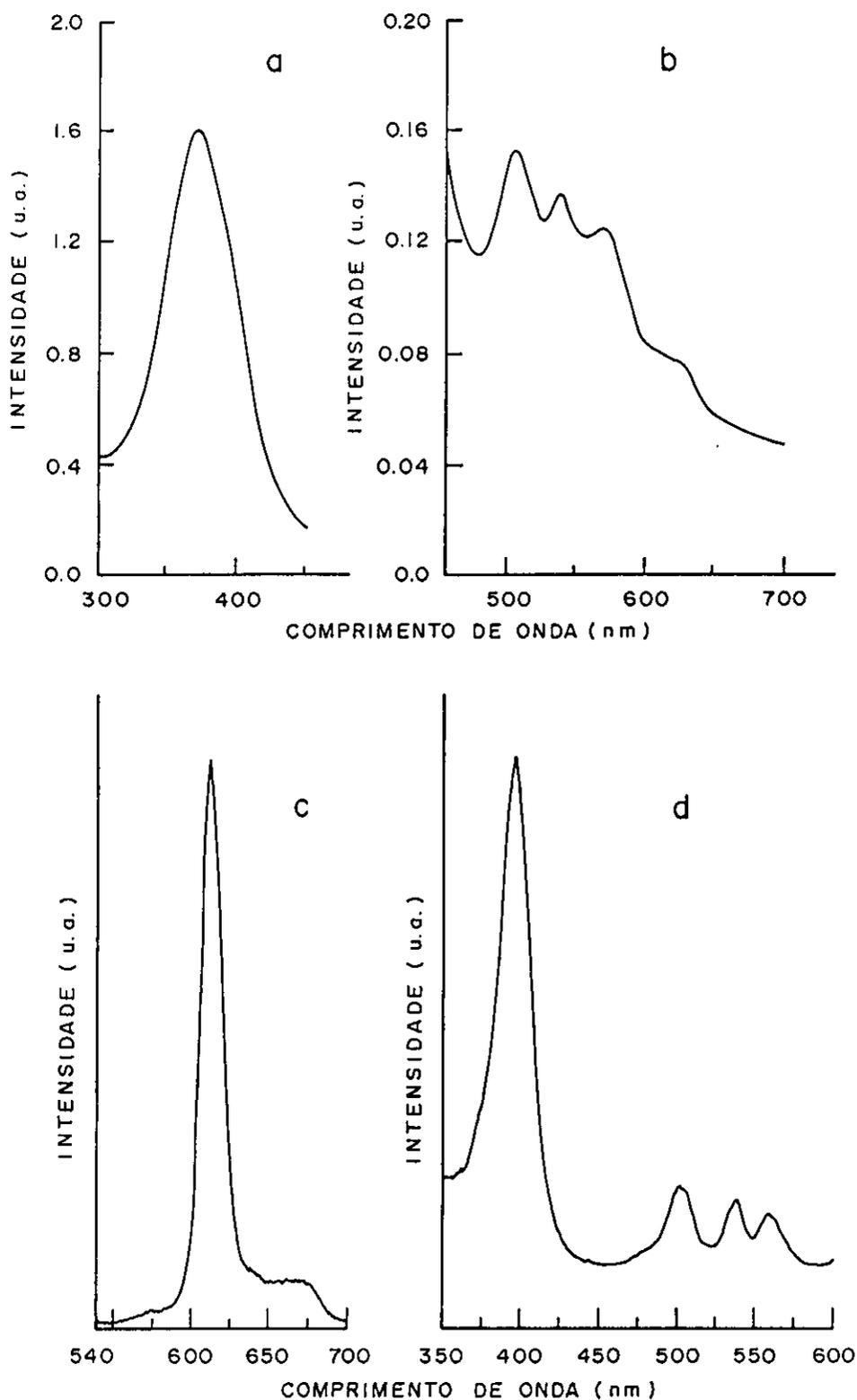


Figura 22- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 05

$\lambda_{\text{absorção}} = 397\text{nm} \quad 502,5\text{nm} \quad 538,5\text{nm} \quad 559\text{nm} \quad 622\text{nm}$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 612,5\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

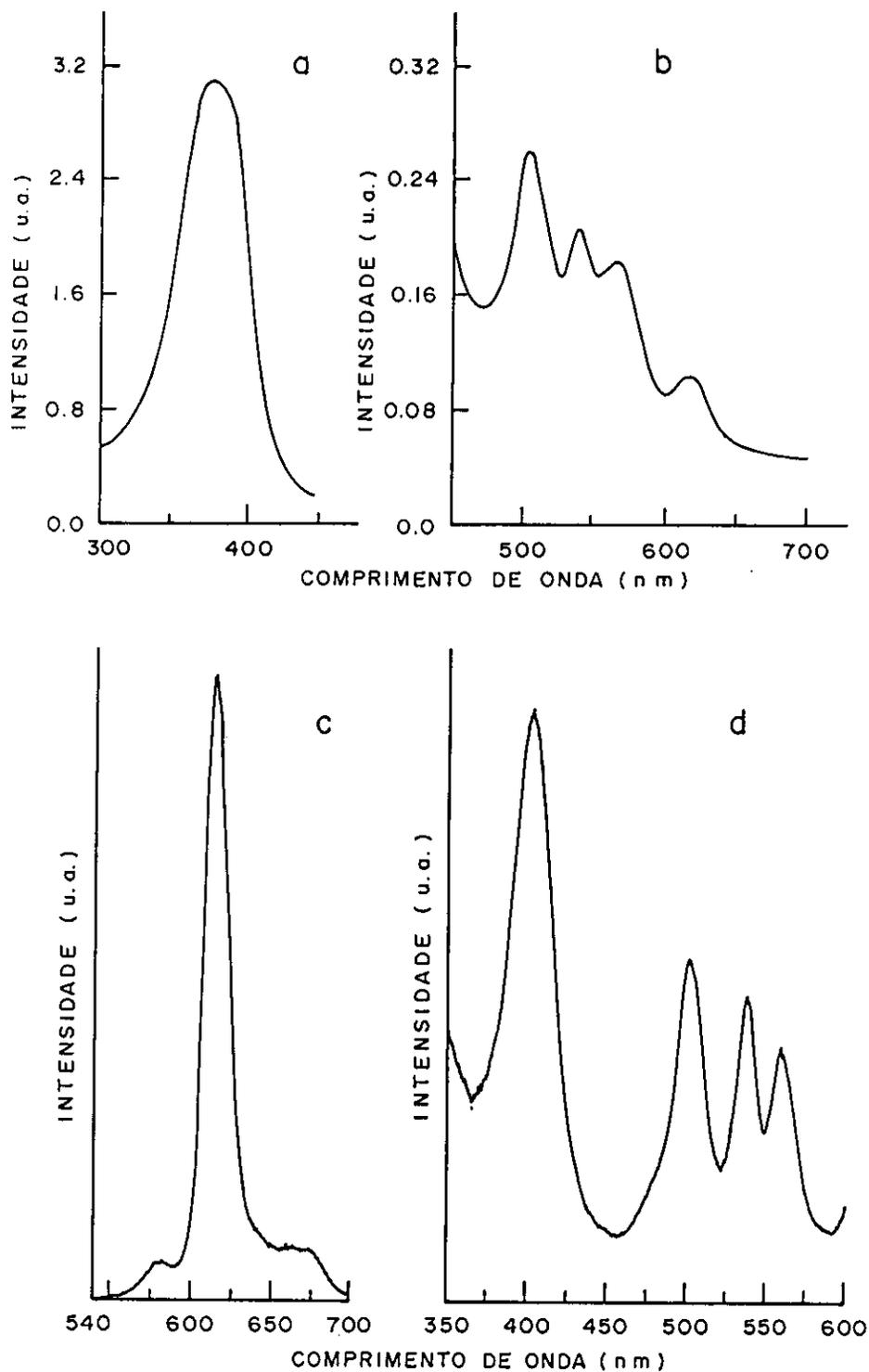


Figura 23- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 06

$\lambda_{\text{absorção}} = 378,6\text{nm} \quad 504,5\text{nm} \quad 538,4\text{nm} \quad 565,7\text{nm} \quad 617,8\text{nm}$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 613,5\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

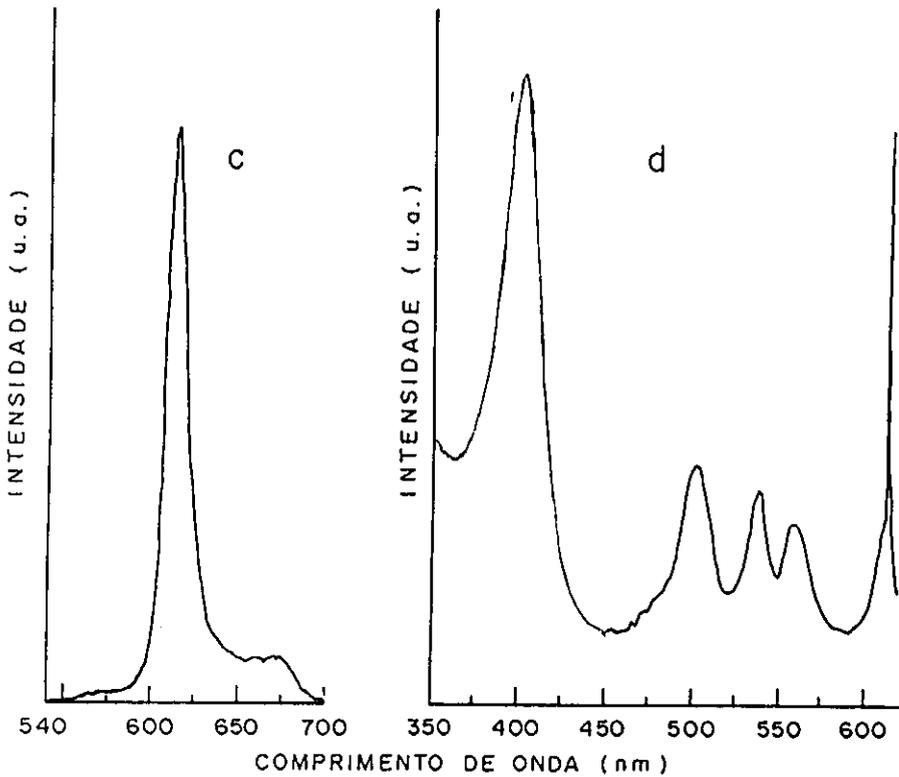
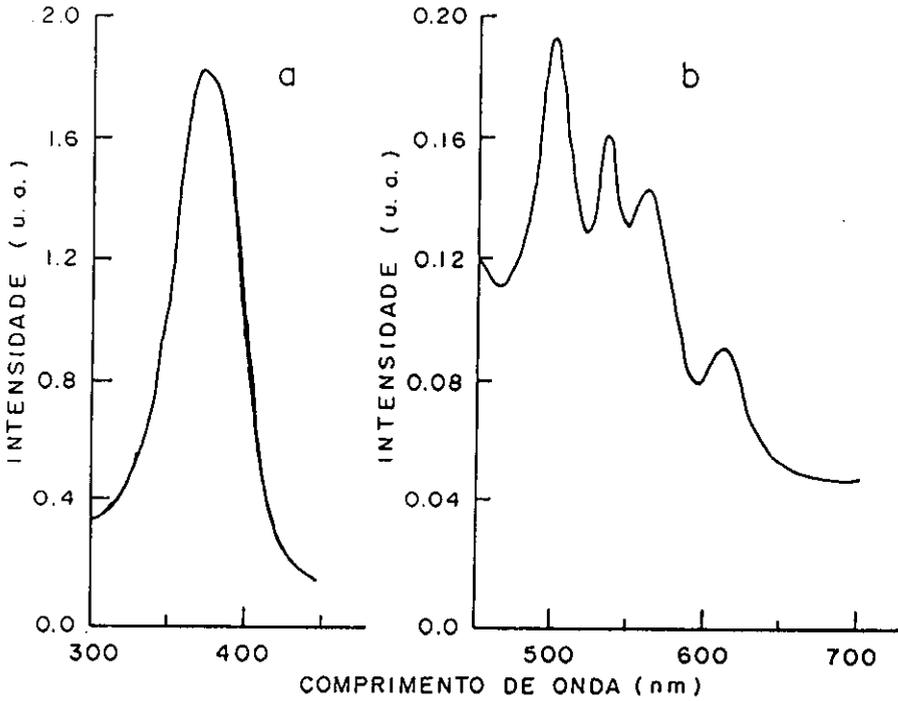


Figura 24- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 07

$\lambda_{\text{absorção}} = 379,4\text{nm} \quad 502,9\text{nm} \quad 537,8\text{nm} \quad 564,3\text{nm} \quad 612,3\text{nm}$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 612,5\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

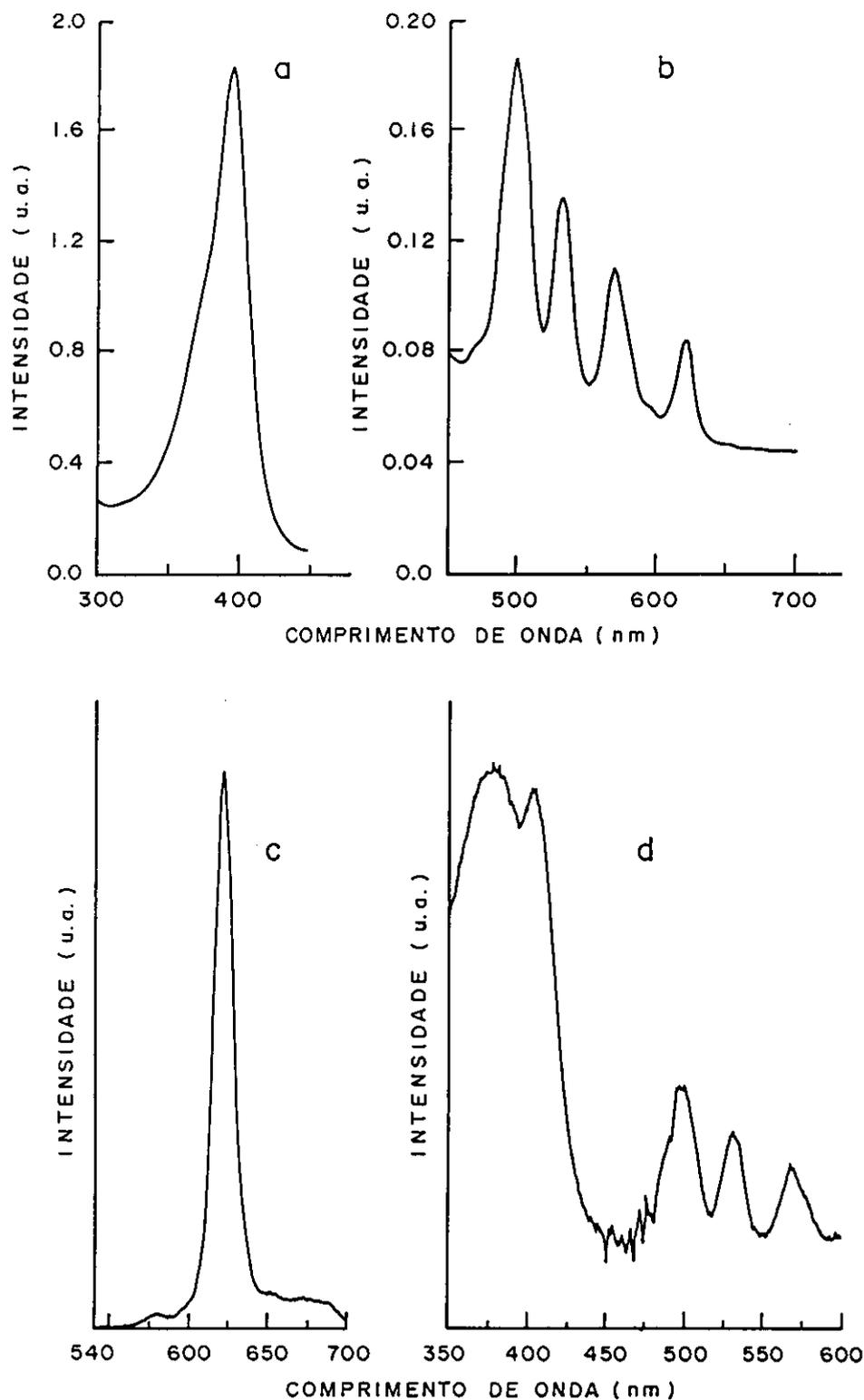


Figura 25- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 08

$$\lambda_{\text{absorção}} = 395,6\text{nm} \quad 497,3\text{nm} \quad 530,9\text{nm} \quad 567,8\text{nm} \quad 620,4\text{nm}$$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 623,5\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

