

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE FÍSICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

BÁRBARA SAKAMOTO

*SCAFFOLDS* POLIMÉRICOS POR *SALT LEACHING* DE  
*POLI (METACRILATO DE METILA)* COM PORFIRINA  
PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.

**UBERLÂNDIA**

**2018**

BÁRBARA SAKAMOTO

*SCAFFOLDS* POLIMÉRICOS POR *SALT LEACHING* DE  
*POLI (METACRILATO DE METILA)* COM PORFIRINA  
PARA APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física, do Instituto de Física da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Física.

Área de concentração: Física da  
Matéria Condensada

Orientador: Prof. Dr. Alexandre  
Marletta

Co-Orientadora: Profa. Dra. Patricia  
Targon Campana

**UBERLÂNDIA**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S158s Sakamoto, Bárbara, 1992-  
2018 *Scaffolds* poliméricos por *salt leaching de poli* (metacrilato de metila) com porfirina para aplicações biotecnológicas [recurso eletrônico] / Bárbara Sakamoto. - 2018.

Orientador: Alexandre Marletta.

Coorientadora: Patricia Targon Campana.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Física.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1232>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Física. 2. Porfirina e compostos de porfirina. 3. Materiais biomédicos. 4. Biopolímeros. I. Marletta, Alexandre (Orient.). II. Campana, Patricia Targon (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

---

CDU: 53

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE FÍSICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA



BARBARA SAKAMOTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física, do Instituto de Física, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Física.

Uberlândia, 26 de Outubro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

*Alexandre Marletta*

---

Prof. Dr. Alexandre Marletta  
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

*Augusto Miguel Alclade Milla*

---

Prof. Dr. Augusto Miguel Alclade Milla  
Universidade Federal de Uberlândia - UFU

*Leni Campos Akcelrud*

---

Prof. Dr. Leni Campos Akcelrud  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus familiares e ao meu marido Felipe, companheiro de todas as horas.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Marletta e a minha co-orientadora Profa. Dra. Patricia Targon Campana pela disponibilidade, apoio, incentivo e, não menos importante, pela dedicação e confiança que em mim depositaram.
- Aos professores e alunos do grupo de espectroscopia de materiais (GEM) pelo auxílio intelectual e pela disponibilização dos laboratórios do grupo, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.
- Ao professor Maurício Foschini pelo auxílio no desenvolvimento da técnica de *salt leaching*.
- A todos os responsáveis pelo laboratório de novos materiais isolantes e semicondutores (LNMIS) do instituto de física da UFU, pela disponibilização de seus equipamentos.
- A todos os responsáveis pelo laboratório multiusuários do instituto de química da UFU, e especificamente ao técnico Flaysner Magayver Portela pela operação e auxílio nos experimentos realizados.
- Ao técnico Guilherme de Lima Fernandes pela ajuda nas discussões e realização das medidas de AFM.
- A UFU e CAPES pelo apoio financeiro.
- A todos os professores que ajudaram na minha formação.
- Ao corpo docente e aos técnicos administrativos da UFU.
- E meu muito obrigado a todos que de qualquer forma me auxiliaram durante minha formação.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>19</b>
1.1	Biomateriais	19
1.2	Biomateriais Poliméricos	21
1.3	<i>Scaffolds</i>	22
1.4	Técnicas de Confeção dos <i>Scaffolds</i>	24
1.5	Bioengenharia Tecidual	25
1.5.1	Breve Histórico da Bioengenharia Tecidual	25
1.6	Terapia Fotodinâmica (PDT)	26
1.6.1	Histórico da Terapia Fotodinâmica	26
1.6.2	Processo Fotofísico para Geração de Oxigênio Singlete	27
1.6.3	Mecanismos da Terapia Fotodinâmica	28
1.6.4	Mecanismos de Morte Celular e a Terapia Fotodinâmica	29
<b>2</b>	<b>Microscopia de Força Atômica (MFA)</b>	<b>32</b>
2.1	Breve Histórico e Princípios de Funcionamento	32
2.2	Modos de Operação e Forças Envolvidas	34
2.2.1	Modo Contato	36
2.2.2	Modo Não-Contato	36
2.2.3	Modo Contato Intermitente	36
<b>3</b>	<b>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</b>	<b>37</b>
3.1	Breve Histórico e Aplicações	37
3.2	Princípios de Funcionamento	37
<b>4</b>	<b>Fundamentos da Fotofísica</b>	<b>41</b>
4.1	Transições Eletrônicas em Moléculas Poliatômicas	41
4.2	Luminescência	44
4.3	Fundamentos de Excitação e Emissão de Fluorescência	44
4.4	Absorção, Excitação e Emissão	46
4.5	Regra e Desvio de Stokes	51
4.6	Transições Radiativas e Não-Radiativas	51
4.7	Agregados	53
<b>5</b>	<b>Materiais Utilizados e Técnicas Experimentais</b>	<b>55</b>
5.1	Materiais Utilizados	55
5.1.1	Porfirina	55

5.1.1.1	Histórico e Nomenclaturas .....	55
5.1.1.2	Características fotofísicas - região UV-Vis das Porfirinas .....	58
5.1.2	Polímeros .....	60
5.1.2.1	Biopolímeros .....	63
5.1.2.2	Poli (metacrilato de metila).....	65
5.2	Técnicas Experimentais .....	66
5.2.1	Confecção dos Filmes de PMMA/Porfirina pela Técnica <i>Casting</i> ...	66
5.2.2	Confecção dos <i>Scaffolds</i> de PMMA/Porfirina pela Técnica <i>Salt Leaching</i> .....	68
5.2.3	Absorção .....	71
5.2.4	Emissão de Fluorescência .....	72
5.2.5	Emissão de Fluorescência Excitada .....	73
5.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplado ao Sistema de Espectroscopia por Energia Dispersa (MEV-EDS) .....	74
5.2.7	Microscopia de Força Atômica.....	74
6	Resultados e Discussão.....	78
6.1	Resultados e Discussão das Soluções de Porfirina .....	78
6.1.1	Medida de Absorção UV-Vis da Porfirina Estudada em Solução de CHCl <sub>3</sub> .....	78
6.1.2	Medidas de Absorção UV-Vis das Soluções em Concentrações Diferentes .....	80
6.1.3	Medidas de Emissão de Fluorescência das Soluções em Concentrações Diferentes .....	82
6.1.4	Medidas de Emissão de Fluorescência Excitada das Soluções em Concentrações Diferentes .....	84
6.2	Resultados e Discussão dos Filmes de Porfirina.....	86
6.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	86
6.2.2	Microscopia de Força Atômica.....	88
6.2.3	Medidas de Absorção UV-Vis dos Filmes em Concentrações Diferentes .....	95
6.2.4	Medidas de Emissão de fluorescência dos Filmes em Concentrações Diferentes .....	96
6.2.5	Medidas de Emissão de Fluorescência Excitada dos Filmes em Concentrações Diferentes .....	98
6.3	Resultados e Discussão dos <i>Scaffolds</i> de Porfirina.....	99
6.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura .....	99
6.3.2	Microscopia de Força Atômica.....	102

6.3.3	Medidas de Emissão de Fluorescência dos <i>Scaffolds</i> em Concentrações Diferentes .....	110
6.3.4	Medidas de Emissão de Fluorescência Excitada dos <i>Scaffolds</i> em Concentrações Diferentes .....	112
7	Conclusões e Perspectivas Futuras .....	113
7.1	Conclusões .....	113
7.2	Perspectivas Futuras .....	114
8	Apêndice A .....	116
8.1	Imagens de MEV em Diferentes Magnificações dos Filmes de Porfirina .....	116
8.2	Imagens de MEV em Diferentes Magnificações dos <i>Scaffolds</i> de Porfirina .....	120
9	Apêndice B .....	132
9.1	Espectroscopia por Energia Dispersa (EDS) .....	132
10	Referências .....	135

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-1 - Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais ao longo de seu desenvolvimento. ....	21
Figura 1-2 - Ilustração dos biomateriais poliméricos produzidos em diferentes dimensões. ....	22
Figura 1-3 - Configuração eletrônica dos orbitais moleculares da molécula de oxigênio que apresenta seu estado fundamental tripleto e seus dois estados excitados singletos. ....	27
Figura 1-4 - Diagrama de Perrin-Jablonski dos fotosensibilizadores e as reações tipo 1 e tipo 2. ....	29
Figura 1-5 - Ilustração de uma célula normal e as diferentes formas de mortes celulares por meio de um fotossensibilizador ao ser excitado com uma fonte de energia. ....	30
Figura 2-1 - Representação das etapas de funcionamento e operação do MFA. ....	33
Figura 2-2 - Diagrama de funcionamento do microscópio de força atômica. ....	34
Figura 2-3 - Forças atuantes entre a ponta e a amostra em relação a distância de separação. ....	35
Figura 2-4 - Curva de força em relação a distância de separação da ponta e a amostra. ....	35
Figura 3-1 - Ilustração de um microscópio eletrônico de varredura com componentes existentes. ....	38
Figura 3-2 - Diagrama esquemático dos sinais resultantes pela interação de um feixe de elétrons com um alvo sólido (amostra). ....	39
Figura 4-1 - Representação da formação do orbitais $\sigma$ (ligante e antiligantes), pela combinação de dois orbitais atômicos 2p. ....	42
Figura 4-2 - Representação da formação do orbitais $\pi$ (ligante e antiligantes), pela combinação de dois orbitais atômicos 2p. ....	42
Figura 4-3 - Representação dos estados singleto e tripleto de uma molécula. ....	43
Figura 4-4 - Diagrama de Perrin-Jablonski, IC = conversão interna, ISC = cruzamento intersistema, $S_0$ = estado fundamental singleto, $S_1$ = primeiro estado excitado singleto, $S_2$ = segundo estado excitado singleto, $T_0$ = estado fundamental tripleto, $T_1$ = primeiro estado excitado tripleto e $T_2$ = segundo estado excitado tripleto. ....	47
Figura 4-5 - Diagrama de energia de Franck-Condon. $S_0$ = estado fundamental singleto, $S_1$ = primeiro estado excitado singleto, $v_0$ = níveis vibracionais do estado eletrônico $S_0$ e $v_1$ = níveis vibracionais do estado eletrônico $S_1$ . ....	50
Figura 4-6 - Representação da transferência não-radiativa de energia entre segmentos de diferentes graus de conjugação. ....	53
Figura 4-7 - Formação dos agregados tipo H e J. ....	54

Figura 5-1 - Sistema de numeração do macrociclo tetrapirrólico proposto por Hans Fischer. ....	56
Figura 5-2 - Sistema de numeração do macrociclo base e substituintes proposto pela IUPAC. ....	57
Figura 5-3 - Estrutura química da porfirina empregada neste estudo, denominada 5,10,15,20 -Tetrakis (4-methoxyphenyl) - 21H,23H porphine. ....	57
Figura 5-4 - Modelo de quatro orbitais de Gouterman. ....	59
Figura 5-5 - Transições eletrônicas no modelo dos quatro orbitais de Gouterman. ....	60
Figura 5-6 - Representação dos encadeamentos das unidades monoméricas. ....	62
Figura 5-7 - Representação das cadeias macromoleculares. ....	63
Figura 5-8 - Estrutura química do polímero empregado neste estudo, denominado Poly (methyl methacrylate). ....	65
Figura 5-9 - Representação esquemática da técnica casting utilizada preparação dos filmes poliméricos. ....	66
Figura 5-10 - Filmes confeccionadas pela técnica <i>casting</i> . ....	68
Figura 5-11 - Representação esquemática da técnica <i>salt leaching</i> para a preparação de <i>scaffolds</i> poliméricos. ....	70
Figura 5-12 - <i>Scaffold</i> de PMMA e <i>Scaffolds</i> de PMMA/Porfirina confeccionados pela técnica <i>salt leaching</i> . ....	71
Figura 5-13 - Diagrama óptico do equipamento utilizado nas medidas de absorção. ....	72
Figura 5-14 - Diagrama óptico simplificado das medidas de emissão de fluorescência. ....	73
Figura 6-6 - Espectro experimental da banda de Soret da porfirina estudada e fitting realizado pela deconvolução gaussiana. ....	78
Figura 6-7 - Espectro experimental UV-Vis da porfirina estudada com um aumento nas sub-bandas Q para melhor observação. ....	79
Figura 6-8 - Espectro UV-Vis da solução de porfirina estudada em diferentes concentrações. ....	81
Figura 6-9 - Espectros de emissão de fluorescência da porfirina estudada excitada nos comprimentos de onda das posições de máximo da absorção, a) banda Soret, b), c), d) e e) sub-bandas Q. ....	83
Figura 6-10 - Espectros de emissão de fluorescência excitada das soluções da porfirina. ....	84
Figura 6-11 - MEV dos filmes, a) magnificação de 100x e b) magnificação de 250x. A ordem de apresentação das imagens vai do filme 1 até o filme 4. ....	87

Figura 6-12 - MFA do filme 1, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. .....	88
Figura 6-13 - MFA do filme 2, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. ....	89
Figura 6-14 - MFA do filme 3, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. ....	90
Figura 6-15 - MFA do filme 4, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. ....	91
Figura 6-16- O gráfico do número de eventos ( $\text{nm}^{-1}$ ) em função da distribuição de alturas (nm) de cada filme. ....	92
Figura 6-17 - Imagens de autocovariância de altura dos filmes, a) filme 1, b) filme 2, c) filme 3 e d) filme 4. ....	93
Figura 6-18 - Componentes da função correlação de diferença de alturas, a) direção horizontal $g(x)$ e b) direção vertical $g(y)$ . ....	94
Figura 6-19 - Absorção UV-Vis dos filmes, a) espectro de todas as bandas da porfirina, b) espectro da banda de Soret, e c) espectro das sub-bandas Q. ....	95
Figura 6-20 - Espectros de emissão dos filmes em diferentes comprimentos de excitação. ....	97
Figura 6-21 - Espectros de emissão de fluorescência excitada das soluções da porfirina. ....	98
Figura 6-22 - Imagens de MEV do <i>scaffold</i> 1 (PMMA), a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x. ....	100
Figura 6-23 - Imagens de MEV do <i>scaffold</i> 2, a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x. ....	101
Figura 6-24 - Imagens de MEV do <i>scaffold</i> 3, a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x. ....	101
Figura 6-25 - Imagens de MEV do <i>scaffold</i> 4, a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x. ....	102
Figura 6-26 - MFA do <i>scaffold</i> 1, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. .....	103
Figura 6-22 - MFA do <i>scaffold</i> 2, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. .....	104
Figura 6-23 - MFA do <i>scaffold</i> 3, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. .....	105
Figura 6-24 - MFA do <i>scaffold</i> 4, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D. .....	105

Figura 6-25 - O gráfico do número de eventos ( $\text{nm}^{-1}$ ) em função da distribuição de alturas (nm) de cada <i>scaffold</i> . .....	107
Figura 6-26 - Imagens de autocovariância de altura dos <i>scaffolds</i> , a) <i>scaffold</i> 1, b) <i>scaffold</i> 2, c) <i>scaffold</i> 3 e d) <i>scaffold</i> 4. ....	108
Figura 6-27 - Componentes da função correlação de diferença de alturas, a) direção horizontal g (x) e b) direção vertical g (y). ....	109
Figura 6-28 - Espectros de emissão dos <i>scaffolds</i> em diferentes comprimentos de excitação. ....	111
Figura 6-29 - Espectros de emissão de fluorescência excitada dos <i>scaffolds</i> com porfirina. ....	112
Figura 8-1 - Imagens de MEV do filme 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	116
Figura 8-2 - Imagens de MEV do filme 2 (PMMA/porfirina 25 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	117
Figura 8-3 - Imagens de MEV do filme 3 (PMMA/porfirina 250 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	118
Figura 8-4 - Imagens de MEV do filme 4 (PMMA/porfirina 2500 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	119
Figura 8-5 - Imagens de MEV da parte superior do <i>scaffold</i> 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	120
Figura 8-6 - Imagens de MEV da parte inferior do <i>scaffold</i> 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	121
Figura 8-7 - Imagens de MEV da parte lateral do <i>scaffold</i> 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	122
Figura 8-8 - Imagens de MEV da parte superior do <i>scaffold</i> 2 (PMMA/porfirina 25 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	123
Figura 8-9 - Imagens de MEV da parte inferior do <i>scaffold</i> 2 (PMMA/porfirina 25 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	124
Figura 8-10 - Imagens de MEV da parte lateral do <i>scaffold</i> 2 (PMMA/porfirina 25 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	125
Figura 8-11 - Imagens de MEV da parte superior do <i>scaffold</i> 3 (PMMA/porfirina 250 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	126
Figura 8-12 - Imagens de MEV da parte inferior do <i>scaffold</i> 3 (PMMA/porfirina 250 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	127
Figura 8-13 - Imagens de MEV da parte lateral do <i>scaffold</i> 3 (PMMA/porfirina 250 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	128
Figura 8-14 - Imagens de MEV da parte superior do <i>scaffold</i> 4 (PMMA/porfirina 2500 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	129
Figura 8-15 - Imagens de MEV da parte inferior do <i>scaffold</i> 4 (PMMA/porfirina 2500 $\mu\text{L}$ ), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....	130

<b>Figura 8-16 - Imagens de MEV da parte lateral do <i>scaffold</i> 4 (PMMA/porfirina 2500 <math>\mu</math>L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x. ....</b>	<b>131</b>
<b>Figura 9-1 - Espectro EDS do filme 1. ....</b>	<b>132</b>
<b>Figura 9-2 - Espectro EDS do filme 2. ....</b>	<b>132</b>
<b>Figura 9-3 - Espectro EDS do filme 3. ....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 9-4 - Espectro EDS do filme 4. ....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 9-5 - Espectro EDS do <i>scaffold</i> 1. ....</b>	<b>133</b>
<b>Figura 9-6 - Espectro EDS do <i>scaffold</i> 2. ....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 9-7 - Espectro EDS do <i>scaffold</i> 3. ....</b>	<b>134</b>
<b>Figura 9-8 - Espectro EDS do <i>scaffold</i> 4. ....</b>	<b>134</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fenômenos da luminescência provenientes de diferentes modos de excitação. ....	44
Tabela 2 - Tipos de transição para cada processo e escala de tempo, S=Singleto e T=Tripleto. ....	45
Tabela 3 - Cadeias macromoleculares em homopolímeros e copolímeros. ....	61
Tabela 4 - Espessuras dos filmes. $C_p$ = concentração das moléculas de porfirina nos filmes. ....	68
Tabela 5 - Espessuras e diâmetros dos <i>scaffolds</i> . $C_p$ = concentração das moléculas de porfirina nos <i>scaffolds</i> . ....	71
Tabela 6 – Posições de máximo das sub-bandas de Soret. $\lambda$ pm = posição de máximo. ....	79
Tabela 7 - Posições de máximo das sub-bandas Q. $\lambda$ pm = posição de máximo. ....	80
Tabela 8 - Posições de máximo das bandas Soret e Q em concentrações diferentes. $\lambda$ pm = posição de máximo. ....	82
Tabela 9 - Valores da rugosidade quadrática média, Skewness e Kurtosis de cada filme. $C_p$ = concentração das moléculas de porfirina nos filmes. ....	91
Tabela 10 - Valores do comprimento de correlação lateral dos filmes. $C_p$ = concentração das moléculas de porfirina nos filmes. ....	94
Tabela 11 - Valores da rugosidade quadrática média, Skewness e Kurtosis de cada <i>scaffold</i> . $C_p$ = concentração das moléculas de porfirina nos <i>scaffolds</i> . ....	106
Tabela 12 - Valores do comprimento de correlação lateral dos <i>scaffolds</i> . $C_p$ = concentração das moléculas de porfirina nos <i>scaffolds</i> . ....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ROS** - Reactive Oxygen Species

**1D** - Unidimensional

**2D** - Bidimensional

**3D** - Tridimensional

**TIPS** - Thermally Induced Phase Separation

**MIT** - Massachusetts Institute of Technology

**PDT** - Photodynamic Therapy

**FS** - Fotossensibilizador

**M<sub>u</sub>** - Unidade monomérica

**MFA** - Microscópio de força atômica

**MEV** - Microscópio eletrônico de varredura

**EP** - Primary Beam

**SE** - Secondary Electrons

**BSE** - Backscattered Electrons

**HOMO** - Orbital molecular mais alto ocupado

**LUMO** - Orbital molecular mais baixo desocupado

**PMMA** - Poli (metacrilato de metila)

**CHCl<sub>3</sub>** -Clorofórmio

**GEM** - Grupo de Espectroscopia de Materiais

**UFU** - Universidade Federal de Uberlândia

**LNMIS** - Laboratório de novos materiais isolantes e semicondutores

**EDS** - Espectroscopia por energia dispersiva

## LISTA DE SÍMBOLOS

$O_2$  - Oxigênio

$^3O_2$  - Estado tripleto do oxigênio

$^1O_2$  - Estado singleto do oxigênio

$T_0$  - Estado fundamental do tripleto

$T_1$  - Primeiro estado excito do tripleto

$T_2$  - Segundo estado excitado do tripleto

$S_0$  - Estado fundamental do singleto

$S_1$  - Primeiro estado excitado do singleto

$S_2$  - Segundo estado excitado do singleto

$\text{Å}$  - Angstrom

$\sigma$  - Orbital molecular ligante

$\pi$  - Orbital molecular ligante

$\sigma^*$  - Orbital molecular antiligante

$\pi^*$  - Orbital molecular antiligante

$E$  - Energia

$h$  - Constante de Planck

$\nu$  - Frequência

$\lambda$  - Comprimento de onda

$c$  - Velocidade da luz

**KeV** - Quilo elétrons-volt

$\sigma_{RMS}$  - Rugosidade quadrática média

$\sigma_{SK}$  - Skewness

$\sigma_{KU}$  - Kurtosis

## RESUMO

Este projeto envolve o desenvolvimento de filmes e *scaffolds* poliméricos com a incorporação de moléculas de porfirina que apresentam atividades biológicas para aplicações nas áreas biotecnológicas. Os *scaffolds* poliméricos são estruturas tridimensionais altamente porosas que podem ser utilizadas para crescimento celular/tecidual, liberação controlada de drogas, como carregadores de moléculas que promovem a morte celular, entre outras.

Primeiramente as propriedades fotofísicas dos monômeros das moléculas de porfirina base livre (5,10,15,20-Tetrakis(4-methoxyphenyl)-21H,23H porphine) em clorofórmio foram investigadas por meio das medidas de absorção, onde observamos a presença de duas sub-bandas na banda B (Soret) localizadas entre 400-420 nm e na banda Q um ombro e quatro sub-bandas localizadas entre 480-650 nm. Os filmes e *scaffolds* foram confeccionadas em concentrações diferentes das moléculas de porfirina, e as possíveis mudanças provocadas devido ao efeito do aumento da concentração foram caracterizadas nas medidas de absorção, emissão de fluorescência e emissão de fluorescência excitada das soluções de porfirina em diferentes concentrações. Os espectros de absorção apresentaram deslocamentos para o vermelho, e as medidas de fluorescência e de fluorescência excitada apresentaram mudanças na forma de linha da solução mais concentrada, indicando uma possível presença de agregados. Os filmes e *scaffolds* foram confeccionados por meio da adição das moléculas de porfirina em concentrações diferentes, em solução polimérica do Poli (metacrilato de metila) (PMMA), usando as técnicas de *casting* e *salt leaching*, respectivamente. As imagens de MEV e MFA das amostras proporcionaram análises qualitativas (visual), e o MFA possibilitou também as análises quantitativas, por meio das estatísticas de primeira e segunda ordem. As propriedades fotofísicas dos filmes e *scaffolds* de PMMA/Porfirina foram avaliadas usando as medidas de absorção na região UV-Vis, emissão de fluorescência e emissão de fluorescência excitada. Observou-se que em concentrações mais elevadas, o deslocamento para o vermelho nos espectros aparece, revelando que mesmo em uma estrutura sólida os agregados estão presentes e possivelmente são agregados do tipo H e J coexistindo.

Palavras-chave: *Scaffolds*, *salt leaching*, porfirina, PMMA, agregados.

## ABSTRACT

This project aims the development of polymer films and scaffolds with the incorporation of porphyrin molecules that has biological activities for application in biotechnology. The polymer scaffolds are highly porous three-dimensional structures that can be used in cell/tissue growth, drug delivery, molecule carriers that promote cell death etc.

The photophysical properties of free base porphyrin monomer molecules (5,10,15,20-Tetrakis(4-methoxyphenyl)-21H,23H porphine) in chloroform was investigated by absorption measurements, where the presence of two sub-bands in B band (Soret) localized between 400-420 nm was observed as well as a solder in Q band and four sub-bands localized between 480-650 nm. As the confectioned film and scaffolds have different concentrations of porphyrin molecules, present the changes as the concentration increases in the absorption, fluorescence emission and excited fluorescence emission measurements in the solutions. The absorption measurements show red shift, where the fluorescence emission and excited emission we see changes in the line form of the solution with higher concentration, showing possible presence of aggregates. Next we made the films and scaffolds by adding the porphyrin molecules in different concentration in polymeric Poly (methyl methacrylate) (PMMA) solutions. The films was made by casting forming structure of guest-host type and the scaffolds by salt leaching forming porous structures. The MEV and AFM measurements of the samples allow the qualitative analysis (visual) and quantitative analysis by first and second order statistic. Besides, we studied the photophysical properties of films and scaffolds of PMMA/Porphyrin. The UV-Vis absorption, fluorescence and excited fluorescence emission measurement also show red shift for the higher concentrations, revealing that even in solid structures the aggregation is present and are probably coexistence of H and J type.

**Keywords:** *Scaffolds, salt leaching, porphyrin, PMMA, aggregates.*

# **1 Introdução**

Os estudos envolvendo a compreensão dos fenômenos biológicos e principalmente, as propriedades físico-químicas de moléculas com atividade biológica, têm contribuído para o desenvolvimento de nano/micro materiais. Esses materiais resultam em produtos aplicáveis na nanomedicina e engenharia de tecidos biomiméticos. Nos últimos 40 anos, as demandas por produtos têm se diversificado, como a criação de sistemas de liberação controlada de drogas, dispositivos que geram espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species, ROS*), sistemas de detecção de biomarcadores, nanossensores, *biochips* e copolímeros (MORAIS, MARTINS, *et al.*, 2014).

Nos sistemas geradores de ROS, como os empregados em terapia fotodinâmica, o fotosensibilizador transfere a energia diretamente para o oxigênio molecular, com a finalidade de gerar as espécies reativas do oxigênio para provocar a morte de células neoplásicas (JEONG e CHOI, 2016).

Os *scaffolds* poliméricos são estruturas adequadas à estas aplicações, principalmente pelas propriedades como densidade adequada, maleabilidade quanto ao arranjo e porosidade, diversidade de estrutura superficial, de características funcionais e de resistência mecânica. Mais especificamente, os *scaffolds* são estruturas tridimensionais porosas que aumentam a área superficial. Estes podem ser produzidos de diferentes polímeros (DASH, MURTHY, *et al.*, 2010). Dependendo do polímero empregado os *scaffolds* são biocompatíveis e biodegradáveis, assim servindo como base para o crescimento de matéria orgânica, absorção de nanopartículas, confecção de estruturas nanométricas complexas, entre outros usos (RAVICHANDRAN, VENUGOPAL, *et al.*, 2012).

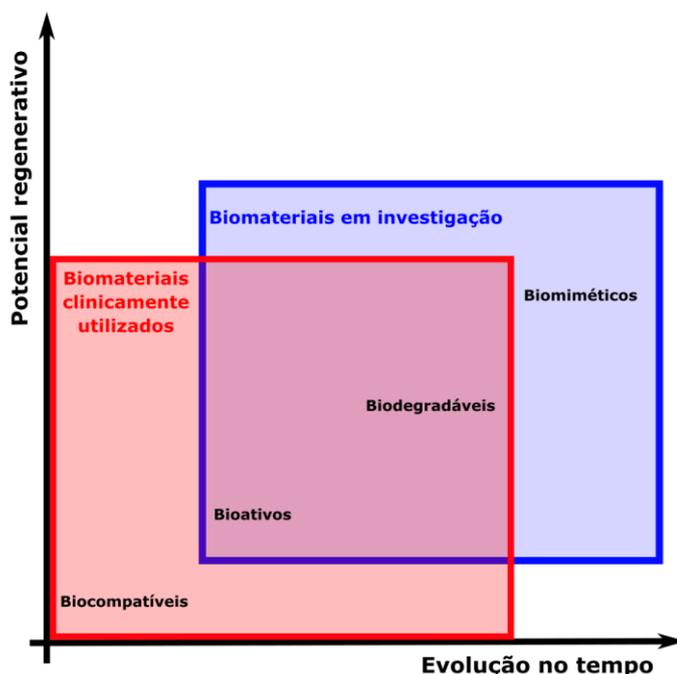
## **1.1 Biomateriais**

O termo biomaterial vem sendo definido de diferentes formas por diferentes autores ao longo dos últimos anos. São dispositivos que entram em contato com sistemas biológicos com a intenção de aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas. Estes biomateriais podem ser constituídos de compostos de origem sintética ou natural, assim como de materiais naturais quimicamente modificados,

tanto na forma de sólidos quanto de géis, pastas ou mesmo líquidos. Dentre eles, podem ser citados como exemplos dispositivos biomédicos (como biossensores, tubos de circulação sanguínea, sistemas de hemodiálise), materiais implantáveis (como suturas, placas, substitutos ósseos, tendões, telas ou malhas, válvulas cardíacas, lentes, dentes), dispositivos para a liberação de medicamentos (na forma de filmes, implantes subdérmicos e partículas), órgãos artificiais (como coração, rim, fígado, pâncreas, pulmões, pele) e curativos, dentre muitos outros (PIRES, BIERHALZ e MORAES, 2015). Além disso, tanto os estudos quanto a própria área do conhecimento, requerem competência multidisciplinar, envolvendo ciências básicas, engenharias e as áreas de saúde.

Nas proximidades da década de 50, época que deu início ao uso dos biomateriais de forma mais sistematizada, buscavam-se os materiais bioinertes. Com o passar do tempo, a meta passou a ser a bioatividade dos biomateriais, e mais recentemente, o objetivo tem sido a regeneração de um tecido funcional de fato, com foco, então, no aspecto biológico. Ou seja, inicialmente tinha-se por objetivo a obtenção de materiais biocompatíveis que pudessem substituir um tecido danificado e prover suporte mecânico, com mínima resposta biológica do paciente. Conforme os estudos avançavam, buscou-se aumentar a interação do biomaterial com a interface do tecido hospedeiro. Posteriormente, foram desenvolvidos materiais biodegradáveis, com capacidade de serem incorporados ou absorvidos pelo tecido hospedeiro e atualmente, tem-se trabalhado com o conceito de biomimética, buscando-se materiais que participem de forma ativa no processo de recuperação, atuando no tecido de forma específica, com estimulação em nível celular. Tal conceito evolutivo no desenvolvimento e utilização de biomateriais é ilustrado na Figura 1-1, que indica também que os biomateriais mais usados clinicamente na atualidade são os biocompatíveis, bioativos e biodegradáveis, e os mais pesquisados, os bioativos, os biodegradáveis e os biomiméticos (HOLZAPFEL, REICHERT, *et al.*, 2013).

Figura 1-1 - Evolução da funcionalidade e da capacidade regenerativa dos biomateriais ao longo de seu desenvolvimento.

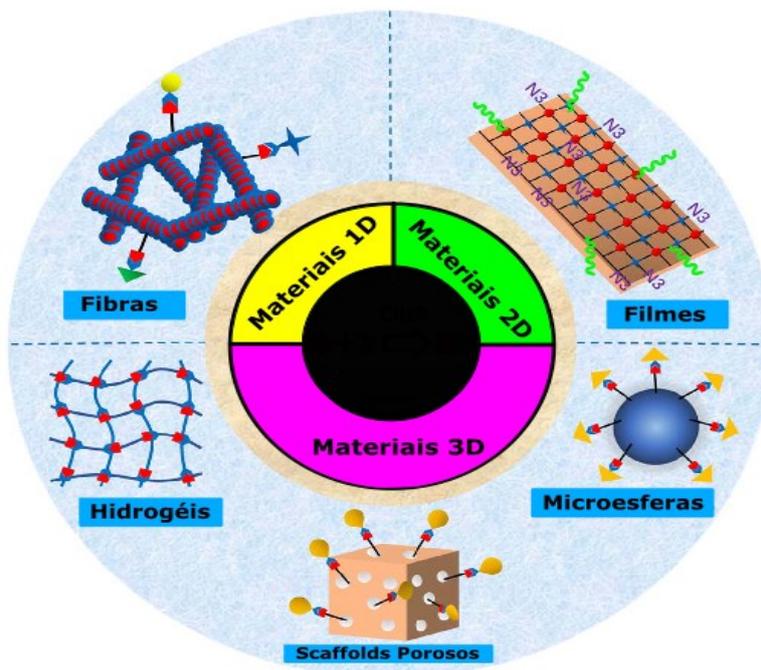


Fonte: Adaptado de (HOLZAPFEL, REICHERT, et al., 2013).

## 1.2 Biomateriais Poliméricos

Entre os diferentes tipos de biomateriais, os biomateriais poliméricos são mais interessantes devido às suas propriedades únicas, incluindo a preparação controlável, fácil processamento e versatilidade. Os biomateriais poliméricos ganharam enorme impacto e têm sido amplamente utilizados na engenharia de tecidos, medicina regenerativa, administração de medicamentos e terapia gênica nos últimos anos. Notavelmente, os biomateriais poliméricos são facilmente fabricados em várias estruturas dimensionais (Figura 1-2), como 1D (isto é, fibras, tubos), 2D (ou seja, discos, placas, filmes e 3D (ou seja, géis, microesferas, *scaffolds* porosos) estruturas para apoiar as funções biológicas especificamente desejáveis. Estes *scaffolds* poliméricos fornecem espaço e ambiente biológico para as reações metabólicas, bem como suporte mecânico temporal ou permanente para células e tecidos circundantes (ZOU, ZHANG, et al., 2018).

Figura 1-2 - Ilustração dos biomateriais poliméricos produzidos em diferentes dimensões.



Fonte: Adaptado de (ZOU, ZHANG, et al., 2018).

Os polímeros possuem inúmeras propriedades físicas, químicas, biológicas, biomecânicas e de degradação específicas, podendo resultar em um ambiente controlado. Por exemplo, compósitos de moléculas bioativas, incluindo peptídeos, drogas, genes, proteínas, sacarídeos, vitaminas com polímeros, podem aumentar as interações biológicas (LIN, YU, *et al.*, 2013). Estes biomateriais poliméricos com moléculas bioativas podem estimular respostas celulares específicas direcionando a proliferação e diferenciação celular e a produção e organização da matriz extracelular (ECM) (ZOU, ZHANG, *et al.*, 2018).

### 1.3 Scaffolds

O termo *scaffold*, original da língua inglesa, significa um suporte ou um andaime adequado para hospedar componentes biológicos, assegurando a sua permanência no local da lesão e auxiliando a sua ação. Assim, os *scaffolds* devem alojar células-tronco, fatores de crescimento, proteínas e outros componentes que participam da regeneração do tecido humano lesionado (SANTANA, 2016).

Os *scaffolds* fazem parte dos novos biomateriais da medicina moderna, e devem ser fabricados a partir de materiais inertes ou de funcionais, que também

participam da regeneração. Podem ser construídos em vários formatos, dimensões, e com propriedades diferentes. Para células-tronco, devem ser formados de fibras muito finas, de espessura da ordem de nanômetros, ou de esponjas com microporos, fornecendo assim uma grande superfície para adesão dessas células. Podem também serem filmes densos ou microesferas que proporcionam o aprisionamento e liberação gradual de fatores de crescimento e proteínas. Os materiais usados são em geral polímeros naturais ou sintéticos, aos quais são adicionados ou não outros compostos, como antibióticos e vitaminas que protegem e/ou auxiliam na regeneração. Alguns desses materiais podem ser absorvidos pelo corpo, não necessitando de remoção. As dimensões dos *scaffolds* variam com o local e o tamanho da lesão. Assim, para cicatrização de feridas cutâneas devem ser adequados para a colocação sobre a pele, para osteoartrite e outras lesões articulares devem ser injetados no local da lesão, ou em casos mais graves devem ser implantados juntamente com as células-tronco por meio de procedimentos cirúrgicos para acelerarem a regeneração. Atualmente existem *scaffolds* comerciais, mas a literatura mais recente cita numerosos estudos voltados para o seu desenvolvimento e testes em animais, devido aos benefícios destes novos biomateriais (SANTANA, 2016).

Esses *scaffolds* podem ser confeccionados por diferentes métodos com a liofilização, separação de fases termicamente induzida, eletrofiação, impressoras 3D, *salt leaching*, etc. Na engenharia de tecidos os polímeros mais utilizados são os polímeros naturais como o colágeno e a gelatina. Outros polímeros, tais como ácido poli-láctico co-glicólico (PLGA), dodecil sulfato de sódio (SDS), celulose, ácido poli-glicólico (PGA), poli (etilenoglicol) e ácido poli-láctico (PLA) também são utilizados para fabricar os *scaffolds* devido à sua excelente biodegradabilidade e biocompatibilidade (RAHMANI DEL BAKHSHAYESH, ANNABI, *et al.*, 2018).

*Scaffolds* produzidos com colágeno, gelatina, elastina e quitosana estão presentes em inúmeros estudos relacionados com a substituição e tratamentos de lesões de pele, já que esses apresentam uma excelente adesão celular e proliferação das culturas de células da pele, além disso não demonstram nenhuma citotoxicidade contra as células. Já os *scaffolds* de policaprolactona (PCL) apresentam várias vantagens, incluindo biocompatibilidade, baixo custo e processabilidade. O PCL está sendo aplicado em biomateriais de tecidos moles e tecidos duros, para usos como na engenharia de tecido ósseo, engenharia de tecidos nervosos e sistemas de liberação

de medicamentos. Os *scaffolds* de poli (metacrilato de metila) (PMMA) possuem boas propriedades mecânicas e baixa toxicidade. Estudos recentes do PMMA buscam alcançar estabilidade mecânica a longo prazo após a implantação, além disto, tem uma ampla gama de aplicações, como cimento ósseo, lentes, substitutos ósseos e sistemas de liberação de fármacos (DHANDAYUTHAPANI, YOSHIDA, *et al.*, 2011).

## 1.4 Técnicas de Confeção dos *Scaffolds*

Existem diversas técnicas para a confecção de *scaffolds* poliméricos. Dentre elas, a liofilização está entre as mais simples e com menor custo. Brevemente, o processo, que ocorre em condições especiais de pressão e temperatura, possibilita que o solvente previamente congelado (estado sólido) passe diretamente ao estado gasoso (sem passar pelo estado líquido), ou seja, a mudança de estado físico ocorre por sublimação. A temperatura e a velocidade de congelamento definem a estrutura final, pois a distribuição dos poros depende do tamanho e da localização dos cristais de gelo formados. Desta forma, condições mais adequadas para o congelamento dependerão das características particulares da solução a ser liofilizada. (TERRONI, DE JESUS, *et al.*, 2013).

Outra metodologia onde os parâmetros termodinâmicos da solução estão diretamente ligados à estrutura obtida é a separação de fase termicamente induzida (*Thermally Induced Phase Separation*, TIPS). TIPS pode ser feita de várias formas, utilizando uma solução homogênea de solvente e polímero, criando assim um sistema multifásico. Essa solução é separada em um fase rica de polímero e uma fase pobre de polímero. No caso desta técnica em específico essa separação de fase é feita por indução térmica. E em seguida, o solvente é retirado por liofilização ou lixiviação restando o scaffold polimérico (KIM, KIM, *et al.*, 2016).

Outro processo bastante utilizado na engenharia de tecidos biomiméticos é a eletrospinning (*Electrospinning*). A técnica consiste na aplicação de forças eletrostáticas e de arraste em uma solução polimérica com a finalidade de produzir fibras interligadas e com diâmetros muito pequenos, na ordem de microns, ou mesmo nanômetros dependendo do polímero. Nesse processo, um eletrodo conectado a uma fonte de alta tensão elétrica (positiva ou negativa) é inserido em uma solução polimérica contida em um tubo capilar. Inicialmente, a solução se mantém dentro do

capilar pela tensão superficial, adquirindo o formato de uma gota na extremidade do mesmo. Com o aumento da tensão elétrica, a superfície da gota se estende formando um cone. Isso ocorre quando as forças eletrostáticas superam a tensão superficial da gota. O cone é conhecido como cone de Taylor. Como resultado de instabilidades viscoelásticas e elétricas, o “cone” forma um jato carregado eletricamente que se subdivide em centenas de filamentos ou fibrilas. Durante a trajetória do jato ou das fibrilas até o coletor, o solvente evapora e o polímero forma uma manta não tecida, formada de nanofibras. (SANTANA-MELO, 2016).

Ainda sobre *scaffolds* 3D, as impressoras 3D ganharam destaque nos últimos 10 anos no desenvolvimento de tecidos biomiméticos. Seu princípio é o mesmo da convencional. No lugar de tinta, são introduzidos pó, gel ou filamento de metal ou de plástico. A impressora imprime, camada por camada, peças tridimensionais como dedos, crânios ou dentes. Para criar um crânio de plástico, por exemplo, são utilizadas como base imagens de ressonância magnética ou tomografia computadorizada. Devido ao desenvolvimento acelerado dessas impressoras, os metais ou plásticos estão sendo substituídos por células vivas, a matéria prima nomeada biotinta (LIU, LIU, *et al.*, 2018).

Neste trabalho, utilizou-se a técnica de *salt leaching* (lixiviação de sal) para a confecção dos *scaffolds*. Nesta técnica os cristais de sal são colocados em um molde e, em seguida, o polímero é derramado sobre o sal penetrando nos espaços entre seus cristais. Após a solidificação da solução polimérica, o sal é removido por dissolução em um solvente (tal como água) que lava/lixivia para fora da estrutura polimérica os cristais salinos. Após a remoção dos cristais de sal, resta o polímero solidificado com poros no local onde antes estavam os cristais de sal. Na seção de materiais e métodos serão apresentados maiores detalhes desta técnica e os refinamentos para otimizar a confecção das amostras.

## **1.5 Bioengenharia Tecidual**

### **1.5.1 Breve Histórico da Bioengenharia Tecidual**

O termo Bioengenharia Tecidual foi inicialmente definido pelos participantes da primeira reunião da *National Science Foundation* em 1988 como “a aplicação dos

princípios e métodos da engenharia e ciências da vida na compreensão da relação estrutura-função em condições normais e patológicas dos tecidos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para sua reparação e regeneração”. Durante os anos 90, a bioengenharia tecidual progrediu rapidamente e substitutos biológicos foram desenvolvidos para diversos tecidos do corpo (NEREM, 2010).

A bioengenharia tecidual surgiu como alternativa potencial diante da falência de órgãos e de lesões teciduais, assim como em substituição ao transplante de órgãos que podem ser tratados pela implantação de substituto da engenharia biológica. A mesma visa substituir os tecidos que estão lesionados, a fim de recriar tecidos funcionais e órgãos saudáveis. Tem se desenvolvido, ao longo da última década, para corrigir defeitos de tecidos duros e moles, secundários a trauma, congênitos e doenças adquiridas. As atuais abordagens clínicas para substituição de tecidos e reconstrução têm o propósito de aliviar a dor e restaurar a estabilidade mecânica e funcional de tecidos e órgãos biológicos (KAIGLER e MOONEY, 2001).

## **1.6 Terapia Fotodinâmica (PDT)**

### **1.6.1 Histórico da Terapia Fotodinâmica**

O emprego da luz como agente terapêutico vem se desenvolvendo ao longo de milhares de anos. Primordialmente foi utilizada no antigo Egito, na Índia e na China para tratar doenças da pele, como a psoríase, o vitiligo e câncer, bem como raquitismo e inclusive psicose (ACKROYD, KELTY, *et al.*, 2001).

A primeira descrição científica de tratamento fotodinâmico foi realizada em Munique por um estudante de medicina, Oscar Raab e seu professor Herman von Tappeiner. Em seus estudos sobre protozoários causadores de malária, constatou que a interação do marcador acridina com a luz, tornava-se letal para os protozoários (ACKROYD, KELTY, *et al.*, 2001).

A interação da luz com um composto fluorescente com a finalidade de aplicação médica foi feita por von Tappeiner e um dermatologista chamado Jesionek, utilizaram uma combinação de eosina tópica e luz branca para tratar tumores de pele. Posteriormente von Tappeiner, juntamente com Jodlbauer demonstraram que a presença do oxigênio nas reações de fotossensibilização era imprescindível e, em

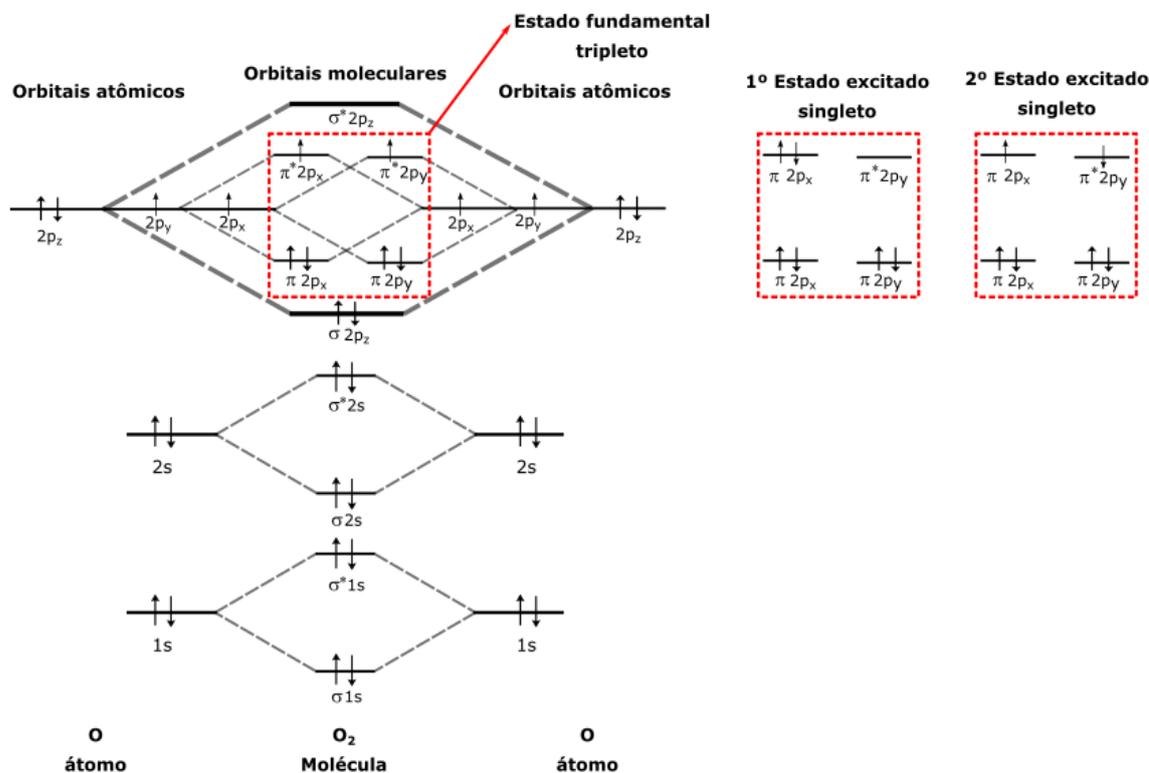
1907, introduziram o termo "ação fotodinâmica" para descrever esse fenômeno (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010).

Em 1913 o alemão Friedrich Meyer-Betz com o propósito de testar a fotosensibilização humana pelas porfirinas, injetou-se 200 mg do que ele acreditava ser hematoporfirina e não sentiu nenhum efeito, porém ao se expor à luz, teve fotossensibilidade na pele durante alguns meses (BONNETT, 2014).

### 1.6.2 Processo Fotofísico para Geração de Oxigênio Singlete

O oxigênio molecular ( $O_2$ ) está presente na geração de energia e na respiração do organismos vivos. Em seu estado fundamental apresenta-se na forma de oxigênio tripleto ( $^3O_2$ ), ou seja, os dois elétrons encontram-se desemparelhados (Figura 1-3).

Figura 1-3 - Configuração eletrônica dos orbitais moleculares da molécula de oxigênio que apresenta seu estado fundamental tripleto e seus dois estados excitados singletos.



Fonte: Adaptado de (JEONG e CHOI, 2016).

O oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ), pode ser gerado do estado fundamental tripleto de duas formas diferentes, 1º estado excitado singleto e 2º estado excitado singleto. O estado de maior energia, ou seja, 2º estado excitado singleto é convertido rapidamente para o 1º estado excitado singleto, gerando espécies reativas do oxigênio para o uso em terapia fotodinâmica (JEONG e CHOI, 2016).

