UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PORFIRINAS COM MELANINA POR ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

Sebastião Claudino da Silva

Orientador: Prof. Dr.Amando Siuiti Ito

Tese apresentada ao Instituto de Física da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Defesa : 18/05/92

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO
1909
INSTITUTO DE FÍSICA

São Paulo

1992

SBI-IFUSP

305M810T1909

535.846
S586e
D
e.1

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Serviço de Biblioteca e Informação
do Instituto de Física da Universidade de São Paulo

Silva, Sebastião Claudino da
Estudo da interação de porfirina com melanina por espectroscopia óptica. São Paulo, 1992.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Física. Departamento de Física Experimental.
Área de Concentração: Física do Estado Sólido
Orientador: Profº Drº Amando Siuiti Ito

Unitermos: 1. Espectroscopia Raman ressonante; 2. Fluorescência; 3. Porfirinas catiônicas; 4. Transferência de energia; 5. Melanina; 6. Complexo porfirina-Melanina.

USP/IF/SBI - 11/92

Para Sandrinho
Eberê Luiz Caldas

À Paula e Fernanda,

pelo tempo que lhes foi roubado

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Amando Ito, pela confiança inicial e pelas sugestões e orientação durante todo o trabalho.

Ao Prof. Marcel Tabak, USP - São Carlos, pelas sugestões e discussão.

Ao pessoal do Laboratório de Espectroscopia Molecular do IQUSP, pela apoio logístico e, em especial, ao Prof. Oswaldo Sala por me franquear o uso do Laboratório.

Ao Prof. Gianlucca Azzelini, IQUSP,pela boa vontade e pela cessão das porfirinas.

A todos os colegas do Grupo de Biofísica pela colaboração durante esses anos. Um agradecimento especial ao Pascutti pelas discussões e interesse com que acompanhou o trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Radioquímica e Química Ambiental, USP - São Carlos, pelo apoio e pela agradável convivência.

À Marió, pela paciência e por tudo o mais

À FAPESP pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO 1

I.1 - Porfirinas 1

I.2 - Melaninas 2

I.3 - Interação de melaninas e porfirinas com outras moléculas 5

I.4 - Objetivos 6

II - MATERIAIS E MÉTODOS 9

II.1 - Material utilizado 9

Melanina 9

Porfirinas 9

II.2 - Equipamento 10

Espectroscopia de absorção óptica 10

Fluorescência estática 10

Fluorescência com resolução temporal 10

Espectroscopia Raman 11

III - ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓPTICA DAS PORFIRINAS E COMPLEXOS PORFIRINA/MELANINA 13

III.1 - A estrutura eletrônica e o espectro de absorção das porfirinas 13

III.2 - Uma interpretação empírica para o espectro de absorção óptica das porfirinas 24

A passagem metaloporfirina ⇒ base livre 28

O efeito dos meso-substituintes 31

III.3 - Espectros eletrônicos de soluções porfirina/melanina 33

IV - ESPECTROS RAMAN DAS PORFIRINAS 41

IV.1 - Sobre o espalhamento Raman ressonante 54

IV.2 - Interpretação dos espectros Raman das porfirinas ..57

Estrutura e modos de vibração das porfirinas 57

Modos de vibração de espécies A_{1g} e B_{1g} 60

Modos de vibração de espécies A_{2g} e B_{2g} 62

IV.3 - Atribuição das bandas dos espectros Raman 71

IV.4 - Espectros Raman dos complexos porfirina/melanina 80

IV.5 - Interpretação dos espectros Raman dos complexos porfirina/melanina 96

V - FLUORESCÊNCIA DE PORFIRINAS E DOS COMPLEXOS PORFIRINA/MELANINA 99

Fluorescência estática 99

Fluorescência com resolução temporal 99

V.1 - Sobre a espectroscopia de fluorescência 106

O espectro de emissão de uma molécula "simples" 106

O modelo para o espectro de fluorescência das porfirinas 110

A supressão da fluorescência 115

V.2 - A taxa de transferência de energia porfirina ⇒ melanina 123

A constante de associação do complexo porfirina/melanina - Gráfico de Scatchard 125

VI - CONCLUSÕES 140

APÊNDICE 144

Algumas considerações sobre a fluorescência 144

O acoplamento vibrônico da transições eletrônicas

e o princípio de Franck-Condon 149

Transições spin-proibidas e transições não radiativas ...153

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 156

GLOSSÁRIO

L-DOPA - L-dihidroxifenilalanina

TMPyP - tetra(4-N-metilpiridil)porfina

ZnTMPyP - Zn-tetra(4-N-metilpiridil)porfina

TBzPyP - tetra(4-N-benzilpiridil)porfina

ZnTBzPyP - Zn-tetra(4-N-benzilpiridil)porfina

NiTPP - Ni-tetrafenilporfina

ε - coeficiente de extinção molar

ν número de onda

ν estiramento (vibração molecular)

δ deformação angular no plano (vibração molecular)

OOP deformação angular fora do plano (vibração molecular)

RESUMO

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE PORFIRINAS COM MELANINA POR ESPECTROSCOPIA ÓPTICA

No presente trabalho estudou-se os processos de interação entre uma série de porfirinas catiônicas e a melanina. Utilizou-se as porfirinas (Zn-(tetra(4-N-Metilpiridil)porfina): Zn-TMPyP, (Zn-(tetra(4-N-Benzilpiridil)porfina): Zn-TBzPyP, as respectivas porfirinas de base livre (TMPyP e TBzPyP) e a melanina sintética obtida a partir da auto-oxidação da dihidroxifenilalanina (L-DOPA). O trabalho baseou-se em três técnicas espectroscópicas complementares: espectroscopia eletrônica (absorção na região do ultravioleta-visível), fluorescência e espalhamento Raman ressonante.

Demonstrou-se a formação de complexos estáveis como resultado da interação porfirina-melanina.

A partir dos dados de espectroscopia Raman fez-se uma atribuição de bandas vibracionais para as porfirinas, comparando-se com os dados disponíveis na literatura para porfirinas semelhantes. Discutiu-se as possíveis mudanças de estruturas provocadas pela melanina na porfirina, baseadas nas diferenças entre os espectros Raman das porfirinas puras e dos complexos porfirina-melanina.

Sugeriu-se uma nova interpretação para os espectros eletrônicos das porfirinas baseada no modelo de Gouterman (modelo de quatro orbitais). A partir dessa interpretação do espectro eletrônico analisou-se a perturbação causada pela melanina nos orbitais moleculares da porfirina fazendo-se uma discussão dos espectros de emissão fluorescente das mesmas.

Estimou-se a taxa de transferência de energia da porfirina para melanina através da supressão da fluorescência da porfirina, usando-se medidas de fluorescência com resolução temporal.

Demonstrou-se que a fluorescência do complexo porfirina-melanina tem um tempo de vida menor que 5 ps.

Utilizou-se as medidas de supressão de fluorescência em regime estacionário para determinar as constantes de dissociação do complexo porfirina-melanina e os possíveis sítios de ligação da melanina.

Os resultados evidenciam a importante propriedade do polímero de melanina em atuar como eficiente meio para a dissipação não radiativa de estados eletrônicos excitados.

ABSTRACT

STUDY OF THE PORPHYRIN-MELANIN INTERACTION BY OPTICAL SPECTROSCOPY

In this work we studied the interaction between some cationic porphyrins and melanin. The porphyrins used were Zn-tetra(4-N-Methylpyridyl)porphine:Zn-TMPyP, Zn-tetra(4-N-Benzylpyridyl)porphine: Zn-TBzPyP, and their respective free bases porphyrins (TMPyP and TBzPyP). Synthetic melanin was obtained from the auto-oxidation of the 3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA).

From ressonance Raman spectra an attribution is made to the vibrational bands of the porphirins, analysing the effects of the substituents. The possible changes in the porphyrin structure due to the interaction with melanin are discussed based on the modifications of the ressonance Raman spectra of the porphyrins in the presence of melanin.

From optical absorption and fluorescence measurements it is suggested a new interpretation to the eletronic spectra of the porphyrins based on the Gouterman's model. The perturbation due to the melanin in the molecular orbitals of the porphyrins is also analysed.

An estimation of the energy transfer rate to the melanin by time resolved fluorescence measurements of the porphyrin-melanin solution is made. It is demonstrated that the fluorescence lifetime of the porphyrin-melanin complexes are lesser than 5ps.

The dissociatin constants of the porphyrin-melanin complexes and possible sites of binding of the melanin are determined by fluorescence quenching of the porphyrins as observed by steady state measurements.

The results show clearly the important role of the melanin to act as an eficient way to the non-radiative dissipation of the excited eletronic states of the porphyrins.

I. INTRODUÇÃO

I.1 - PORFIRINAS

As porfirinas pertencem a uma categoria de moléculas de importância fundamental para a vida na Terra. É conhecido o seu papel no transporte e armazenamento de oxigênio, nos animais de respiração intravenosa. O grupo heme da hemoglobina é uma porfirina com um átomo de ferro na posição central, que é responsável pelo transporte de oxigênio para as células e também pela eliminação do gás carbônico produzido pelo metabolismo celular [1]. A mioglobina, uma hematoproteina que está presente nos músculos de todos os vertebrados e invertebrados e é responsável pelo armazenamento de oxigênio nas células, também tem como centro ativo um grupo heme, que se liga reversivelmente ao oxigênio.

O grupo heme é também o grupo ativo dos citocromos, heme proteínas que têm como principal função biológica o transporte de hidrogênio ou eletrons, em virtude da alternância da valência do átomo de ferro do grupo heme [2]. Os citocromos são encontrados em praticamente todos os seres vivos, desde as bactérias até o homem.

Outra atividade biológica na qual uma porfirina está diretamente envolvida é a fotossíntese. A absorção da luz solar é a primeira etapa de um processo fotoquímico bastante complexo e é feita pela clorofila, cujo cromóforo é um derivado da porfirina com um átomo de magnésio coordenado na posição central.

No começo dos anos 70 dois acontecimentos independentes levaram ao surgimento de um grande interesse pelas propriedades ópticas de uma variedade de porfirinas sintéticas [3]:

1) Surgiu a primeira crise mundial de energia com a guerra do Yom Kippur no Oriente Médio e a tomada de consciência pelos países consumidores de petróleo de que suas fontes de energia poderiam

estar sujeitas a embargo pelos países da OPEP. Urgia, portanto, que se procurassem novas fontes de energia, se possível inesgotáveis.

2) Foi observado que o estado excitado do íon tris(2,2'-bipiridino) rutênio [$Ru(bpy)_3^{2+}$], podia sensibilizar reações de transferência de eletrons.

A associação dos dois fatos vem do reconhecimento de que a reação de transferência de eletrons do estado excitado do $Ru(bpy)_3^{2+}$ e, por extensão, de outros compostos de coordenação em solução, poderia levar à formação de espécies ricas em energia, as quais, através da manipulação de suas reações subsequentes poderiam chegar a um combustível armazenável. A idéia central do problema era imitar o processo da fotossíntese e encontrar um sistema molecular que absorvesse a energia solar e, através de uma reação de transferência de eletrons, catalizasse a decomposição de água em oxigênio e hidrogênio, que são fontes de energia armazenáveis. Para isso era necessário que fosse um absorvedor eficiente da luz do sol, eficiente doador de eletrons no estado excitado e também que fosse solúvel em água.

É durante essa época que se sintetiza uma série de porfirinas e metaloporfirinas, entre elas as porfirinas TMPyP (tetra (4-N-metilpiridil)porfina) e Zn-TMPyP, como potenciais sensibilizadores da reação de produção de H_2 atavés da decomposição da água [4-6].

I.2 - MELANINAS

As melaninas naturais são biopolímeros de estrutura heterogênea que estão presentes tanto em animais como em vegetais. Nos animais superiores, a melanina é encontrada em regiões iluminadas como a pele, pelos e olhos e em órgãos não iluminados como cérebro, medula e ouvido interno.

Os diferentes grupos de polímeros classificados genericamente como melaninas podem ser agrupados em três classes, quanto à cor e

precursores químicos [7]:

- eumelaninas, pigmentos de côr marron escura ou negra, que aparecem em maior quantidade na espécie humana. É encontrada principalmente em regiões iluminadas como na pele, cabelo e globo ocular. São encontradas também em regiões não iluminadas como no ouvido interno e na "substantia nigra" do cérebro. As eumelaninas são sintetizadas a partir da tirosina e da L-DOPA, pela ação da enzima tirosinase.
- feomelaninas, que apresentam vários tons de marron ou amarelado e são encontradas em várias espécies animais e em menor quantidade na espécie humana, nas pessoas de cabelos claros. São sintetizadas a partir da L-DOPA em presença de cisteína.
- alomelaninas, pigmentos de coloração marron escura ou negra, que são encontrados em várias espécies de plantas, onde aparecem principalmente nas sementes, nos esporos e nas cascas das frutas. Nessa classe de melaninas pode-se agrupar também os ácidos húmicos e fúlvicos. Seus precursores típicos são as moléculas de catecol.

Dessas clas s es de melanina, a eumelanina apresenta propriedades físicas bastante semelhantes às da melanina sintética obtida a partir da auto-oxidação da L-DOPA.

Uma forma possível para a estrutura do polímero de melanina é mostrade na figura I.1 [7]. A estrutura básica de polímero são os derivados do indol como a indol-quinona, dihidroxi-indol (hidroquinona) e hidroxi-indol (semiquinona), resultantes da ciclização da tirosina e da L-DOPA. Esses grupos são ligados entre si principalmente através de ligações carbono-carbono, o que dá um caráter extremamente ressonante para as ligações-π do polímero. Esse caráter ressonante e os vários tamanhos de cadeias poliméricas são responsáveis pelo espectro eletrônico característico das melaninas, com absorbância crescente do vermelho ao ultravioleta, sem estrutura de banda definida. No polímero de melanina existe um grande número de grupos carboxílicos e OH fenólicos, que se acredita serem os responsáveis pela formação de complexos da melanina com metais e outros sistemas catiônicos [8].

Não é ainda totalmente conhecida a função da melanina, principalmente quando localizada em regiões não iluminadas. Quando

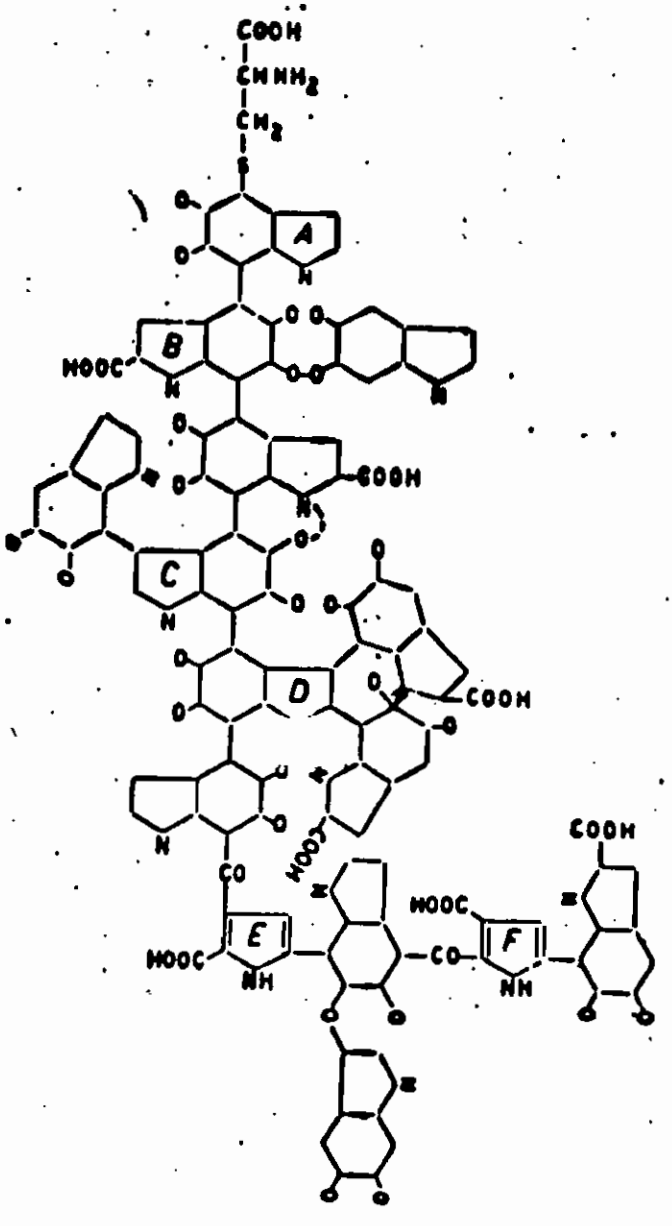


FIGURA I.1 - Modelo da estrutura da melanina

localizada em regiões iluminadas, a melanina teria principalmente a função fotoprotetora, devido à sua capacidade de absorver a radiação visível e principalmente o ultravioleta [9]. Nessas condições, a melanina tomaria parte em processos de transferência de eletrons [10]. Experiências mostram que o neurotóxico metilfenilpiridina (MPP^+), uma droga que causa sintomas de mal de Parkinson, pode formar compostos estáveis com a melanina [11]. Sabe-se também que a ausência do hormônio dopamina (um possível precursor da melanina) pode levar pacientes a apresentarem sintomas de mal de Parkinson. Recentemente, experiências feitas in vitro com melaninas sintéticas mostraram a potencial utilização do polímero como inibidor da replicação e atividade do vírus HIV-1 (o vírus da AIDS) [12]. Dessa forma, a compreensão da função biológica do pigmento nos seres vivos passa por estudo de suas interações com outras moléculas de interêsse biológico.

I.3 - INTERAÇÃO DE MELANINAS E PORFIRINAS COM OUTRAS MOLÉCULAS

Quando em presença de oxigênio, a melanina induz a formação de superóxido e, sob iluminação, a interação com oxigênio leva à formação de peróxido de hidrogênio e de radicais hidroxila [13].

Vários autores têm estudado a interação da melanina com outros sistemas biológicos . Pascutti [14] estudou a interação da melanina com a albumina sérica bovina (BSA) utilizando a técnica de ressonância paramagnética eletrônica. Ficou demonstrado que sob iluminação, a presença da BSA leva a um aumento do número de radicais livres na melanina. Também é comprovado que a interação da melanina com corantes como Rose Bengal leva a um significativo aumento dos radicais livres fotoinduzidos superior a 50 vezes na melanina e também ao consumo de oxigênio [15,16].

Haberman et al [17] estudaram as propriedades de oxi-redução do complexo de melanina com a protoporfirina. Bielec et al [18] estudaram a interação da melanina com uma série de porfirinas como a hematoporfirina (HP), a tetra(4-sulfonato-fenil)porfirina

(TPPS), a tetra(4-N,N,N,N-trimetil-anilina)porfina (TAP) e a tetra(4-N-metilpiridil)porfina (TMPyP). Esses autores analisaram a supressão de fluorescência das porfirinas por fluorescência estática e a supressão de estados tripletos das porfirinas por "flash fotólise".

A interação da melanina com sensitizadores também poderia ser importante em fototerapia. Porfirinas naturais têm sido utilizadas como sensitizadores em terapia fotodinâmica, particularmente a protoporfirina IX [19] e o derivado da hematoporfirina [20], que na verdade é um complexo onde a força ativa é um dímero da hematoporfirina [21]. Também tem sido estudado o potencial terapêutico de uma série de porfirinas sintéticas [20,21].

Uma série de trabalhos mostram que porfirinas catiônicas como a TMPyP podem-se ligar à estrutura do DNA por intercalação entre as duplas hélices do mesmo, impedindo sua duplicação [22,25]. Sistemas com esta propriedade têm o potencial de impedir o crescimento de tumores malignos. Outra possibilidade de aplicação das porfirinas em fototerapia vem da sua capacidade de se agregar às células cancerosas [26,27]. Uma série de experimentos têm demonstrado que em estado excitado as porfirinas podem gerar oxigênio singleto que destruiria estas células.

I.4 - OBJETIVOS

As células pigmentadas apresentam melaninas como protagonistas primários da interação com a radiação luminosa. Acredita-se que o conhecimento da função biológica do pigmento passa pela compreensão, tanto de suas propriedades intrínsecas, como dos mecanismos através dos quais interage com outras moléculas de interesse biológico. Por outro lado, reconhecendo-se a importância das porfirinas em processos fotofísicos e aplicações em campos da biofísica que vão do armazenamento de energia solar através da fotossíntese a terapia fotodinâmica do câncer, é importante o conhecimento das propriedades ópticas desta classe de

moléculas e dos possíveis mecanismos de interação das mesmas com outros sistemas biológicos. Nesse sentido, é importante o estudo das estruturas eletrônica e vibracional das porfirinas, que se relacionam diretamente com os processos fotofísicos envolvendo estas moléculas. Além disso, deve-se tentar entender de que maneira essas estruturas são afetadas pela interação com as melaninas.

Com este objetivo, estudamos a interação entre uma série de porfirinas catiônicas e a melanina sintética obtida a partir da auto-oxidação da dihidroxifenilalanina(L-DOPA). As porfirinas estudadas foram as recém-sintetizadas Zn-tetra(4-N-benzilpiridil)porfina, Zn-TBzPyP, sua base livre tetra(4-N-benzilpiridil)porfina, TBzPyP [28] e também as porfirinas já conhecidas Zn-tetra(4-N-metilpiridil)porfina, Zn-TMPyP e a base livre tetra(4-N-metilpiridil)porfina, TMPyP.

A utilização de porfirinas sintéticas no estudo da interação porfirina/melanina pode ser particularmente útil pelo fato de se poder manusear com uma série de parâmetros estruturais das mesmas tais como os grupos substituintes, o metal central, a carga total da molécula e sua hidrofobicidade. O conhecimento desses parâmetros e de seus efeitos nas propriedades da porfirina a serem estudadas pode ser de grande utilidade para um melhor conhecimento sobre a estrutura vibracional e eletrônica das porfirinas e de como se dá a interação porfirina/melanina.

Foram utilizadas as técnicas de absorção óptica na região UV-visível, fluorescência estática e resolvida no tempo e espectroscopia Raman ressonante. A cada uma destas técnicas é dedicado um capítulo da tese, onde são estudadas as porfirinas isoladas e os complexos porfirina/melanina. Não são mostrados dados da melanina isolada, pois o polímero não apresenta nenhum detalhe de banda na região UV-visível, não é fluorescente e é um espalhador Raman muito fraco.

No capítulo III é feito um estudo das 4 porfirinas isoladas por absorção UV-visível. É feita uma análise do efeito de cada um do grupos substituintes nas energias dos orbitais moleculares das porfirinas. Com base nesta análise é discutida a formação dos

complexos porfirina/melanina.

No capítulo IV estudamos as porfirinas e complexos porfirina/melanina por espectroscopia Raman ressonante. Como o espectro Raman ressonante é diretamente dependente das propriedades eletrônicas dos estados excitados [29-33], o conhecimento de propriedades do sistema como transferência de cargas, atividades de oxidação e redução e outras podem estar diretamente ligadas a propriedades do espectro Raman ressonante. Considerando que duas das porfirinas (TBzPyP e ZnTBzPyP) são estudadas por espectroscopia Raman pela primeira vez e considerando que os grupos substituintes podem alterar bastante o espectro Raman das porfirinas [34-40], é feita uma discussão bastante longa do espectro vibracional das porfirinas.

No capítulo V usamos os dados de fluorescência estática e com resolução temporal para discutir mais propriamente a formação do complexo porfirina/melanina. É estimada uma taxa de transferência de energia da porfirina para a melanina e são calculadas as constantes de dissociação do complexo. Também é discutida a influência da hidrofobicidade e hidrofilicidade dos grupos substituintes, do metal e dos hidrogênios centrais das porfirinas, na formação do complexo porfirina/melanina.

II-MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 MATERIAL UTILIZADO

MELANINA

A melanina sintética foi obtida a partir da auto-oxidação da L-DOPA [41]. Foi preparada uma solução de L-DOPA de 0,5mg/ml em água bidestilada, e o pH da solução elevado a 9,0 por adição de hidróxido de sódio (NaOH). Esta solução foi mantida por um período de 5 dias à temperatura ambiente e sob fluxo de oxigênio, formando uma solução escura resultante da auto-oxidação e polimerização da L-dopa. A seguir foi lavada várias vezes em saco de diálise para eliminar os polímeros de peso molecular menor que 5000. O material retido no saco de diálise foi liofilizado a 40°C, restando um pó preto que é solúvel em água numa faixa de pH entre 4,0 e 9,0. O peso molecular médio do polímero de melanina assim obtido foi estimado em 12.000.

PORFIRINAS

As porfirinas estudadas neste trabalho foram sintetizadas pelo Prof. G.Azzellini, do Instituto de Química-USP. As porfirinas TMPyP e Zn-TMPyP foram sintetizadas de acordo com método já estabelecido [42]. A porfirina TBzPyP foi preparada por alquilação da tetra-piridil-porfina(TPyP) com cloreto de benzila em mistura clorofórmio/etanol. A porfirina (Zn-TBzPyP) foi obtida pela alquilação da porfirina Zn-TPyP com cloreto de benzila em mistura clorofórmio/etanol, sendo garantida uma pureza superior a 98,5% em todas as amostras. Os pesos moleculares destas porfirinas, levando em conta os contra-íons são: TMPyP = 1363,6; TBzPyP = 1084,5; Zn-TMPyP = 1120,0 e Zn-TBzPyP = 1147,9 g/mol.

Os complexos porfirinas/melanina em pó, dos quais obtivemos espectros Raman, foram preparados a partir de soluções aquosas de porfirinas em concentrações 10^{-4} a 10^{-5}mol/l e aproximadamente igual quantidade em massa de melanina. Embora tanto a melanina

quanto as porfirinas catiônicas sejam aquossolúveis em pH 7,0, as soluções porfirina/melanina depois de algum tempo (dependendo das concentrações) acabam formando um complexo insolúvel que precipita em proporção aproximada de 1:1 em massa, ficando o excesso de porfirina ou melanina na solução. O precipitado foi separado por centrifugação e liofilizado.

II.2 EQUIPAMENTO

ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ÓPTICA

Nos experimentos de absorção óptica foram utilizados os espectrofotômetros "CARL ZEISS"-mod. DMR-21 e/ou "VARIAN DMS 200". Nas medidas de absorção óptica das porfirinas puras usamos a água destilada como referência (branco), enquanto que os espectros das soluções porfirina/melanina foram obtidos com relação a uma solução aquosa de igual concentração de melanina. Os experimentos com os complexos porfirina/melanina foram feitos em tampão fosfato, pH 7,0 em concentração entre 10 e 100mM.

FLUORESCÊNCIA ESTÁTICA

As medidas de fluorescência estática foram feitas com espectrofluorímetros "PERKIN-ELMER mod.LS-5" ou "AMINCO SLM-8000". As concentrações foram ajustadas para que as absorbâncias das porfirinas e das soluções porfirina/melanina não fossem maiores que 0,1. Como a melanina desloca as posições das bandas dos espectros das porfirinas (ver dados de absorção óptica de soluções porfirina/melanina), procuramos sempre que possível, excitar a fluorescência no ponto isosbéstico das soluções porfirina/melanina, para evitar que uma possível variação na absorbância alterasse a intensidade da fluorescência.

FLUORESCÊNCIA COM RESOLUÇÃO TEMPORAL

O equipamento de resolução temporal é baseado num sistema de contagem de fóton único, "single photon counting" [43].

O equipamento consta de um laser de corante bombeado por um laser de argônio "SPECTRA PHYSICS" pulsado e com sistema "cavity damping", que pode gerar pulsos com largura temporal de 15ps, operando a uma frequência de 825 khz. A emissão fluorescente é detectada por uma placa microcanal "Hamamatsu 1564-01". A curva experimental de emissão fluorescente em função do tempo é ajustada a uma curva de decaimento multiexponencial pelo método de mínimos quadrados. A adequação da curva de decaimento experimental à curva teórica gerada pelo ajuste multiexponencial é feita pela minimização da distribuição residual entre os pontos das duas curvas.

ESPECTROSCOPIA RAMAN

Obtivemos os espectros Raman com espectrômetro "Jobin Yvon-mod. RAMANLOG H2GS", equipado com fotomultiplicadora "RCA-C31034a" refrigerada por nitrogênio líquido. A aquisição de dados foi feita por um contador de fótons acoplado a um microcomputador, ambos desenvolvidos no Instituto de Física da USP [44]. A excitação Raman foi feita com um laser de argônio, que tem várias linhas entre 457,9 e 514,5nm, o que permitiu levantar o perfil parcial de excitação Raman para as quatro porfirinas. Para a calibração do espectrômetro, utilizamos as linhas de emissão atômica do argônio do tubo do laser e seus deslocamentos em relação às linhas de emissão laser. Com este sistema de calibração,as posições das bandas dos espectros Raman são determinadas com uma precisão máxima de $\mp$ 1,0 cm^{-1}.

Para minimizar os problemas de degradação das amostras pela radiação do laser, os espectros foram obtidos com as amostras em celas rotatórias, tanto para as medidas em líquido quanto em sólido. Para a obtenção de espectros de porfirinas e complexos porfirina/melanina em sólido, as amostras foram dispersas em brometo de potássio (KBr), numa proporção aproximada de

200mg KBr/1mg amostra. Com isso procuramos evitar o problema de auto-absorção pelas amostras, além de maximizar a relação sinal/ruído para os espectros.

No caso dos espectros em solução aquosa, a maximização do sinal Raman exige uma solução concentrada para que se tenha um grande número de moléculas espalhadoras e, ao mesmo tempo, a solução deve ser suficientemente diluída para que sua absorbância não atenue totalmente a radiação do laser. Essa maximização foi obtida para concentrações de porfirina na faixa de 0,1 - 0,3 mM.

Para as amostras sólidas, tanto de porfirinas puras quanto de complexos porfirina/melanina foi possível obter espectros excitados em todas linhas de laser entre o violeta (457,9nm) e o verde (514,5nm). Para as amostras em solução obtivemos apenas os espectros com excitação na região da banda Soret (457,9nm), uma vez que para excitação nos outros comprimentos de onda a relação sinal/ruído é piorada pelo efeito da "prompt fluorescence".

Por questões práticas, todos os espectros Raman foram divididos em dois intervalos, com resoluções espectrais diferentes. No intervalo 100-500cm^{-1} trabalhamos com resolução espectral de 4-5cm^{-1} (fendas mais fechadas), para minimizar o espalhamento de Rayleigh devido à proximidade da linha de excitação. No intervalo 500-1700cm^{-1}, trabalhamos com resolução espectral de 7-9cm^{-1}, que é menor que a largura da maior parte das bandas vibracionais das amostras.

Para todas as porfirinas, registramos os espectros Raman para deslocamentos entre 100 e 1700 cm^{-1}, com excitação próximo à banda Soret (457,9nm) e no mínimo mais dois comprimentos de onda próximos à banda Q(0,1). Neste caso, quando possível, utilizamos as linhas 488,0 e 514,5nm. Com isso foi possível levantar um perfil parcial de ressonância para as quatro porfirinas e complexos porfirina/melanina.