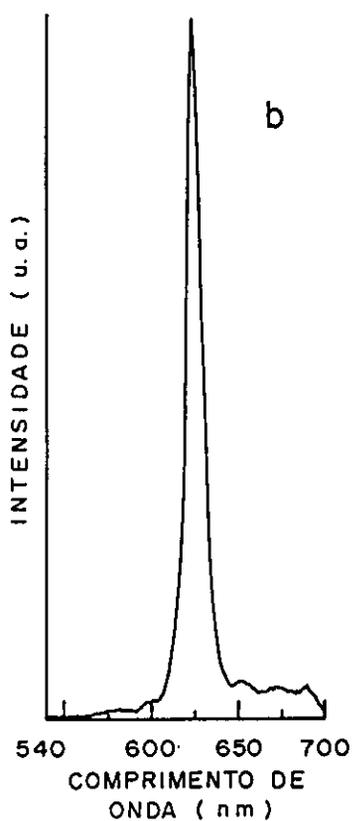
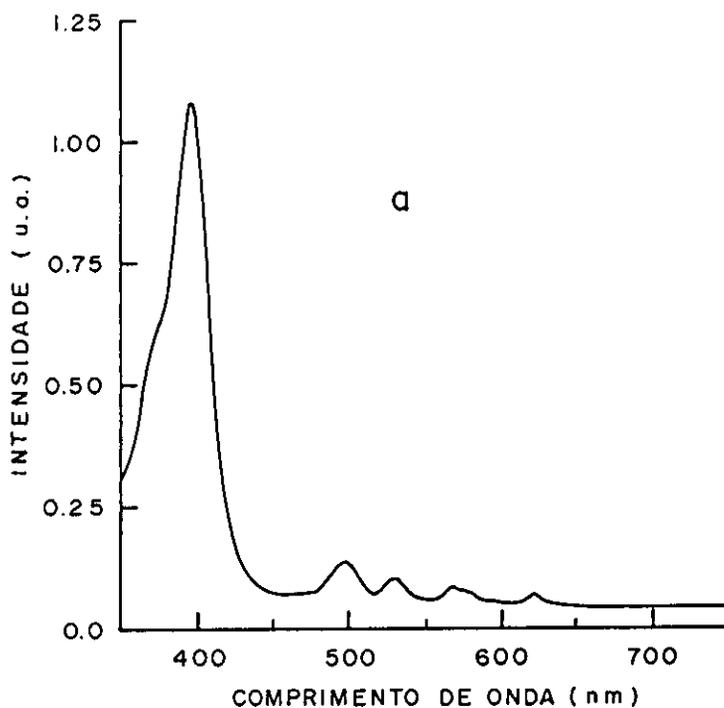


Figura 26- (a) Espectro de absorção - AMOSTRA 09

$\lambda_{\text{absorção}} = 396,3\text{nm} \quad 496,9\text{nm} \quad 529,0\text{nm} \quad 567,6\text{nm} \quad 621,8\text{nm}$

(b) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 622,5\text{nm}$

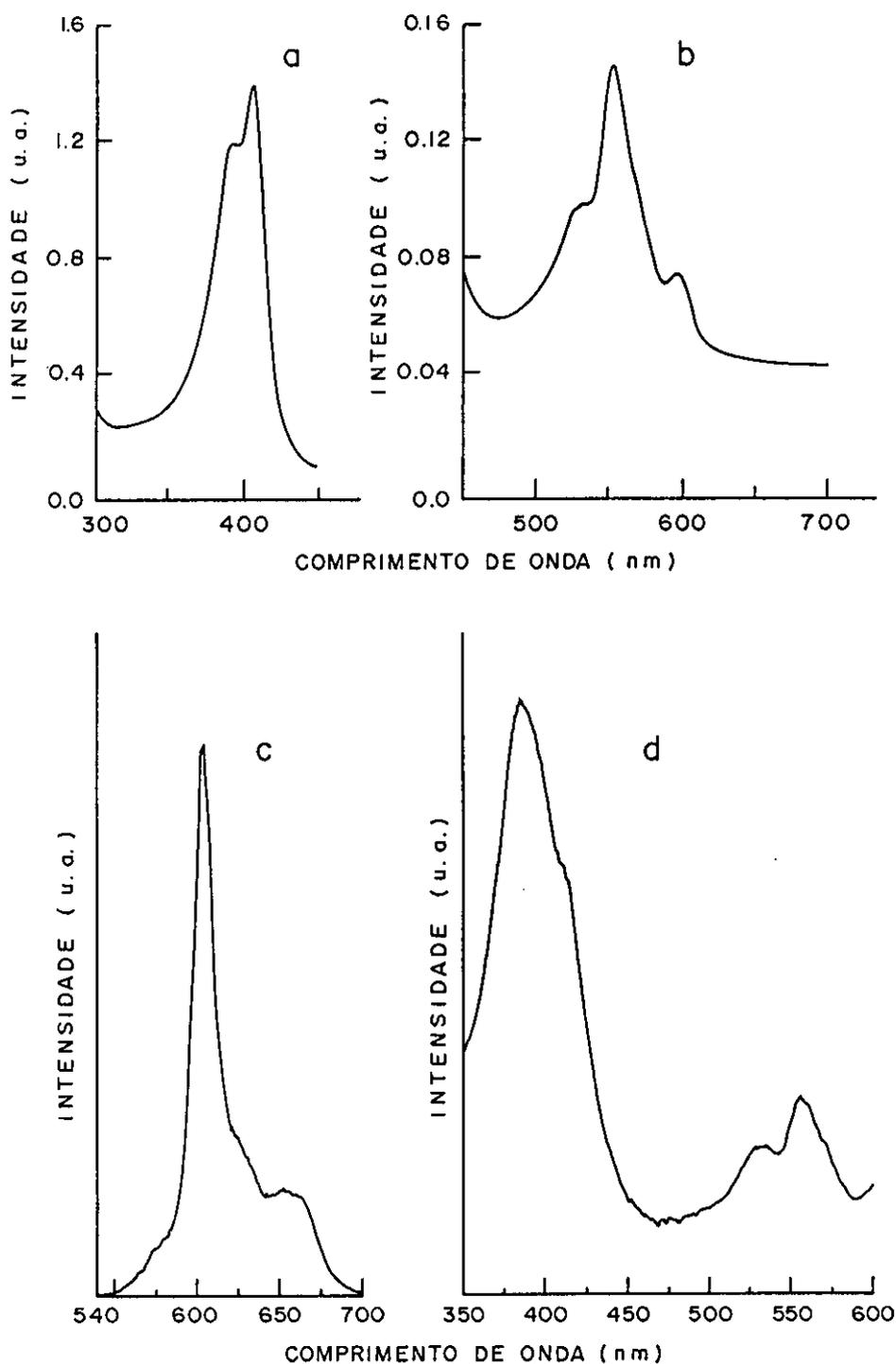


Figura 27- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 10

$\lambda_{\text{absorção}} = 393\text{nm} \quad 406,9\text{nm} \quad 554,3\text{nm} \quad 598,6\text{nm}$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 604,5\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

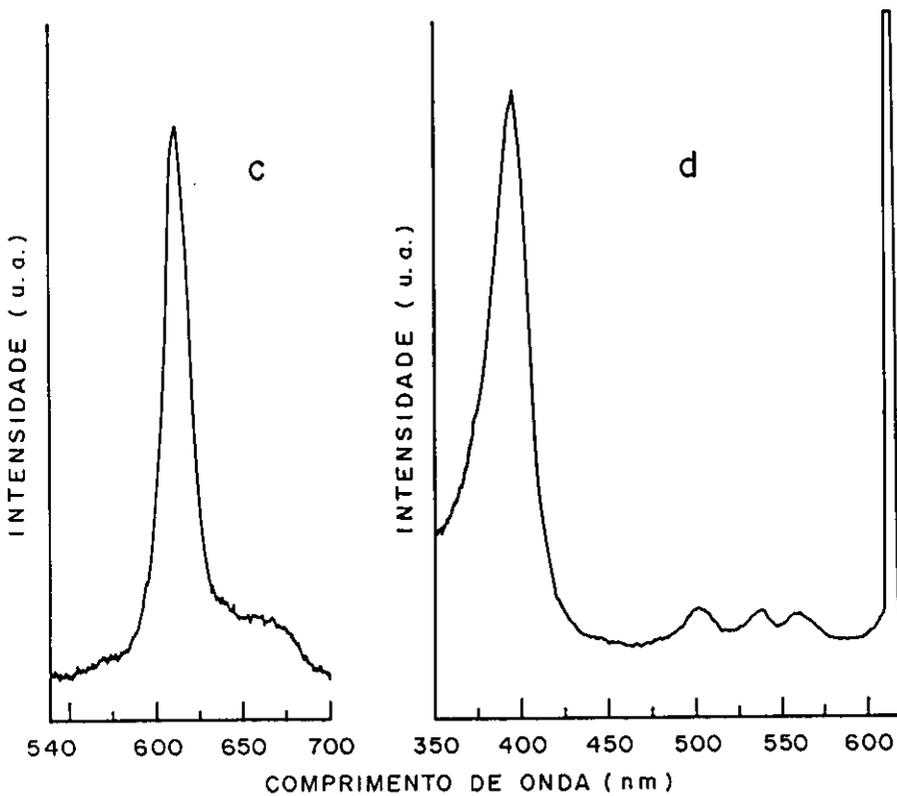
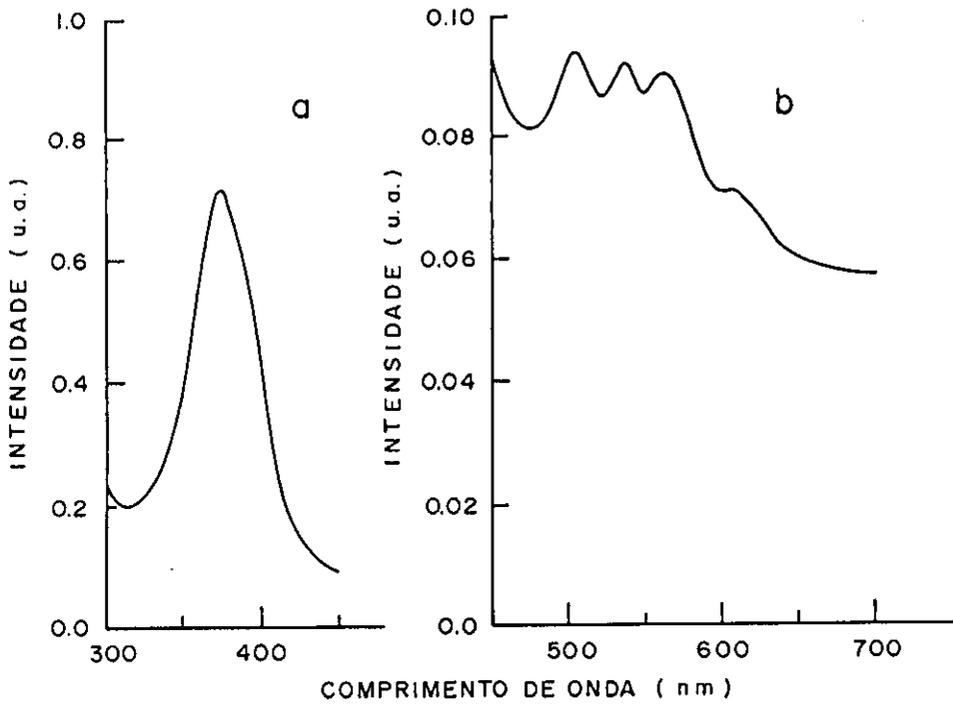


Figura 28- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 11

$\lambda_{\text{absorção}} = 379,4\text{nm} \quad 502,9\text{nm} \quad 537,8\text{nm} \quad 564,3\text{nm} \quad 612,3\text{nm}$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 612,5\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

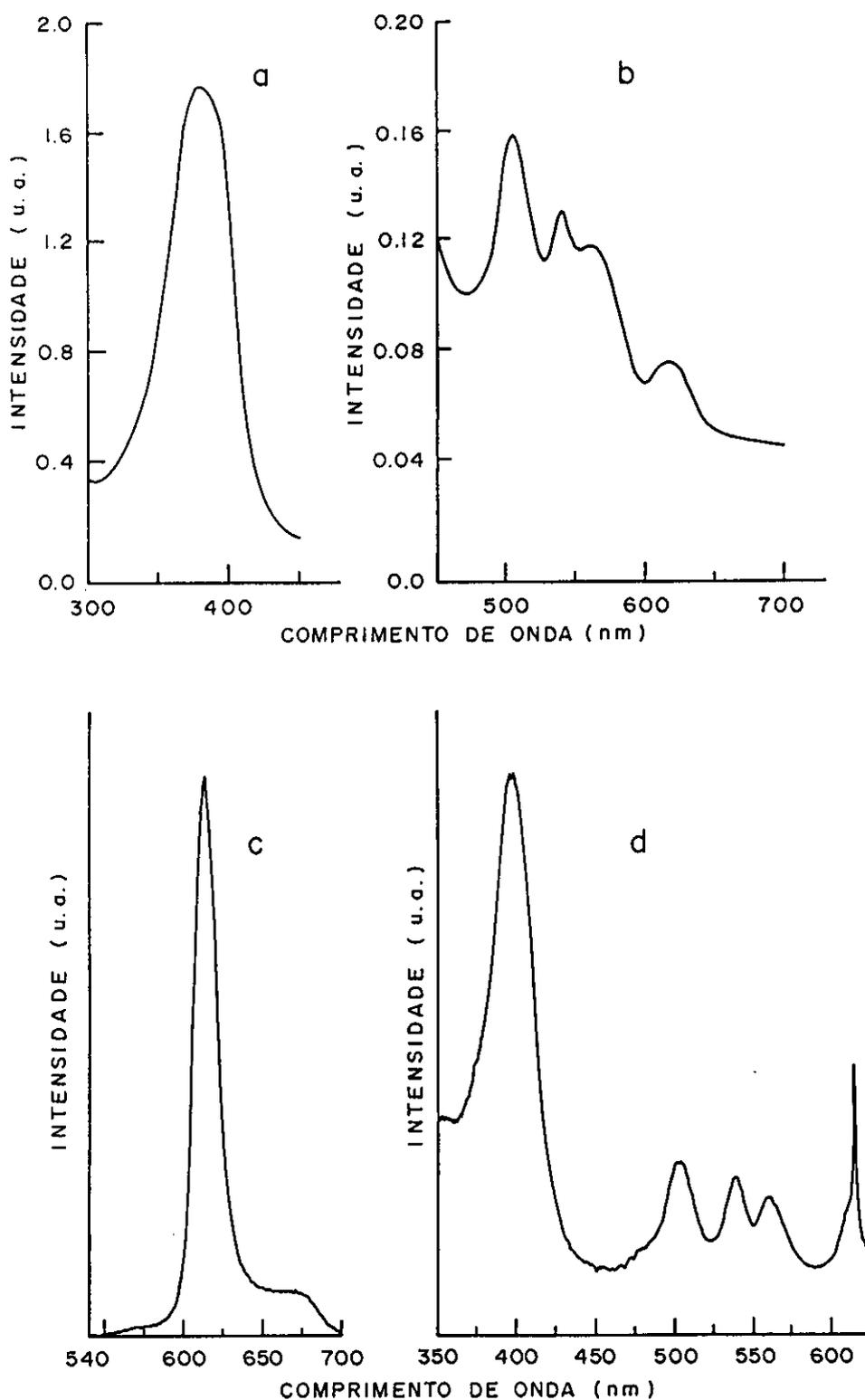


Figura 29- (a) e (b) Espectros de absorção - AMOSTRA 12

$\lambda_{\text{absorção}} = 378,9\text{nm} \quad 504,7\text{nm} \quad 539,2\text{nm} \quad 558,3\text{nm} \quad 618,8\text{nm}$

(c) Espectro de fluorescência $\lambda_{\text{fluo máx}} = 614,5\text{nm}$

(d) Espectro de excitação de fluorescência

4.1.2- DISCUSSÃO

O anel básico das porfirinas, denominado porfina, é formado pelos 16 membros do anel com 18 elétrons π , incluindo 4 átomos de N no centro. Este núcleo eletrônico é o responsável pelo espectro óptico típico de porfirinas (com uma banda de máxima absorção (banda de Soret) na região ultra-violeta e duas bandas na região visível) que pode ser perturbado dependendo das várias modificações químicas nesta estrutura básica.