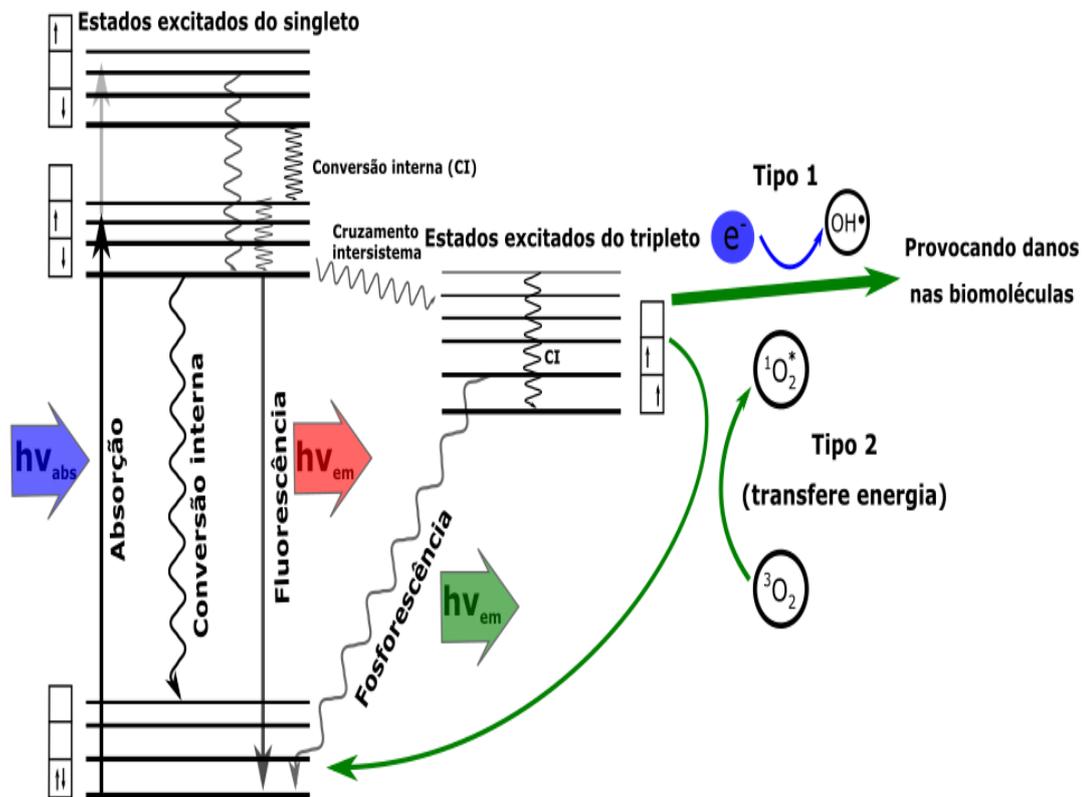
### 1.6.3 Mecanismos da Terapia Fotodinâmica

O processo estabelece-se quando o fotossensibilizador (FS) absorve um fóton com comprimento de onda adequado e em seguida sofre decaimentos simultâneos ou sequenciais que resultam em reações intramoleculares de transferência de energia (SIBATA, COLUSSI, *et al.*, 2000).

O estado fundamental do fotossensibilizador apresenta dois elétrons com spins opostos em um orbital molecular de mais baixa energia, conhecido com estado singleto. Após a absorção da luz na forma de fótons, um desses elétrons desloca-se para um orbital de mais alta energia, mas mantém o spin do primeiro estado singleto excitado. Este estado é de curta duração e perde sua energia ao emitir luz por meio da fluorescência ou por conversão interna em calor. O estado de singleto excitado do fotossensibilizador também pode sofrer um processo conhecido como cruzamento intersistema através do qual o spin do elétron excitado se inverte para formar um estado tripleto excitado relativamente longo que possui elétrons com spins em uma conformação paralela (CASTANO, DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004).

O fotossensibilizador no estado tripleto excitado pode sofrer dois tipos de reações. A reação de tipo 1, a qual pode reagir diretamente com o substrato, como a membrana celular ou uma molécula, e transferir um próton ou um elétron para formar um ânion ou cátion, respectivamente. Estes radicais podem reagir com o oxigênio e produzir espécies reativas do oxigênio. Na reação de tipo 2, o fotossensibilizador no estado tripleto pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio molecular, com a finalidade de formar o estado excitado do oxigênio singleto. Tanto as reações de tipo 1 como a de tipo 2 podem ocorrer simultaneamente, e a relação entre esses processos depende do fotossensibilizador utilizado, bem como das concentrações de substrato e oxigênio (Figura 1-4).

Figura 1-4 - Diagrama de Perrin-Jablonski dos fotosensibilizadores e as reações tipo 1 e tipo 2.



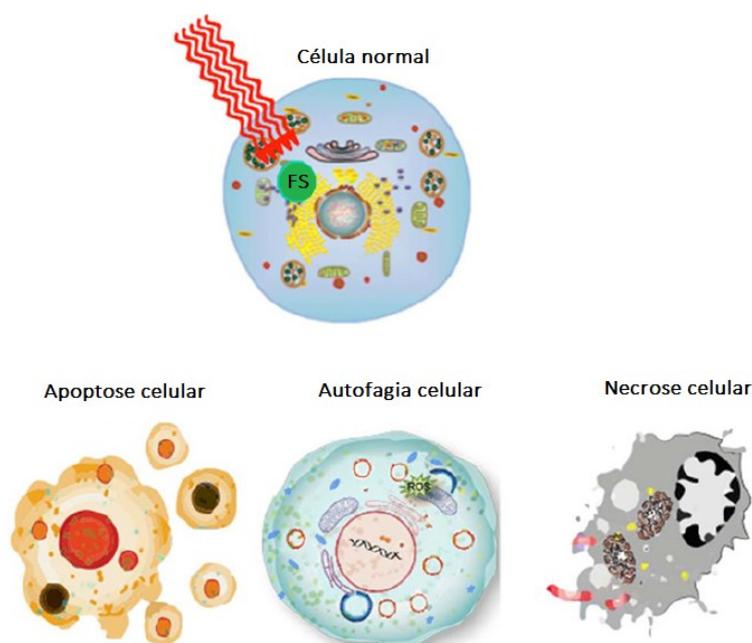
Fonte: Adaptado de (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016).

Devido à alta reatividade e meia vida curta do oxigênio singlete e dos radicais hidroxila, apenas moléculas e estruturas próximas da área de sua produção (ou seja, áreas onde se localizada o fotossensibilizador) são diretamente afetadas e posteriormente destruídas (ROBERTSON, EVANS e ABRAHAMSE, 2009).

#### 1.6.4 Mecanismos de Morte Celular e a Terapia Fotodinâmica

Existem vários processos que resultam na morte celular. Alguns deles, como a apoptose e a necrose (Figura 1-5), estão diretamente ligados a danos irreversíveis à membrana celular. Neste casos, a membrana plasmática da célula perde a integridade, ocasionando a fragmentação do núcleo celular (KROEMER, GALLUZZI, *et al.*, 2009).

**Figura 1-5 - Ilustração de uma célula normal e as diferentes formas de mortes celulares por meio de um fotossensibilizador ao ser excitado com uma fonte de energia.**



**Fonte: (ABRAHAMSE e HAMBLIN, 2016).**

Para a manutenção do tecido biológico e de todas as funções necessárias à sua sobrevivência, bem como do organismo, as células necessitam também da interação entre elas. As lesões irreversíveis podem levar à ausência de fatores de reconhecimento, ou mesmo fatores de crescimento ou reparação. Nesses casos, a célula sofre um aumento de volume, perde as funções metabólicas e sofre alterações na membrana plasmática, que perde a integridade, resultando em morte (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

As lesões irreversíveis em membranas, ou mesmo em estruturas específicas das células estão, na maioria das vezes, relacionadas à formação das ROS (SEN, CHAKRABORTY, *et al.*, 2010). Naturalmente, os organismos vivos possuem proteínas chamadas superóxido desmutases que são capazes de diminuir ou mesmo anular a ação das ROS. No entanto, casos em que a morte da célula é o objetivo, pode-se causar um aumento da formação de ROS através da formação do oxigênio singlete.

Além disso, em PDT utiliza-se a geração do oxigênio singlete e ROS na destruição de tumores. Nessa terapia, moléculas fotossensíveis são ativadas por luz visível e geram as ROS dentro do tecido tumoral. Tais espécies provocam uma

cascata de eventos oxidativos que resultam na morte das células cancerígenas (BUYTAERT, DEWAELE e AGOSTINIS, 2007).

Neste trabalho foram produzidos *scaffolds* poliméricos de PMMA pela técnica *salt leaching* com e sem a incorporação das moléculas de porfirina para propor alternativas de produção de sistemas biomiméticos para aplicações em terapia fotodinâmica para tumores de pele, já que esses *scaffolds* aumentam a área superficial devido a sua estrutura tridimensional com poros interconectados, além da contribuição para o entendimento das propriedades ópticas de novos materiais biomiméticos. Mais especificamente, realizamos um estudo sobre a influência da concentração das moléculas de porfirina sobre as estruturas dos filmes e *scaffolds* formados. Para entender melhor o efeito da concentração das moléculas de porfirina sobre as superfícies das amostras confeccionadas em diferentes concentrações, as características morfológicas foram investigadas por meio das imagens geradas pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de força atômica (MFA). As propriedades ópticas foram investigadas por meio das técnicas: absorção no UV-Vis, emissão de fluorescência e emissão de fluorescência excitada.

## **2 Microscopia de Força Atômica (MFA)**

### **2.1 Breve Histórico e Princípios de Funcionamento**

O MFA, ou microscópio de força atômica, foi desenvolvido por Gerd Binnig e Heinrich Rohrer no início de 1980, e foram recompensados com o prêmio Nobel de física em 1986. Este instrumento forneceu um avanço na capacidade de investigar a matéria em escala atômica.

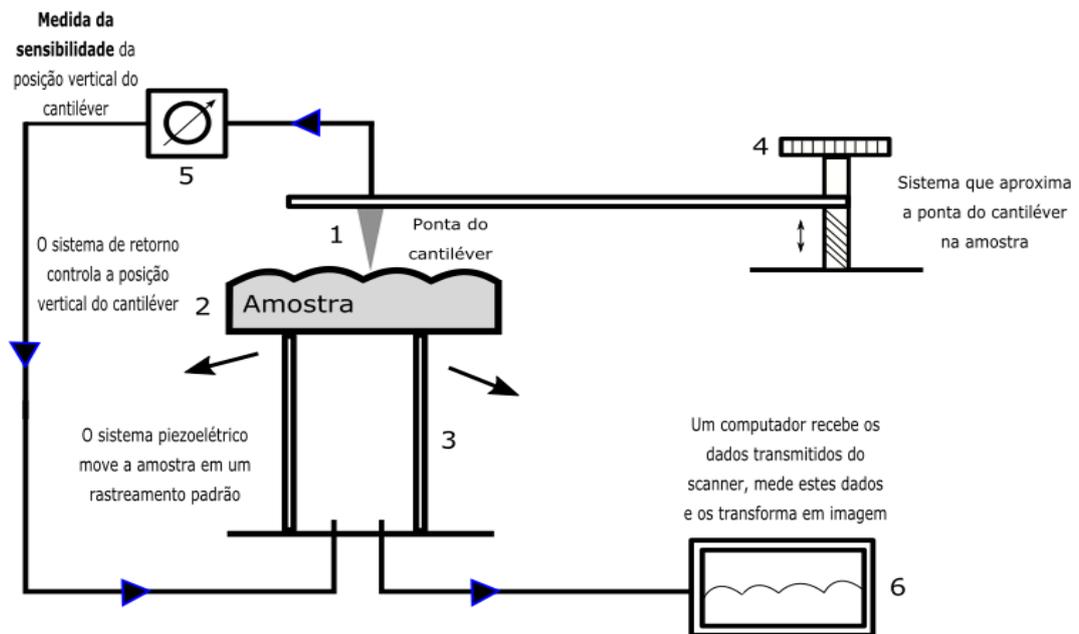
Para a compreensão de suas aplicações é de fundamental importância entender seu princípio de funcionamento. Neste microscópio, as imagens são formadas por meio das forças de atração ou repulsão entre a superfície da amostra e a ponta de um cantiléver que varre a amostra. Esta varredura é feita, por intermédio de um sistema piezoelétrico, com deslocamentos nas posições x, y e z com precisão de décimo de angstrom ( $10^{-8}$  cm - 1 Å), por meio das variações da tensão aplicada no mesmo. O deslocamento é controlado por um circuito de realimentação cuja função é manter a força e/ou altura constante (HERRMANN, 1997).

Nesta varredura emprega-se também um sistema de alinhamento com um feixe laser que incide sobre o cantiléver e reflete em um sensor de quatro quadrantes. Este sensor fornece informações de localização para o sistema de realimentação e controle, que corrige a posição do cantiléver para manter o contato com a amostra durante a varredura e permitir a obtenção da imagem (BERNARDES FILHO e MATTOSO, 2003).

Primeiramente, a ponta do cantiléver é colocada em contato ou muito próximo à superfície da amostra que se deseja investigar, dando origem a uma interação fortemente localizada entre a ponta do cantiléver e a amostra. O sistema piezoelétrico permite a movimentação lateral da amostra em relação ao cantiléver, descrevendo o padrão de varredura. Pelo mecanismo de monitoração, a variação da interação da ponta do cantiléver com a amostra é detectada durante a varredura e esta informação é passada ao sistema de alimentação que controla a separação entre a ponta do cantiléver e a amostra. Este processo é inteiramente controlado por computador, que recebe os dados e os converte em imagem. O sistema de reaproximação posiciona a ponta do cantiléver sobre uma determinada região da amostra, de forma que a ponta do cantiléver fique próximo à região desejada (GHENO e FILHO, 2006).

No diagrama apresentado na figura 2-1, são apresentadas de forma resumida as etapas de funcionamento e operação do MFA.

**Figura 2-1 - Representação das etapas de funcionamento e operação do MFA.**

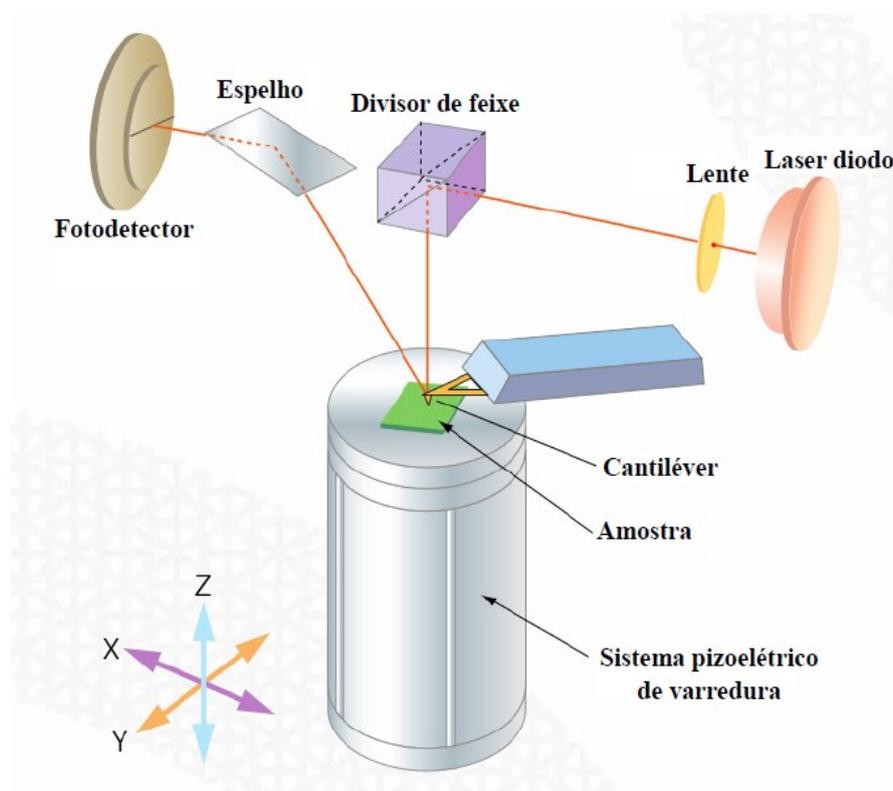


Fonte: Adaptado de (HOWLAND e BENATAR, 1996).

No momento que a varredura ocorre, a intensidade da força de interação entre o cantiléver e a amostra varia com a morfologia da superfície da amostra. Conforme o cantiléver se aproxima da superfície, as forças de interação do cantiléver com a amostra fazem o cantiléver defletir. No decorrer da varredura na amostra a deflexão é monitorada continuamente. O sinal resultante da deflexão do cantiléver é processado pelo computador para gerar um mapa da superfície da amostra. A alteração de altura corresponde precisamente a alteração topográfica da amostra, identificando sua morfologia (GHENO e FILHO, 2006).

A intensidade de interação do cantiléver com a superfície possui um sistema de detecção simples, estável e com baixo ruído. Este sistema é constituído por um laser, um espelho e um fotodetector (Figura 2-2).

Figura 2-2 - Diagrama de funcionamento do microscópio de força atômica.



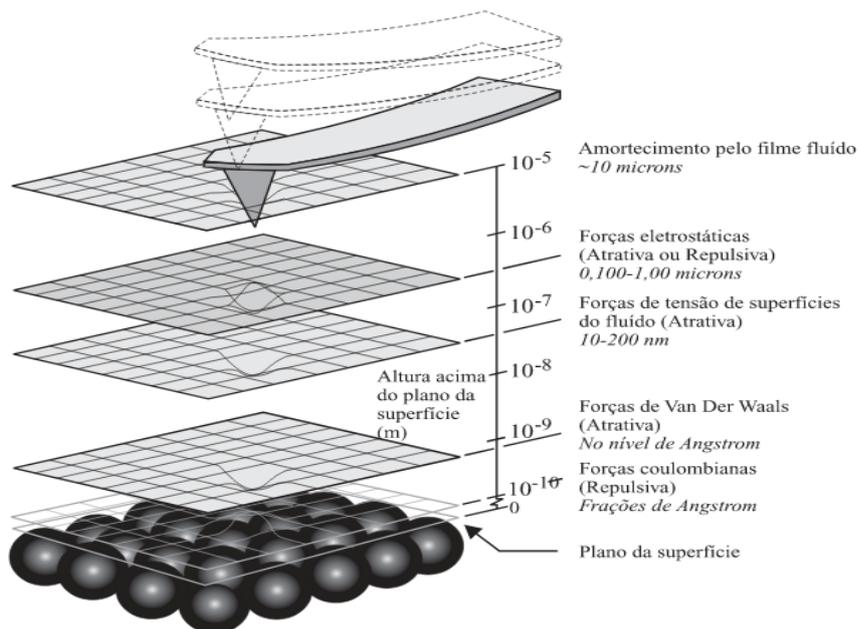
Fonte: (SHIMADZU, 2006).

## 2.2 Modos de Operação e Forças Envolvidas

O microscópio de força atômica permite a obtenção de imagens, mas também a análise de forças e propriedades em escala nanométrica. Para um melhor entendimento deste microscópio é necessário conhecer os modos de operação, uma vez que estes modos definem as forças envolvidas.

Existem diversas forças contribuintes na deflexão do cantiléver em um microscópio de força atômica. Na figura 2-3 estão apresentadas as informações sobre as distâncias de separação da ponta do cantiléver em relação a amostra e as respectivas forças.

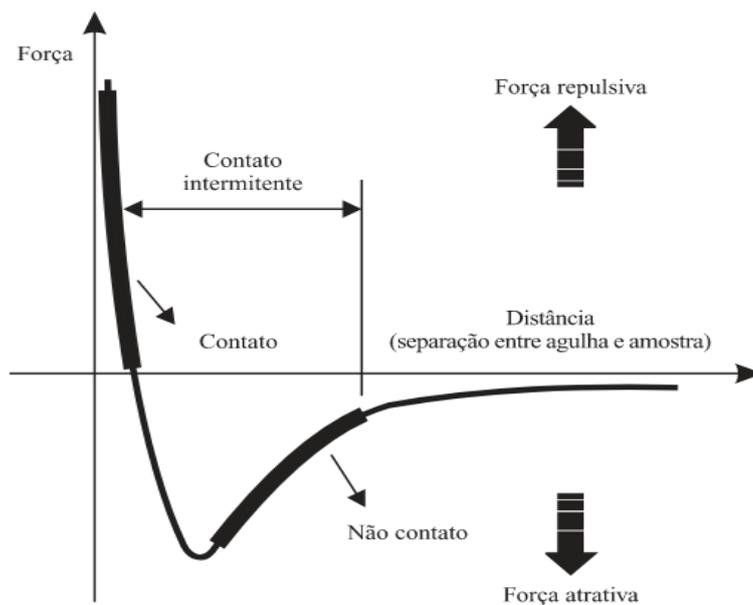
Figura 2-3 - Forças atuantes entre a ponta e a amostra em relação a distância de separação.



Fonte: (HERRMANN, 1997).

Outra maneira de análise de interação é a curva de força como função da distância (Figura 2-4).

Figura 2-4 - Curva de força em relação a distância de separação da ponta e a amostra.



Fonte: (HERRMANN, 1997).

### 2.2.1 Modo Contato

Neste modo de operação a sonda conserva a menor distância possível ao varrer a amostra, nesse caso as forças que atuam são as forças de repulsão, quando a ponta do cantiléver chega perto da amostra, tanto os átomos (prótons e elétrons) da ponta do cantiléver quanto os da amostra se repelem (HERRMANN, 1997).

Calcula-se a força aplicada pela ponta do microscópio de força atômica por meio da deflexão do cantiléver pela constante de mola, no caso do modo contato.

$$\vec{F} = -K \cdot \vec{x} \quad (1)$$

F = força em Newtons (N);

K = constante de mola ( $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ );

X = valor da deflexão do cantiléver.

### 2.2.2 Modo Não-Contato

No modo não-contato utiliza-se o elemento pizoelétrico com uma frequência de oscilação próxima da frequência de ressonância do cantiléver, para preservar o feixe do laser constante no fotodetector, proporcionando uma melhor relação sinal/ruído. As forças envolvidas neste modo são as forças de van der Waals e de dipolo magnético (HERRMANN, 1997).

### 2.2.3 Modo Contato Intermitente

O funcionamento é muito parecido com o modo não-contato, pois neste modo o cantiléver também oscila por um sistema pizoelétrico, próximo a sua frequência de oscilação. Tanto a ponta quanto o cantiléver são colocados próximos a amostra até que o elemento pizoelétrico seja controlado e permitindo que a ponta toque suavemente a amostra (HERRMANN, 1997).

## **3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

### **3.1 Breve Histórico e Aplicações**

O MEV, ou microscópio eletrônico de varredura teve seu início com o trabalho de M. Knoll (1935), descrevendo a concepção do MEV. Em 1938 von Ardenne construiu o primeiro microscópio eletrônico de varredura adaptando bobinas de varredura ao microscópio eletrônico de transmissão. O primeiro microscópio eletrônico de varredura para observação de amostras espessas foi construído em 1942, usando o detector de elétrons secundários para obter a imagem. Em 1939 a empresa Siemens produz o primeiro microscópio de transmissão comercial. Em 1957, pela primeira vez Robertson observa e descreve a estrutura trilaminar de membrana. Em 1965 foi produzido comercialmente pela empresa *Cambridge Scientific Instrument* o primeiro MEV.

Este microscópio eletrônico produz imagens em alta resolução e alta ampliação (cerca de, 300.000X). A alta resolução é devido a maneira com que as imagens são criadas, essas imagens possuem um aspecto tridimensional e são relevantes na avaliação de estruturas superficiais e microanálises elementares. Especialmente é utilizado para análises morfológicas de superfícies de particulados, polímeros, proteínas, sementes, compostos orgânicos e inorgânicos. Possibilita análises de superfícies fraturadas (análise de falhas), mapeamento químico de superfícies, microanálise qualitativa e semi-qualitativa de elementos químicos. Avaliação do tamanho de partículas e porcentagem de fase em microestruturas.

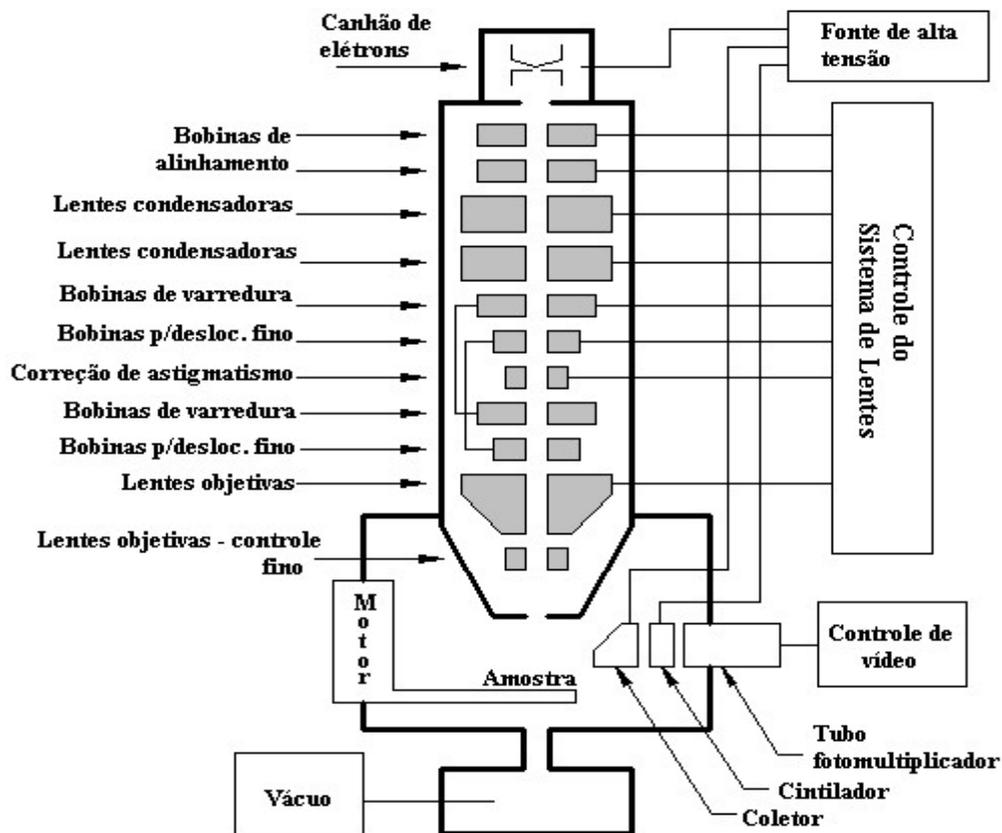
### **3.2 Princípios de Funcionamento**

O princípio do MEV consiste em: (i) emissão de um feixe de elétrons por um filamento de tungstênio; (ii) concentração, controle e redução do feixe por um sistema de lentes eletromagnéticas (consiste de um cilindro de ferro com um furo central através do qual passa o eixo óptico eletrônico do microscópio), diafragmas e bobinas; (iii) incidência sobre a amostra, provocando uma série de emissões de sinais relacionados a interação do feixe de elétrons. Os sinais emitidos encontram-se sob a forma de elétrons (secundários, retroespalhados, absorvidos, transmitidos, difratados)

e de fótons (fotoluminescentes e raios X), os quais são captados por detectores apropriados, sendo amplificados e processados em um sistema analisador específico para cada tipo de sinal (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

O MEV pode ser operado no modo convencional, no qual toda a configuração é mantida em alto vácuo, para que as moléculas do gás não interfiram na trajetória dos elétrons e para minimizar efeitos de contaminação de elétrons. O MEV pode ser operado em baixo vácuo e também permite manter a câmara em pressão mais alta (alto vácuo) (HINRICHS, 2014). Na figura 3-1 contêm um diagrama da coluna e da câmara de um MEV.

Figura 3-1 - Ilustração de um microscópio eletrônico de varredura com componentes existentes.



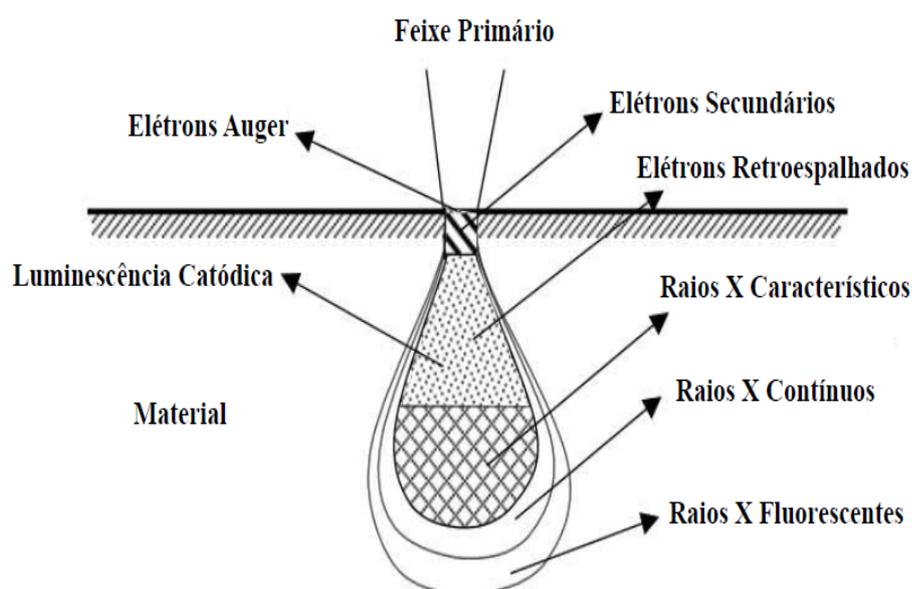
Fonte: (TEIXEIRA, 2013).

A técnica de microscopia eletrônica de varredura permite a obtenção de uma imagem ampliada e tridimensional da amostra a partir da interação de um feixe de elétrons com o material. O feixe de elétrons (elétrons primários) gerado por efeito termoiônico é acelerado através de uma diferença de potencial e colimado através de uma coluna óptico-eletrônica sendo conduzido à câmara que contém a amostra. Este

feixe de elétrons ao focalizar um ponto da amostra gera sinais que são captados e ampliados fornecendo um sinal elétrico que gera a imagem. Conforme o feixe varre a área em análise, uma imagem virtual vai sendo formada ponto a ponto (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

A interação do feixe de elétrons com a amostra gera uma variedade de sinais conforme pode ser observado na figura 3-2. Na microscopia eletrônica de varredura para a obtenção da imagem são captados elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios X característicos.

**Figura 3-2 - Diagrama esquemático dos sinais resultantes pela interação de um feixe de elétrons com um alvo sólido (amostra).**



Fonte: (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

Os elétrons primários (EP - *Primary Beam*), são os elétrons gerados pelo próprio microscópio eletrônico de varredura e que incidem sobre a amostra. Estes elétrons são gerados por um filamento aquecido, acelerados por um forte campo elétrico e colimados (focalizados) na superfície do material a ser analisado (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

Os elétrons secundários (SE - *Secondary Electrons*) são resultantes da interação inelástica do feixe primário da amostra. Nestas colisões inelásticas os elétrons do feixe perdem energia que é transferida para os elétrons da amostra que em se tratando de elétrons das últimas camadas (fracamente ligados ao núcleo),

podem ser removidos do átomo e passam a se movimentar através do material (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

Quando os elétrons são removidos próximos à superfície podem ser ejetados da amostra, sendo os demais absorvidos pelos átomos adjacentes. Normalmente estes são elétrons de baixa energia (inferior a 50 eV) e por causa disso a sua origem está próxima à superfície (de modo geral, menor que 10 nm de profundidade). A consequência direta disto é que, em se tratando dos SE, o contraste nas imagens resulta da topografia da amostra, sendo os picos brilhantes e os vales escuros (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

Os elétrons retroespalhados (BSE - *Backscattered Electrons*) são elétrons do feixe primário que, após choques elásticos (interações com mudanças de direção sem perda acentuada de energia) com o núcleo dos átomos da amostra, escaparam do material. Estes elétrons de alta energia (50 eV até a voltagem de aceleração do feixe primário) resultam em um elevado volume específico de interação, e em uma imagem com menor resolução originada pelo SE. O contraste nas imagens obtidas por BSE decorre das diferenças de número atômico dos elementos que compõem a amostra: números atômicos mais elevados retroespalham mais elétrons resultando em pontos mais brilhantes na amostra. Desta forma, a imagem virtual resultante contém informação sobre a heterogeneidade da composição da amostra (ORÉFICE, PEREIRA e MANSUR, 2012).

## 4 Fundamentos da Fotofísica

### 4.1 Transições Eletrônicas em Moléculas Poliatômicas

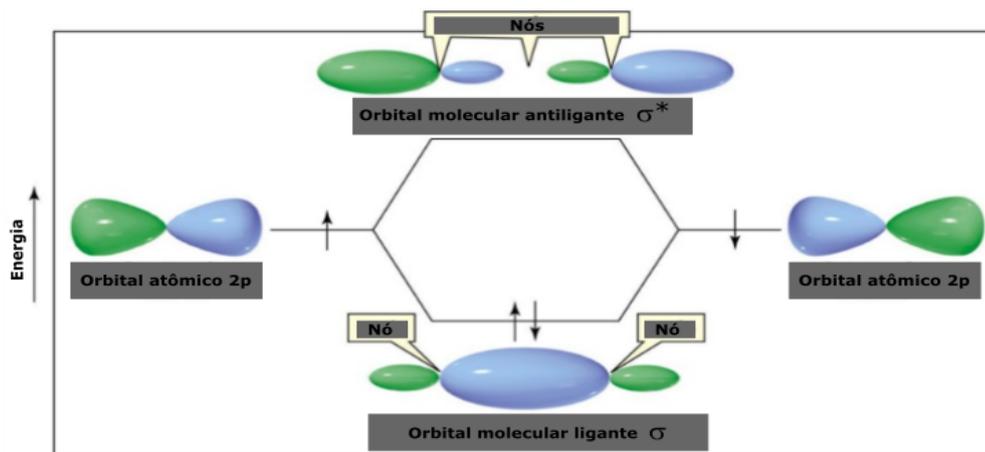
A estrutura do átomo é formada pelo núcleo, que é constituído por duas partículas (prótons e nêutrons), e pela eletrosfera, que detém os elétrons. Quando os átomos estão isolados estes apresentam níveis de energia bem definidos. Sendo assim, a região do espaço com maior probabilidade de encontrar o elétron são nos orbitais atômicos, sendo os mais comuns denominados de: s, p, d e f (VALEUR, 2001).

Os átomos necessitam de oito elétrons na última camada eletrônica ou camada de valência (regra do octeto), em razão disso os átomos interligam-se buscando a estabilidade. A molécula é um grupo de átomos, iguais ou diferentes, que se mantêm ligados, ou seja, é uma sobreposição dos orbitais atômicos da camada de valência que proporciona a origem dos orbitais moleculares. Os orbitais moleculares ligantes são: sigma ( $\sigma$ ), pi ( $\pi$ ), n e os orbitais antiligantes  $\sigma^*$  e  $\pi^*$  (VALEUR, 2001).

O orbital  $\sigma$  pode ser formado por meio de três combinações possíveis de orbitais atômicos. A primeira combinação acontece por intermédio da sobreposição de dois orbitais atômicos s, a segunda pela combinação de um orbital s com um orbital p e por fim pela sobreposição colinear de dois orbitais atômicos p. Abaixo encontra-se uma ilustração de uma das combinações (Figura 4-1). Ao absorver um fóton com energia adequada, o elétron  $\sigma$  é elevado para um orbital antiligante denominado  $\sigma^*$ , e essa transição é representada pelo símbolo  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  (VALEUR, 2001).

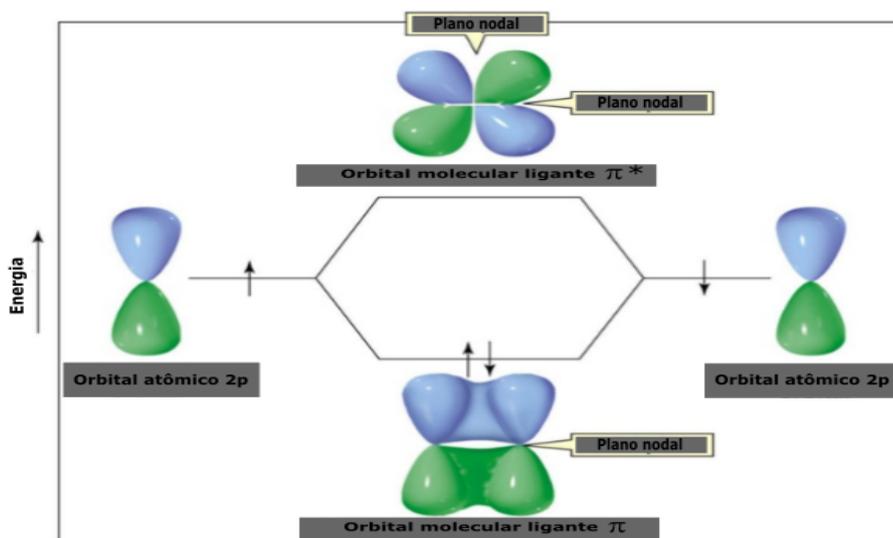
Os orbitais  $\pi$  são formados por uma única combinação de orbitais atômicos, compondo-se pela sobreposição lateral de dois orbitais p (Figura 4-2). No momento em que o elétron  $\pi$  absorve um fóton de energia adequada, este é levado para um orbital antiligante denominado  $\pi^*$ . Essa transição é representada por  $\pi \rightarrow \pi^*$  (VALEUR, 2001).

Figura 4-1 - Representação da formação do orbitais  $\sigma$  (ligante e antiligantes), pela combinação de dois orbitais atômicos 2p.



Fonte: (SILVEIRA, 2013).

Figura 4-2 - Representação da formação do orbitais  $\pi$  (ligante e antiligantes), pela combinação de dois orbitais atômicos 2p.



Fonte: (SILVEIRA, 2013).

As moléculas podem dispor de elétrons não ligantes, ou seja, um orbital molecular cuja ocupação por elétrons não aumenta nem diminui a ordem de ligação entre os átomos envolvidos. Para esses elétrons não ligantes diz-se que eles estão localizados no orbital molecular n. A elevação de um elétron não ligante para um antiligante é possível e as transições associadas é representadas pelos símbolos  $n \rightarrow \sigma^*$  e  $n \rightarrow \pi^*$  (VALEUR, 2001).

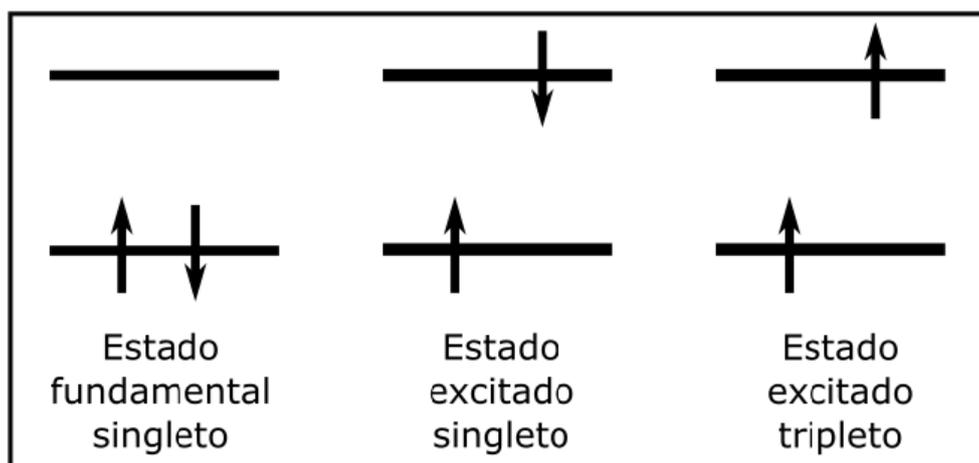
A energia dessas transições eletrônicas geralmente está na seguinte ordem:



Utiliza-se os termos HOMO (orbital molecular mais alto ocupado) e LUMO (orbital molecular mais baixo desocupado), para os orbitais moleculares. O HOMO se refere à molécula no seu estado fundamental, ou seja, os orbitais ligantes  $\pi$ ,  $\sigma$  e  $n$ . Enquanto o LUMO se refere aos orbitais antiligantes  $\pi^*$  e  $\sigma^*$  (VALEUR, 2001).

Com relação aos estados eletrônicos eles são chamados de singlete e tripleto, dependendo da configuração dos spins de todos os elétrons da molécula. Se a molécula é composta por pares de elétrons de spins paralelos ou emparelhados (dois up ou dois down na molécula) os estados eletrônicos são chamados de tripleto, onde  $T_0$  refere-se ao estado fundamental e  $T_1, T_2...$  aos estados excitados. Se a distribuição dos spins na molécula for, up e down, ou seja, um para cima e um para baixo os estados são chamados de singlete, onde  $S_0$  refere-se ao estado fundamental e  $S_1, S_2...$  aos estados excitados (VALEUR, 2001). A figura 4-3 demonstra os estados singletos e tripletos de uma molécula, com seus elétrons de valência.

Figura 4-3 - Representação dos estados singlete e tripleto de uma molécula.



Fonte: Adaptado de (VALEUR, 2001).

Uma transição é dita singlete-singlete, quando os estados inicial e final que participam da transição são singletos. Se os estados forem tripletos a transição é denominada tripleto-tripletto (VALEUR, 2001).

## 4.2 Luminescência

A luminescência é o fenômeno onde ocorre a emissão de fótons (radiação ultravioleta, visível ou infravermelha) por um determinado material ao retornar de um estado excitado para um estado de menor energia. A palavra luminescência foi introduzida pelo físico Eilhardt Wiedemann em 1888, com o intuito de descrever fenômenos de luz em oposição à incandescência. De acordo com o modo de excitação, o fenômeno da luminescência recebe diferentes denominações (Tabela 1).

**Tabela 1 - Fenômenos da luminescência provenientes de diferentes modos de excitação.**

<b>Modo de excitação</b>	<b>Fenômeno</b>
Fótons	Fotoluminescência
Radiações ionizantes	Radioluminescência
Raios catódicos	Catodoluminescência
Calor	Termoluminescência
Processos químicos	Quimiluminescência
Processos biológicos	Bioluminescência
Atrito	Triboluminescência
Ultrassom	Sonoluminescência
Campo elétrico	Eletroluminescência

## 4.3 Fundamentos de Excitação e Emissão de Fluorescência

Fluorescência é um membro da luminescência onipresente de processos nos quais moléculas suscetíveis emitem luz de estados eletronicamente excitados criados por um mecanismo físico (por exemplo, absorção de luz), mecânico (fricção) ou químico. A geração de luminescência através da excitação de uma molécula por fótons de luz ultravioleta ou visível é um fenômeno denominado fotoluminescência, que é formalmente dividido em duas categorias, fluorescência e fosforescência, dependendo da configuração eletrônica do estado excitado e da via de emissão. A fluorescência é a propriedade de alguns átomos e moléculas de absorver a luz em um determinado comprimento de onda e subsequentemente emitir luz de maior

comprimento de onda após um breve intervalo, denominado tempo de vida da fluorescência. O processo de fosforescência ocorre de maneira semelhante à fluorescência, mas com um tempo de vida maior no estado excitado (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

O processo de fluorescência é governado por três eventos importantes, todos os quais ocorrem em escalas de tempo diferentes (Tabela 2). A excitação de uma molécula suscetível por um fóton de entrada acontece em femtossegundos ( $10^{-15}$  segundos), enquanto o relaxamento vibracional de elétrons de estado excitado ao nível de energia mais baixo é muito mais lento e pode ser medido em picossegundos ( $10^{-12}$  segundos). O processo final, emissão de um fóton de maior comprimento de onda e retorno da molécula ao estado fundamental, ocorre no período de tempo relativamente longo de nanossegundos ( $10^{-9}$  segundos) (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

**Tabela 2 - Tipos de transição para cada processo e escala de tempo, S=Singleto e T=Tripleto.**

<b>Transição</b>	<b>Processo</b>	<b>Escala de tempo (s)</b>
S(0) => S(1) ou S(n)	Absorção (excitação)	$10^{-15}$
S(n) => S(1)	Conversão interna	$10^{-14}$ a $10^{-10}$
S(1) => S(1)	Relaxação vibracional	$10^{-12}$ a $10^{-10}$
S(1) => S(0)	Fluorescência	$10^{-9}$ a $10^{-7}$
S(1) => T(1)	Cruzamento intersistema	$10^{-10}$ a $10^{-8}$
S(1) => S(0)	Relaxação não-radiativa	$10^{-7}$ a $10^{-5}$
T(1) => S(0)	Fosforescência	$10^{-3}$ a 100
T(1) => S(0)	Relaxação não-radiativa	$10^{-3}$ a 100

Fonte: (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

A fluorescência é geralmente estudada com moléculas aromáticas policíclicas altamente conjugadas que existem em qualquer um dos níveis de energia no estado fundamental, cada uma associada a um arranjo específico de orbitais moleculares eletrônicos. O estado eletrônico de uma molécula determina a distribuição de carga negativa e a geometria molecular geral. Para qualquer molécula particular, existem vários estados eletrônicos diferentes, dependendo da energia de elétrons e o total de simetria de vários estados de spin eletrônico. Cada estado eletrônico é ainda

subdividido em vários níveis de energia vibracional e rotacional associados aos núcleos atômicos e orbitais de ligação. O estado fundamental para a maioria das moléculas orgânicas é o singlete, no qual todos os elétrons são pareados por *spin* (têm *spin* opostos). À temperatura ambiente, pouquíssimas moléculas têm energia interna suficiente para existir em qualquer outro estado que não o nível vibracional mais baixo do estado fundamental, e assim, os processos de excitação geralmente se originam desse nível de energia (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

A categoria de moléculas capazes de sofrer transições eletrônicas que resultam em fluorescência são conhecidas como corantes. Os corantes que são conjugados com uma macromolécula maior (tal como um ácido nucleico, lípido, enzima ou proteína) através de adsorção ou ligações covalentes são denominados fluoróforos. Em geral, os fluoróforos são divididos em duas classes, denominadas intrínsecas e extrínsecas. Os fluoróforos intrínsecos, como aminoácidos aromáticos, neurotransmissores, porfirinas e proteínas fluorescentes verdes, são aqueles que ocorrem naturalmente. Os fluoróforos extrínsecos são corantes sintéticos ou bioquímicos modificados que são adicionados a uma amostra para produzir fluorescência com propriedades espectrais específicas (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

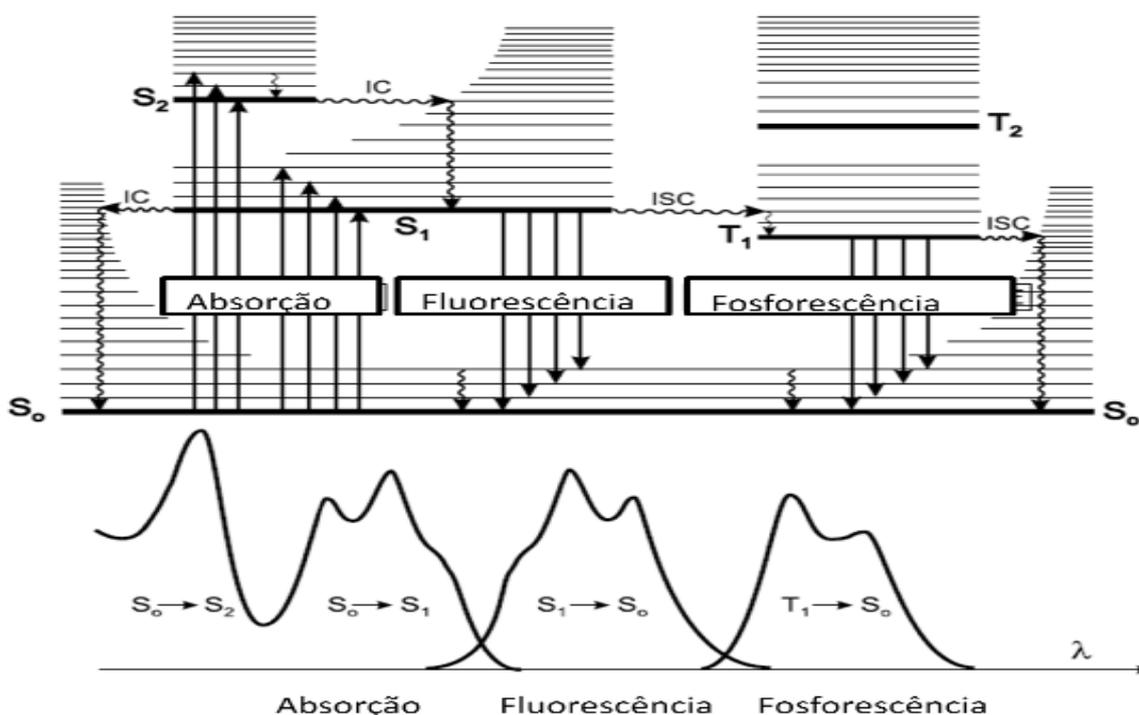
#### **4.4 Absorção, Excitação e Emissão**

Absorção de energia nos corantes ocorre entre os níveis de energia vibracional e rotacional dos estados excitados em diferentes orbitais moleculares. Os vários níveis de energia envolvidos na absorção e emissão de luz por um fluoróforo são classicamente apresentados por um diagrama de energia de Perrin-Jablonski (Figura 4-4). Um diagrama típico de Perrin-Jablonski ilustra o estado fundamental singlete (S(0)), o primeiro (S(1)) e o segundo (S(2)) estados singletos excitados como uma pilha de linhas horizontais (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

Na Figura 4-4, as linhas mais espessas representam os níveis de eletrônicos de energia, enquanto as linhas mais finas os estados de energia vibracional. As transições entre os estados são ilustradas como setas retas ou onduladas, dependendo se a transição está associada à absorção ou emissão de um fóton (seta reta) ou resulta de uma conversão interna molecular ou processo de relaxamento não

radiativo (setas onduladas). Setas verticais para cima são utilizadas para indicar a natureza instantânea dos processos de excitação, enquanto as setas onduladas são reservadas para aqueles eventos que ocorrem em uma escala de tempo muito maior (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

Figura 4-4 - Diagrama de Perrin-Jablonski, IC = conversão interna, ISC = cruzamento intersistema,  $S_0$  = estado fundamental singlete,  $S_1$  = primeiro estado excitado singlete,  $S_2$  = segundo estado excitado singlete,  $T_0$  = estado fundamental tripleto,  $T_1$  = primeiro estado excitado tripleto e  $T_2$  = segundo estado excitado tripleto.



Fonte: (VALEUR, 2001).