III -ESPECTRO DE ABSORCÃO ÓPTICA DAS PORFIRINAS E COMPLEXOS PORFIRINA/MELANINA

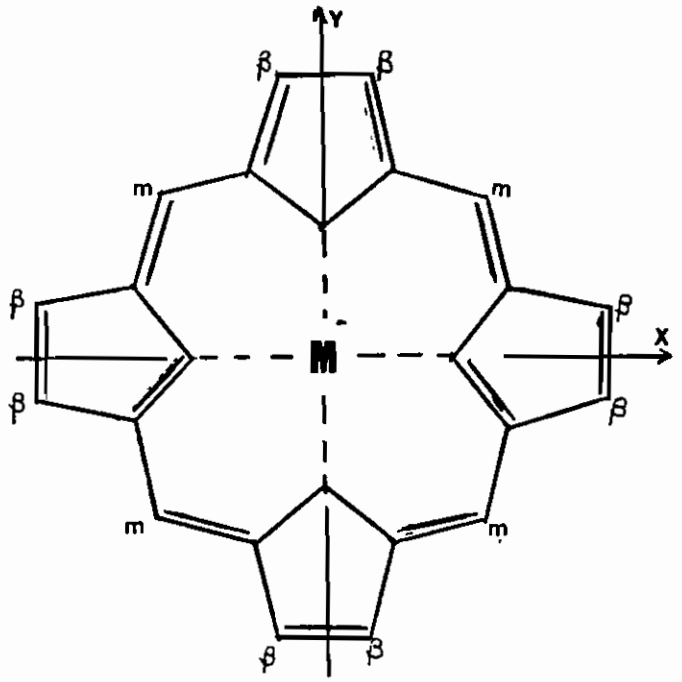
III.1- A ESTRUTURA ELETRONICA E O ESPECTRO DE ABSORCAO DAS PORFIRINAS

As porfirinas são derivadas da porfina, um macrociclo formado por quatro anéis pirrólicos ligados através de uma ponte constituída de um átomo de carbono com uma ligação-π coordenada e estabilizados por um metal (nas metaloporfirinas) ou dois átomos de hidrogênio (nas porfirinas de base livre) ligados aos átomos de nitrogênio do centro do anel (fig.III.1).

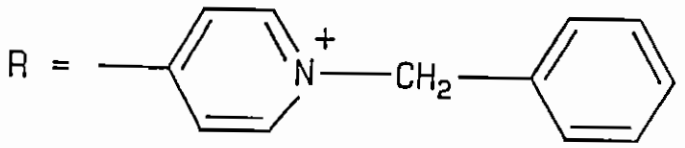
Nas porfirinas de base livre, os átomos de hidrogênio podem-se ligar a nitrogênios adjacentes ou opostos. Considerando a porfirina como uma estrutura planar, com a ligação dos hidrogênios a nitrogênios opostos, a porfirina é classificada no grupo de ponto de simetria D_{2h}, enquanto a ligação a nitogênios adjacentes abaixaria drasticamente a simetria da molécula para C_{2v}. Embora as duas estruturas possam estabilizar o macrociclo, as evidências experimentais indicam que a estrutura mais provável é com os átomos de hidrogênio ligados a nitrogênios opostos.

Na porfina, todos os carbonos das posições β e m são ligados a átomos de hidrogênio. As porfirinas estudadas neste trabalho têm átomos de hidrogênio nas posições β e grupos metil-piridil ou benzil-piridil nas posições m.

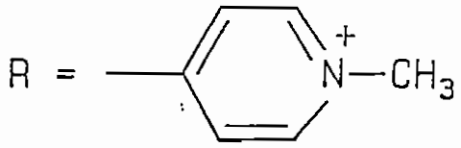
Todas as porfirinas de base livre têm espectro eletrônico bastante semelhante, caracterizado por uma banda de absorção próxima a 400 nm, chamada banda Soret ou banda B, e quatro bandas na região 500 - 650 nm, as bandas Q. A banda Soret é bastante intensa ($\varepsilon > 10^5$), enquanto as bandas na região visível são de uma a duas ordens de grandeza mais fracas. As posições e as intensidades das bandas dependem da natureza dos substituintes periféricos.



A



B



C

FIGURA III.1 - Estrutura da porfirina e substituintes.
(A) macrociclo (B) benzilpiridil
(C) metilpiridil

Quando da formação de uma metaloporfirina, as quatro bandas da região visível são reduzidas a duas, enquanto a banda Soret é apenas ligeiramente deslocada para o vermelho. Esta simplificação dos espectros de absorção das metaloporfirinas com relação às de base livre é atribuída a um aumento da simetria de D_{2h} para D_{4h}. A similaridade dos espectros eletrônicos das metaloporfirinas e sua pouca dependência com o metal central são uma evidência adicional de que a absorção das metaloporfirinas é devida ao mesmo cromóforo. Devido ao fato de que a banda Q nas metaloporfirinas (a banda de energia mais baixa) apresentar uma banda satélite com deslocamento constante (para o azul), é aceito por consenso que esta banda satélite seja um ramo vibracional Q(1,0) da banda fundamental Q(0,0). Nas porfirinas de base livre, onde as duas bandas Q se desmembram em 4, atribui-se igualmente duas bandas como dois ramos vibracionais $Q_x(1,0)$ e $Q_y(1,0)$ das bandas fundamentais $Q_x(0,0)$ e $Q_y(0,0)$

Nos últimos anos tem aparecido vários modelos empíricos que tentam explicar a estrutura eletrônica das porfirinas, principalmente baseados nos modelos de orbitais moleculares [45]. Devido à complexidade da molécula, os cálculos exatos de orbitais moleculares (MO) não são efetuados por dificuldades de cálculo, tornando necessária a utilização de modelos aproximados, semi-empíricos e/ou fenomenológicos.

Como as porfirinas são sistemas altamente π-conjugados e como as transições eletrônicas das mesmas caem principalmente nas regiões visível e UV próximo, uma das principais aproximações que se faz no estudo do espectro eletrônico das porfirinas é considerar que as transições envolvem unicamente os eletrons π. Outra simplificação vem do alto grau de simetria do macrociclo. As transições para os estados excitados devem obedecer as regras de transformação dos grupos de ponto D_{4h} para as metaloporfirinas e D_{2h} para as porfirinas de base livre.

Os primeiros estudos da estrutura eletrônica baseiam-se no chamado "modelo de orbital molecular de elétron livre" [46], que é uma extensão do problema da partícula na caixa. Simpson [47] e Kuhn [48] tratam a porfirina como um anel de raio r, em cuja

circunferência os elétrons-π podem-se mover livremente. Esses autores tomam como refefência o anel de 18 membros da porfirina (fig.III.2), com 18 elétron-π. Não é levada em conta a diferença entre os átomos de carbono e nitrogênio. Nesse sistema, as energias dos elétrons-π são dadas por:

$$E_n = n^2 \frac{\hbar}{2mr^2} \qquad n = 0\ ,\ 1,\ 2... \qquad \text{III.1}$$

onde n é o número quântico associado ao anel e corresponde essencialmente a um momento angular.

De acordo com a regra de Hund, os orbitais associados aos números quânticos 0, ∓ 1, ∓ 2, ∓ 3 e ∓ 4 são preenchidos no estado fundamental. A primeira transição eletrônica viria necessariamente de $\mu = \mp 4 \Rightarrow \nu = \mp 5$, correspondendo à passagem de um elétron do "orbital molecular superior ocupado" (HOMO) para o "orbital molecular inferior desocupado" (LUMO), que daria quatro transições degeneradas, com variacões de momento angular $\Delta n = \mp 1$ ou $\Delta n = \mp 9$. Esse modelo prevê a primeira transição em 16 100 cm^{-1} (620nm), o que está qualitativamente de acordo com os resultados experimentais para a banda Q das porfirinas.

Um modelo semelhante ao de elétrons livres foi desenvolvido por Moflitt [46], que considera o anel interno de 16 membros como o coração da porfirina, tratando-o como um polieno cíclico de 16 átomos e 18 elétrons-π. Nesses polienos, os orbitais moleculares têm a seguinte forma:

$$\phi_\mu = N \sum_{p=1}^{16} \exp(2\pi i \mu p/16)\chi_p \qquad \text{III.2}$$

onde χ_p é um orbital atômico centrado no átomo p, e N é um fator de normalização. As energias dos orbitais são dadas por:

$$w_\mu = \alpha + 2\beta\cos(2\pi\mu/16) \qquad \text{III.3}$$

com $\alpha = \langle\chi_p \mid h_{ef} \mid \chi_p\rangle$

$\beta = \langle\chi_p \mid h_{ef} \mid \chi_{p+1}\rangle$

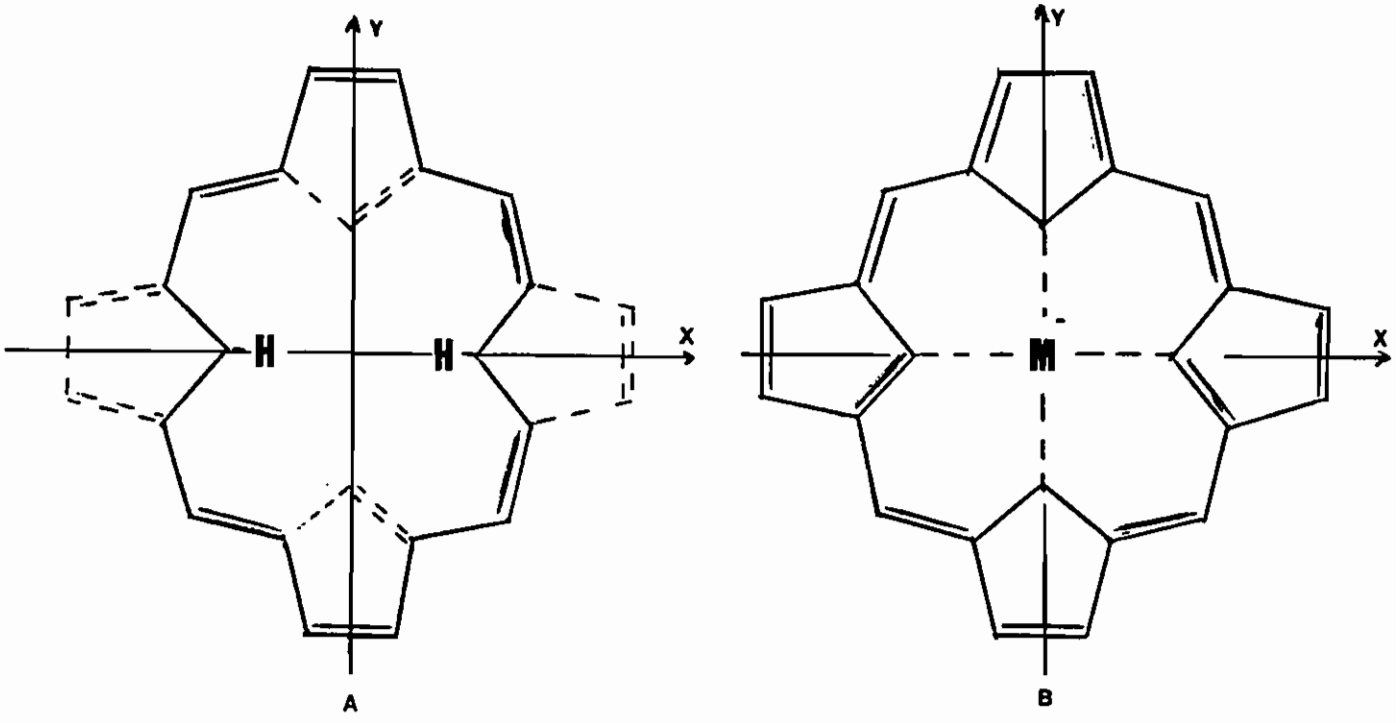


Figura III.2 - Porfirina como uma superposição de polienos cíclicos

(a) base livre, onde os anéis de 18 membros na direção x (tracejado) e y (contínuo) não são equivalentes

(b) metaloporfirina, onde os 2 anéis são equivalentes

No polieno cíclico, os orbitais são preenchidos tal como no modelo de elétrons livres, ou seja, os orbitais com $\mu = 0,\ldots,\mp 4$ são preenchidos no estado fundamental e a primeira transição eletrônica corresponde a $\mu = \mp 4 \Rightarrow \nu = \mp 5$. O modelo do polieno cíclico é o primeiro a tentar justificar o desmembramento da banda Q quando da passagem da metaloporfirina para a base livre. Moflitt mostra que no caso de um polieno cíclico de $(4\nu+2)$ membros, a degenerescência do primeiro estado excitado é quebrada por interações eletrônicas [46]. Então a passagem de uma metaloporfirina para uma base livre é interpretada pelo autor como uma mudança de um anel de 16 para um de 18 membros. Na fig.III.2 pode-se ver como um anel de 18 membros sobrepõe-se ao de 16 no esqueleto da porfirina.

Longuet-Higgins et al [45] tentam aplicar o modelo de orbitais moleculares de Hückel (HMO) ao estudo da estrutura eletrônica das porfirinas. Levando em conta os apectos de simetria da molécula, os autores obtém dois orbitais superiores preenchidos de espécies $a_{2u}(\pi)$ e $a_{1u}(\pi)$ e dois orbitais inferiores degenerados não preenchidos de espécie $e_g(\pi^*)$. Na figura III.3 são mostrados os orbitais superiores ocupados a_{2u} e a_{1u} não degenerados e os orbitais inferiores desocupados e_g degenerados [45]. Os cálculos de HMO colocam a transição $a_{2u} \Rightarrow e_g$ com energia mais baixa que $a_{1u} \Rightarrow e_g$. Então a primeira transição é identificada com a banda Q e a segunda com a banda Soret. É previsto o desmembramento da banda Q em duas componentes Q_x Q_y (também é previsto o desmembramento da banda Soret) nas porfirinas de base livre (simetria D_{2h}) pois no grupo de ponto D_{2h} a espécie E_g se desmembra em B_{2g} e B_{3g}, não degeneradas. Este modelo não prevê a diferença de intensidade entre as bandas Q e a banda Soret, uma vez que os momentos de dipolo de transição permanecem iguais para as duas bandas .

Cada um desses modelos explica alguns aspectos isolados do espectro das porfirinas mas não conseguem explicar simultaneamente detalhes como:

a) as posições das bandas, ou seja, as energias envolvidas nas

transições;

b) a diferença de intensidade entre as bandas Q e a banda Soret;

c) o desmembramento das bandas Q (e não desmembramento da banda Soret) quando da passagem de uma metaloporfirina para uma base livre.

Como uma evolução desses modelos, temos o modelo de Gouterman [49] ou modelo de 4 orbitais, aceito até hoje para a interpretação do espectro de absorção óptica das porfirinas. Gouterman procura unir os modelos de elétron livre do polieno cíclico e o modelo de orbitais moleculares de Hückel. O modelo dá ênfase ao caráter ressonante do anel interno de 16 membros com 18 elétrons-π deslocalizados, como no caso do polieno cíclico [50]. Para uma porfirina de simetria D_{4h} , os orbitais moleculares HOMO e LUMO têm o mesmo aspecto que os do modelo de Hückel (fig.III.3). Pode-se notar que os orbitais HOMO têm 4 planos nodais enquanto os orbitais LUMO têm 5 planos nodais, em analogia com os orbitais dos modelos de elétrons livres e do polieno cíclico.

Gouterman no entanto impõe uma diferença fundamental entre o modelo de 4 orbitais e o HMO. O cálculo de orbitais moleculares no modelo de Hückel prevê que o orbital a_{2u} deve ser mais energético que o a_{1u} , associando as bandas Q e Soret às transições $a_{2u} \Rightarrow e_g$ e $a_{1u} \Rightarrow e_g$,respectivamente, com momentos de dipolos de igual intensidade. Para dar conta da diferença de intensidade entre as bandas Q e Soret, Gouterman impõe como ponto de partida que os orbitais a_{1u} e a_{2u} sejam "acidentalmente" degenerados, tornando a banda Q proibida e a banda Soret permitida. O autor muda a nomenclatura dos orbitais para torná-la compatível com sistemas de simetria mais baixa que D_{4h} . Assim, os arbitais passam a ser b_2 , b_1 , c_1 e c_2 em lugar de a_{1u} , a_{2u} e e_g , respectivamente.

Se os orbitais b_1 e b_2 são degenerados, as transições singletos podem-se misturar por interação de configuração, dando alguma intensidade às bandas Q, proibidas. Se designarmos por Q e B os estados excitados de uma porfirina, teremos os seguintes estados Q^0 e B^0 :

$$B_x^0 = (1/2)^{1/2} [(b_1 \Rightarrow c_2) - (b_2 \Rightarrow c_1)]$$

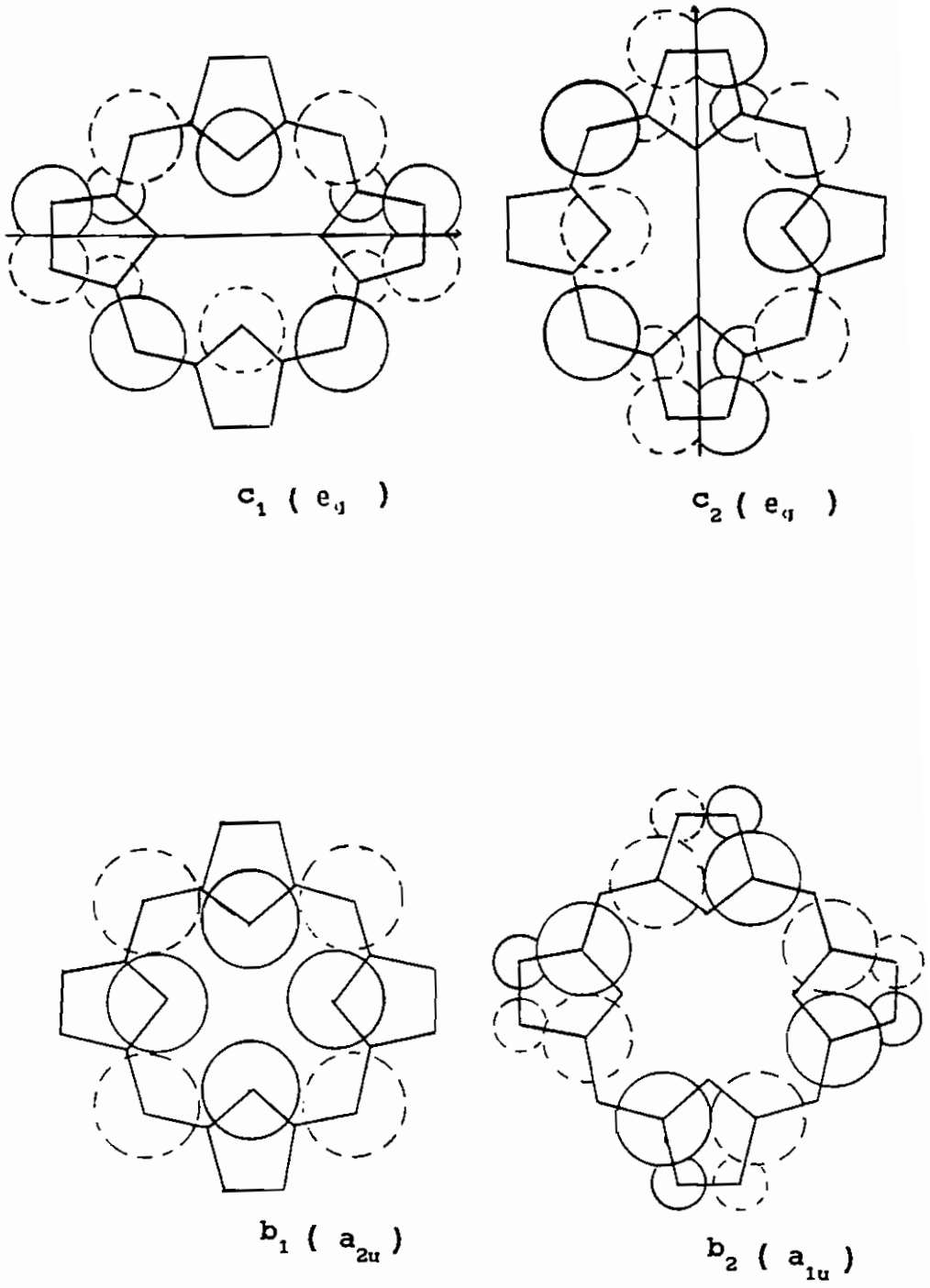


FIGURA III.3 - Orbitais moleculares de uma metaloporfirina

$$Q_x^0 = (1/2)^{1/2} [(b_1 \Rightarrow c_2) + (b_2 \Rightarrow c_1)]$$

$$B_y^0 = (1/2)^{1/2} [(b_1 \Rightarrow c_1) + (b_2 \Rightarrow c_2)] \qquad \text{III.4}$$

$$Q_y^0 = (1/2)^{1/2} [(b_1 \Rightarrow c_1) - (b_2 \Rightarrow c_2)]$$

Os estados Q^0 dão as bandas Q (proibidas) e os estados B^0 dão as bandas Soret (permitidas). Esta configuração faz com que as transicões eletrônicas tenham momentos de dipolos de transição polarizados nas direções x ou y. Como as configurações de polarizações diferentes não se misturam, pode-se descrever os estados Q para uma porfirina a partir da interação de configuração [51]:

$$Q_x = Q_x^0 + \lambda_x B_x^0$$

$$Q_y = Q_y^0 + \lambda_y B_y^0 \qquad \text{III.5}$$

$$\lambda_x = \frac{1}{2\Delta E} \left\{ [\varepsilon(c_2) - \varepsilon(b_1)] - [\varepsilon(c_1) - \varepsilon(b_2)] \right\}$$

$$\lambda_y = \frac{1}{2\Delta E} \left\{ [\varepsilon(c_1) - \varepsilon(b_1)] - [\varepsilon(c_2) - \varepsilon(b_2)] \right\} \qquad \text{III.6}$$

onde ΔE é a diferençade energia entre as bandas B e Q, $\varepsilon(b_1)$ é a energia do orbital b_1 e assim por diante. A intensidade das bandas Q_x e Q_y é proporcional a λ_x^2e λ_y^2,respectivamente.

A construção do espectro de absorção da porfirina, de acordo com o modelo de 4 orbitais, é feita então da seguinte maneira: os parâmetros dos orbitais moleculares são ajustados de modo a levar os orbitais b_1 e b_2 próximos da degenerescência (os orbitais c_1 e c_2 são degenerados na metaloporfirina). Nesta situação a banda Soret é permitida e a banda Q proibida. Devido à degenerescência dos orbitais inferiores, aparece entre eles uma

interação de configuração, levando a uma separação dos orbitais b_1 e b_2 , tornando a banda Q parcialmente permitida.

A partir do modelo de 4 orbitais pode-se explicar as mudanças nos espectros das porfirinas quando da passagem da metaloporfirina para a base livre, principalmente na região da banda Q. Como o orbital b_2 não contem densidade eletrônica sobre os átomos de nitrogênio, ele não deve se alterar quando da passagem da metaloporfirina para a base livre. O orbital c_1 só tem densidade eletrônica sobre os nitrogênios dos pirróis 1 e 3, enquanto o orbital c_2 só tem densidade eletrônica sobre os nitrogênios 2 e 4. Com a protonação dos nitrogênios dos anéis 2 e 4, a energia do orbital c_2 será abaixada em relação à do orbital c_1 e os dois orbitais se tornarão polarizados nas direções x e y, respectivamente. Com isso a banda Q será desmembrada em duas componentes Q_x e Q_y ,também polarizadas.

Também de acordo com este modelo, a banda Soret é bastante sensível à substituição nas posições meso (os carbonos C_m) enquanto as bandas Q são mais sensíveis a substituições nos carbonos C_β . De fato , resultados experimentais mostram que no caso da metaloclorina (dihidrogenação dos carbonos C_β de um dos anéis pirrólicos) a banda Soret praticamente não se altera, enquanto a banda Q, além de separar as componentes Q_x e Q_y, é deslocada para o vermelho e tem a componente de menor energia fortemente intensificada [51] .

Existem alguns pontos obscuros no modelo de Gouterman, como por exemplo, a imposição de que os orbitais b_1 e b_2 sejam degenerados como ponto de partida para a formulação do modelo. Na verdade, o orbital molecular $b_2(a_{1u})$ se comporta como um polieno cíclico de 20 membros, enquanto o orbital $b_1(a_{2u})$ se comporta efetivamente como um polieno de 16 membros.

Um ponto importante de desacordo entre o modelo e os resultados experimentais é o comportamento da banda Soret nas porfirinas de base livre. De acordo com o modelo, na porfirina de base livre, a banda Soret deveria sofrer o mesmo desmembramento que a banda Q, uma vez que se originaria de um orbital (b_1) para os orbitais c_1 e c_2 não mais degenerados.

Essa incompatibilidade do modelo com os resultados experimentais poderia ser resolvida se admitíssemos que , nas porfirinas de base livre o orbital b_1 fosse polarizado como o são os orbitais c_1 e c_2. Dessa maneira uma das transições $b_1 \Rightarrow c_1$ ou $b_1 \Rightarrow c_2$ seria proibida pois viria de orbitais polarizados perpendicularmente. Com isso, nas porfirinas de base livre a banda Soret teria uma única componente permitida, de acordo com os resultados experimentais.

III.2 UMA INTERPRETAÇÃO EMPÍRICA PARA O ESPECTRO DE ABSORÇÃO ÓPTICA DAS PORFIRINAS

Os espectros de absorção óptica das quatro porfirinas são mostrados na figura III.4. Na tabela III.1, mostramos um sumário das propriedades ópticas (posição das bandas de absorção, atribuição de banda e coeficiente de extinção molar) das quatro porfirinas estudadas neste trabalho. A seguir, nesta secção é feita uma tentativa de reinterpretação dos espectros de absorção das porfirinas.

TABELA III.1 - Bandas (nm) do espectro de absorção óptica das porfirinas medidas em tampão fosfato 10mM, pH 7,0. Os números entre parêntesis representam $\varepsilon/10^4$ (coeficiente de extinção molar)

	B	Q(0,1)	Q(0,0)	$Q_y(0,1)$	$Q_y(0,0)$	$Q_x(0,1)$	$Q_x(0,0)$
TMPyP	421 (24,0)			519 (1,5)	556 (0,56)	585 (0,65)	642 (0,15)
TBzPyP	424 (19,0)			523 (1,40)	558 (0,62)	586 (0,62)	644 (0,25)
ZnTMPyP	436 (21,0)	565 (2,50)	607 (0,81)				
ZnTBzPyP	442 (17,0)	566 (1,60)	609 (0,62)				

Esta tentativa de interpretação do espectro de absorção óptica das porfirinas é feita a partir do modelo de 4 orbitais de Gouterman, acrescido das suposições feitas no fim da secção

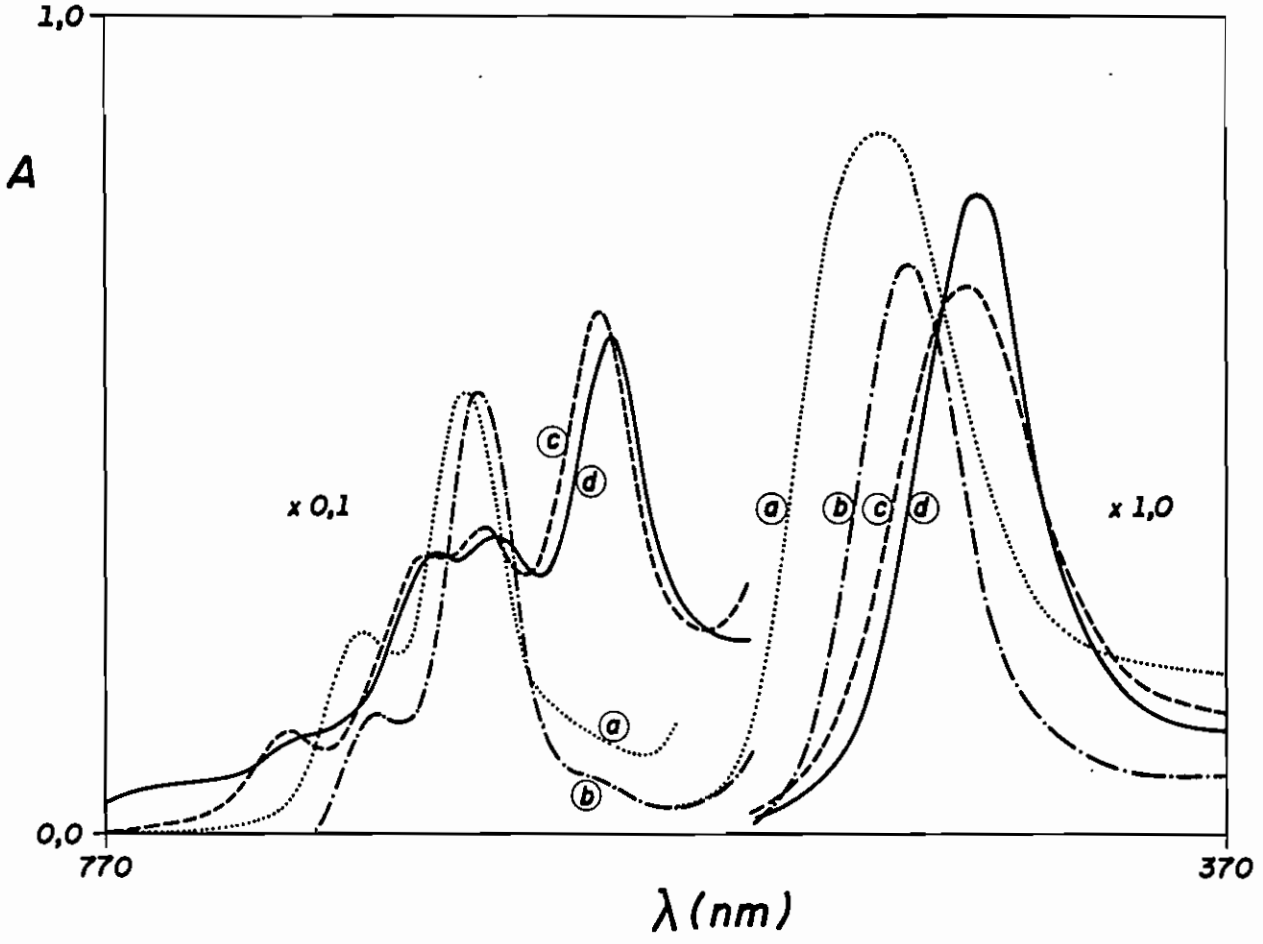


Figura III.4 - Espectro de absorção de porfirinas na região 770 - 370 nm

A) ZnTBzPyP B) ZnTMPyP C) TBzPyP D) TMPyP

anterior. Partindo do modelo de Gouterman, fazemos duas considerações adicionais:

a) O orbital b_2 , que dá origem à banda Q tem a mesma energia , qualquer que seja o substituinte nas posições C_β e qualquer que seja o átomo ou grupo que ocupe a posição central. Essa suposição é baseada nas propriedades nodais do orbital b_2 , que apresenta densidade eletrônica nula tanto nos carbonos C_β quanto nos nitrogênios dos anéis pirrólicos.

b) O orbital b_1 , que dá origem à banda Soret, é polarizado na porfirina de base livre, tornando proibida a transição para um dos orbitais superiores, c_1 ou c_2. A questão da polarização do momento de dipolo de transição associado ao orbital b_1 há que ser analisada em profundidade, pelas suas implicações. Um argumento a favor desta hipótese é que ela permite construir o espectro de absorção óptica das porfirinas levando em conta os efeitos dos substituintes ou, segundo a justificativa de Gouterman para o modelo de 4 orbitais "explains why grass is green and blood is red" [51].