Para tratarmos a hematoporfirina segundo este modelo, temos que introduzir no mínimo duas perturbações:

- 1-Substituintes externos no anel;
- 2-Variação no substituinte central, com 2 hidrogênios.

Todas as porfirinas de base livre têm os mesmos substituintes laterais, exceto para 2 posições. Para a hematoporfirina (figura 02), elas são $\text{CH}_3-\overset{\text{H}}{\underset{|}{\text{C}}}-\text{OH}$, que é um radical saturado e não forma parte na conjugação do macrociclo.

A hematoporfirina é uma porfirina de base livre planar com oito cadeias laterais, que assumidas como sendo massas puntuais, mantém como já mencionado no item (3.3), simetria molecular D_{2h} e apresenta quatro bandas de absorção na região visível em contraste com as duas bandas observadas para as metaloporfirinas. Estas bandas são originadas dos estados eletrônicos B e Q (em geral transições $\pi \longrightarrow \pi^*$ associadas ao macrociclo) e há uma polarização de bandas com respeito ao eixo H-H.

Como podemos observar nos espectros de absorção, itens (a) e (b) das figuras (17 a 28) uma banda extremamente intensa (Banda de Soret) aparece entre 370 e 400nm para todas

as amostras. Esta banda é de origem eletrônica $B(0,0)$ do segundo estado excitado singlete. As bandas do visível são as bandas Q de origem eletrônica $Q(0,0)$ do estado excitado singlete de energia mais baixa que se divide em $Q_x(0,0)$ e $Q_y(0,0)$ cada uma com um overtone vibrônico $Q_x(1,0)$ e $Q_y(1,0)$ respectivamente^(34,35). Alguns autores⁽³⁶⁻³⁸⁾ propõe uma interpretação para a variação relativa na intensidade observada para as bandas Q baseada na perturbação dos elétrons π devido aos substituintes externos.

As soluções de hematoporfirina apresentam forte fluorescência (espectros de emissão (c) figura 17 a 28). A distância relativamente pequena entre o estado singlete mais baixo e o tripleto além da correspondente alta eficiência de cruzamento intersistemas⁽⁴¹⁾ faz com que a hematoporfirina seja particularmente usada como doadora de excitação tripleto para o oxigênio singlete. Através das posições dos picos de emissão observados nas figuras (17 a 28) pudemos estabelecer a melhor amostra e as condições de excitação para realização do experimento do ítem 4.3.

Todas as medidas apresentam concordância com os dados apresentados na literatura⁽³⁰⁻⁴⁶⁾.

4.2- ESPECTROS RAMAN

4.2.1- DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Para a obtenção dos espectros Raman utilizamos pastilhas de Hematoporfirina.2HCl e hematoporfirina de base-livre em pó, dissolvidas em KBr ou KI. Para evitar problemas de deterioração por aquecimento localizado, utilizamos uma célula rotativa Jobin Yvon, de teflon com motor em 2000 rpm. Para algumas amostras utilizamos KNO_3 ou Na_2SO_4 como marcadores para nos certificarmos das posições relativas dos picos. As medidas de espalhamento Raman foram feitas no laboratório do professor Dr. Osvaldo Sala do Instituto de Química da Universidade de São Paulo-SP, com auxílio de um aluno de doutoramento do Instituto de Física da USP, Sebastião Claudino da Silva. O equipamento utilizado foi um RAMANOR HG 2S- Jobin Yvon, acoplado a uma fotomultiplicadora RCA-C31043A02 (mantida a baixa temperatura por nitrogênio líquido). A fonte de excitação foi um laser de argônio Spectra Physics, emitindo em $\lambda = 4880\text{\AA}$, 4965\AA e 5145\AA . Os espectros aqui apresentados são uma média de 3 a 5 espectros, cujos dados foram tratados pelo programa do sistema de aquisição e traçagem de dados desenvolvido pelo mesmo grupo. As condições de varredura variaram entre 40 e 50 $\text{cm}^{-1}/\text{min}$, com fenda espectral de 6 a 10 cm^{-1} .