A absorção de luz ocorre muito rapidamente (aproximadamente um femtossegundo, o tempo necessário para o fóton percorrer um único comprimento de onda) em quantidades discretas denominadas quanta e corresponde à excitação do fluoróforo do estado fundamental para um estado excitado. Da mesma forma, a emissão de um fóton através de fluorescência ou fosforescência também é medida em termos de quanta. A energia em um quantum (Lei de Planck) é expressa pela equação:

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad (2)$$

onde  $E$  é a energia,  $h$  é a constante de Planck,  $\nu$  a frequência,  $\lambda$  o comprimento de onda do fóton de entrada e  $c$  é a velocidade da luz. A Lei de Planck determina que a energia de radiação de um fóton absorvido é diretamente proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda, ou seja, para menores comprimentos de onda a energia é maior. O absorção de um fóton de energia por um fluoróforo, acontece em consequência da interação do campo elétrico oscilante com as cargas (elétrons) presente na molécula. Se o fóton absorvido contém mais energia do que o necessário para um simples transição eletrônica, o excesso de energia é geralmente convertido em energia vibracional e rotacional. No entanto, se ocorrer uma colisão entre uma molécula e um fóton com energia insuficiente para promover uma transição, não ocorre absorção (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

Imediatamente após a absorção de um fóton, vários processos ocorrerão com probabilidades variadas, mas o mais provável será o relaxamento para o nível mais baixo de energia vibracional do primeiro estado excitado ( $S(1) = 0$ ; Figura 4-4). Este processo é conhecido como conversão interna ou relaxamento vibracional (perda de energia na ausência de emissão de luz) e geralmente ocorre em um picosegundo ou menos. O excesso de energia vibracional é convertido em calor, que é absorvido por moléculas vizinhas ao colidir com o fluoróforo no estado excitado (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

Uma molécula excitada existe no menor estado excitado singleto ( $S(1)$ ) por períodos na ordem de nanossegundos (o período de tempo mais longo no processo de fluorescência) antes de finalmente relaxar para o estado fundamental. Se o relaxamento deste estado é acompanhado pela emissão de um fóton, o processo é formalmente conhecido como fluorescência (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

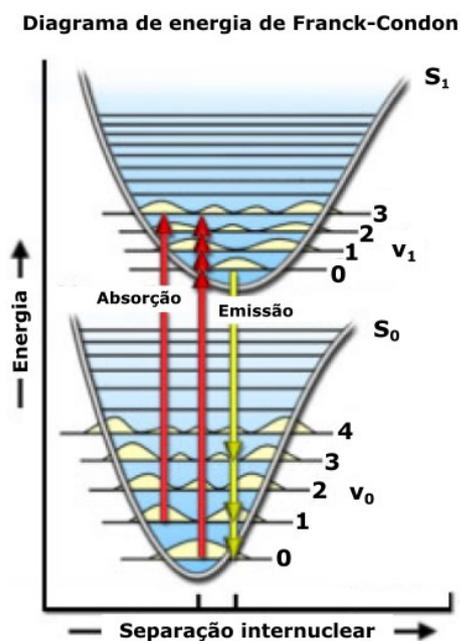
Várias outras vias de relaxamento que têm diferentes graus de probabilidade competem com o processo de emissão de fluorescência. A energia do estado excitado pode ser dissipada não radiativamente como calor, o fluoróforo excitado pode colidir com outra molécula de transferência de energia em um segundo tipo de processo não-radiativo, ou um fenômeno conhecido como cruzamento intersistema para o estado tripleto excitado mais baixo. O último evento é relativamente raro, mas no final resulta na emissão de um fóton através de fosforescência ou uma transição de volta para o estado excitado singleto que rende fluorescência tardia. Transições do estado

excitado do tripleto para o estado fundamental do singleto são proibidas (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

A baixa probabilidade dos cruzamento intersistemas surge do fato de que as moléculas devem primeiro sofrer conversão de spin para produzir elétrons desemparelhados. A importância primária do estado tripleto é o alto grau de reatividade química exibido por moléculas nesse estado, que frequentemente resulta em fotodegradação e na produção de radicais livres prejudiciais. Em amostras biológicas, o oxigênio é um agente de extinção muito eficaz para fluoróforos no estado tripleto. A molécula de oxigênio no estado fundamental, que é um tripleto, e pode ser excitado para um estado singleto reativo, provocando reações que exibem um efeito fototóxico nas células vivas (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

A probabilidade de uma transição ocorrer do estado fundamental (S(0)) para o estado excitado singleto (S(1)) depende dos estados de energia vibracional e rotacional quando um elétron reside no estado fundamental para aqueles presente no estado excitado, conforme descrito na Figura 4-5. O diagrama de energia de Franck-Condon ilustrado na figura 4-5 apresenta a distribuição da probabilidade da energia vibracional entre os vários níveis no solo (S(0)) e primeiro excitado (S(1)) estados para uma molécula hipotética. Transições de excitação (linhas vermelhas) do estado fundamental para o estado excitado ocorre em um período de tempo tão curto (femtosssegundos) que a distância internuclear associada aos orbitais de ligação não tem tempo suficiente para mudar, e assim as transições são representadas como linhas verticais. Este conceito é referido como o princípio de Franck-Condon. O comprimento de onda da absorção máxima (linha vermelha no centro) representa a separação internuclear mais provável no estado fundamental para um nível vibracional permitido no estado excitado (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

Figura 4-5 - Diagrama de energia de Franck-Condon.  $S_0$  = estado fundamental singlete,  $S_1$  = primeiro estado excitado singlete,  $v_0$  = níveis vibracionais do estado eletrônico  $S_0$  e  $v_1$  = níveis vibracionais do estado eletrônico  $S_1$ .



Fonte: (HERMAN, LAKOWICZ, et al., 2011).

À temperatura ambiente, a energia térmica não é adequada para povoar significativamente estados de energia excitados e o estado mais provável para um elétron é o estado fundamental ( $S(0)$ ), que contém vários estados de energia vibracional distintos, cada um com níveis de energia diferentes. As transições mais favorecidas serão aquelas onde as probabilidades de densidade de elétrons rotacionais e vibracionais se sobrepõem ao máximo nos estados fundamentais e excitados. No entanto, fótons incidentes de comprimento de onda variável podem ter energia suficiente para serem absorvidos e frequentemente produzem transições de outras distâncias de separação internuclear e níveis de energia vibracional (HERMAN, LAKOWICZ, et al., 2011).

Os espectros de excitação e emissão podem ser considerados como funções de distribuição de probabilidade que um fóton de dada energia quântica será absorvido e, finalmente, permitirá que o fluoróforo emita um segundo fóton na forma de radiação de fluorescência (HERMAN, LAKOWICZ, et al., 2011).

## 4.5 Regra e Desvio de Stokes

A transição  $S(0) = 0$  para  $S(1) = 0$  é geralmente a mesma para a absorção e fluorescência. No entanto, o espectro de fluorescência é localizado em comprimentos de onda maiores (energia mais baixa) que o espectro de absorção, em razão da perda de energia no estado excitado devido à relaxação vibracional. De acordo com a regra de Stokes, o comprimento de onda de emissão de fluorescência deve ser sempre maior que o da absorção. Entretanto, na maioria dos casos, o espectro de absorção intercepta parcialmente o espectro de fluorescência, isto é, uma fração de luz é emitida em comprimento de onda menor que a luz absorvida. Isto pode ser explicado pelo fato de que em temperatura ambiente uma pequena fração de moléculas está em um nível vibracional maior que o  $S(0) = 0$ , tanto no estado fundamental como no estado excitado. Em temperaturas baixas, essa violação da lei de Stokes deve desaparecer (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

Em geral, as diferenças entre os níveis vibracionais são similares nos dois: fundamental e excitado, tanto que o espectro de fluorescência frequentemente apresenta a primeira banda de absorção (regra do espelho). A diferença entre o máximo da primeira banda e o máximo de fluorescência é chamado de desvio de Stokes (HERMAN, LAKOWICZ, *et al.*, 2011).

## 4.6 Transições Radiativas e Não-Radiativas

Além dos processos de decaimento radiativos (absorção, fluorescência e fosforescência), processos de decaimento não-radiativos podem ocorrer antes da molécula excitada retornar ao estado fundamental, tais como: transferência de carga, mudanças conformacionais, transferência de elétron, transferência de próton, transferência de energia, mudanças fotoquímicas e fluorescência atrasada (VALEUR, 2001; LAKOWICZ, 1999).

Para os materiais orgânicos esses processos radiativos e não-radiativos se dividem em intramoleculares e intermoleculares. Os processos intramoleculares ocorrem na mesma cadeia polimérica onde ocorreu a excitação, enquanto que nos intermoleculares considera os processos entre moléculas de diferentes materiais, como por exemplo, os filmes poliméricos. Antes da emissão, a amostra passa por um

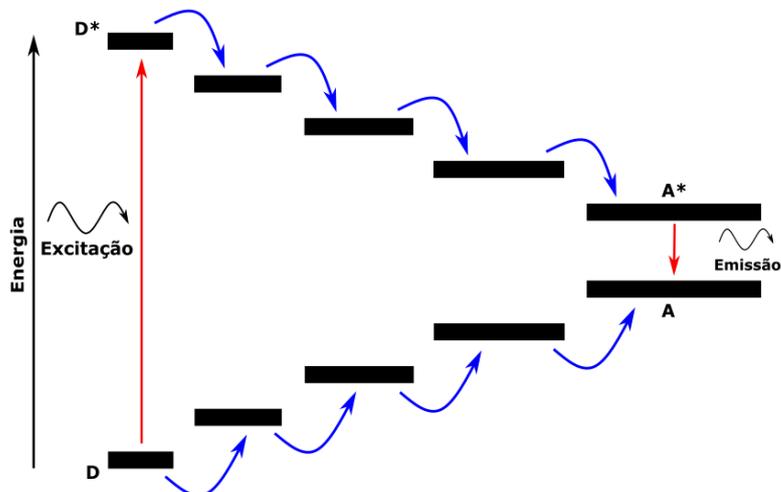
processo de relaxação energética, onde ocorre a migração do par elétron-buraco para estados de menor energia. Alguns mecanismos são propostos para explicar essa migração de portadores, tais como: difusão de carga, "*hopping*", tunelamento e mecanismo de Förster, sendo que durante o processo de relaxação os portadores de cargas podem ainda sofrer uma recombinação não-radiativa emitindo fônons ou serem capturados por defeitos (*traps*) (MARLETTA, 2001).

Entre os segmentos conjugados, os mecanismos de transferência de energia na forma não-radiativa que se destacam são os de migração via "*hopping*" e o mecanismo de Förster. No mecanismo de "*hopping*" a transferência de energia entre os estados ocorre por tunelamento quântico intermediado por fônons. Consiste no transporte de cargas via saltos termicamente ativados, onde o portador de carga se move entre moléculas de diferentes comprimentos de conjugação saltando ("tunelando") as barreiras de energia entre os estados localizados no interior do polímero. A probabilidade do salto depende da distância e da diferença de energia entre os estados inicial e final (ROTH e CARROLL, 2015).

Já o mecanismo proposto por Förster (Figura 4-6) em 1959 propõe que a transferência não-radiativa de energia é devido a interação dipolo-dipolo entre uma molécula doadora (D no estado fundamental e D\* no estado excitado) e uma molécula aceitadora (A no estado fundamental e A\* no estado excitado). A transferência de energia ocorre mediante a perturbação dos movimentos dos elétrons de D\* sobre A, ocasionando uma ressonância entre as oscilações do campo elétrico do estado excitado (D\*) e do estado fundamental (A). A energia da molécula excitada (doadora D\*) transfere energia para outra molécula no estado fundamental (aceitadora A\*). Esse processo de transferência depende basicamente da separação entre essas moléculas (como esse mecanismo não requer contato físico entre D\* e A, a transferência de energia ocorre entre uma distância de 1 a 10 nm e em uma escala de tempo de  $10^{-9}$  s), da orientação relativa entre os momentos de dipolo do doador e do aceitador e da sobreposição entre os espectros de emissão do doador e o espectro de absorção do aceitador (FÖRSTER, 1959).

A transferência de energia (Figura 4-6) envolve o decaimento de D\* e a excitação do A, simultaneamente, como mostra a representação:  $D^*+A \rightarrow D+A^*$ .

Figura 4-6 - Representação da transferência não-radiativa de energia entre segmentos de diferentes graus de conjugação.



Fonte: Adaptado de (SILVA, 2016).

Após a excitação óptica a molécula excitada pode transferir energia para uma molécula vizinha com maior grau de conjugação. Uma vez tendo recebido esta energia a molécula vizinha passa para o estado excitado e pode transferir a energia para outra com grau ainda maior de conjugação e assim sucessivamente até se deparar com uma molécula na qual a probabilidade de transição radiativa seja maior que a probabilidade de transição não radiativas via mecanismo de Förster, ocorrendo então a emissão de luz, como mostra a figura 4-6 (SILVA, 2016).

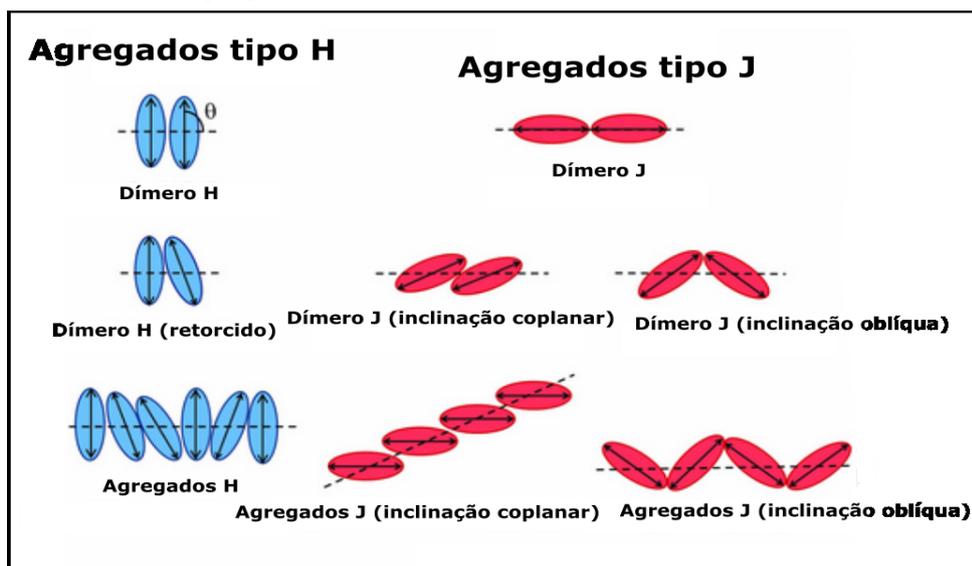
## 4.7 Agregados

No estado fundamental as moléculas dispersas em solução ou em matriz sólida podem interagir entre elas formando uma nova espécie, denominada agregados, por exemplo: dímeros, trímeros, entre outros. Esses agregados são formados principalmente pela força atrativa de Van der Waals entre as moléculas. Conseqüentemente a concentração torna-se uma grandeza relevante na formação dos agregados, uma vez que a probabilidade de interação das moléculas é maior em altas concentrações (PRADEEP, 2007).

Os agregados apresentam propriedades espectroscópicas e estrutura interessantes para possíveis aplicações tecnológicas, alguns apresentam um alto ordenado das moléculas, conhecidos como agregados H e J. Esses agregados são

formados por meio de um forte acoplamento entre os monômeros que se alinham em uma determinada direção. Os agregados H se acoplam frente a frente e os J lado a lado (MAITI, MAZUMDAR e PERIASAMY, 1998). A figura 4-7 apresenta uma ilustração da formação dos agregados tipo H e J.

Figura 4-7 - Formação dos agregados tipo H e J.



Fonte: Adaptado de (BARANYAIOVÁ e BUJDÁK, 2018).

A detecção desses agregados pode ser feita por várias técnicas, na espectroscopia de absorção eletrônica quando o espectro de absorbância apresenta um deslocamento para menores comprimentos de onda em relação ao monômero, ou seja, maiores frequências é um forte indicativo da formação de agregado tipo H, sendo esse deslocamento denominado de hipsocrômico ou *blue shift*, e quando apresenta deslocamento para maiores comprimentos de onda, ou seja, menores frequências é um forte indicativo da formação de agregados tipo J, esse deslocamento é denominado batocrômico ou *red shift*. Em medidas de emissão de fluorescência a presença de agregados, geralmente apresenta um espectro deslocado para maiores comprimentos de onda (SPANNO e SILVA, 2014).

## **5 Materiais Utilizados e Técnicas Experimentais**

### **5.1 Materiais Utilizados**

#### **5.1.1 Porfirina**

##### **5.1.1.1 Histórico e Nomenclaturas**

Os tetrapirroles representam uma grande conquista da evolução química, já que são semelhantes a outras unidades moleculares primordiais, como as porfirinas, as clorinas e os corroles. Eles envolvem os processos essenciais que sustentam os sistemas vivos e são essenciais para muitos grupos prostéticos, desempenhando funções chave para os caminhos bioenergéticos, como a fotossíntese. Eles também medeiam conversões catalíticas e o transporte ou armazenamento de gases respiratórios (AUWÄRTER, 2015).

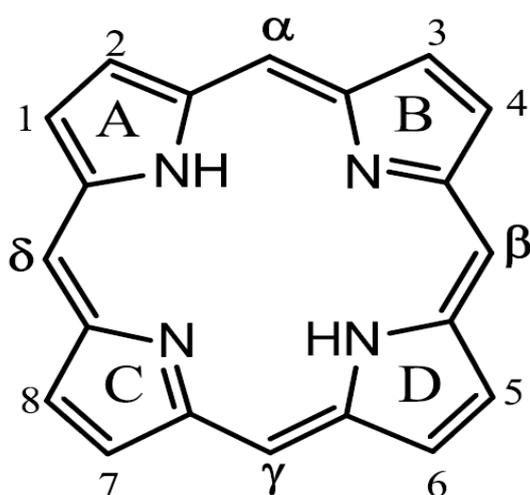
As porfirinas são estudadas a mais de 50 anos, no entanto nas últimas décadas esses estudos intensificaram-se devido ao interesse em sintetizar e compreender as propriedades de porfirinas com diferentes conformações estruturais, tais como porfirinas expandidas, contraídas e isoméricas. Essas modificações estruturais resultam em mudanças acentuadas nas propriedades ópticas e de coordenação iônica, tornando-os potencialmente adequados para uma ampla gama de aplicações (MACK, 2016).

A estrutura básica, comum a todas as moléculas de porfirina conhecida como macrociclo tetrapirrólico foi proposta pela primeira vez por Küster em 1912, mas não foi muito bem aceita pela comunidade científica, já que consideravam que um anel tão grande deveria ser instável (COOK, BREWER e WONG-NG, 2017). Somente em 1929 Fischer, veio confirmar essa estrutura, ao sintetizar o grupo heme.

A molécula de porfirina é formada por um anel macrocíclico tetrapirrólico conhecido como anel porfirínico, este anel é constituído de quatro grupos pirróis ligados entre si por átomos de carbono (denominados mesocarbonos) através de pontes metínicas (-CH=), e estruturalmente estabilizado por um substituinte central ligado aos átomos de nitrogênio dos grupos pirrólicos.

O primeiro sistema de nomenclatura para compostos macrocíclicos tetrapirrólicos foi desenvolvido por Hans Fischer. Neste sistema, as unidades pirrólicas são identificadas pelas letras A, B, C e D. Cada unidade pirrólica é constituída pelos carbonos  $\beta$ , numeradas de 1 a 8, e pelos carbonos  $\alpha$  adjacentes aos azotos, que não se apresentam numerados. Os carbonos das pontes metino interpirrólicas, designados carbonos meso, são representados pelas letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  (Figura 5-1) (MOSS, 1988).

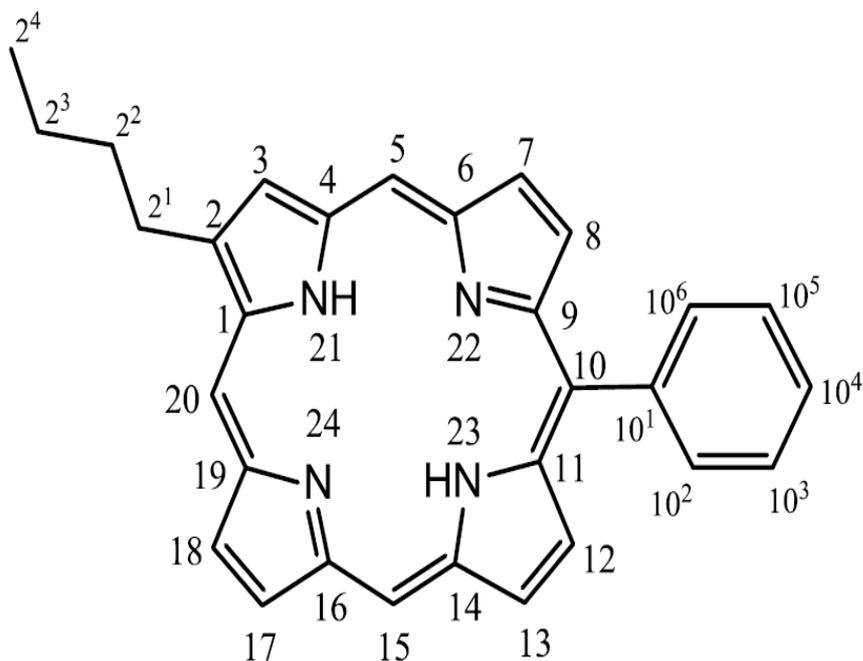
Figura 5-1 - Sistema de numeração do macrociclo tetrapirrólico proposto por Hans Fischer.



Fonte: Modificado de (MOSS, 1988).

Com o desenvolvimento da química das porfirinas, o sistema de Fischer tornou-se insuficiente. Desta forma, para eliminar as ambiguidades resultantes da nomenclatura trivial desenvolveu-se em 1979 um sistema de nomenclatura proposto pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Neste sistema, os carbonos são numerados de 1 a 20, onde as posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18 correspondem aos carbonos  $\beta$ , as posições 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 aos carbonos  $\alpha$  pirrólicos e as posições 5, 10, 15 e 20 aos carbonos meso. Este sistema também inclui a numeração dos azotos pirrólicos de 21 a 24 (Figura 5-2). Quando o macrociclo é substituído, os grupos substituintes são referenciados pelo(s) número(s) do(s) átomo(s) de carbono em que aconteceu a substituição, sendo o número de carbonos do grupo substituinte representado em expoente (MOSS, 1988).

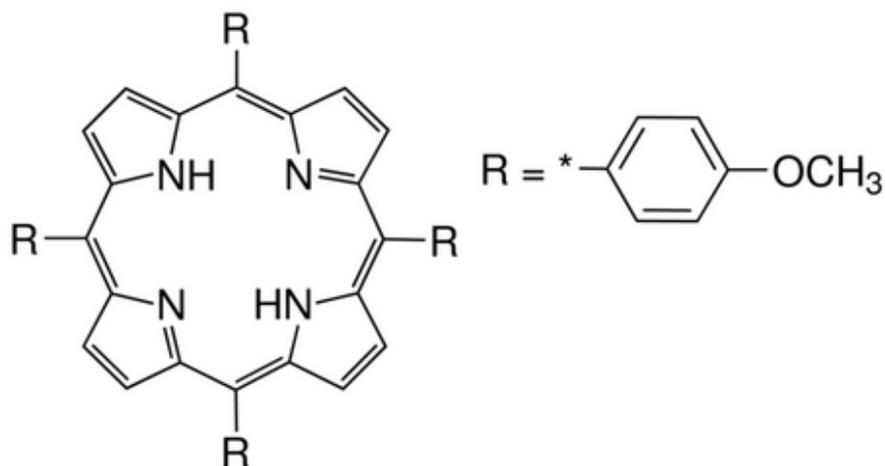
Figura 5-2 - Sistema de numeração do macrociclo base e substituintes proposto pela IUPAC.



Fonte: Modificado de (MOSS, 1988).

Neste trabalho a porfirina estudada é a *5,10,15,20 - Tetrakis (4-methoxyphenyl) - 21H,23H porphine* base livre, foi adquirida da empresa *Sigma-Aldrich*. Na figura 5-3 encontre-se a estrutura da molécula.

Figura 5-3 - Estrutura química da porfirina empregada neste estudo, denominada *5,10,15,20 - Tetrakis (4-methoxyphenyl) - 21H,23H porphine*.



Fonte: (Sigma Aldrich).

### 5.1.1.2 Características fotofísicas - região UV-Vis das Porfirinas

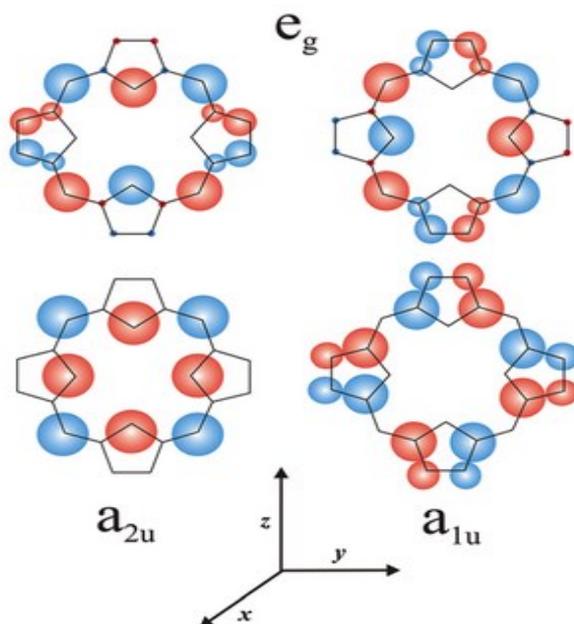
Uma das características fotofísicas importantes que as porfirinas apresentam é a intensa absorção na região espectral visível. O espectro de absorção típico das porfirinas exibe uma intensa absorção em torno de a 400 nm (conhecida como banda de Soret ou região B) e outra na região de 450 a 700 nm (região das bandas Q). Assim como ocorre em outros cromóforos as alterações na estrutura das porfirinas como a formação de complexo com metais, protonação dos átomos do nitrogênio do anel ou a substituição de grupos periféricos, podem provocar variações nas intensidades e nas posições das bandas de absorção (GOUTERMAN, 1961).

As bandas do espectro de absorção eletrônico das porfirinas são devido a transições do tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$ . Estas transições eletrônicas foram inicialmente interpretadas por Simpson e Platt. Simpson empregou um modelo baseado em um polieno cíclico de 18 membros e Platt utilizou orbitais moleculares gerados pela combinação linear de orbitais atômicos (GOUTERMAN, 1961).

Fundamentado nos trabalhos de Platt, Simpson e outros estudos em destaque na época, Gouterman desenvolveu o modelo dos quatro orbitais de fronteira para explicar os espectros das porfirinas. De acordo com esse modelo o surgimento das bandas é esclarecido supondo que os estados excitados resultam da promoção de um elétron dos orbitais de maior energia ocupados (HOMO), designados  $a_{2u}$  e  $a_{1u}$  na notação adequada para a simetria ( $D_{4h}$  - para as metaloporfirinas), e os dois orbitais vazios de menor energia (LUMO), que são de simetria  $e_g$  (PAVANI, 2009).

Por meio de cálculos das densidades eletrônicas sobre todos os átomos do anel porfirínico, tornou-se possível uma representação esquemática da distribuição da nuvem eletrônica, nos quatro orbitais envolvidos (Figura 5-4).

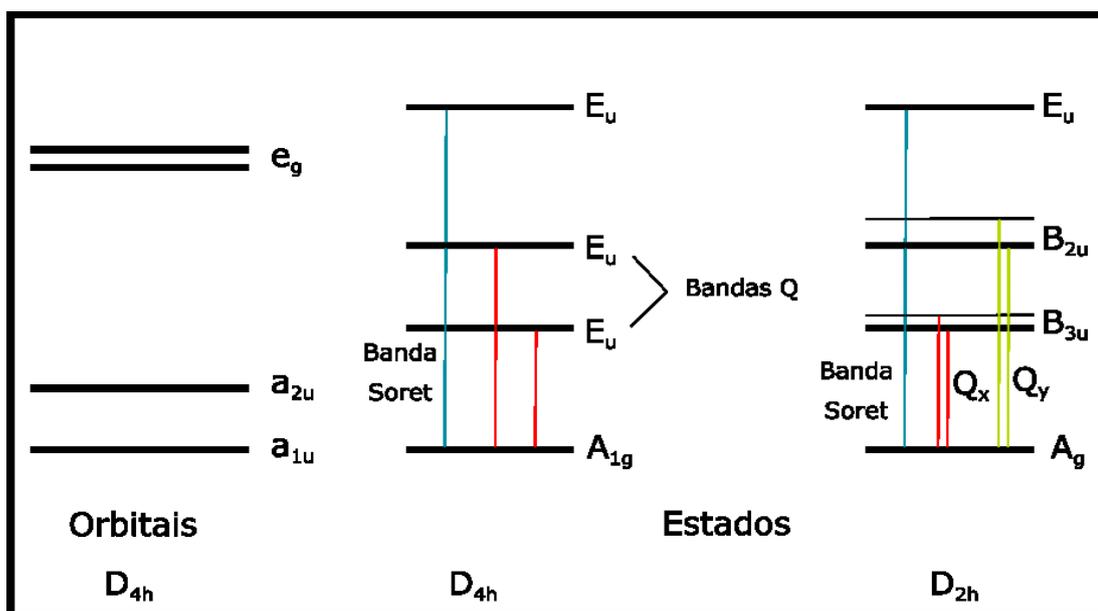
Figura 5-4 - Modelo de quatro orbitais de Gouterman.



Fonte: (NAMUANGRUK, KEAWIN, et al., 2014).

As transições  $a_{2u} \rightarrow e_g$  e  $a_{1u} \rightarrow e_g$  nas metaloporfirinas resultam em dois estados excitados de simetria  $E_u$ . Esta degenerescência é consequência da equivalência dos dipolos nas direções  $x$  e  $y$  no plano da molécula (GOUTERMAN, 1961). Gouterman estabeleceu que as interações de configuração entre estes estados eram importantes para compreender os espectros eletrônicos das porfirinas. Dessa maneira, a interação de configuração resulta em bandas de comprimentos de onda e intensidades diferentes. Interação construtiva resulta na banda de maior intensidade (banda B ou Soret) com menor comprimento de onda e a interação destrutiva resulta na banda menos intensa (banda Q) de maior comprimento de onda (Figura 5-5).

Figura 5-5 - Transições eletrônicas no modelo dos quatro orbitais de Gouterman.



Fonte: Adaptado de (PAVANI, 2009).

Nas metaloporfirinas (simetria  $D_{4h}$ ) observa-se duas bandas Q, referindo-se uma delas a transição para o estado singleto excitado de menor energia e a outra, encarrega-se da transição envolvendo o nível vibracional  $\nu_0$  do estado fundamental e o nível  $\nu_1$  do estado singleto excitado (PAVANI, 2009).

Devido a mudança de simetria de  $D_{4h} \rightarrow D_{2h}$  os estados  $E_u$  das porfirinas base livre torna-se não degenerados e desdobram-se os dipolos de transição nas direções x e y. Em consequência surgem duas transições. A combinação vibrônica das duas transições resultam no aparecimento de quatro bandas  $Q_y(1,0)$ ,  $Q_y(0,0)$ ,  $Q_x(1,0)$ ,  $Q_x(0,0)$  em ordem decrescente de energia e intensidade (PAVANI, 2009).

### 5.1.2 Polímeros

Polímeros são materiais de alto peso molecular que são encontrados em variadas aplicações em nossa sociedade moderna. Eles geralmente consistem de várias unidades estruturais ligadas por ligações covalentes. Essas unidades se repetem e são conhecidas como *meros* ou *unidades monoméricas*. O número de *meros* na cadeia polimérica é chamado grau de polimerização. O produto do grau de polimerização  $n$  e da massa molecular da unidade monomérica  $M_u$ , é a massa molar do polímero. Os polímeros que dispõem de diferentes *meros* em sua composição são

designados copolímeros e os que apresentam somente uma categoria de *mero*, são os homopolímeros. No caso de existirem três *meros* formando o polímero, denomina-se terpolímero (MANO e MENDES, 1999). A tabela 3 abaixo engloba as diferentes categorias de *meros* e suas representações.

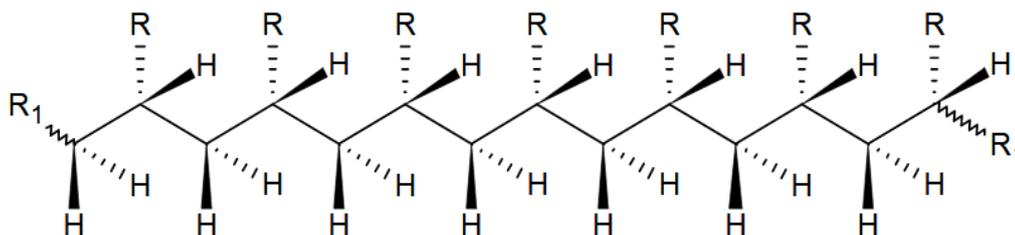
**Tabela 3 - Cadeias macromoleculares em homopolímeros e copolímeros.**

Monômero	Polímero	Representação	
A	Homopolímero	...A-A-A-A-A-A...	
B	Homopolímero	...B-B-B-B-B-B...	
A+B	Copolímero	Alternado	...A-B-A-B-A-B...
		Em bloco	...A-A-B-B-A-A...
		Graftizado	$\begin{array}{c} \text{B-B-B...} \\   \\ \dots\text{A-A-A-A-A-A}\dots \\   \\ \dots\text{B-B-B} \end{array}$
		Aleatório	...A-B-B-A-B-A...

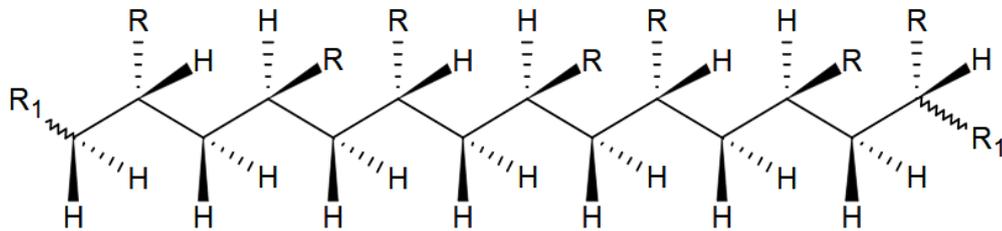
Fonte : (MANO e MENDES, 1999).

Quanto à taticidade, ou seja, à orientação dos substituintes dos *meros*, que possuem grupos pendentes em relação ao plano formado pela cadeia principal (em ziguezague, devido a ligação  $sp^3$ ) de um polímero supostamente linear, três configurações podem ser formadas (MANO e MENDES, 1999):

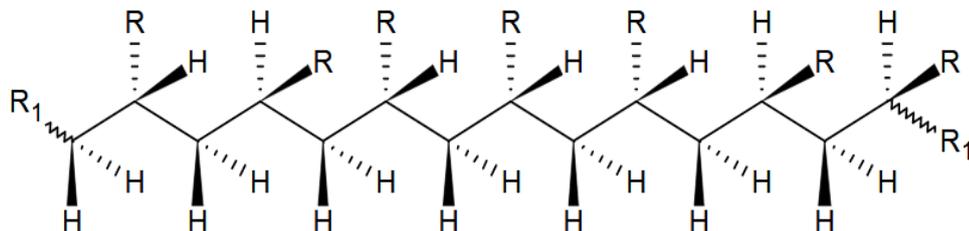
- Polímeros isotáticos, em que as ramificações estão todas voltadas para um mesmo lado do plano.



- Polímeros sindiotáticos, em que há alternância de orientação em relação ao plano da cadeia.

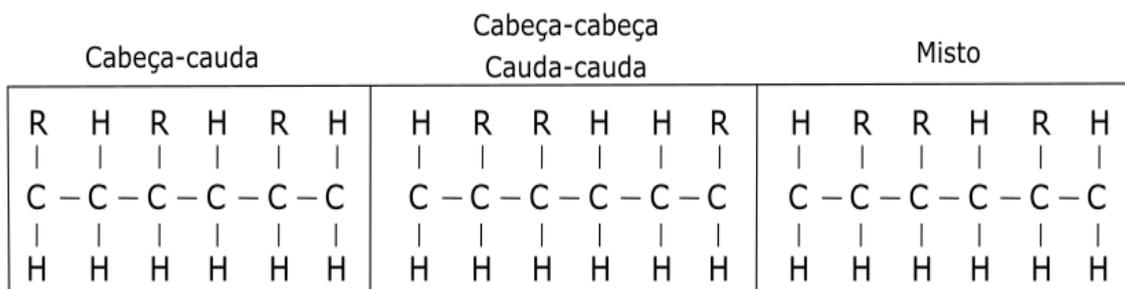


- Polímeros atáticos, quando não há regularidade de orientação.



O encadeamento das unidades monoméricas pode ser feito na forma regular cabeça-cauda, ou na forma cabeça-cabeça, cauda-cauda ou mista (Figura 5-6). Geralmente ocorre o primeiro caso, por razões estéricas (MANO e MENDES, 1999)

Figura 5-6 - Representação dos encadeamentos das unidades monoméricas.

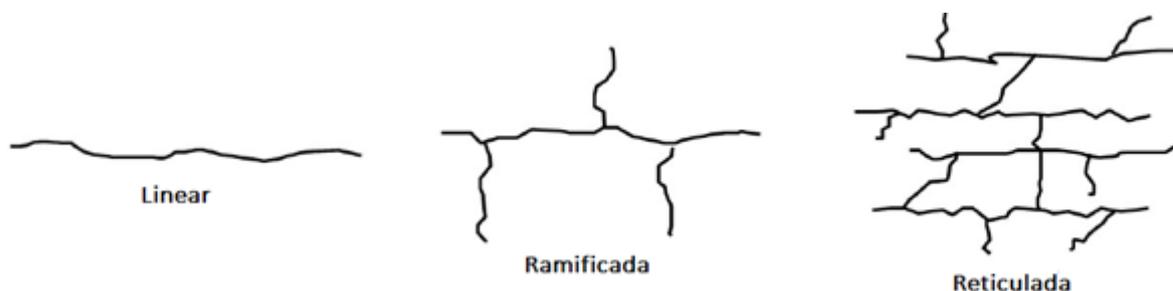


Fonte: Adaptado de (MANO e MENDES, 1999).

Uma das formas mais antigas de classificar os polímeros baseia-se na resposta ao calor. Neste sistema, existem duas classificações de polímeros: termoplásticos e termorrígidos. Os polímeros termoplásticos "derretem" no aquecimento e solidificam no resfriamento. O aquecimento e os ciclos de resfriamento podem ser aplicados várias vezes sem afetar as propriedades. Polímeros termorrígidos, por outro lado,

derretem apenas na primeira vez que são aquecidos (MANO e MENDES, 1999). Uma das classificações fundamentais dos polímeros é baseada na estrutura molecular, como podemos encontrar a seguir (AKCELRUD, 2007) (Figura 5-7):

**Figura 5-7 - Representação das cadeias macromoleculares.**



Fonte: Adaptado de (MANO e MENDES, 1999).

Em cadeias lineares, as unidades de repetição são mantidas por fortes ligações covalentes. Já as moléculas diferentes são mantidas juntas por forças secundárias mais fracas. Quando a energia térmica é fornecida ao polímero, aumenta o movimento aleatório das moléculas, que tenta superar as forças secundárias. No momento em que todas as forças são superadas, as moléculas ficam livres para se movimentar e o polímero derrete, o que explica a natureza termoplástica dos polímeros (AKCELRUD, 2007).

### 5.1.2.1 Biopolímeros

Biopolímeros são polímeros produzidos por seres vivos ou obtidos a partir de matérias primas de fontes renováveis, que podem ser encontrados desde a estrutura do DNA até muitos produtos usados para a fabricação de embalagens plásticas. No caso do DNA e de outras moléculas, como o RNA, proteínas e enzimas, são os organismos vivos os responsáveis por sua síntese. Já os plásticos e outros biopolímeros sintéticos, por sua vez, são polimerizados, a partir de matérias primas de fontes naturais renováveis, e vários deles substituem os polímeros derivados do petróleo (PAULO, 2014).

Podemos encontrar muitos exemplos do uso de biopolímeros no nosso dia a dia, em diversas áreas. Uma delas é a medicina, na qual são utilizados os polímeros bioabsorvíveis, ou seja, polímeros biodegradáveis que podem ser assimilados por um

sistema biológico. Esses polímeros auxiliam na confecção de suturas, implantes e fixações ósseas e devem ser absorvidos pelo organismo na mesma escala de tempo em que ocorre a regeneração de um tecido. Um exemplo atual desse tipo de biopolímero é o polihidroxialcanoato (PHA) o qual é produzido, em biorreatores, por bactérias que guardam os biopolímeros em suas células (PAULO, 2014).

Já na indústria, um exemplo é a utilização dos chamados “polímeros verdes”, tal qual o polietileno (PE) verde, que possui a mesma variedade de aplicações do PE de origem fóssil, e ainda apresenta a vantagem de capturar CO<sub>2</sub> da atmosfera para sua produção. Esse biopolietileno tem sido usado na área automotiva, cosmética, em brinquedos, higiene e limpeza (PAULO, 2014).

Outro biopolímero comumente usado é o polímero de amido (PA), um polissacarídeo produzido a partir da batata, do milho, do trigo e da mandioca. Nesse caso, o amido contido nesses vegetais é retirado e sofre um processo químico de desestabilização e um rearranjo na cadeia de moléculas, gerando assim um material plástico. O uso principal do polímero de amido é na fabricação de sacos de lixo, material de preenchimento de embalagens e, também, na fabricação de filmes comestíveis para embalagem e proteção de alimentos. Esses materiais agem, por exemplo, contra o escurecimento que ocorre em frutos, e podem apresentar ações bactericidas e fungicidas, diminuindo o desenvolvimento de organismos patogênicos (PAULO, 2014).

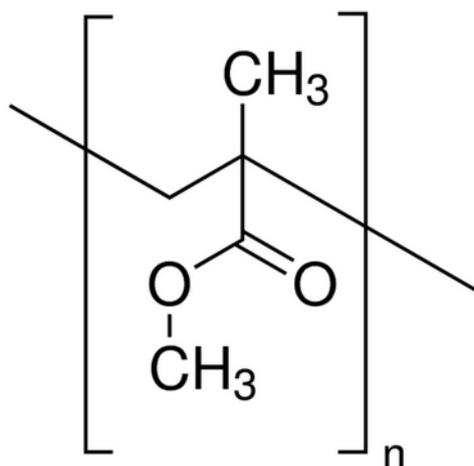
Outro exemplo de biopolímero muito utilizado é o polilactato (PLA), elaborado a partir do ácido láctico produzido pela fermentação bacteriana de glicose extraída do milho. Posteriormente, por meio de processos químicos, esse ácido é convertido em plástico e, assim, pode ser usado na confecção de embalagens, itens de descarte rápido e fibras para vestimentas (PAULO, 2014).

Uma grande vantagem do uso dos biopolímeros é sua degradação no ambiente. A degradação dessas macromoléculas resulta da ação de microorganismos de ocorrência natural, como bactérias, fungos e algas. Ou seja, a biodegradação é um processo de decomposição de materiais pela atividade biológica, transformando o material em moléculas menores e causando um menor impacto ambiental. Por isso, os biopolímeros ganham cada vez mais espaço devido a propriedades que, ao mesmo tempo, aumentam a vida útil e tornam mais fácil o descarte desses materiais (PAULO, 2014).

### 5.1.2.2 Poli (metacrilato de metila)

O poli (metacrilato de metila) (PMMA) foi descoberto no início dos anos 1930 por químicos britânicos, Rowland Hill e John Crawford, seguido por sua primeira aplicação por um químico alemão, Otto Rohm, em 1934. O PMMA é um polímero termoplástico opticamente transparente, membro de uma família de polímeros denominados acrilatos. Considera-se o PMMA um material amorfo, pelo fato dele ser formado por longas cadeias, enoveladas ao acaso, cuja mobilidade é restringida pelo embaraçamento entre elas (AKCELRUD, 2007). O polímero utilizado neste estudo é atático, apresenta peso molecular médio de aproximadamente 996,000 e foi obtido por meio da empresa *Sigma-Aldrich*. Na figura 5-8 abaixo encontra-se a estrutura química do PMMA.

Figura 5-8 - Estrutura química do polímero empregado neste estudo, denominado Poly (methyl methacrylate).



Fonte: (Sigma Aldrich).

O PMMA é um polímero promissor para aplicações em atuação óptica, sensores, separação analítica e dispositivos condutores. Outras aplicações incluem o uso de PMMA em aplicações biomédicas em entregas de drogas usando eletrodifusão ou fluxo eletrosmótico. Devido à sua compatibilidade com materiais inorgânicos, como os nanotubos de carbono desempenha um papel importante no desenvolvimento da nanotecnologia (ALI, KARIM e BUANG, 2015).

Neste trabalho, o poli(metacrilato de metila) foi utilizado como hospedeiro, ou seja, “condicionou” as moléculas de porfirina nos filmes e *scaffolds* confeccionados. A

ausência de absorção na região UV-Vis fazem deste material o polímero escolhido para confecção das amostras.

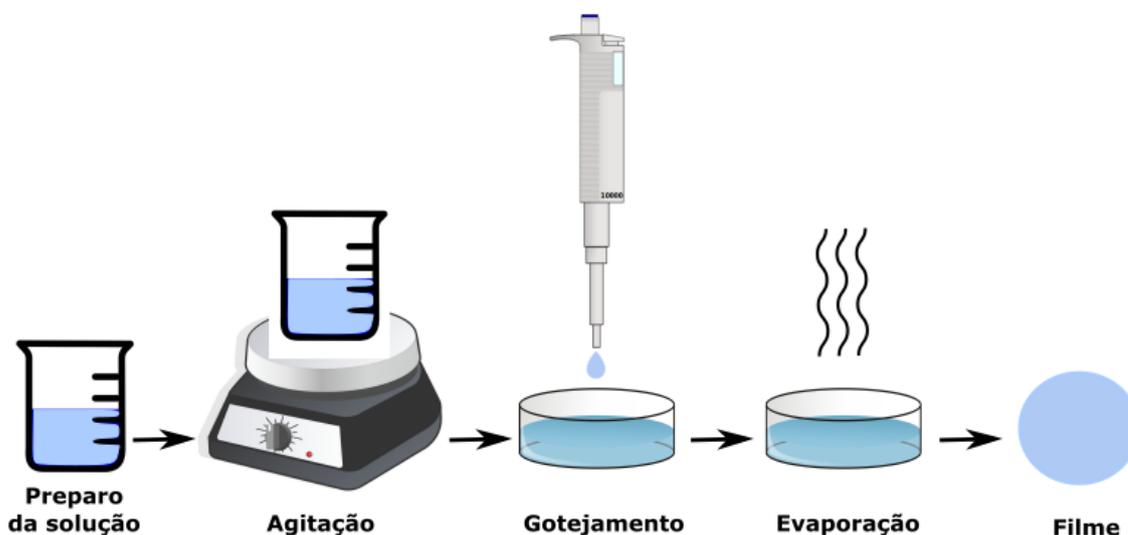
## 5.2 Técnicas Experimentais

### 5.2.1 Confecção dos Filmes de PMMA/Porfirina pela Técnica *Casting*

Os filmes foram confeccionados por meio de soluções de PMMA e porfirina em clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ). O solvente, usado na preparação das soluções, é um reagente analítico, comprado da empresa *Sigma-Aldrich* com grau de pureza 99,8%.

Por meio da técnica *casting* os filmes foram confeccionados. As principais vantagens são o seu baixo custo e sua fácil manipulação operacional. A técnica *casting* (Figura 5-9) consiste no gotejamento e espalhamento da solução polimérica sobre um substrato utilizando uma micropipeta. Em seguida a amostra é colocada em um ambiente fechado (estufa), onde é evaporado o solvente formando um filme sobre a superfície do substrato. Para a formação do filme é necessário que a macromolécula possua a capacidade de formar uma matriz contínua e coesa. A capacidade de uma macromolécula em formar filmes está associada ao rompimento de sua estrutura semicristalina, permitindo desta forma a formação de uma matriz polimérica homogênea e amorfa.

Figura 5-9 - Representação esquemática da técnica *casting* utilizada preparação dos filmes poliméricos.



O sistema formado da mistura é classificado de acordo com o tipo de interação, estes sistemas são: *main-chain*, *side-chain*, *guest-host* e outros. Neste trabalho os filmes *casting* confeccionados são do tipo *guest-host* (hóspede-hospedeiro), ou seja, a porfirina (hóspede) fica dispersa na matriz polimérica de PMMA (hospedeira).

Neste trabalho foram produzidos quatro filmes com concentrações diferentes. Para a confecção dos filmes foram utilizadas placas de petri de vidro, que foram previamente limpas com detergente, e em seguida enxaguadas com água destilada. Por fim, estas placas foram esterilizadas com o álcool etílico 70%.

A solução de porfirina foi produzida diluindo em um balão volumétrico 3 mg de porfirina em 5 mL de  $\text{CHCl}_3$ . O balão foi agitado em um banho ultrassônico por 2 horas, obtendo-se uma solução homogênea.

Para a confecção do filme 1 foram dissolvidos 0,6 g de PMMA em 5 mL de  $\text{CHCl}_3$ , a dissolução é feita por meio de um agitador magnético, o processo de agitação é feito até que a solução esteja homogênea. Após a agitação a solução é gotejada sobre a placa de petri e colocada na estufa para a evaporação do solvente orgânico. A amostra chamada de filme 1 foi produzida, pois queríamos demonstrar por meio das medidas fotofísicas que o PMMA não interfere nas medidas na faixa UV-Vis.