Como os dados experimentais (o número de onda da banda de absorção) fornecem apenas a informação sobre a diferença de energia entre dois orbitais moleculares, a medida da energia envolvida numa transição eletrônica não permite avaliar o efeito de um determinado substituinte sobre cada um dos orbitais, uma vez que o substituinte pode afetar simultaneamente os dois orbitais envolvidos. Nesse sentido, a hipótese de que um dos orbitais (no caso o orbital b_2) permanece inalterado é a chave para se estudar o efeito dos substituintes sobre os outros orbitais moleculares.

Tomando como base o modelo de 4 orbitais com as suposições acima, construímos o diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares das porfirinas (fig.III.5), usando os dados espectrais de cada porfirina, mostrados na tabela III.1. A partir desse diagrama pode-se identificar os efeitos dos substituintes sobre a energia de cada um dos orbitais das porfirinas.

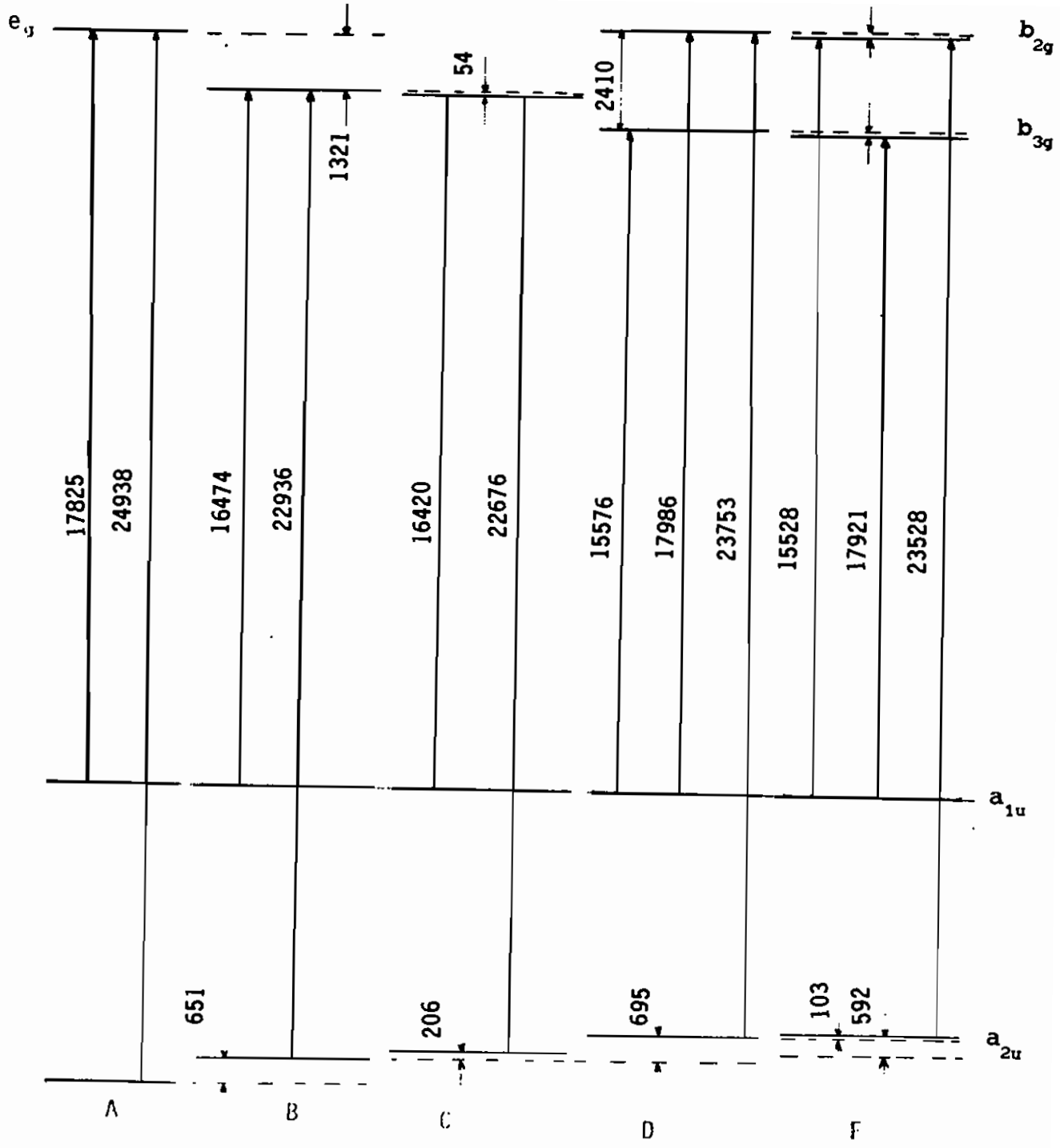


Figura III.5 - Diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares das porfirinas, onde se obsesrva os efeitos dos grupos substituintes com relação aos orbitais da zinco-porfirina [51]. Os valores de energia são dados em número de onda (cm^{-1})

(a) Zn-porfina (b) Zn-TMPyP (c) Zn-TBzPyP (d) TMPyP

(e) TBzPyP

A PASSAGEM METALOPORFIRINA ⇒ BASE LIVRE

Das substituições que se podem fazer nas porfirinas, uma das que mais alteram seus espectros é a troca do metal central por dois átomos de hidrogênio .

Para os dois grupos de porfirinas aqui estudados (tetra-metilpiridil e tetra-benzilpiridil), o desmembramento observado entre as bandas $Q_x(0,0)$ e $Q_y(0,0)$ quando da passagem da metaloporfirina para a base livre foi de aproximadamente $2400cm^{-1}$. Esse "spliting" é ainda maior no caso de porfirinas pirrol substituídas, como na octaetil-porfirina base livre (H_2OEP), onde a separação entre as bandas $Q_y(0,0)$ e $Q_x(0,0)$ é de aproximadamente 3100 cm^{-1} [52]. A intensidade desse desdobramento sugere que o metal ou hidrogênios centrais exercem um papel muito importante na estabilização do macrociclo, o qual não foi ainda devidamente analisado.

Gouterman [49] prevê que ao se substituir o metal central por dois prótons em posições opostas nos nitrogênios dos anéis pirrólicos, o orbital c_2 , que contem esses prótons, é abaixado com relação ao orbital c_1 "desprotonado". Por outro lado, ao fazermos o orbital b_2 independente dos meso-substituintes e do metal central, podemos medir o comportamento dos orbitais $c_1(b_{2g})$ e $c_2(b_{3g})$ da base livre um em relação ao outro, e também o comportamento desses orbitais em relação ao orbital degenerado $c_1 \equiv c_2$ (e_g) da metaloporfirina. Conforme podemos observar no diagrama da fig.III.5, a passagem da metaloporfirina para a base livre provoca um deslocamento quase simétrico dos orbitais c_1 e c_2 em relação ao orbital degenerado (e_2) da metaloporfirina.

A hipótese do abaixamento do orbital "protonado" c_2 em relação a c_1 ao orbital degenerado e_g é reforçada pelo espectro da porfirina dicatiônica H_4TMPyP^{2+} , mostrado na figura III.6 e cujo diagrama de níveis de energia é mostrado na figura III.7. Nessa espécie, obtida em solução da respectiva porfirina em meio ácido, é forçada a ligação de dois prótons adicionais nos nitrogênios inicialmente "livres", tornando os orbitais c_1 e c_2 novamente degenerados e devolvendo ao sistema a simetria D_{4h} da

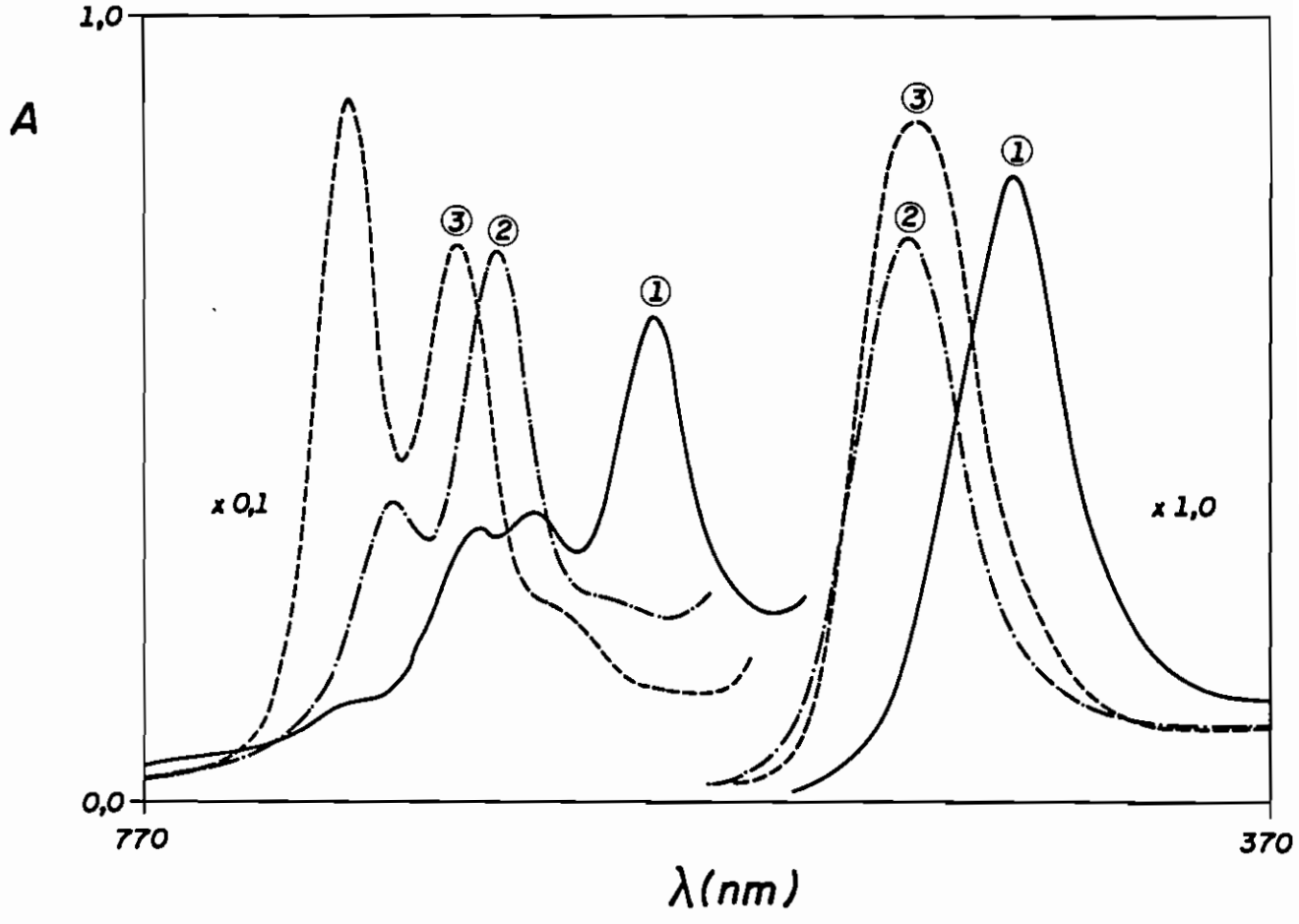


FIGURA III.6 - Espectros de absorção óptica da porfirina H_2TMPyP e das espécies dianiônica ($TMPyP^{2-}$) e dicatiônica (H_4TMPyP^{2+}), medidos em pH > 11 e em pH < 0,5, respectivamente.

(1) TMPyP (2) $TMPyP^{2-}$ (3) H_4TMPyP^{2+}

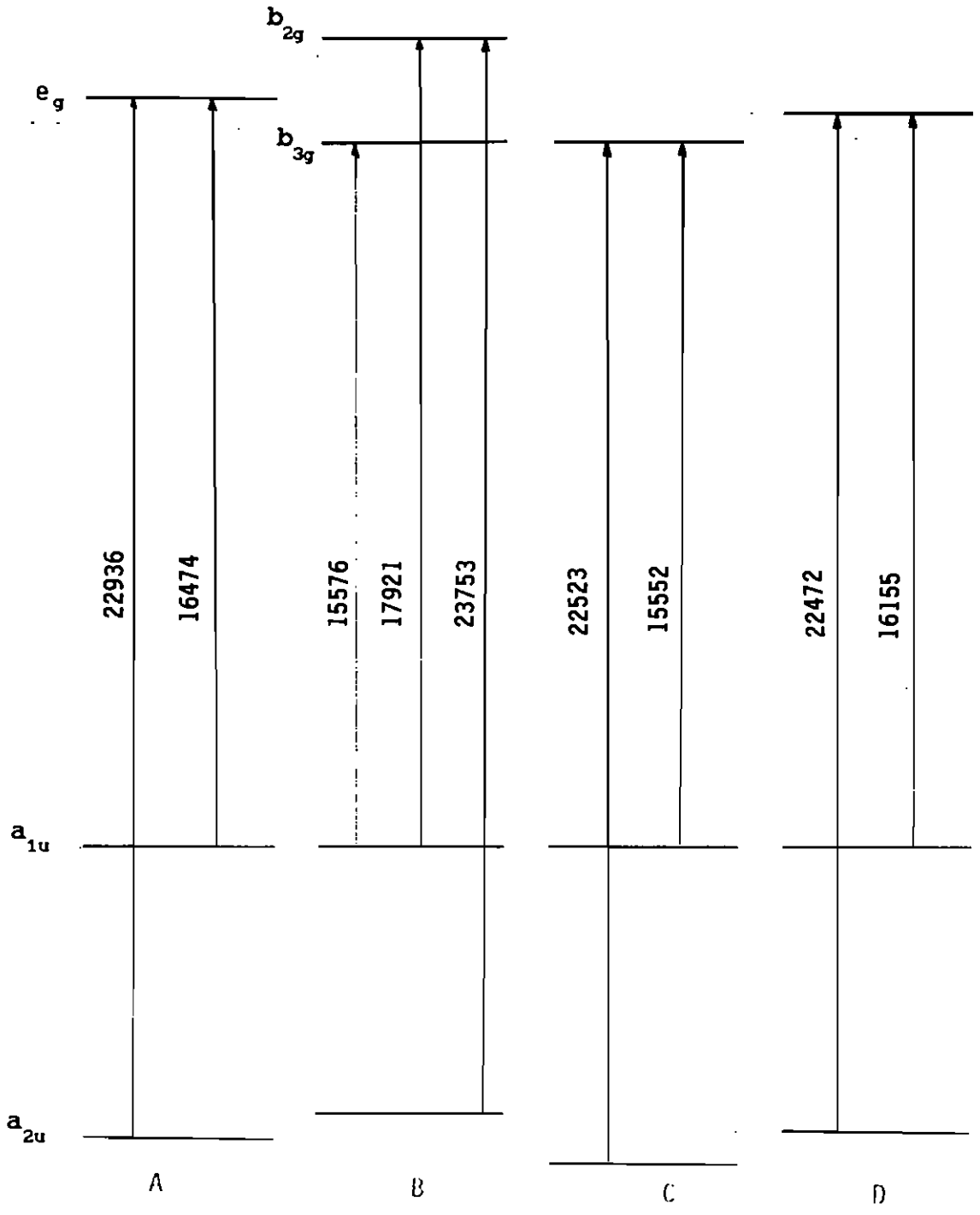


Figura III.7 - Diagrama de níveis de energia da porfirina Zn-TMPyP, da base livre H_2TMPyP e das espécies dianiônica ($TMPyP^{2-}$) e dicatiônica (H_4TMPyP^{2+})
(a) Zn-TMPyP (b) TMPyP (c) H_4TMPyP^{2+} (d) $TMPyP^{2-}$

metaloporfirina. A partir do diagrama da figura III.7, podemos constatar que os dois prótons adicionados estabilizam os orbitais c_1 e c_2 ao nível dos orbitais c inferiores das porfirinas de base livre.

Com relação ao orbital ligante inferior b_1 , a posição do mesmo nas diversas porfirinas também está de acordo com nossa interpretação para o espectro das porfirinas. O levantamento desse orbital de $695cm^{-1}$ na troca ZnTMPyP ⇒ H_2TMPyP e de $592cm^{-1}$ na troca ZnTBzPyP ⇒ H_2TBzPyP é consistente com a suposição de que o Zn ligado por coordenação estabiliza melhor o macrociclo do que os dois prótons isolados.

O EFEITO DOS MESO-SUBSTITUINTES

É sabido da literatura que grupos π-coordenados quando ligados aos carbonos C_m das porfirinas acoplam-se ao sistema de elétrons-π do macrociclo, provocando uma perturbação que pode alterar significativamente as energias dos orbitais das mesmas. Dados experimentais de Edwards et al [52] para soluções de porfirinas em benzeno mostram que para a substituição da zinco-porfina (ZnP) pela porfirina meso-substituida zinco-tetrafenilporfina (ZnTPP), o orbital e_g (c_1,c_2) é abaixado de ≃ $850cm^{-1}$, enquanto o orbital b_1 é levantado de ≃ $560cm^{-1}$. Lembramos ainda uma vez que também neste caso o orbital b_2 não é afetado pelos substituintes.

Comparando os dados espectrais da ZnP com a ZnTMPyP, por exemplo, notamos que a substituição dos prótons pelos grupos metilpiridil nos carbonos C_m provoca um abaixamento dos orbitais c_1 maior que $1300cm^{-1}$ e um levantamento de $b_1$de ≃ $650cm^{-1}$.

Infelizmente esta comparação é prejudicada pelo fato dos dados serem obtidos usando-se solventes diferentes, o que pode alterar significativamente os espectros das porfirinas. De qualquer modo observa-se que pelo menos qualitativamente, tanto o fenil como o metilpiridil provocam o mesmo efeito, ou seja, abaixam a energia dos orbitais superiores (c_1 e c_2) e levantam a

do orbital b_1 e coincidentemente quase na mesma proporção.

A substituição do grupo metilpiridil (nas porfirinas H_2TMPyP e ZnTMPyP) pelo benzilpiridil (nas H_2TBzPyP e ZnTBzPyP) provoca uma alteração nos orbitais c_1, c_2 e b_1 que mantém a tendência de intensificar o efeito causado pelo metilpiridil em relação ao H na posição meso na ZnP. Como se pode observar no diagrama da figura III.5, o segundo anel aromático provoca uma perturbação muito menor que o primeiro sobre o macrociclo da porfirina. Isto pode ser atribuído à blindagem causada pelo grupo piridil e ainda (principalmente) ao carbono alifático que separa os anéis de piridina e benzeno, rompendo o caráter aromático do sistema e minimizando a interação via ressonância entre o anel benzênico e o macrociclo.

III.3 ESPECTROS ELETRÔNICOS DE SOLUÇÕES PORFIRINA/MELANINA

Os espectros de absorção óptica das soluções porfirina/melanina são mostrados nas figuras III.8 a III.11. Em cada figura são mostrados vários espectros de absorção da porfirina em várias concentrações de melanina. Como estamos interessados na possível alteração que a melanina provoca no espectro eletrônico das porfirinas, nos espectros mostrados é subtraída a absorção devida à melanina. Essa subtração é conseguida com o uso de uma mesma concentração de melanina tanto na cela de amostra quanto na de referência.

TABELA III.2 - Posição de bandas (nm) do espectro de absorção óptica de soluções porfirina/melanina. Os números entre parêntesis referem-se à posição das bandas na porfirina pura.

solução	B	Q(0,1)	Q(0,0)	$Q_y(0,1)$	$Q_y(0,0)$	$Q_x(0,1)$	$Q_x(0,0)$
H_2TMPyP/ melanina	436 (421)			528 (519)	565 (556)	595 (585)	654 (642)
H_2TBzPyP/ melanina	439 (424)			530 (520)	570 (558)	595 (586)	658 (644)
ZnPMPyP/ melanina	450 (436)	575 (565)	614 (607)				
ZnTBzPyP/ melanina	458 (441)	576 (566)	615 (609)				

O espectro de absorção óptica da melanina isolada não apresenta nenhum pico de intensidade, mostrando uma densidade óptica monotonicamente do vermelho para o violeta, uma

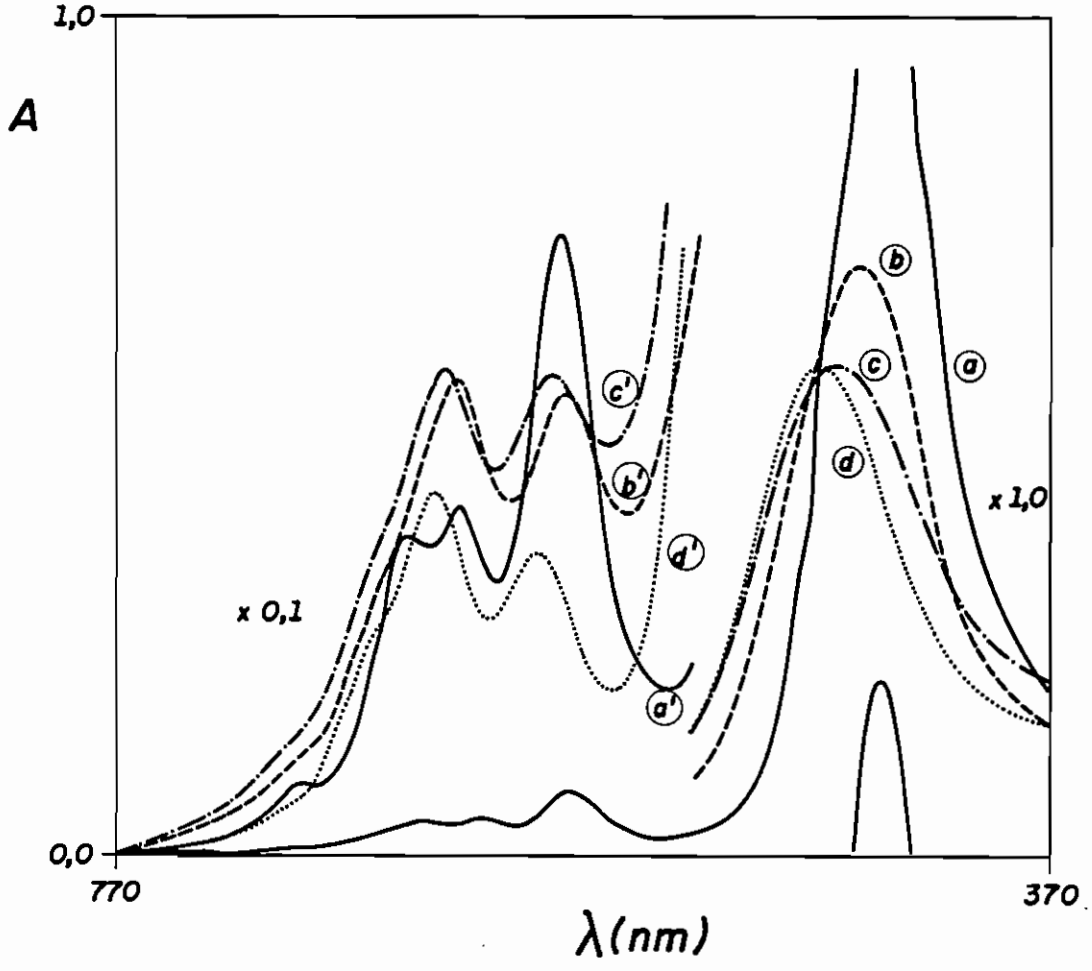


FIGURA III.8 - Espectro de absorção de TMPyP/melanina
[TMPyP] = 8.10^{-6}M (= 10,91 μg/ml)
[melanina] (μg/ml)
(a) 0 (b) 4 (c) 8 (d) 12

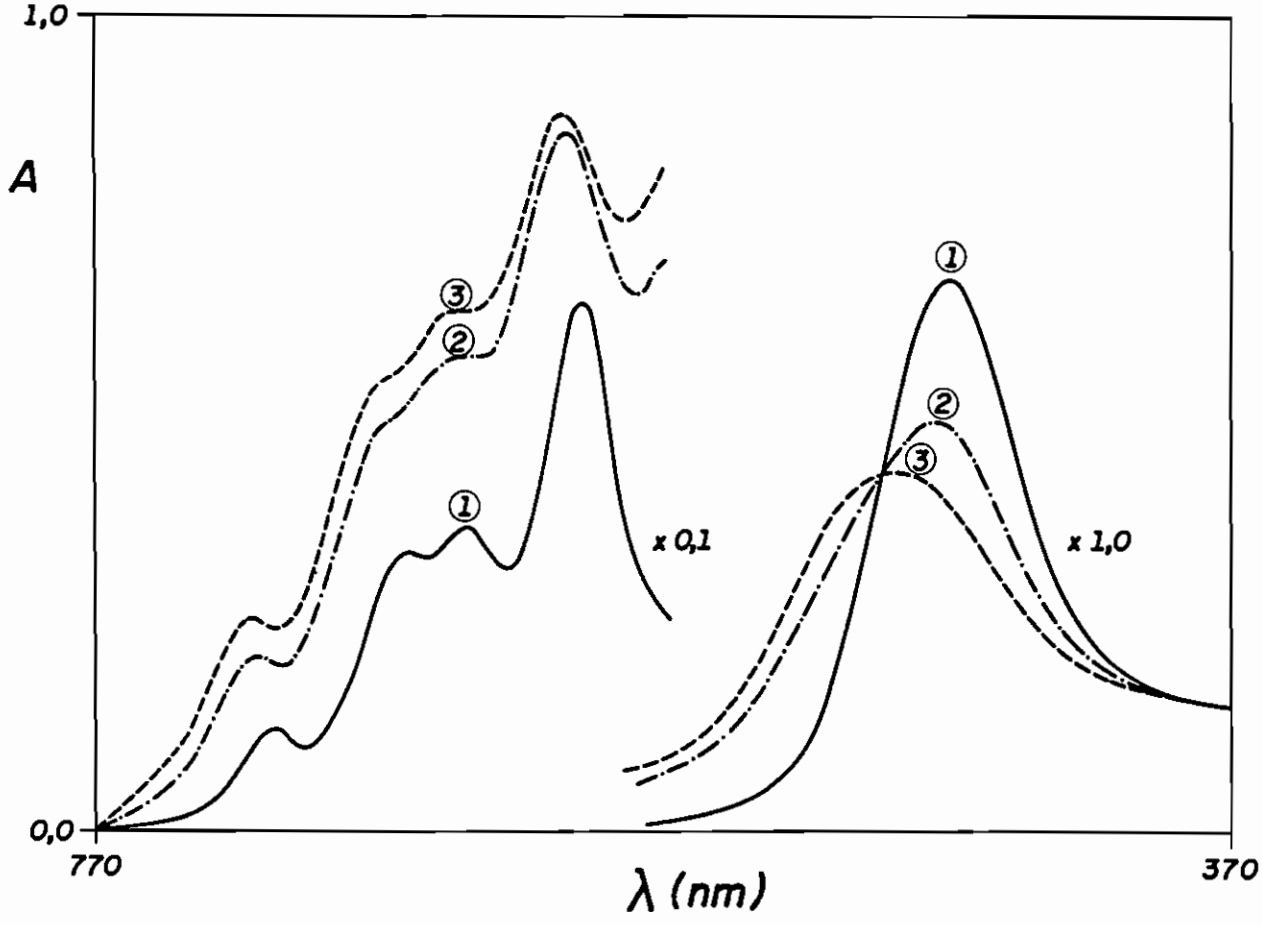


FIGURA III.9 - Espectro de absorção de TBzPyP e TBzPyP/melanina
[TBzPyP] = 5.10^{-6}M (= 5,42 μg/ml)
[melanina] (μg/ml)
(1) 0 (2) 3,3 (3) 10,0

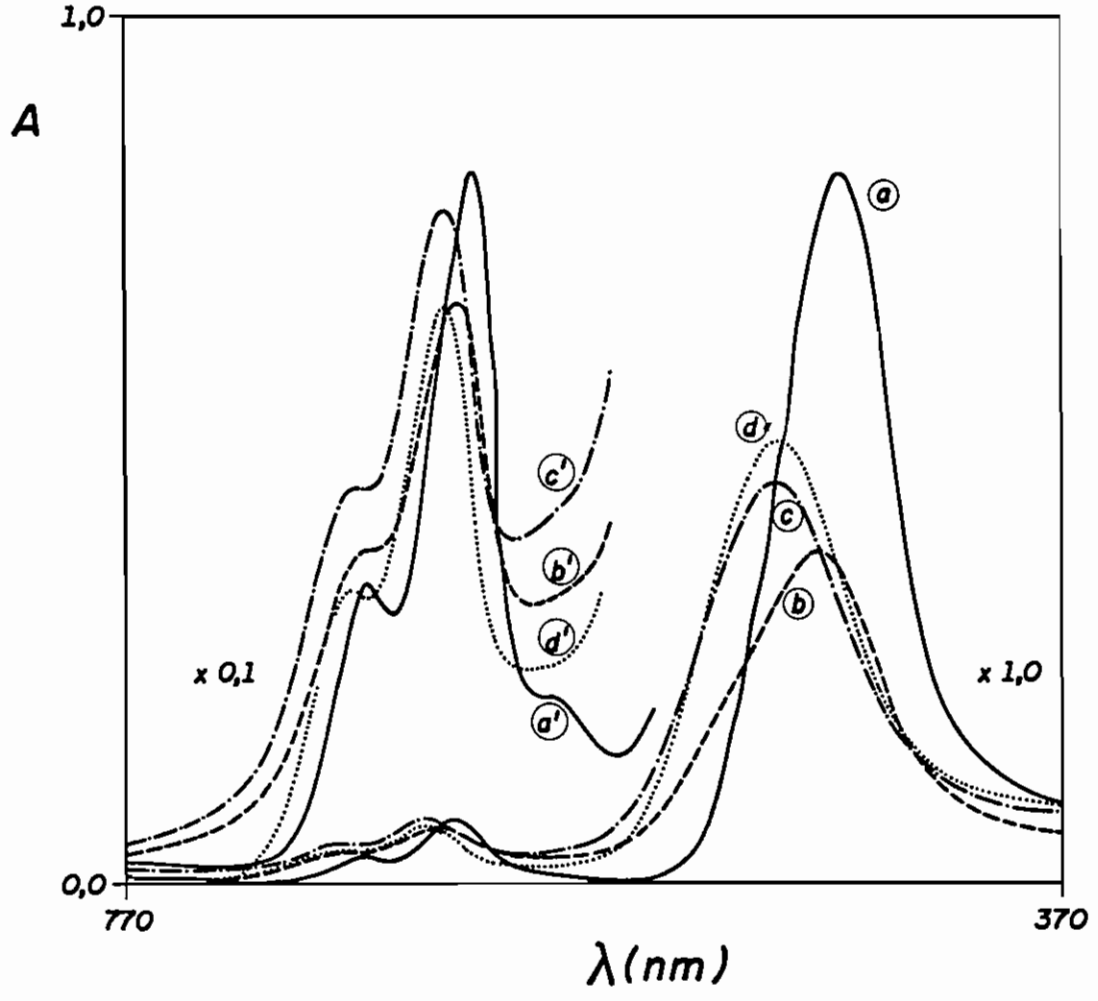


FIGURA III.10 - Espectro de absorção de Zn-TBzPyP/melanina
[Zn-TBzPyP] = 8 μM (= 9,18 μg/ml)
[melanina] (μg/ml)
(a) 0 (b) 4 (c) 8 (d) 12

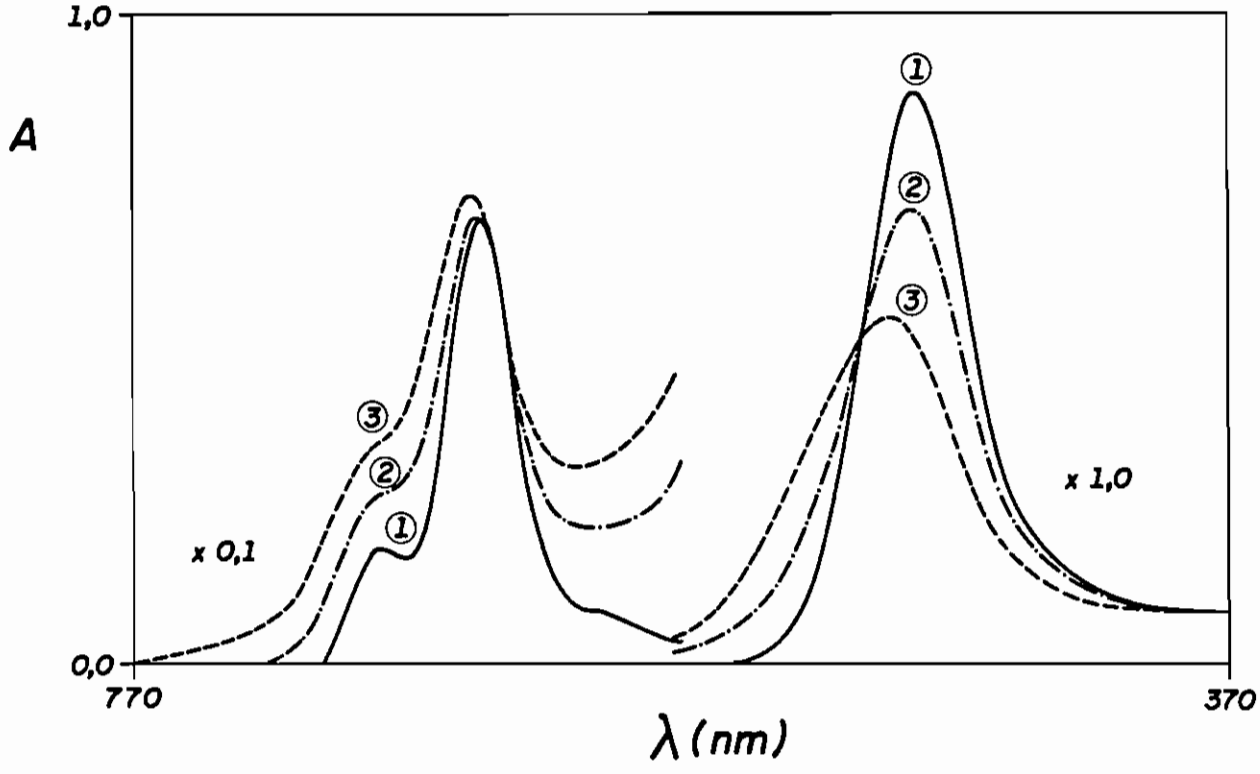


FIGURA III.11 - Espectro de absorção de Zn-TMPyP/melanina
[Zn-TMPyP] = 5 μM (= 5,60 μg/ml)
[melanina] (μg/ml)
(1) 0,0 (2) 3,3 (3) 6,3

característica dos semicondutores amorfos [53].