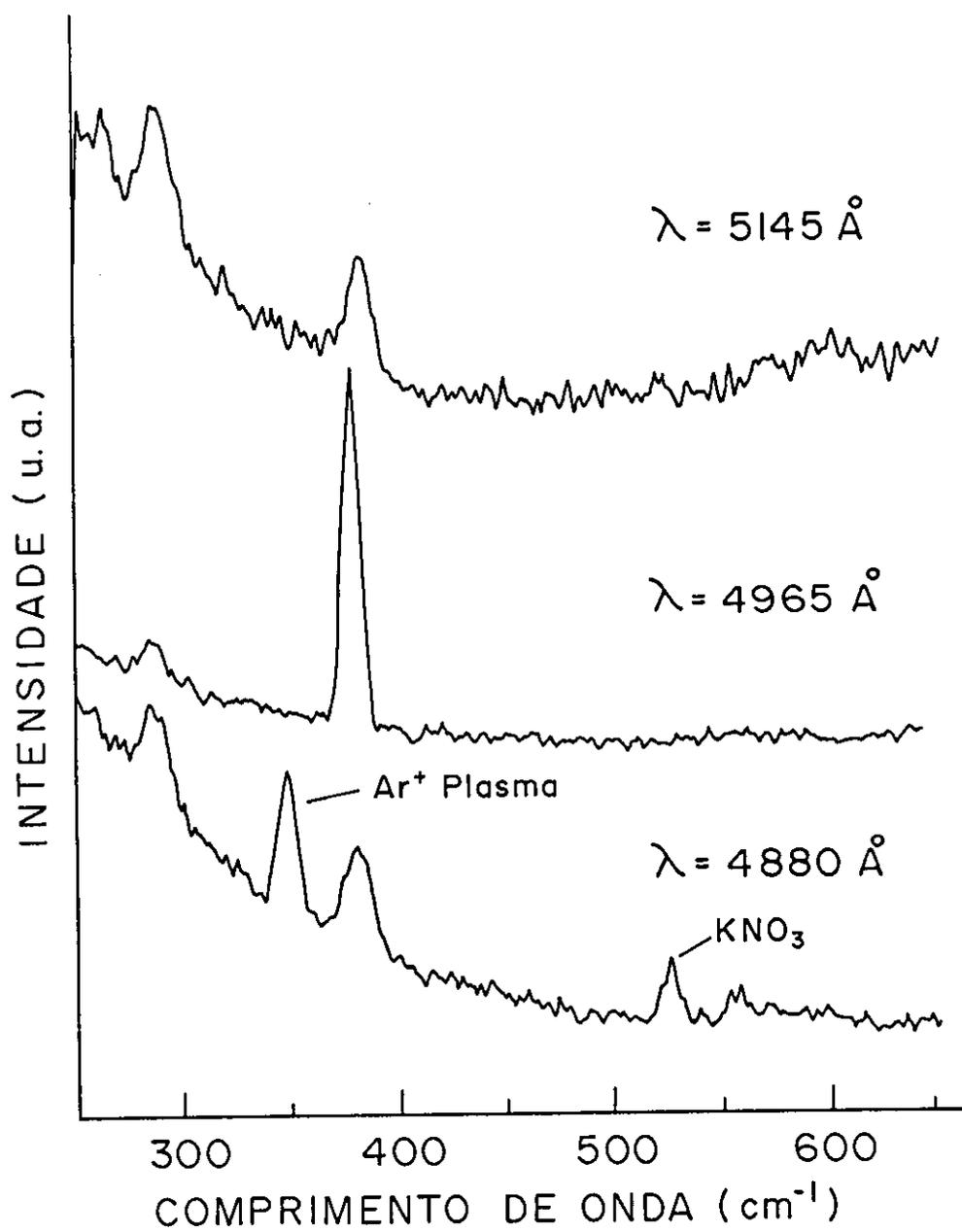


Figura 30- Espectros Raman de Hp.2HCl

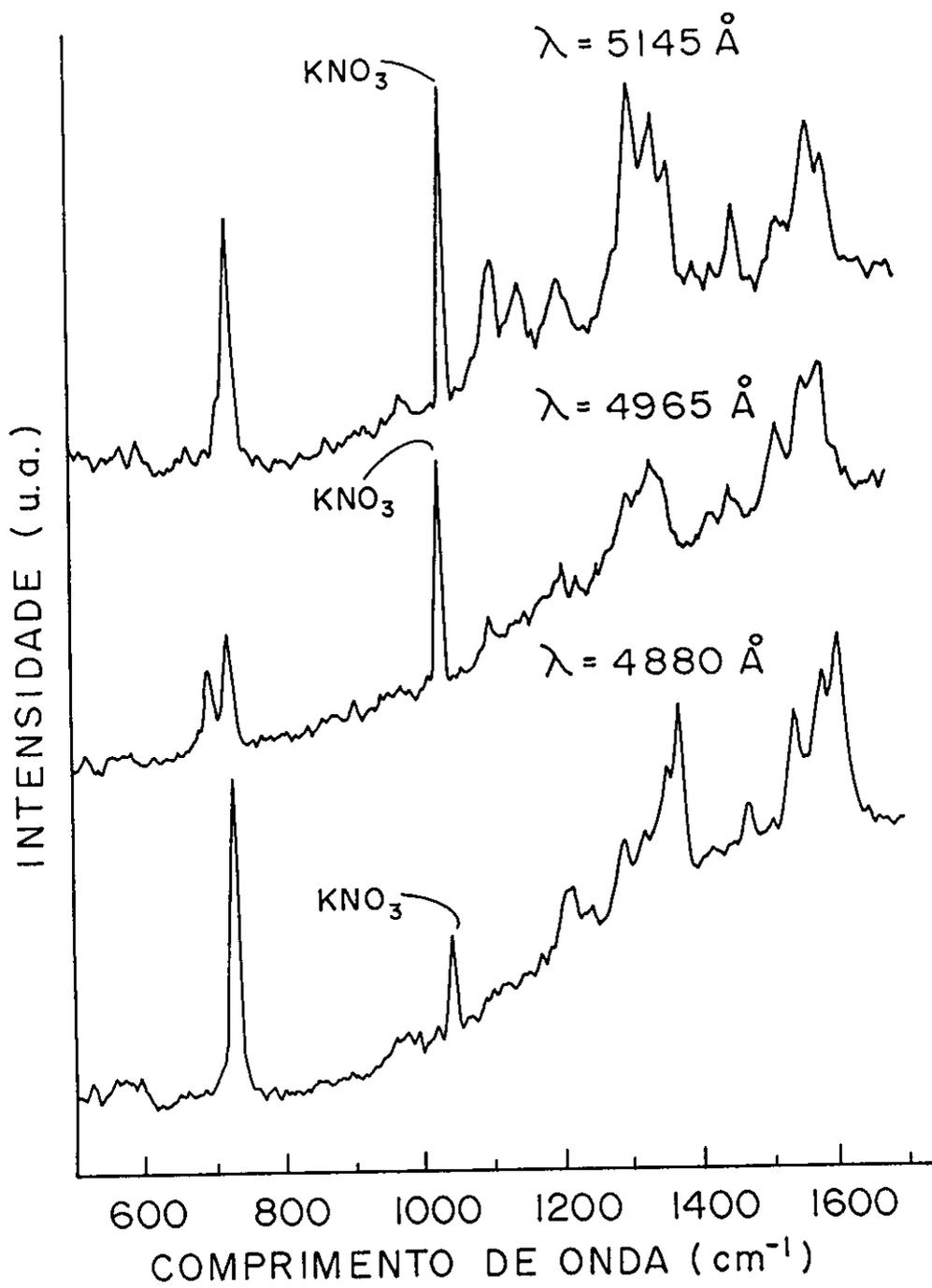


Figura 31- Espectros Raman de Hp.2HCl

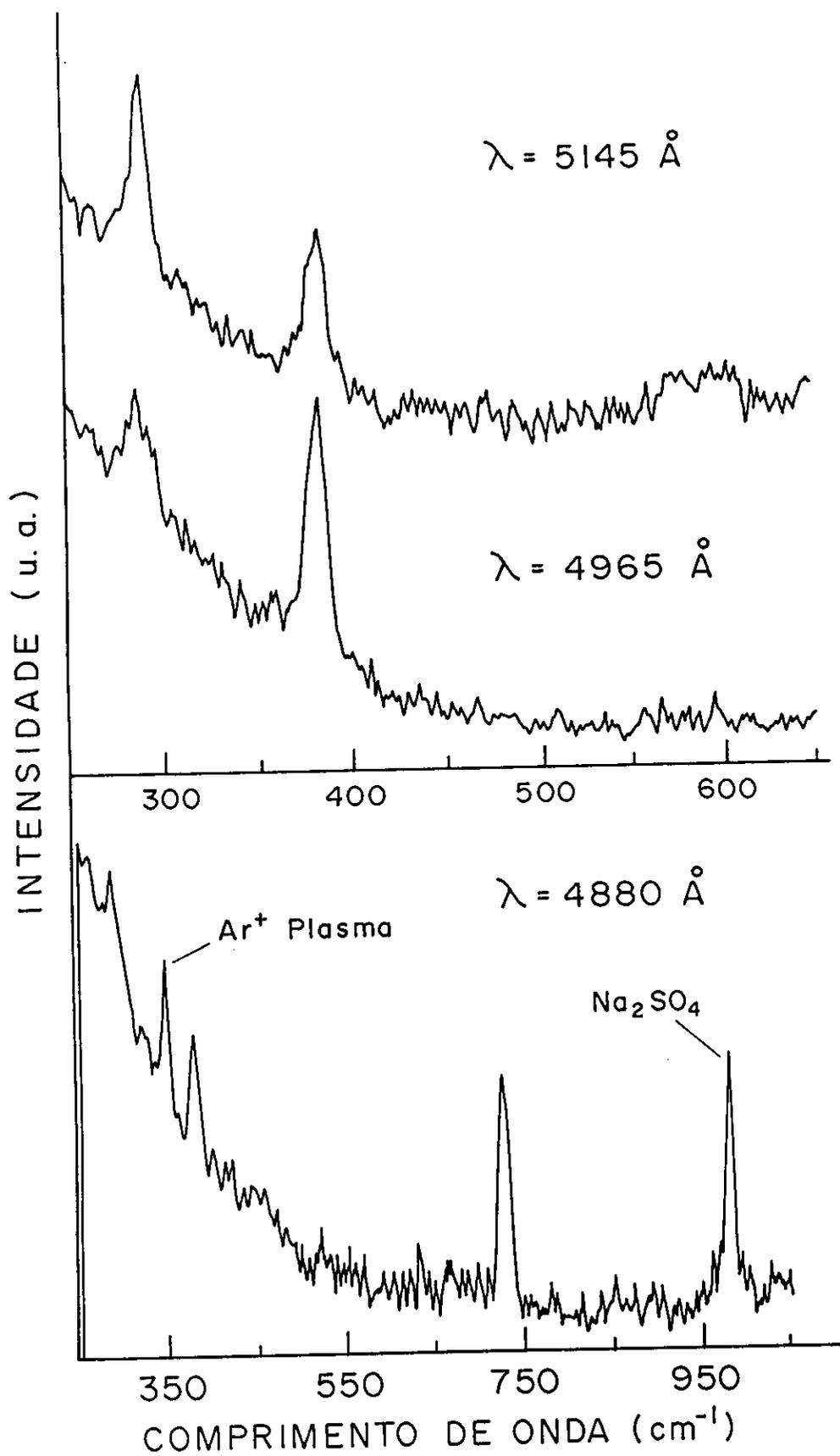


Figura 32- Espectros Raman de Hematoporfirina de base-livre

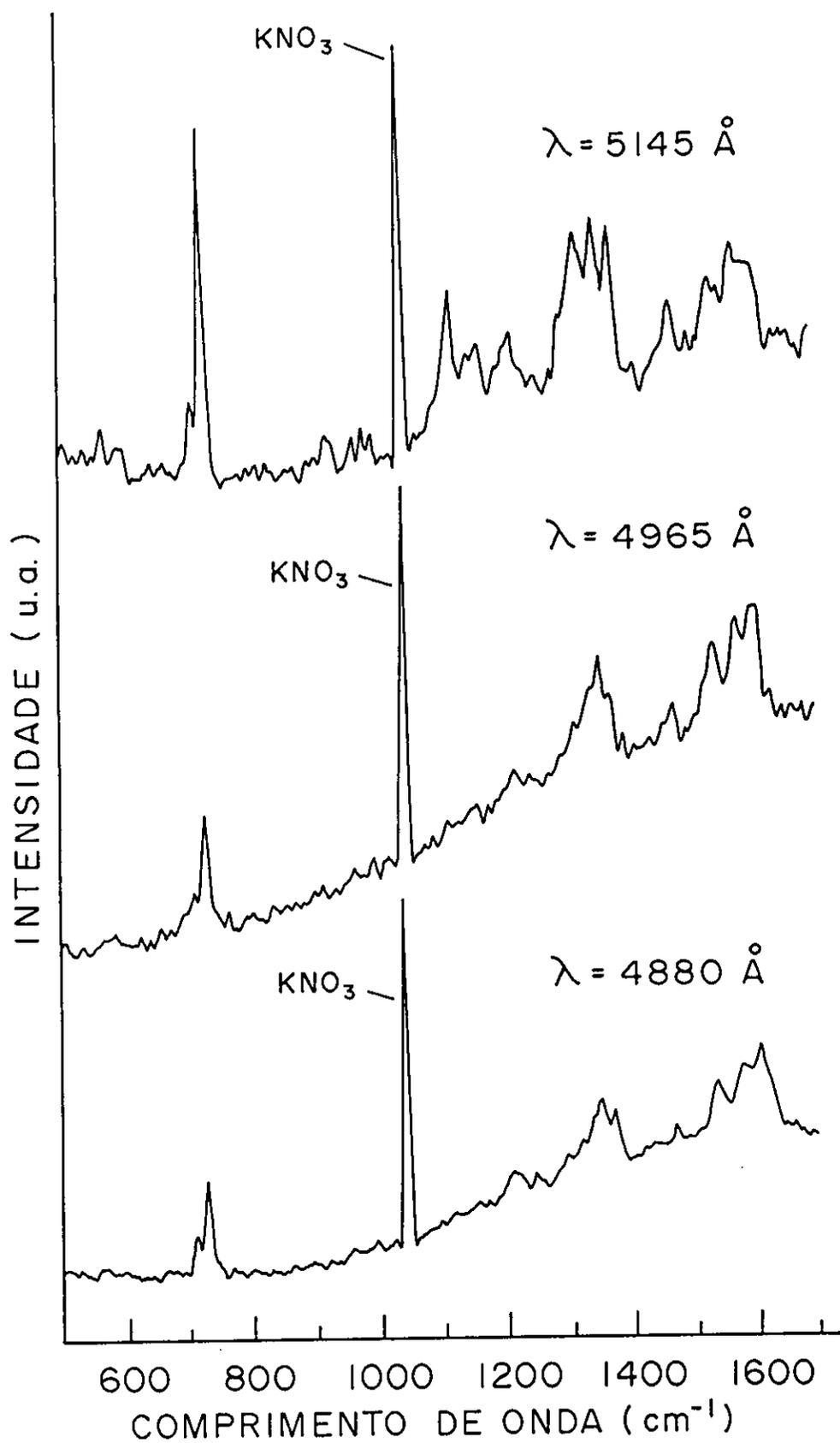


Figura 33- Espectros Raman de Hematoporfirina de base-livre

4.2.2- DISCUSSÃO

O estudo da absorção Infra-Vermelha e espalhamento Raman de metaloporfirinas com simetria molecular D_{4h} já é bem estabelecido, em particular pelo grande interesse que alguns complexos metálicos apresentam na bioquímica dos seres vivos. Entretanto o estudo das porfirinas de base livre com simetria D_{2h} , vem sendo apresentado apenas de forma qualitativa e poucos compostos foram analisados. Estas porfirinas apresentam um espectro de absorção mais complexo que as metaloporfirinas, além de terem fluorescência muito pronunciada, o que implica em dificuldades experimentais na obtenção dos espectros.

Assumindo os substituintes laterais como sendo massas puntuais (vide item 3.3), as porfirinas de base livre com 38 átomos terão 108 modos normais de vibração. A análise de teoria de grupos classifica então:

$$\Gamma_{\text{no plano}} = 19A_g + 18B_{1g} + 18B_{2g} + 18B_{3u}$$

$$\Gamma_{\text{fora do plano}} = 8A_u + 10B_{1u} + 8B_{2g} + 9B_{3g}$$

onde só observaremos os modos simétricos como indica a tabela de caracteres para o grupo D_{2h} (tabela 02).

A natureza e as propriedades eletrônicas dos substituintes laterais que diferenciam as várias porfirinas de base livre entre sí, determinam a perturbação e os deslocamentos nos níveis eletrônicos do cromóforo. Isto também afetará as frequências vibracionais e interações vibracionais entre os diferentes modos. Além disto os substituintes periféricos da hematoporfirina são saturados e não se espera que afetem muito a estrutura eletrônica do cromóforo em

comparação a outras porfirinas de base livre, como por exemplo, a protoporfirina cujos substituintes (A) são $-\text{CH}=\text{CH}_2$.

Algumas bandas Raman serão classificadas empiricamente por comparação a trabalhos publicados de outras porfirinas:

- da porfina de base livre^(48,50), cujos substituintes laterais são todos H e portanto pertence ao grupo D_{2h} (sem que seja necessário fazer nenhuma aproximação)
- da protoporfirina⁽⁵³⁾, cujos radicais R_1 e R_2 são $-\text{CH}=\text{CH}_2$
- do único trabalho conhecido com *hematoporfirina de base livre*

A tabela 04 apresenta os dados que obtivemos para as amostra de hematoporfirina dihidroclorato ($\text{Hp} \cdot 2\text{HCl}$) e a tabela 05 para a hematoporfirina de base livre, com excitação em $\lambda=4880\text{\AA}$ e $\lambda=4965\text{\AA}$ $\lambda=5145\text{\AA}$.

Tabela 04- Deslocamentos Raman (cm^{-1}) para a Hp.2HCl

$\lambda_{\text{exc}} = 4880\text{\AA}$	$\lambda_{\text{exc}} = 4965\text{\AA}$	$\lambda_{\text{exc}} = 5145\text{\AA}$
285	285	285
382	382	382
	595	595
729	729	729
		985
		1123
	1164	1164
1218	1218	1218
1297	1297	1297
1323	1323	1323
1353	1353	1353
1373	1373	1373
1474	1474	1474
1543	1543	1543
1579	1579	1579
		1592
1607	1607	1607
		1687

Tabela 05- Deslocamentos Raman (cm^{-1}) para a HpFb

$\lambda_{\text{exc}} = 4880\text{\AA}$	$\lambda_{\text{exc}} = 4965\text{\AA}$	$\lambda_{\text{exc}} = 5145\text{\AA}$
286	286	286
382	382	382
	598	598
729	729	729
990		990
1117	1117	1117
	1161	1161
1218		1218
		1260
1296	1296	1296
1321	1321	1321
1355	1355	1355
1374	1374	1374
1440	1440	1440
1473	1473	1473
1539	1539	1539
1581	1581	1581
1606	1606	1606

A tabela 06 é um sumário das bandas Raman para as outras porfirinas e nossas medidas.

Tabela 06 - Sumário das bandas Raman obtidas e publicadas.

P	PP	Hp	Hp.2HCl	HpFB
			* 285 *	* 286 *
			* 382 *	* 382 *
	502	502		
		514		
527				
543				
558				
	605	606	598	595
	658			
	670	670		
721				
a .. 736 741 741 729 729
776	771	771		
842		843		
	933	929		
	964	964		
	970			
	986	982	985	
b .. 992 996 996 990
		1004		
		1027		
1046		1046		
	1078			
1085				
	1096			
		1103		
c 1113 1113 1117
1121				
1124			1123	
	1128	1128		
d .. 1162 1158 1167 1160 1164
	1170	1181		
	1209		1218	1218
1224	1228	1229		
	1260	1264	1260	
e .. 1304 1307 1307 1297 1297
	1321	1315		
f .. 1332 1332 1328 1323 1321
f .. 1355 1356 1356 1353 1355
f .. 1366 1367 1366 1373 1374
1422	1424	1424		
				1440
	1472			
g .. 1479 1481 1479 1474 1473
	1514	1516		
h .. 1542 1541 1542 1543 1539
1562	1563	1565		
h .. 1587 1586 1588 1579 1581
		1599	1592	
h 1605 1605 1607 1606
1614	1612	1617		
1643				
1663	1662			
i 1680 1687	

Naturalmente algumas bandas diferem nos diferentes sistemas por várias razões, por exemplo, efeitos cinemáticos envolvendo variações nas massas dos substituintes periféricos, variação na função energia potencial do rearranjo de cargas eletrônicas do macrociclo resultante da natureza doadora ou receptora de elétrons dos substituintes laterais e acoplamento vibracional com os modos do esqueleto e abaixamento na simetria do ciclo devido à colocação assimétrica dos substituintes.

Podemos observar das figuras 30 a 33 que há mudanças marcantes na intensidade relativa de bandas correspondentes através de todo o espectro com diferentes excitações.

Devemos levar em consideração o erro experimental de cada caso. Infelizmente os valores da literatura não contém a faixa de erro nem a resolução dos espectrômetros usados. Um fato que salientamos é que a linha intensa em 729 cm^{-1} presente em ambas amostras estudadas por nós, corresponde à mesma linha, também intensa, mas observada em 741 cm^{-1} por Verma⁽⁵³⁾ e indicado na tabela com (a). Notamos ainda a coincidência das linhas observadas em 990 cm^{-1} , 1117 cm^{-1} , 1164 cm^{-1} , 1297 cm^{-1} , 1473 cm^{-1} e 1687 cm^{-1} , indicados na tabela 06 respectivamente como (b), (c), (d), (e), (g) e (i). Além destas, observamos ainda a coincidência do conjunto de linhas entre 1321 cm^{-1} e 1374 cm^{-1} , marcados na tabela com (f) e outro entre 1539 cm^{-1} e 1606 cm^{-1} marcados com (h).

Embora a natureza dos modos vibracionais do cromóforo seja um problema complicado e difícil, faremos menção à alguns pontos. Como já mencionamos anteriormente, alguns grupos têm vibrações características aproximadamente independentes do meio em que se encontram^(51, 52). Salientaremos apenas as bandas em :

- a banda em 990cm^{-1} possivelmente correspondente à modos de deformação do grupo NH do pirrol,
- a banda em 1164cm^{-1} e 1473cm^{-1} , possivelmente correspondendo à deformação de CH do metil e metileno do pirrol.

Podemos relacionar por inspeção dois modos vibracionais com as oscilações do macrociclo, que são simétricos sobre o eixo C_2 do grupo de pirrois que em geral são sensíveis ao acréscimo de metais e seus ligantes, são:

$$A_{1g} (\approx 1370 \text{ cm}^{-1}) \quad \text{e} \quad B_{1g} (\approx 1620 \text{ cm}^{-1})$$

A_{2g} e B_{2g} são vibrações antissimétricas em relação as eixo C_2 de cada anel pirrólico. Obviamente neste caso as vibrações podem ser influenciadas pelos radicais (A) devido à sua localização. Teremos assim:

A_{2g} entre $\approx 730\text{cm}^{-1}$ e a $\approx 790\text{cm}^{-1}$ e, um modo vibracional ainda superior A_{2g} entre $\approx 990\text{cm}^{-1}$ e $\approx 1160\text{cm}^{-1}$.

Pudemos finalmente observar a presença das linhas indicadas com * na tabela 06, ainda não mencionadas na literatura. São elas 286cm^{-1} e 382cm^{-1} , para a hematóporfirina de base livre como para a Hp.2HCl.

4.3- ESPECTROS DE EMISSÃO EXCITADOS SIMULTANEAMENTE POR DOIS COMPRIMENTOS DE ONDA DIFERENTES

Em complementação aos dados experimentais que obtivemos e discutimos nos capítulos anteriores, investigamos a possibilidade de utilizar a espectroscopia óptica como método de monitoração da terapia fotodinâmica. O sucesso de tal investigação sugere a possibilidade do seu uso durante aplicações terapêuticas em seres humanos.

Para entender a nossa idéia devemos partir do fato que a excitação da hematoporfirina na região ultra-violeta, promove fluorescência intensa (vide ítem 4.1). Neste processo os elétrons do nível energético fundamental, quando excitados, populam um nível energético superior e decaem, emitindo luz. Quando esta mesma amostra for excitada simultaneamente por outro comprimento de onda capaz de provocar absorção a partir do mesmo estado inicial envolvido na fluorescência, podemos afirmar que este novo processo será concorrente com a emissão. Esta excitação ressonante pode ser aquela de interesse para o processo de transferência de energia ao oxigênio e que desencadeia a PDT. Neste caso, uma parte da população do nível energético fundamental estará sendo envolvida no processo de sua transferência para o nível excitado triplete. Este processo faz com que a população do nível fundamental disponível para o processo de fluorescência diminua, diminuindo sua intensidade observável.

Em outra palavras, se estivermos monitorando a fluorescência, excitada pela radiação ultra-violeta, e iniciarmos uma excitação concorrente na região do vermelho,

podemos esperar então uma diminuição da intensidade desta fluorescência.

Com este princípio em mente, iniciamos a preparação do experimento.

4.3.1- DESCRIÇÃO EXPERIMENTAL

Para este experimento utilizamos a amostra 12, de Hematoporfirina.2HCl em solução de TRISMA Base 0,1M. Esta solução foi escolhida por não apresentar a banda de emissão máxima (614,5nm) tão próxima da banda de absorção de menor energia (618,8nm) para a hematoporfirina, além disto esta é a amostra com maior concentração de oxigênio de que dispúnhamos.