Os filmes 2, 3 e 4 foram obtidos por meio da mistura das soluções de PMMA e porfirina, em clorofórmio. Após a dissolução da mesma quantidade de PMMA em três béqueres foram adicionados em cada um deles a solução de porfirina. No primeiro béquer foi adicionado uma concentração de  $4 \times 10^{-6} \text{M}$ , no segundo  $4 \times 10^{-5} \text{M}$  e no terceiro  $4 \times 10^{-4} \text{M}$ .

Como as concentrações das soluções de porfirina contida nos béqueres são diferentes, os filmes confeccionados também terão concentrações distintas. Para a confecção dos filmes, com o auxílio de uma pipeta foi feito o gotejamento sobre a placa de petri e posteriormente estas placas foram colocadas em uma estufa para a evaporação do solvente orgânico. Por fim, após 24 horas os filmes de PMMA/porfirina são retirados das placas de petri formando uma estrutura autossustentada.

A figura 5-10 são apresentadas as amostras confeccionadas após todas as etapas de preparação dos filmes e na tabela 4 encontra-se as espessuras dos filmes.

Figura 5-10 - Filmes confeccionadas pela técnica *casting*.

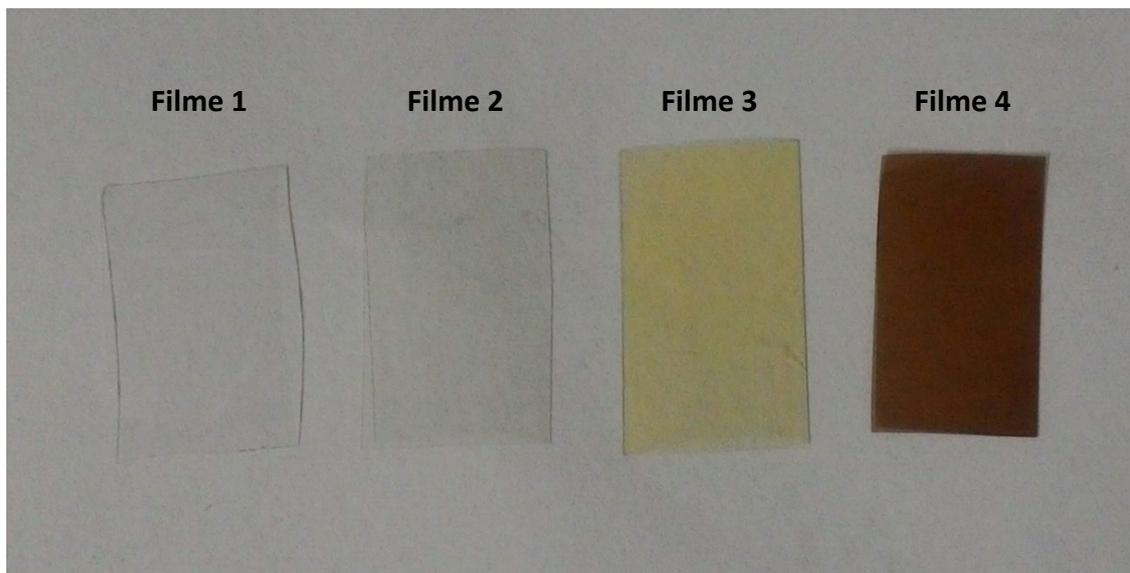


Tabela 4 - Espessuras dos filmes.  $C_p$  = concentração das moléculas de porfirina nos filmes.

Amostra	Espessura (mm)
Filme 1 (PMMA)	0,11
Filme 2 ( $C_p = 4 \times 10^{-6} \text{ M}$ )	0,10
Filme 3 ( $C_p = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$ )	0,11
Filme 4 ( $C_p = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$ )	0,12

### 5.2.2 Confeção dos *Scaffolds* de PMMA/Porfirina pela Técnica *Salt Leaching*

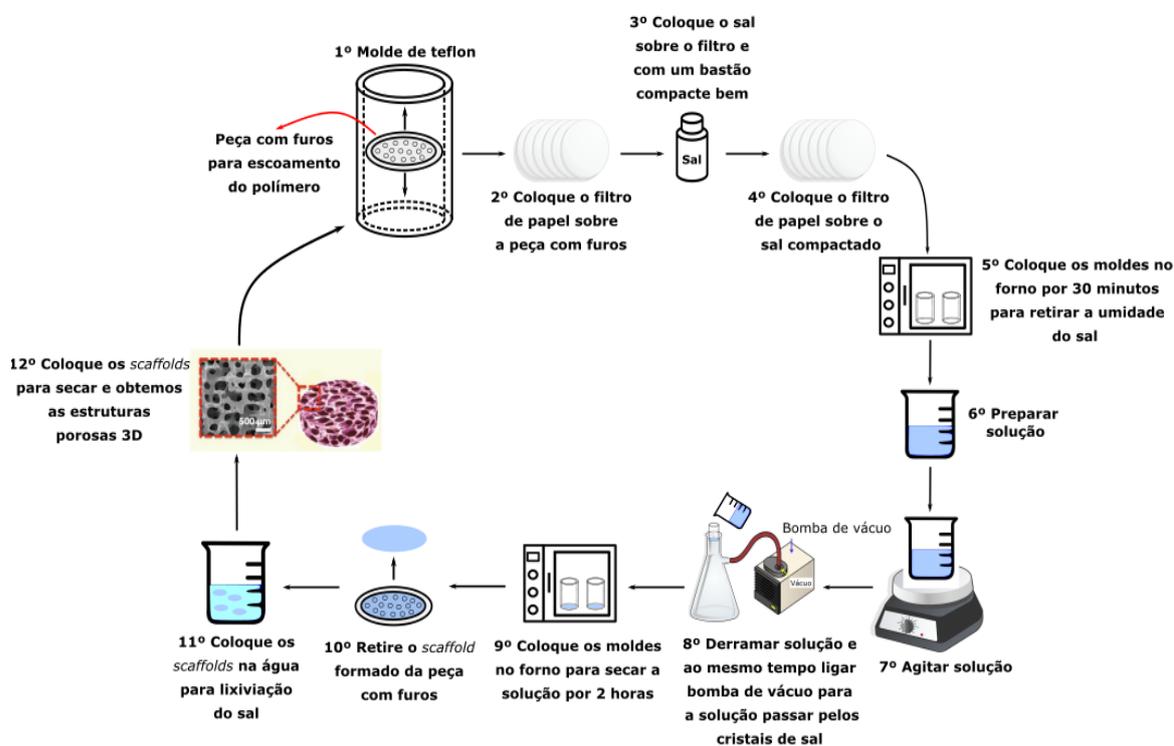
Inicialmente, para a confecção dos *scaffolds*, foram feitos alguns testes de concentração de polímero/solvente orgânico para fornecer um suporte físico adequado. Visto que dependendo da concentração os *scaffolds* desmanchavam-se ao passar pelo processo de lixiviação, devido à baixa viscosidade da solução.

Depois de definir a concentração de confecção dos *scaffolds* foram feitos alguns ajustes na técnica, com a intenção de refinar e economizar os materiais utilizados. Como a perda de polímero e solvente orgânico estava alta, um novo porta-amostras de teflon que serve de suporte para a peça com furos com diâmetro de 8 mm foi desenvolvido, ou seja, dez vezes menor quando comparado ao inicialmente empregado. Além disso, para otimizar o tempo de preparação das amostras oito porta-amostras foram confeccionados.

Os *scaffolds* foram confeccionados por meio da técnica de *salt leaching*, com soluções de PMMA e porfirina em clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ), em concentrações diferentes. O solvente, usado na preparação das soluções, é um reagente analítico comprado da empresa *Sigma-Aldrich* com grau de pureza 99,8%.

Primeiramente os porta-amostras (moldes) foram lavados com detergente e enxaguados com água destilada e em seguida esterilizados com álcool 70%. Em seguida, uma peça com furos para escoamento da solução é encaixada no centro do molde de teflon e sobre essa peça é colocado um filtro com espessura de 0,16 mm e retenção de partículas com tamanhos de 4-12  $\mu\text{m}$ . Posteriormente os cristais de sal (fosfato de potássio monobásico) são colocados sobre o filtro de papel e compactados com um bastão, para que os cristais de sal se acomodem. Logo após os moldes são levados para o forno à 50° C por um período de 40 minutos para retirar a umidade do sal. Enquanto os moldes estão no forno, a solução é preparada com o auxílio de um agitador magnético, a fim de obter uma solução homogênea. Durante o tempo de espera da agitação, um aparato composto de um kitassato, um encaixe dos moldes e uma bomba de vácuo é montado para fazer a filtração da solução. Ao atingir o tempo de forno os moldes são retirados e deixados sobre a bancada para atingir a temperatura ambiente. Depois de atingir a temperatura ambiente, os moldes são encaixados um por vez no kitassato e a solução é derramada e ao mesmo tempo filtrada com o sistema de vácuo, para que a solução penetre nos espaços entre os cristais de sal. Após todos os moldes serem passados pela filtração, são levados para o forno à 50° C por um período de 2 horas para a solidificação da estrutura e evaporação do solvente orgânico. Por fim, as amostras são retiradas dos moldes e o sal é removido por dissolução em água que lava/lixivia para fora da estrutura polimérica os cristais salinos, restando a estrutura porosa, nomeada *scaffolds*. Na figura 5-11 encontra-se um resumo esquemático da técnica *salt leaching*.

Figura 5-11 - Representação esquemática da técnica *salt leaching* para a preparação de *scaffolds* poliméricos.



Para a confecção do *scaffold* 1, foram dissolvidos 0,6 g de PMMA em 5 mL de  $\text{CHCl}_3$ , após a preparação da solução são feitas as etapas do processo de *salt leaching* esquematizadas na figura 3-10 e no final o *scaffold* é obtido. A amostra chamada de *scaffold* 1 foi produzida, pois queríamos demonstrar por meio das medidas fotofísicas que o PMMA não interfere nas medidas na faixa UV-Vis.

Os *scaffolds* 2, 3 e 4 foram obtidos por meio da mistura das soluções de PMMA e porfirina, em clorofórmio. Após a dissolução da mesma quantidade de PMMA em três béqueres, foram adicionados em cada um deles a solução de porfirina. No primeiro béquer foi adicionado uma concentração de  $4 \times 10^{-6}$  M, no segundo  $4 \times 10^{-5}$  M e no terceiro  $4 \times 10^{-4}$  M.

Após a preparação da solução são feitas as etapas do processo de *salt leaching* esquematizadas na figura 5-11 e no final os *scaffolds* são obtidos.

Na figura 5-12 são apresentadas os *scaffolds* confeccionadas com diferentes concentrações de porfirina e na tabela 5 encontra-se as espessuras e diâmetros dos *scaffolds*.

Figura 5-12 - Scaffold de PMMA e Scaffolds de PMMA/Porfirina confeccionados pela técnica *salt leaching*.



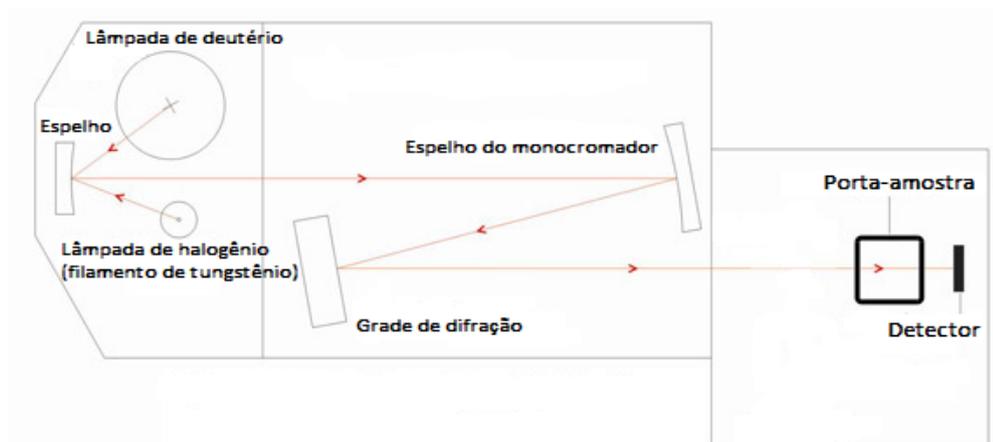
Tabela 5 - Espessuras e diâmetros dos scaffolds.  $C_p$  = concentração das moléculas de porfirina nos scaffolds.

Amostra	Espessura (mm)	Diâmetro (mm)
<b>Scaffold 1 (PMMA)</b>	<b>2,44</b>	<b>8,10</b>
<b>Scaffold 2 (<math>C_p = 4 \times 10^{-6} \text{ M}</math>)</b>	<b>2,37</b>	<b>8,07</b>
<b>Scaffold 3 (<math>C_p = 4 \times 10^{-5} \text{ M}</math>)</b>	<b>2,40</b>	<b>8,17</b>
<b>Scaffold 4 (<math>C_p = 4 \times 10^{-4} \text{ M}</math>)</b>	<b>2,25</b>	<b>8,03</b>

### 5.2.3 Absorção

A medida de absorção óptica é uma técnica espectroscópica, na qual o espectrofotômetro detecta a luz transmitida pela amostra, cuja intensidade é gravada através do sistema de aquisição de dados em um microcomputador. O equipamento utilizado neste trabalho foi o espectrofotômetro UV-VIS 800XI Femto, como mostrado na figura 5-13, disponibilizado pelo Grupo de Espectroscopia de Materiais (GEM) do Instituto de Física da UFU. Este aparelho pode efetuar leituras de absorbância ou transmitância em uma região de comprimento de onda entre 190 e 1100 nm. Primeiramente, se faz uma medida para a linha de base com a varredura do espectro da lâmpada sem a amostra, em seguida repete-se o experimento com a presença da amostra. Realizamos esta medida a fim de obter informações sobre o comprimento de onda de absorção para cada material em análise.

Figura 5-13 - Diagrama óptico do equipamento utilizado nas medidas de absorção.



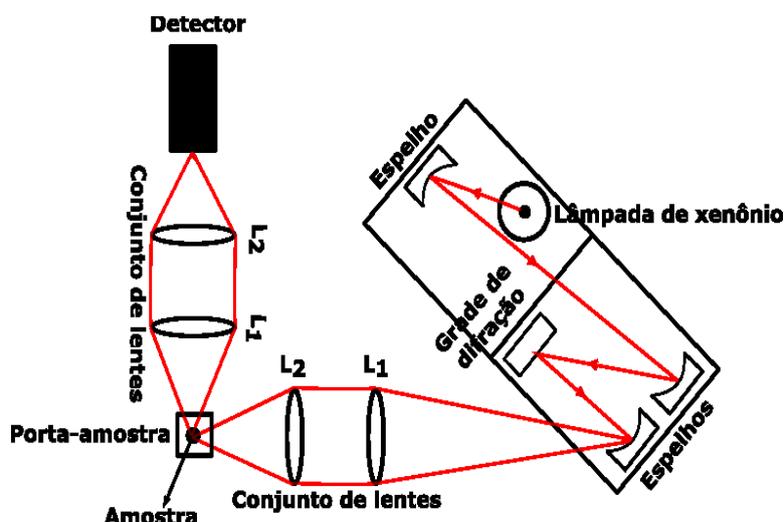
Fonte: Modificado de (FEMTO, 2014).

O processo de absorvência mede a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado no momento que a radiação eletromagnética é absorvida por elétrons.

#### 5.2.4 Emissão de Fluorescência

A emissão de fluorescência é uma técnica espectroscópica, em que um elétron após ter sido excitado por um fóton, sofre um decaimento passando do estado excitado para o estado fundamental, emitindo uma radiação eletromagnética. As medidas de emissão de fluorescência foram realizadas no GEM, utilizando uma lâmpada de xenônio de 450 W como fonte de excitação. A luz monocromática excita a amostra, cuja luz emitida é colimada por um conjunto de lentes biconvexas e, posteriormente, detectada por um espectrofotômetro portátil *Ocean Optics* modelo USB4000, o qual envia um sinal ao microcomputador que processa e grava o espectro de emissão de fluorescência. O aparato experimental é representado na Figura 5-14.

Figura 5-14 - Diagrama óptico simplificado das medidas de emissão de fluorescência.



### 5.2.5 Emissão de Fluorescência Excitada

A emissão de fluorescência excitada é um tipo específico de emissão de fluorescência e diz respeito à interação entre a radiação eletromagnética e a matéria. É utilizado em medições espectroscópicas em que a frequência da luz excitada é variada, e a emissão de fluorescência é monitorada no comprimento de onda de emissão típicas do material em estudo. Picos no espectro da emissão de fluorescência excitada frequentemente representam linhas de absorção do material, desde que este seja relacionado a uma única espécie no estado fundamental. Quando existem outras espécies absorventes ou o mesmo cromóforo de forma diferente no estado fundamental, agregados, por exemplo, não ocorre a relação de sobreposição dos espectros de excitação e absorção. Esta análise é um método útil para investigar a estrutura eletrônica do nível de materiais com baixa absorção em função da relação sinal-ruído superior em comparação com medições de absorção. Os espectros de emissão de fluorescência excitada estudados neste trabalho foram em um espectrofotômetro Hitachi pertencente ao laboratório de novos materiais isolantes e semicondutores (LNMIS) do instituto de física da UFU.

### **5.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura Acoplado ao Sistema de Espectroscopia por Energia Dispersa (MEV-EDS)**

A técnica de MEV foi utilizada neste experimento para a obtenção de imagens topográficas da superfície dos *scaffolds*. Foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo Vega 3 LMU da Tescan, localizado no Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

Na preparação das amostras a serem analisadas no MEV, é necessário primeiramente verificar se a espécie é composta por material condutor, caso contrário, recobre-se com ouro ou carbono, como é o caso dos polímeros e materiais orgânicos. Depois de recobertas, as amostras são apoiadas em um suporte de metal e, quando necessário, estes são colados a uma fita de carbono.

Um analisador de raios X é acoplado ao MEV (espectrômetro de raios X por dispersão de energia - EDS), trazendo um método baseado no princípio de energia de um fóton do espectro do raio X, em que sua frequência é proporcional à energia. Quando os elétrons do feixe principal se chocam com os átomos da amostra, ocorre a emissão de radiação em forma de raio X de várias frequências, cujos fótons atingirão um detector, que será capaz de determinar suas respectivas energias. Isso torna possível a elaboração de um espectro, com a abscissa sendo a energia dos fótons (KeV) e a ordenada o número de fótons recebidos (contagens).

### **5.2.7 Microscopia de Força Atômica**

As medidas de AFM foram realizadas através do modo contato intermitente com o intuito de analisar a topologia da superfície. Estas medidas foram realizadas no microscópio *Shimadzu SPM-9600*, que se encontra no Laboratório Multiusuário do Instituto de Física da UFU. As medidas foram realizadas a fim de obter informações sobre a homogeneidade, rugosidade e alturas que formam a superfície das amostras. Através das informações obtidas, um software faz o processamento das imagens. Parte da análise foi feita utilizando o software *livre Gwyddion*.

Por meio do software livre *Gwyddion* realizamos uma análise estatística das imagens de MFA. Foi utilizado estatística de primeira ordem para analisar a topologia da superfície por meio do cálculo da distribuição de alturas na superfície, distribuição

da rugosidade quadrática média, assimetria e curtose. A estatística de segunda ordem foi usada para calcular a função de autocovariância da altura da superfície.

Estatística de primeira ordem:

Uma superfície rugosa pode ser descrita matematicamente pela função  $h = h(\vec{r})$  onde  $h$  é a altura da superfície na posição  $\vec{r}(x, y)$  em relação a uma referência, neste caso a altura média. A introdução de uma função distribuição de altura normalizada  $p(h)$  nos fornece a probabilidade de encontrar uma altura  $h$ , entre  $h$  e  $h+dh$ , em relação a algum ponto da superfície.

$$\int_{-\infty}^{+\infty} p(h)dh = 1 \quad (3)$$

Diferentes superfícies podem possuir diferentes funções de distribuição, mas devido a sua simplicidade matemática, a função Gaussiana é mais utilizada para modelar uma superfície de distribuição de alturas aleatórias.

$$p(h) = \frac{1}{\sigma_{RMS}\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(h - \bar{h})^2}{2\sigma_{RMS}^2}\right) \quad (4)$$

Sendo  $\bar{h}$  o valor médio da altura da superfície e  $\sigma_{RMS}$  a rugosidade quadrática média. A partir da função distribuição é possível determinar valores estatísticos numéricos, a fim de descrever propriedades particulares da variável  $h$  de uma superfície. O momento de  $n$ -ésima ordem da variável  $h$  é definido como:

$$\sigma_n = \int_{-\infty}^{+\infty} (h - \bar{h})^n p(h)dh \quad (5)$$

onde  $\bar{h} = \sigma_1$  é a altura média da superfície ou momento de primeira ordem. O momento de segunda ordem é um dos parâmetros mais utilizados na caracterização de superfícies rugosas, também chamado de rugosidade quadrática média e é dado por:

$$\sigma_{RMS}^2 = \sigma_2 = \int_{-\infty}^{+\infty} (h - \bar{h})^2 p(h) dh \quad (6)$$

Momentos de maior ordem podem fornecer informações muito importantes sobre distribuição de alturas. Dentre eles, temos o terceiro e o quarto momento. O terceiro é chamado de *Skewness* e é dado por:

$$\sigma_{SK} = \frac{\sigma_3}{\sigma_{RMS}^3} = \frac{1}{\sigma_{RMS}^3} \int_{-\infty}^{+\infty} (h - \bar{h})^3 p(h) dh \quad (7)$$

Este momento mede a simetria de uma distribuição de alturas em torno da altura média ( $\bar{h}$ ) e é adimensional. O sinal do momento, positivo ou negativo, está relacionado à quantidade de picos ou vales com relação à altura média. Ou seja,  $\sigma_{SK}$  positivo indica que a distribuição  $p(h)$  da superfície analisada possui mais picos do que vales, logo distribuição de picos mais deslocada para a região positiva, e  $\sigma_{SK}$  negativo representa distribuição  $p(h)$  das superfícies analisadas com mais vales que picos, ou seja, distribuição mais deslocada para valores negativos.

O momento de quarta ordem, chamada de *Kurtosis*, é dado por:

$$\sigma_{KU} = \frac{\sigma_4}{\sigma_{RMS}^4} = \frac{1}{\sigma_{RMS}^4} \int_{-\infty}^{+\infty} (h - \bar{h})^4 p(h) dh \quad (8)$$

Este momento fornece a suavidade da superfície e também é adimensional. O momento  $\sigma_{KU}$  descreve o perfil da distribuição  $p(h)$  ao longo da superfície, relativo a uma superfície perfeitamente aleatória (distribuição Gaussiana), que tem  $\sigma_{KU} = 3$ , chamada de *mesokurtic*. Caso obtenhamos  $\sigma_{KU} < 3$ , dizemos que a distribuição é *platykurtic* (pico pontiagudo) e para  $\sigma_{KU} > 3$ , a distribuição é *leptokurtic* (pico suave).

Estatística de segunda ordem:

A estatística de segunda ordem nos fornece informação sobre a correlação entre as variáveis entre duas posições distintas  $\vec{r}_1$  e  $\vec{r}_2$ . Superfícies distintas podem possuir o mesmo valor de  $\sigma_{RMS}$  e distribuição de altura  $p(h)$ , mas com frequência de

flutuação das alturas diferentes. Portanto, vamos introduzir a função correlação, definida como:

$$G(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} h_1 h_2 p_j(h_1, h_2; \vec{r}_1, \vec{r}_2) dh_1 dh_2 \quad (9)$$

Considerando uma superfície normal (isotrópica), onde  $p(h)$  pode ser aproximado por uma distribuição Gaussiana, a função de  $G(\vec{r}_1, \vec{r}_2)$  depende somente da distância entre  $\vec{r}_1$  e  $\vec{r}_2$ , ou seja:

$$G(\vec{r}_1, \vec{r}_2) = G(|\vec{r}_1 - \vec{r}_2|) = G(\rho) \quad (10)$$

A variável independente  $\rho$  é a coordenada de translação. É importante notar que o limite  $G(\rho \rightarrow 0) = \sigma_{RMS}^2$  e em situações onde as superfícies são totalmente aleatórias  $G(\rho \rightarrow \infty) = 0$ .

A correlação lateral ( $\xi$ ) nos fornece a distância em que dois pontos na superfície não podem ser mais considerados correlacionados. Deste modo, quando a distância entre dois pontos for menor que ( $\xi$ ) dizemos que as alturas destes pontos estão correlacionadas, enquanto que se a distância for maior que ( $\xi$ ) as alturas são independentes. O comprimento de correlação lateral pode ser determinado através da equação:

$$G(\xi) = \frac{G(0)}{e} \quad (11)$$

Para melhor entendimento deste método, indicamos a consulta do capítulo “*Statistical Analysis in Homopolymeric Surfaces*” do livro “*Scanning Probe Microscopy*”.

## 6 Resultados e Discussão

### 6.1 Resultados e Discussão das Soluções de Porfirina

#### 6.1.1 Medida de Absorção UV-Vis da Porfirina Estudada em Solução de $\text{CHCl}_3$

O espectro de absorção dos monômeros das porfirinas base livre é caracterizado por uma forte absorção na região UV-Vis, fundamentalmente essa absorção é formada pela banda B ou banda de Soret, localizada próxima à região de 400 nm, e a banda Q localizada entre 470 e 700 nm. Estas bandas são originadas por meio das transições  $\pi \rightarrow \pi^*$  dos elétrons presentes no anel porfirínico. As figuras 6-1 e 6-2 apresentam o espectro característico da porfirina em solução de  $\text{CHCl}_3$  utilizada neste estudo. A figura 6-1 apresenta a banda de Soret e a figura 6-2 as sub-bandas Q.

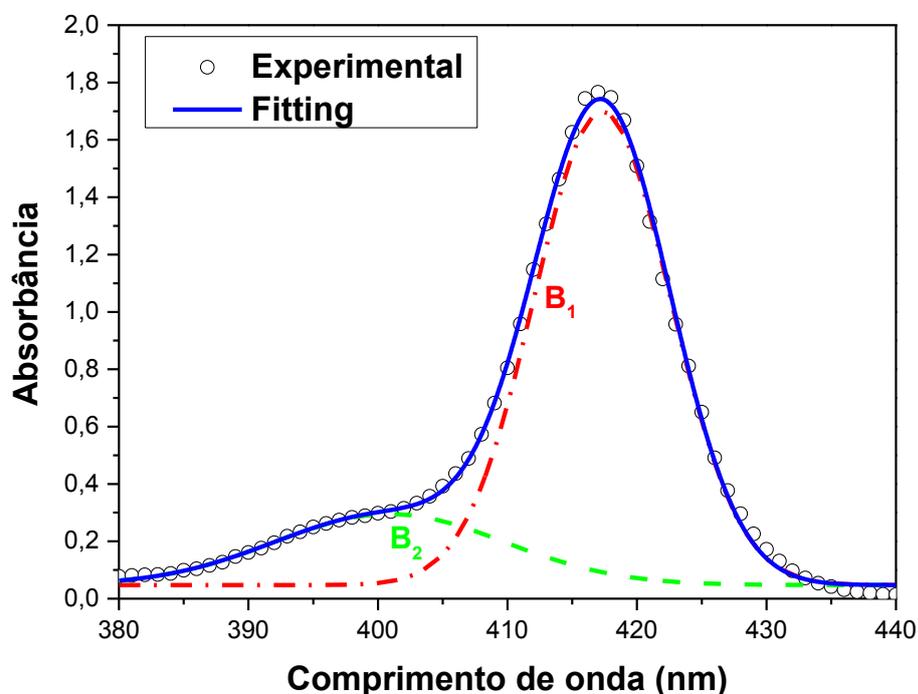


Figura 6-1 - Espectro experimental da banda de Soret da porfirina estudada e fitting realizado pela deconvolução gaussiana.

Da deconvolução da banda de Soret, observamos que esta é formada por duas sub-bandas denominadas B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>. A primeira é o pico principal localizado por volta de 417 nm (B<sub>1</sub>) e a segunda é responsável pelo ombro observado por volta de 400 nm (B<sub>2</sub>). A banda B resulta de uma transição permitida de S<sub>0</sub>→S<sub>2</sub>. De acordo com Gouterman (GOUTERMAN, 1961) esta transição ocorre do orbital molecular a<sub>1u</sub> (HOMO) para o orbital e<sub>g</sub> (LUMO). As posições de máximo das sub-bandas de Soret estão resumidas na tabela 6.

Tabela 6 – Posições de máximo das sub-bandas de Soret. λ<sub>pm</sub> = posição de máximo.

	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>
λ <sub>pm</sub> (nm)	417,2	400,7

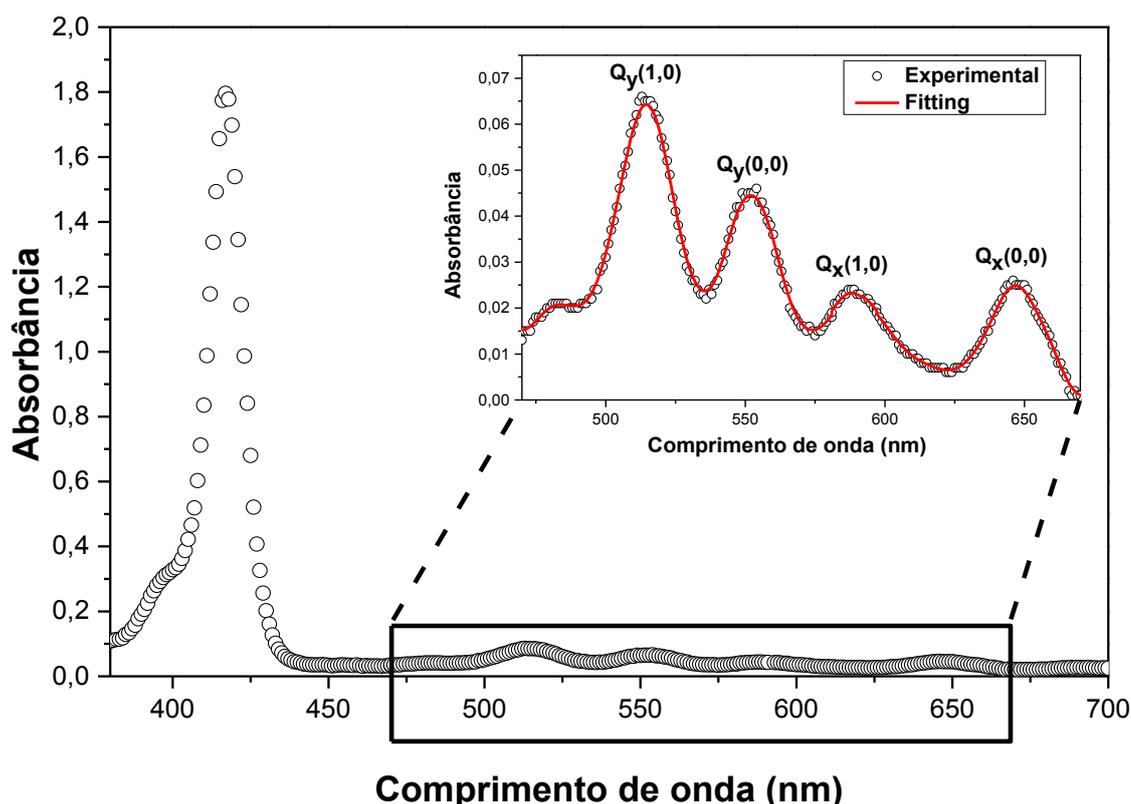


Figura 6-2 - Espectro experimental UV-Vis da porfirina estudada com um aumento nas sub-bandas Q para melhor observação.

A banda Q está relacionada com a transição para o primeiro estado singlete excitado, e o número de sub-bandas Q depende da simetria da molécula. Em nosso caso, a porfirina base livre com dois prótons no centro do macrociclo tem simetria D<sub>2h</sub>

e apresenta quatro sub-bandas na banda Q, conhecidas como  $Q_y (1,0)$ ,  $Q_y (0,0)$ ,  $Q_x (1,0)$ ,  $Q_x (0,0)$ , a porfirina utilizada também apresenta um ombro na sub-banda  $Q_y (1,0)$ . Como indicado na figura 6-2, a banda de Q é cerca de 28 vezes menos intensa do que a banda de Soret. As sub-bandas  $Q_y$  são devido à transição  $A_g \rightarrow B_{2u}$  e as  $Q_x$  são devido à transição  $A_g \rightarrow B_{3u}$ . As posições de máximo das sub-bandas Q estão na tabela 7.

**Tabela 7 - Posições de máximo das sub-bandas Q.  $\lambda_{pm}$  = posição de máximo.**

	<b>Ombro (banda Q)</b>	<b><math>Q_y (1,0)</math></b>	<b><math>Q_y (0,0)</math></b>	<b><math>Q_x (1,0)</math></b>	<b><math>Q_x (0,0)</math></b>
<b><math>\lambda_{pm}</math> (nm)</b>	484	515	552	588	647

### **6.1.2 Medidas de Absorção UV-Vis das Soluções em Concentrações Diferentes**

Inicialmente analisamos o espectro de absorção UV-Vis do clorofórmio ( $CHCl_3$ ) nomeado como solução 1, já que este foi o solvente orgânico empregado nas diluições das soluções. No espectro obtido do  $CHCl_3$  verificamos que este solvente não contribui nos espectros de absorção das soluções de porfirina, dado que este não absorve na faixa UV-Vis.

Para confeccionar as amostras três concentrações diferentes da solução estoque de porfirina foram utilizadas, a primeira (solução 2) com concentração  $4 \times 10^{-6}$  M, a segunda (solução 3) com  $4 \times 10^{-5}$  M e a terceira (solução 4) com  $4 \times 10^{-4}$  M. Essas concentrações foram empregadas neste estudo, devido ao fato de que queríamos uma alta quantidade de moléculas de porfirina nas amostras. A figura 6-3 retrata os espectros de absorção UV-Vis das três diferentes concentrações empregadas neste estudo.

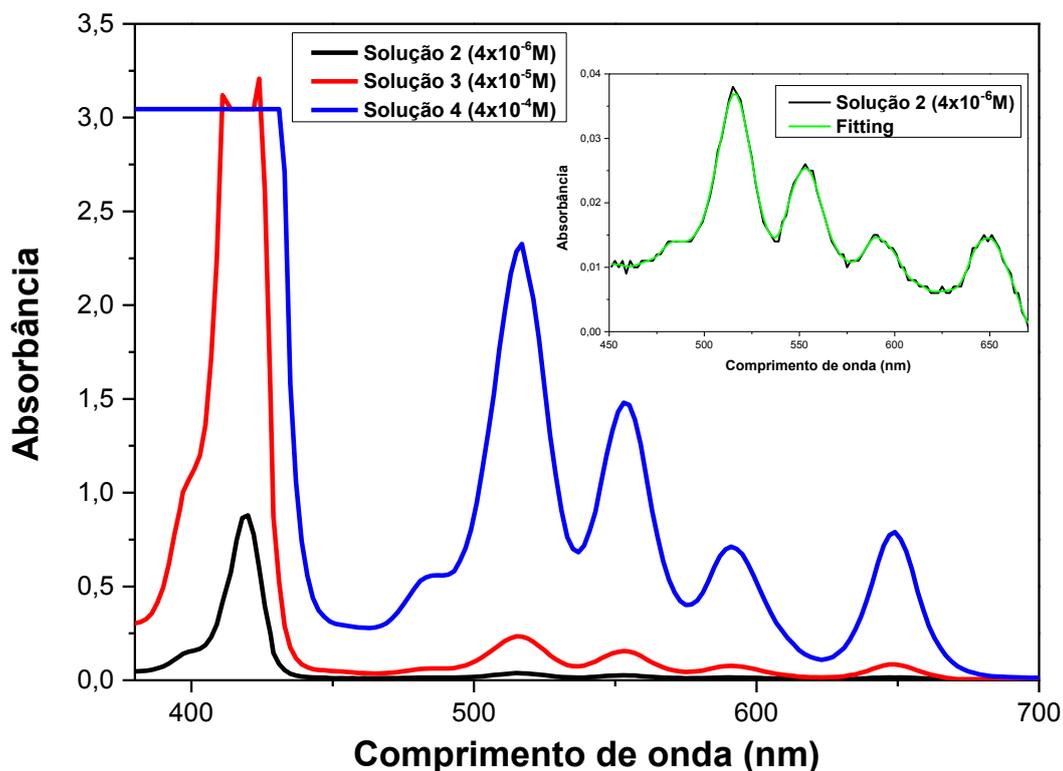


Figura 6-3 - Espectro UV-Vis da solução de porfirina estudada em diferentes concentrações.

O aumento da concentração de porfirina dá lugar a uma solução de cor mais intensa, no entanto, no espectro UV-Vis apenas se verifica o aumento de intensidade da banda de Soret, não sendo possível detectar seu máximo de absorção. Com relação as sub-bandas Q ao aumentar a concentração a intensidade também aumenta e um ombro por volta de 486 nm aparece. Além disso, na solução mais concentrada (solução 4) percebemos um pequeno desvio para maiores comprimentos quando comparadas as soluções 2 e 3 menos concentradas. Por meio dos espectros as posições dos máximos de absorção foram extraídas e utilizadas para a realização das medidas dos espectros de emissão de fluorescência. As posições de máximo podem ser encontradas na tabela 8.

**Tabela 8 - Posições de máximo das bandas Soret e Q em concentrações diferentes.  $\lambda_{pm}$  = posição de máximo.**

	<b>Solução 2</b> $\lambda_{pm}$ (nm)	<b>Solução 3</b> $\lambda_{pm}$ (nm)	<b>Solução 4</b> $\lambda_{pm}$ (nm)
<b>B<sub>1</sub></b>	419	-	-
<b>B<sub>2</sub></b>	400	400	-
<b>Ombro (banda Q)</b>	486	486	487
<b>Q<sub>y</sub> (1,0)</b>	514	516	517
<b>Q<sub>y</sub> (0,0)</b>	553	553	554
<b>Q<sub>x</sub> (1,0)</b>	589	591	591
<b>Q<sub>x</sub> (0,0)</b>	648	648	649

### **6.1.3 Medidas de Emissão de Fluorescência das Soluções em Concentrações Diferentes**

A emissão de fluorescência está relacionada ao processo radiativo, em que a molécula que se encontra no nível vibracional de menor energia,  $v_1 = 0$ , do estado eletrônico  $S_1$ , decai para um dos níveis vibracionais do estado eletrônico fundamental,  $S_0$ , resultando na emissão de um fóton. No caso das porfirinas as sub-bandas Q são responsáveis pela formação dos espectros de emissão, uma vez que a banda de Soret não emite, somente absorve (CHAMPION e PERREAULT, 1981). Na figura 6-4 a seguir serão apresentados os espectros de emissão de fluorescência das soluções de porfirina em  $CHCl_3$  variando a concentração e o comprimento de onda de excitação. Por meio das posições de máximo dos espectros de absorção os comprimentos de onda de excitação foram definidos. Realizamos medidas para todas as bandas, uma vez que a porfirina estudada é de base livre cinco comprimentos de onda de excitação foram explorados.

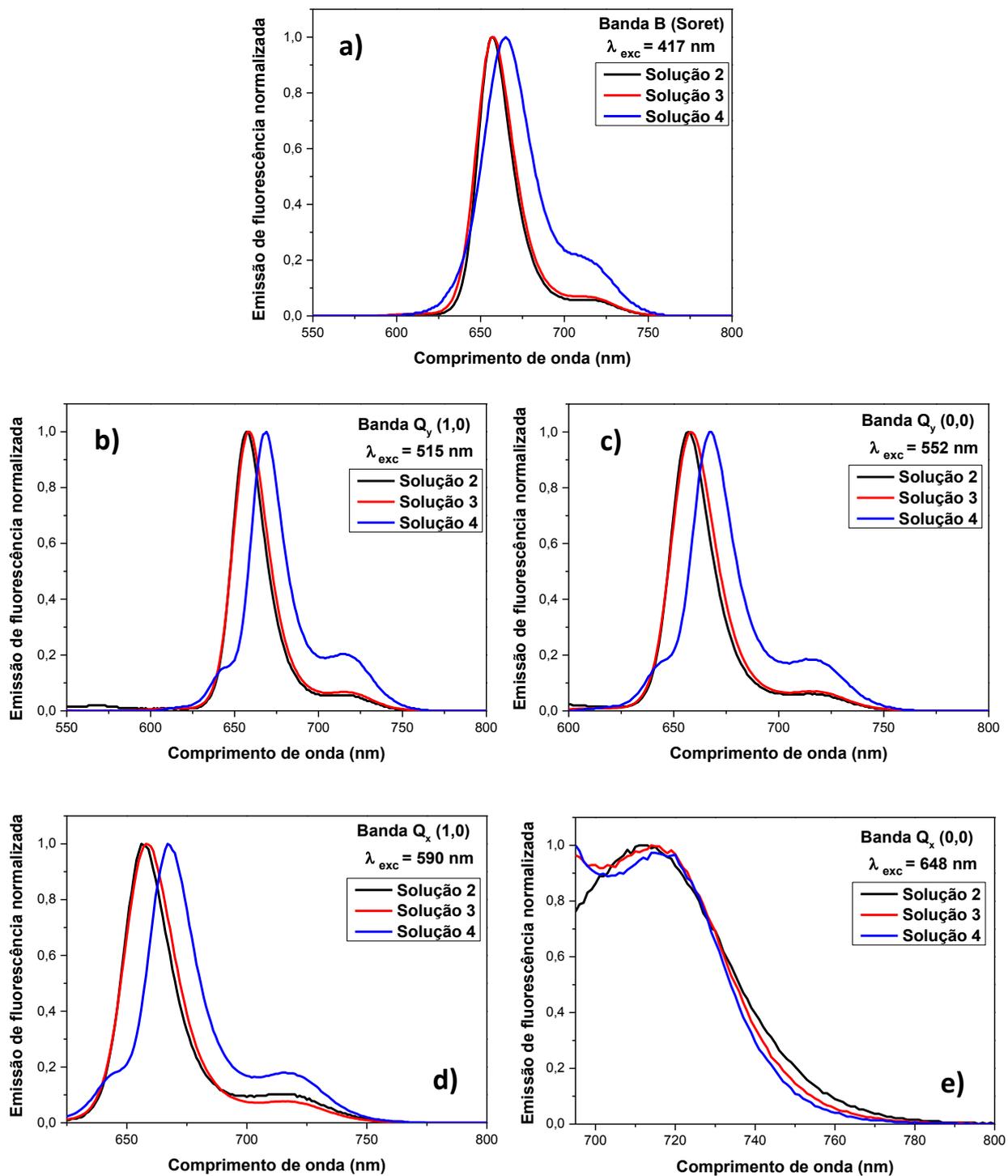


Figura 6-4 - Espectros de emissão de fluorescência da porfirina estudada excitada nos comprimentos de onda das posições de máximo da absorção, a) banda Soret, b), c), d) e e) sub-bandas Q.

Observamos dos espectros que a porfirina estudada apresenta duas bandas localizadas entre de 640-700 nm. É também verificado que a intensidade de emissão da primeira banda é mais intensa. Devido à ausência de deslocamento de Stokes uma sobreposição da primeira banda do espectro de emissão de fluorescência com a banda  $Q_x(0,0)$  do espectro de absorção acontece.

Verificamos na figura 6-4 que ao aumentar a concentração das moléculas de porfirina na solução 4, o espectro de emissão de fluorescência sofre deslocamento para maiores comprimentos de onda (red shift), ou seja, surgem agregados do tipo J. Além disso, surge um ombro entre 625-650 nm, indicando também a presença de agregados do tipo H. Nos espectros de emissão de fluorescência das soluções 2 e 3 não foram observadas modificações significativas no espectro, desta forma podemos constatar que ao diminuir o número de moléculas de porfirina na solução a desagregação acontece.

#### 6.1.4 Medidas de Emissão de Fluorescência Excitada das Soluções em Concentrações Diferentes

Para confirmarmos a presença dos agregados nas soluções de porfirina realizamos medidas de emissão de fluorescência excitada.

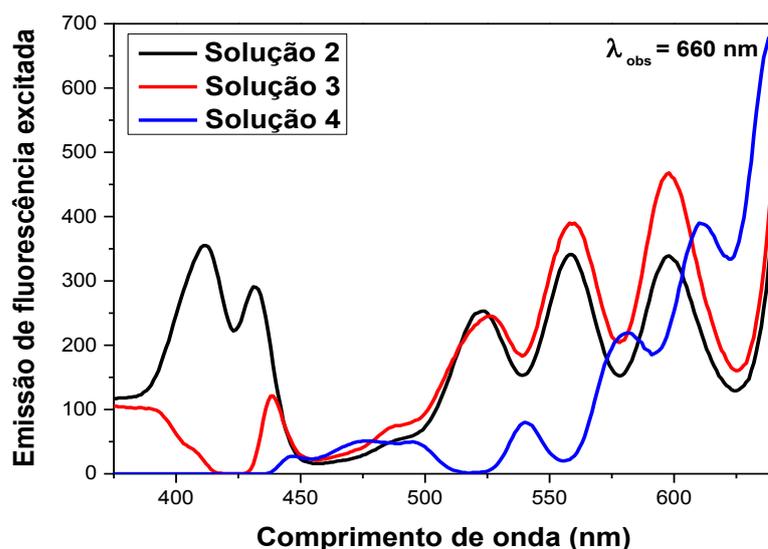


Figura 6-5 - Espectros de emissão de fluorescência excitada das soluções da porfirina.

Vemos do espectro de emissão de fluorescência excitada, figura 6-5, que o deslocamento para o vermelho também é verificado o que fortalece o argumento da formação dos agregados tipo J. Além disso, a forma de linha quando comparamos com os espectros de absorção de cada solução muda drasticamente. No espectro da solução 2 a banda de Soret sofre deslocamento para o azul (formação de agregado tipo H) e uma nova banda aparece em torno de 440 nm. Para a solução 1 a forma de linha muda totalmente e a banda de Soret desaparece e a nova banda presente na solução permanece com um desvio para o vermelho. Na solução 4 a forma de linha muda drasticamente confirmando que, ao aumentar a concentração, as moléculas se agregam e formam novas espécies.

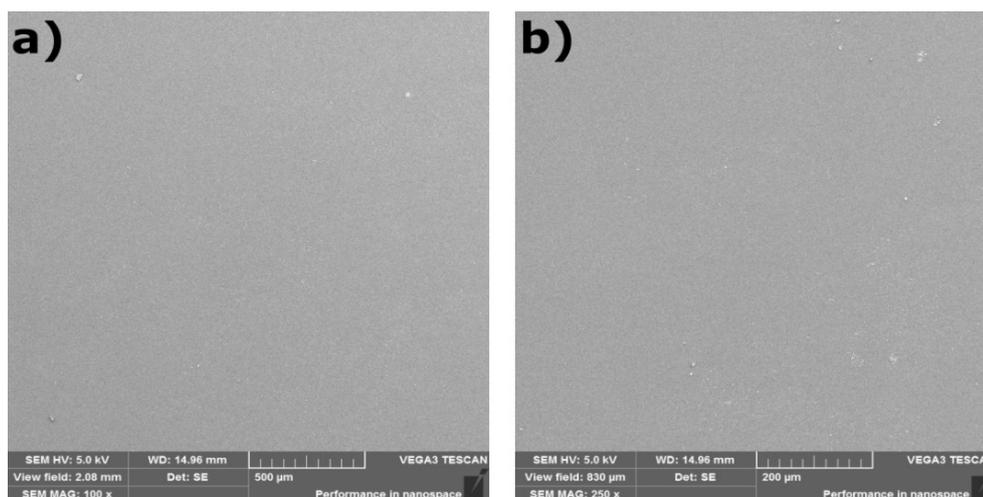
## 6.2 Resultados e Discussão dos Filmes de Porfirina

### 6.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

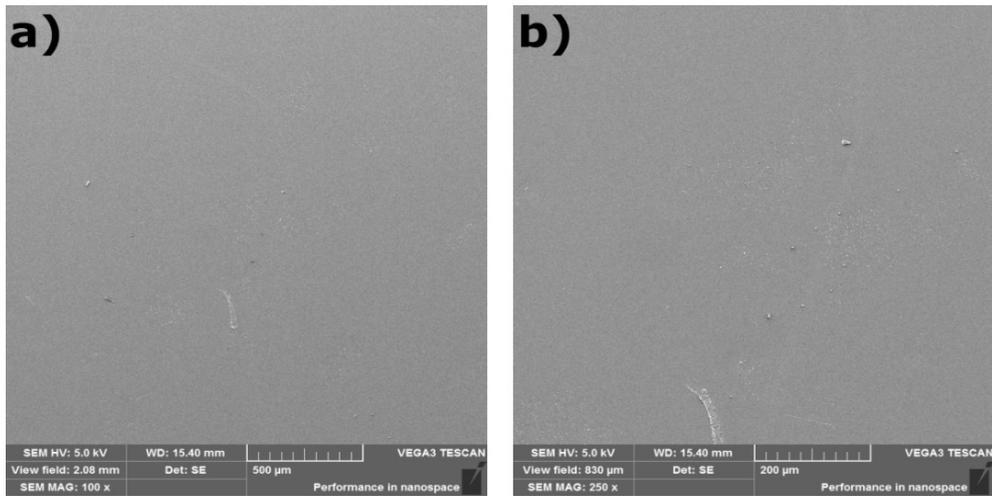
A fim de analisar mudanças na morfologia de superfícies dos filmes, em razão da incorporação das moléculas de porfirina nos filmes, foram realizadas para cada amostra uma série de imagens de MEV em diferentes magnificações. Nesta seção serão apresentadas duas imagens em magnificações diferentes para cada filme. No apêndice A podem ser visualizadas todas as magnificações. Nas medidas de EDS que podem ser observadas no apêndice B, podemos ver os elementos que compõem os filmes. Notamos que o elemento cloro que advém do solvente orgânico aparece nos filmes, mas a quantidade é insignificante.