A hipótese mais provável para a formação do agregado porfirina/menanina é através da interação eletrostática entre o N^+ do grupo piridil e os vários grupos carregados negativamente que estão presentes na melanina. Este complexo formado é relativamente insolúvel em água devido à neutralização parcial das cargas das duas espécies. Se este modelo estiver correto, é de se esperar que a melanina provoque no espectro de absorção das porfirinas, o mesmo tipo de efeito que os grupos fenil, metilpiridil ou benzilpiridil.

Nas figuras III.12 e III.13 são mostrados os diagramas de níveis de energia dos orbitais moleculares de cada uma das porfirinas e respectivos complexos porfirina/melanina, onde se pode observar o efeito da melanina sobre cada um dos orbitais moleculares das porfirinas.

Como podemos observar nestes diagramas, a melanina provoca o abaixamento dos orbitais c_1 e c_2 e o levantamento do orbital b_1, exatamente como no caso dos meso-substituintes aromáticos analisados anteriormente. Isto reforça a idéia de que a formação do complexo se dá principalmente devido à interação eletrostática entre os grupos piridil e os grupos negativamente carregados da melanina. Neste caso, a melanina tem o papel de perturbar a nuvem eletrônica dos elétrons-π do macrociclo, aumentando sua deslocalização.

Por outro lado, deve-se notar que a melanina causa alterações diferenciadas nos orbitais das zinco-porfirinas e das base livres. Enquanto nas base livres a melanina provoca um abaixamento dos orbitais c_1 e c_2 comparável ao levantamento do orbital b_1, nas metaloporfirinas o levantamento de b_1 é comparativamente muito maior que o abaixamento de c_1 e c_2. Uma explicação para este comportamento diferenciado é que nas metaloporfirinas deve haver uma interação adicional com a melanina, possivelmente envolvendo o zinco que se ligaria através de sua quinta coordenação com sítios negativos da melanina.

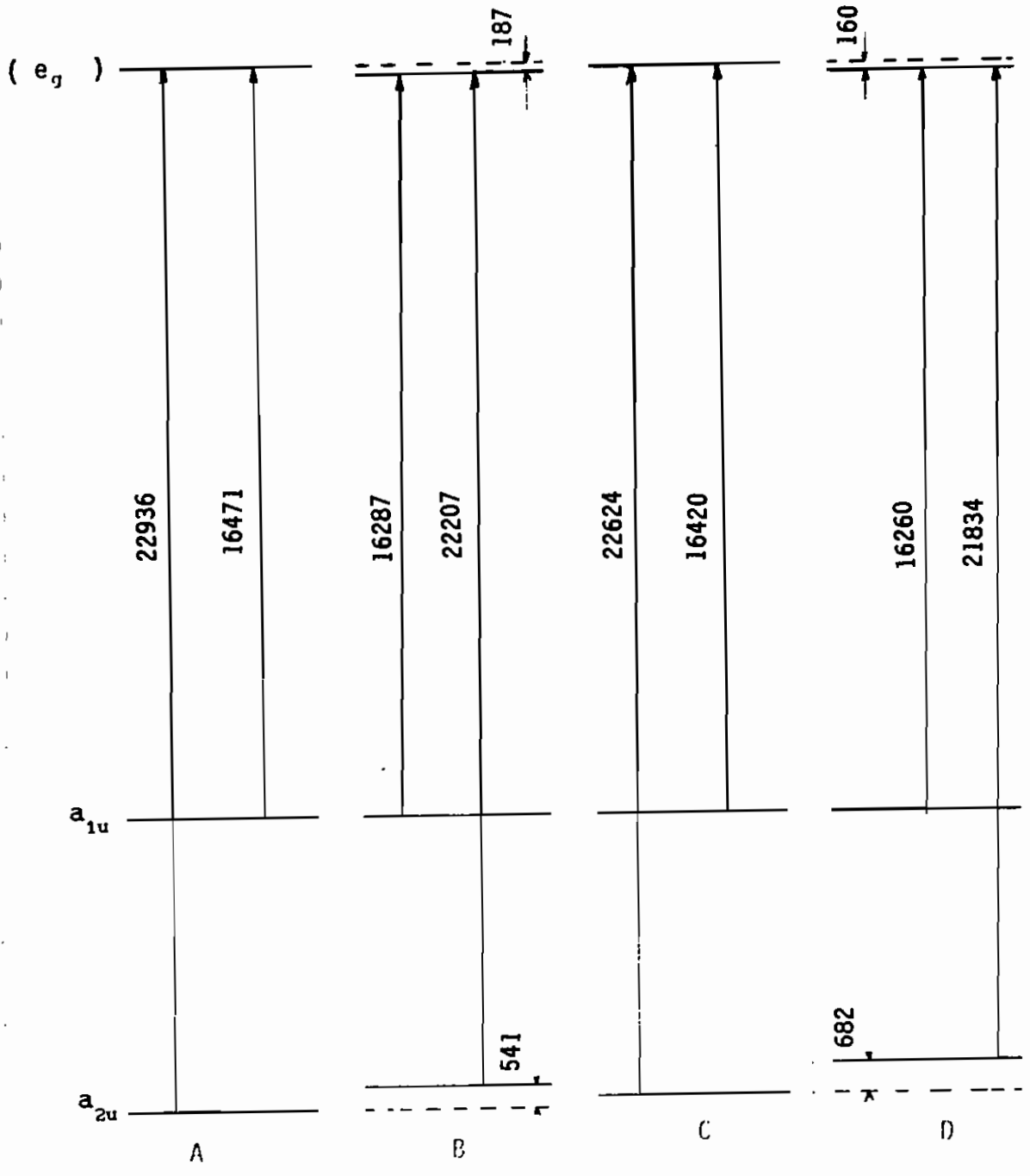


Figura III.12 - Diagrama de níveis de energia dos orbitais moleculares de porfirinas e complexos porfirina/melanina

(a) Zn-TMPyP (b) Zn-TMPyP/melanina

(c) Zn-TBzPyP (d) Zn-TBzPyP/melanina

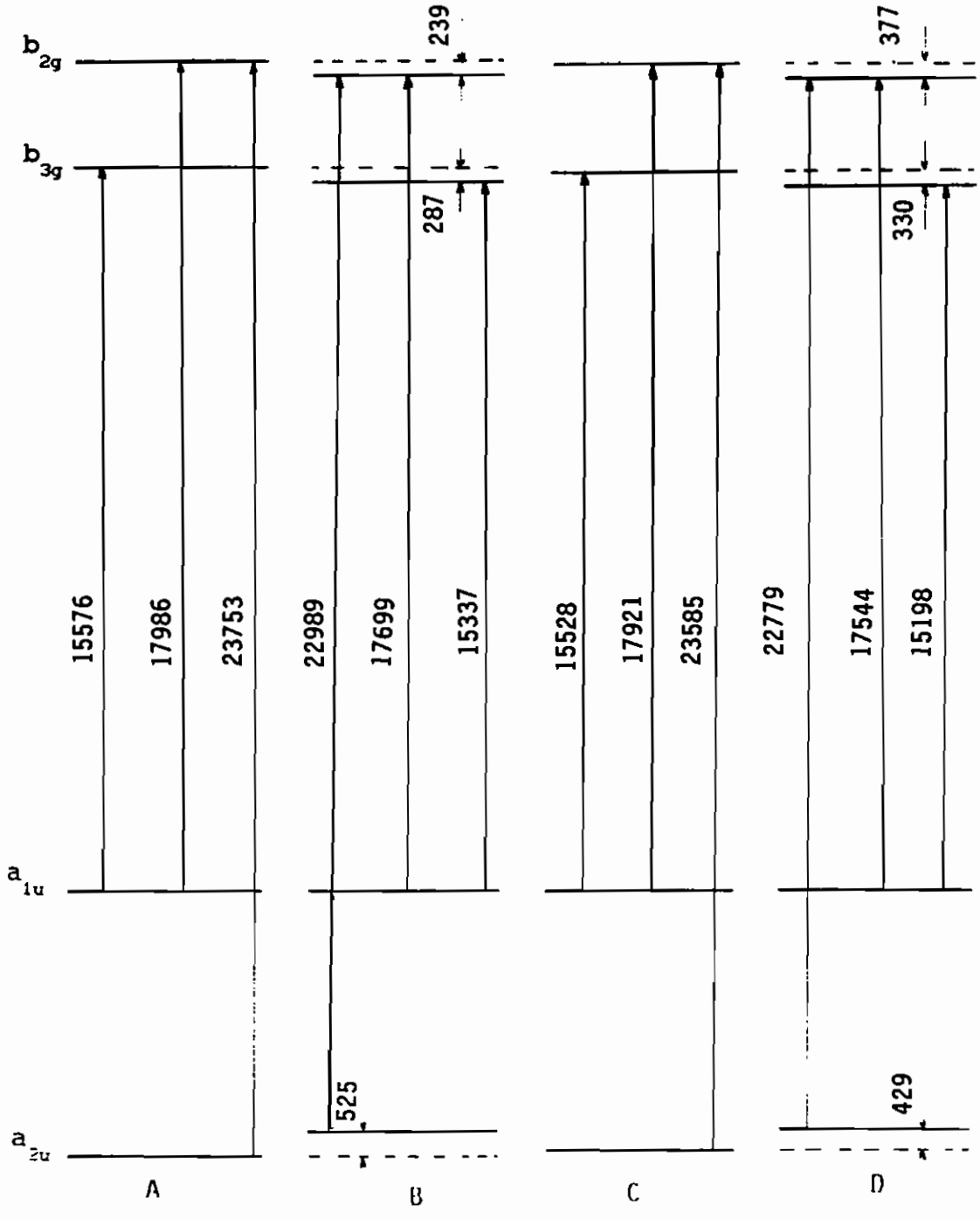


Figura III.13 - Diagrama de níveis de energia de orbitais moleculares de porfirinas e complexos porfirina/melanina

(a) TMPyP (b) TMPyP/melanina

(c) TBzPyP (d) TBzPyP/melanina

IV.- ESPECTROS RAMAN DAS PORFIRINAS

Nesta seção apresentamos os espectros Raman ressonantes das quatro porfirinas em pó, com excitação em vários comprimentos de onda do laser de argônio.

Na figura IV.1 são mostrados os espectros Raman ressonantes da porfirina Zn-TMPyP na região de 500 a 1700 cm^{-1}.Os espectros dessa porfirina na região de 100 a 500 cm^{-1} são mostrados na figura IV.2. As posições das bandas observadas bem como as intensidades relativas para excitação nos vários comprimentos de onda são mostrados na tabela IV.1. As intensidades são tomadas com relação ao estiramento simétrico ν do KNO_3 ($\Delta\nu \cong 1053$ cm^{-1}) em concentração arbitrária, que é assumido não ressonante. Para deslocamentos abaixo de 500 cm^{-1} não foi usado nenhum padrão de referência e as bandas são designadas simplesmente como forte (s), média (m) e fraca (w).

Analogamente, os espectros Raman das outras porfirinas isoladas são mostrados nas figuras a seguir. O espectro da porfirina TMPyP é mostrado nas figuras IV.3 e IV.4. O espectro Raman da porfirina TBzPyP é mostrado nas figuras IV.5 e IV.6, enquanto o da porfirina Zn-TBzPyP é mostrado nas figuras IV.7 e IV.8.

Na tabela IV.2 são mostradas as posições de bandas para os espectros Raman das quatro porfirinas observados com excitação em algum dos comprimentos de onda.

As intensidades de bandas dos espectros Raman das porfirinas TMPyP, TBzPyP e Zn-TBzPyP são analisadas mais adiante , juntamente com os espectros Raman dos complexos porfirina/melanina.

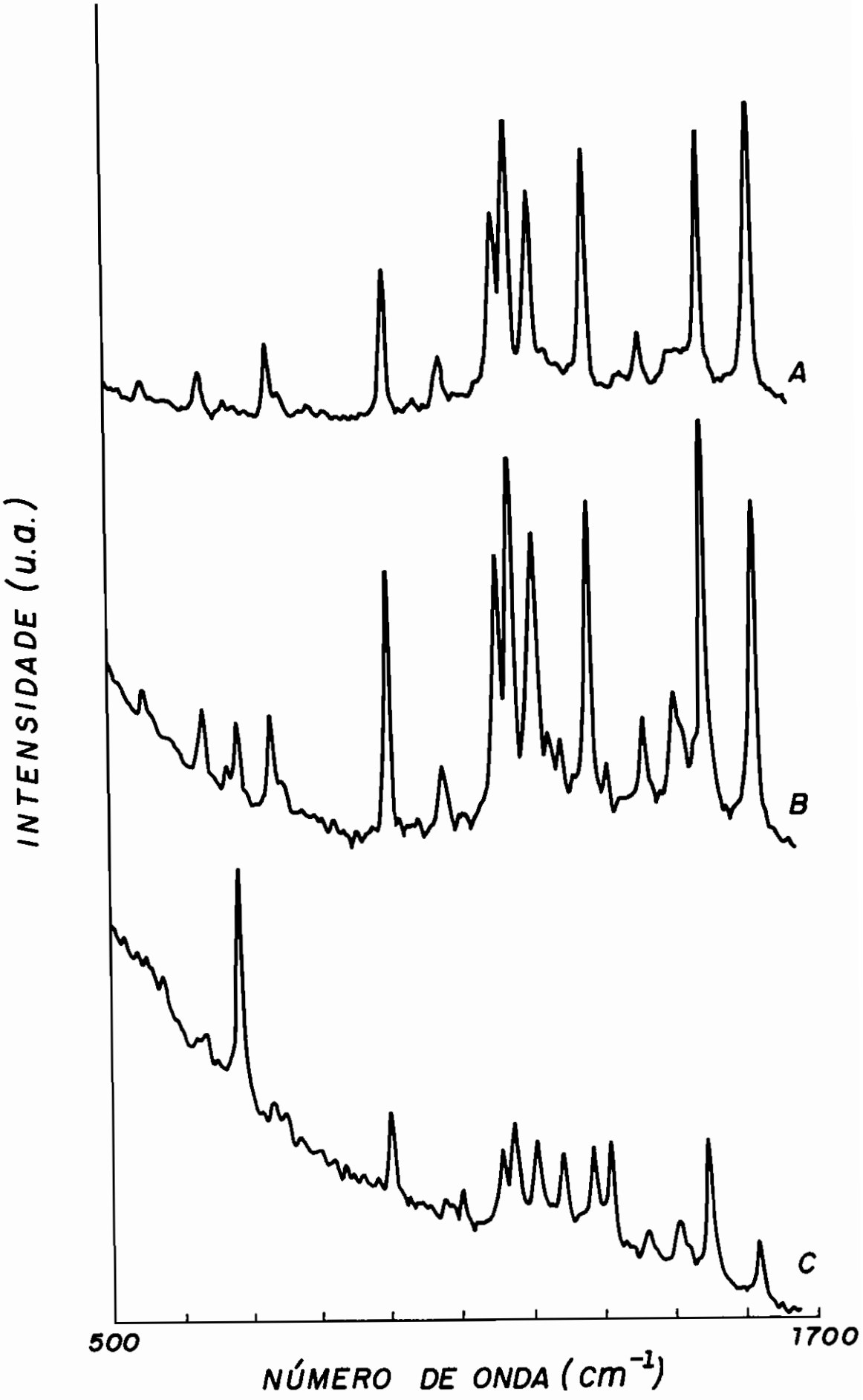


Figura IV.1 - Espectro Raman ressonante da porfirina Zn-TMPyP na região de deslocamentos de 500 a 1700 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda: 457,9 nm (a); 488,0 nm (b) e 514,5 nm (c)

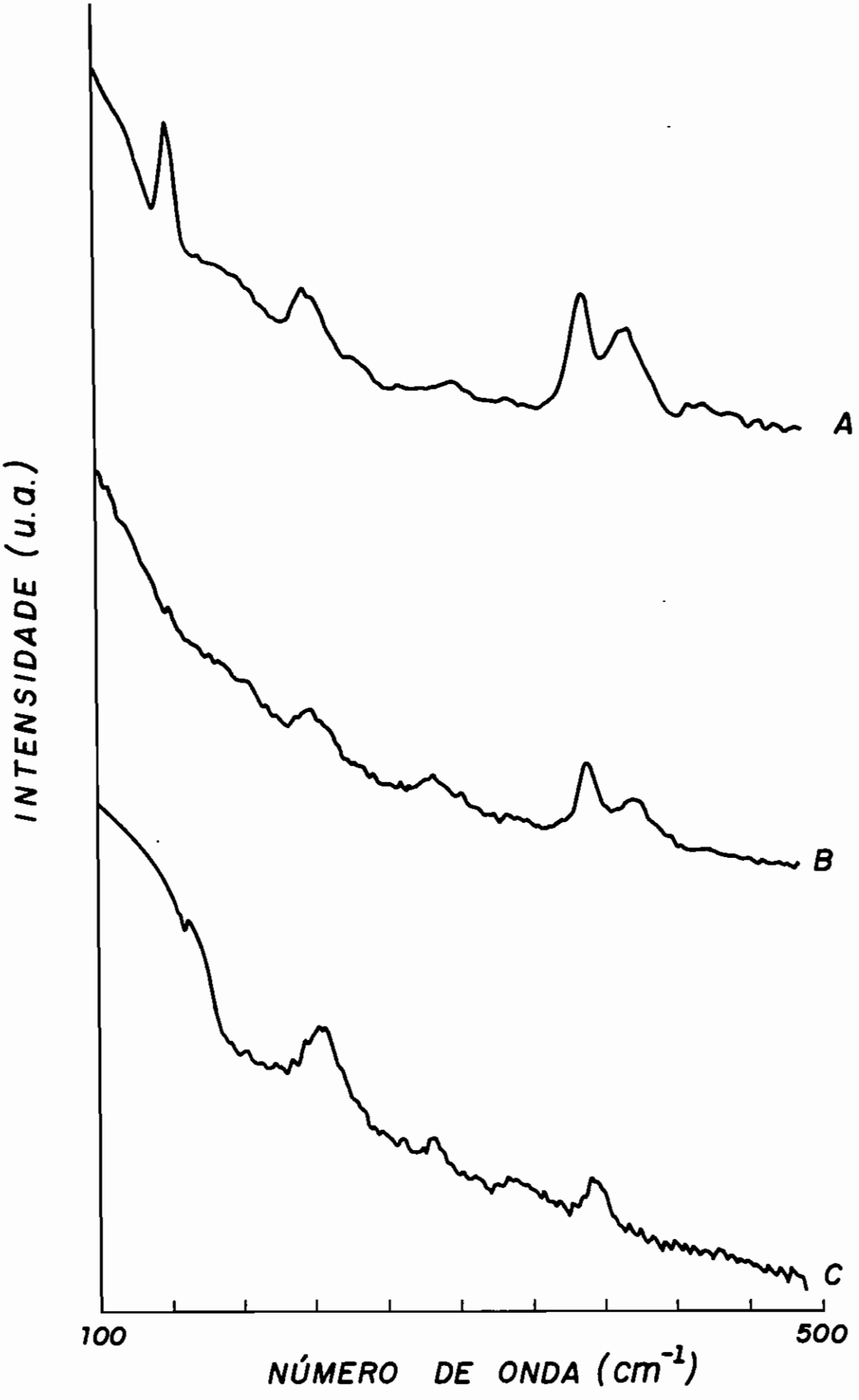


Figura IV.2 - Espectro Raman ressonante da porfirina Zn-TMPyP na região de deslocamentos de 100 a 500 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda de 457,9nm (a); 488,0 (b) e 514,5nm (c)

Tabela IV.1- Intensidade relativa das bandas do espectro Raman porfirina Zn-TMPyP entre 100 e 1700 cm^{-1}

	comprimento de onda de excitação (nm)				
	457,9	476,5	488,0	496,5	514,5
$\Delta\nu(cm^{-1})$	intensidade relativa				
1643	198	160	125	86	73
1555	171	175	152	142	162
1531					
1517					
1502			41	50	58
1449	38	44	31	30	31
1384			17	20	96
1353	160	131	116	92	81
1329					
1300					
1282					
1255	124	115	102	90	95
1215	180	152	135	114	115
1193	120	106	99	85	85
1098	33	23	25	31	26
1052					
1002	100	100	100	100	100
856					
812					
792	58	38	37	32	35
733			28	56	281
716	w	w	w		
669	40	29	25	30	38
615	w	w	w	w	w

568	w	w	w	w	w
446	w				
406	m		m		
381	s		s		m
327					w
305	w				
289			w		w
248	w				
227			w(sh)		s
220			m		
185(a)	w		w		

onde w, m, s e sh são abreviações para banda fraca, média, forte ombro (banda mal resolvida), respectivamente.

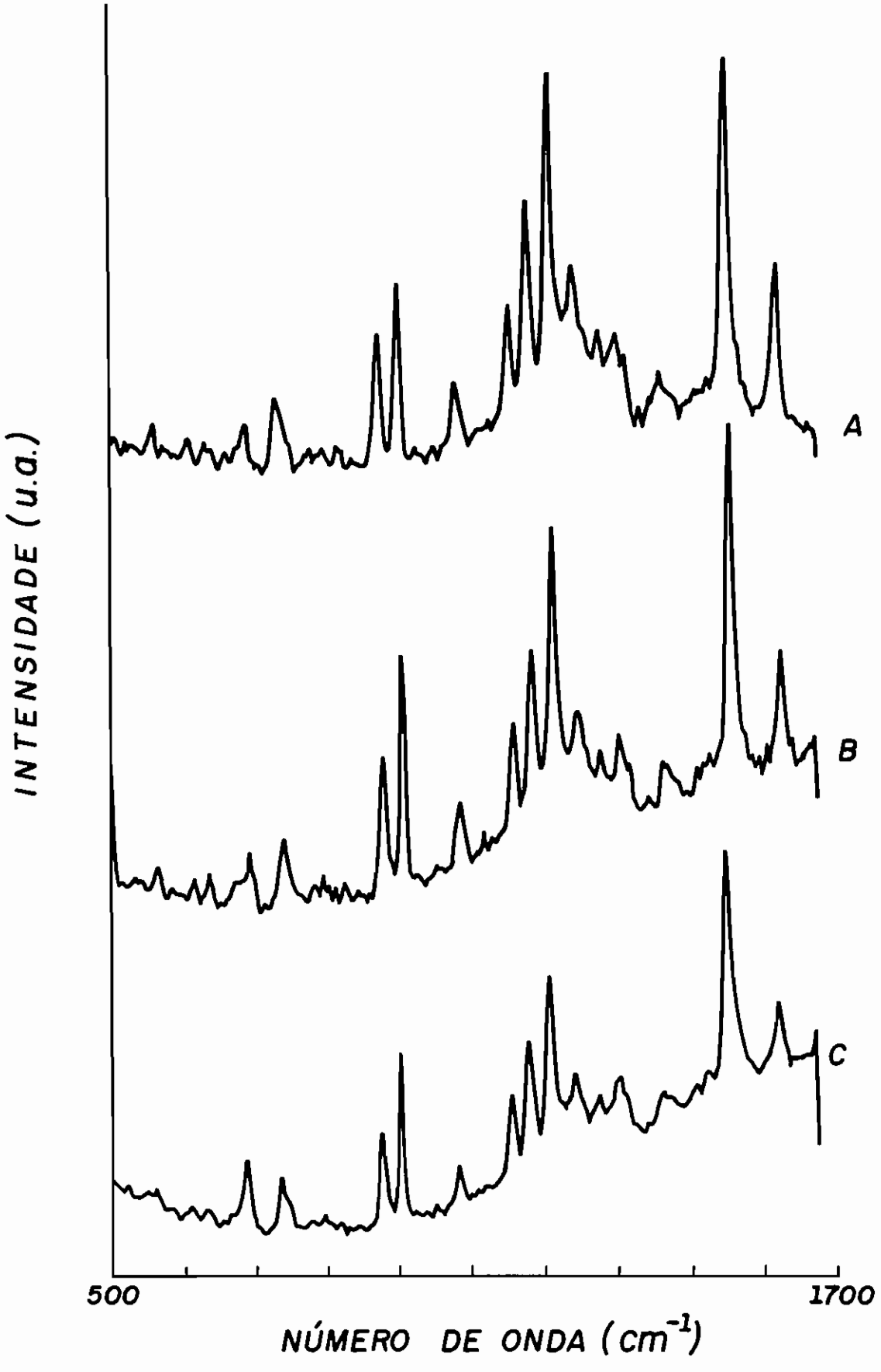


Figura IV.3 - Espectro Raman ressonante da porfirina TMPyP na região de deslocamentos de 500 a 1700 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda de 457,9nm (a); 488nm (b) e 514,5nm (c)

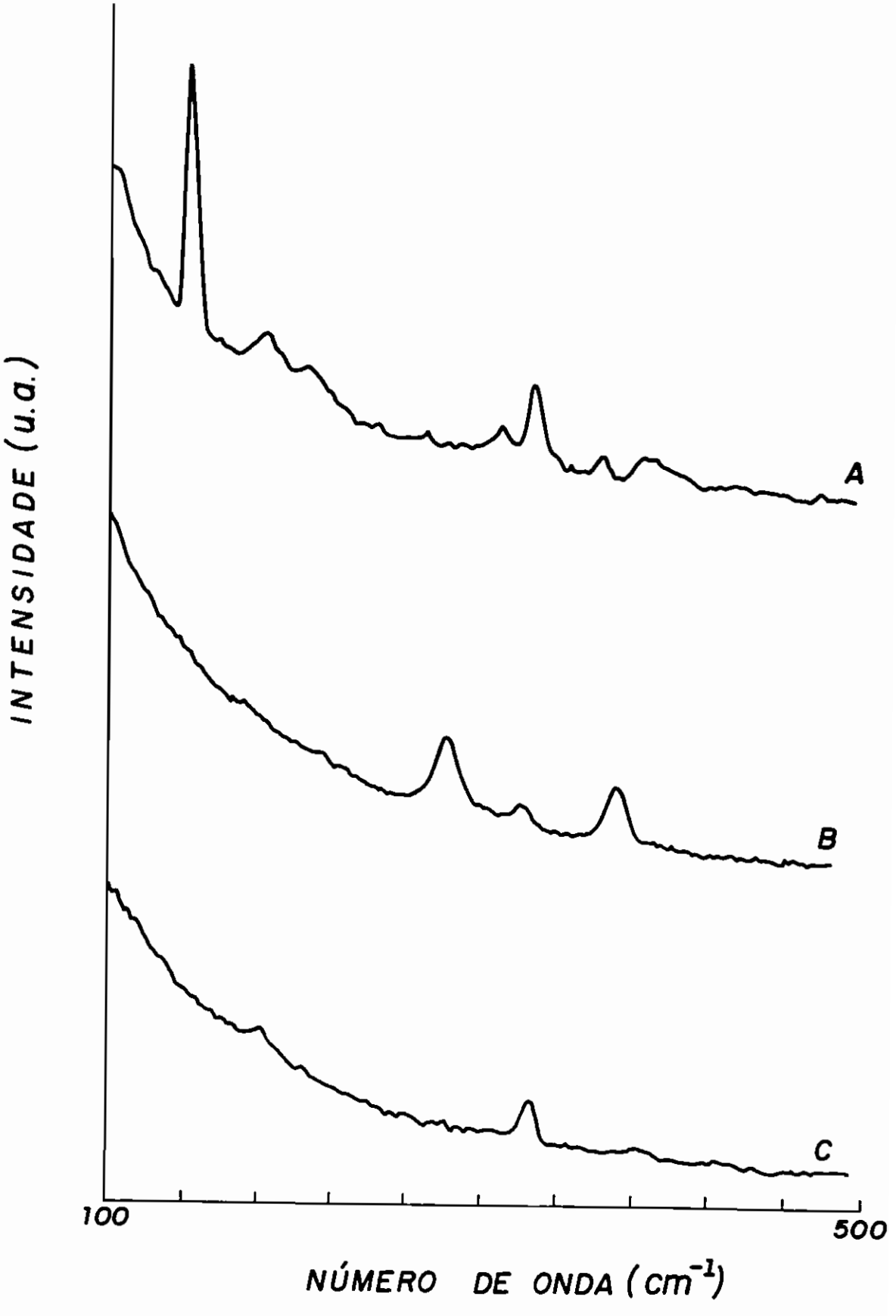


Figura IV.4 - Espectro Raman ressonante da porfirina TMPyP na região de deslocamentos de 100 a 500 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda de 457,9nm (a); 488,0nm (b) e 514,5nm (c)