Necessitávamos também de duas fontes de excitação, uma no ultra-violeta e outra na região do vermelho. A utilização de lâmpadas e filtros que nos fornecessem os comprimentos de onda apropriados se mostrou inadequada basicamente pelas dificuldades de focalização necessariamente coincidente dentro da amostra. Decidimos usar um laser de Argônio com óptica especial para emissão no ultra-violeta. Esta foi uma etapa árdua, uma vez que os lasers disponíveis no Instituto de Física da Unicamp têm tubos velhos e não emitem potência maior que 4 watts em multilinha na região do visível (esta é uma das condições para obtenção do ultra-violeta). Em três diferentes lasers de Argônio Spectra Physics, realizamos todo o processo de limpeza e alinhamento dos espelhos e tubo, otimizando os parâmetros de corrente e campo magnético, assim como o fornecimento de jato de nitrogênio na vizinhança dos espelhos na cavidade (para evitar a rápida deposição de

compostos orgânicos provocada pela radiação ultra-violeta). a máxima potência obtida foi de 10mW, mas em condições de trabalho e após o funcionamento por alguns minutos, a potência caiu a zero.

O problema foi resolvido com a chegada e instalação de um laser de Argônio Spectra Physics de 25W, adquirido pelo Grupo de Propriedades Ópticas do Instituto de Física/UNICAMP, cuja emissão na região ultra-violeta (após realização dos passos descritos para os outros lasers) atingiu 7W.

Para obtenção de emissão na região do vermelho, decidimos utilizar um laser de corante, com Rodamina 6G, bombeado por um laser de Argônio, pertencentes ao nosso grupo. As dificuldades iniciais recaíram principalmente no fato de que este laser de Argônio não emite um modo TEM_{00} , mas um modo de ordem superior, ficando sua focalização no jato de rodamina muito prejudicada. Além disto, alguns elementos da óptica do laser de corante não estavam em bom estado de conservação. Desta forma se fez necessária a utilização da óptica de outro laser de Argônio, ambos do Grupo de Propriedades Ópticas do IFGW.

Como fonte de excitação utilizamos então um laser de Argônio (I) Spectra Physics, modelo 2045E com óptica especial para emissão na região do ultra-violeta em multilinha entre 333,6nm e 363,8nm. A outra fonte de excitação foi um laser de Argônio (II) Spectra Physics, modelo 2025 emitindo em multilinha entre 488nm e 514,5nm, bombeando um laser de corante Coherent Radiation, modelo 490. O corante usado foi uma solução de metanol, etilenoglicol e Rhodamina 6G, Kodak, preparada de acordo com instruções do manual do laser de corante. Quando

este laser é bombeado com potência de 4W pelo laser de argônio (II) ele emite entre 590nm e 625nm, e um filtro birrefringente colocado no interior da cavidade permite a escolha de uma linha específica dentro deste intervalo.

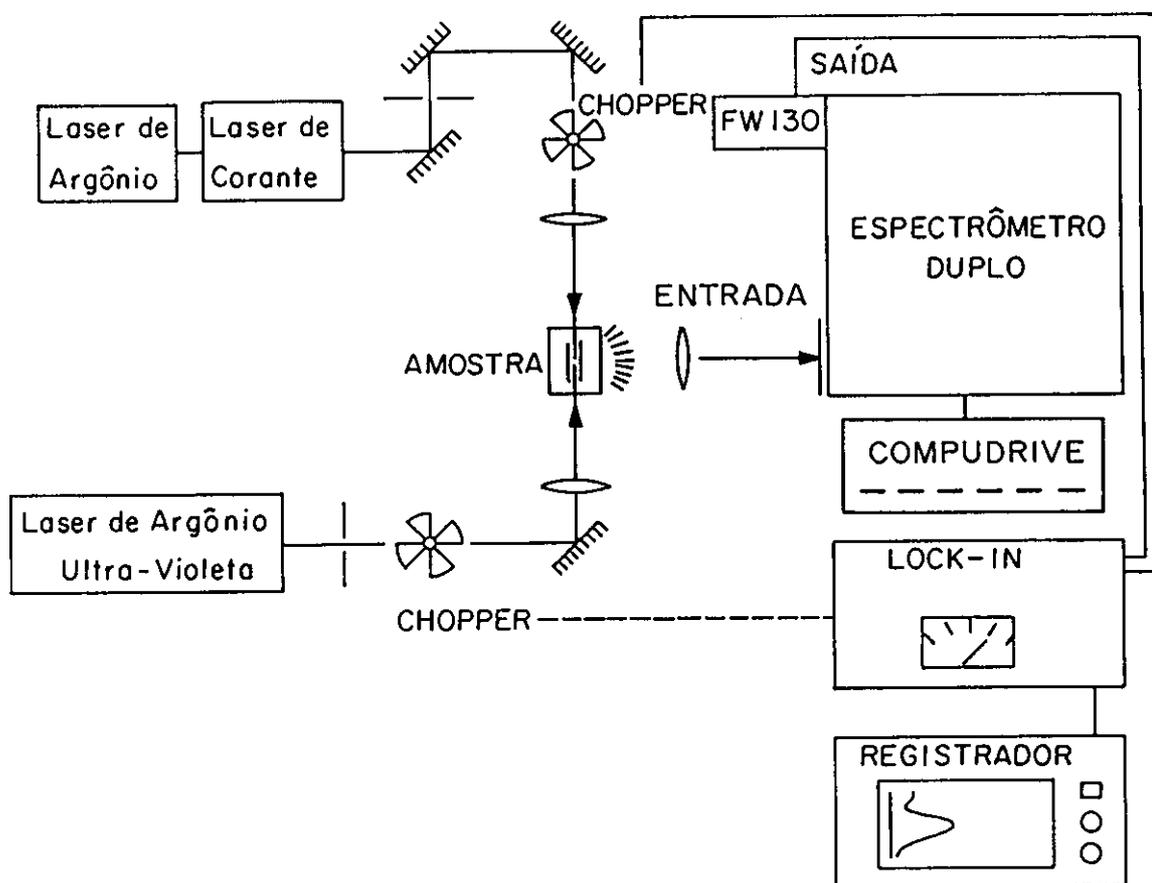


Fig. 34 - Diagrama simplificado da montagem experimental.

Na figura 34 podemos observar a montagem experimental, que além das fontes de excitação mencionadas acima contém o sistema de detecção e registro dos dados. Na amostra incidem os dois feixes laser e o sinal é observado a 90° por um espectrômetro duplo Spex, modelo 1401, com altura de fenda de 0,2mm, acoplado a uma fotomultiplicadora RCA, modelo FW-130. O amplificador Lock-in Princeton Applied Research, modelo 124A, foi conectado com o Chopper Stanford Research System, modelo SR540, e ao registrador X-t, Hewlett Packard, modelo 7100BM/17505A.

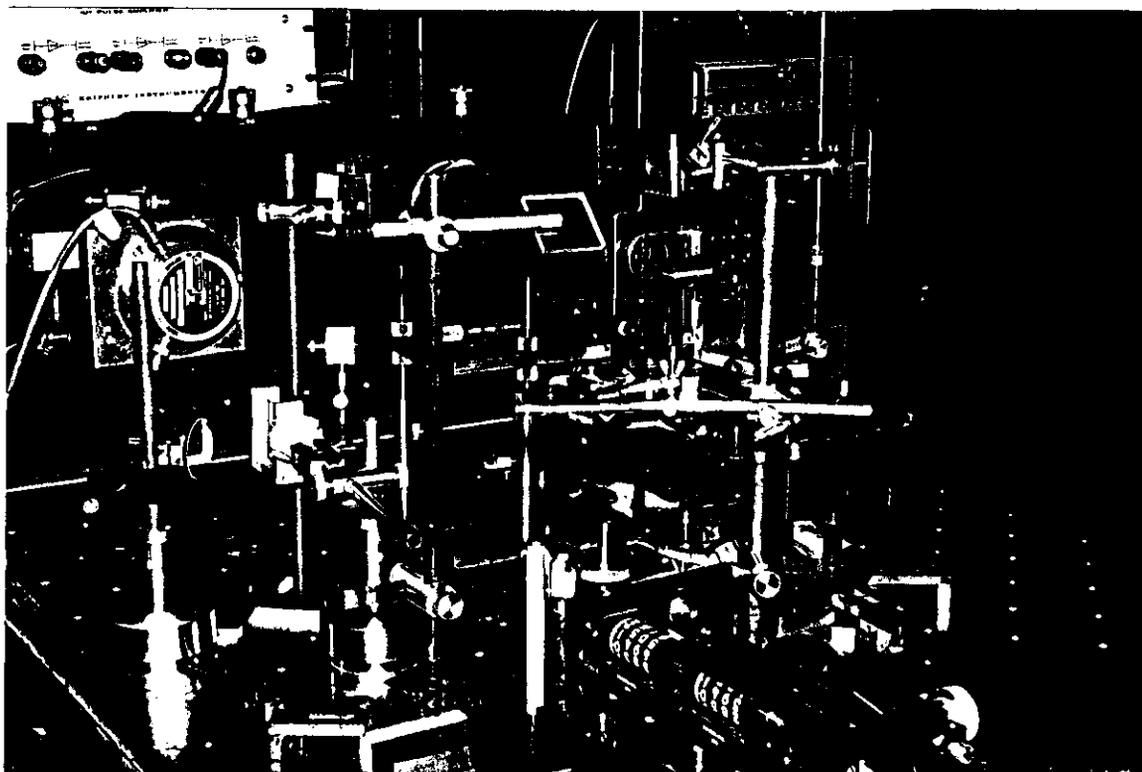


Foto 01 - Visão geral da montagem experimental.

A foto 1 dá uma visão geral da montagem e a foto 2 mostra um detalhe da cubeta com amostra durante o experimento.

Todo o processo de montagem e tomada de dados deste ítem foram acompanhados e auxiliados pelo prof. Geraldo Ferreira Mendes do IFGW.



Foto 02 - Detalhe da cubeta com a amostra durante o experimento.

Uma vez ajustados todos os parâmetros de medidas como potência dos feixes de lasers antes e depois da amostra, alinhamento dos elementos do caminho óptico, coincidência dos focos e posição dos feixes dentro da amostra e alinhamento desta imagem com o espectrômetro, chegamos à condição de reprodutividade para obtenção dos espectros.

Em todos os espectros utilizamos potências de excitação baixas para evitar deterioração da amostra. A medida destas potências após a amostra foi da ordem de 0,1mW. No lock-in trabalhamos com sensibilidade de 2mV; frequência do chopper = 1000 Hz, tempo de integração = 1s, PSD normal e Band Pass. O espectrômetro foi ajustado para varrer 5 cm⁻¹/s com altura de fenda de 0,2mm e slits em 200/400/200µm.

4.3.2 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas medidas iniciais, apesar de termos assegurada a reprodutividade dos espectros, não observamos a diminuição esperada na intensidade da fluorescência.

A figura 35 apresenta os espectros de fluorescência obtidos em (a) excitação apenas com ultra-violeta (b) excitação simultânea com ultra-violeta (334 < λ < 364 nm) proveniente do laser de Argônio e $\lambda = 618,8\text{nm}$ proveniente do laser de corante. Não há variação mensurável neste caso e nem nos casos similares, onde variamos os parâmetros das medidas e que não apresentamos nesta tese.

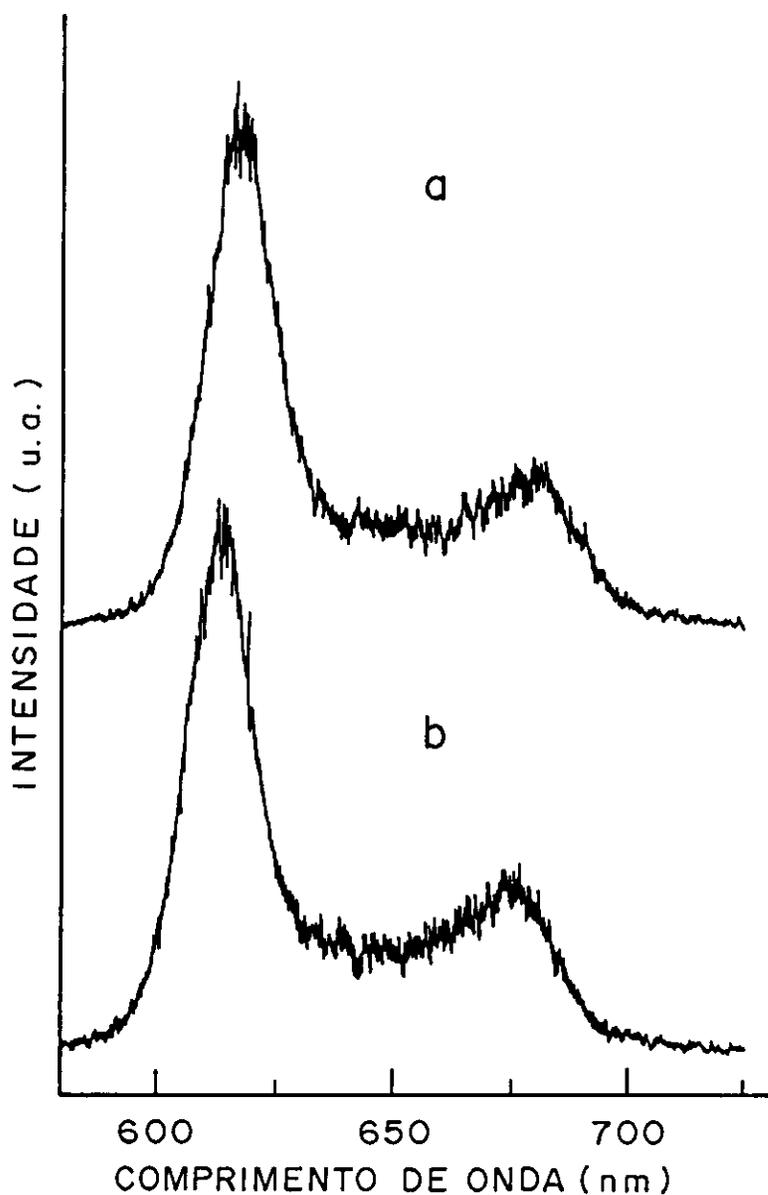


Figura 35- Espectros de fluorescência da amostra 12, picos em $\lambda \approx 614,5$ nm e $\lambda \approx 675$ nm.

(a) Excitação só com ultra-violeta

(b) Excitações com ultravioleta e $\lambda = 618,8$ nm

Entre o registro de cada família de espectros, a amostra ficou exposta aos dois feixes de excitação, principalmente para um ajuste fino de alinhamento.

Depois de uma longa exposição observamos o aparecimento de uma nova banda de fluorescência como mostra a figura 36.

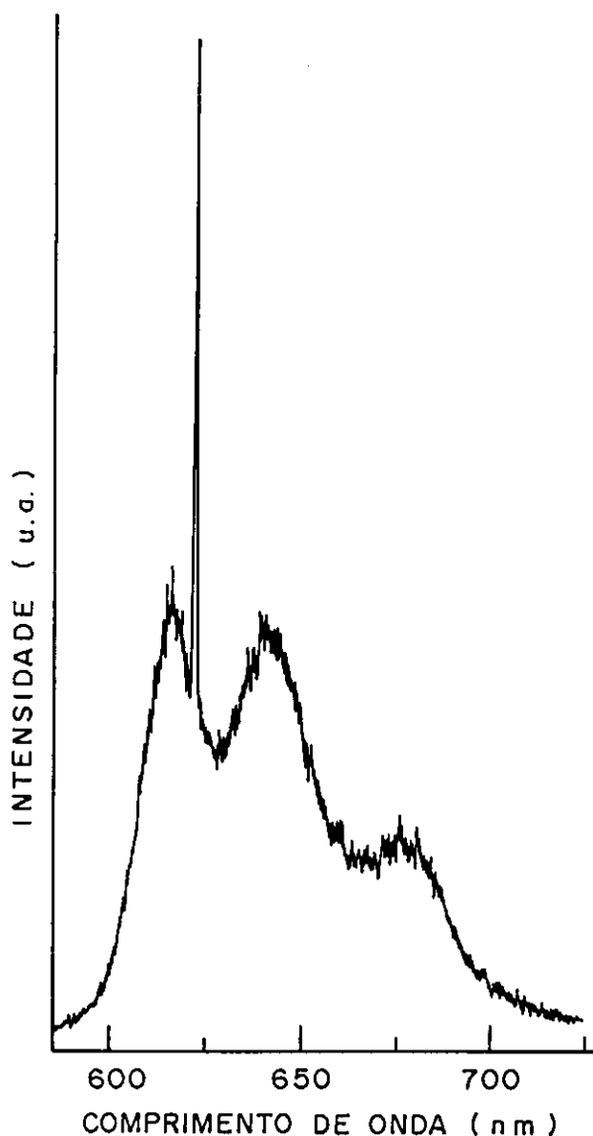


Fig. 36 - Espectro de fluorescência da amostra 12 após longa exposição aos feixes laser. Aparecimento de uma nova banda na região de $\lambda \approx 640$ nm.