As medidas de MEV viabiliza as análises qualitativas (análises visuais) das superfícies dos filmes. Das imagens da figura 6-6 observamos que todos os filmes apresentam pequenos grãos na superfície, no entanto como a quantidade desses grãos é baixa podemos chegar à conclusão de que os filmes produzidos pela técnica *casting* podem exibir uma morfologia homogênea. A conclusão final da morfologia dos filmes só será feita por meio das medidas de MFA (próxima seção), uma vez que essas medidas são feitas em escalas nanométricas.

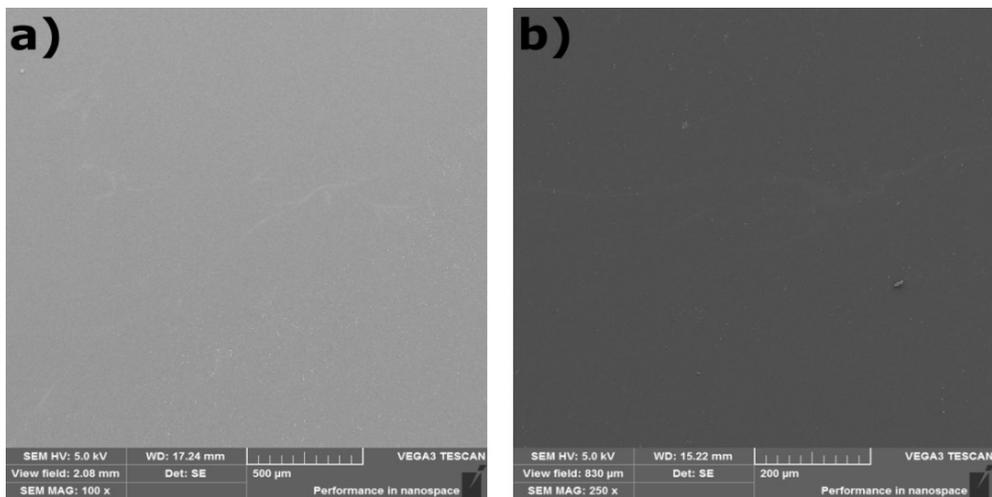
Filme 1



### Filme 2



### Filme 3



### Filme 4

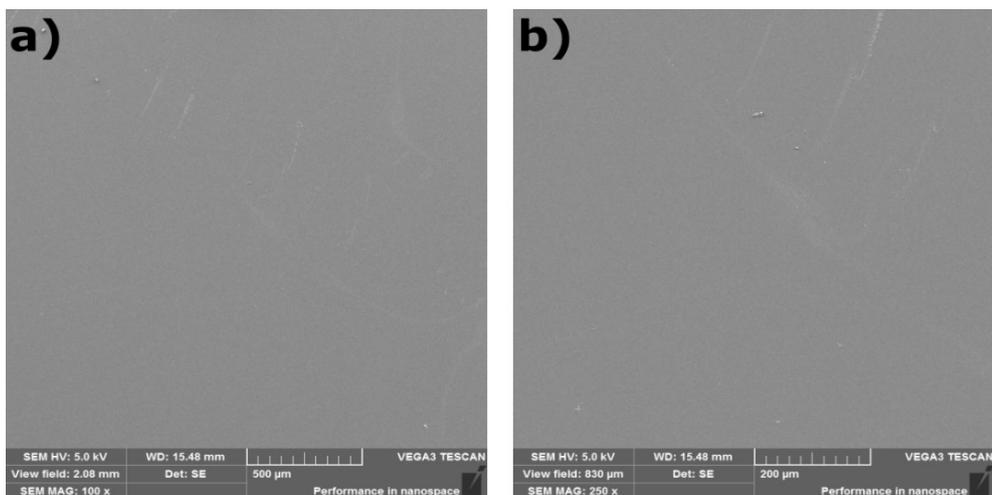


Figura 6-6 - MEV dos filmes, a) magnificação de 100x e b) magnificação de 250x. A ordem de apresentação das imagens vai do filme 1 até o filme 4.

## 6.2.2 Microscopia de Força Atômica

Entender como as diferentes alturas dos grãos que formam a superfície de um material estão distribuídas ao longo de uma determinada área é de extrema importância, desta forma identificamos se a superfície é plana ou rugosa. Para obter informações sobre a morfologia dos filmes foram realizadas medidas de MFA em modo contato intermitente. As medidas possibilitaram as análises qualitativas (análises visuais) e quantitativas (estatísticas de primeira e segunda ordem) das superfícies dos filmes.

Nas figuras abaixo serão apresentadas as imagens de MFA 2D e 3D com área de  $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$  e os perfis de altura de cada filme. Pode-se observar que há alteração da superfície dos filmes em função da concentração das moléculas de porfirina adicionadas na matriz polimérica.

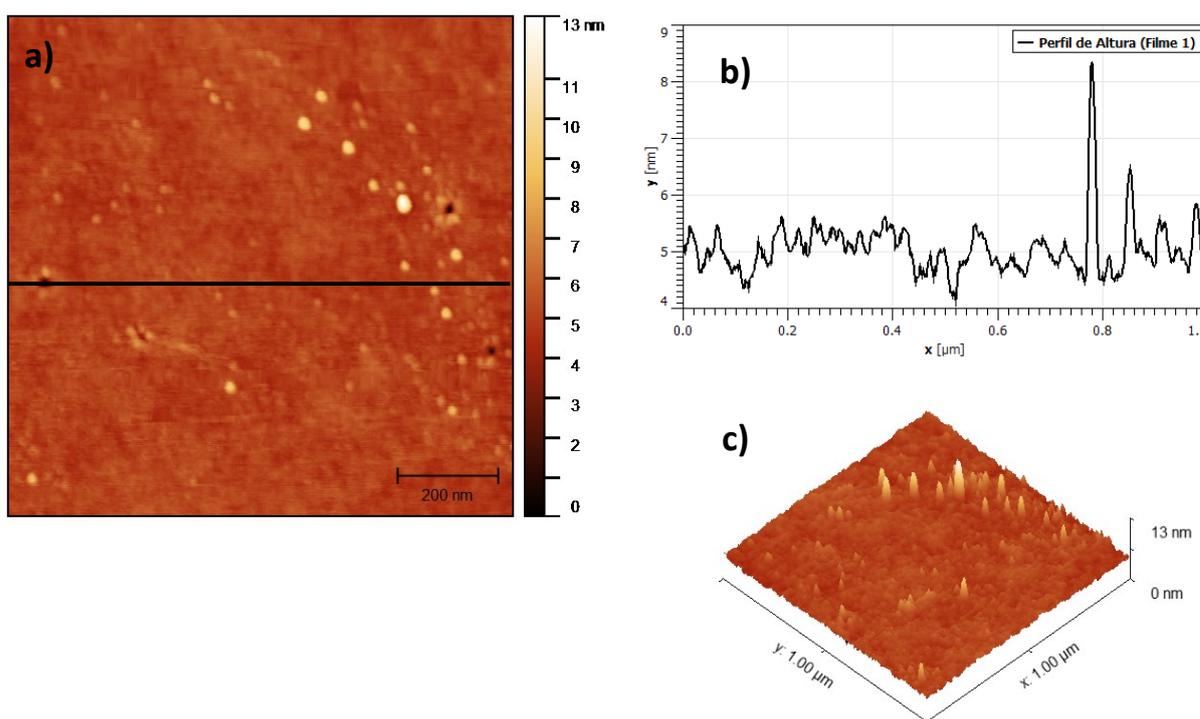


Figura 6-7 - MFA do filme 1, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

No perfil de altura e nas imagens da figura 6-7 percebe-se a existência de domínios elevados distribuídos em alguns pontos da matriz polimérica composta somente de PMMA (filme 1). Essa elevação encontrada em alguns pontos pode estar

associada a uma distribuição não uniforme da densidade do polímero, ou seja, a matriz de PMMA possui uma não homogeneidade intrínseca.

Ao adicionar uma concentração entre  $4 \times 10^{-6}$  M -  $4 \times 10^{-5}$  M da solução de porfirina na solução polimérica, verificamos na figura 6-8 (filme 2) e na figura 6-9 (filme 3) que as superfícies apresentaram distribuição praticamente homogênea de picos e buracos. Essa mudança na superfície pode ser resultado da interação das moléculas de porfirina com o polímero.

Quando comparamos os perfis de altura e as imagens 3D dos filmes 2 e 3, vemos que a distribuição de picos e vales não varia muito no filme 2, ou seja, o filme 2 dispõe de uma distribuição mais homogênea.

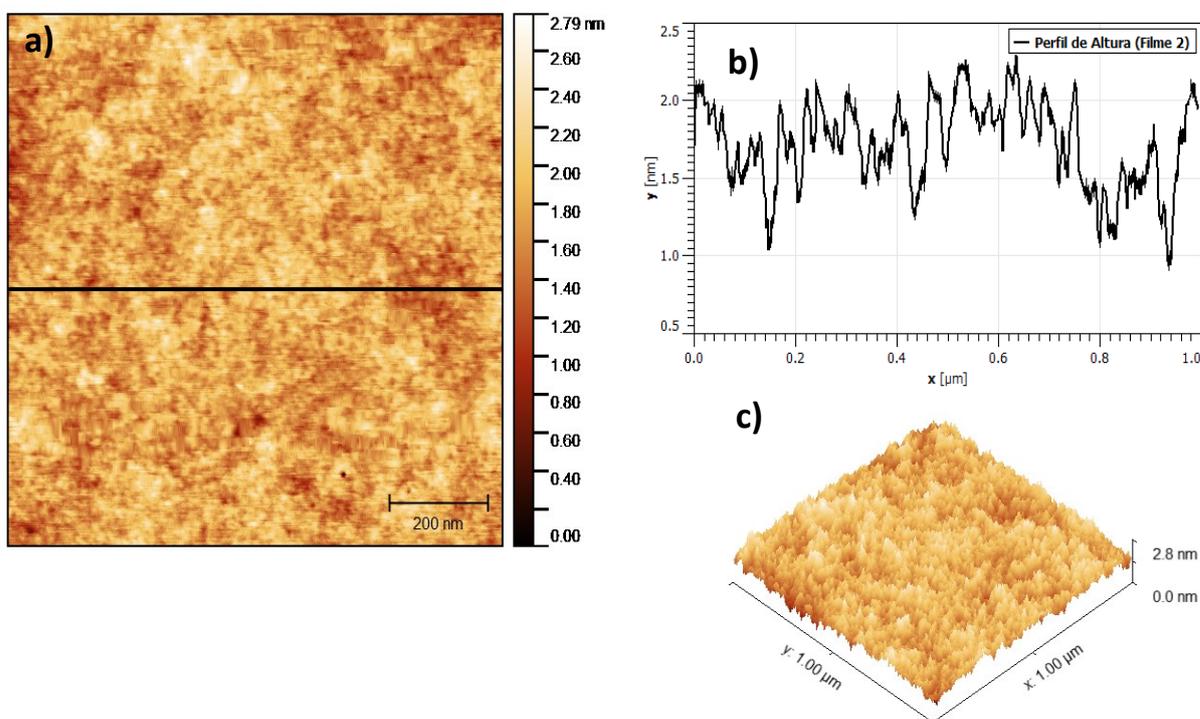


Figura 6-8 - MFA do filme 2, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

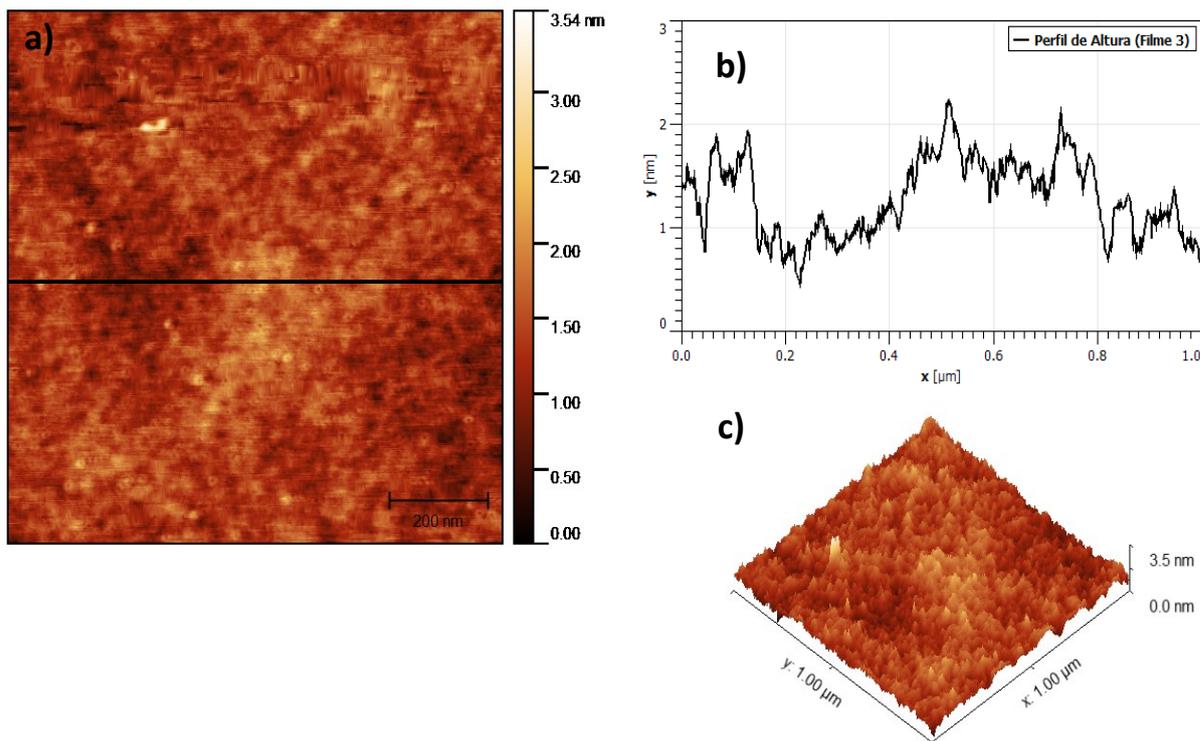


Figura 6-9 - MFA do filme 3, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

O fato do filme 3 apresentar uma superfície com mais picos pode ter ligação com a formação de agregados, pois como já vimos nos resultados dos espectros de solução das porfirinas, quando aumentamos a concentração a formação de agregados aumenta. Esse aumento de formação de agregados pode interferir na interação das moléculas de porfirina com o polímero, resultando em picos mais pontiagudos devido a dispersão dos agregados de porfirina pela matriz polimérica.

O argumento de que os agregados de porfirina interfiram na formação dos filmes produzidos pela técnica *casting* é comprovado quando analisamos o filme 4, que é o filme mais concentrado ( $4 \times 10^{-4}$  M).

Nas imagens abaixo da figura 6-10 observamos que os aglomerados parecidos aos observados no filme 1 voltam a aparecer, além de aglomerados menores que podem ser os agregados formados na solução de porfirina.

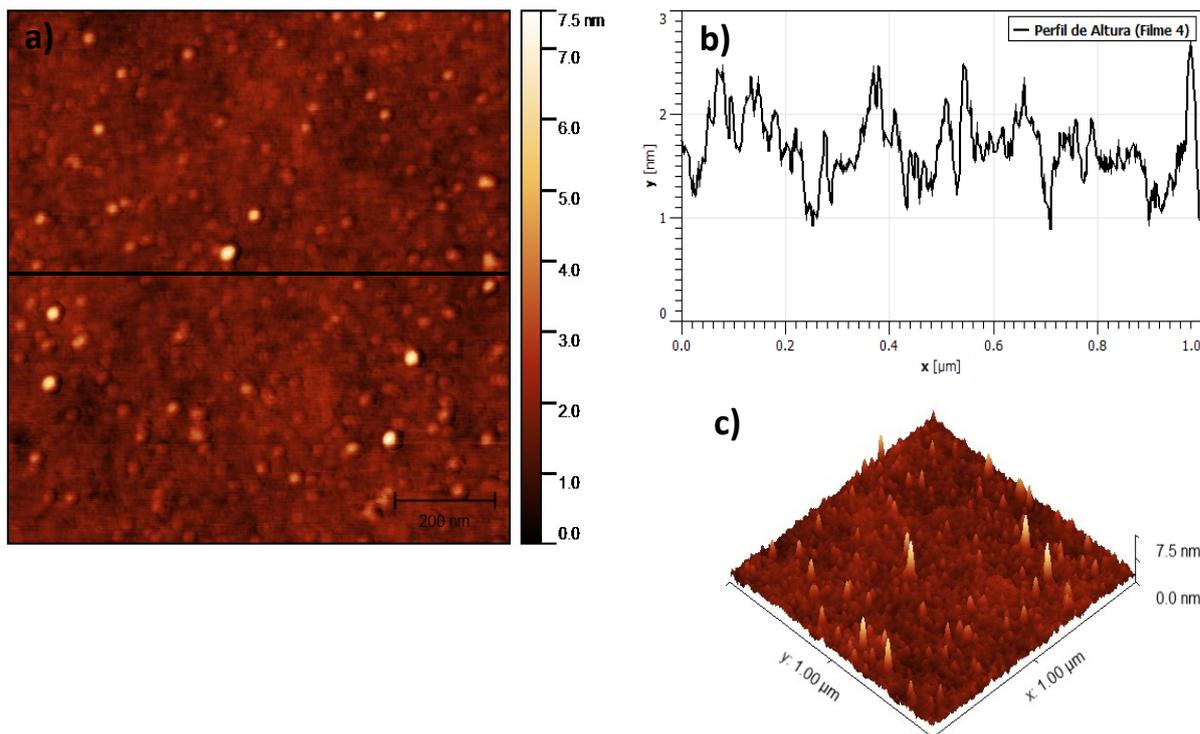


Figura 6-10 - MFA do filme 4, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

Concluimos que por meio das imagens de MFA dependendo da concentração das moléculas de porfirina, os filmes confeccionados apresentam superfícies diferentes. Quando a concentração de porfirina é baixa o filme confeccionado pela técnica *casting* apresenta superfície homogênea. Em concentrações mais altas de porfirina a formação de agregados aumenta, e esse aumento de agregados diminui a interação das moléculas de porfirina com o polímero, resultando em filmes não homogêneos.

Através do cálculo da rugosidade quadrática média ( $\sigma_{RMS}$ ), *Skewness* e *Kurtosis*, foram obtidas as informações quantitativas sobre as superfícies dos filmes. Os valores desses parâmetros estão presentes na tabela 9 abaixo.

Tabela 9 - Valores da rugosidade quadrática média, *Skewness* e *Kurtosis* de cada filme.  $C_p$  = concentração das moléculas de porfirina nos filmes.

Amostra	$\sigma_{RMS}$ (nm)	$\sigma_{SK}$	$\sigma_{KU}$
Filme 1 (PMMA)	0,444	3,100	33,860
Filme 2 ( $C_p = 4 \times 10^{-6} M$ )	0,257	-0,050	0,152
Filme 3 ( $C_p = 4 \times 10^{-5} M$ )	0,286	0,162	0,533
Filme 4 ( $C_p = 4 \times 10^{-4} M$ )	0,442	2,720	19,840

Os valores de rugosidade quadrática média dos filmes 1 e 4 são iguais o que demonstra que ao aumentar a concentração, as moléculas de porfirina se agregam e a distribuição na matriz polimérica torna-se não homogênea como no filme 1. Nos filmes 2 e 3 os valores apresentados de rugosidade quadrática média também são próximos, mostrando que para baixas concentrações de porfirina as superfícies estruturam-se de forma homogênea.

O parâmetro *Skewness* nos mostra se a superfície terá mais picos ou vales. Por meio dos valores da tabela 9 vemos que os filmes 1 e 4 apresentam mais picos e os filmes 2 e 3 um equilíbrio na quantidade de picos e vales, pelo fato das estruturas serem praticamente homogêneas.

O parâmetro *Kurtosis* nos mostra se a superfície terá mais picos pontiagudos ou picos mais suaves. Por meio dos valores da tabela 9 vemos que os filmes 1 e 4 apresentam mais pontiagudos, e os filmes 2 e 3 picos mais suaves.

Esses parâmetros confirmam os argumentos utilizados nas análises feitas anteriormente nas imagens 2D, 3D e perfis de altura de cada filme.

O gráfico do número de eventos em função da distribuição de alturas é apresentado na figura 6-11.

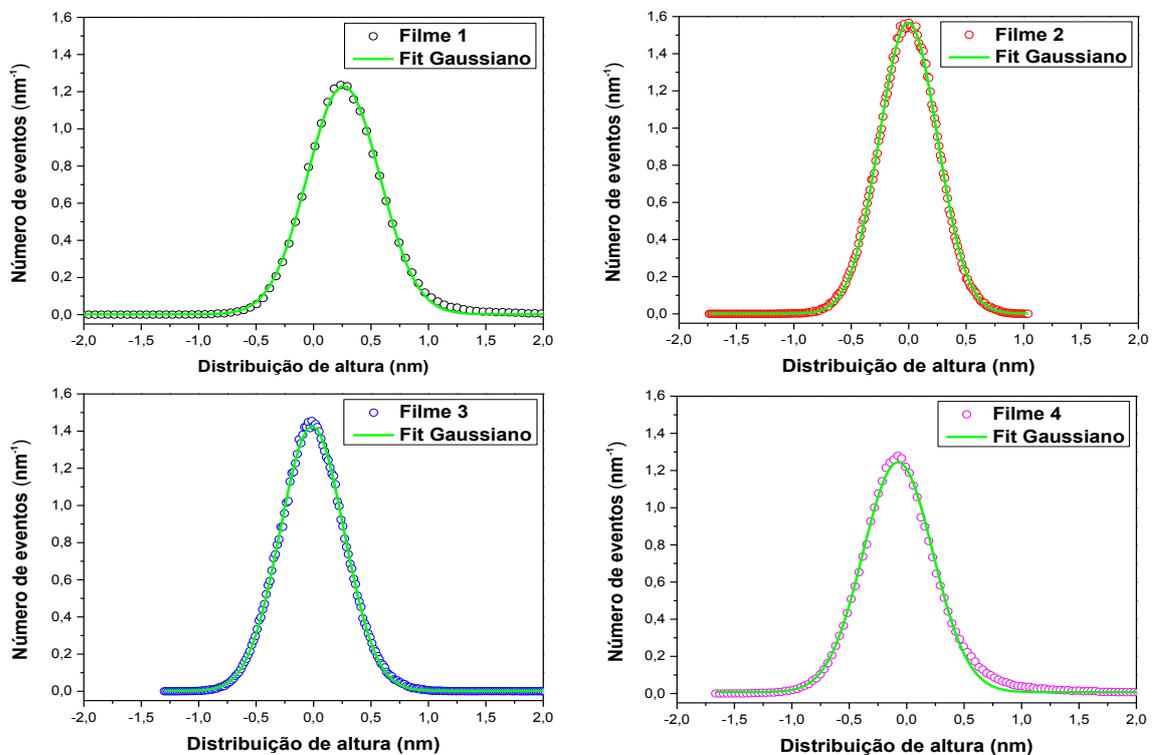


Figura 6-11- O gráfico do número de eventos (nm<sup>-1</sup>) em função da distribuição de alturas (nm) de cada filme.

Para os filmes 2 e 3 o perfil da Gaussiana é mais largo, mostrando que as superfícies dos filmes possuem uma dispersão maior nas alturas dos picos, já nos filmes 1 e 4 o perfil é mais estreito, ou seja, as superfícies apresentam pouca dispersão nas alturas dos picos. Esses perfis confirmam as observações que podem ser feitas das imagens de MFA.

Por meio da estatística de segunda ordem realizamos para cada filme um estudo a fim de obter a imagem de autocorrelação entre as alturas nas imagens de MFA. As imagens de autocorrelação podem ser observadas na figura 6-12.

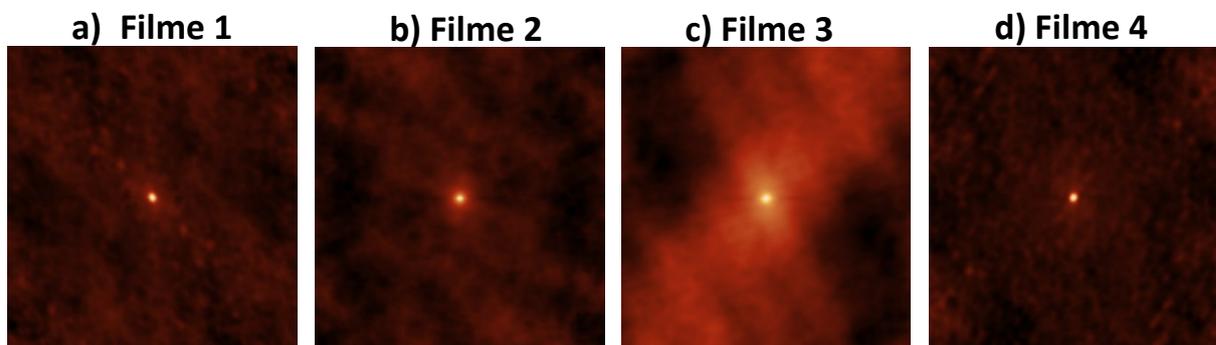


Figura 6-12 - Imagens de autocovariância de altura dos filmes, a) filme 1, b) filme 2, c) filme 3 e d) filme 4.

As regiões mais claras indicam as distâncias onde as alturas são mais correlacionadas. Ao analisar as imagens notamos que todos os filmes são formados de forma isotrópica, ou seja, as alturas são independentes da direção.

Podemos definir a função correlação de diferença de altura  $g(\rho)$ , usando a função de autocovariância de altura  $G(\rho)$ :

$$g(\rho) = 1 - \frac{G(\rho)}{\sigma_{RMS}^2} \quad (12)$$

A figura 6-13 apresenta a componente da correlação de diferença de altura para todos os filmes. A figura 6-13 a) mostra a componente na direção horizontal  $g(x)$  e na figura 6-13 b) a direção vertical  $g(y)$ .

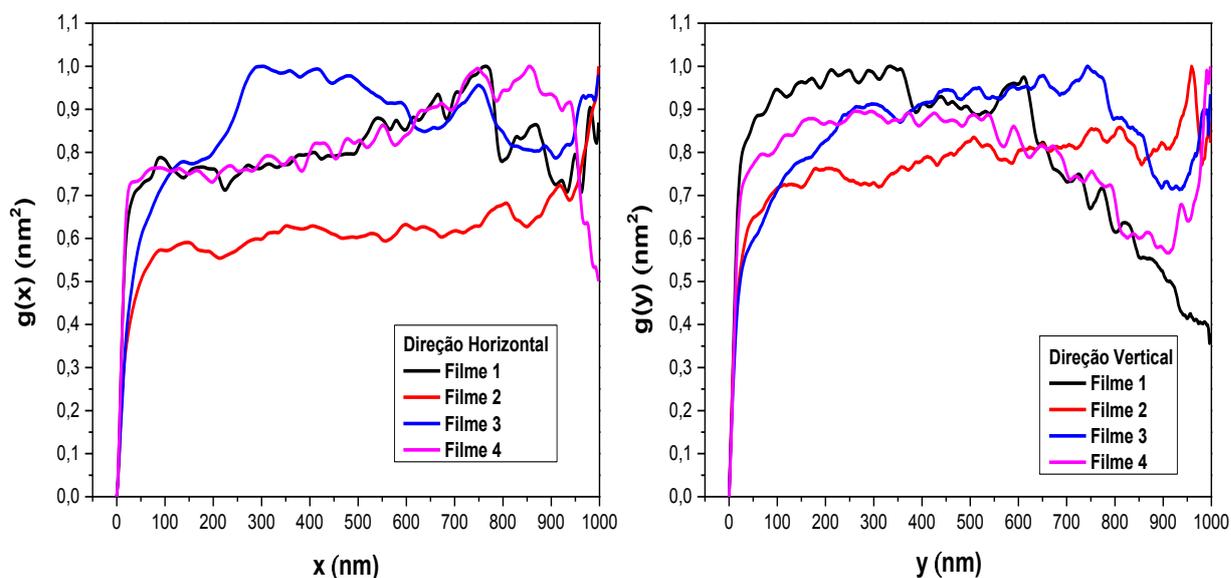


Figura 6-13 - Componentes da função correlação de diferença de alturas, a) direção horizontal  $g(x)$  e b) direção vertical  $g(y)$ .

Por meio do valor do comprimento de correlação lateral ( $\xi$ ), cuja intensidade de correlação é definida como o valor onde a função decai a  $1/e$ , podemos obter informações sobre até que distância dois picos podem ser correlacionados.

Na tabela 10 contém os valores dos comprimentos de correlação lateral extraídos por meios dos gráficos da função correlação de altura nas componentes horizontais e verticais.

Tabela 10 - Valores do comprimento de correlação lateral dos filmes.  $C_p$  = concentração das moléculas de porfirina nos filmes.

Amostra	Direção	$\xi$ (nm)
Filme 1 (PMMA)	Horizontal	10,91
Filme 2 ( $C_p = 4 \times 10^{-6} M$ )	Horizontal	22,55
Filme 3 ( $C_p = 4 \times 10^{-5} M$ )	Horizontal	19,28
Filme 4 ( $C_p = 4 \times 10^{-4} M$ )	Horizontal	10,83
Filme 1 (PMMA)	Vertical	9,56
Filme 2 ( $C_p = 4 \times 10^{-6} M$ )	Vertical	11,21
Filme 3 ( $C_p = 4 \times 10^{-5} M$ )	Vertical	13,56
Filme 4 ( $C_p = 4 \times 10^{-4} M$ )	Vertical	10,58

Os valores da tabela indicam que os picos estão poucos correlacionados em ambas as direções. Na direção horizontal os valores de  $\xi$  está entre 11 a 23 nm e na direção vertical de 10 a 14 nm. A correlação dos picos pode depender da técnica em

que os filmes são confeccionados, a técnica *casting* empregada na confecção dos filmes não permite controlar a distribuição das moléculas na matriz.

### 6.2.3 Medidas de Absorção UV-Vis dos Filmes em Concentrações Diferentes

Após as análises morfológicas dos filmes, foram realizadas as caracterizações fotofísicas começando pelas medidas de absorção. O espectro de absorção dos filmes confeccionados pela técnica *casting* é mostrado na figura 6-14 a). Para uma melhor observação das bandas B e Q dividimos o espectro da figura 6-14 a) em dois, um na faixa de 375-450 nm para a banda B (Figura 6-14 b)) e outro na faixa de 450-700 nm para a banda Q (Figura 6-14 c)).

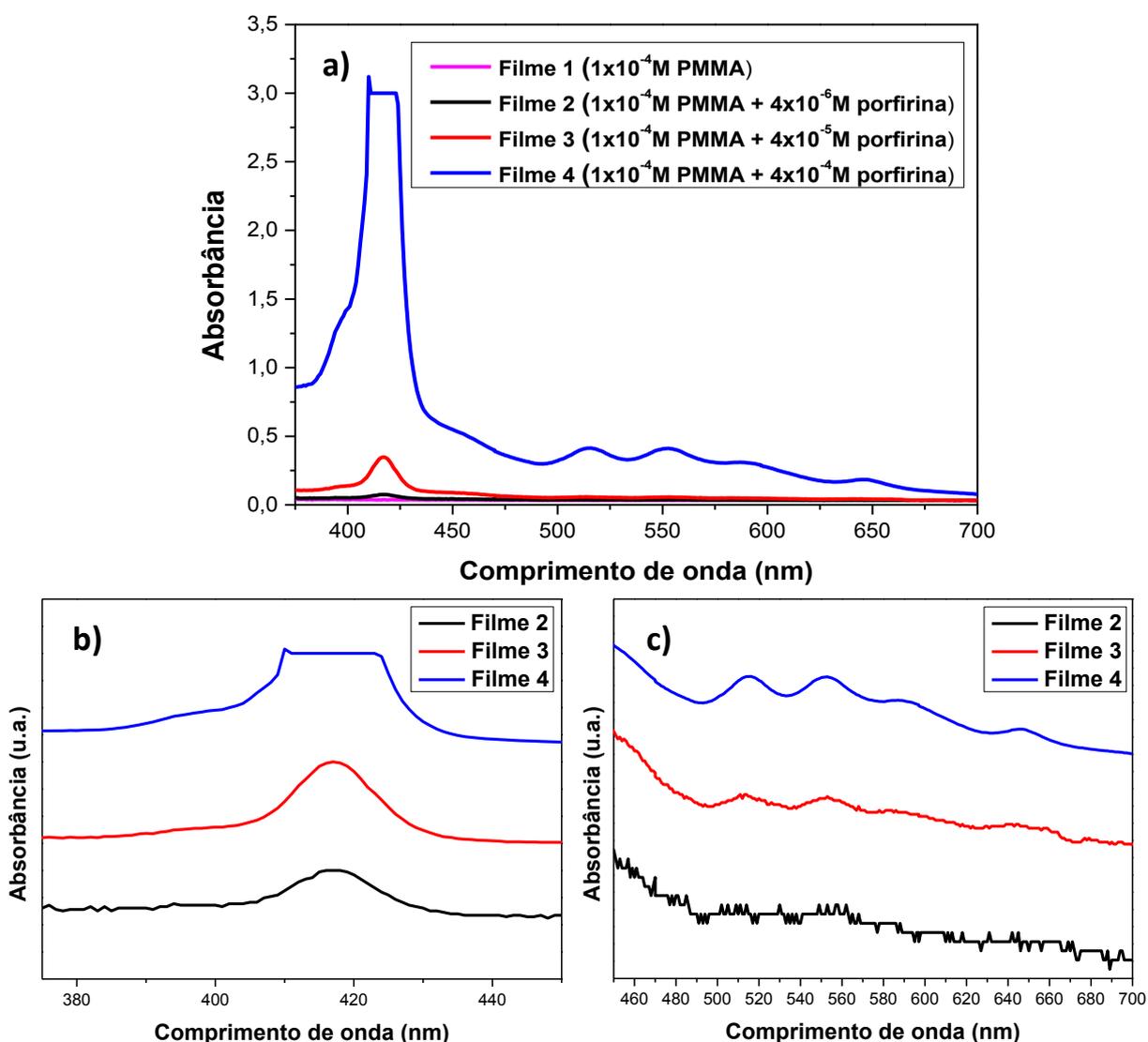
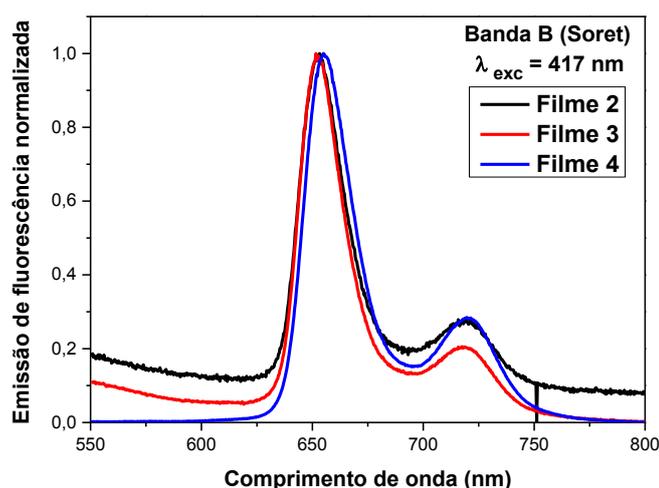


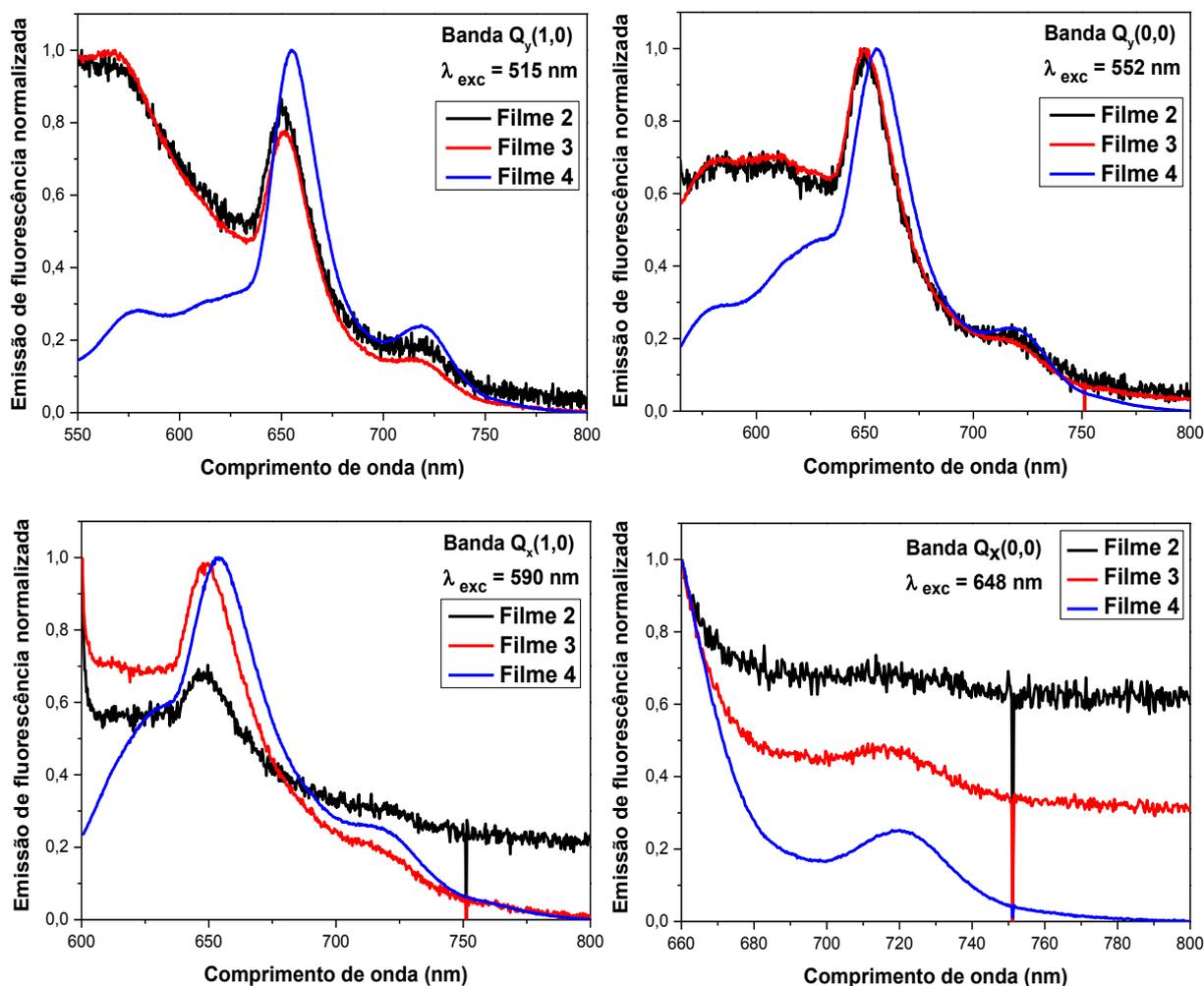
Figura 6-14 - Absorção UV-Vis dos filmes, a) espectro de todas as bandas da porfirina, b) espectro da banda de Soret, e c) espectro das sub-bandas Q.

Como esperado o filme 1 que contém apenas o polímero não apresentou nenhuma absorção na região UV-Vis. Observamos nos filmes a diminuição das intensidades das bandas B e Q ao diminuir a concentração das moléculas de porfirina, na figura 6-14 c) não foi possível observar as sub-bandas Q do filme 2, devido à baixa concentração das porfirinas. Por meio dos espectros dos filmes 3 e 4 vemos que a banda de Soret e as sub-bandas Q apresentam seus máximos de absorção em torno dos mesmos valores das soluções, a banda de Soret em torno de 417 nm e as sub-bandas Q entre 515-650 nm.

#### 6.2.4 Medidas de Emissão de fluorescência dos Filmes em Concentrações Diferentes

Para os filmes seguimos o mesmo padrão utilizado nas medidas das soluções, identificamos as bandas da porfirina nos espectros de absorção e realizamos as medidas de emissão de fluorescência com a excitação nas posições de máximo de absorção. Na figura 6-15 a seguir serão apresentados os espectros de emissão de fluorescência dos filmes de porfirina variando a concentração e o comprimento de onda de excitação.





**Figura 6-15 - Espectros de emissão dos filmes em diferentes comprimentos de excitação.**

Observamos dos espectros que nos filmes a porfirina estudada apresenta duas bandas localizadas por volta de 650 e 700 nm, assim como nas soluções. É também verificado que a intensidade de emissão da primeira banda é mais intensa. Devido à ausência de deslocamento de Stokes uma sobreposição da primeira banda do espectro de emissão de fluorescência com a banda  $Q_x(0,0)$  do espectro de absorção acontece também nos filmes.

Verificamos na figura 6-15 que ao aumentar a concentração das moléculas de porfirina na filme 4, o espectro de emissão de fluorescência sofre deslocamento para maiores comprimentos de onda (red shift), ou seja, surgem agregados do tipo J. Além disso, surge nos espectros de emissão de fluorescência das sub-bandas  $Q_y(1,0)$  e  $Q_y$

(0,0) dois ombros e um ombro em  $Q_x(1,0)$  no intervalo entre 625 - 650 nm, indicando também a presença de agregados do tipo H. Nos espectros de emissão de fluorescência dos filmes 2 e 3 não foram observadas modificações significativas no espectro, desta forma podemos constatar que ao diminuir as moléculas de porfirina nos filmes a desagregação acontece.

### 6.2.5 Medidas de Emissão de Fluorescência Excitada dos Filmes em Concentrações Diferentes

Para confirmarmos a presença dos agregados nos filmes de porfirina realizamos medidas de emissão de fluorescência excitada.

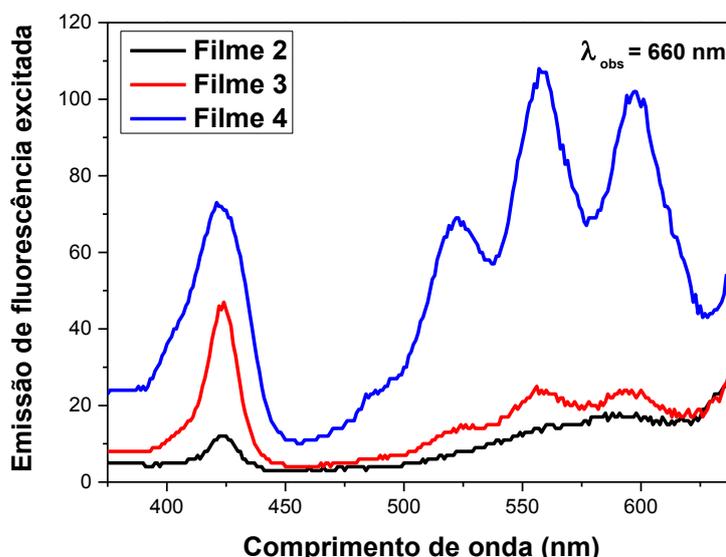


Figura 6-16 - Espectros de emissão de fluorescência excitada das soluções da porfirina.

Vemos do espectro de emissão de fluorescência excitada, figura 6-16, que o deslocamento para o vermelho também é verificado o que fortalece o argumento da formação dos agregados tipo J. Além disso, para o filme 4 a forma de linha quando comparamos com o espectro de absorção apresenta mudança. Essa mudança aparece na banda de Soret, já que no espectro de emissão de fluorescência excitada o filme 4 apresenta um alargamento na banda, além de sofrer um pequeno desvio para o azul quando comparado aos filmes 2 e 3, ou seja, fortalecemos o argumento da formação dos agregados do tipo H.

## 6.3 Resultados e Discussão dos *Scaffolds* de Porfirina

### 6.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Como queríamos identificar uma possível mudança na estrutura, na distribuição dos poros e nos tamanhos dos poros, em consequência da incorporação das moléculas de porfirina nos *scaffolds*, foram realizadas para cada amostra uma série de imagens de MEV em diferentes magnificações. Nesta seção serão apresentadas duas magnificações das imagens referente a parte superior dos *scaffolds* e duas da parte inferior, para maiores detalhes ver apêndice A.

Por meio das imagens de MEV observamos que as estruturas dos *scaffolds* produzidos pelo método de *salt leaching* apresentaram abundância de poros, com diferentes tamanhos distribuídos aleatoriamente. Além disso, os *scaffolds* apresentam uma maior área superficial quando comparados aos filmes em razão da interconectividade dos poros. Nas medidas de EDS que podem ser observadas no apêndice B, podemos ver os elementos que compõem os *scaffolds*. Notamos que o elemento cloro que advém do solvente orgânico aparece nos *scaffolds*, mas em uma quantidade muito menor do que as encontradas nos filmes, ou seja, desprezível.

Na figura 6-17 as imagens MEV são referentes ao *scaffold* 1 (somente PMMA). A formação da estrutura porosa depende do polímero escolhido, já que dependendo da viscosidade da solução a estrutura não se forma. Como a solução do PMMA apresenta alta viscosidade ao passar pelo processo de lixiviação as estruturas são se desmancham e as estruturas formadas são robustas. Além disso, o PMMA apresenta a propriedade de biocompatibilidade (SAMAVEDI, POINDEXTER, *et al.*, 2014), fundamental em aplicações em que os *scaffolds* estão em contato aos organismos vivos.

### Scaffold 1

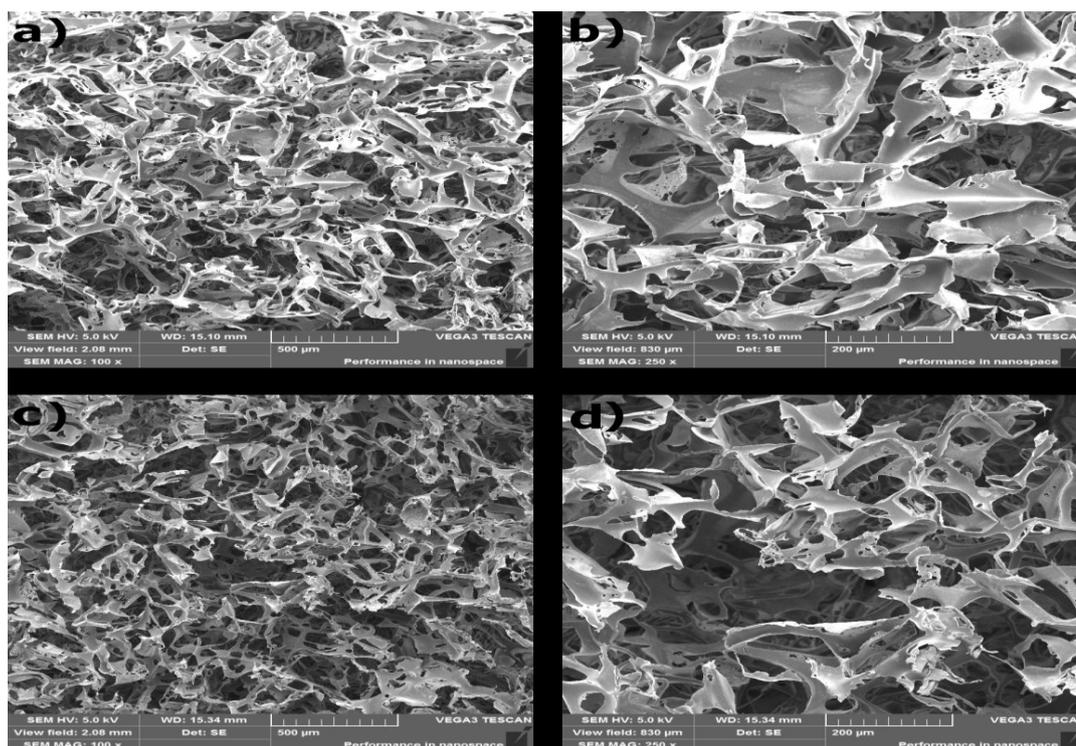


Figura 6-17 - Imagens de MEV do *scaffold* 1 (PMMA), a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x.

Nas imagens da figura 6-17 os poros formados na estrutura apresentam diversos tamanhos e chegam a raios de 450 µm. O tamanho dos raios são de extrema importância dado que as células apresentam tamanhos que variam de 10-50 µm. Como a estrutura produzida apresenta diferentes tamanhos as células teriam fácil acesso e dependendo da molécula dispersa pelas paredes dos poros, o *scaffold* pode ser um bom ambiente na morte celular ou ricos em nutrientes para proliferação das células, por exemplo, o crescimento de pele.

Observamos também que a estrutura da parte superior do *scaffold* apresenta uma pequena diferença em relação a estrutura formada na parte inferior, essa diferença aparece porque ao aplicar o vácuo a face inferior fica em contato com peneira de teflon provocando uma leve deformação dos poros.

As figuras a seguir são referentes aos *scaffolds* com moléculas de porfirina dispersas nas paredes dos poros.