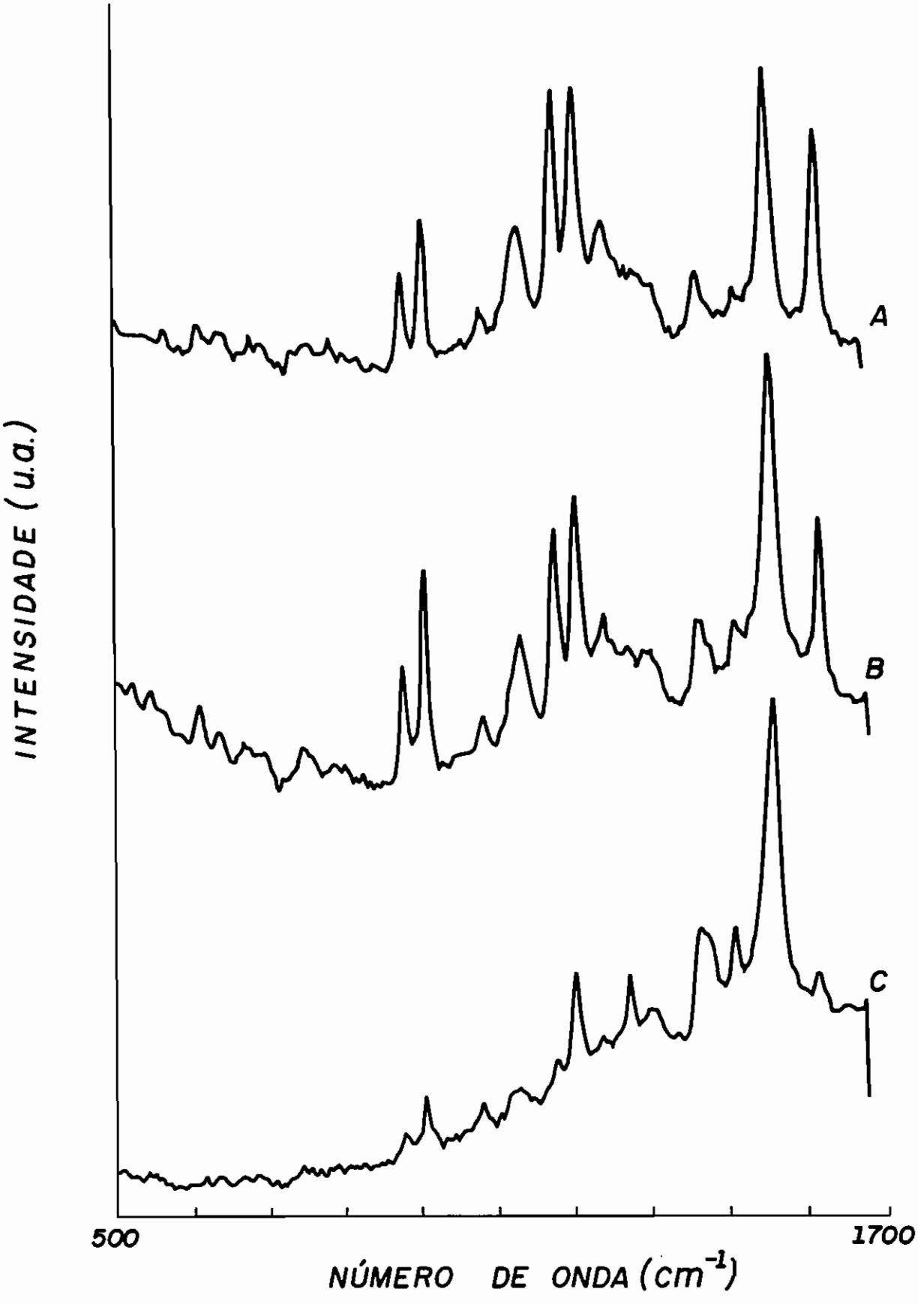


Figura IV.5 - Espectro Raman ressonante da porfirina TBzPyP na região de deslocamentos de 500 a 1700 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda de 457,9nm (a); 488,0nm (b) e 514,5nm (c)

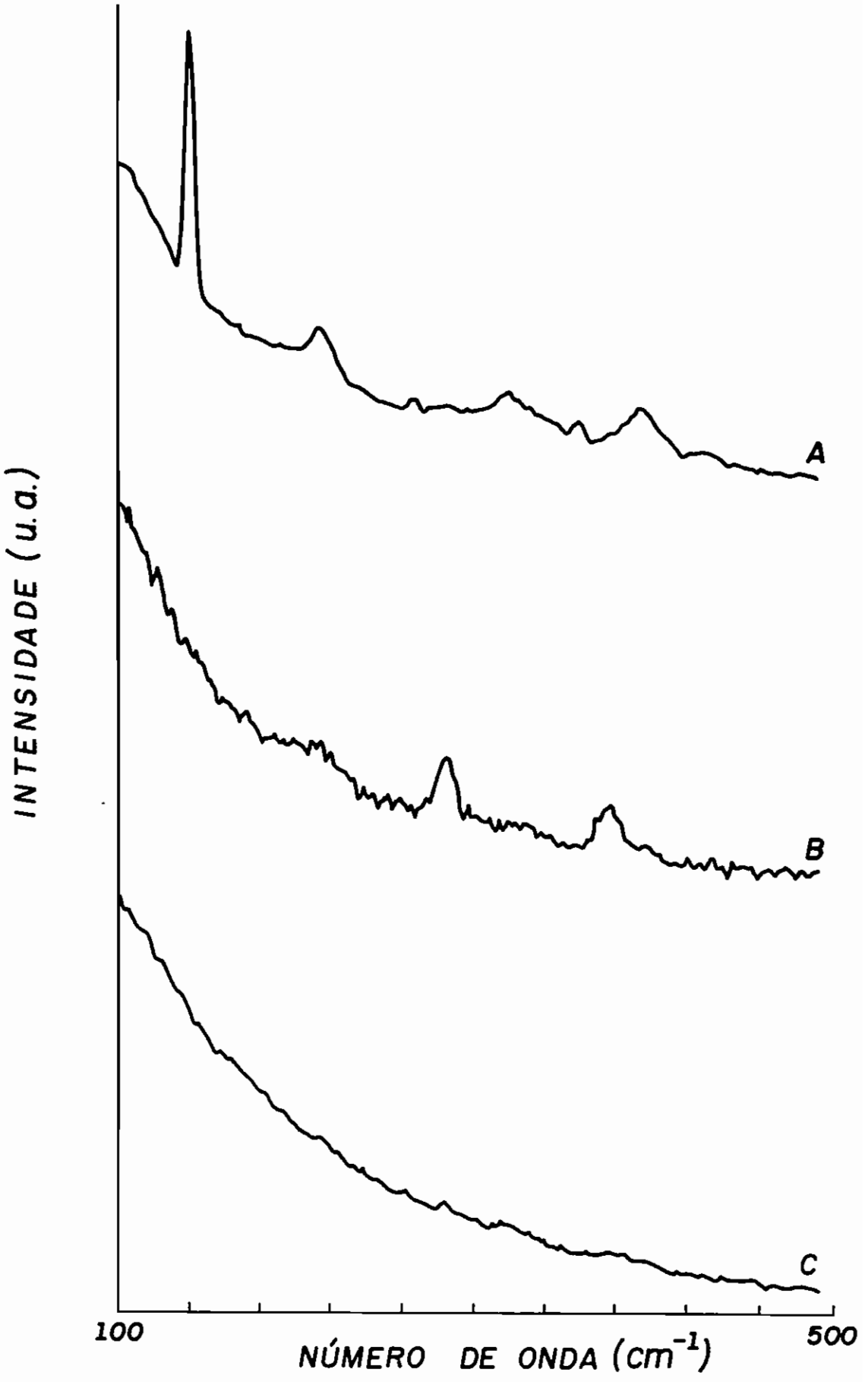


Figura IV.6 - Espectro Raman ressonante da porfirina TBzPyP na região de deslocamentos de 100 a 500 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda de 457,9nm (a); 488,0nm (b) e 514,5nm (c)

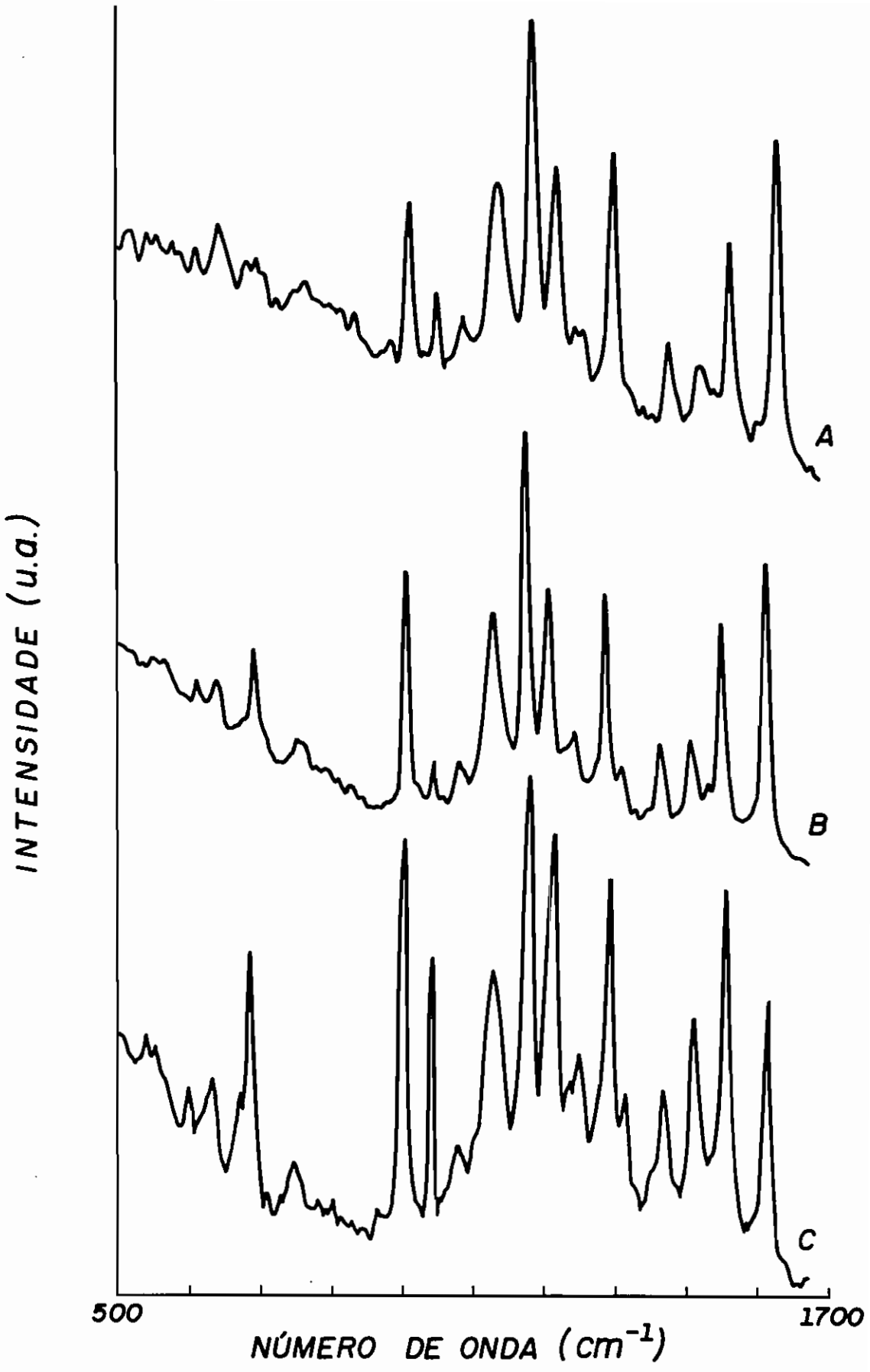


Figura IV.7 - Espectro Raman ressonante da porfirina Zn-TBzPyP na região de deslocamentos de 500 a 1700 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda de 457,9nm (a); 488,0nm(b) e 514,5nm (c)

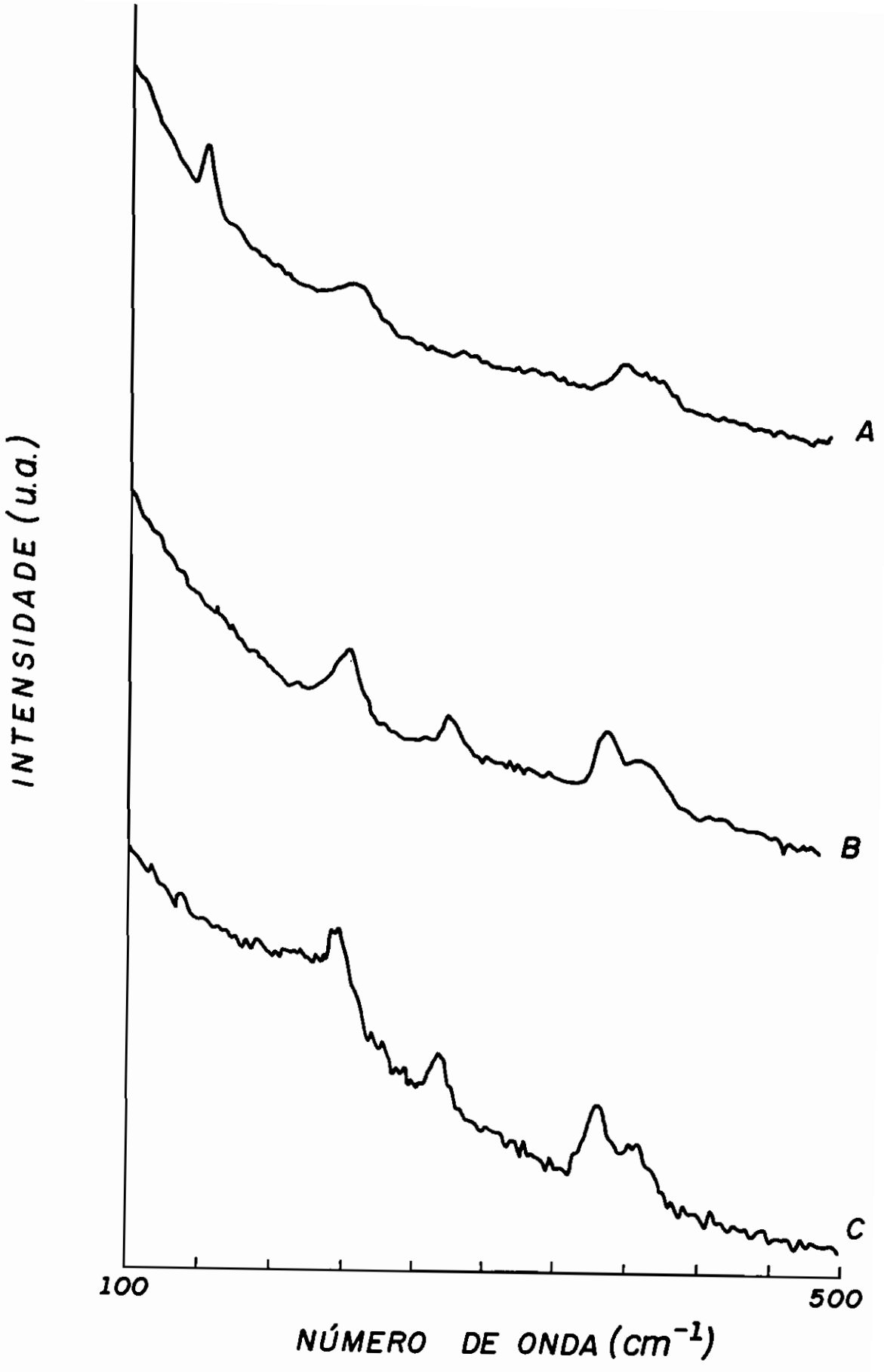


Figura IV.8 - Espectro Raman ressonante da porfirina Zn-TBzPyP na região de deslocamentos de 100 a 500 cm^{-1}, excitado com os comprimentos de onda de 457,9nm (a); 488,0nm (b) e 514,5nm (c)

Tabela IV.2 - Posição das bandas dos espectros Raman das 4 porfirinas, entre 100 e 1700 cm^{-1}

	$\Delta\nu$ (cm^{-1})		
Zn-TMPyP	TMPyP	TBzPyP	Zn-TBzPyP
1643	1645	1638	1638
	1580(sh)		
1555	1556	1558/1567	1558
1531	1523	1529	
1517			
1502	1500	1505	1504
1449	1443/1457	1448/1460	1453
1384	1383	(1384)	1384
	1368	1374	
1353		1357	1355
1329	1336	1336	
	1310		
1300	1296	1296	1301
1282			1285
1255	1255	1250	1256
1215	1219	1215	1216
1193	1190		
		1158	1157
1098	1099	1096	1099
1052	1062	(1058)	1051
1002	1002	1004	1002
	967	969	
866	865	868	(858)
	846	847	
812	808	812	818
792	794	796	808

733	737	736	734
716	720(sh)	720(sh)	715
669	667	667	669
	640	635	632
568	578	579	577
		556	562
445			444
406			404
	391	(396)	386
381	383	386	380
327	332	328	
305	313		
289	288	293	288
248			
227			227
221	224	217	223
	208		
(185)	185		

109

IV.1 - SOBRE O ESPALHAMENTO RAMAN RESSONANTE

O espalhamento Raman ocorre quando um fóton interage com uma molécula levando-a a um estado eletrônico intermediário (virtual), que é uma superposição dos auto-estados de energia da molécula. O processo é completado com a emissão (espalhamento) de um fóton com energia diferente da incidente e o retorno da molécula ao estado fundamental. Supondo que $|m\rangle$ representa o estado vibracional fundamental do estado eletrônico fundamental, $|n\rangle$ representa um estado vibracional excitado do estado eletrônico fundamental e $|e\rangle$ representa um estado eletrônico excitado. O espalhamento Raman envolve duas transições simultâneas: de $|m\rangle$ a $|e\rangle$ e de $|e\rangle$ a $|n\rangle$. O espalhamento Raman oferece portanto, informações sobre a diferença de energia entre os estados vibracionais excitados $|n_i\rangle$ e o estado vibracional fundamental $|m\rangle$, ambos do estado eletrônico fundamental de uma molécula.

A intensidade I_{mn} da radiação espalhada devido à transição $|m\rangle \Rightarrow |n\rangle$ é dada por [29]:

$$I_{mn} = \frac{128\ \pi^5}{9c^4} (\nu_0 \mp \nu_{mn})^4\ I_0 \sum_{\rho\alpha} |(\alpha_{\rho\sigma})_{mn}|^2 \qquad \text{IV.1}$$

onde $\alpha_{\rho\sigma}$ é o tensor de polarizabilidade dado por:

$$(\alpha_{\rho\sigma})_{mn} = \frac{1}{h} \sum_e \frac{\langle n|\mu_\sigma|e\rangle\langle e|\mu_\rho|m\rangle}{\nu_{em} - \nu_0 + i\Gamma e} + \frac{\langle n|\mu_\sigma|e\rangle\langle e|\mu_\rho|m\rangle}{\nu_{en} + \nu_0 + i\Gamma e} \qquad \text{IV.2}$$

onde ν_0 e I_0 são respectivamente, a frequência e a intensidade da luz incidente; ν_{mn} é a frequência do modo vibracional envolvido no espalhamento; $\alpha_{\rho\sigma}$ é a $\rho\alpha$-ésima componente do tensor de polarizabilidade e μ_ρ é a ρ-ésima componente de um operador dipolo.

Quando $\langle e|\mu|m\rangle$ é finito para um estado real $|e\rangle$, a transição de $|m\rangle$ a $|e\rangle$ é acompanhada por absorção de luz centrada na frequência ν_{em} e meia largura $2\Gamma e$, sendo sua intensidade máxima proporcional a $|\langle e|\mu|m\rangle|^2$. Se a energia do fóton de excitação Raman ($h\nu_o$) é próxima da energia da transição eletrônica ($h\nu_{em}$), o primeiro termo $\alpha_{\rho\sigma}$ será intensificado e teremos o chamado espalhamento Raman ressonante. Apenas os modos de vibração

envolvidos no cromóforo da banda de absorção são intensificados via espalhamento Raman ressonante [54].

Supondo que a função de onda de uma molécula possa ser separada em suas partes vibracional e eletrônica (aproximação de Born - Openheimer [55,56]), podemos representá-las por $|m\rangle = |g\rangle.|i\rangle$; $|n\rangle = |g\rangle.|j\rangle$ e $|e\rangle = |r\rangle.|v\rangle$, onde $|g\rangle$ e $|r\rangle$ são funções de onda puramente eletrônicas e $|i\rangle$, $|j\rangle$ e $|v\rangle$ são puramente vibracionais. Nessa aproximação é postulado que as funções de onda vibracionais nos estados eletrônicos fundamental e excitado têm a mesma forma exceto pela origem das coordenadas (a estrutura de equilíbrio) que difere nos dois estados. Os principais termos que contribuem para o tensor de polarizabilidade na condição de ressonância com um dado estado eletrônico, $|r\rangle$, podem ser agrupados em dois:

$$(\alpha_{\rho\sigma})^{r}_{ij} = (A_{\rho\sigma})^{r}_{ij} + (B_{\rho\sigma})^{r}_{ij} \qquad \text{IV.3}$$

$$(A_{\rho\sigma})^{r}_{ij} = \frac{M_{\sigma}^{gr}\, M_{\rho}^{gr}}{h} \sum_{v} \frac{\langle j|v\rangle\langle v|i\rangle}{\nu_{rg} + (v-i)\Delta\nu_{a} - \nu_{o} + i\Gamma r} \qquad \text{IV.4}$$

$$(B_{\rho\sigma})^{r}_{ij} = \frac{M_{\sigma}^{gr}\, h_{a}^{rs}\, M_{\rho}^{sg}}{h^{2}\,(\nu_{r} - \nu_{s})} \sum_{v} \frac{\langle j|Q_{a}|v\rangle\langle v|i\rangle}{\nu_{rg} + (v-1)\Delta\nu_{a} - \nu_{o} + i\Gamma r} +$$

$$+ \frac{M_{\sigma}^{gs}\, h_{a}^{sr}\, M_{\rho}^{rg}}{h^{2}(\nu_{r} - \nu_{s})} \sum_{v} \frac{\langle j|v\rangle\langle v|Q_{a}|i\rangle}{\nu_{rg} + (v-i)\Delta\nu_{a} - \nu_{o} + i\Gamma r} \qquad \text{IV.5}$$

onde $M_{\sigma}^{gr} = \langle \overset{\circ}{g}\, |\mu_{\sigma}| \overset{\circ}{r} \rangle$

$h\nu_{rg}$ = energia de separação entre $|r\rangle$ e $|g\rangle$

$\Delta\nu_{a}$ = frequência da coordenada normal Q_{a}

$h_{a} = \frac{\partial H}{\partial Q_{a}}$ = operador de acoplamento vibrônico para o modo normal Q_{a}

O termo A contém o fator de Franck-Condon, $\langle j|v\rangle\langle v|i\rangle$ que depende do deslocamento da origem. Para modos de vibração não totalmente simétricos, o deslocamento da origem sob excitação eletrônica é nulo. Portanto, o termo A somente dá origem a vibrações totalmente simétricas. Quando os deslocamentos nucleares envolvidos num dado modo vibracional ocorrem ao longo da deformação molecular produzida pela excitação eletrônica, tal vibração ganha forte intensificação Raman através do termo A. Por outro lado, o termo B é importante para modos de vibração não totalmente simétricos. Quando uma dada vibração ajuda a misturar dois estados eletrônicos, $|r\rangle$ e $|s\rangle$, o termo B também é importante. Um tratamento teórico para a intensificação Raman nas porfirinas foi desenvolvido por Shelnut et al [31-34]. Nas metalo-porfirinas que têm simetria D_{4h}, os orbitais moleculares superiores ocupados (HOMO) pertecem às espécies a_{2u} e a_{1u}, enquanto o orbital molecular inferior desocupado (LUMO) pertence à espécie e_g [51]. As principais transições eletrônicas que dão origem às bandas B_o(Soret) e Q_o têm simetria E_u. Desde que os dipolos de transição das bandas Q_o e B_o estão no plano da porfirina, as vibrações que dão origem a valores finitos de $\langle B_o|h_a|Q_o\rangle$ nos termos B são restritos aos modos no plano, com simetrias A_{1g}, A_{2g}, B_{1g} e B_{2g}. Então, os modos de vibração pertencentes a quaisquer dessas espécies de simetria devem ser intensificados via ressonância sob excitação Raman na região das bandas B e Q.

A teoria de grupo prevê que dos modos de vibração no plano, apenas aqueles pertencentes às espécies de simetria A_{1g}, B_{1g} e B_{2g} são ativos no Raman normal (não ressonante). No entanto, em virtude da ressonância com as bandas de absorção Q e B é previsto que os modos da espécie A_{2g} ganhem intensidade [33]. Os modos das espécies A_{2g}, B_{1g} e B_{2g} são intensificados principalmente por excitação na banda Q, enquanto os da espécie A_{1g} são intensificados por excitação na região da banda B. Os modos da espécie A_{1g} são polarizados, os modos A_{2g} são anomalamente polarizados enquanto os modos B_{1g} e B_{2g} são despolarizados.

IV.2 - INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN DAS PORFIRINAS

ESTRUTURA E MODOS DE VIBRAÇÃO DAS PORFIRINAS

Na discussão dos espectros Raman das porfirinas mostrados neste trabalho, partimos do modelo desenvolvido por Kitagawa et al [34] numa série de artigos com várias níquel-porfirinas. Kitagawa adota um modelo planar de simetria D_{4h}, com os grupos laterais considerados como massas puntuais. Este modelo pode ser estendido a porfirinas meso-substituídas e a porfirinas com substituição nos anéis pirrólicos, se forem adotadas massas puntuais generalizadas para substituintes nas posições $C_m(X)$ ou $C_\beta(Y)$. Quando os grupos laterais são poliatômicos, como é o caso das porfirinas aqui estudadas, há que se considerar os modos de vibração associados a esses grupos. O esquema para esta configuração é mostrado na figura IV.9.

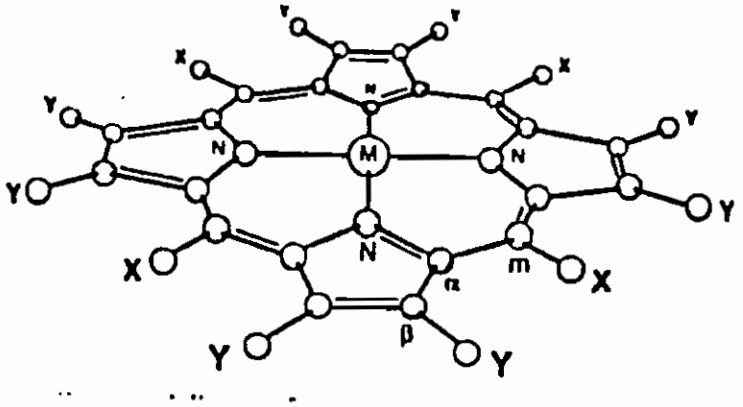


Figura IV.9 - Diagrama estrutural de uma metaloporfirina com substituintes periféricos genéricos x e y [38]

No estudo do espectro vibracional das porfirinas é conveniente separar os modos de vibração em dois grupos: os modos de vibração no plano do macrociclo e os modos fora do plano (OOP). Como os momentos de dipolo de transições eletrônicas associados aos elétrons-π das porfirinas estão no plano do macrociclo, para

uma porfirina de estrutura planar não distorcida apenas os modos de vibração no plano são intensificados no espalhamento Raman ressonante. Os modos de vibração OOP, quando aparecem, são atribuídos a um abaixamento da simetria da molécula, principalmente à deformações da estrutura planar, como veremos adiante.

No caso de uma porfirina de simetria D_{4h} , considerando-se os grupos laterais como massas puntuais, tem-se 37 átomos e 71 (2n-3) graus de liberdade para movimentos no plano. Esses graus de liberdade dão origem a 71 modos mormais de vibração que, de acordo com a teoria de grupos, são classificados como:

$$\Gamma_{no\ plano} = 9A_{1g} + 9B_{1g} + 8A_{2g} + 9B_{2g} + 18E_u \qquad (IV.6)$$

Como a simetria D_{4h} apresenta centro de inversão, os modos de vibração ativos no Raman são inativos no infravermelho e vice-versa. Assim, as porfirinas apresentam 18 modos de vibração fundamentais E_u ativos no infravermelho e 35 modos ativos no Raman. Os 18 modos ativos no infravermelho vem da simetria E_u e são duplamente degenerados. Com isso os 71 graus de liberdade no plano dão origem a 53 frequências fundamentais.

A maneira convencional de se analisar os modos normais de vibração de um sistema molecular é usar suas coordenadas internas como base, ou seja, considerar os estiramentos e deformações angulares. No entanto, no caso especifico das porfirinas, é ilustrativo considerar-se as coordenadas locais de cada anel pirrólico [38]. Para o tratamento das coordenadas locais , às vibrações do anel pirrólico são acrescentados os modos de vibração C_β-Y , C_α-C_m e C_m-X. A conveniência de se usar as coordenadas locais do anel pirrólico é salientada por Li et al [57].

Devido à sua estrutura geométrica, os modos de vibração de uma porfirina são bastante deslocalizados, fazendo com que um modo onde predomina a variação de determinada coordenada interna seja bastante dependente das coordenadas adjacentes e mesmo não adjacentes. Assim, por exemplo, na porfirina NiOEP o modo mais localizado é atribuído ao estiramento $\nu(C_\beta-C_\beta)$, com apenas 45% de

distribuição de energia potencial (PED), sendo o restante atribuído aos modos $\nu(C_\alpha-C_\beta)$, $\nu(C_\alpha-C_m)$, $\delta(C_\alpha C_\beta C_\beta)$ e outros com menor potencial [37].

Devido à essa deslocalização, a frequência correspondente à determinada variação de coordenada local de um anel pirrólico é dependente da relação de fase com que essa coordenada varia nos outros anéis do macrociclo. A partir da relação de fase com que as variações de coordenadas ocorrem em cada anel pirrólico e da simetria interna dessas variações chega-se ao mesmo conjunto de modos de vibração dado pela equação IV.6.