Esta nova banda de emissão aparece na região de $\lambda \approx 640$ nm e também foi observada na literatura⁽³⁹⁻⁴⁷⁾ e parece que sua intensidade aumenta com a quantidade de agregados em equilíbrio. Para os experimentos de medida de tempo de decaimento de fluorescência esta banda mostra um decaimento mais rápido em relação ao monômero^(44,45). O aparecimento desta banda de emissão parece estar correlacionado com fotoprocessos irreversíveis levando a fotoprodutos fluorescentes (dímeros ou oligômeros covalentes ligados). Outros estudos ainda mostram a presença desta banda em células malignas com hematoporfirina indicando que os fotoprodutos fluorescentes podem ser formados também "in vivo"⁽⁴⁶⁾. O fato de que estes produtos são mais abundantes em células malignas que em células normais é interpretado também em termos do alto grau de acumulação de hematoporfirina neste tipo de tecido.

O fotoproduto é muito estável (já que esta banda não desaparece) e sua formação depende da presença de oxigênio, da densidade de potência de irradiação e da concentração de hematoporfirina como monômero. Como a cinética de formação de fotoprodutos é muito complexa, sua estrutura química é até agora desconhecida.

Tentamos então uma nova técnica de medida. Deixando o espectrômetro parado e registrando dados na região de máxima intensidade de fluorescência e em intervalos de tempo repetidos (7min) fizemos a incidência coincidente de comprimento de onda na região do vermelho. O resultado está representado na figura 37, onde registramos também a potência da laser de corante antes da amostra. Neste caso podemos observar que realmente há uma diminuição de intensidade de fluorescência, mas que a mesma

não é imediata.

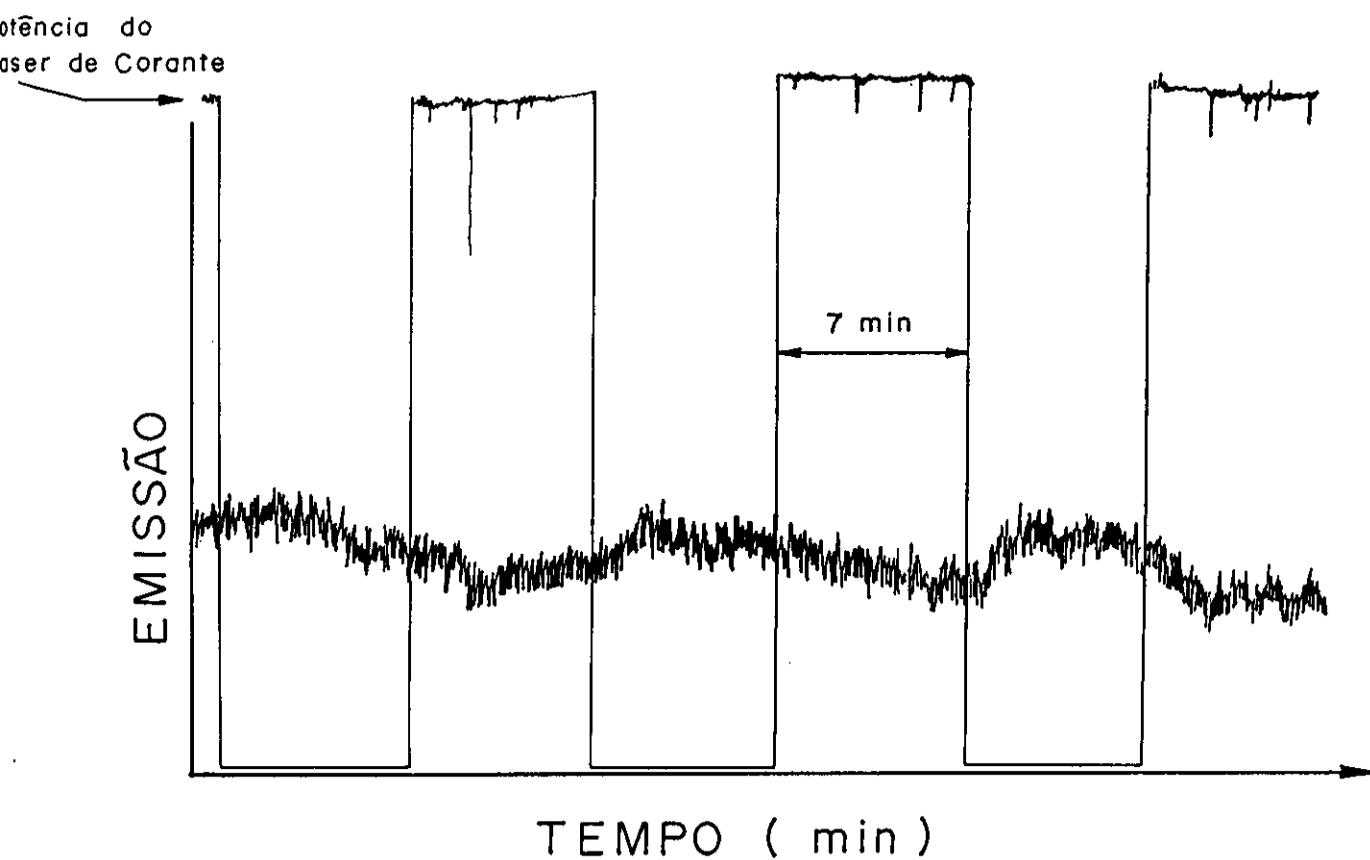


Figura 37- Intensidade de Fluorescência com o tempo, na região de comprimento de onda de máxima intensidade fluorescente ($\lambda = 614,5\text{nm}$) amostra 12 .

A figura 37 está dividida em intervalos, onde observamos sempre um sinal ruidoso. Nos intervalos (a), (c) e (e), a fonte de excitação foi apenas o ultra-violeta, e nos intervalos (b), (d) e (f), as duas fontes de excitação estavam presentes. Podemos observar uma diminuição lenta do sinal após o início da dupla excitação, que atribuímos à fase de transferência de energia para o oxigênio e consequente formação de oxigênio singlete. Devemos ter em mente que o processo de desexcitação do oxigênio não é um processo rápido, já que a transição para o estado fundamental triplete é proibida.

Consideramos portanto que durante estes intervalos de dupla excitação, ocorre uma formação progressiva de oxigênio singlete e que durante o intervalo de interrupção da irradiação do laser de corante, uma certa quantidade de oxigênio singlete ainda continuará existindo. De forma qualitativa podemos fazer uma analogia deste resultado com o de Tromberg⁽²⁴⁾, já comentado no item 2.3.1. e representado na figura 38.

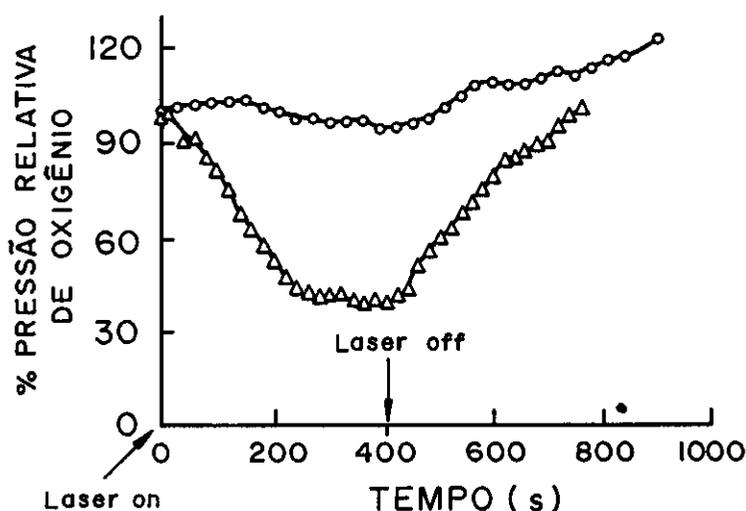


Figura 38- Pressão relativa de oxigênio de tecido normal sem^O e com^Δ hematoporfirina irradiados no vermelho. ⁽²⁴⁾

A figura 38 representa a medida da pressão relativa de oxigênio em tecido normal incorporado com hematoporfirina e irradiado com $\lambda = 630\text{nm}$, onde se observa uma diminuição da pressão durante o período em que a irradiação vermelha é feita. Esta diminuição é atribuída ao consumo de oxigênio singlete formado que reagirá com o meio. Quando a irradiação é interrompida, a vascularização coloca à disposição nova quantidade de oxigênio, que pode ser consumido caso haja nova irradiação [figura 9(b) cap. II].

Nosso sistema não sendo de tecido vivo, não consumirá o oxigênio singlete formado, nem terá novo fornecimento de oxigênio triplete e deverá portanto usar apenas aquelas moléculas presentes na solução. O que estamos supondo então se resume simplesmente no fato de que em nosso experimento ocorre a formação do oxigênio singlete e que uma parte deste ainda subsiste no próximo intervalo de excitação, fazendo com que a intensidade de fluorescência retorne ao nível médio anterior mais lentamente.

Podemos desta forma correlacionar o caráter *cíclico* de nossa medida com aquela observada na figura 9(b), e dizer são resultados concordantes.

Este resultado nos leva a crer portanto que a medida da intensidade de fluorescência provocada pela radiação ultra-violeta feita simultaneamente ao tratamento da PDT (irradiação com $\lambda \approx 630\text{ nm}$) pode ser usada como método de avaliação da eficiência na produção de oxigênio singlete.

CAPITULO V

OTIMIZAÇÃO DA TERAPIA PELA ADEQUAÇÃO DA PRESSÃO PARCIAL DE
OXIGÊNIO

Pela conclusão do capítulo II ficou claro que o oxigênio desempenha importante papel no processo da PDT. É óbvio que, tratando-se de tecidos vivos, não podemos esperar que o aumento indefinido da densidade de oxigênio propicie um aumento indefinido na eficiência do processo. É intuitivo que deverá existir uma função densidade de oxigênio com um máximo próximo ao valor da densidade normalmente encontrada nos tecidos.

Em técnicas como a de Radioterapia de Câncer, a associação de Oxigênio Hiperbárico mostra efeitos que facilitam o tratamento radioterápico. Este assunto é relativamente bem estudado e nos deu margem para elaborar o modelo que segue.

5.1-CONDIÇÕES DE OXIGENAÇÃO EM TECIDOS NORMAIS E TUMORAIS

Muito frequentemente a vascularização tumoral tem morfologia anormal, i.e., irregular e inadequada, o que faz com que estes tecidos apresentem regiões hipóxicas ou anóxicas localizadas mais distantes dos capilares, tal que a difusão de oxigênio através destes é inteiramente consumida pelas células intermediárias. Na figura 38 representamos um modelo da vascularização tumoral descrita acima.

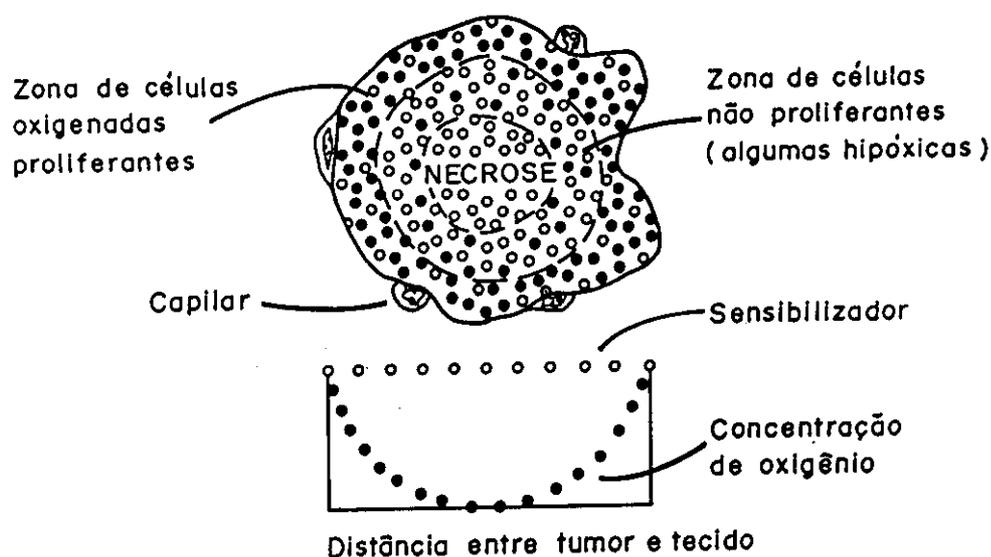


Figura 39- Modelo de vascularização tumoral⁽⁵⁴⁾

Uma grande parte do oxigênio transportado pelo sangue está ligado à hemoglobina dos eritrócitos e uma pequena fração é transportada pelo plasma pois o O_2 é muito pouco solúvel em soluções aquosas. A $\bar{p}O_2$ nos espaços aéreos dos pulmões é cerca de 100 mm Hg e nesta pressão a hemoglobina está 97% saturada com O_2 . À medida que o sangue atravessa os capilares do tecido o O_2 é liberado por uma mudança conformacional da hemoglobina, (depois da qual ela capta CO_2 e H^+ dos tecidos para os pulmões), passa para o plasma sanguíneo e então penetra nas células difundindo-se através das paredes dos capilares.

Como podemos observar da figura 40, a curva de saturação de hemoglobina com O_2 é profundamente influenciada pela concentração de CO_2 e pelo pH do meio.

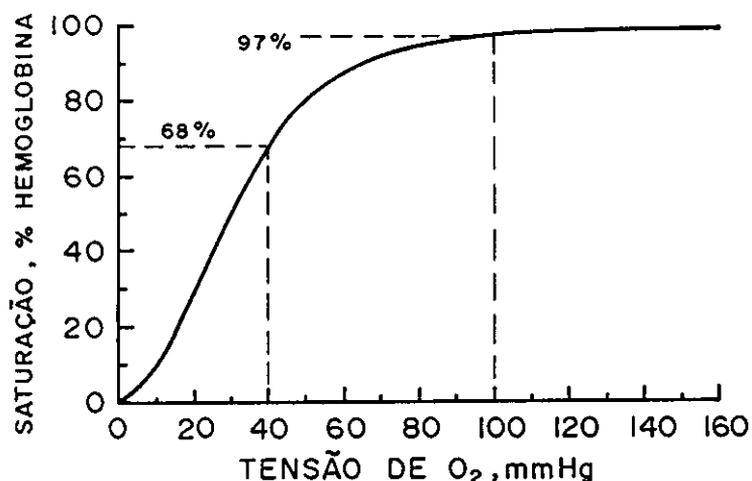


Figura 40- Curva de Saturação da hemoglobina com oxigênio

Desta forma a concentração de O₂ dissolvido nas paredes dos capilares determina a taxa de difusão no tecido vizinho. Não é possível manter um alto nível de O₂ dissociado nos capilares meramente aumentando a saturação de O₂ da hemoglobina por mais 3%, uma vez que este O₂ só será liberado quando $\bar{p}O_2$ do plasma cair de acordo com a curva de dissociação da oxihemoglobina. Assim, para aumentar a taxa de difusão, praticamente todo O₂ consumido pelos tecidos deve vir do O₂ dissolvido no plasma nos capilares arteriais, pois ao manter alta a concentração de O₂ dissolvido ao longo de todo o comprimento dos capilares, as hemoglobinas não podem liberar seus O₂ ligados e sairão destes praticamente saturadas.