### Scaffold 2

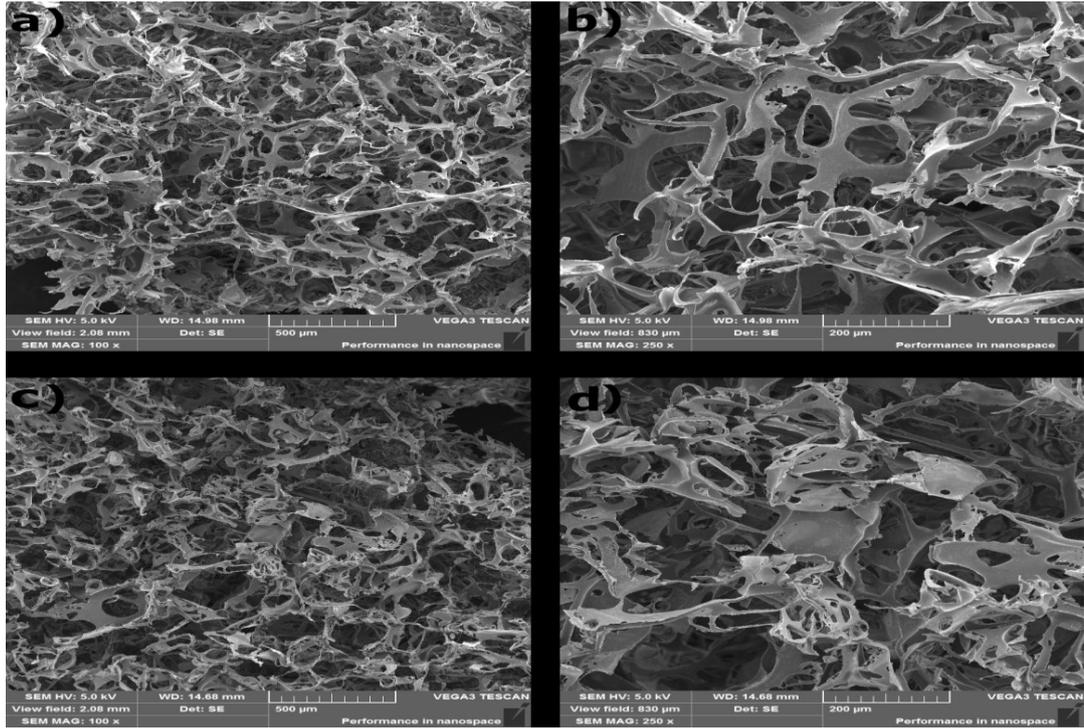


Figura 6-18 - Imagens de MEV do *scaffold 2*, a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x.

### Scaffold 3

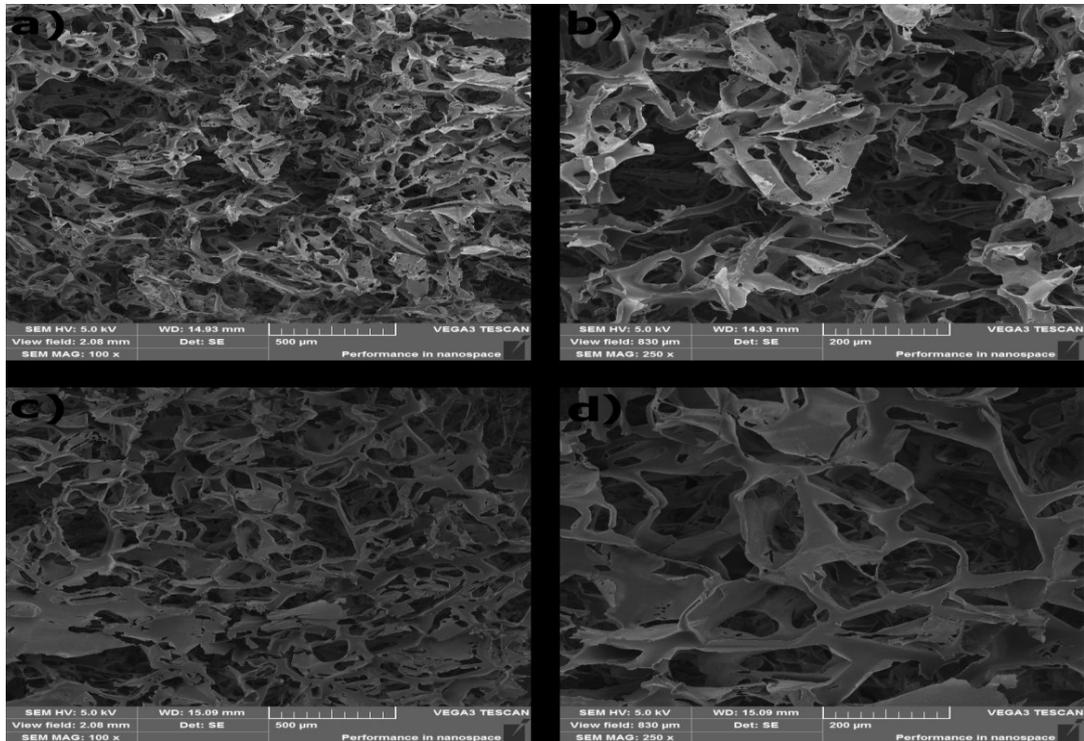


Figura 6-19 - Imagens de MEV do *scaffold 3*, a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x.

#### Scaffold 4

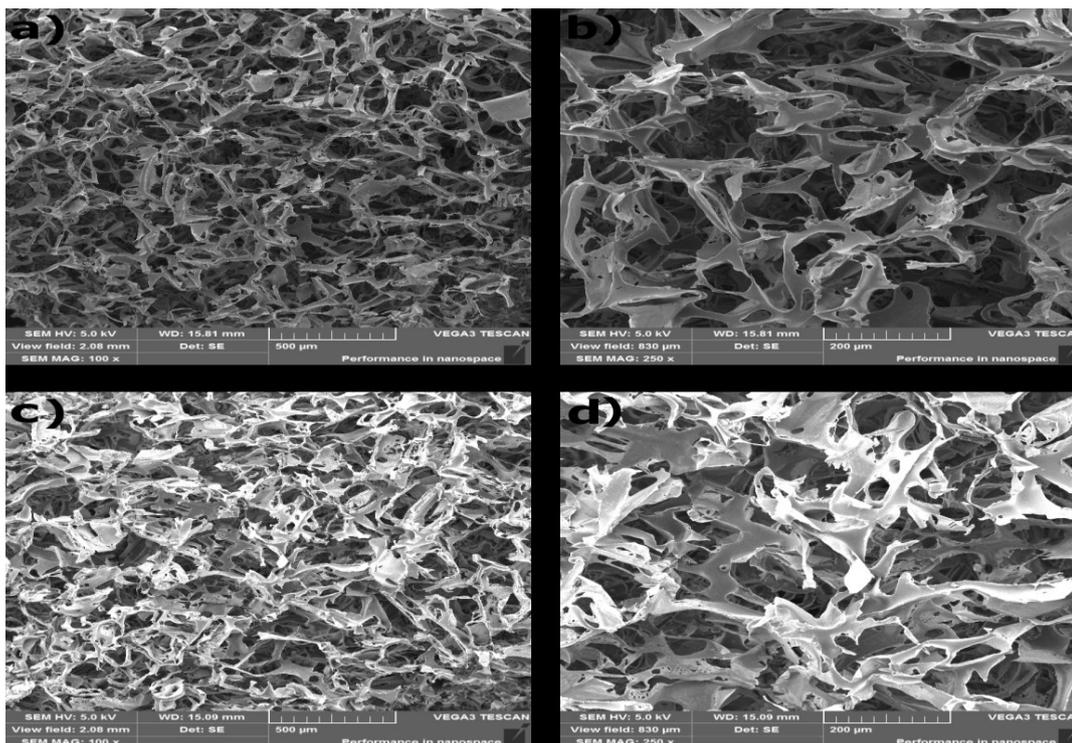


Figura 6-20 - Imagens de MEV do *scaffold 4*, a) e b) imagens da parte superior com magnificações de 100x e 250x e c) e d) imagens da parte inferior com magnificações de 100x e 250x.

Ao adicionar as moléculas de porfirina nos *scaffolds*, não observamos grandes mudanças na estrutura, na distribuição dos poros e nos tamanhos dos poros quando comparamos as imagens do *scaffold* somente com PMMA. As imagens de MEV são importantes na caracterização morfológica, entretanto essas imagens possibilitam somente uma análise qualitativa. Na seção a seguir as mudanças provocadas pela dispersão das moléculas nas paredes dos poros serão apresentadas já que as medidas permitem análises quantitativas.

#### 6.3.2 Microscopia de Força Atômica

Por meio das medidas de MFA, informações sobre a morfologia dos *scaffolds* foram obtidas. Para realização das medidas utilizamos o modo contato intermitente, neste modo o cantiléver oscila por um sistema pizoelétrico, próximo a sua frequência de oscilação, tocando suavemente sobre a amostra. As medidas possibilitaram as análises qualitativas (análises visuais) e quantitativas (estatísticas de primeira e segunda ordem) das superfícies dos *scaffolds*.

Nas figuras abaixo serão apresentadas as imagens de MFA 2D e 3D com área de  $2,5\ \mu\text{m} \times 2,5\ \mu\text{m}$  e os perfis de altura de cada *scaffold*. Pode-se observar algumas alterações na superfície dos *scaffolds* em função da concentração das moléculas de porfirina adicionadas na matriz polimérica.

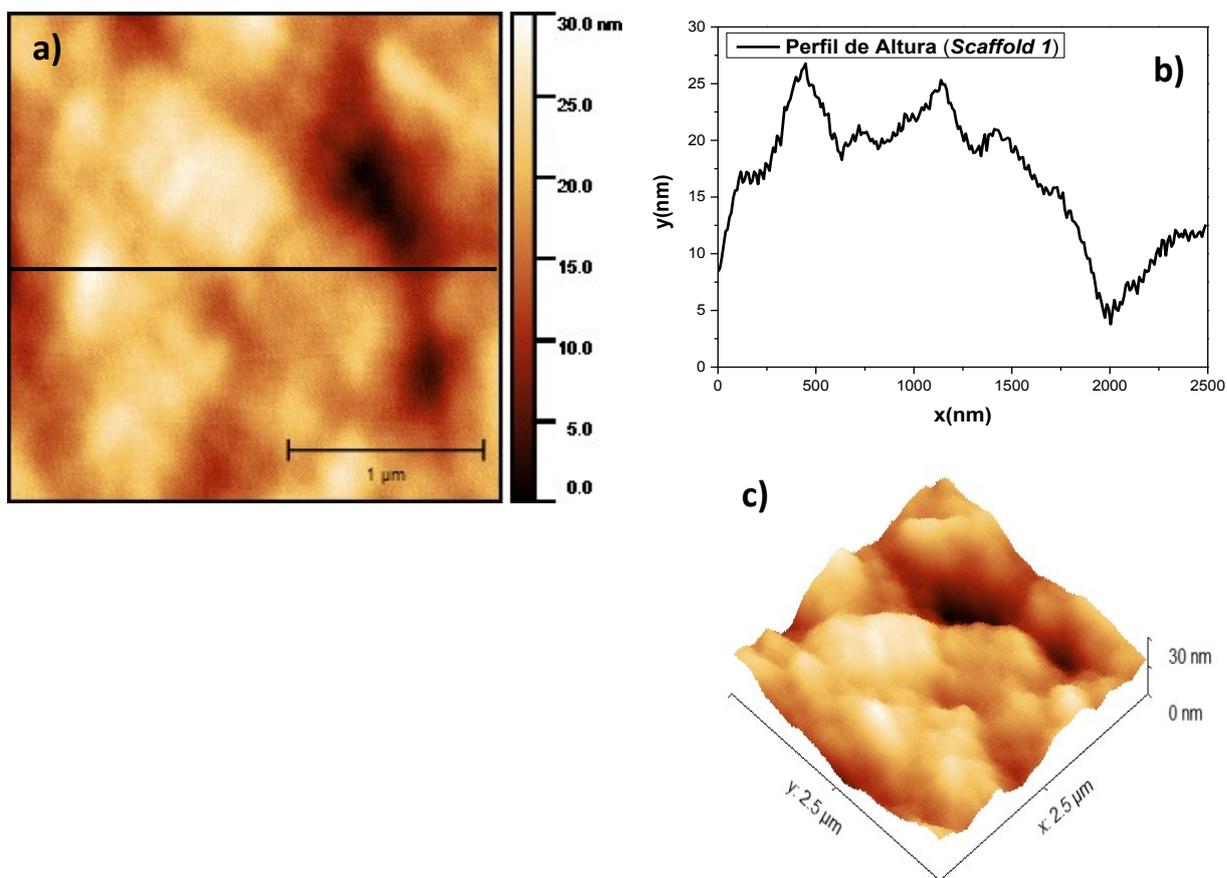


Figura 6-21 - MFA do *scaffold* 1, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

No perfil de altura e nas imagens da figura 6-21 percebe-se a existência de grandes aglomerados distribuídos sobre a parede do poro do *scaffold* somente de PMMA (*scaffold* 1). Esses aglomerados em alguns pontos podem estar associados a maneira como o sal acomoda o polímero e também a não uniforme da densidade do polímero, ou seja, o PMMA possui uma não homogeneidade intrínseca.

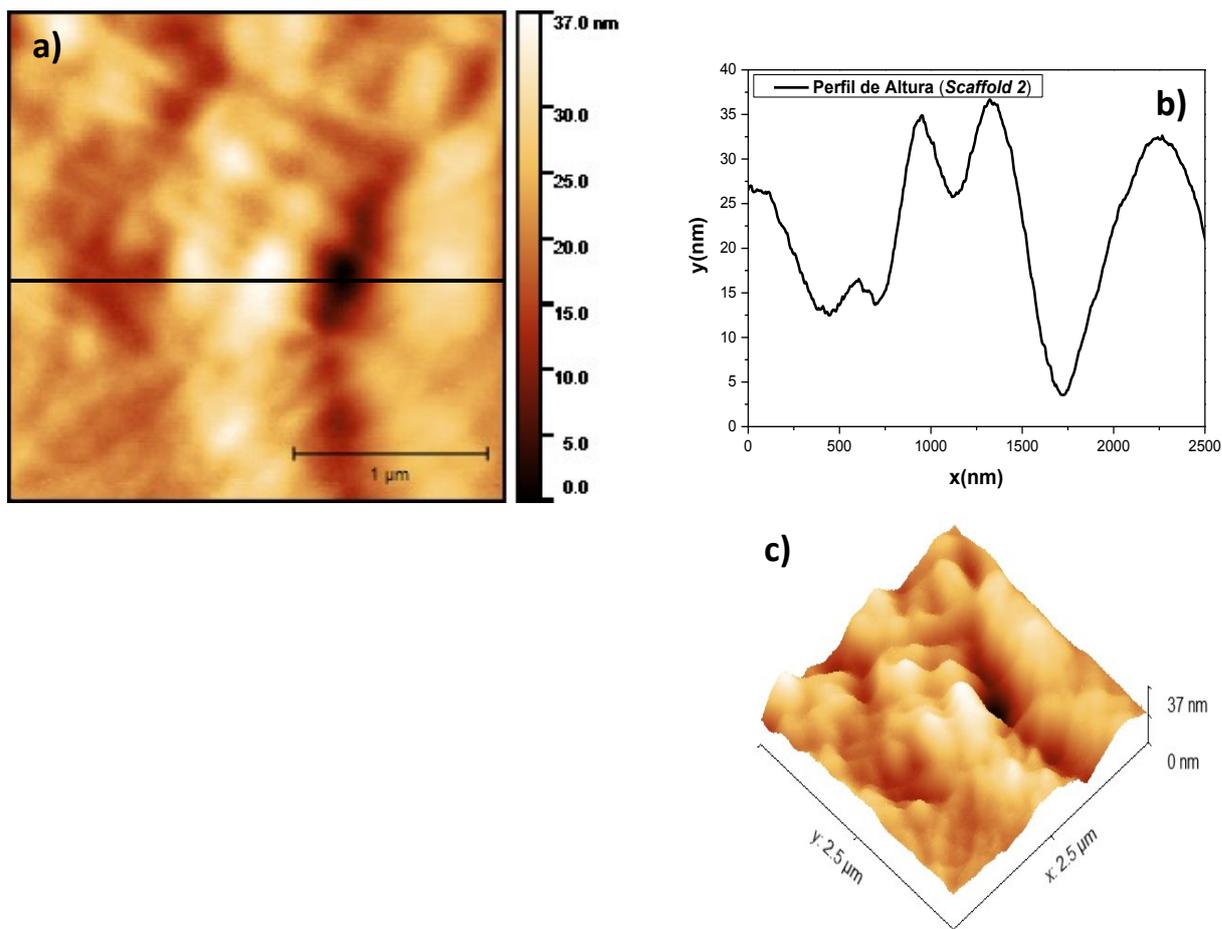


Figura 6-22 - MFA do *scaffold 2*, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

Ao adicionar uma concentração de  $4 \times 10^{-4}$  M da solução de porfirina na solução polimérica, observamos na figura 6-22 (*scaffold 2*) a presença dos aglomerados assim como no *scaffold 1*, mas agora esses aglomerados são menores e com maiores picos. Essa mudança na superfície pode ser resultado da dispersão das moléculas de porfirina sobre o polímero.

Percebemos nas figuras 6-23 e 6-24 que ao aumentar ainda mais a concentração das porfirinas nos *scaffolds*, os aglomerados ainda permanecem e os picos desses aglomerados torna-se cada vez maiores. A permanência desses aglomerados como já dito para o *scaffold 2* pode ser da dispersão das porfirinas sobre o polímero e o aumento dos picos deve estar ligado ao fato de que essas moléculas se agregam, ou seja, quanto elas se agregam ocorre a junção dessas moléculas aumento a altura dos picos.

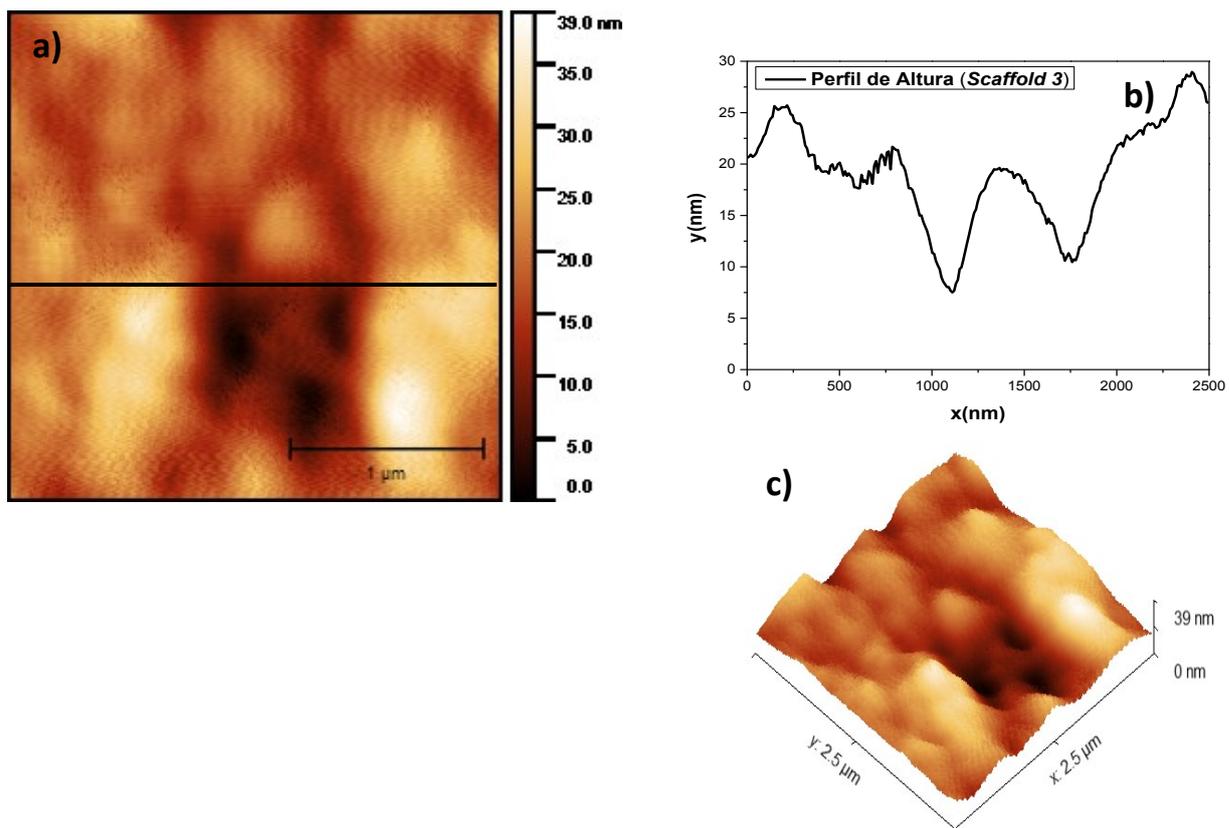


Figura 6-23 - MFA do *scaffold* 3, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

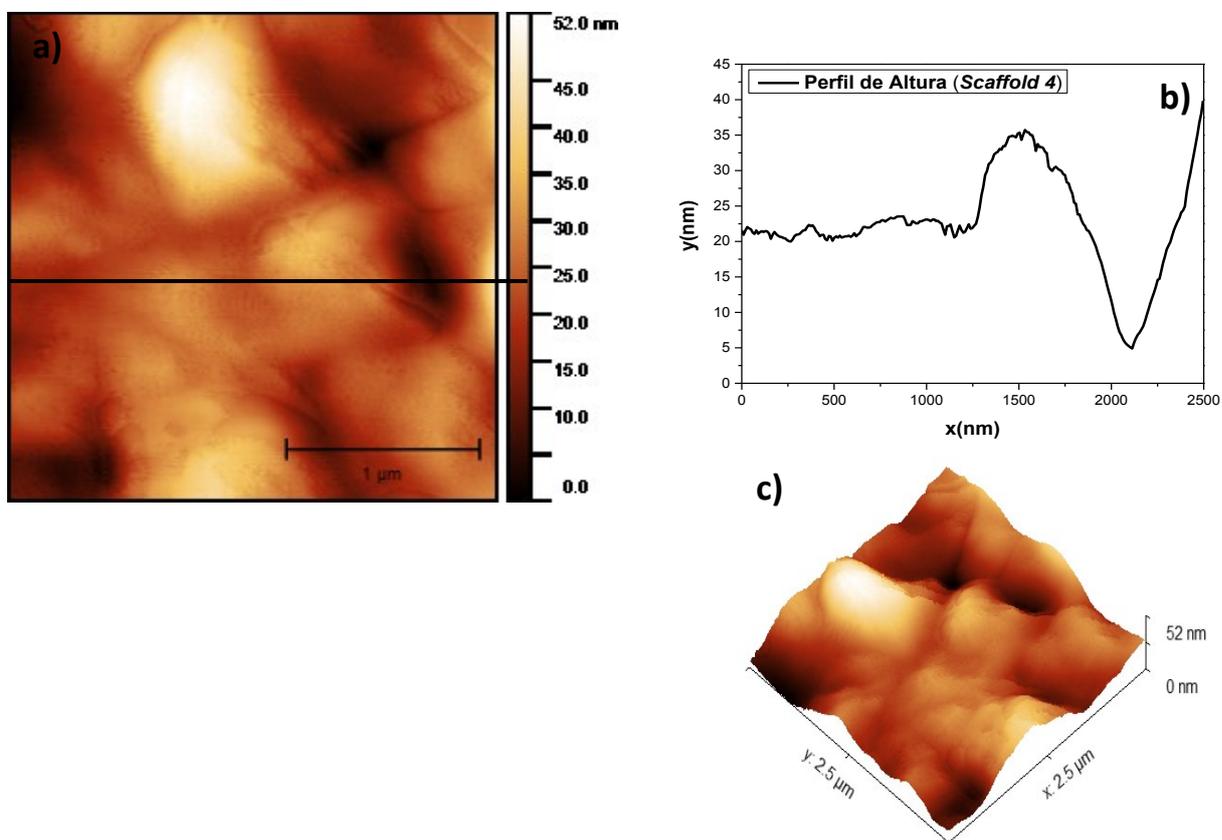


Figura 6-24 - MFA do *scaffold* 4, a) imagem 2D, b) perfil de altura e c) imagem 3D.

Concluimos, por meio das imagens de MFA que dependendo da concentração das moléculas de porfirina, os *scaffolds* confeccionados apresentam superfícies diferentes. Quando a concentração de porfirina é baixa o *scaffold* confeccionado pela técnica *salt leaching* apresenta superfície com aglomerados menores, já que a porfirina se acomoda sobre o polímero. Em concentrações mais altas de porfirina a formação de agregados aumenta, e esse aumento de agregados produz superfícies com maiores alturas nos picos.

Através do cálculo da rugosidade quadrática média ( $\sigma_{RMS}$ ), *Skewness* e *Kurtosis*, foram obtidas as informações quantitativas sobre as superfícies dos *scaffolds*. Os valores desses parâmetros estão presentes na tabela 11 abaixo.

**Tabela 11 - Valores da rugosidade quadrática média, Skewness e Kurtosis de cada *scaffold*.  $C_p$  = concentração das moléculas de porfirina nos *scaffolds*.**

<b>Amostra</b>	<b><math>\sigma_{RMS}</math> (nm)</b>	<b><math>\sigma_{SK}</math></b>	<b><math>\sigma_{KU}</math></b>
<b>Scaffold 1 (PMMA)</b>	4,969	-0,547	0,262
<b>Scaffold 2 (<math>C_p = 4 \times 10^{-6}</math> M)</b>	5,257	-0,368	0,529
<b>Scaffold 3 (<math>C_p = 4 \times 10^{-5}</math> M)</b>	6,311	0,040	0,054
<b>Scaffold 4 (<math>C_p = 4 \times 10^{-4}</math> M)</b>	8,917	0,388	0,605

Notamos que os valores de rugosidade quadrática média dos *scaffolds* sofrem um aumento quando adicionamos mais moléculas de porfirina, ou seja, aumentamos a concentração. Esse aumento nos valores de rugosidade pode estar ligado ao fato de que quando aumentamos a concentração as moléculas de porfirina se agregam e produz picos mais pontiagudos. Observamos também que para valores de rugosidades mais altos as paredes apresentam superfícies que se estruturam de forma menos homogênea.

O parâmetro *Skewness* nos mostra se a superfície terá mais picos ou vales. Por meio dos valores da tabela 11 vemos que os *scaffolds* 1 e 2 apresentam mais vales, o *scaffold* 3 um equilíbrio na quantidade de picos e vales e o *scaffold* 4 mais picos.

O parâmetro *Kurtosis* nos mostra se a superfície terá mais picos pontiagudos ou picos mais suaves. Por meio dos valores da tabela 11 vemos que os todos os *scaffolds* apresentam picos mais pontiagudos.

Esses parâmetros confirmam os argumentos utilizados nas análises feitas anteriormente nas imagens 2D, 3D e perfis de altura de cada *scaffold*.

O gráfico do número de eventos em função da distribuição de alturas é apresentado na figura 6-25.

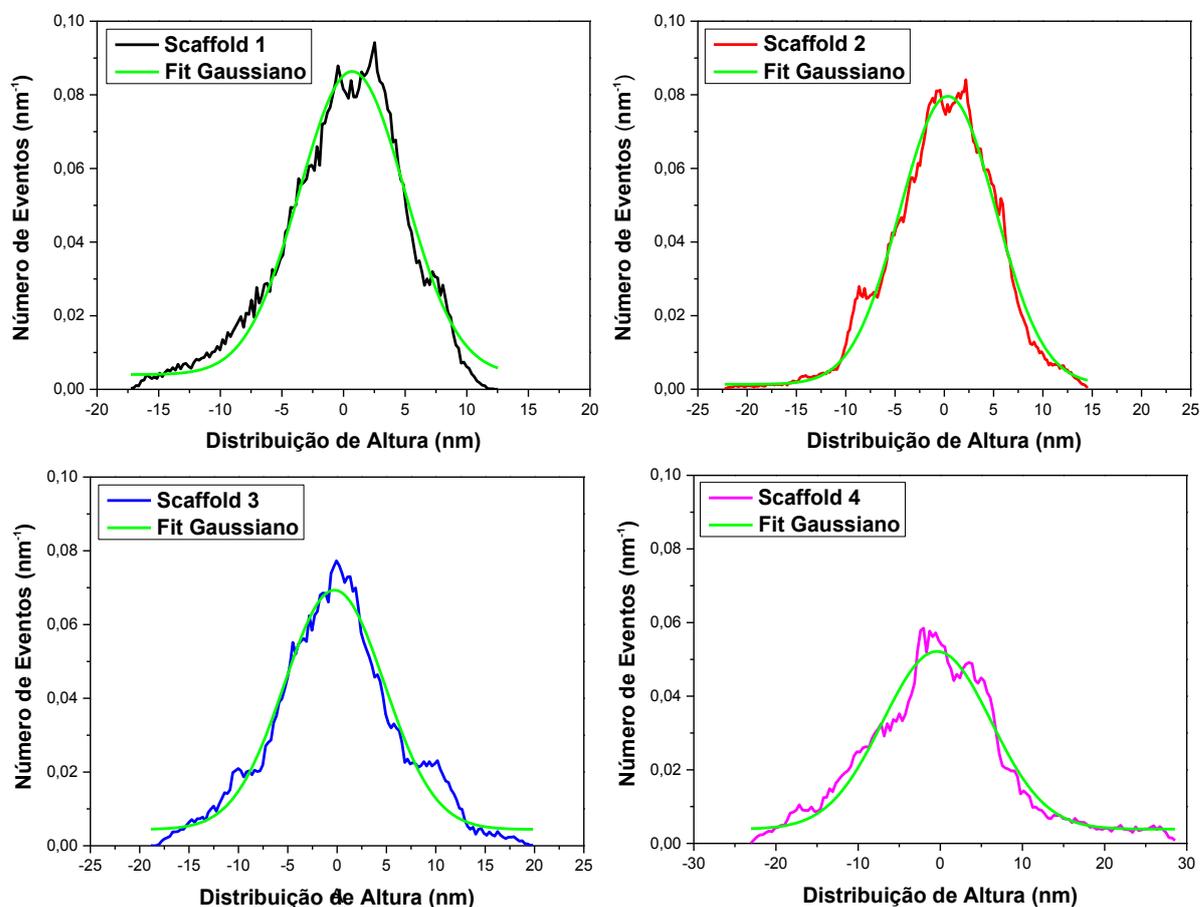


Figura 6-25 - O gráfico do número de eventos ( $\text{nm}^{-1}$ ) em função da distribuição de alturas (nm) de cada *scaffold*.

Em todos os *scaffolds* verificamos que o perfil da Gaussiana é largo, mostrando que as superfícies dos *scaffolds* possuem dispersão nas alturas dos picos. Esse alargamento da Gaussiana só confirma que o já observamos nas análises das imagens de MFA.

Por meio da estatística de segunda ordem realizamos para cada *scaffold* um estudo a fim de obter a imagem de autocorrelação entre as alturas nas imagens de MFA. As imagens de autocorrelação podem ser observadas na figura 6-26.

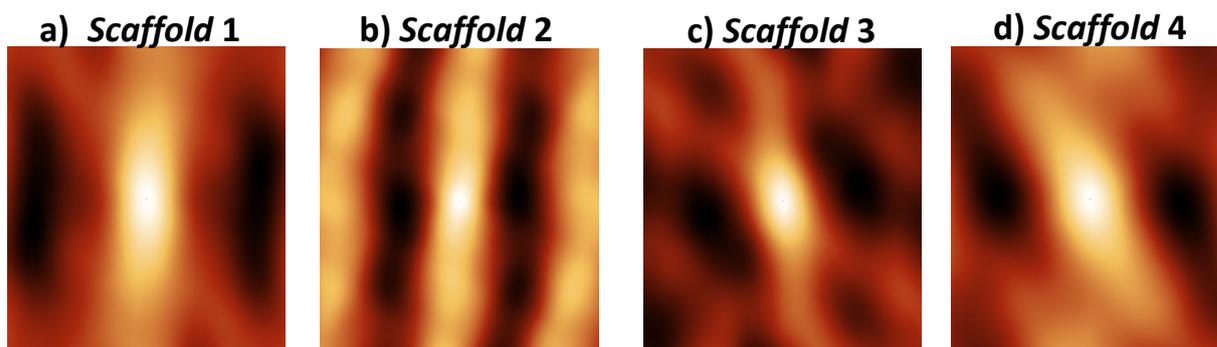


Figura 6-26 - Imagens de autocovariância de altura dos *scaffolds*, a) *scaffold 1*, b) *scaffold 2*, c) *scaffold 3* e d) *scaffold 4*.

As regiões mais claras indicam as distâncias onde as alturas são mais correlacionadas. As imagens demonstram que a correlação das alturas ocorre de maneiras diferentes em direções distintas. Podemos observar que o *scaffold 1* (PMMA) apresenta uma correlação de alturas na direção vertical e ao adicionar uma baixa concentração de porfirina (*scaffold 2*) essa correlação aumenta ainda mais nesta direção. Quando aumentamos mais a concentração percebemos no *scaffold 3* uma correlação menor na direção vertical e na concentração mais alta (*scaffold 4*) a correlação passa a ser maior na direção horizontal.

Podemos definir a função correlação de diferença de altura  $g(\rho)$ , usando a função de autocovariância de altura  $G(\rho)$  e chegamos na equação 12. Por meio dessa equação obtemos os gráficos apresentados na figura 6-27.

A figura 6-27 apresenta a componente da correlação de diferença de altura para todos os *scaffolds*. A figura 6-27 a) mostra a componente na direção horizontal  $g(x)$  e na figura 6-27 b) a direção vertical  $g(y)$ .

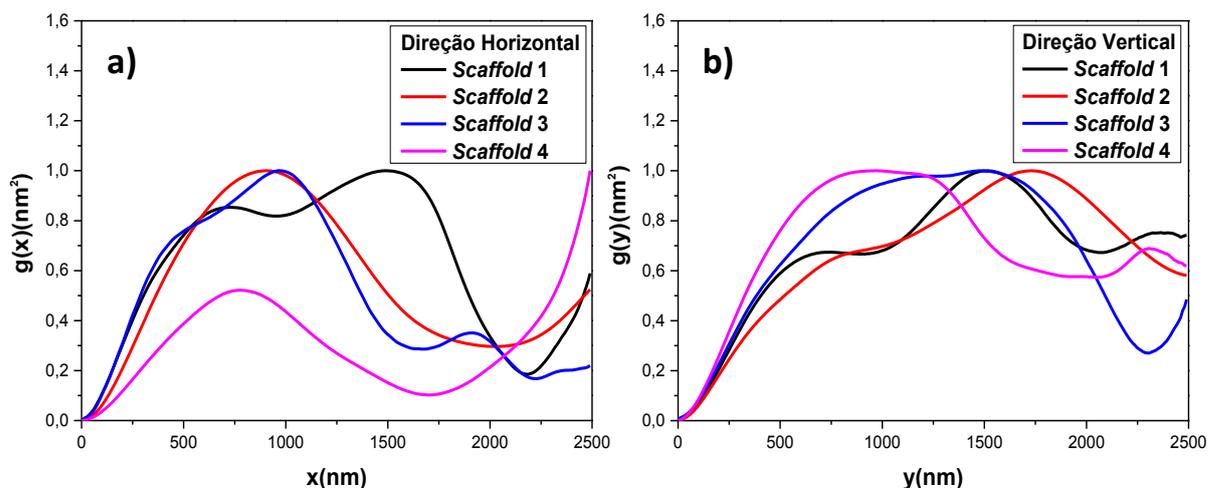


Figura 6-27 - Componentes da função correlação de diferença de alturas, a) direção horizontal  $g(x)$  e b) direção vertical  $g(y)$ .

Por meio do valor do comprimento de correlação lateral ( $\xi$ ), cuja intensidade de correlação é definida como o valor onde a função decai a  $1/e$ , podemos obter informações sobre até que distância dois picos podem ser correlacionados.

Na tabela 12 contém os valores dos comprimentos de correlação lateral extraídos por meios dos gráficos da função correlação de altura nas componentes horizontais e verticais.

Tabela 12 - Valores do comprimento de correlação lateral dos *scaffolds*.  $C_p$  = concentração das moléculas de porfirina nos *scaffolds*.

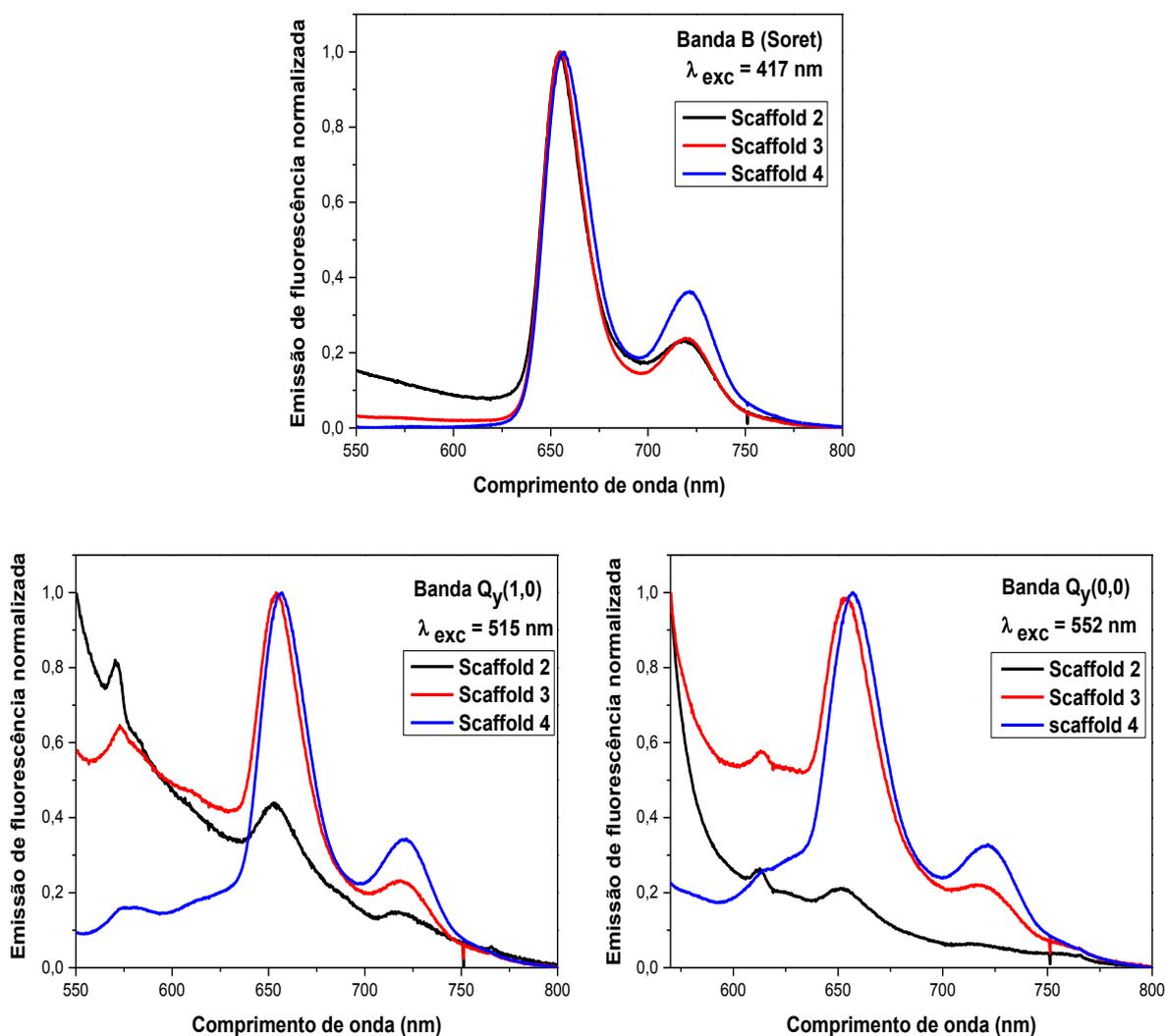
Amostra	Direção	$\xi$ (nm)
<b>Scaffold 1 (PMMA)</b>	Horizontal	233,77
<b>Scaffold 2 (<math>C_p = 4 \times 10^{-6}</math> M)</b>	Horizontal	290,56
<b>Scaffold 3 (<math>C_p = 4 \times 10^{-5}</math> M)</b>	Horizontal	227,49
<b>Scaffold 4 (<math>C_p = 4 \times 10^{-4}</math> M)</b>	Horizontal	257,68
<b>Scaffold 1 (PMMA)</b>	Vertical	308,30
<b>Scaffold 2 (<math>C_p = 4 \times 10^{-6}</math> M)</b>	Vertical	361,53
<b>Scaffold 3 (<math>C_p = 4 \times 10^{-5}</math> M)</b>	Vertical	290,89
<b>Scaffold 4 (<math>C_p = 4 \times 10^{-4}</math> M)</b>	Vertical	478,62

Os valores da tabela indicam que os picos estão mais correlacionados nos *scaffolds* em ambas as direções. Na direção horizontal os valores de  $\xi$  está entre 230 a 290 nm e na direção vertical de 290 a 480 nm. Essa anisotropia na direção vertical deve estar correlacionada a técnica de confecção dos *scaffolds*, já que na técnica *salt*

*leaching* utilizamos uma bomba de vácuo para fazer o escoamento da solução polimérica e esse escoamento é feito na direção vertical.

### 6.3.3 Medidas de Emissão de Fluorescência dos *Scaffolds* em Concentrações Diferentes

Na figura 6-28 a seguir serão apresentados os espectros de emissão de fluorescência dos *scaffolds* de porfirina variando a concentração e o comprimento de onda de excitação.



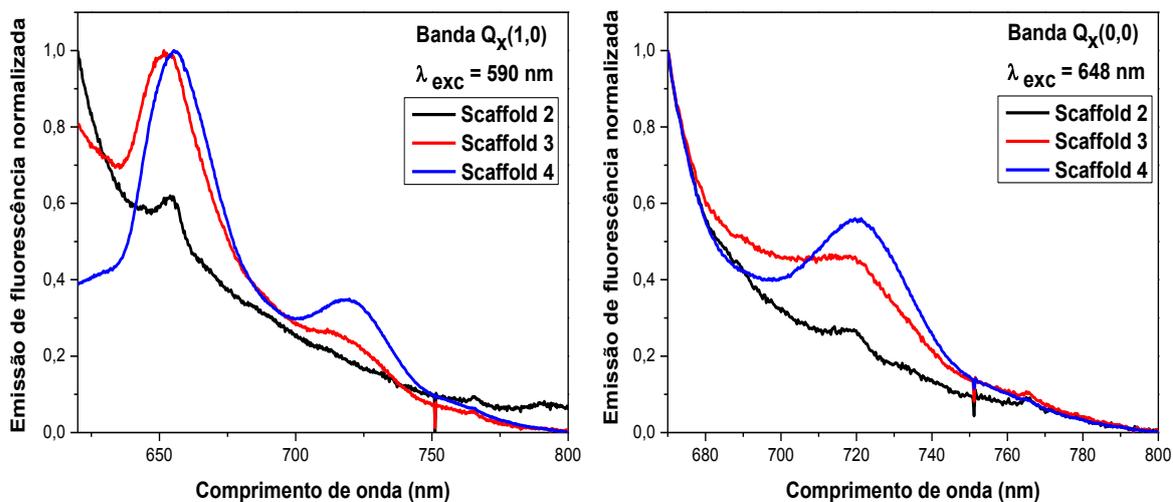


Figura 6-28 - Espectros de emissão dos *scaffolds* em diferentes comprimentos de excitação.

Observamos dos espectros que nos *scaffolds* a porfirina estudada apresenta duas bandas localizadas por volta de 650 e 700 nm, assim como nos filmes e nas soluções. É também verificado que a intensidade de emissão da primeira banda é mais intensa. Devido à ausência de deslocamento de Stokes uma sobreposição da primeira banda do espectro de emissão de fluorescência com a banda  $Q_x(0,0)$  do espectro de absorção acontece também nos *scaffolds*.

Verificamos na figura 6-28 que ao aumentar a concentração das moléculas de porfirina no *scaffold* 4, o espectro de emissão de fluorescência sofre deslocamento para maiores comprimentos de onda (red shift), ou seja, surgem agregados do tipo J. Além disso, surge dois ombros no espectro (Figura 6-28 b)) no intervalo entre 550-640 nm e um ombro no espectro (Figura 6-28 c)) no intervalo entre 600-640 nm, indicando também a presença de agregados do tipo H. Nos espectros de emissão de fluorescência dos *scaffolds* 2 e 3 não foram observadas modificações significativas no espectro, desta forma podemos constatar que ao diminuir as moléculas de porfirina nos *scaffolds* a desagregação acontece.

### 6.3.4 Medidas de Emissão de Fluorescência Excitada dos *Scaffolds* em Concentrações Diferentes

Para confirmarmos a presença dos agregados nos *scaffolds* de porfirina realizamos medidas de emissão de fluorescência excitada.

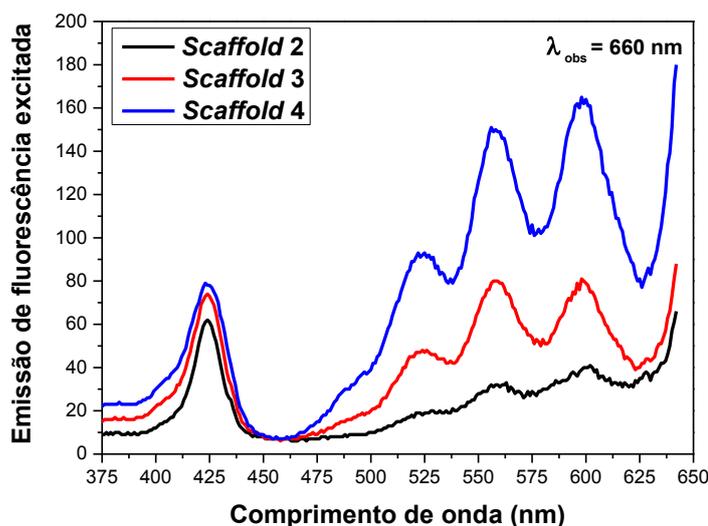


Figura 6-29 - Espectros de emissão de fluorescência excitada dos *scaffolds* com porfirina.

Vemos do espectro de emissão de fluorescência excitada dos *scaffolds*, figura 6-29, que o deslocamento para o vermelho também é verificado o que fortalece o argumento da formação dos agregados tipo J. Como não foi possível realizar as medidas de absorção dos *scaffolds*, a comparação dos deslocamentos para o vermelho foi feita com relação ao máximo de absorção do monômero de porfirina em solução.

## **7 Conclusões e Perspectivas Futuras**

### **7.1 Conclusões**

Neste trabalho conseguimos fabricar filmes do tipo *guest-host* e *scaffolds* incorporando concentrações diferentes das moléculas de porfirina na matriz polimérica de PMMA. Os filmes foram confeccionados por meio da técnica *casting* que permitiu a obtenção de estruturas autossustentadas e os *scaffolds* por meio da técnica *salt leaching* que formou as estruturas porosas.

As imagens de MEV dos filmes não apresentaram muitos detalhes da superfície, somente uma visão geral. Para os *scaffolds* nas imagens de MEV observamos que as estruturas produzidas pelo método de *salt leaching* apresentaram abundância de poros, com diferentes tamanhos distribuídos aleatoriamente. Além disso, os *scaffolds* apresentam uma maior área superficial quando comparados aos filmes em razão da interconectividade dos poros. Os poros formados na estrutura apresentam diversos tamanhos e chegam a raios de 450  $\mu\text{m}$ .

As imagens de MFA e a estatística de primeira ordem dos filmes mostraram que para baixas concentrações as superfícies são mais homogêneas e em altas concentrações as superfícies perdem a homogeneidade já que a formação de agregados aumenta, e esse aumento de agregados diminui a interação dos polímeros com as moléculas. A estatística de segunda ordem das imagens de MFA mostraram que os picos estão pouco correlacionados nas direções horizontais e verticais, a baixa correlação é resultado da formação isotrópica dos filmes. Assim como nos filmes as imagens de MFA e a estatística de primeira ordem mostraram que dependendo da concentração das moléculas de porfirina, os *scaffolds* confeccionados apresentam superfícies diferentes. Quando a concentração de porfirina é baixa o *scaffold* apresenta superfície com aglomerados menores, já que a porfirina se acomoda sobre o polímero, em concentrações mais altas de porfirina a formação de agregados aumenta, e esse aumento de agregados produz superfícies com maiores alturas nos picos. A estatística de segunda ordem das imagens de MFA dos *scaffolds* mostraram que os picos estão mais correlacionados nas direções horizontais e verticais.

Verificamos nos espectros de emissão de fluorescência que ao aumentar a concentração das moléculas de porfirina no filme 4, o espectro de emissão de

fluorescência sofre deslocamento para maiores comprimentos de onda (red shift), ou seja, surgem agregados do tipo J. Além disso, surge nos espectros de emissão de fluorescência dois ombros indicando também a presença de agregados do tipo H. Nos espectros de emissão de fluorescência dos filmes 2 e 3 não foram observadas modificações significativas no espectro, desta forma podemos constatar que ao diminuir as moléculas de porfirina nos filmes a desagregação acontece. Nos espectros de emissão de fluorescência dos *scaffolds* também observamos as mesmas modificações.

Do espectro de emissão de fluorescência excitada verificamos também o deslocamento para o vermelho o que fortalece o argumento da formação dos agregados tipo J. Além disso, para o filme 4 a forma de linha quando comparamos com o espectro de absorção apresenta mudança. Essa mudança aparece na banda de Soret, já que no espectro de emissão de fluorescência excitada o filme 4 apresenta um alargamento na banda, além de sofrer um pequeno desvio para o azul quando comparado aos filmes 2 e 3, ou seja, fortalecemos o argumento da formação dos agregados do tipo H. Nos *scaffolds* também aparecem deslocados para o vermelho, ou seja, a formação dos agregados tipo J.

No geral podemos concluir que os filmes e os *scaffolds* podem ser promissores em aplicações de PDT, uma vez que existem inúmeros estudos demonstrando que as moléculas de porfirina produzem ROS que provocam a morte células tumorais. Os *scaffolds* por apresentarem uma área superficial maior e poros interconectados seria o mais promissor. Nos *scaffolds* os poros chegam a tamanhos de 450  $\mu\text{m}$  e as células apresentam tamanhos que viriam de 10-50  $\mu\text{m}$ . Sendo assim, as células teriam fácil acesso, causando assim a morte das células cancerosas por meio da geração do oxigênio singleto.

## 7.2 Perspectivas Futuras

- Os filmes e *scaffolds* passarão por testes de meio de cultura para ver o seu potencial na morte de células tumorais.
- Para otimizar as amostras pretendemos estudar a produção do oxigênio singleto nos filmes e *scaffolds* ligando nas moléculas de porfirina uma molécula que detecte essa

produção e monitoraremos por meio das medidas de emissão de fluorescência pelo tempo.