O anel pirrólico apresenta uma simetria local C_2 , com um eixo de simetria C_2 que passa pelo átomo de nitrogênio e pelo ponto médio da ligação $C_\beta-C_\beta$. Cada modo de vibração é classificado de simétrico ou assimétrico em relação ao eixo de simetria C_2 ou ainda com relação ao eixo C_2' (que passa pela bissetriz do ângulo $C_\alpha-C_m-C_\alpha$).

Deste modo, no sistema de coordenadas locais temos os seguintes modos de vibração:

- um estiramento $C_\beta-C_\beta$,
- um estiramento correspondente a um quarto de anel em que as ligações $C_\alpha-C_\beta$ e $C_\alpha-N$ se alongam em oposição de fase,
- dois estiramentos $C_\beta-Y$ simétrico e assimétrico (com relação ao eixo C_2'),
- dois estiramentos de meio anel ,paralelo ao eixo C_2' (simétrico) ao eixo que passa por C_α e pelo ponto médio da ligação $C_\alpha--C_\beta$,
- duas deformações do anel (simétrica e assimétrica),
- um modo de respiração do anel em que todas as ligações se expandem ao mesmo tempo,
- duas deformações $C_\beta-Y$ (simétrica e assimétrica),
- dois estiramentos $C_\alpha-C_m$ (simétrico e assimétrico com relação ao eixo C''_2),
- um estiramento C_m-X (simétrico com relação a C''_2),
- um estiramento N-M, onde M pode ser um metal ou hidrogênio (na base livre),
- uma deformação C_m-X (assimétrica),
- uma translação tangencial do anel pirrólico e
- uma rotação do anel pirrólico.

Os modos de vibração nas coordenadas locais são apresentados esquematicamente na Fig.IV.10 A seguir, é feita a transposição da simetria local do anel pirrólico para a simetria D_{4h} do macrociclo.

MODOS DE VIBRAÇÃO DE ESPÉCIES A_{1g} E B_{1g}

Quando considerados na porfirina, os modos de vibração simétricos com relação ao eixo C_2 do anel pirrólico são classificados nas espécies de simetria A_{1g} e B_{1g}. Os modos de espécie A_{1g} são representados por vibrações de todos os anéis pirrólicos em fase, enquanto que nos modos de espécie B_{1g} os anéis adjacentes vibram em oposição de fase. A partir da fig.IV.10, podemos classificar sete pares de modos de vibração que são praticamente equivalentes em termos das coordenadas locais do pirrol.

Esses pares são os seguintes: $\nu(C_\beta-C_\beta)(\nu_2,\nu_{11})$; ν(meio anel)$_s(\nu_4,\nu_{12})$; $\nu(C_\beta-Y)_s(\nu_5,\nu_{14})$; ν(respiração do anel)(ν_6,ν_{15}); δ(deformação anel)$_s(\nu_7,\nu_{16})$; $\nu(N-M)(\nu_8,\nu_{18})$ e $\delta(C_\beta-Y)_s(\nu_9,\nu_{17})$. As diferenças de frequência para esses pares de vibrações nas duas espécies de simetria é dada pelo maior ou menor acoplamento com o carbono C_m ou os grupos ligados a ele.

Os modos de vibração envolvendo diretamente os carbonos C_m são classificados como A_{1g}, B_{2g} quando o deslocamento do carbono C_m é simétrico com relação ao eixo C_2' e classificado como B_{1g}, A_{2g} quando o deslocamento de C_m é assimétrico em relação a C_2'. Assim, os modos da espécie A_{1g} são completados com os pares $\nu(C_m-X)_s(\nu_1,\nu_{27}(B_{2g}))$ e $\nu(C_\alpha-C_m)_s(\nu_3,\nu_{28}(B_{2g}))$ enquanto os modos da espécie B_{1g} são completados com os pares $\nu(C_\alpha-C_m)_{as}(\nu_{10},\nu_{19}(A_{2g}))$ e $\delta(C_m-X)(\nu_{13},\nu_{21}(A_{2g}))$.

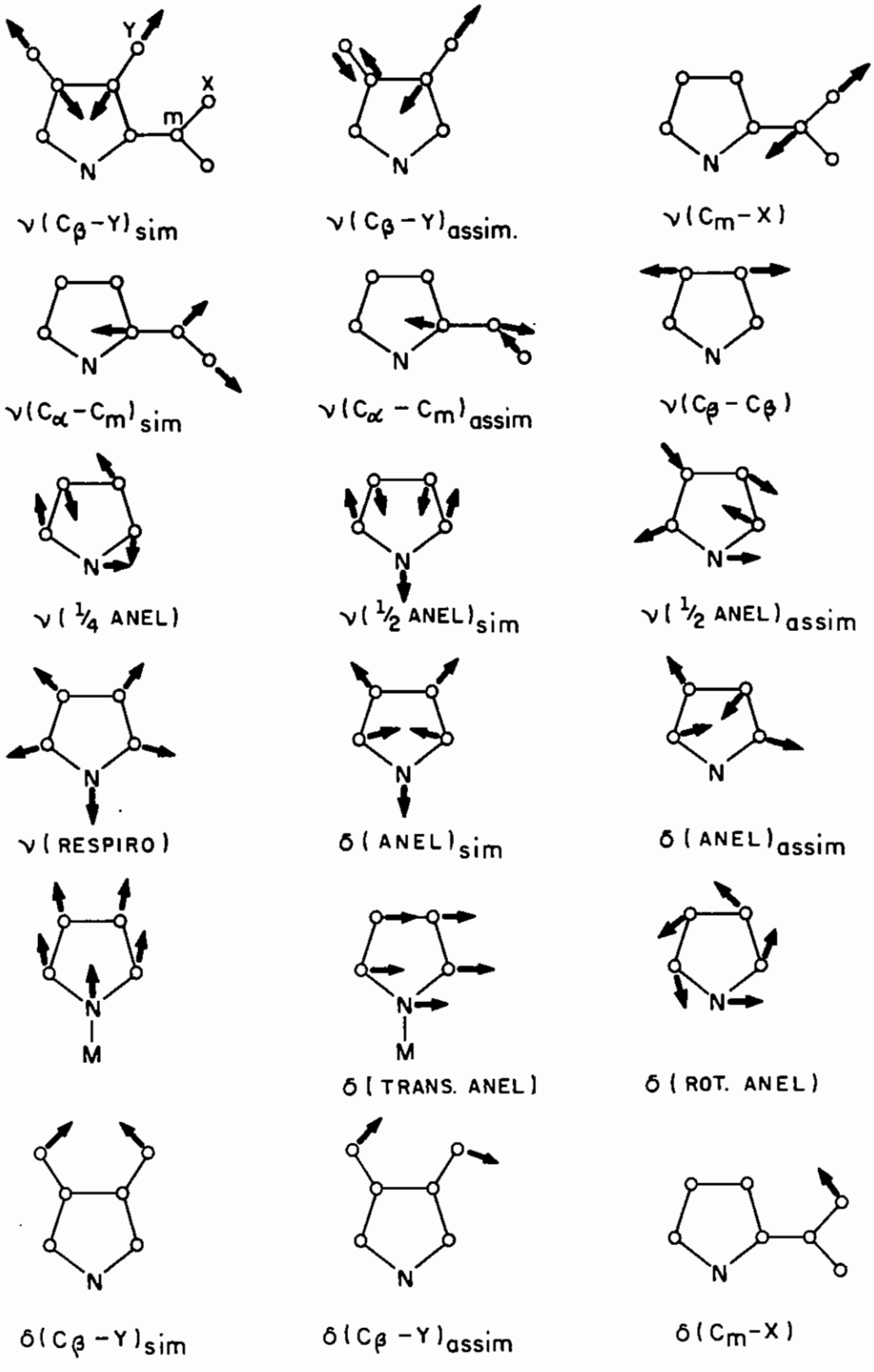


Figura IV.10 - Diagrama de coordenadas locais do anel pirrólico usadas para classificar os modos de vibração do esqueleto da porfirina no plano [38]

MODOS DE VIBRAÇÃO DE ESPÉCIES A_{2g} E B_{2g}

Os modos de vibração das espécies A_{2g} e B_{2g} são assimétricos com relação ao eixo C_2' dos anéis pirrólicos. Quando os anéis vibram em fase os modos são classificados na espécie A_{2g} e para os anéis adjacentes vibrando em oposição de fase os modos de vibração pertencem à especie de simetria B_{2g}.

Podemos então classificar os seguintes pares de modos de vibração das espécies de simetria A_{2g} e B_{2g} que correspondem a movimentos análogos dos átomos dos anéis pirrólicos na porfirinas: $\nu(1/4\text{de anel})(\nu_{20},\nu_{29})$; $\nu(1/2\text{anel})_{as}(\nu_{22},\nu_{30})$; $\nu(C_\beta\text{-Y})_{as}(\nu_{23},\nu_{31})$; $\delta(\text{def.anel})_{as}(\nu_{24},\nu_{32})$; $\delta(\text{rot. anel})(\nu_{25},\nu_{33})$; $\delta(C_\beta\text{-Y})_{as}(\nu_{26},\nu_{34})$ e $\delta(\text{trans. anel})(\nu_{35})$. No último par, a translação em fase dos anéis pirrólicos tangencial ao anel porfirínico leva a uma rotação no plano da porfirina, de modo que esta é uma coordenada redundante.

Na tabela IV.3 são mostrados os modos normais de vibração de uma metaloporfirina de simetria D_{4h} de acordo com as coordenadas locais e sua contribuição à cada espécie de simetria. É usada a notação original de Kitagawa et al [35] para a NiOEP, onde as bandas são numeradas por blocos de simetria decrescente e dentro de cada bloco as bandas são numeradas a partir da frequência mais alta.

O espectro de vibração de uma porfirina é modificado quando da passagem da metaloporfirina para a respectiva base livre. Com a substituição do metal central por dois prótons, o modelo da porfirina passará a ter 38 átomos e terá 73 modos normais de vibração permitidos em vez dos 71 da metaloporfirina. A simetria do sistema será reduzida de D_{4h} para D_{2h} (como já vimos no capítulo anterior) e a classificação dos modos normais de vibração em cada espécie de simetria agora é dada por:

$$\Gamma_{\text{no plano}} = 19A_g + 18B_{1g} + 18B_{2u} + 18B_{3u} \qquad \text{IV.7}$$

Para compararmos os espectros de vibração das porfirinas de base livre com os das respectivas metaloporfirinas, precisamos da correlação entre as espécies de simetria dos grupos de ponto D_{2h} e

Tabela IV.3 - Modos normais de porfirina de simetria D4h, em termos de coordenadas locais

coordenada local	A_{1g}	B_{1g}	A_{2g}	B_{2g}	E_u
ν(Cm-X)	ν_1			ν_{27}	ν_{36}
$\nu_{as}(C_\alpha-C_m)$		ν_{10}	ν_{19}		ν_{37}
$\nu_s(C_\beta-C_\beta)$	ν_2	ν_{11}			ν_{38}
$\nu_s(C_\alpha-C_m)$	ν_3			ν_{28}	ν_{39}
ν(pirrol)1/4 anel			ν_{20}	ν_{29}	ν_{40}
ν_s(pirrol)1/2 anel	ν_4	ν_{12}			ν_{41}
$\delta(C_m-X)$		ν_{13}	ν_{21}		ν_{42}
$\nu_s(C_\beta-Y)$	ν_5	ν_{14}			ν_{43}
ν_{as}(pirrol)1/2 anel			ν_{22}	ν_{30}	ν_{44}
$\nu_{as}(C_\beta-Y)$			ν_{23}	ν_{31}	ν_{45}
δ_{as}(pirrol)			ν_{24}	ν_{32}	ν_{46}
ν(pirrol-suspiro)	ν_6	ν_{15}			ν_{47}
δ_s(pirrol)	ν_7	ν_{16}			ν_{48}
δ(pirrol-rot)			ν_{25}	ν_{33}	ν_{49}
ν(N-M)	ν_8	ν_{18}			ν_{50}
$\delta_{as}(C_\beta-Y)$			ν_{26}	ν_{34}	ν_{51}
$\delta_s(C_\beta-Y)$	ν_9	ν_{17}			ν_{52}
δ(pirrol-trans)			f	ν_{35}	ν_{53}
total	9	9	8	9	18

f⇒ redundante com a rotação da molécula

D_{4h} . Esta correlação é dada pela Tabela IV.4 [59]:

TABELA IV.4 Correlação entre as representações irredutíveis dos grupos de ponto D_{2h} e D_{4h}

D_{4h}	D_{2h}
A_{1g} B_{1h}	A_g
A_{1u} B_{2u}	A_u
A_{2g} B_{2g}	B_{1g}
A_{2u} B_{1u}	B_{1u}
E_g	$B_{2g} + B_{3g}$
E_u	$B_{2u} + B_{3u}$

O abaixamento da simetria leva a modificações importantes no espectro de vibração das porfirinas. Essas modificações são mais facilmente compreensíveis se tentarmos construir o espectro a partir das coordenadas locais dos anéis pirrólicos. Como vemos da tabela IV.4, a primeira consequência do abaixamento da simetria é o levantamento da degenerescência dos modos E_u , ativos no infravervelho. Com isso espera-se o dobro no número de modos fundamentais das porfirinas, no infravermelho.

Para a determinação dos modos ativos no Raman, devemos levar em conta que os anéis pirrólicos protonados e desprotonados não são mais equivalentes. Como os modos dos anéis são acoplados, as

vibrações associadas a modos internos dos pirróis devem ser contadas em dobro. Então, apesar de as quatro espécies do grupo D_{4h} ativas no Raman colapsarem para duas no grupo D_{2h} ,tem-se o mesmo número de modos de vibração associados aos modos internos dos anéis pirrólicos. A esses modos devemos acrescentar os estiramentos e deformações ν(N-H) e δ(N-H) dos prótons centrais de acordo com a fase, essas vibrações dão origem a modos simétricos ou antissimétricos em relação ao centro de inversão da porfirina. Outra diferença entre a estrutura D_{4h} e a D_{2h} é que enquanto na metaloporfirina a translação radial do pirrol é redundante com o estiramento metal-nitrogênio, na base livre a translação radial leva a um modo genuíno da porfirina.

Na tabela IV.5 são mostrados os modos normais de vibração de uma porfirina-modelo base livre de 38 átomos e simetria D_{2h} . Mantivemos a mesma numeração de bandas usada nas porfirinas de simetria D_{4h} . As designações pyr-H e pyr referem-se aos modos internos dos anéis pirrólicos protonados e desprotonados, respectivamente.

Quando nas porfirinas as posições X e Y em vez de átomos isolados são ocupadas por conjuntos de átomos há que se considerar também os modos de vibração correspondentes a esses conjuntos de átomos. Para as porfirinas estudadas neste trabalho, devemos considerar principalmente os modos normais de vibração nos grupos piridil que podem ser intensificados por acoplamento vibracional com os modos do esqueleto ou ainda devido a uma maior deslocalização dos orbitais-π do macrociclo envolvendo o grupo piridil. Essa deslocalização é possível se considerarmos os anéis piridil formando uma estrutura coplanar com o macrociclo, o que está de acordo com a literatura a respeito dessas porfirinas [5].

No caso das porfirinas meso-substituídas, dos 35 modos normais de vibração que se espera ativos no Raman, aqueles quatro correspondentes aos estiramentos C_{β}-H caem na região de 3100 cm^{-1}. Como os protons periféricos são desacoplados do sistema de eletrons π do macrociclo, os estiramentos envolvendo esses átomos não são intensificados por espectroscopia Raman ressonante. Tem-se, então, que dos 35 modos normais de vibração espera-se encontrar no máximo 31 frequências fundamentais atribuíveis ao

Tabela IV.5 - Modos normais de porfirina de simetria D_{2h}, em termos de coordenadas locais

coord. local	D_{2h} / D_{4h}	A_g		B_{1g}		B_{2u}	B_{3u}
		A_{1g}	B_{1g}	A_{2g}	B_{2g}	E_u	
$\nu(C_m-X)$		ν_1			ν_{27}	ν_{36a}	ν_{36b}
$\nu_{as}(C_\alpha-C_m)$			ν_{10}	ν_{19}		ν_{37a}	ν_{37b}
$\nu_s(C_\beta-C_\beta)$	pir-H[b]	ν_2					ν_{38b}
	pir		ν_{11}			ν_{38a}	
$\nu_s(C_\alpha-C_m)$		ν_3			ν_{28}	ν_{39a}	ν_{39b}
ν(1/4 anel)	pir-H			ν_{20}			ν_{40b}
	pir				ν_{29}	ν_{40a}	
ν_s(1/2anel)	pir-H	ν_4					ν_{41b}
	pir		ν_{12}			ν_{41a}	
$\delta(C_m-X)$			ν_{13}	ν_{21}		ν_{42a}	ν_{42b}
$\nu_s(C_\beta-Y)$	pir-H	ν_5					ν_{43b}
	pir		ν_{14}			ν_{43a}	
ν_{as}(1/2anel)	pir-H			ν_{22}			ν_{44b}
	pir				ν_{30}	ν_{44a}	
$\nu_{as}(C_\beta-Y)$	pir-H			ν_{23}			ν_{45b}
	pir				ν_{31}	ν_{45a}	
δ_{as}(pirrol)	pir-H			ν_{24}			ν_{46b}
	pir				ν_{32}	ν_{46a}	

ν(respiro)	pir-H	ν_6			ν_{47b}
	pir		ν_{15}	ν_{47a}	
δ_s(pirrol)	pir-H	ν_7			ν_{48b}
	pir		ν_{16}	ν_{48a}	
δ(pir.rot)	pir-H			ν_{25}	ν_{49b}
	pir			ν_{33}	ν_{49a}
ν(trans.rad.		ν_8	ν_{18}	ν_{50a}	ν_{50b}
δ_{as}(C_β-Y)				ν_{26} ν_{34}	ν_{51a} ν_{51b}
δ_s(C_β-Y)		ν_9	ν_{17}	ν_{52a}	ν_{52b}
δ(trans.tg.)				d ν_{35}	ν_{53a} ν_{53b}
ν(N-H)		$\nu(N-H)^c_s$			ν_{as}(NH)
δ(N-H)				$\delta(N-H)_{as}$	δ_{as}(NH)
total		19		18	18 18

a ⇒ procuramos manter a mesma numeração usada nas metaloporfirinas

b ⇒ pir-H e pir referem-se a anéis pirrol protonados e desprotonados, respectivamente

c ⇒ para esses modos relacionados aos prótons centrais, a designação de simétrico e assimétrico refere-se ao centro de inversão da molécula

d ⇒ redundante com resteito à rotação da molécula em torno de seu eixo

macrociclo. O modelo de porfirina planar de 37 átomos prevê ainda a existência de 34 modos de vibração OOP. Para uma porfirina de simetria D_{4h} esses modos são classificados como [38]:

$$\Gamma_{OOP} = 3A_{1u} + 6A_{2u} + 5B_{1u} + 4B_{2u} + 8E_g \qquad (IV.8)$$

Para a simetria D_{4h}, apenas os modos E_g são ativos no Raman. Como esses modos são não totalmente simétricos, requerem acoplamento vibrônico para intensificação Raman ressonante. Mas, por questões de simetria, esses modos são incapazes de se acoplarem com as transições eletrônicas π-π^* no plano, uma vez que essas transições têm simetria E_u e $E_u \times E_u = A_{1g} + A_{2g} + B_{1g} + B_{2g}$ não contêm explicitamente a representação E_g. Com isso, de acordo com o modelo de Gouterman (modelo de 4 orbitais) para porfirinas planas não pode haver intensificação Raman ressonante para nenhum modo de vibração OOP. A ativação intensificada de modos de vibração fora do plano e intensificação via Raman ressonante exige um abaixamento da simetria da molécula, para que as regras de seleção possam ser relaxadas. Um possível abaixamento da simetria pode ter origem no desvio da planicidade do macrociclo, permitindo o acoplamento de modos fora do plano com transições eletrônicas π-π^*.

Recentemente, Li et al [39] obtiveram o espectro Raman ressonante da porfirina NiOEP cristalizada em estrutura tetragonal. A cristalização da porfirina nessa estrutura provoca uma distorção com relação à planicidade, com isso os autores observaram uma série de bandas às quais atribuiram vibrações fora do plano. Isso foi possível porque a distorção provoca o abaixamento da simetria de D_{4h} para o grupo de ponto S_4 onde os modos A_{1u} e A_{2u} se transformam como B e os modos B_{1u} e B_{2u} se transformam como A e os modos E_g se transformam como E. Essas classes de simetria são as mesmas pelas quais os modos de vibração no plano são transformados, o que permite que os modos OOP sejam intensificados via acoplamento vibrônico com as transições eletrônicas π-π^*.

Na Fig.IV.11 são mostrados os modos de vibração OOP na configuração de coordenadas locais.

Dos modos de vibração OOP, aqueles correspondentes às deformações γCH OOP (e γNH OOP nas porfirinas de base livre) são previstos que ocorram na região 800-1200 cm^{-1} enquanto os restantes são esperados a frequências mais baixas, coincidindo com as frequências de deformação do macrociclo no plano. Isto dificulta a interpretação do espectro Raman na região de baixas frequências, uma vez que a intensificação Raman dos modos OOP se dá às custas do abaixamento de simetria do sistema, o qual por sua vez relaxa as regras de seleção para as vibrações no plano.

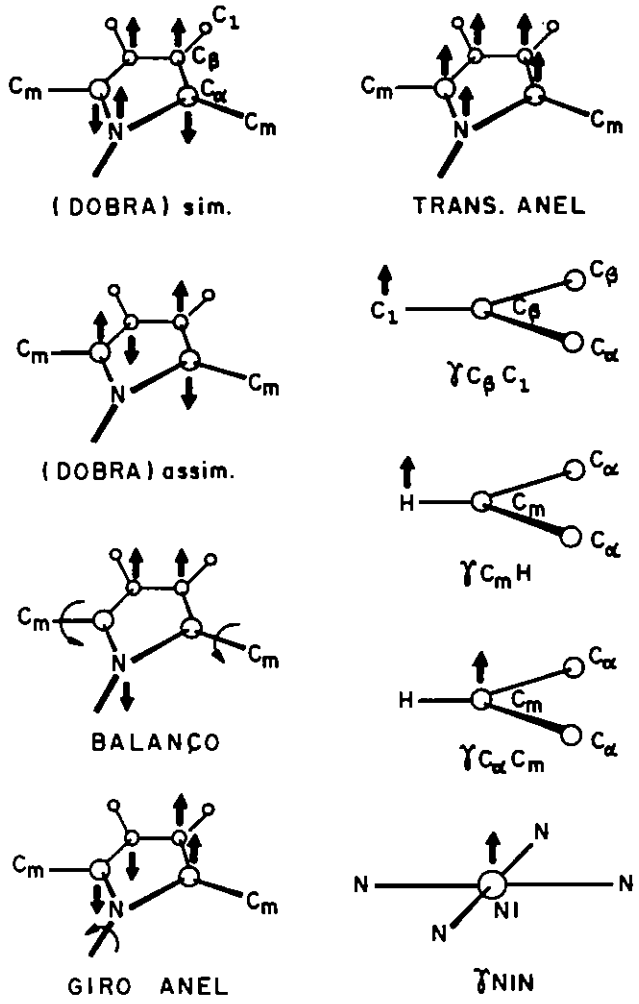


Figura IV.11 - Modos de vibração fora do plano (OOP) para o esqueleto de uma metaloporfirina em termos das coordenadas locais do anel pirrólico [37]

IV.3 ATRIBUIÇÃO DAS BANDAS DOS ESPECTROS RAMAN

No caso das porfirinas meso-substituídas o acoplamento cinemático entre modos de vibração de anéis ligados ao carbono C_m e alguns modos do anel pirrólico parece ser responsável pela alteração do espectro Raman de porfirinas como a NiTPP em relação às porfirinas "normais" como a NiOEP. No caso da NiTPP, Li et al [36] observam, que em geral, os modos de vibração envolvendo os estiramentos C_β-C_β, C_α-C_β e C_α-C_m são acoplados cinematicamente aos modos do grupo fenil, provocando o deslocamento para frequências mais baixas com relação às bandas da NiOEP.

Por sua forma estrutural, esperamos que as porfirinas estudadas neste trabalho apresentem um comportamento espectral mais próximo ao da NiTPP que da NiOEP, com os grupos MPy e BzPy fazendo o acoplamento com o anel pirrólico, como é feito pelo grupo fenil no caso da porfirina NiTPP. Seguindo este raciocínio, esperamos que esses modos de vibração do anel pirrólico apresentem intensificação e frequências semelhantes às da NiTPP, de modo que usaremos a interpretação dos espectros dessa porfirina como referência para nossa atribuição de frequência.

A banda fundamental de frequência mais alta (1635-1650cm^{-1}) é atribuída por Nakamoto et al [40] e Song e Yoon [58] a um modo simétrico do anel piridil. Esta atribuição é consistente com a intensificação via SERS (Espalhamento Raman Intensificado em Superfície) e a polarização parcial da mesma, o que está de acordo com a espécie de simetria A_{1g}. A intensificação ressonante dessa banda por excitação na banda Soret poderia ser justificada pelo acoplamento dinâmico entre os estiramentos envolvendo o carbono C_m e o estiramento simétrico C_β-C_β. A atribuição desta banda a um modo de vibração do piridil acoplado ao estiramento (C_m-C_{py}) também está de acordo com o abaixamento da mesma em aproximadamente 10cm^{-1} quando da troca do grupo metil pelo piridil nos substituintes laterais.

Quanto à banda em 1550-1560cm^{-1}, é atribuída como estiramento

simétrico $\nu_s(C_\beta - C_\beta)$,$\nu_2(A_{1g})$, pois é polarizada e é intensificada com excitação na banda Soret , o que está de acordo com a teoria de intensificação de modos de vibração de simetria A_{1g} . Embora esta banda seja observada próximo de 1600cm^{-1} nas porfirinas NiOEP [26,27] e NiOMP [28], seu deslocamento para frequências mais baixas por efeito da alquilação do carbono C_m está de acordo com o que foi discutido logo acima. A banda fraca em 1500-1505cm^{-1} não intensificada com excitação na banda Soret pode ser classificada como $\nu_{as}(C_\beta - C_\beta)$,ν_{11} (B_{1g}).

A banda em aproximadamente 1450cm^{-1} á atribuída por Nakamoto et al [40] como $\nu_s(C_\alpha - C_\beta)$ (A_{1g}). De acordo com nossa interpretação, essa banda seria melhor atribuída como ν_3, $\nu_s(C_\alpha - C_m)$, que está de acordo com a atribuição para a NiTPP. O estiramento simétrico $\nu_s(C_\alpha - C_\beta)$ pode ser atribuído à banda intensa que aparece a seguir e está localizada em aproximadamente 1350cm^{-1}. De acordo com seu perfil de ressonância pode ser atribuída como a banda ν_4 A_{1g} ν(pirrol-1/2 anel). Esta banda apresenta um deslocamento de aproximadamente 20 cm^{-1}para baixo com relação aos valores conhecidos para a NiOEP e NiTPP e é sensível ao metalo-substituinte.

A banda em 1300cm^{-1} pode ser atribuída como $\nu_{12}(B_{1g})$ ν(pirrol-1/2 anel), enquanto a que aparece em ≈ 1380cm^{-1}como uma banda fraca com excitação na banda de absorção Q(0,1) e não observada com excitação na banda Soret, poderia ser atribuída ao estiramento $\nu_{as}(C_\alpha - C_\beta)$, B_{2g}. Essas duas bandas apresentam características semelhantes, pois são depolarizadas e intensificadas por excitação na banda de absorção Q(0,1). Nossa atribuição para essas bandas discorda da de Nakamoto et al [40], que atribuem a banda em 1300cm^{-1} ao estiramento $\nu_{as}(C_\alpha - C_\beta)$, B_{2g}, e não observam nenhuma banda em 1380cm^{-1} nos espectros das porfirinas TMPyP e Zn-TMPyP em solução aquosa.

O par de bandas intensas que aparece nas quatro porfirinas nas regiões 1210/1220cm^{-1} e 1245/1255cm^{-1} não pode ser atribuído a modos do "esqueleto" da porfirina, sendo portanto classificado a princípio, como um modo interno do grupo piridil ou envolvendo o estiramento $\nu(C_m - C_{py})$. Essas duas bandas apresentam o mesmo comportamento quanto à polarização e intensificação com excitação

na banda Soret, o que permite atribuí-las à mesma espécie de simetria A_{1g}. Fazemos a atribuição da banda de frequência mais alta ao estiramento $\nu_1(C_m - C_{py})$ com base em que ela é mais sensível à substituição do grupo metil pelo benzil, e a variação da massa do substituinte tende a afetar mais este estiramento que a um modo interno do anel. A banda observada em 1210-1220cm^{-1} seria então atribuída a uma deformação simétrica do anel piridil. O estiramento antissimétrico $\nu_{as}(C_m-C_{py})$, B_{2g} é atribuído à banda fraca que aparece como um ombro em 1281cm^{-1} na porfirina ZnTMPyP e em 1275cm^{-1} na ZnTBzPyP.

Existe uma certa confusão quanto à nomenclatura dos modos de vibração $\nu(C_m-X)$, onde X é um grupo de átomos como os grupos metil-piridil ou benzil-piridil das porfirinas estudadas neste trabalho. Na vibração que corresponde de fato ao estiramento $\nu(C_m-X)$, o grupo metil-piridil ou benzil-piridil deve ser encarado como uma unidade rígida, ou seja, os átomos do grupo devem se deslocar paralelamente, sem deformação do anel. No caso do metil-piridil, esta banda é esperada em aproximadamente 200cm^{-1}, enquanto no benzil-piridil deve ocorrer por volta de 100cm^{-1}. Nesta discussão, mantivemos a notação adotada por Li e colaboradores [36], que classificam como $\nu(C_m-X)$ as bandas observadas na região correspondente aos estiramentos $\nu(C-C)$, apesar de estas terem uma grande participação de deformações do anel piridil. As bandas observadas em frequências mais baixas são classificadas como modos internos do anel.

Nas porfirinas TMPyP e ZnTMPyP é observada uma banda forte em 1190cm^{-1}, que classificamos na espécie de simetria A_{1g}. Para essa banda, não existe equivalente em outras porfirinas, de modo que a mesma é atribuída como uma deformação simétrica do anel piridil, envolvendo também o acoplamento com o estiramento metil-piridil, $\nu(N^+-CH_3)$. Essa atribuição é consistente com nossos dados para as porfirinas TBzPyP e Zn-TBzPyP, onde esta banda é (presumivelmente) deslocada para ≈ 1150cm^{-1}. As bandas observadas em 1095 e 1050cm^{-1} são atribuídas respectivamente à deformação $\delta_s(C_\beta-H)$, $\nu_9(A_{1g})$ e deformação $\delta(C-H)$ do anel piridil, de acordo com a literatura.