Saber a quanto deve ser aumentada a taxa de difusão de O₂ para eliminar regiões hipóxicas ou anóxicas, depende da distância máxima entre capilares e portanto a microestrutura do tumor. Não podemos discutir aqui totalmente estes aspectos, mas

podemos fazer algumas abstrações estatísticas e avaliar qualitativamente o problema.

A grosso modo, em tecidos normais poderíamos considerar a taxa de difusão como sendo:

$$R \propto \sqrt{\frac{D C}{K}}, \text{ onde}$$

D = coeficiente de difusão

C = concentração de O_2 no plasma

K = consumo de O_2 /g de tecido

pO_2 arterial = 100 mm Hg

pO_2 venoso = 40

pO_2 nos capilares é 70 mm Hg

Assim para triplicar a taxa de difusão R, a concentração de O_2 nas paredes dos capilares deve ser aumentada de um fator nove, ie, $70 \times 9 = \bar{p}O_{2 \text{ capilares}} = 630 \text{ mm Hg}$.

A constante de difusão para o O_2 em tecidos neoplásicos não difere daquela para tecidos normais com conteúdo similar de água⁽⁵⁵⁾; a respiração de células malignas parece ser similar a de células normais. As diferenças devem ser atribuídas principalmente aos diferentes arranjos dos vasos nutritivos.

É claro que condições fisiológicas e individuais alteram a forma da curva de dissociação, mas pelo menos qualitativamente podemos fazer as seguintes considerações:

Com 14mg de hemoglobinas por 100ml de sangue, o oxigênio se ligará à hemoglobina quando esta estiver completamente saturada e teremos então 18,7 ml de oxigênio ligado por 100ml de sangue. Assim o oxigênio dissolvido no

sangue com $p[O_2] = 100\text{mmHg}$ será de $0,3\text{ml}/100\text{ml}$ de sangue. Em 1atm de ar, através dos valores das concentrações de oxigênio na entrada e saídas dos capilares podemos obter um valor estimativo do consumo de oxigênio.

$$\text{Entrada } 0,97 \times 18,7 = 18,1 + 0,3 = 19,4 \text{ ml } O_2$$

$$\text{Saída } 0,68 \times 18,7 = 12,7 + 0,12 = 12,82 \text{ ml } O_2$$

$$= \text{consumo de } \approx 5,6 \text{ ml } O_2 / 100 \text{ ml de sangue}$$

Tabela 07- Importância do oxigênio dissolvido e ligado na demanda metabólica em diferentes valores de pressão arterial de oxigênio

Entrada dos capilares			Saída dos capilares			O ₂ utilizado		
pO ₂ sangue	O ₂		pO ₂ sangue	O ₂		Total	Dissol	
mmHg	ml/100ml	Hmog.	mmHg	ml/100l	Hmog.	ml/100ml	sol.	Hmog.
100	0,3	18,1	40	0,12	12,7	5,6	0,18	5,4
200	0,6	18,5	42	0,13	13,4	5,6	0,5	5,1
300	0,9	18,6	44	0,14	13,8	5,6	0,8	4,8
760	2,3	18,7	51	0,15	15,2	5,6	2,1	3,5
1520	4,6	18,7	78	0,23	17,5	5,6	4,4	1,2
1850	5,6	18,7	120	0,36	18,3	5,6	5,24	0,36
2280	6,9	18,7	430	1,3	18,7	5,6	5,24	0
3040	9,1	18,7	1170	3,5	18,7	5,6	5,6	0

Assumindo que o consumo de O₂ e a taxa de fluxo sanguíneo permaneçam invariáveis, para respirar O₂ sobre pressão até 2 atm não há O₂ suficientemente estocado em solução que supra toda a demanda e ainda capaz de deixar O₂ extra. Isto só ocorre quando o sangue arterial é saturado com O₂ a uma

pressão de aproximadamente 3 atm ou maior.

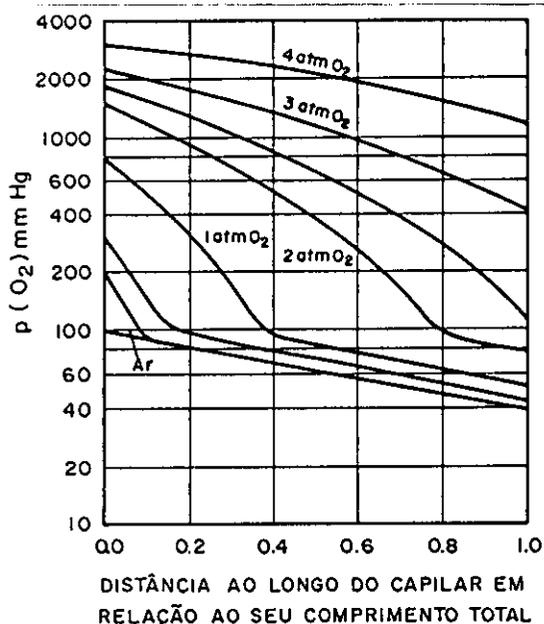


Figura 41- Pressão teórica de oxigênio ao longo de um capilar ⁽⁵⁶⁾

Ao longo de um capilar isolado, um cálculo teórico de Innes ⁽⁵⁶⁾ representado pelo gráfico da figura 41, mostra os vários valores da pO_2 na entrada dos capilares e a mudança de pressão ao longo do mesmo. Inicialmente a queda é rápida, uma vez que todo fluxo de saída através das paredes dos capilares tem que vir do O_2 mantido em solução.

Quando pO_2 cair para 100 mm Hg, o efeito de "tamponamento" da dissociação de oxihemoglobina se torna aparente e a subsequente queda na pO_2 ao longo do capilar é muito mais lenta. (neste caso a oxihemoglobina vai liberando O_2 ao longo do vaso).

Para valores pO_2 acima de 2.000 mm Hg, a oxihemoglobina não é mais requisitada e a hemoglobina permanece " virtualmente" saturada através de todo o comprimento do

capilar.

Capilares reais não são isolados em uma massa infinita de tecido e assim o aumento da saída de O_2 devido ao aumento do raio de difusão dependerá da separação entre capilares adjacentes. Portanto o aumento na saída de O_2 dependerá de todo o padrão vascular do tumor particular, que é função também da localização do tumor: Subcutâneo ou intramuscular.

5.1.1-AVALIAÇÃO QUANTITATIVA EM TECIDOS

Estudos "in situ" (Carcinosarcoma DS implantados em rim de ratos onde as medidas de pressões locais de O_2 foram feitas com técnicas de microeletrodo- O_2 de ouro⁽⁵⁷⁾) mostram que pO_2 no tecido tumoral depende do peso do tumor (em diminuição logarítmica) e apresenta valores muito baixos em relação direta com a idade do tumor.

As pO_2 no tecido diminuem com o aumento da distância dos capilares e dos terminais capilares arteriais para os venosos.

Em tecidos normais a distribuição de frequências apresenta fortes variações para altas pO_2 , enquanto que para tumores sólidos esta distribuição está deslocada para a esquerda, como apresentado no histograma da figura 42 e traçado na figura 43 ⁽⁵⁷⁾.

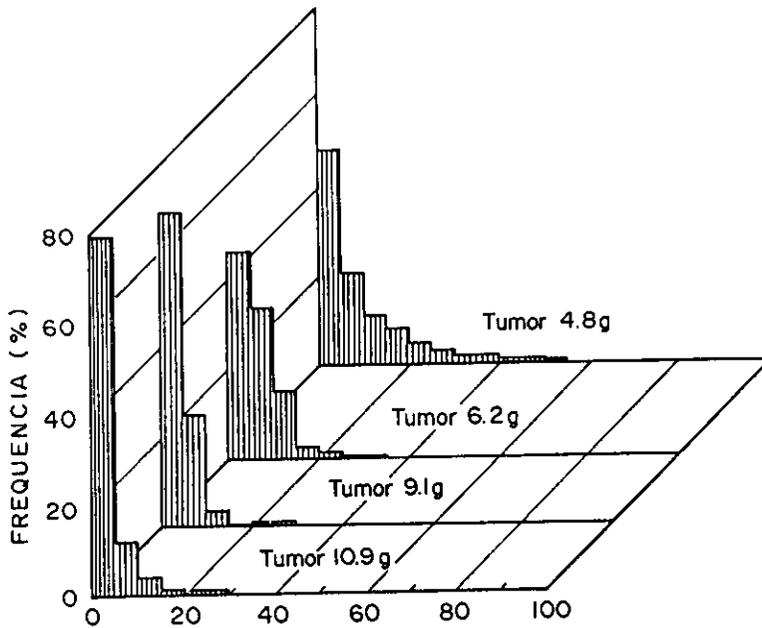


Figura 42- Distribuição de frequência da pO_2 em tumores de diferentes idades. ⁽⁵⁷⁾

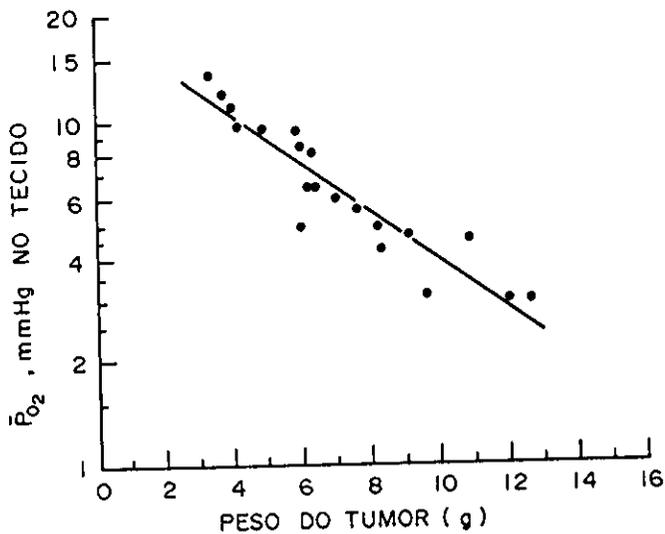


Figura 43- Dependência da pressão média de oxigênio no tecido tumoral em relação à massa. ⁽⁵⁷⁾

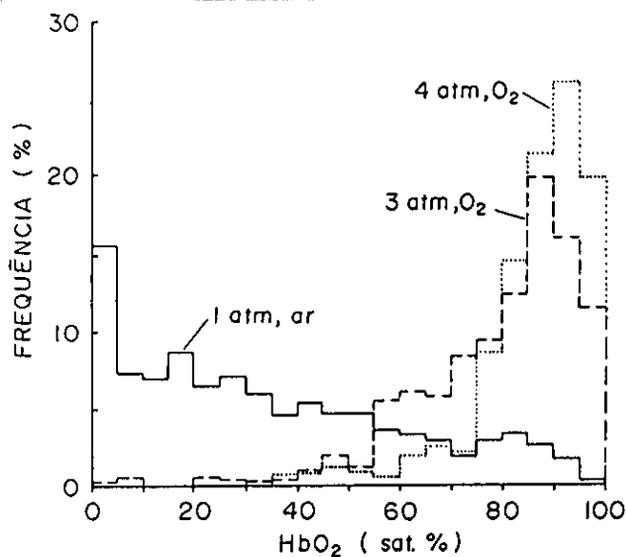
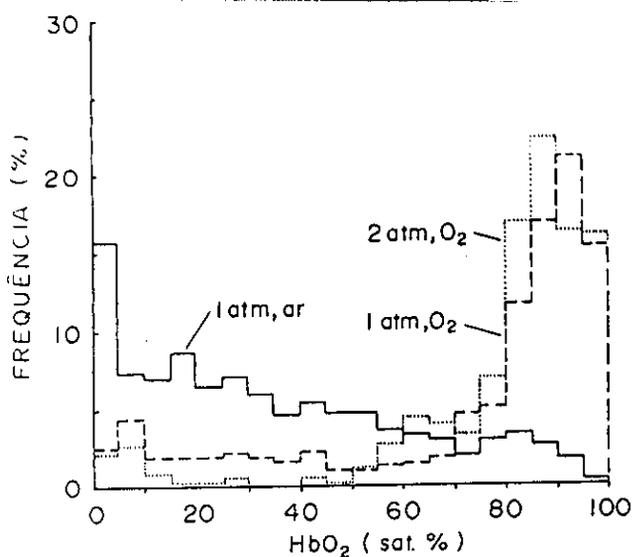
Com o crescimento do tumor a pO_2 no tecido cai exponencialmente (figura 43). Este estudo mostra que pO_2 no tecido tumoral está abaixo de um limite crítico, tal que a atividade de enzimas respiratórias é reduzida. Assim, o consumo de O_2 nestas regiões não depende somente do complemento de enzimas respiratórias como também das condições de transporte de O_2 no tecido (capilarização).

Examinando as condições de fornecimento de O_2 em D-S Carcinosarcoma, observa-se que as células na vizinhança direta dos capilares tem uma taxa de consumo de O_2 relativamente alta, causando uma diminuição aguda na pressão, tal que em células mais distantes somente baixas pO_2 são encontradas.

Para tumores com massa de até 3,5g todo o tecido está oxigenado; para massas de 6,0g, 5% do tecido tem deficiência de O_2 e para 11g, 50% do tecido tem deficiência de O_2 .

5.2.2-AVALIAÇÃO QUALITATIVA

A curva de distribuição de freqüências dos valores de saturação de oxihemoglobina esta estreitamente correlacionada com a correspondente distribuição dos valores de PO_2 nos tecidos, como podemos observar pelas figuras 44⁽⁵⁵⁾ abaixo.



Figuras 44- Curvas de distribuição de frequência de valores de saturação de oxihemoglobina em ratos respirando ar à 1 atm, oxigênio puro à 1, 2, 3 ou 4 atms.⁽⁵⁵⁾

Todas as curvas da figura 44 mostram que respirar O_2 a pressões maiores do que 1 atm levam a uma frequência de ocorrência de oxihemoglobinas saturadas muito maior maior.

Em 4 atm de O_2 puro, nenhum valor de saturação de oxihemoglobina menor que 35% foi encontrado. Assumindo este valor como representando a saturação mais baixa de oxihemoglobina nos terminais venosos dos capilares do tumor, a PO_2 intracapilar correspondente é 38 mmHg.

Se a distância intercapilar não for maior que 125-130 μm , a pO_2 não cai mais do que 3 mmHg. Uma vez que as distâncias intercapilares determinadas histologicamente são muito menores, pO_2 é provavelmente maior que 3mmHg à 4 atm.

Mostramos assim que oxigênio hiperbárico é uma eficiente ferramenta para aumentar o fornecimento de O_2 para o tecido tumoral e erradicar hipoxia em tumores sólidos, estabelecendo 4 atm O_2 por 30 min.

5.2- PROPOSTA

Como pudemos verificar nos ítems anteriores, os tecidos neoplásicos apresentam baixa pressão parcial de oxigênio. Quando ocorre fornecimento de oxigênio hiperbárico consegue-se aumentar a entrega de oxigênio para o tecido tumoral e erradicar a hipoxia em tumores sólidos, estabelecendo-se que os mesmos devem ser submetidos à pressões de 4atm de oxigênio puro por 30 min. Uma vez que o oxigênio é o principal responsável pelo processo de destruição tumoral, a associação do uso correto da Terapia de Oxigênio Hiperbárico ao tratamento da PDT, como descrito anteriormente, deverá auxiliar consideravelmente na eficiência do processo.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO

O desenvolvimento de um trabalho interdisciplinar como este dá margem a várias conclusões, aparentemente, independentes. Se por um lado isto pode dificultar a elaboração deste capítulo em forma consistente, por outro lado nos ajuda já que no corpo da tese apresentamos geralmente junto às discussões, conclusões que agora serão agrupadas.