## 8 Apêndice A

### 8.1 Imagens de MEV em Diferentes Magnificações dos Filmes de Porfirina

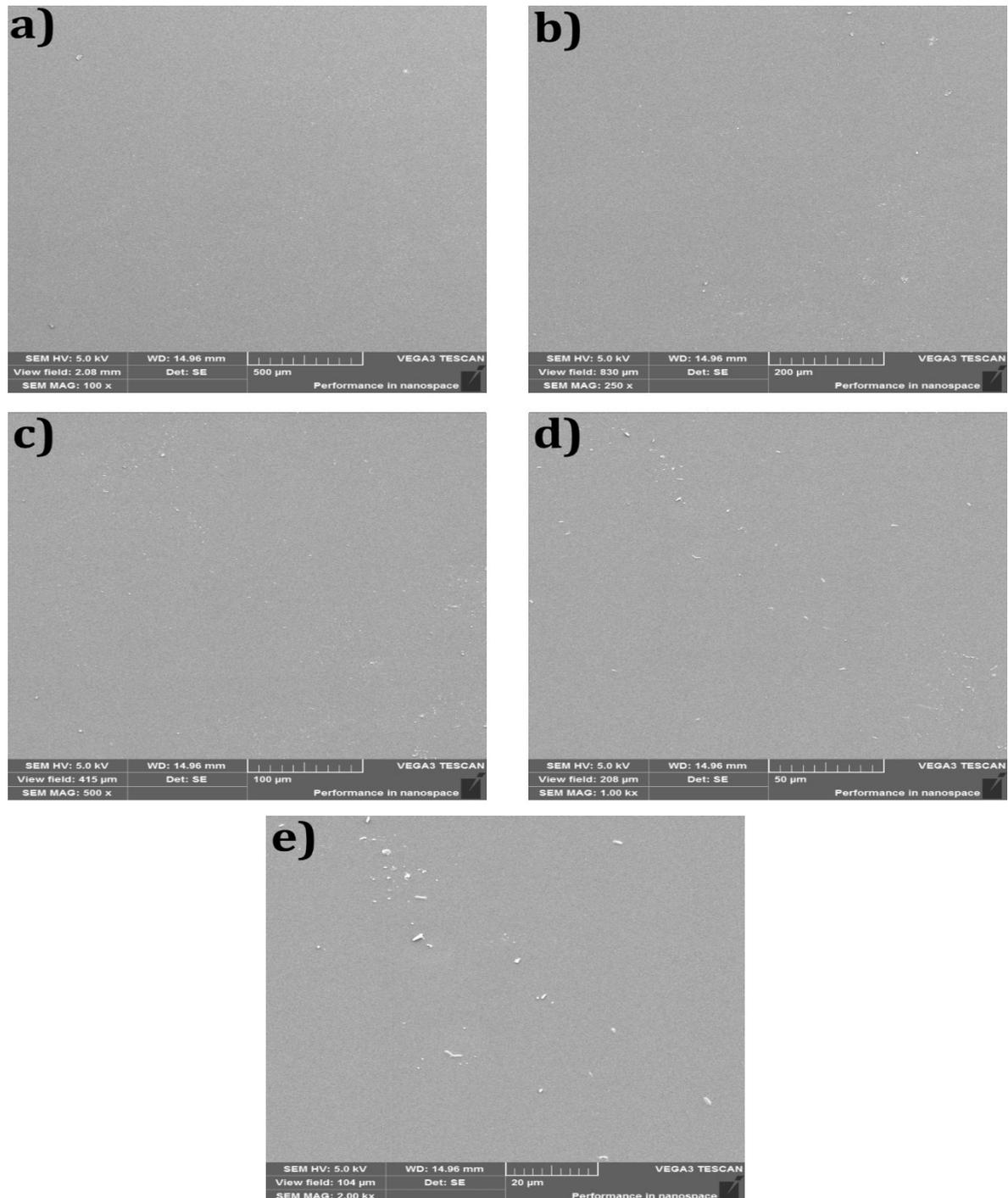


Figura 8-1 - Imagens de MEV do filme 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

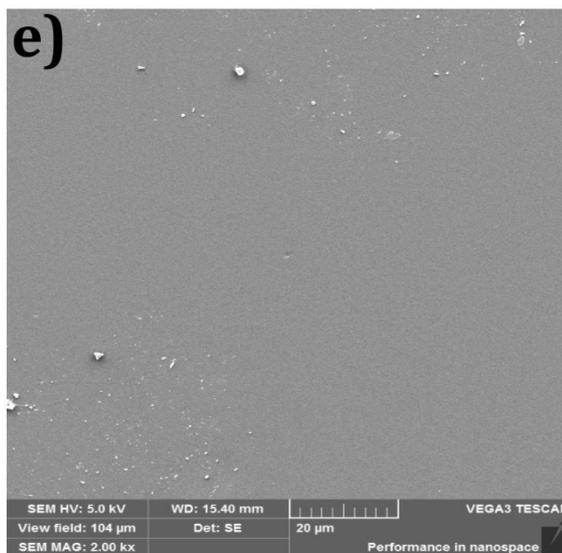
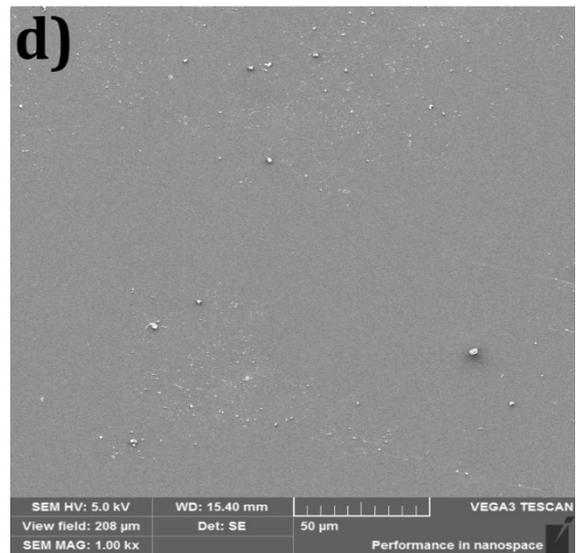
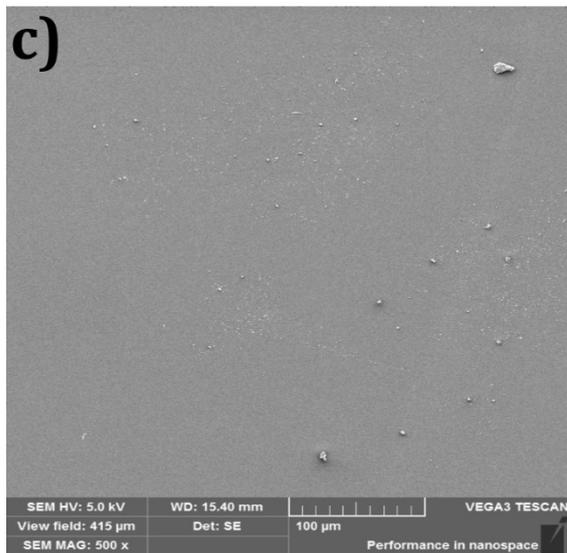
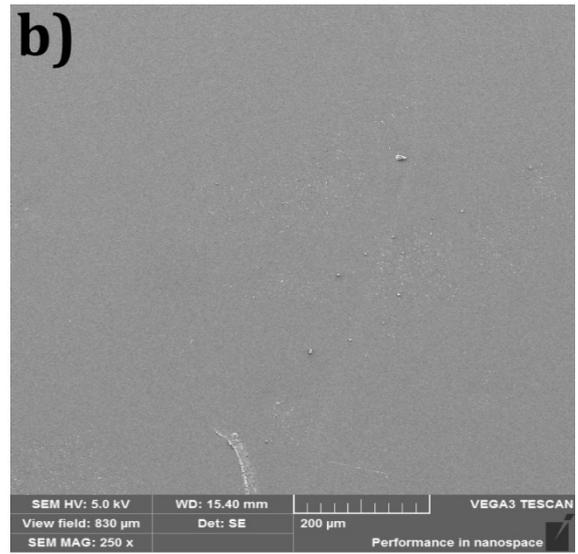
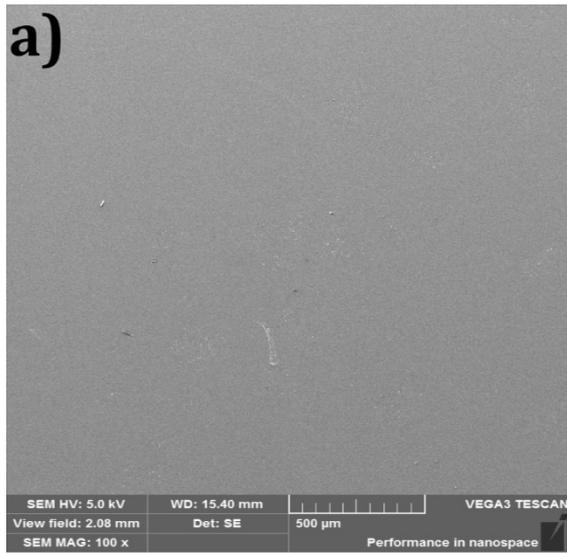


Figura 8-2 - Imagens de MEV do filme 2 (PMMA/porfirina 25  $\mu$ L), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

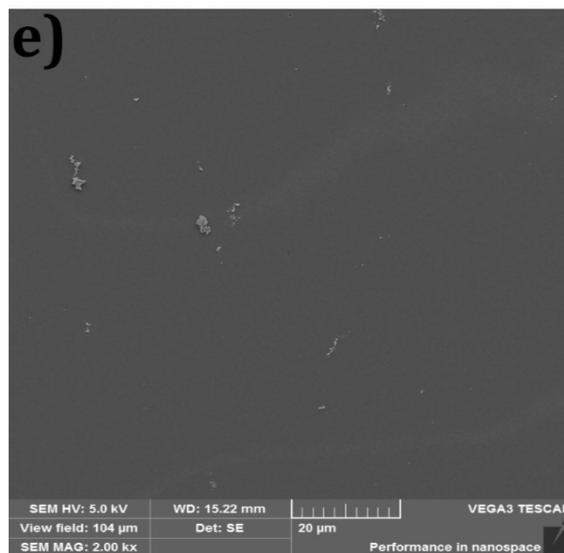
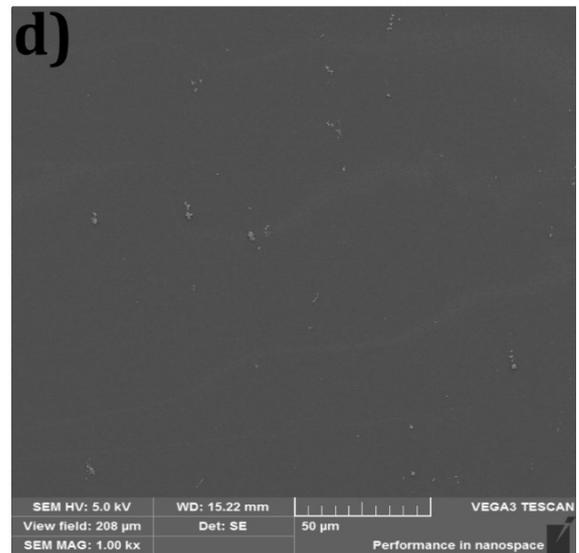
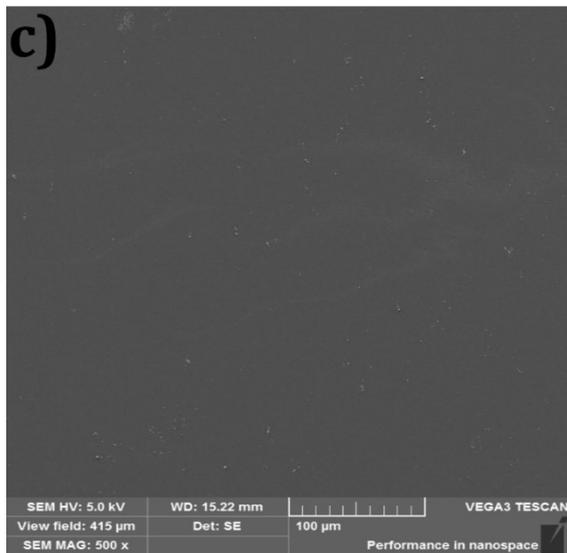
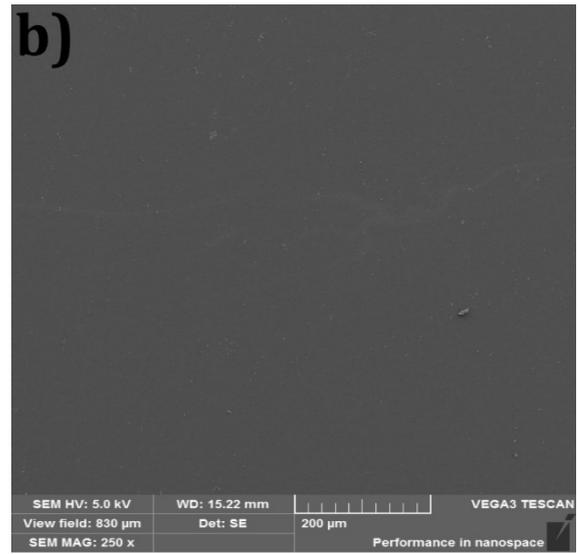
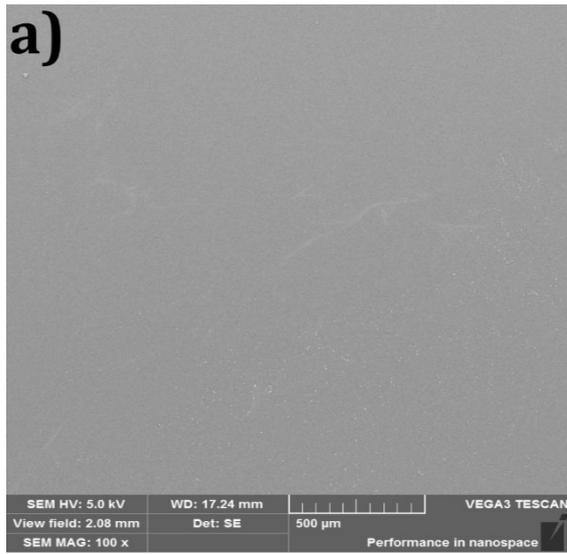


Figura 8-3 - Imagens de MEV do filme 3 (PMMA/porfirina 250 μL), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

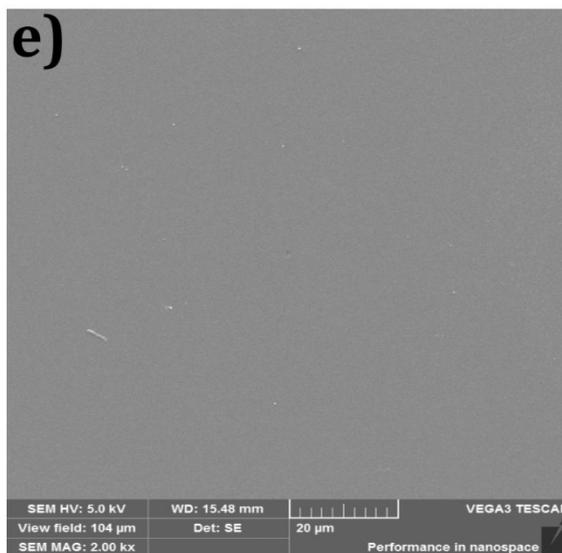
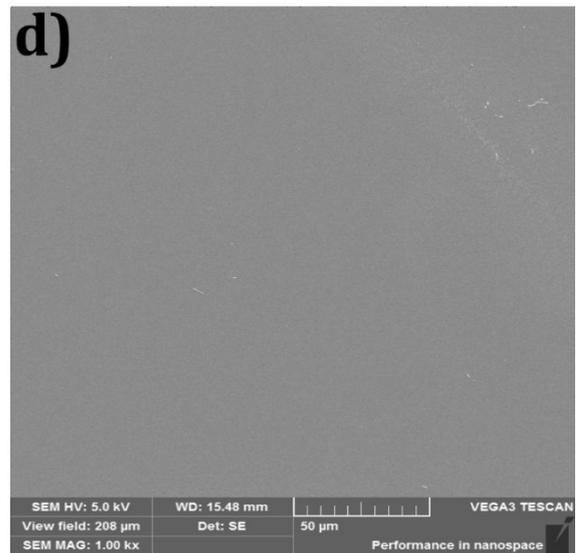
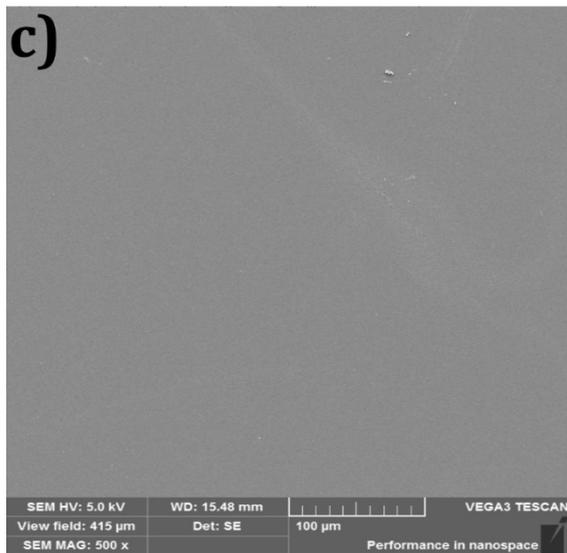
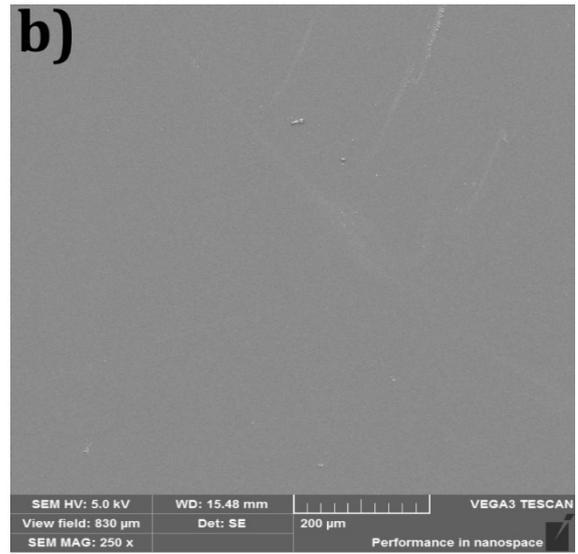
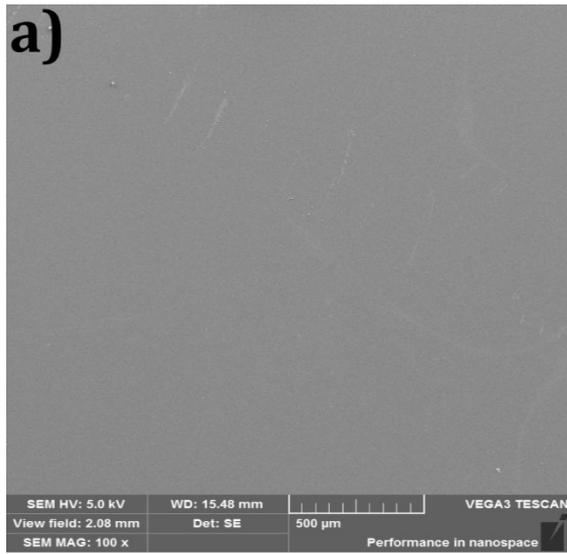


Figura 8-4 - Imagens de MEV do filme 4 (PMMA/porfirina 2500  $\mu$ L), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

## 8.2 Imagens de MEV em Diferentes Magnificações dos *Scaffolds* de Porfirina

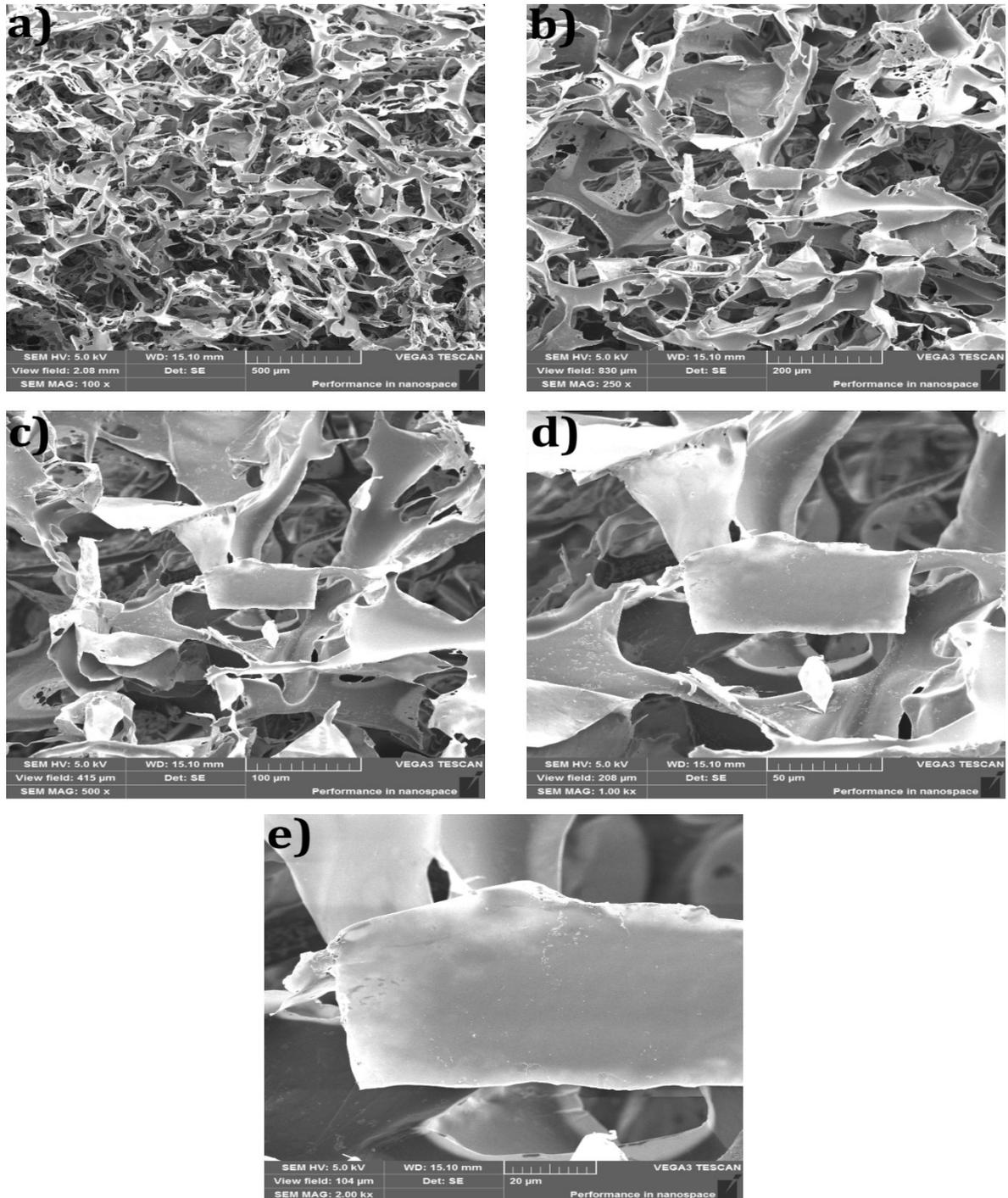


Figura 8-5 - Imagens de MEV da parte superior do *scaffold* 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

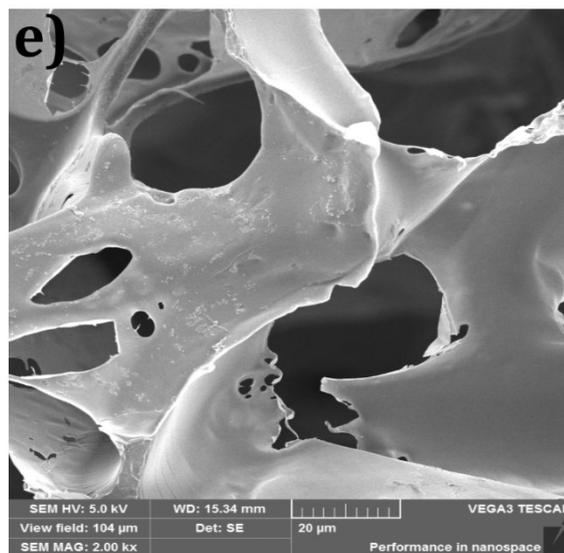
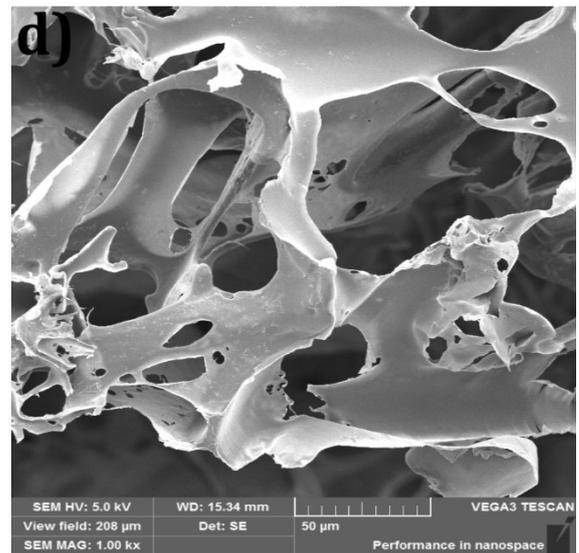
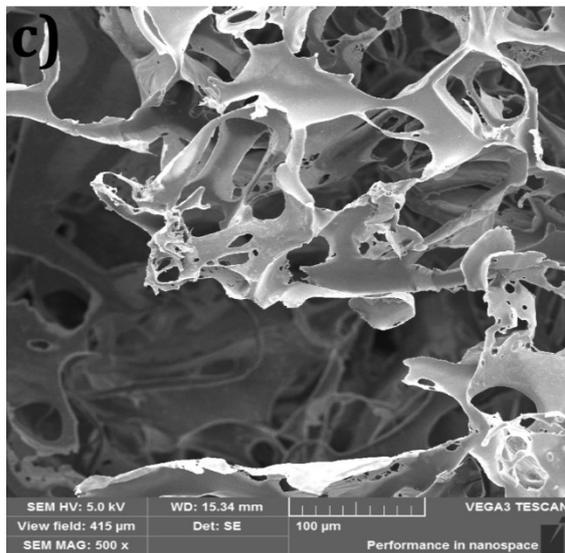
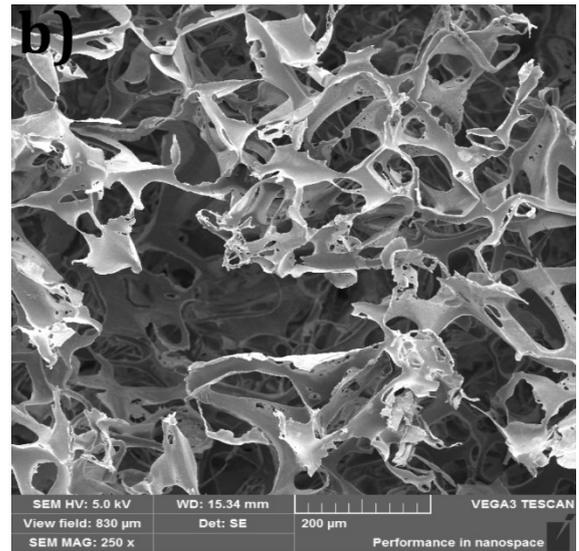
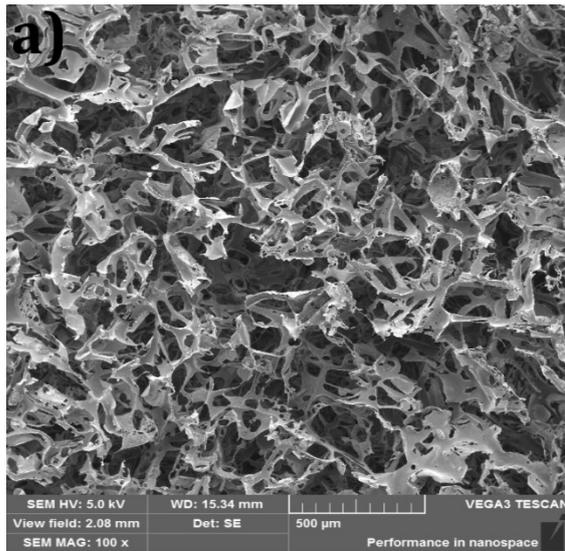


Figura 8-6 - Imagens de MEV da parte inferior do *scaffold* 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

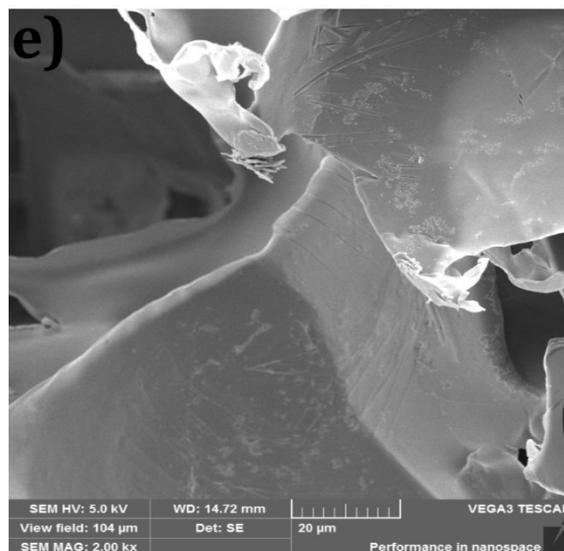
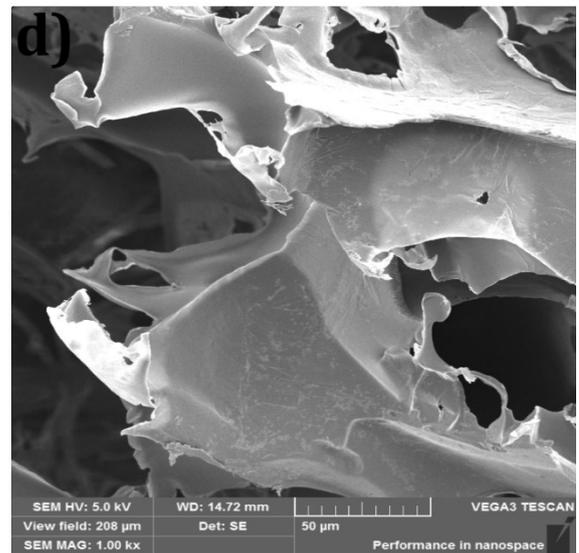
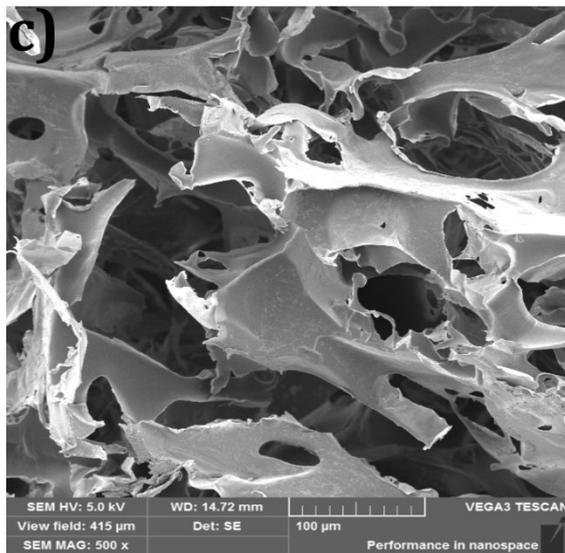
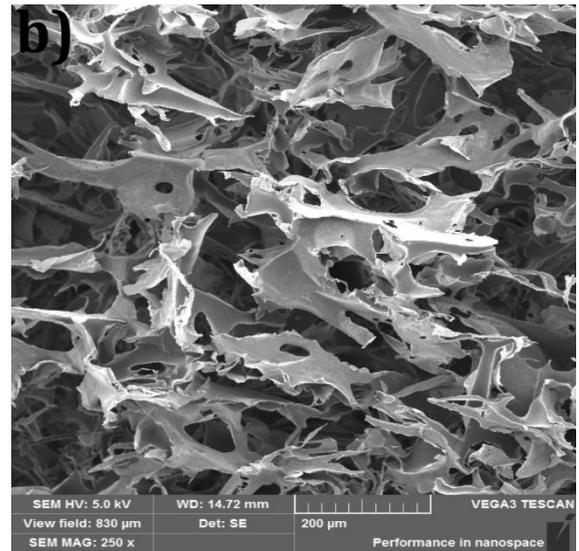
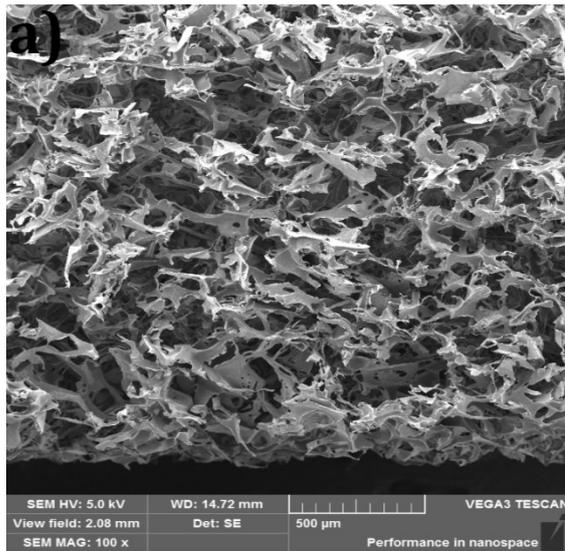


Figura 8-7 - Imagens de MEV da parte lateral do *scaffold* 1 (PMMA puro), com magnificações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

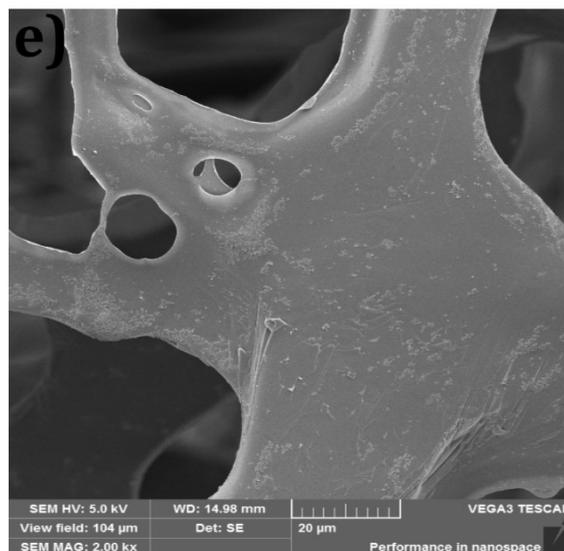
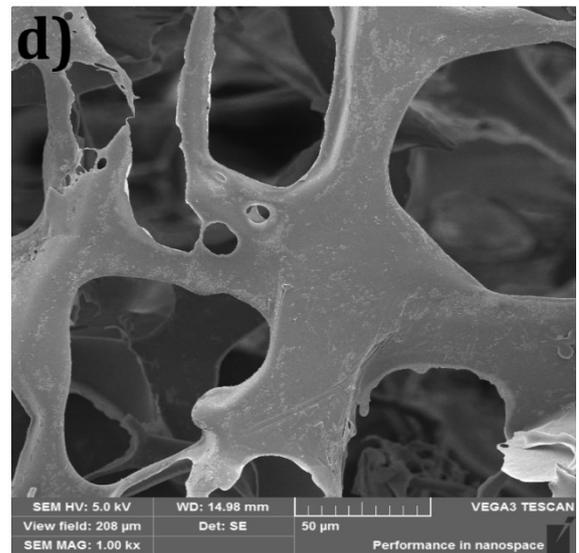
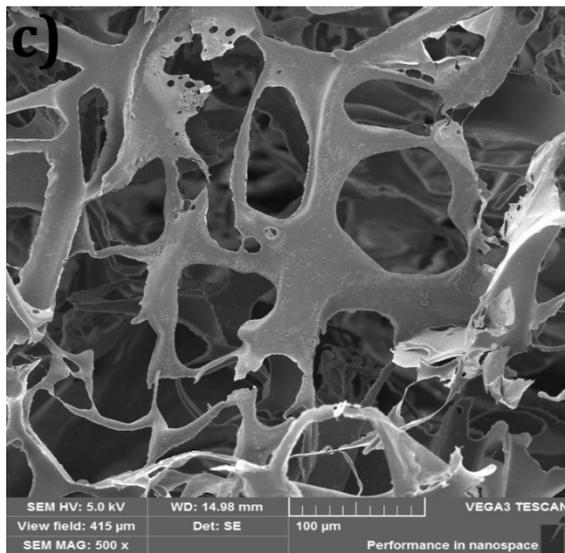
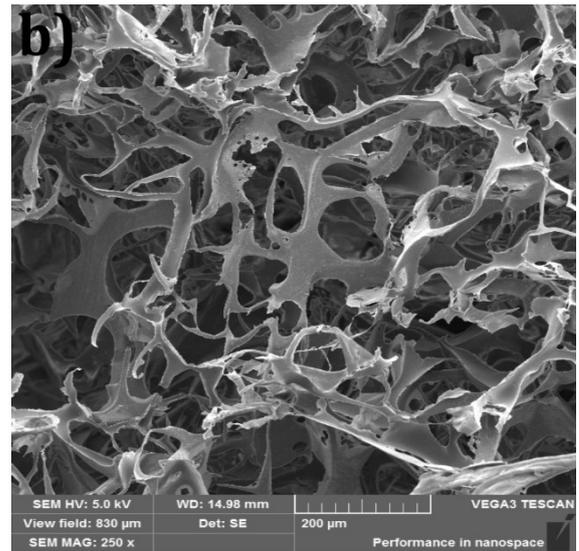
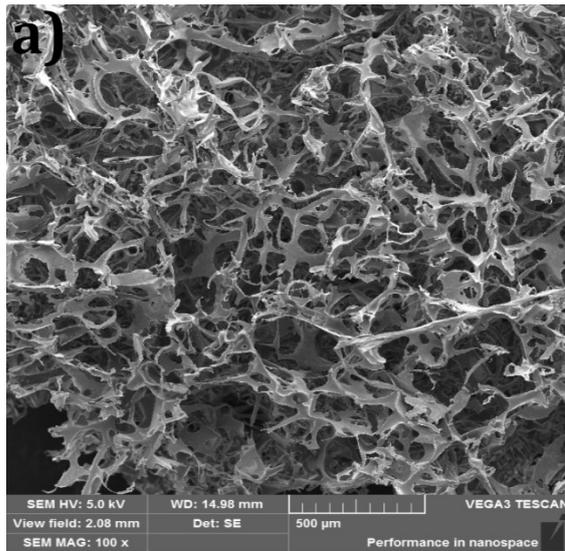


Figura 8-8 - Imagens de MEV da parte superior do *scaffold* 2 (PMMA/porfirina 25  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

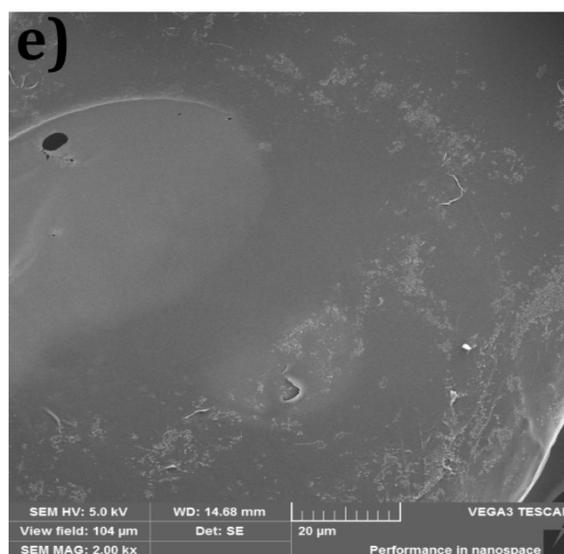
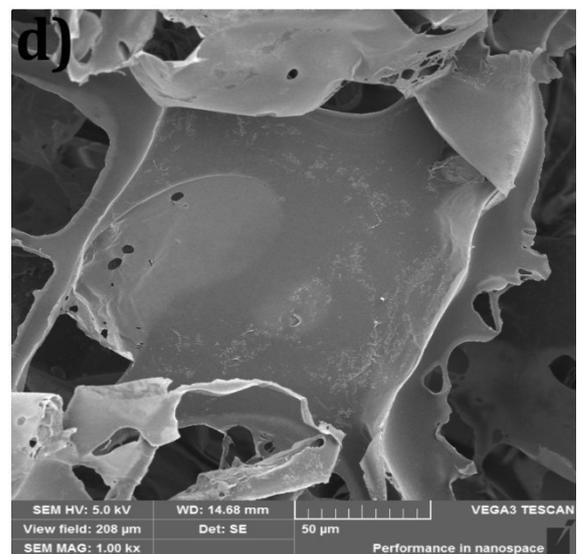
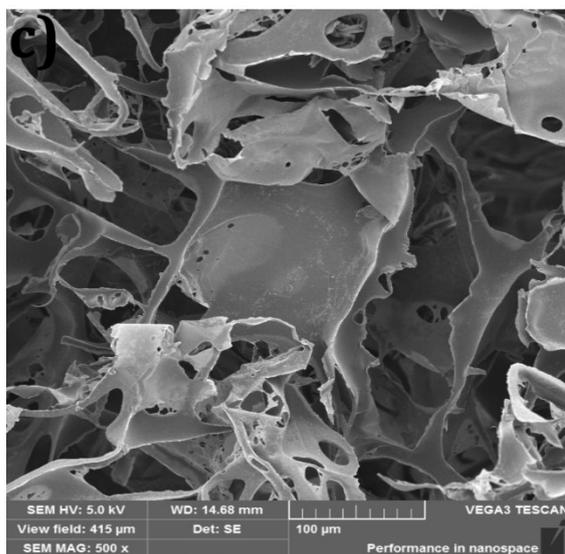
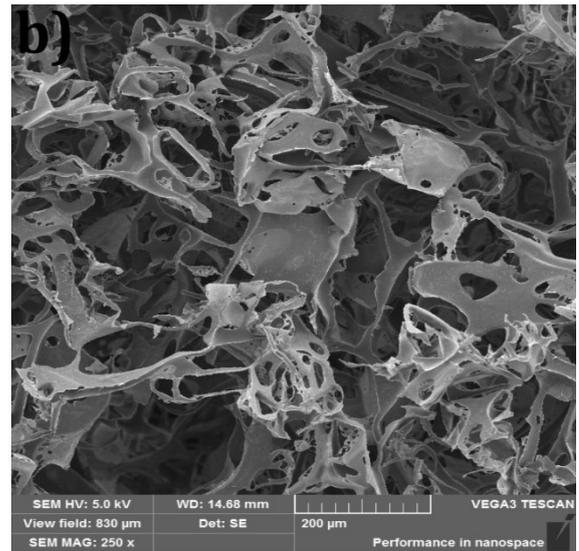
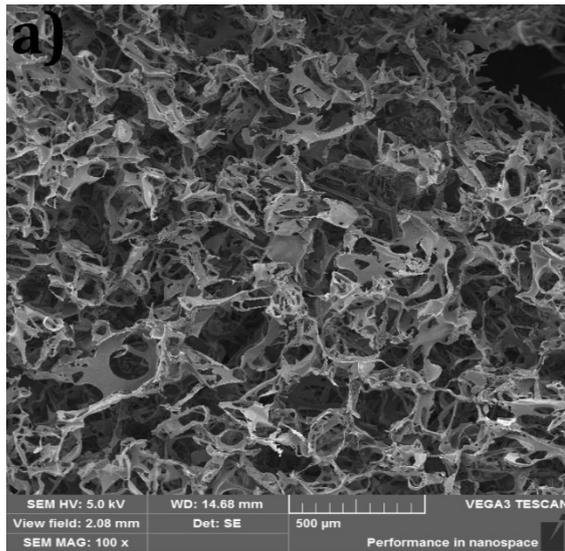


Figura 8-9 - Imagens de MEV da parte inferior do *scaffold* 2 (PMMA/porfirina 25  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

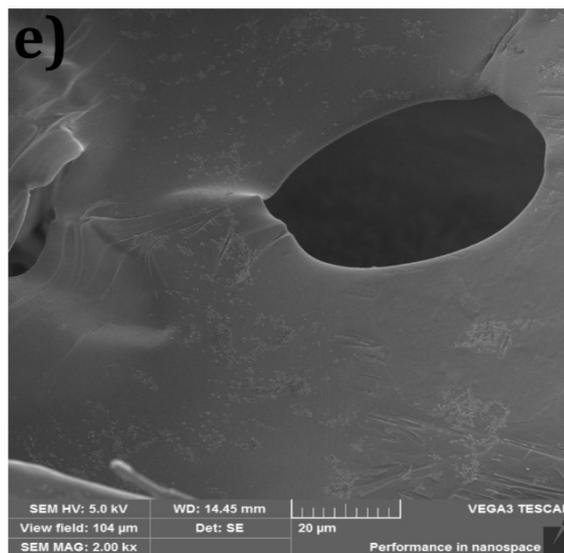
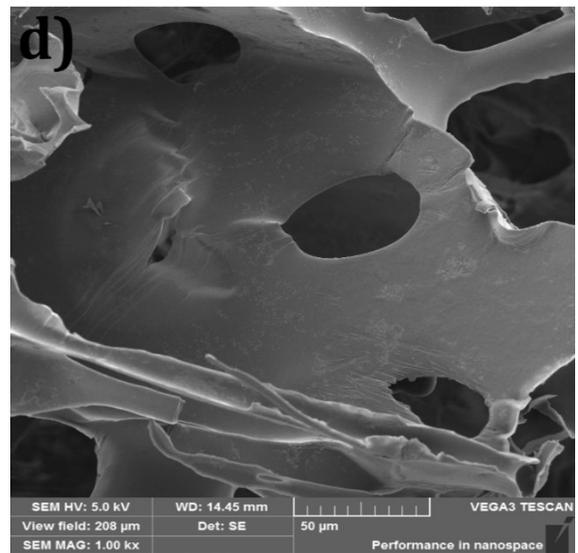
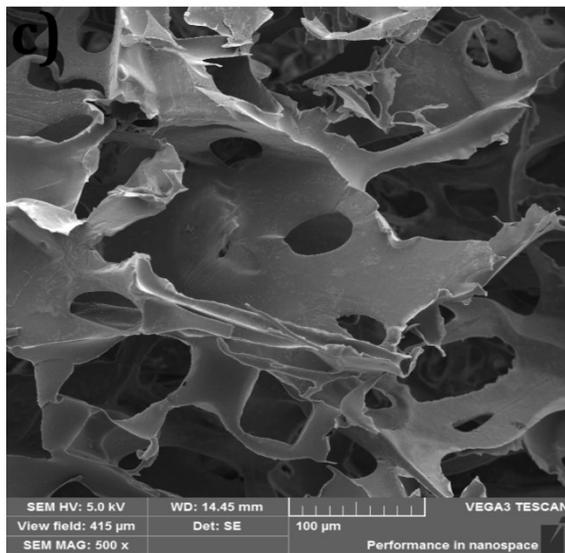
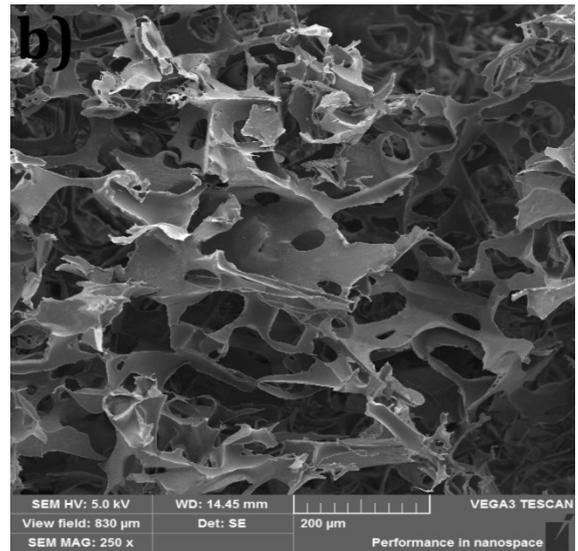
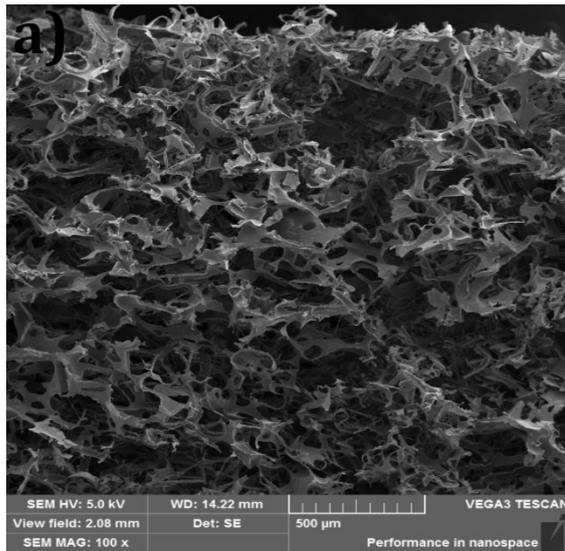


Figura 8-10 - Imagens de MEV da parte lateral do *scaffold* 2 (PMMA/porfirina 25  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