Existe uma controvérsia quanto à atribuição da banda bastante

intensa que aparece em ≈ 1000cm^{-1} para as 4 porfirinas: ela é classificada por Song e Yoon [57] como suspiro do anel piridil e por Nakamoto como $\nu_{as}(C_\alpha-C_m)$. O problema destas atribuições é que esta banda é pouco intensificada via SERS no primeiro caso, o que é contra a interpretação do espectro SERS para estas porfirinas. Quanto à atribuição como $\nu_{as}(C_\alpha-C_m)$, esta frequência é muito mais baixa que os valores citados na literatura para este modo de vibração em outras porfirinas (1460-1520cm^{-1}). Além disso, cálculos de constante de força [36] mostram que o modo correspondente ao suspiro do anel pirrólico pode deslocar-se de 804cm^{-1} na porfirina NiOEP para 1004cm^{-1} na NiTPP, devido ao acoplamento cinemático com o respiro do anel fenílico. Por comparação com a atribuição para o espectro da porfirina NiTPP, fazemos a atribuição desta banda também ao modo ν_s(respiro pirrol).

Nas porfirinas de base livre observamos uma banda de intensidade média em 967-969cm^{-1}. Medidas feitas com a porfirina TMPyP em solução aquosa mostram que em meio ácido (pH < 1,0), esta banda e a de ≈ 1000 cm^{-1} fundem-se numa única banda. De acordo com Kalyanassundaran [5], em meio ácido, a porfirina TMPyP pode ser protonada segundo a seguinte equação de equilíbrio:

$$H_2TMPyP + 2H^+ \rightleftarrows H_3TMPyP^+ + H^+ \rightleftarrows H_4TMPyP^{2+} \qquad \text{IV.9}$$

De acordo com esses dados, atribuímos a banda de 967-969cm^{-1} ao respiro do anel pirrólico desprotonado, enquanto a banda de ≈ 1000 cm^{-1} é atribuída ao respiro do anel protonado. Essa atribuição da frequência mais baixa ao modo do anel desprotonado é também baseada em Li e Zgierski [57], que atribuem as bandas de 971 e 956cm^{-1} respectivamente ao respiro dos anéis protonado e desprotonado.

Na região 790- 820cm^{-1} existem duas bandas de intensidade variável dependendo da porfirina . Nas porfirinas TMPyP e ZnTMPyP, observamos uma banda de intensidade média em 795cm^{-1} e outra muito fraca em 808cm^{-1}. Nas benzo-porfirinas, a segunda banda é deslocada para frequências mais altas, aparecendo respectivamente em 812cm^{-1} na TBzPyP e em 816cm^{-1} na Zn-TBzPyP. As duas bandas

apresentam características da espécie de simetria A_{1g}. Nakamoto et al [40] atribuem a banda de $795cm^{-1}$ a modos dos meso-substituintes, como uma mistura de estiramento $\nu(C-C)$ do grupo piridil e estiramento $\nu(N^{+}-CH_3)$. No entanto, Spiro et al [38] observam que para porfirinas meso-substituidas com grupos cíclicos como a NiTPP, o acoplamento dinâmico pode levar a uma mistura dos modos de deformação do grupo fenil com modos do pirrol. No caso da Ni-porfirina, a deformação simétrica ν_7, δ(pirrol) A_{1g} passa de $732cm^{-1}$ na NiP (níquel-porfina) para $889cm^{-1}$ na NiTPP [36]. De acordo com esse raciocínio, é possível prever um acoplamento das deformações dos grupos pirrol e piridil, levando a uma mistura desses modos de vibração, permitindo classificar a banda de $795-810cm^{-1}$ como δ_s(pirrol), ν_7 a_{1g}. A banda de $\approx 810cm^{-1}$, pela sensibilidade à substituição do metil pelo benzil, seria atribuída a um modo do piridil.

A banda observada na região $730-740cm^{-1}$ é dominante no espectro Raman das quatro porfirinas estudadas quando se excita na região da banda Q e não é observada quando se excita na banda Soret, quer seja em sólido ou líquido. Descartamos a possibilidade de atribuição à vibração do piridil porque esta mesma banda é observada no espectro Raman da hemina e da hematoporfirina com as amostras dispersas em KBr. Consideramos duas possibilidades para atribuição desta banda: a deformação do pirrol, no plano, δ_{as}(pirrol), ν_{16} B_{1g} e a deformação fora do plano γ(dobradura pirrol), $\nu_{11}B_{1u}$. Esta última estaria de acordo com a atribuição de Li et al [37] para a porfirina NiOEP cristalizada em estrutura não planar.

A banda em $667-671cm^{-1}$, pela sua intensificação via SERS [58] pode ser atribuída a um modo do substituinte, possivelmente à deformação $\delta(C-N^{+}-CH_3)$ ou $\delta(C-N^{+}-C)_{piridil}$ A_{1g}, enquanto as bandas observadas em $630-640cm^{-1}$e $570-580cm^{-1}$ podem ser atribuídas a deformações do anel pirrólico OOP (γ_{21} E_ge γ_{12} B_{1u}).

Na região de frequências abaixo de $500cm^{-1}$, o espectro Raman mostrou-se muito mais sensível à intensificação ressonante que nas frequências mais altas. Com excitação em 488nm, as quatro porfirinas apresentam uma banda muito intensa em $\approx 380cm^{-1}$. Nas porfirinas de base livre esta banda desaparece com excitação em

457,9nm. Como esta banda é observada também em outras porfirinas como a protoporfirina-IX e a hematoporfirina, nós a atribuímos a um modo do macrociclo. De acordo com a literatura, nesta região não se espera nenhum modo fundamental do macrociclo no plano. A atribuição mais provável para esta banda seria ao modo OOP $\gamma_{16}(B_{2u})$, correspondente à inclinação do pirrol em torno do eixo formado pelas ligações C_m-C_m . Pelas mesmas razões, a banda observada em ≈ 280cm^{-1} é atribuída a uma deformação do esqueleto da porfirina.

A banda observada em 405 cm^{-1} nas Zn-porfirinas e não observada nas de base livre é atribuida ao estiramento totalmente simétrico ν(Zn-N), $\nu_8(A_{1g})$. O correspondente estiramento não totalmente simétrico ν(Zn-N), $\nu_{18}(B_{1g})$ é atribuído à banda observada em ≈ 225cm^{-1}. Na literatura não existe um acordo quanto à atribuição do estiramento metal-nitrogênio, em termos de coordenandas internas da molécula de porfirina. O estiramento totalmente simétrico ν(M-N), $\nu_8(A_{1g})$ corresponde ao respiro do grande anel da porfirina, enquanto o estiramento $\nu_{18}(B_{1g})$ equivale a uma deformação do mesmo anel. Kitagawa et al [34] prevêem a banda de espécie B_{1g} em 187cm^{-1} e minimizam a contribuição do estiramento (M-N) no modo A_{1g} correspondente. Por outro lado, Spiro et al [38] atribuem como ν(M-N) A_{1g} a banda observada em 360, 369 e 402cm^{-1} nas porfirinas NiOEP, NiP e NiTPP, respectivamente, enquanto o ν(N-M) B_{1g} é atribuído às bandas observadas em 168, 237 e 277cm^{-1} nas mesmas porfirinas. A grande diferença de frequência entre os modos de espécie A_{1g} e B_{2g} é atribuída a que o primeiro modo tem uma contribuição muito grande das deformações $\delta(C_\alpha C_m C_\alpha)$ e dos estiramentos $\nu(C_\alpha$-$C_m)$, enquanto o modo ν(M-N) B_{1g} seria um estiramento metal-nitrogênio "puro".

Considerando o estiramento ν(M-N) A_{1g} como um respiro do esqueleto da porfirina, poderíamos atribuir a este modo de vibração as bandas observadas em 332cm^{-1} na TMPyP e em 327cm^{-1} na TBzPyP, e não observadas nas Zn-porfirinas.

As bandas de frequências mais baixas das porfirinas TMPyP e Zn-TMPyP são observadas em ≈ 185cm^{-1}, enquanto que na TBzPyP observamos uma banda em 109cm^{-1}. Como estas bandas são excludentes para estas porfirinas, consideramos a possibilidade de que

correspondam ao mesmo modo de vibração. No caso das porfirinas TMPyP e Zn-TMPyP, esta banda ocorre numa frequência próxima à atribuída por Li et al [36] para o estiramento ϕ_{10} do grupo fenil na NiTPP, observada em 202cm^{-1}. Levando-se em conta as massas dos grupos fenil, metil-piridil e benzil-piridil, estas bandas cairiam em frequências próximas às observadas neste trabalho. Nesse estiramento, considera-se a massa do substituinte na posição meso como uma massa puntual e o modo de vibração é semelhante ao estiramento $\nu(C_m\text{-}H)$ das porfirinas não substituídas.

Na tabela IV.6 apresentamos a reprodução dos dados espectrais da tabela IV.2, acrescida da atribuição de bandas aqui discutidas.

Tabela IV.6 Atribuição de bandas dos espectros Raman das 4 porfirinas, entre 100 e 1700 cm^{-1}

$\Delta\nu$ (cm^{-1})				atribuição		
Zn-TMPyP	TMPyP	TBzPyP	Zn-TBzPyP		D_{4h}	D_{2h}
1643	1645	1638	1638	ν(piridil)	A_{1g}	A_g
	1580(sh)					
1555	1556	1558/1567	1558	ν_2 ,$\nu_s(C_\beta-C_\beta)$	A_{1g}	A_g
1531	1523	1529				
1517						
1502	1500	1505	1504	ν_{11}, $\nu_{as}(C_\beta-C_\beta)$	B_{1g}	A_g
1449	1443/1457	1448/1460	1453	ν_3 , $\nu_s(C_\alpha-C_m)$	A_{1g}	A_g
1384	1383	(1384)	1384	ν_{29}, ν_{as}(1/4 anel)	B_{2g}	B_{1g}
	1368	1374				
1353		1357	1355	ν_4 , ν_s(1/2anel)	A_{1g}	A_g
1329	1336	1336				
	1310					
1300	1296	1296	1301	ν_{12}, ν(1/2 anel)	B_{1g}	A_g
1282			1285			
1255	1255	1250	1256	ν_1 , $\nu_s(C_m-C_{py})$	A_{1g}	A_g
1215	1219	1215	1216	ν(piridil)		
1193	1190			δ(piridil); $\nu(N^+-CH_3)$		
		1158	1157	δ(piridil); $\nu(N^+-CH_3)$		
1098	1099	1096	1099	ν_9 , $\delta_s(C_\beta-H)$	A_{1g}	A_g
1052	1062	(1058)	1051	$\delta_s(C-H)_{py}$		
1002	1002	1004	1002	ν_6, ν_s(resp.pir.)	A_{1g}	A_g
	967	969		ν_{15} ν_s(resp.pir.)		A_g
866	865	868	(858)			
	846	847				
812	808	812	818	δ(piridil)		
792	794	796	808	ν_7, δ_s(pirrol)	A_{1g}	A_g

733	737	736	734	γ(pirrol), OOP		
716	720(sh)	720(sh)	715			
669	667	667	669	δ(piridil)		
	640	635	632			
568	578	579	577	γ(pirrol), OOP		
		556	562			
445			444			
406			404	ν_8, ν(Zn-N)	A_{1g}	
	391	(396)	386			
381	383	386	380	γ_6 OOP		
327	332	328				
305	313					
289	288	293	288	γ_7 OOP		
248						
227			227	ν_{18}, ν(Zn-N)	B_{1g}	A_g
221	224	217	223			
	208					
(185)	185			$\nu(C_m\text{-Py})$		
		109		$\nu(C_m\text{-Py})$?		

IV.4 - ESPECTROS RAMAN DOS COMPLEXOS PORFIRINA/MELANINA

Para deslocamentos no intervalo de 500 a 1700 cm^{-1}, apresentamos os espectros Raman dos complexos porfirina/melanina com excitação na região da banda Soret (457,9nm), que são muito semelhantes aos espectros das porfirinas puras, e com excitação em 488,0 ou 514,5nm, onde os espectros dos complexos apresentam diferenças com relação aos respectivos espectros das porfirinas puras. Para facilidade de comparação, mostramos o espectro Raman das porfirinas puras juntamente com o dos complexos. Os espectros Raman dos complexos Zn-TMPyP/melanina, TMPyP/melanina e TBzPyP/melanina com excitação em 457,9 e 488,0nm são mostrados nas figuras IV.12 a IV.15. Em cada figura é mostrado também o espectro da porfirina pura com excitação em 488,0nm. Na figura IV.12 é mostrado o espectro do complexo Zn-TBzPyP/melanina com excitação em 457,9 e 514,5nm, juntamente com o espectro da Zn-TBzPyP pura com excitação em 514,5nm.

No intervalo de deslocamentos entre 100 e 500 cm^{-1}, os espectros Raman dos complexos porfirina/melanina são bastante diferentes daqueles das porfirinas puras. Como os espectros Raman das porfirinas neste intervalo de deslocamento são muito sensíveis ao comprimento de onda de excitação, apresentamos os espectros dos complexos sobrepostos aos respectivos espectros das respectivas porfirinas isoladas, para cada um dos comprimentos de onda de excitação. Os espectros Raman dos complexos porfirina/melanina das porfirinas Zn-TMPyP, TMPyP, TBzPyP e Zn-TBzPyP são mostrados nas figuras IV.16 a IV.19.

As posições de bandas dos complexos porfirina/melanina, com intensidade em função do comprimento de onda de excitação, são mostradas nas tabelas IV.7 a IV.10. É feita a comparação direta entre as intensidades das bandas nos complexos e respectivas porfirinas puras nos mesmos comprimentos de onda de excitação e, quando for o caso, é mostrada a variação $\Delta(\Delta\nu)$ entre a posição da banda na porfirina pura e no complexo.

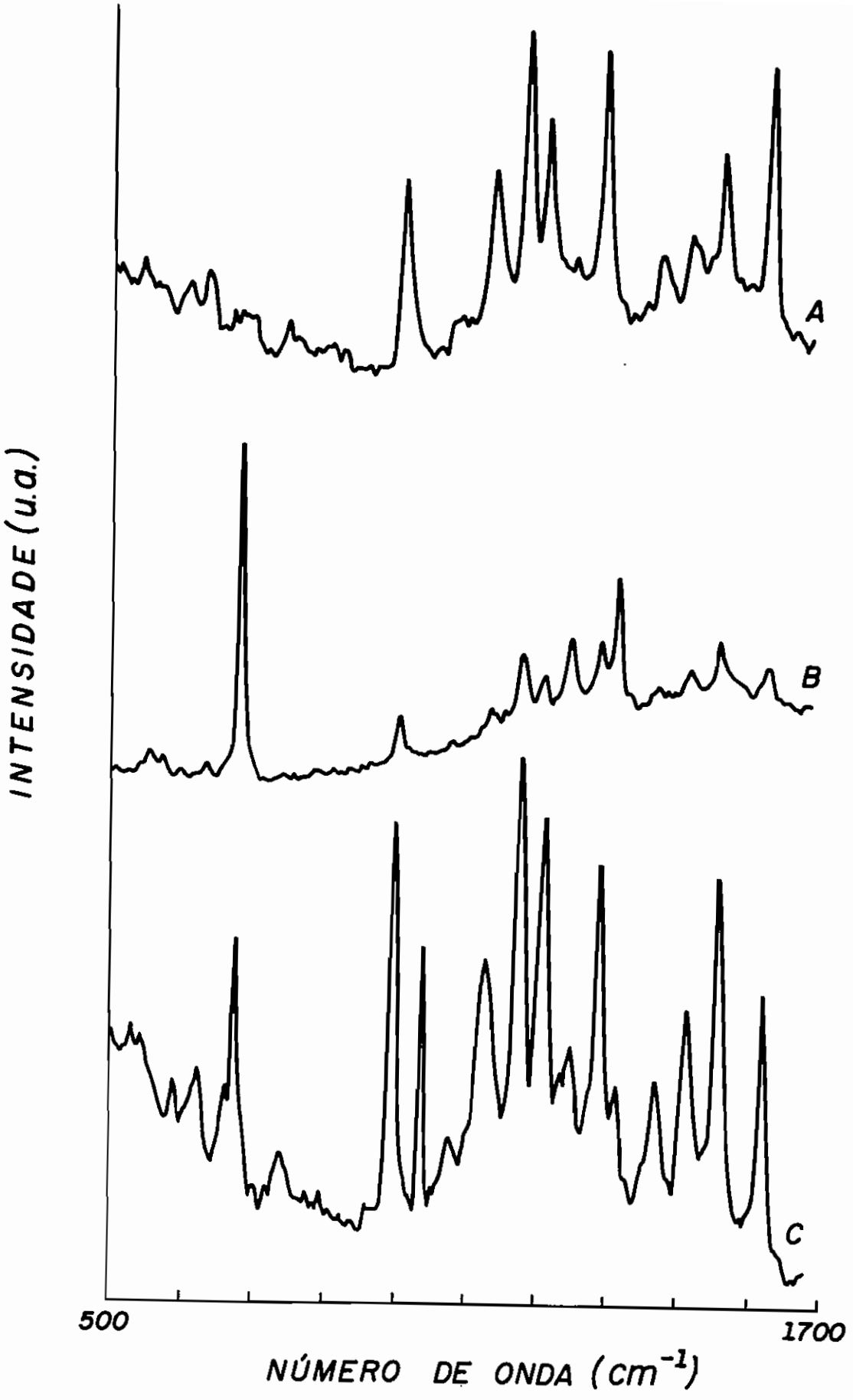


Figura IV.12 - Espectro Raman ressonante do complexo Zn-TBzPyP/melanina na região de deslocamentos de 500 a 1700cm^{-1}
a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 514,5nm; c) Zn-TBzPyP sem melanina, excitação em 514,5nm

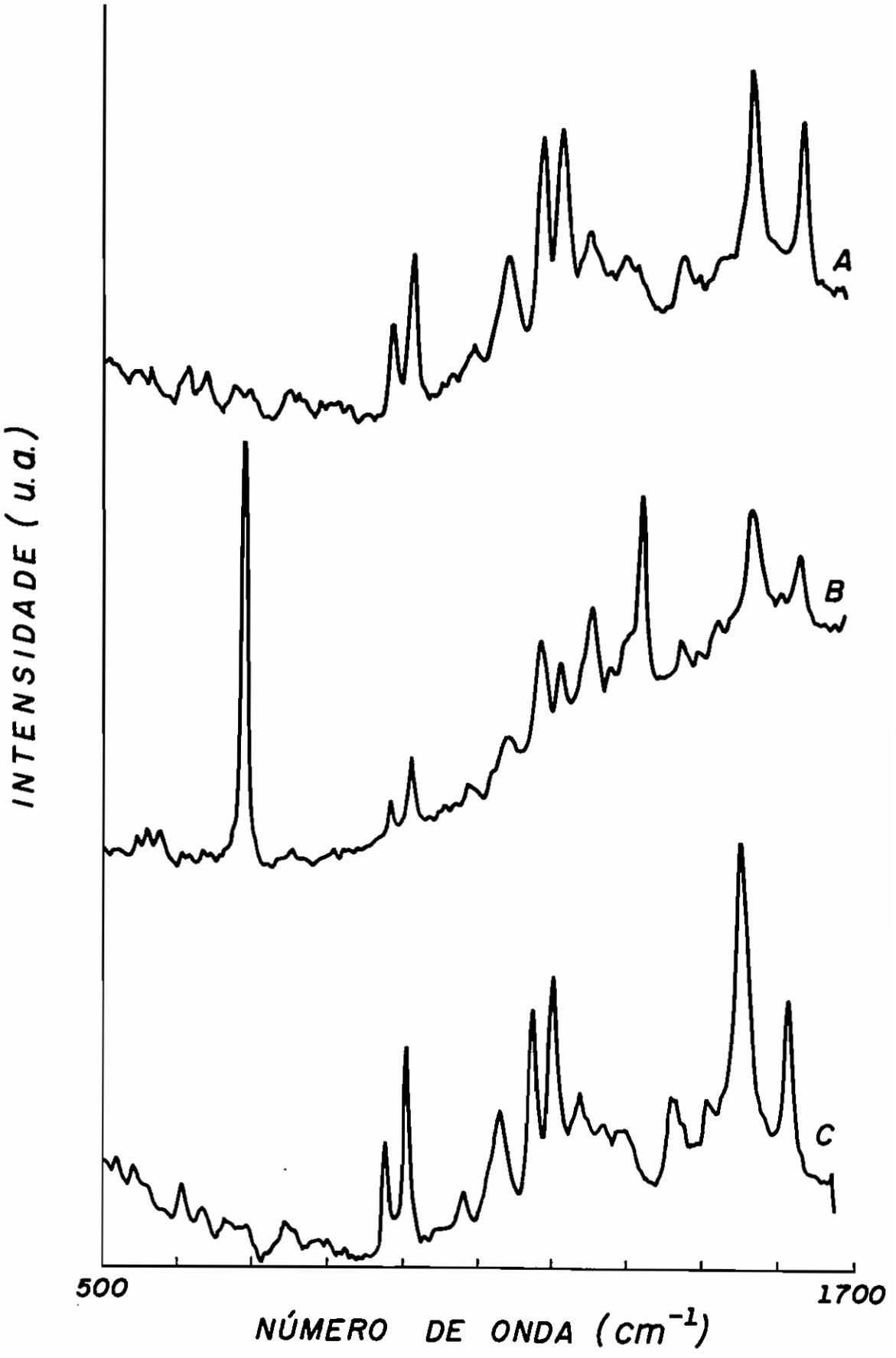


Figura IV.13 - Espectro Raman ressonante do complexo TBzPyP/melanina na região de deslocamentos entre 500 e 1700 cm^{-1} a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 488,0nm; c) TBzPyP sem melanina, excitação em 488,0nm

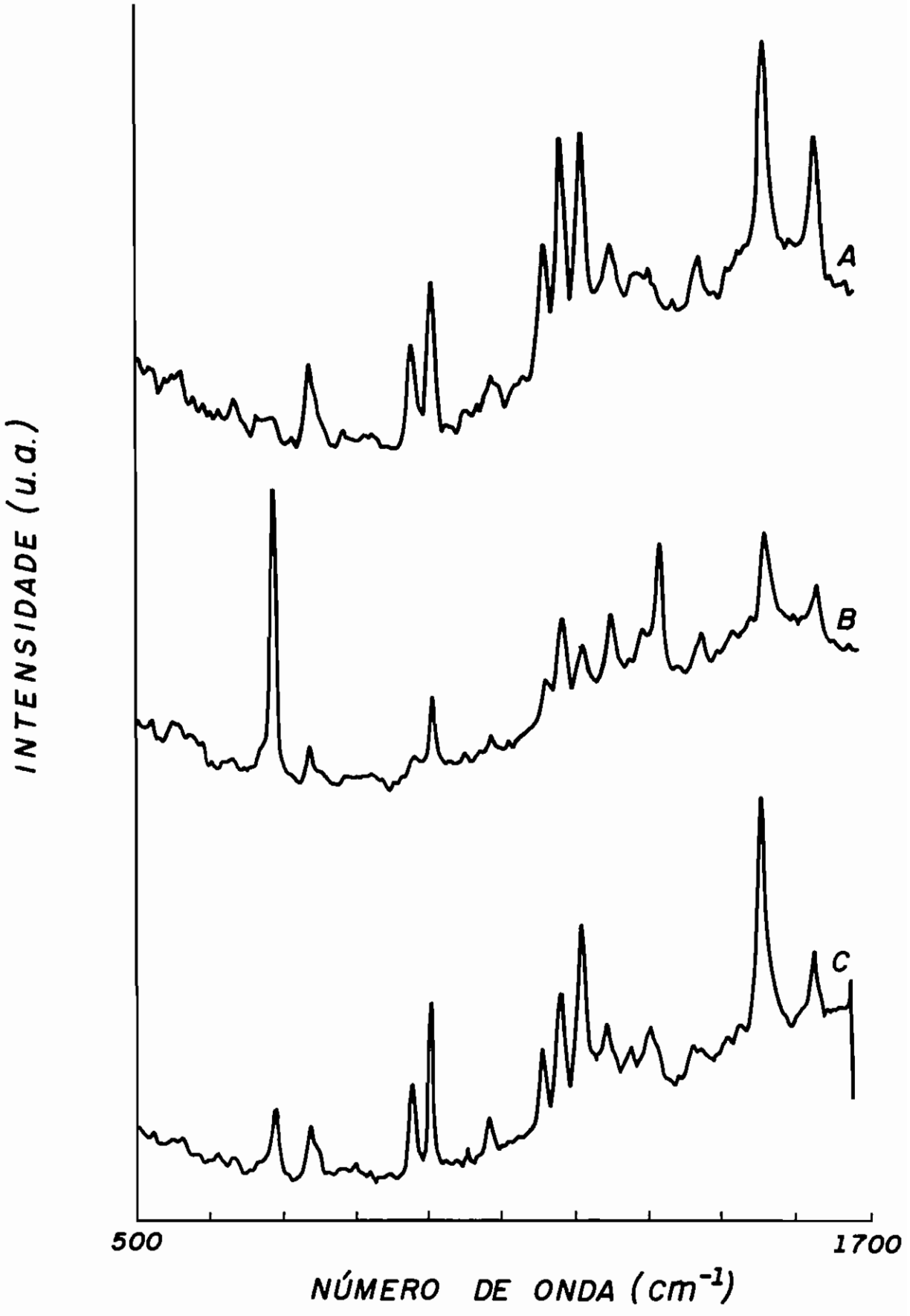


Figura IV.14 - Espectro Raman ressonante do complexo TMPyP/melanina na região de deslocamentos entre 500 e 1700 cm^{-1}
a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 488,0nm; c) TMPyP sem melanina, excitação em 488,0nm

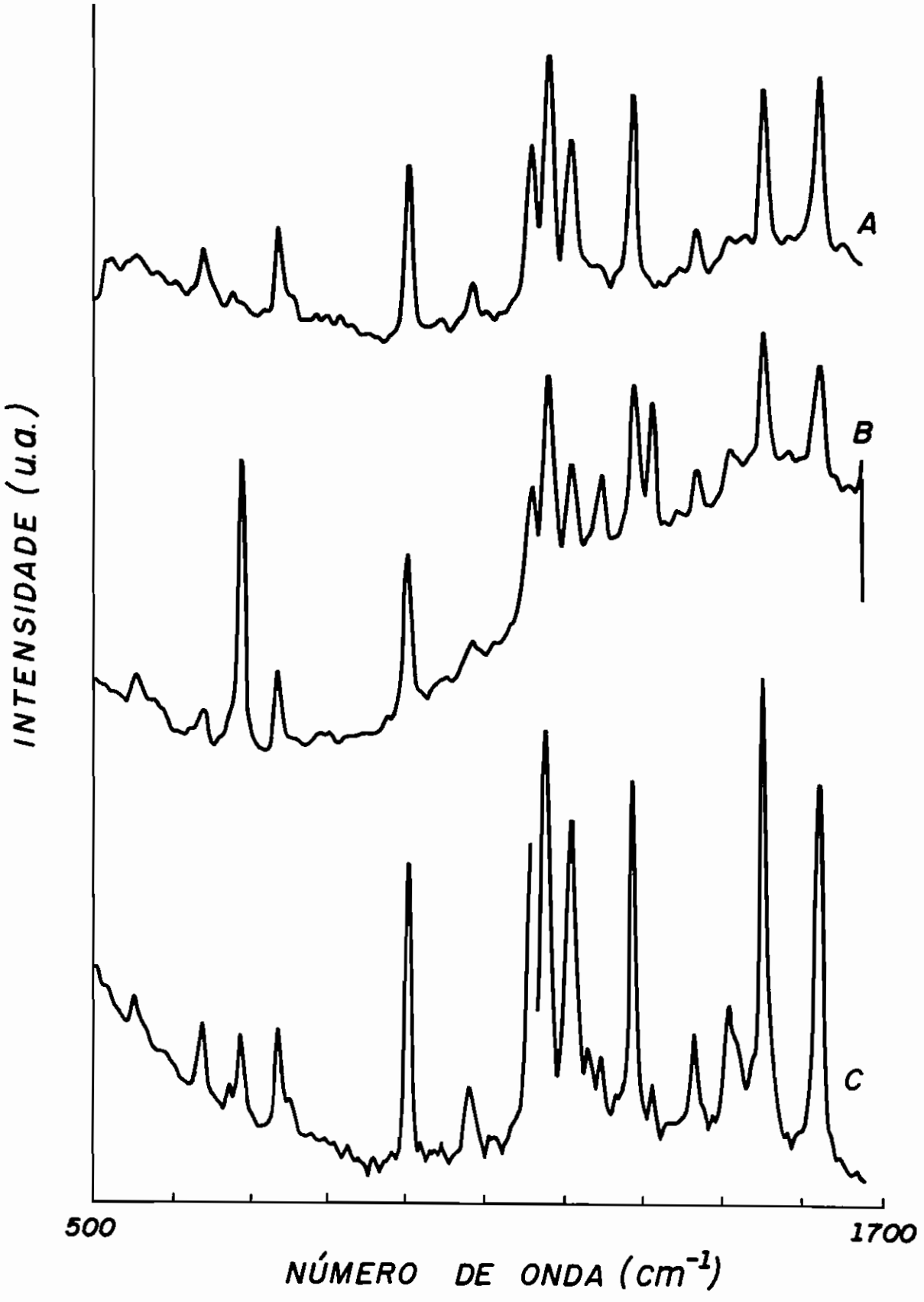


Figura IV. 15 - E spectro Raman ressonante do complexo Zn-TMPyP/melanina na região de deslocamentos entre 500 e 1700cm^{-1} a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 488,0nm; c) Zn-TMPyP sem melanina, excitação em 488,0nm