Nosso objetivo principal foi o de contribuir, como especialista em física, ao conhecimento abrangente da Terapia Fotodinâmica voltada ao tratamento de câncer.

Em primeiro lugar, a elaboração desta tese com as suas revisões e enlaces entre conhecimentos de diferentes áreas já pode ser considerada uma contribuição importante para qualquer pesquisador que necessitar encurtar caminho para rapidamente atingir objetivos específicos.

Do trabalho propriamente dito concluímos que a Terapia Fotodinâmica, embora técnica terapêutica já usada em seres humanos em vários países, oferece ainda grandes possibilidades para pesquisas nas áreas de física, química, biologia e medicina experimental. As nossas contribuições ao acervo de tais conhecimentos, passando pela obtenção de espectros de fluorescência e Raman com as devidas interpretações em termos de modelo qualitativo da molécula, vão até a proposta e elaboração de experimento capaz de medir a

eficiência do processo em tempo real, que se aplicado a um sistema "in vivo" será de grande valia para a humanidade.

A otimização da terapia pela adequação da pressão parcial do oxigênio, que também foi objetivo de nosso estudo, mostrou resultados interessantes e promissores para aplicação da terapia em situações Hiperbáricas, quando uma aceleração do processo deverá ocorrer.

Não há dúvidas de que vários trabalhos poderão ser projetados em função dos resultados aqui apresentados, e neste sentido já existe tese de mestrado em andamento na Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, onde nossas contribuições serão utilizadas.

Na última camada teremos:

Figura A1 (d)- 1 elétron em cada orbital $1\pi_g$ com spins paralelos. Pela regra de Hund esta configuração tem energia mais baixa, e será então a do oxigênio molecular normal, cujo estado fundamental é portanto triplete $3\Sigma_g^-$.

No seu estado fundamental T_0 a molécula de O_2 tem um caráter birradical, responsável por sua natureza reativa (oxidação) e por sua habilidade de aceitar elétrons, gerando íon superóxido ativo O_2^- ou mesmo O_2^{2-} que perdeu o caráter birradical, uma vez que os dois elétrons adicionais se emparelham com os π_x^* e π_y^* .

Figura A1 (e)- 2 elétrons emparelhados no mesmo orbital, mas com spins opostos (singlete $1\Delta_g$).

Figura A1 (f)- 2 elétrons com spins opostos, mas em 2 orbitais diferentes.

Ambos estados singlete necessitam de spins contrários, mas $1\Delta_g$ tem uma energia de ativação mais baixa.

Este estado não tem características de radical, mas ao contrário, se comporta como uma molécula duplamente ligada e seu tempo de vida é relativamente longo na ausência de interação de desexcitação ($\Gamma_0 \approx 45$ min em fase gasosa de baixa pressão) mas muito menor em água ($\Gamma_0 \approx 2 \mu s$).

O estado singlete de energia mais alta ($1\Sigma_g^+$) tem um tempo de vida curto ($\Gamma_0 \approx 10$ s e $\Gamma_{H\ O_2} \approx 10^{-10}$ s). Por esta razão, sua implicação no efeito fotodinâmico é negligenciável.

Estes dois estados singlete resultam da inversão de spin e não de transições eletrônicas para um orbital vazio. Eles podem ser gerados por transferência de energia, mas não por transições ópticas partindo do estado fundamental triplete,

que em ambos os casos são proibidas por:

- Multiplicidade $3 \longrightarrow 1$
- Paridade $g \longrightarrow u$
- Momento angular orbital $\Sigma \longrightarrow \Delta$ para ${}^1\Delta_g$
- Simetria $- \longrightarrow +$ para ${}^3\Sigma_g^+$

Figura A1 (g)- O primeiro estado excitado resultando de uma transição eletrônica para um orbital vazio (σ^*) é o tripleto T_1 e sua geração óptica direta ainda é baixa, uma vez que a transição T_0 (${}^3\Sigma_g^-$) \longrightarrow T_1 (${}^3\Sigma_g^+$) é proibida por simetria.

REFERÊNCIAS

- 1 - KATO, H. et al; "Effectiveness of HpD and Radiation Therapy in Lung Cancer", in "Porphyrin Photosensitization", DOUGHERTY, T.J. and KESSEL, D., eds., Plenum Press, 1983.
- 2 - VINCENT, G.; DOUGHERTY, T.J.; RAO, U. and DOIRON, D.R.; "Hematoporphyrin Derivative in the Diagnosis and Treatment of Lung Cancer" in "Porphyrin Photosensitization", DOUGHERTY, T.J. and KESSEL, D., eds., Plenum Press, 1983.
- 3 - DOUGHERTY, T.J.; "Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors", *Cancer Research*, 38:2628, 1978.
- 4 - BRAULT, D.; "Physical Chemistry of Porphyrins and their Interaction with Membranes, the Importance of pH", *J. Photochem. Photobiol. B*, 6(1-2):79, 1990.
- 5 - ZHOU, C.; "Mechanisms of Tumor Necrosis Induced by Photodynamic Therapy", *J. Photochem. Photobiol. B*, 3:299, 1989.
- 6 - LIPSON, R.L. and BALDES, E.J.; "The Photodynamic Properties of a Particular Hematoporphyrin Derivative", *Arch. Dermatol.*, 82:508, 1960.
- 7 - LIPSON, R.L.; "The Use of Hematoporphyrin in Tumor Detection", *J. Natl. Cancer Inst.*, 26:1, 1961.
- 8 - LIPSON, R.L.; BALDES, E.J. and GRAY, M.J.; "Hematoporphyrin Derivative for Detection and Management of Cancer", *Cancer*, 20:2255, 1967.
- 9 - VALENZENO, D.P.; "Photomodification of Biological Membranes with Emphasis on Singlet Oxygen Mechanisms",

- Photochem. Photobiol., 46(1):147, 1987.
- 10 - NICOLA, J.H. ; Comunicação pessoal.
 - 11 - LAUSTRIAT, G.; "Molecular Mechanisms of Photosensitization", *Biochemie*, 68:771, 1986.
 - 12 - WEISHAAPT, K.R., GOMOR, C.J. and DOUGHERTY, T.J.; "Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photoinactivation of a Murine Tumor", *Cancer Res.*, 36:2326, 1976.
 - 13 - MOAN, J. and SOMMER, S.; "Oxygen Dependence of the Photosensitizing Effect of Hematoporphyrin Derivative in NHIK 3025 Cells", *Cancer Res.*, 45:1608, 1985.
 - 14 - KEENE, J.P.; KESSEL, D.; LAND, E.J.; REDMOND, R.W. and TRUSCOTT, T.G.; "Direct Detection of Singlet Oxygen Sensitized by Haematoporphyrin and Related Compounds", *Photochem. Photobiol.*, 43(2):117, 1986.
 - 15 - GOTTFRIED, V.; PELED, D.; WINKELMAN, J.W. and KIMEL, S.; "Photosensitizers in Organized Media: Singlet Oxygen Production and Spectral Properties", *Photochem. Photobiol.*, 48(2):157, 1988.
 - 16 - PATTERSON, M.; MADSEN, S.J. and WILSON, B.C.; "Experimental Tests of the Feasibility of Singlet Oxygen Luminescence Monitoring *in vivo* During Photodynamic Therapy", *J. Photochem. Photobiol. B*, 5:69, 1990.
 - 17 - GROSSWEINER, L.I. and PATEL, A.S.; "Type I and Type II Mechanisms in the Photosensitized Lysis of Phosphatidylcholine Liposomes by Hematoporphyrin", *Photochem. Photobiol.*, 36:159, 1982.
 - 18 - HASELOFF, R.F. and ERBERT, B.; "Generation of Free Radicals by Photoexcitation of Pheophorbide, Haemato-

- porphyrin and Photoporphyrin", *J. Photochem. Photobiol. B*, 3:593, 1989.
- 19 - LEE, S.; FORBES, I.J. and BETTS, W.H.; "Oxygen Dependency of Phototoxicity with Hematoporphyrin Derivative", *Photochem. Photobiol.*, 39:631, 1984.
- 20 - SPIKES, J.D.; "Photosensitization", in "The Science of Photobiology"; Smith, K.C., ed., Plenum Publishing Co., 1989.
- 21 - SANTUS, R. and REYFTMANN, J.P.; "Photosensitization of Membrane Components", *Biochemie*, 68:843, 1986.
- 22 - SALET, C.; "Hematoporphyrin and Hematoporphyrin Derivative Photosensitization of Mitochondria", *Biochemie*, 68:865, 1986.
- 23 - VALENZENO, D.P.; "Photomodification of Biological Membranes with Emphasis on Singlet Oxygen Mechanisms", *Photochem. Photobiol.*, 46(1):147, 1987.
- 24 - TROMBERG, B.J.; KIMEL, S.; ORENSTEIN, A.; BARKER, S.J. HYATT, J.; NELSON, J.S.; ROBERTS, W.G. and BERNS, M.W.; "Tumor Oxygen Tension During Photodynamic Therapy", *J. Photochem. Photobiol. B*, 5:121, 1990.
- 25 - SELMAN, S.H.; KREUMER, M.; KLAUNIG, J.E.; GOLDBLATT, P.J.; KECK, R.W. and BRITTON, S.L.; "Blood Flow in Transplantable Bladder Tumors Treated with Hematoporphyrin Derivative and Light", *Cancer Res.*, 44:1924, 1984.
- 26 - BUNGE, A.V.; "Introdução à Química Quântica", Ed. Edgard Blücher Ltda., 1977.
- 27 - EYRING, H.; WALTER, J. and KIMBALL, G.E.; "Quantum Chemistry", John Wiley & Sons, 1944.
- 28 - ATKINS, P.W.; "Molecular Quantum Mechanics", Clarendon

Press, 1970.

- 29 - CHANG, R.; "Basic Principles of Spectroscopy", McGraw - Hill, 1971.
- 30 - SCHONLAND, D.S.; "Molecular Symmetry", Van Nostrand Reinhold Co., 1965.
- 31 - BRISTOTI, A. e NICOLA, J.H.; "Aplicações da Teoria de Grupos na Espectroscopia de Raman e Infravermelho", The General Secretariat of the Organization of American States, 1980.
- 32 - JORGENSEN, W.L. and SALEN, L.; "The Organic Chemist's Book of Orbitals", Academic Press, 1973.
- 33 - GRAY, H.B.; "Electrons and Chemical Bonding", W.A. Benjamin Inc., 1965.
- 34 - GOUTERMAN, M.; "Optical Spectra and Electronic Structure of Porphyrins and Related Rings" in "The Porphyrins", vol IIIA:1, Academic Press, 1978.
- 35 - GOUTERMAN, M.; "Study of the Effects of Substitution on the Absorption Spectra of Porphyrin", J. Chem. Phys., 30(5):1139, 1959.
- 36 - FALK, J. (ed); "Porphyrins and Metalloporphyrins", Elsevier, 1964.
- 37 - HOLLAENDER, A. (ed); "Radiation Biology", vol III2, McGraw - Hill, 1956.
- 38 - HOPF, F.R. and WHITTEN, D.G.; "Chemical Transformations Involving Photoexcited Porphyrins and Metalloporphyrins" in "The Porphyrins", vol. III:161, Academic Press, 1978.
- 39 - DOCCHIO, F.; RAMPONI, R.; SACCHI, C.A.; BOTTIROLI, G. and FREITAS, I; "Time-Resolved Fluorescence Microscopy of

- Hematoporphyrin Derivative in Cells", *Lasers in Surgery and Medicine*, 2:21, 1982.
- 40 - MOAN, J. and SOMMER, S.; "Fluorescence and Absorption Properties of the Components of Hematoporphyrin Derivative", *Photobiochem. Photobiophys.*, 3:93, 1981.
- 41 - ROEDER, B. and WABNITZ, H.; "Time Resolved Fluorescence Spectroscopy of Hematoporphyrin, Meso, Pheo and Chlorine in Ethanol and Aqueous Solution", *J. Photochem. Photobiol.*, 1(1):103, 1987.
- 42 - KINOSHITA, S.; SEKI, T.; LIN, T. and KUSHIDA, T.; "Fluorescence of Hematoporphyrin in Living Cells and in Solution", *J. Photochem. Photobiol. B*, 2:195, 1988.
- 43 - KÖNIG, K.; WABNITZ, H. and DIETEL, W.; "Variation in the Fluorescence Decay Properties of Haematoporphyrin Derivative During its Conversion to Photoproducts", *J. Photochem. Photobiol. B*, 8:103, 1990.
- 44 - YAMASHITA, M.; NOMURA, M. KOBAYASHI, S.; SATO, T and AIZAWA, K.; "Picosecond Time-resolved Fluorescence Spectroscopy of Hematoporphyrin Derivative", *IEEE J. Quantum Electron.*, 20:1363, 1984.
- 45 - ANDREONI, A.; CUBEDDU, R.; DeSILVESTRE, S. and LAPORTA, P.; "Hematoporphyrin Derivative: Experimental Evidence for Aggregated Species", *Chem. Phys. Lett.*, 88:37, 1982.
- 46 - BOTTIROLI, G.; RAMPONI, R. and CROCE, A.; "Quantitative Analysis of Intracellular Behaviour of Porphyrins", *Photochem. Photobiol.*, 46(5):663, 1987.
- 47 - ZECELL, D.M.; "Hematoporfirina e Derivados: Propriedades Ópticas e Terapia Fotodinâmica de Câncer", Tese de

Mestrado- Instituto de Física Gleb Wataghin- Unicamp,
1987.

- 48- VERMA, A.L. and Bernstein, H.J.; "Resonance Raman Spectra of Metal-free Porphin and Some Porphyrin", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 57(1), 1974
- 49- KIM, B.F. and Bohandy, J.; "Spectroscopy of Porfirins", *Jonh Hopkins APL Tech. Dig.*, 2(1):153, 1981.
- 50- Bohandy, J, and Kim, B.F.; "A Normal Mode Analysis of Free Base Porphin", *Spectrochim. Acta*, 36A:463, 1980.
- 51- ALBEN, J.O.; "Infrared Spectroscopy of Porphyrins" in "The Porphyrins", vol.III:323, 1978.
- 52- MODIANO, S.H. and LIM, B.T.; "FT IR Studies on the Active Component of Hematoporphyrin Derivative", *Chem. Phys. Lett.*, 125(4):333, 1986.
- 53- VERMA, A.L. and SARKAR, M.; "Effect of Vinyl Groups on Resonance Raman Spectra of Protoporphyrin-IX", *J. Raman Spectrosc.*, 17:407, 1986.
- 54- CHAPMAN, J.D.; "Current Concepts in Cancer: Hipoxic Sensitizer -I mplications for Radiation Therapy", *New Eng. J. Med.*, 301(26):1429, 1979.
- 55- MUELLER-KLIESER, W. and VAUPEL,P.; "Tumour Oxigenation under Normobaric and Hyperbaric Conditions", *British J. Radiol.*, 56:559, 1983.
- 56- INNES, G.S.; in "The Production and Hazards of a Hyperbaric Oxigen Environment", Pergamon Press, 1968.
- 57- VAUPEL,P. and THEWS,G.; " Po_2 Distribution in Tumor Tissue of DS-Carcinosarcoma", *Oncology*, 30:475, 1974.
- 58- HERZBERG,G. ; "Molecular Spectra and Molecular Structure", vol I- "Spectra of Diatomic Molecules", D. Van Nostrand

Company, 1950.

- 59- HERZBERG,G. ; "Molecular Spectra and Molecular Structure",
vol III- "Electronic Spectra and Electronic Structure of
Polyatomic Molecule", Van Nostrand Reinhold Company,
1966.