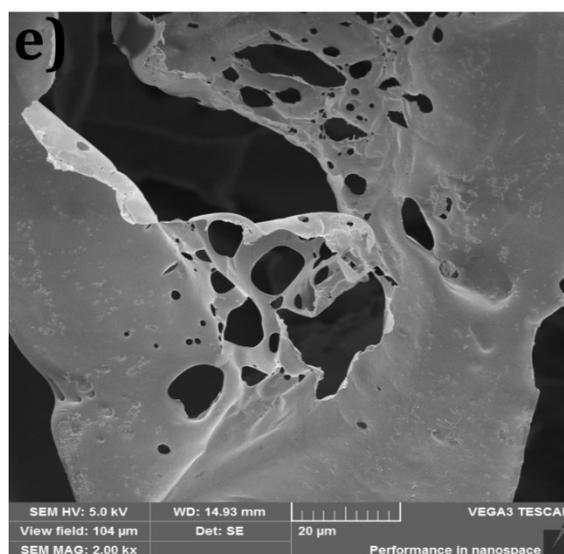
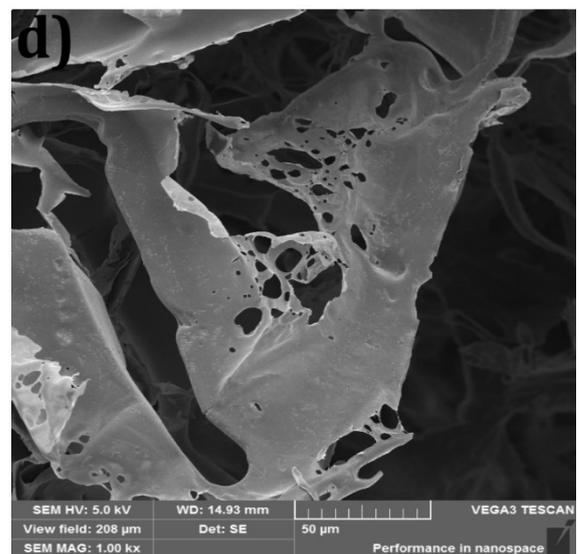
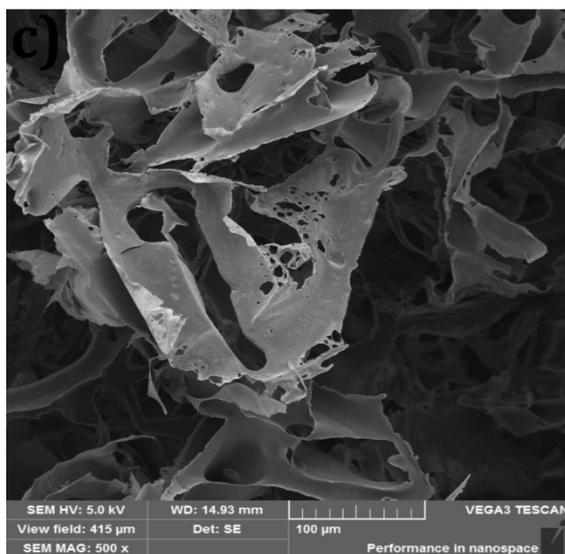
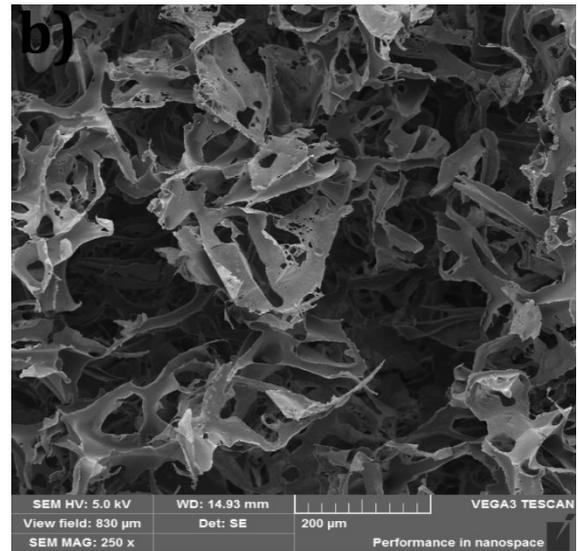
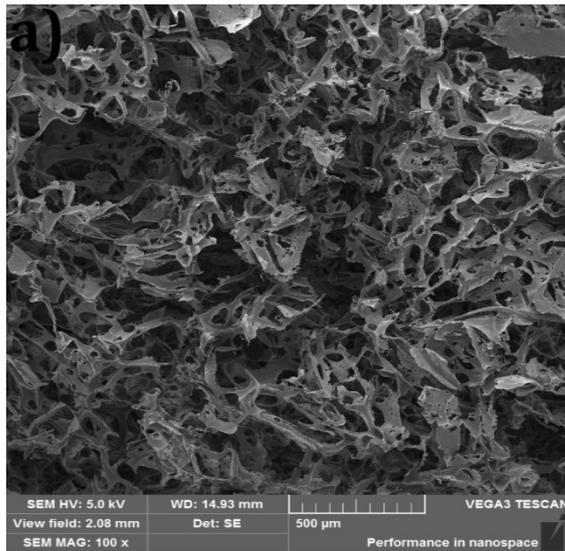


Figura 8-11 - Imagens de MEV da parte superior do *scaffold* 3 (PMMA/porfirina 250  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

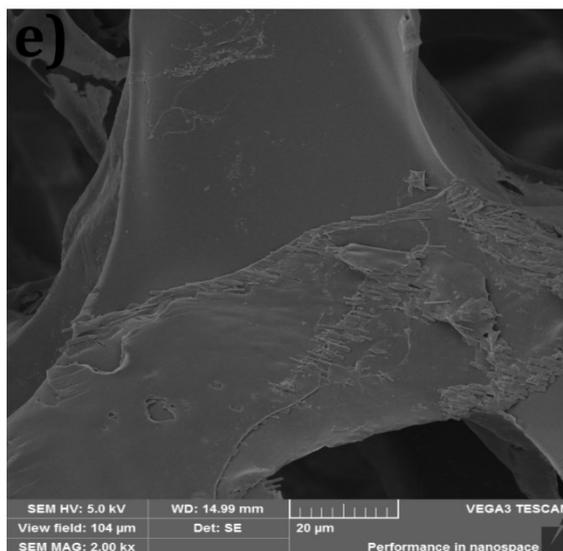
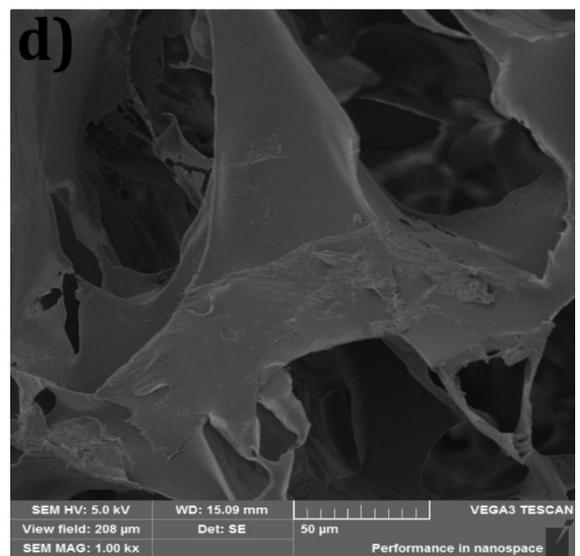
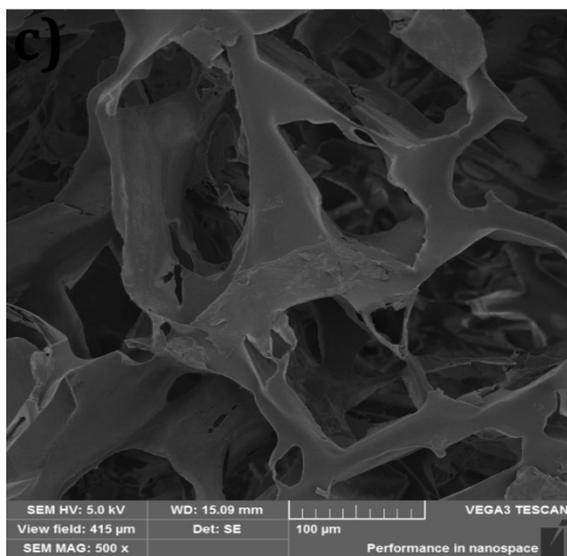
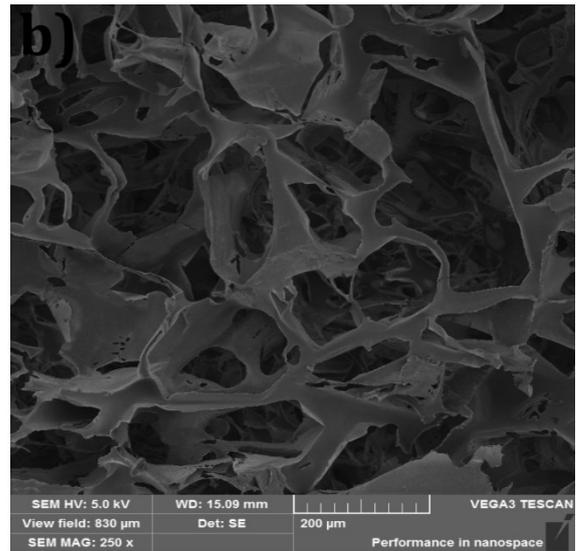
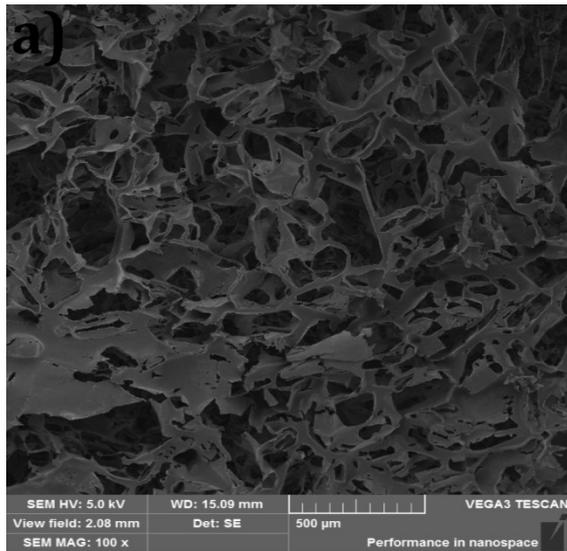


Figura 8-12 - Imagens de MEV da parte inferior do *scaffold* 3 (PMMA/porfirina 250  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

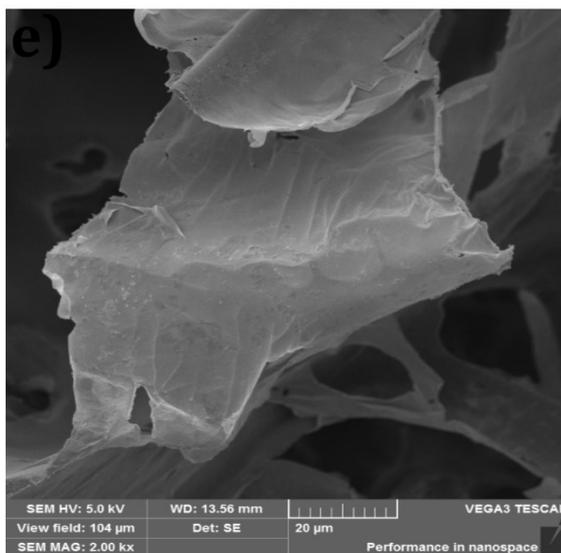
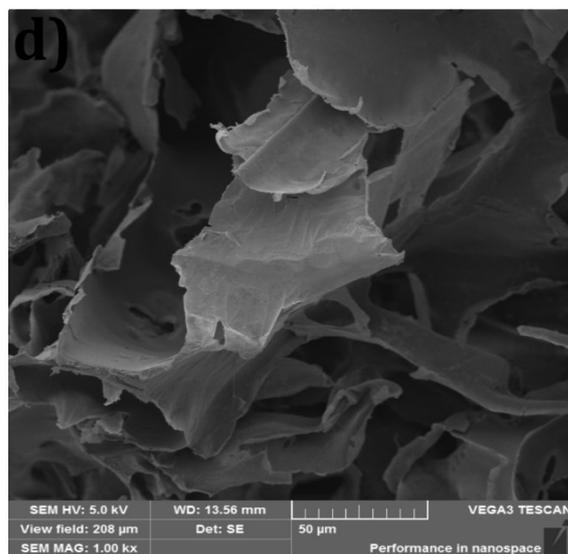
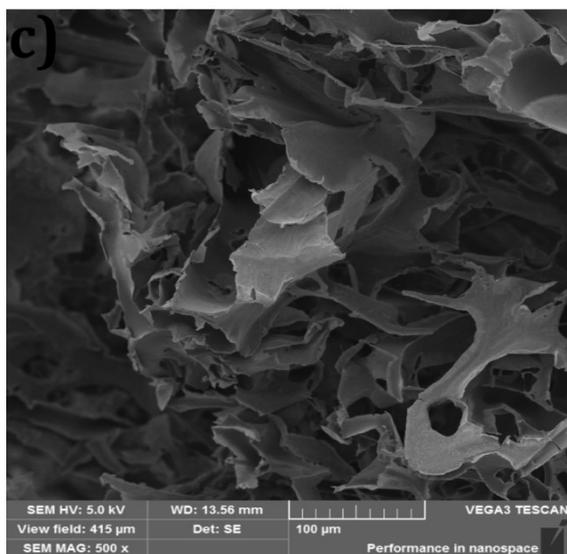
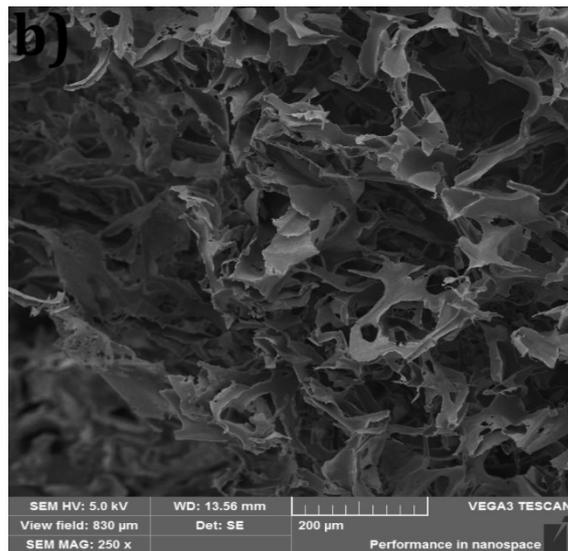
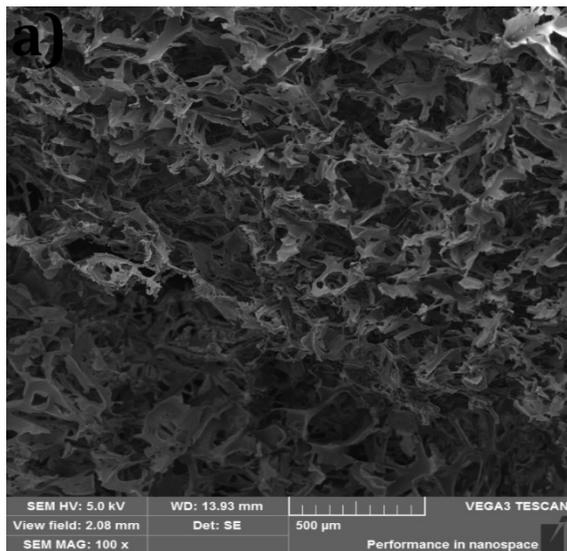


Figura 8-13 - Imagens de MEV da parte lateral do *scaffold* 3 (PMMA/porfirina 250  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

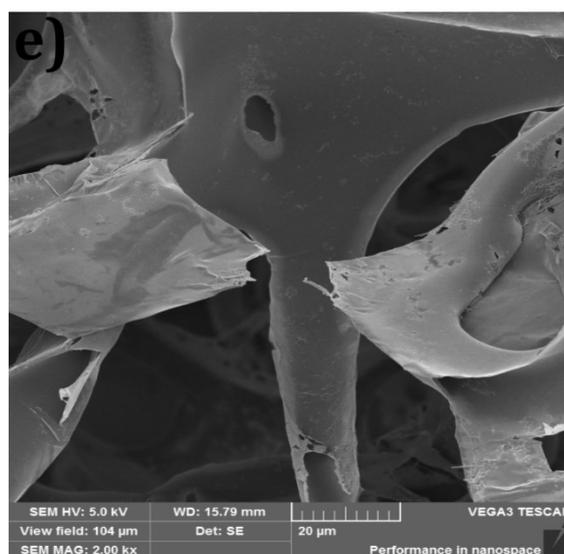
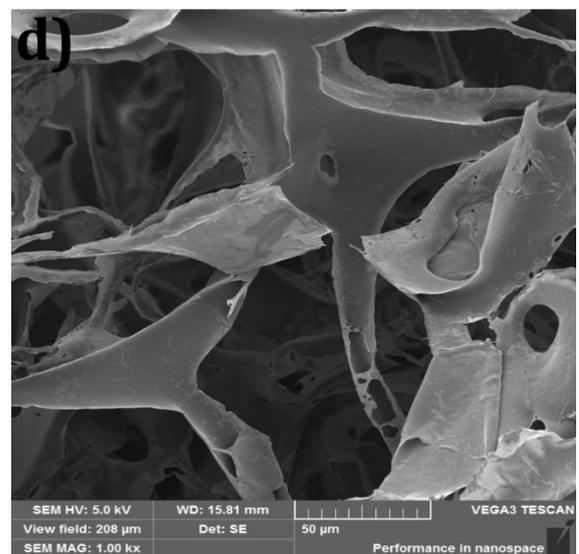
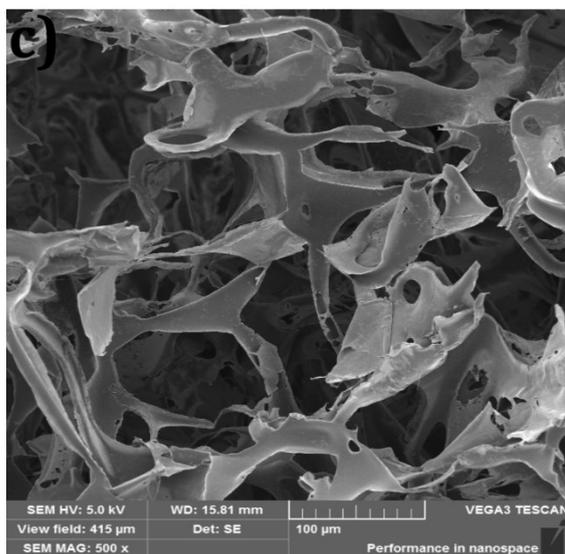
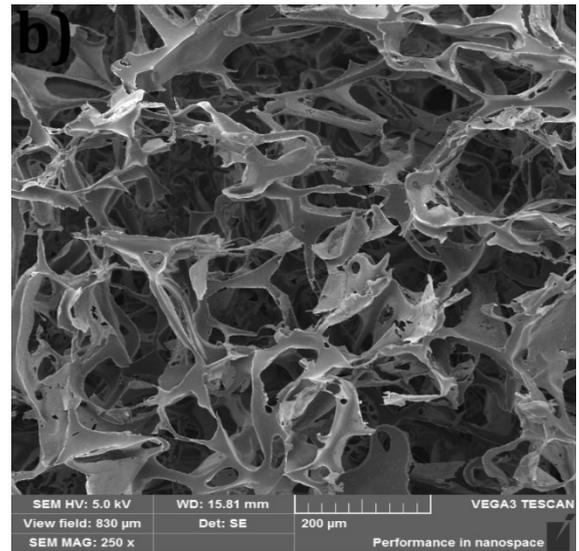
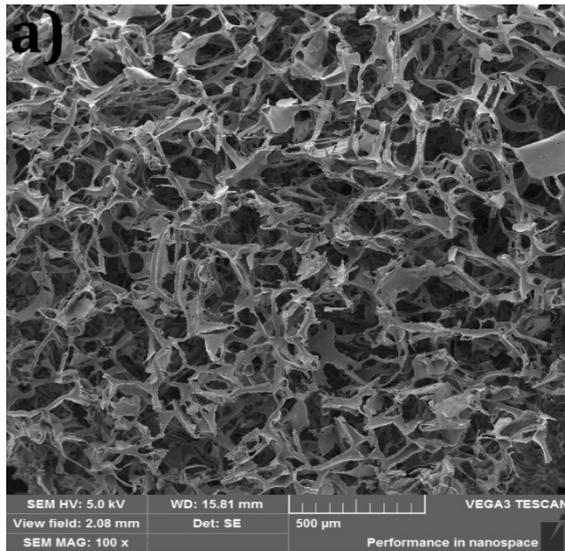


Figura 8-14 - Imagens de MEV da parte superior do *scaffold* 4 (PMMA/porfirina 2500  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

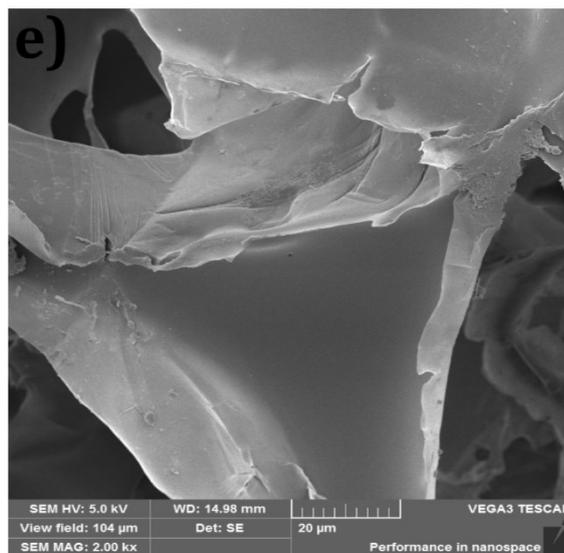
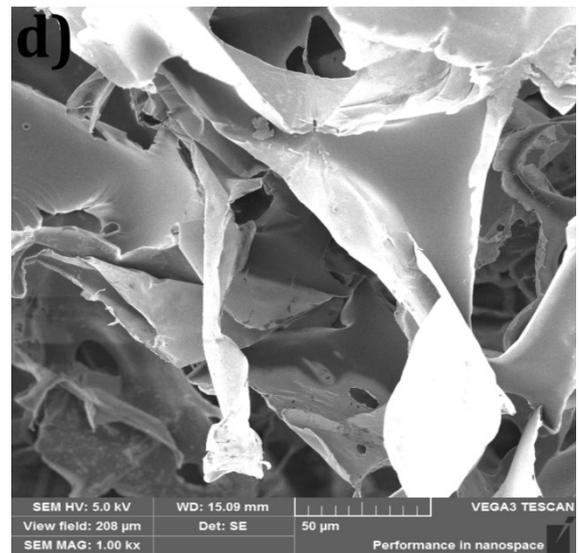
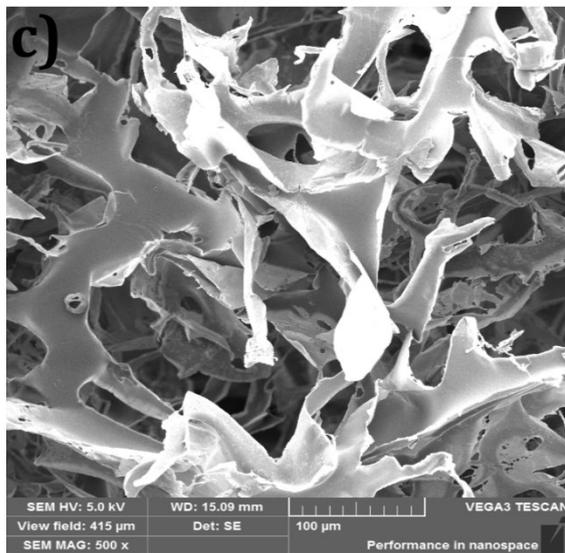
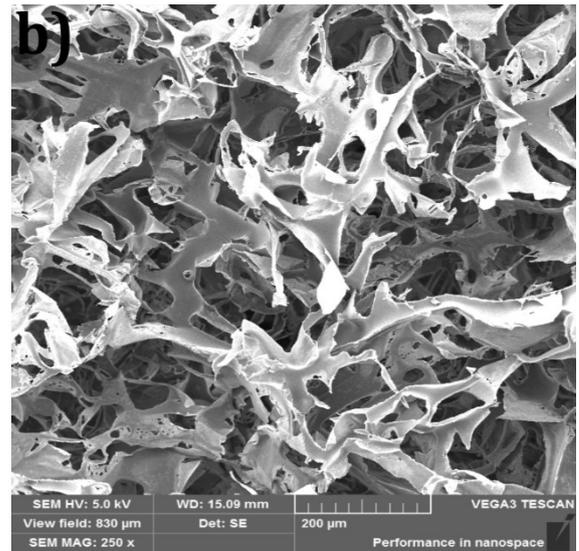
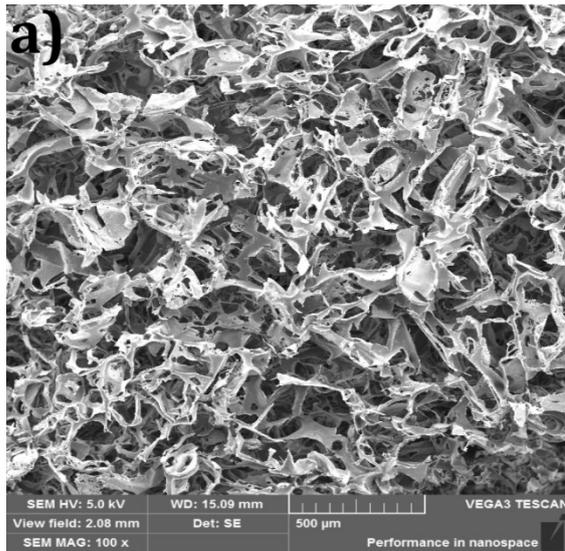


Figura 8-15 - Imagens de MEV da parte inferior do *scaffold* 4 (PMMA/porfirina 2500  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

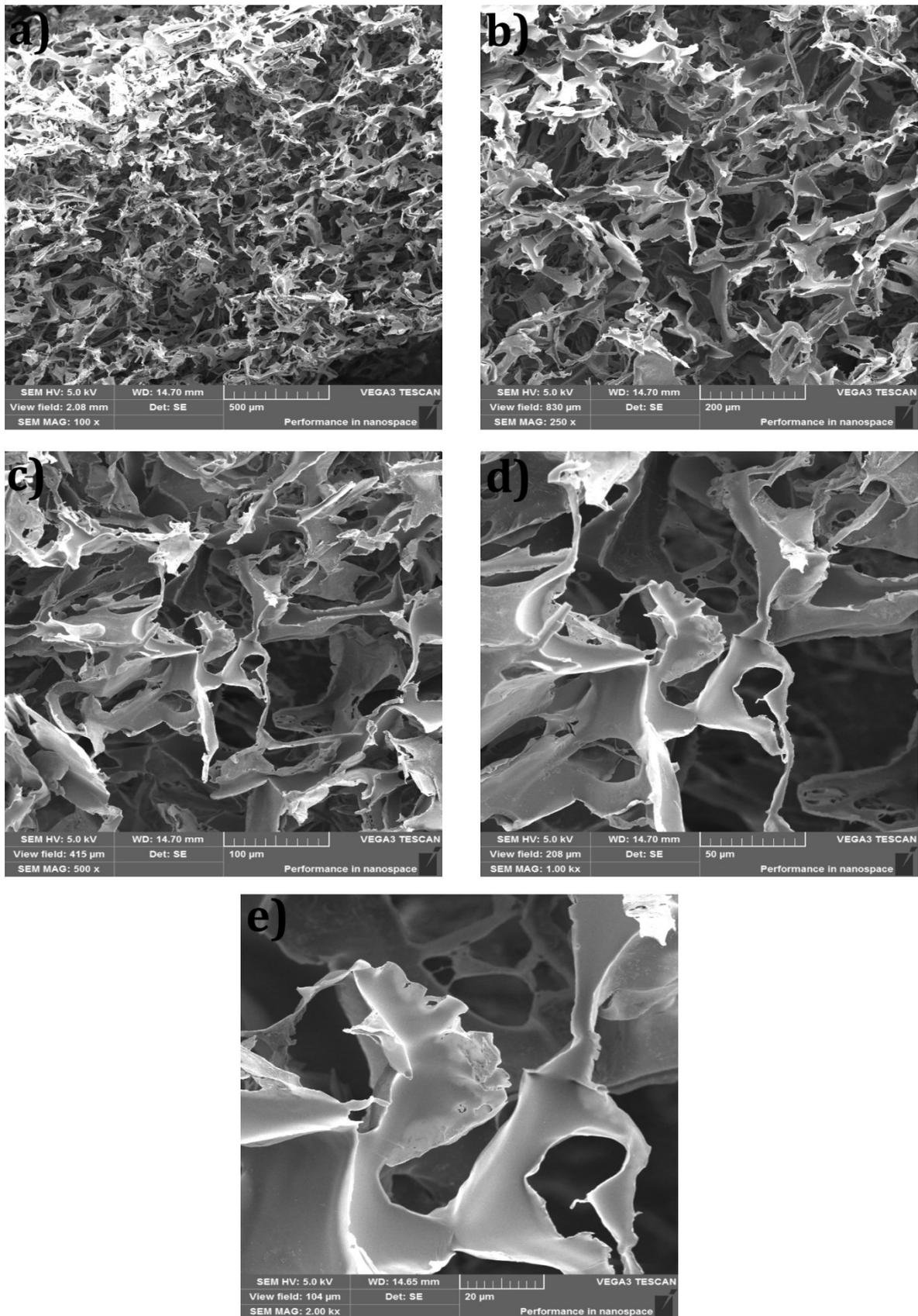


Figura 8-16 - Imagens de MEV da parte lateral do *scaffold* 4 (PMMA/porfirina 2500  $\mu$ L), com ampliações de a) 100x, b) 250x, c) 500x, d) 1000, e) 2000x.

## 9 Apêndice B

### 9.1 Espectroscopia por Energia Dispersa (EDS)

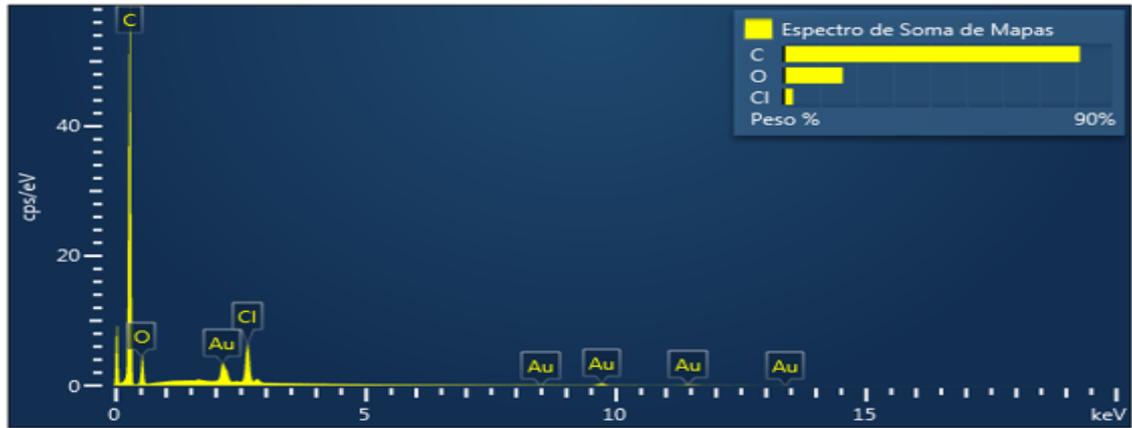


Figura 9-1 - Espectro EDS do filme 1.



Figura 9-2 - Espectro EDS do filme 2.



Figura 9-3 - Espectro EDS do filme 3.

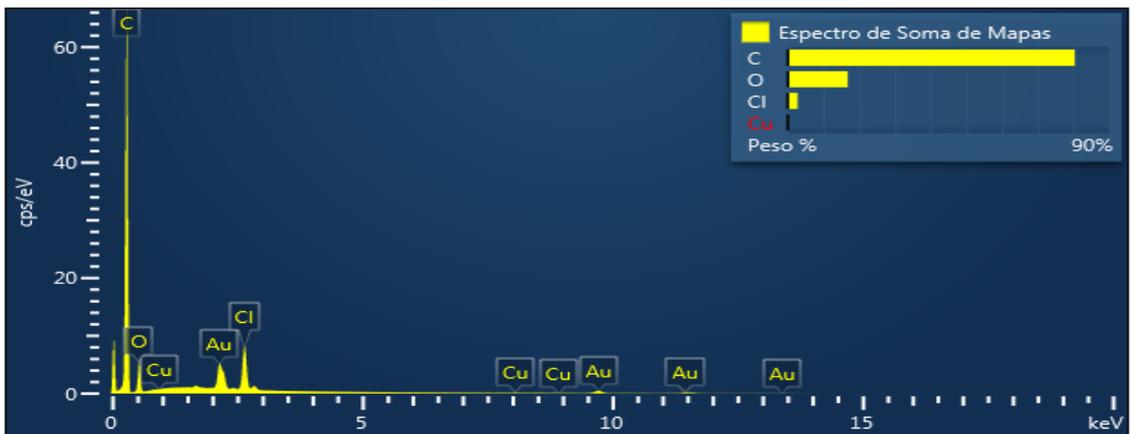


Figura 9-4 - Espectro EDS do filme 4.



Figura 9-5 - Espectro EDS do scaffold 1.

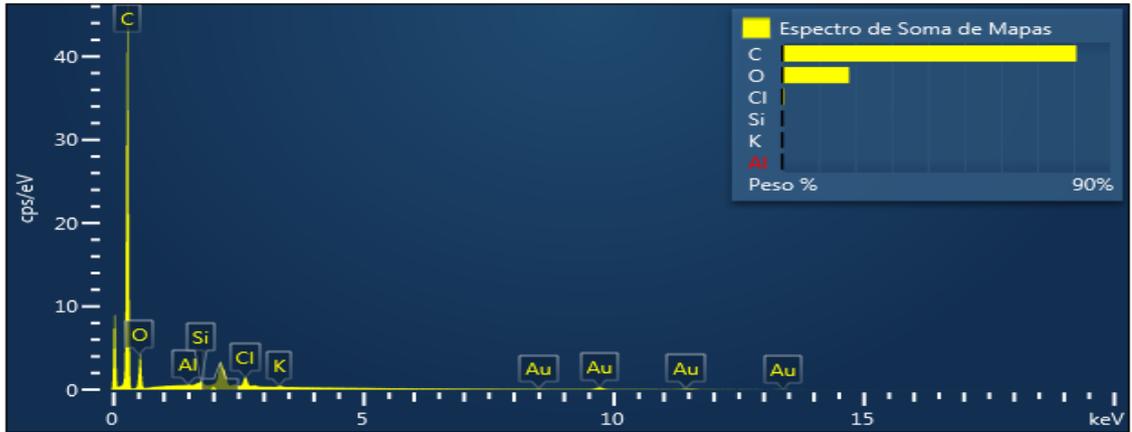


Figura 9-6 - Espectro EDS do scaffold 2.

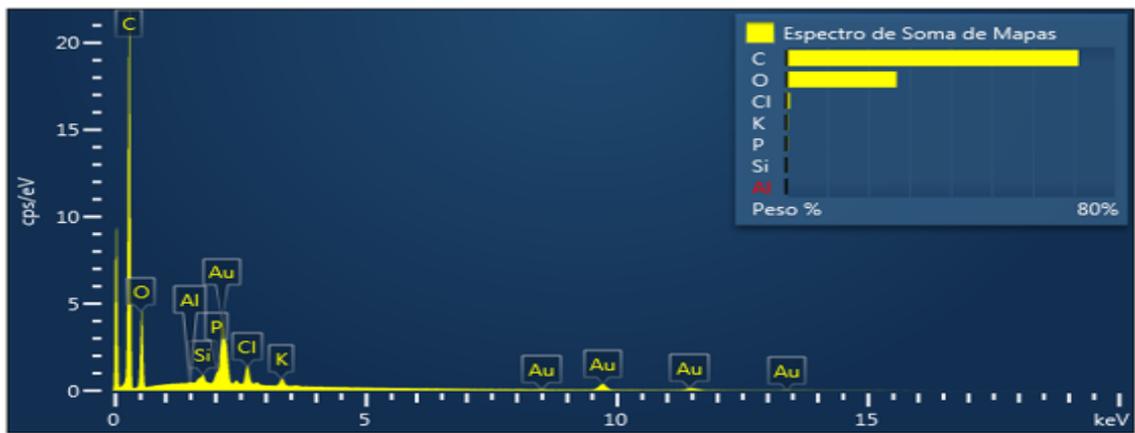


Figura 9-7 - Espectro EDS do scaffold 3.

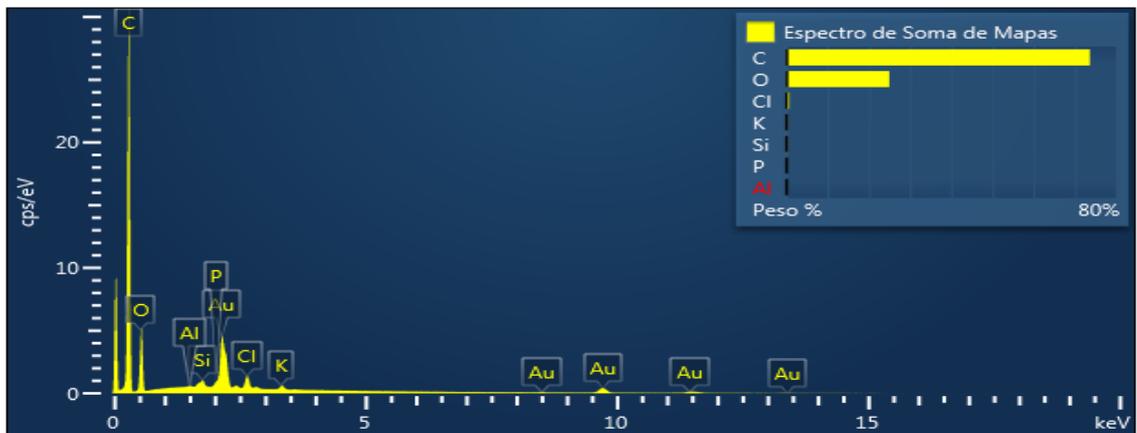


Figura 9-8 - Espectro EDS do scaffold 4.

## 10 Referências

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

<https://doi.org/10.1042/BJ20150942>

ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656-669, 2001.

[https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0656:THOPAP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0656:THOPAP>2.0.CO;2)

AKCELRUD, L. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. 1ª. ed. Barueri, SP: Editora Manole Ltda., 2007.

ALI, U.; KARIM, K. J. B. A.; BUANG, N. A. A review of the properties and applications of poly (methyl methacrylate)(PMMA). **Polymer Reviews**, v. 55, n. 4, p. 678-705, 2015.

<https://doi.org/10.1080/15583724.2015.1031377>

AUWÄRTER, W. E. A. Porphyrins at interfaces. **Nature chemistry**, v. 7, n. 2, p. 105, 2015.

<https://doi.org/10.1038/nchem.2159>

BARANYAIOVÁ, T.; BUJDÁK, J. Effects of dye surface concentration on the molecular aggregation of xanthene dye in colloidal dispersions of montmorillonite. **Clays and Clay Minerals**, v. 66, n. 2, p. 114-126, 2018.

<https://doi.org/10.1346/CCMN.2018.064089>

BERNARDES FILHO, R.; MATTOSO, L. H. C. Estudo de polímeros por microscopia de força atômica. **Embrapa Instrumentação Agropecuária-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2003.

BONNETT, R. **Chemical aspects of photodynamic therapy**. 1ª. ed. London: CRC Press, 2014.

<https://doi.org/10.1201/9781482296952>

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86-107, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2007.07.001>

CAREY, F. A. **Química Orgânica**. 7ª. ed. Brasil: Amgh, v. 2, 2011.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

[https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)

CHAMPION, P. M.; PERREAULT, G. J. Observation and quantitation of light emission from cytochrome c using Soret band laser excitation. **The Journal of Chemical Physics**, v. 75, n. 1, p. 490-491, 1981.

<https://doi.org/10.1063/1.441846>

COOK, L. P.; BREWER, G.; WONG-NG, W. Structural Aspects of Porphyrins for Functional Materials Applications. **Crystals**, v. 7, n. 7, p. 223, 2017.

<https://doi.org/10.3390/cryst7070223>

DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. **International journal of polymer science**, v. 2011, 2011.

<https://dx.doi.org/10.1155/2011/290602>

FARIA-TISCHER, P. C.; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures. **Biochem. Biotechnol. Rep**, v. 1, p. 32-53, 2012.

<https://doi.org/10.5433/2316-5200.2012v1n1p32>

FEMTO , 2014. Disponível em: <<http://www.femto.com.br/espectrofotometro-800XI.html>>. Acesso em: 7 Julho 2018.

FISCHER, H.; ORTH, H. Die Chemie des Pyrrols. **Akadem. Verlagsgesellschaft, Leipzig**, v. 2, p. 1- 478, 1940.

FÖRSTER, T. 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer mechanisms of electronic excitation. **Discussions of the Faraday Society**, v. 27, p. 7-17, 1959.

<https://doi.org/10.1039/DF9592700007>

GHENO, S. M.; FILHO, P. I. P. Tópicos em microscopia de força atômica. **Apostila de curso**, Univesidade Federal de São Carlos, 2006.

GLOGAUER, A. Síntese e caracterização fotofísica de dois copolímeros eletroluminescentes: um completamente conjugado e outro multibloco tendo como unidade cromofórica o fluoreno-vinileno-fenileno. **Dissertação de mestrado**, Curitiba, 2004.

GOUTERMAN, M. Spectra of porphyrins.. **Journal of Molecular Spectroscopy**, v. 6, p. 138-163, 1961.

[https://doi.org/10.1016/0022-2852\(61\)90236-3](https://doi.org/10.1016/0022-2852(61)90236-3)

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HERMAN, B. et al. Fluorescence Excitation and Emission Fundamentals. **Olympus**, 2011. Disponível em: <<https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/fluoroexciteemit/>>. Acesso em: 5 Fevereiro 2018.

HERRMANN, P. S. . D. S. E. A. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 97, p. 51-61, 1997.

<https://dx.doi.org/10.1590/S0104-14281997000400009>

HINRICHS, R. **Técnicas instrumentais não destrutivas aplicadas a gemas do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Biblioteca Geociências - UFRGS, 2014.

HOLZAPFEL, B. M. et al. How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, n. 4, p. 581-603, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>

HOWLAND, R.; BENATAR, L. **A practical guide to scanning probe microscopy**. 1<sup>a</sup> ed. Sunnyvale, CA: Park scientific instruments, 1996.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011>

JEONG, H. G.; CHOI, M. S. Design and Properties of Porphyrin-based Singlet Oxygen Generator. **Israel Journal of Chemistry**, v. 56, n. 2-3, p. 110-118, 2016.

<https://doi.org/10.1002/ijch.201500026>

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **Journal of dental education**, v. 65, n. 5, p. 456-462, 2001.

KIM, J. F. et al. KIM, Jeong F. et al. Thermally induced phase separation and electrospinning methods for emerging membrane applications: a review. **AIChE Journal**, v. 62, n. 2, p. 461-490, 2016.

<https://doi.org/10.1002/aic.15076>

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009.

<https://doi.org/10.1038/cdd.2008.150>

LAKOWICZ, J. R. Energy transfer. In: Principles of fluorescence spectroscopy. **Springer**, p. 367-394, 1999.

[https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4757-3061-6_13)

LIN, F. et al. Postelectrospinning "click" modification of degradable amino acid-based poly (ester urea) nanofibers. **Macromolecules**, v. 46, n. 24, p. 9515-9525, 2013.

<https://doi.org/10.1021/ma401964e>

LIU, F. et al. Progress in organ 3D bioprinting. **International Journal of Bioprinting**, v. 4, n. 1, 2018.

<https://doi.org/10.18063/ijb.v4i1.128>

MACK, J. Expanded, Contracted, and Isomeric Porphyrins: Theoretical Aspects. **Chemical reviews**, v. 117, n. 4, p. 3444-3478, 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00568>

MAITI, N. C.; MAZUMDAR, S.; PERIASAMY, N. J-and H-aggregates of porphyrin-surfactant complexes: time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 9, p. 1528-1538, 1998.

<https://doi.org/10.1021/jp9723372>

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. 2<sup>a</sup>. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 1999.

MARLETTA, A. Propriedades ópticas de semicondutores orgânicos à base de polímeros emissores de luz. **Tese de doutorado**, 2001.

MORAIS, M. G. D. et al. Biological applications of nanobiotechnology. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1007-1017, 2014.

<https://doi.org/10.1166/jnn.2014.8748>

MOSS, G. P. Nomenclature of tetrapyrroles. **The FEBS Journal**, v. 178, n. 2, p. 277-328, 1988.

NAMUANGRUK, S. et al. Theoretical investigation of the charge-transfer properties in different meso-linked zinc porphyrins for highly efficient dye-sensitized solar cells. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 24, p. 9166-9176, 2014.

<https://doi.org/10.1039/C4DT00665H>

NEREM, R. M. Regenerative medicine: the emergence of an industry. **Journal of the Royal Society Interface**, 2010.

<https://doi.org/10.1098/rsif.2010.0348.focus>

ORÉFICE, L.; PEREIRA, M.; MANSUR, S. Biomateriais: Fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012. Cap. Capítulo 7 - Técnicas de caracterização de materiais.

PAULO, H. D. Biopolímeros: uma alternativa favorável. **Temas Atuais em Biologia**, São Carlos, v. 2, n.1, 2014.

PAVANI, C. Porfirinas tetracatiônicas alquiladas: sistemas porfirínicos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica do câncer de pele. **Tese de doutorado**, Universidade de São Paulo, 2009.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, 2015.

<https://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150094>

PRADEEP, T. H and J aggregates. **Pradeep research group**, 2007. Disponível em: <[www.dstuns.iitm.ac.in/teaching-and-presentations/teaching/undergraduate%20courses/cy306-structure-and-energetics-of-biomolecules/presentations/H-%20and%20J-%20Aggregates.pdf](http://www.dstuns.iitm.ac.in/teaching-and-presentations/teaching/undergraduate%20courses/cy306-structure-and-energetics-of-biomolecules/presentations/H-%20and%20J-%20Aggregates.pdf)>. Acesso em: 15 julho 2018.

RAHMANI DEL BAKHSHAYESH, A. et al. Recent advances on biomedical applications of scaffolds in wound healing and dermal tissue engineering.. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 691-705, 2018.

<https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1349778>

RAVICHANDRAN, R. et al. Composite poly-L-lactic acid/poly-( $\alpha$ ,  $\beta$ )-DL-aspartic acid/collagen nanofibrous scaffolds for dermal tissue regeneration. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32, n. 6, p. 1443-1451, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.04.024>

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>

ROTH, S.; CARROLL, D. One-dimensional metals: conjugated polymers, organic crystals, carbon nanotubes and graphene. **John Wiley & Sons**, 2015.

SAMAVEDI, S. et al. Synthetic biomaterials for regenerative medicine applications. **Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation**, p. 81-99, 2014.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398523-1.00007-0>

SANTANA, M. H. A. **Instituto do osso e da cartilagem**, 2016. Disponível em: <<http://www.ossoecartilagem.com.br/single-post/2016/09/21/O-QUE-S%C3%83O-%E2%80%9CSCAFFOLDS%E2%80%9D-E-A-SUA-APLICA%C3%87%C3%83O-EM-TERAPIAS-REGENERATIVAS>>. Acesso em: 08 out. 2018.

SANTANA-MELO, G. D. F. Efetividade de scaffolds de poli (butileno adipato-co-tereftalato)/nanohidroxiapatita obtidos por eletrofiliação para aplicação biomédica: avaliação in vitro, **Tese de doutorado**, Universidade Estadual Paulista, 2016.

SEN, S. et al. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 3, n. 1, p. 91-100, 2010.

SHIMADZU, C. **SPM- 9600 Scanning probe microscope instruction manual**. Kyoto, Japan: Analytical & measuring instruments division, 2006.

SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000800002>

SIGMA Aldrich. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/252883?lang=en&region=US>>. Acesso em: 20 fevereiro 2018.

SIGMA Aldrich. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/materials-science/material-science-products.html?TablePage=113790840>>. Acesso em: 10 janeiro 2018.

SILVA, S. D. F. C. D. Influência de parâmetros físicos no desempenho de PLEDs.. **Tese de doutorado**, Universidade Federal de Uberlândia, 2016.

SILVEIRA, G. Slide Share, 2013. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/gustavopsilveira/aula-2-3-estrutura-ligao-hibridizao-28542201>>. Acesso em: 6 maio 2018.

SPANO, F. C.; SILVA, C. H-and J-aggregate behavior in polymeric semiconductors. **Annual review of physical chemistry**, v. 65, p. 477-500, 2014.

<https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-040513-103639>

TEIXEIRA, F. S. Microscopia Eletrônica de Varredura. **MEV - USP**, 2013. Disponível em: <<http://fap.if.usp.br/~nandast/mev.html>>. Acesso em: 15 Janeiro 2018.

TERRONI, H. C. et al. Liofilização. **Revista Científica UNILAGO**, p. 271-284, 2013.

TORRES, B. B.; MARZZOCO, A. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koohan, 2007.

VALEUR, B. Molecular Fluorescence: Principles and Applications. **Wiley-VCH**, 2001.

<https://doi.org/10.1002/3527600248>

WILLIAMS, D. F. **The Williams dictionary of biomaterials**. London: Liverpool University Press, 1999.

ZOU, Y. et al. "Click" chemistry in polymeric scaffolds: Bioactive materials for tissue engineering. **Journal of Controlled Release**, v. 273, p. 160-179, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.023>