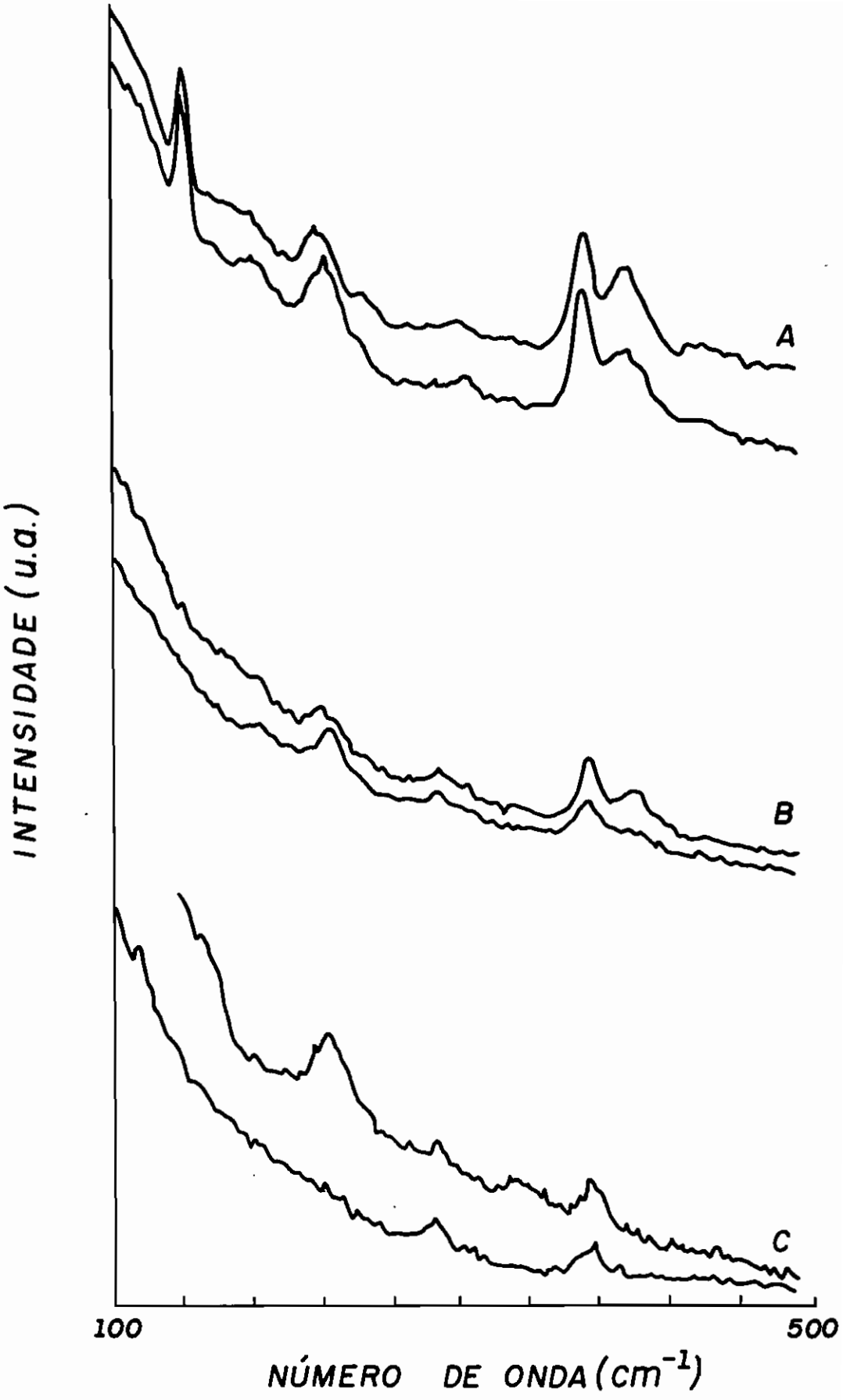


Figura IV.16 - Espectro Raman ressonante da porfirina Zn-TMPyP (curva superior) sobreposto ao do complexo Zn-TMPyP/melanina (curva inferior), região de 100 a 500 cm^{-1}. a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 488,0nm; c) excitação em 514,5nm

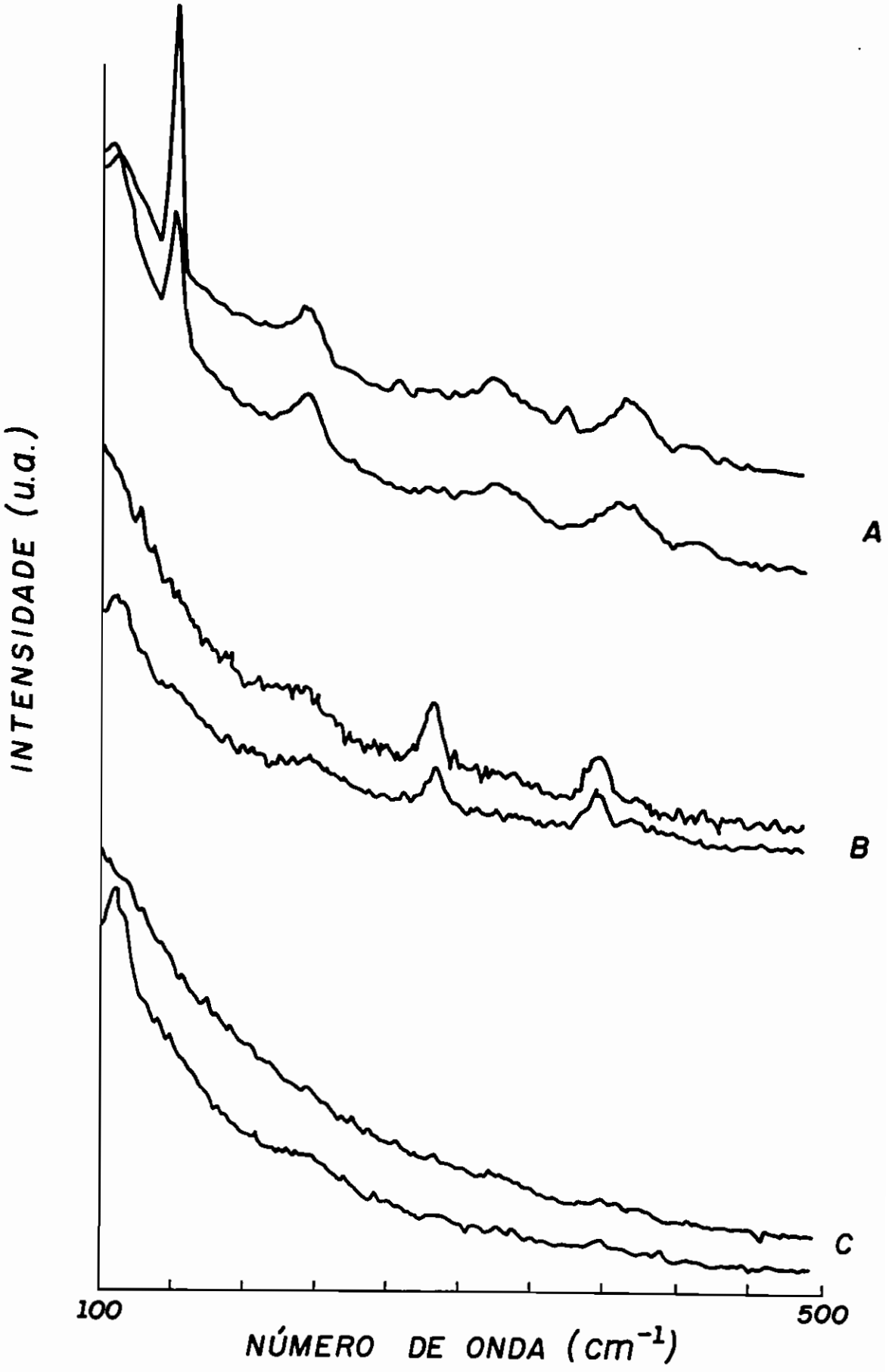


Figura IV.17 - Espectro Raman ressonante da porfirina TBzPyP (curva superior) sobreposto ao do complexo TBzPyP/melanina (curva inferior), região de 100 a 500 cm^{-1}. a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 488,0nm; c) excitação em 514,5nm

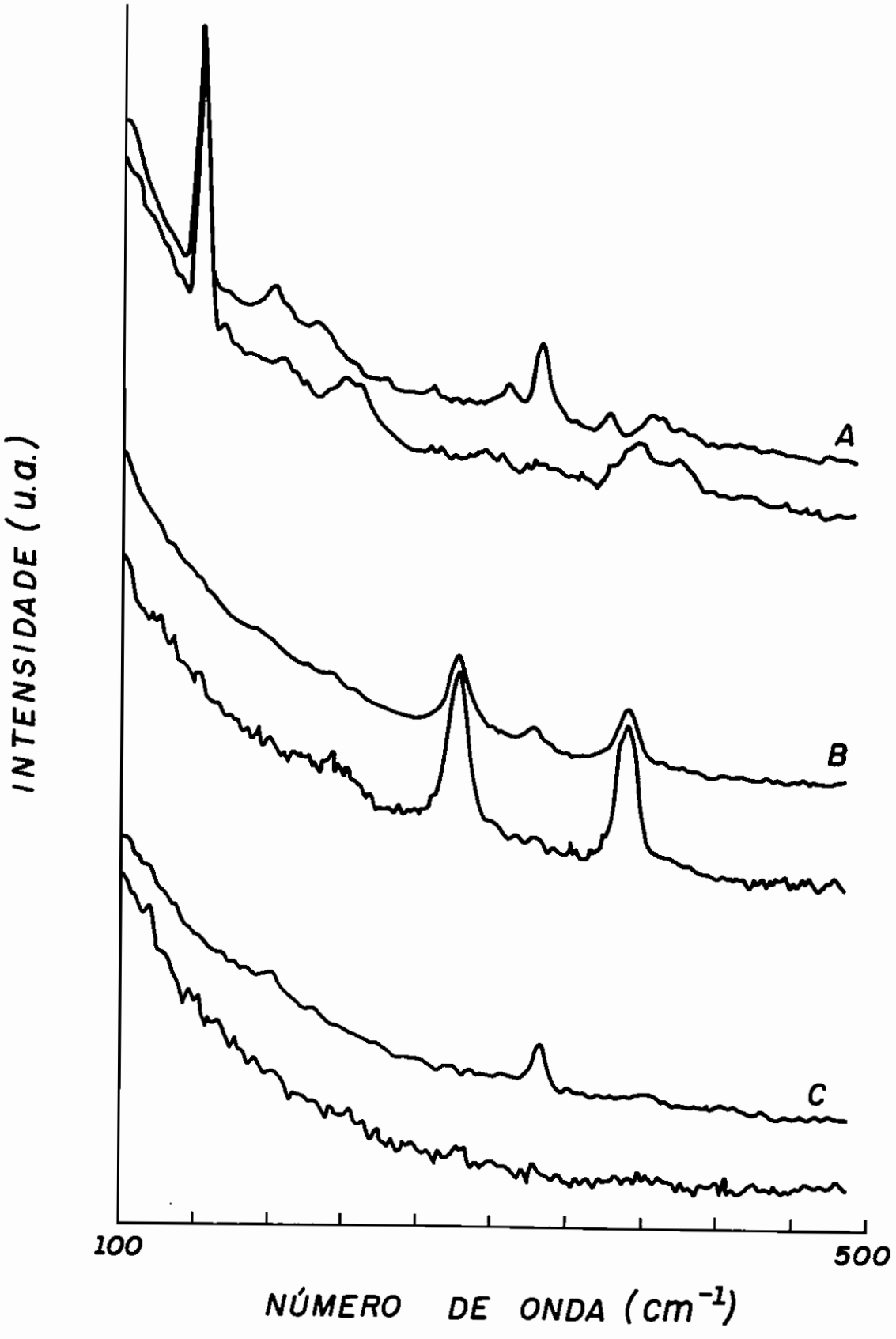


Figura IV.18 - Espectro Raman ressonante da porfirina TMPyP (curva superior) sobreposto ao do complexo TMPyP/melanina (curva inferior), região de 100 a 500 cm^{-1}. a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 488,0nm; c) excitação em 514,5nm

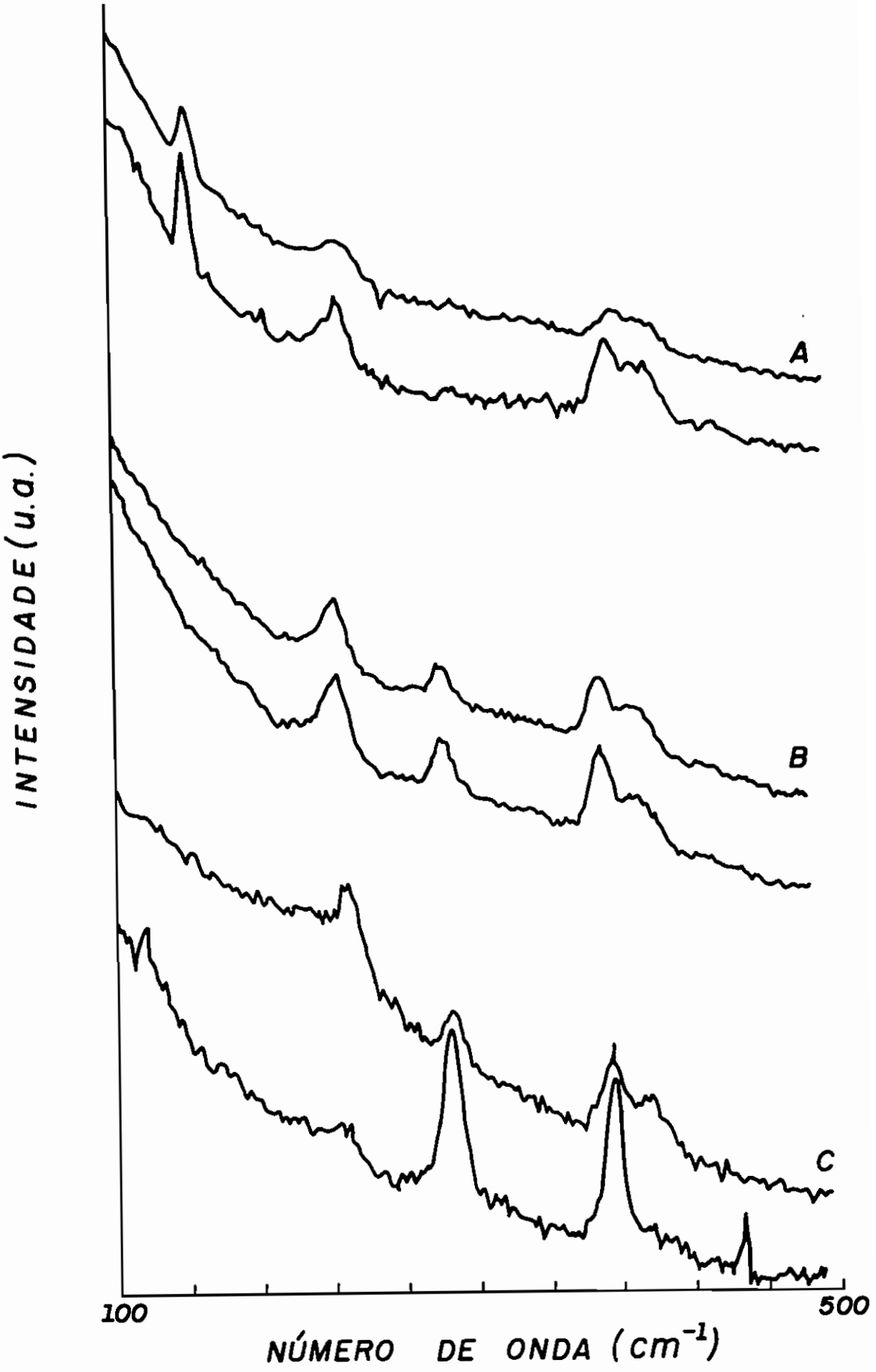


Figura IV.19 - Espectro Raman ressonante da porfirina Zn-TBzPyP (curva superior) sobreposto ao do complexo Zn-TBzPyP/melanina (curva inferior), região de 100 a 500 cm^{-1}. a) excitação em 457,9nm; b) excitação em 488,0nm: c) excitação em 514,5nm

Tabela IV.7 - Posição e intensidade de bandas do espectro Raman de Zn-TMPyP e Zn-TMPyP/melanina entre 100 e 1700 cm^{-1}, para excitação em 457,9; 488,0 e 514,5 nm

Zn-TMPyP				Zn-TMPyP/melanina				
$\Delta\nu(cm^{-1})$	Intensidade em função de λ_{exc}			$\Delta\nu(cm^{-1})$	Intensidade em função de λ_{exc}			$\Delta(\Delta\nu)$
	457,9	488,0	514,5		457,9	488,0	514,5	
1643	vs	s	m	1643	vs	s		0
1555	vs	s	s	1556	vs	s		-1
1531				1530	sh	sh		1
1517				----				
1502				1508	w	m		-6
1449	m	m	m	1454	m	m		-5
1384		w	s	1384		s		0
1353	vs	s	m	1355	vs	vs		-2
1329				1327	sh	sh		2
1300				1302	w	vs		-2
1282				----				
1255	s	s	s	1254	s	s		1
1215	vs	s	s	1219	vs	vs		-4
1193	s	m	m	1193	s	s		0
1098	w	w	w	1102	m	w		-4
1052				1056	w	w		-4
1002	s	s	s	1001	s	s		1
----				872	w	w		
866				855	w	w		11
812				813	w	w		-1
792	m	w	w	792	s	s		0
733		w	vs	734	w	vs		-1
716	w	w		717	w	sh		-1

669	w	w	w	670	m	m	-1
615	w			---			
568	w	w	w	567	m		1
~445	w,br			~444	w,br		1
406	s	m		406	s	m	0
381	s	s	m	380	s	s	1
327			w,br	---			
305	w			308	w,br	w	-3
289		w	w	289		m	0
248	w			245	w,sh		3
227	m	sh	s	226	s	s	1
220		m		---			
---				184	w	w	

br ⇒ banda larga

Tabela IV.8 - Posição e intensidade das bandas do espectro Raman de TMPyP e TMPyP/melanina, região de 100 a 1700 cm^{-1}

$\Delta\nu(cm^{-1})$	TMPyP intensidade em função de λ_{exc}			$\Delta\nu(cm^{-1})$	TMPyP/melanina intensidade em função de λ_{exc}			$\Delta(\Delta\nu)$
	457,9	488,0	514,5		457,9	488,0	514,5	
1645	m	w		1642	s	m		3
1580	sh			1580	sh			0
1556	vs	s	s	1555	s	s	s	1
1520				1535				-15
1500				1502				-2
----				1477				
1443	w	w		1451	w	w		-8
1383	w	w		1383		vs	vs	0
1368		w		1368		w		0
----				1354	w	m		
1336	w	w		1334	w	w		2
1310				----				
1296	m	w		1299	m	s	s	-3
1255	vs	s	s	1253	m	s	s	2
1219	s	m	m	1218	s	s	s	1
1190	m	w	w	1192	m	s	s	-2
1099	m	w		1101	w	w		-2
1062				1057				5
1002	s	s	s	1001	s	s	s	1
967	m	m		968	m	w		-1
808				812				-4
794	m	w		793	w	m		1
737		w		734	w	vs	vs	3
720	sh			712				8

667	w	w		668	w	w	-1
640	w	w		---			
578	w	w		577	w	w	1
---				565			
391			w,br	---			
383	w,br	vs		383	m,br	vs	0
332	m	m	m	334	w		-2
314	w			300	w,br		14?
288		vs		287		vs	1
---				224	w,br	w,br	
208	w	w	w	---			
184	w			186			-2

Tabela IV.9 - Posição e intensidade de bandas do espectro Raman ressonante de TBzPyP e TBzPyP/melanina na região de 100 a 1700 cm^{-1}

TBzPyP intensidade [$I(\lambda_{exc})$]				TBzPyP/melanina intensidade [$I(\lambda_{exc})$]				
$\Delta\nu(cm^{-1})$	457,9	488,0	514,5	$\Delta\nu(cm^{-1})$	457,9	488,0	514,5	$\Delta(\Delta\nu)$
1638	s	s	w	1638	s	m	w	0
1567	s,br	vs,br	vs,br	1568	br	br	vs,br	-1
1558	s	s	sh	1558	vs	vs	sh	0
1529	w	w	w	1529	w	w	w	0
1505	w	m	s	1506	w	m	m	-1
1460	sh	sh	s,sh	1464	w		sh	-4
1448	m	m	s,br	1450	m	m	m	-2
----				1384		vs	vs	
1371	w	w	m,br	1374	sh	m,sh		-3
----				1363	m	sh		
1357	w	w	m,br	1356	w			1
1336	w	m	s	1334		m	m	2
----				1302		s	s	
1296	m	m	w	1297	m	sh	m	-1
1250	s	s	s	1250	s	s	s	0
1215	s	s	w	1218	s	s	m	-3
1158	m,br	m,br	m,br	1161	m,br			-3
1096	w	m	m	1104	w	w	w	-8
----				1058				
1004	s	s	m	1003	s	m	w	1
969	m	s	w	969	m	w		0
812	sh	sh		814		w	w	-2
796	w	m		802		w		-6
736		w	w	735		m	vs	1
715		w	w	---				
667		w	w	669			w	-2
635		m	w	637			w	-2
579	w	w		578			w	1
556	w	w	w	558			w	-2
442	w			442	w			0
406	m,br			406	m,sh	w,sh		0
---				396	m,br			
386		m	w	386	m	m	w	0

327	m			326	w,br			1
290		s		293		m		-3
217	m	w	w	218	m	w	w	-1
109	m	m	m	109	m	m	m	0

Tabela IV.10 - Posição e intensidade de bandas do espectro Raman de Zn-TBzPyP e Zn-TBzPyP/melanina no intervalo de frequências de 100 a 1700 cm^{-1}

Zn-TBzPyP				Zn-TBzPyP/melanina				
$\Delta\nu(cm^{-1})$	intensidade [$I(\lambda_{exc})$]			$\Delta\nu(cm^{-1})$	intensidade [$I(\lambda_{exc})$]			$\Delta(\Delta\nu)$
	457,9	488,0	514,5		457,9	488,0	514,5	
1638	s	vs	s	1638	vs	s	m	0
1558	vs	s	vs	1557	s	s	s	1
1529	sh	sh	sh	1529	sh	sh	sh	0
1504	m	m	m	1503	w	m	m	1
1453	m	m	m	1453	w	w	w	0
1384		w	w	1384		m	vs	0
1355	s	s	s	1355	s	s	s	0
1301	m	m	m	1303	w	w	vs	-2
1285		sh	sh	----				
1256	s	s	s	1256	s	m	m	0
1216	vs	vs	vs	1218	s	s	s	-2
1157	s,br	s,br	s,br	1161	s	m	m	-4
1099	w	w	m	1092				7
1051	w	w	w	1055				-4
1002	s	s	s	1002	s	s	s	0
818	w	vw,sh	w	817		w		1
808	w	w	w	806				2
734		ms	m	733	vw	s	vs	1
715		sh						
669	m	wm	m	673	w	w	w	-4
632		wm	w	638				-6
577		w	w	574				3
562		w	w	557				5
444	vw			441	vw,br			3
404	w	w		401	m,br	w		3
386	m							
380		m		381	m	s		-1
288		mw	mw	287	vw	m		1
227	m	ms	ms	227	m	s		0

IV.5 - INTERPRETAÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN DOS COMPLEXOS PORFIRINA/MELANINA

Na análise do espectro Raman dos complexos porfirina/melanina, devemos levar em conta os vários fatores que possam modificar estes espectros com relação ao das respectivas porfirinas puras:

- A interação da melanina com a porfirina modifica a estrutura eletrônica desta última, deslocando a posição das bandas do espectro de absorção óptica para o vermelho. Esse deslocamento pode alterar as energias de ligação na porfirina e, consequentemente, deslocando as posições das bandas do espectro de vibração.
- Como estamos estudando o espectro Raman na condição de ressonância, a alteração do espectro de absorção pode modificar o perfil de ressonância das bandas Raman ressonantes, com alteração na relação de intensidade entre as mesmas.
- As ligações das porfirinas com a melanina podem provocar um abaixamento da simetria das primeiras, intensificando bandas que não apareciam no espectro das porfirinas isoladas.

Considerando que a interação porfirina/melanina deva se dar por interação eletrostática entre as cargas positivas dos grupos piridil das porfirinas e cargas negativas das melaninas, não se espera uma grande variação nas constantes de força das ligações do esqueleto das porfirinas. Com isso, não é previsto um grande deslocamento nas posições das bandas atribuídas a modos de estiramento do esqueleto, no plano do mesmo.

Os resultados experimentais confirmam um deslocamento muito pequeno das bandas dos espectros Raman correspondentes a modos de estiramento do macrociclo das porfirinas. Por outro lado, os espectros Raman dos quatro complexos apresentam comportamento similar em dois aspectos:

-a) Quando excitados na região da banda Soret (457,9nm), os espectros dos quatro complexos são praticamente idênticos aos das porfirinas puras.

-b) Quando excitados em 488,0 ou 514,5nm, os espectros dos complexos apresentam intensificação de três bandas em 735, 1300 e

1385 cm^{-1}. Estas bandas eram fracas ou ausentes para excitação das porfirinas puras nos mesmos comprimentos de onda.

Existe uma contradição entre a explicação que se poderia dar para a intensificação destas bandas e o deslocamento para o vermelho que a melanina provoca no espectro de absorção óptica das porfirinas. Nas porfirinas puras estas bandas são intensificadas por excitação na região da banda de absorção Q(0,1), o que está de acordo com a sua atribuição a modos de vibração das espécies de simetria B_{1g} ou B_{2g}. Com o deslocamento do espectro de absorção para o vermelho, a excitação no mesmo comprimento de onda de 488,0nm é deslocada para mais longe da banda Q(0,1) em vez de se aproximar da mesma. Com isso, a intensificação destas bandas não pode ser dada em termos de aproximação da condição de ressonância, mesmo porque outros modos de mesma espécie de simetria não são intensificados por ressonância, no complexo porfirina/melanina.

Podemos então pensar em explicar a intensificação destas bandas em termos de abaixamento da simetria no complexo com relação à simetria original das porfirinas tomadas como D_{4h}. Considerando esta interpretação poderíamos utilizar a intensificação destas bandas tanto para monitorar qualitativamente a formação do complexo porfirina/melanina quanto para discutir o desvio da simetria da própria porfirina pura.

Considerando a banda em 735 cm^{-1} como uma deformação OOP, como foi feito na seção anterior, e desde que esta banda é muito fraca nas porfirinas de base livre e forte nas zinco-porfirinas, com excitação em 514,5nm, podemos supor que estas porfirinas têm um desvio com relação à planicidade maior que nas de base livre. Isto implica que o átomo de zinco deve estar fora do plano do macrociclo ou ainda estar ligado na quinta coordenação, por exemplo, a uma molécula de água.

Para a região espectral de 100 a 500 cm^{-1}, as mudanças nos espectros Raman, quanto à intensificação de bandas é muito mais drástica, a ponto de em alguns casos os espectros do complexo porfirina/melanina e da respectiva porfirina pura serem totalmente diferentes entre si. A interpretação do espectro Raman ressonante das porfirinas nessa região espectral já é bastante complexa justamente pelo fato de que nesta região ocorrem os modos de deformação tanto no plano quanto fora do plano do macrociclo. Também nesta região não observamos deslocamento significativo na posição das bandas do espectro Raman, indicando que no complexo

não ocorre uma grande alteração na estrutura eletrônica das porfirinas. Por outro lado, a variação de intensidade das bandas nos complexos, além do aparecimento de outras bandas é indicativo de alteração na simetria das porfirinas. Uma tentativa de atribuição para as bandas observadas nos complexos nessa região seria totalmente especulativa, portanto podemos afirmar, a princípio, que estas bandas são indicativas da deformação do esqueleto das porfirinas com relação à planicidade.

V. FLUORESCÊNCIA DE PORFIRINA E DOS COMPLEXOS PORFIRINA/MELANINA

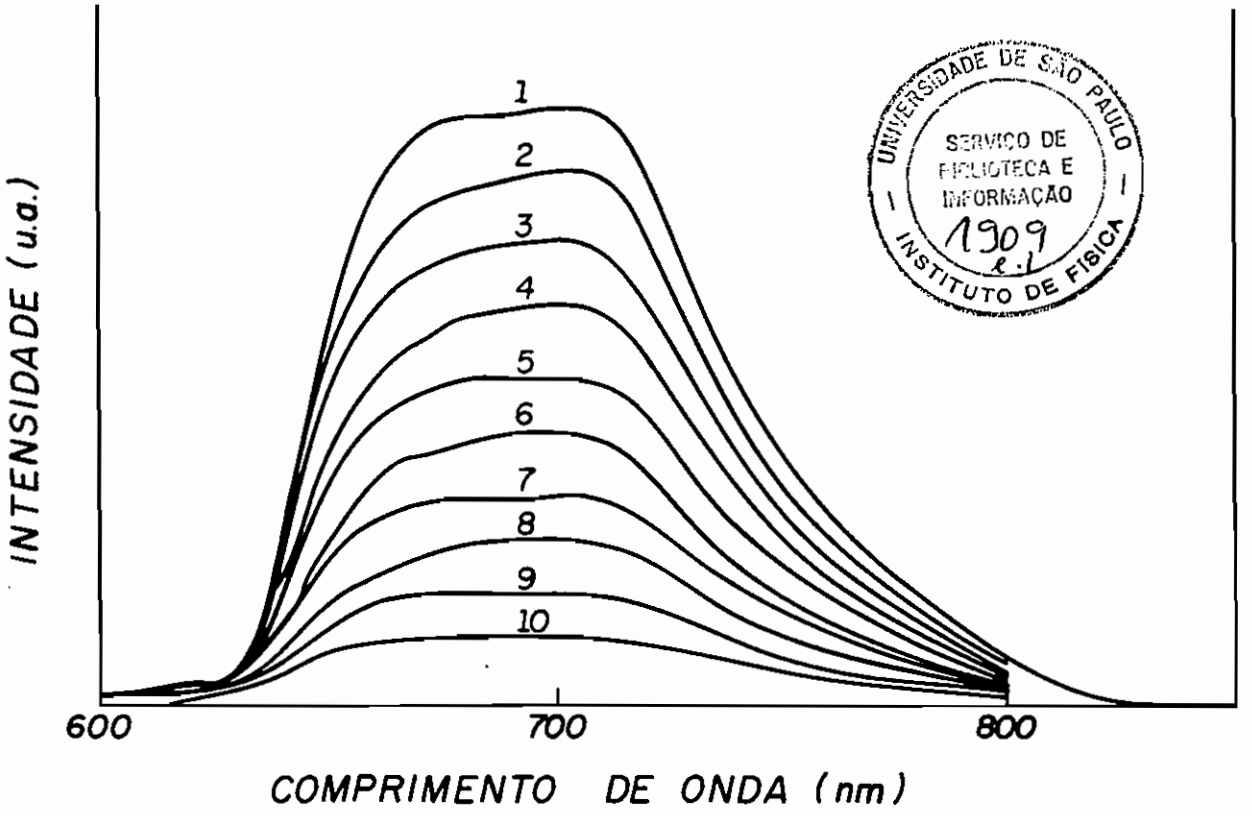
FLUORESCÊNCIA ESTÁTICA

Os espectros de emissão fluorescente das quatro porfirinas estudadas neste trabalho são mostradas nas figuras V.1 a V.4. Cada figura mostra uma série de curvas correspondendo às várias concentrações de melanina. Os espectros das porfirinas Zn-TMPyP e Zn-TBzPyP mostram um "vale" em aproximadamente 630nm devido a um problema de ganho do espectrofluorímetro nessa região.

FLUORESCÊNCIA COM RESOLUÇÁO TEMPORAL

Nas figuras V.5 e V.6 são mostradas as qualidades de ajustes para as curvas de decaimento das porfirinas TMPyP e Zn-TMPyP puras e em soluções porfirina/melanina, em ajustes para duas e três exponenciais. As curvas de decaimento da TBzPyP e TBzPyP/melanina mostram comportamento semelhante às análogas de TMPyP. O decaimento da Zn-TBzPyP e Zn-TBzPyP/melanina mostram uma variação do tempo de vida com o comprimento de onda de emissão, o que é atribuído à contaminação da Zn-TBzPyP pela base livre TBzPyP.

Nas tabelas V.1 a V.4 são mostrados os tempos de vida para as quatro porfirinas, em ajustes para duas e três exponenciais, em função da concentração total de melanina na solução. Também são mostradas as relações entre as intensidades de fluorescência das porfirinas puras (I_0) e de soluções pofirina/melanina (I).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
SERVIÇO DE BIBLIOTECA E INFORMAÇÃO
1909
INSTITUTO DE FÍSICA

FIGURA V.1 - Espectro de fluorescência da porfirina TMPyP (10μg/ml) para várias concentrações de melanina (μg/ml). Curvas (1) 0,0 (2) 1,6 (3) 3,3 (4) 5,0 (5) 6,5 (6) 8,1 (7) 10,0 (8) 11,5 (9) 13,0

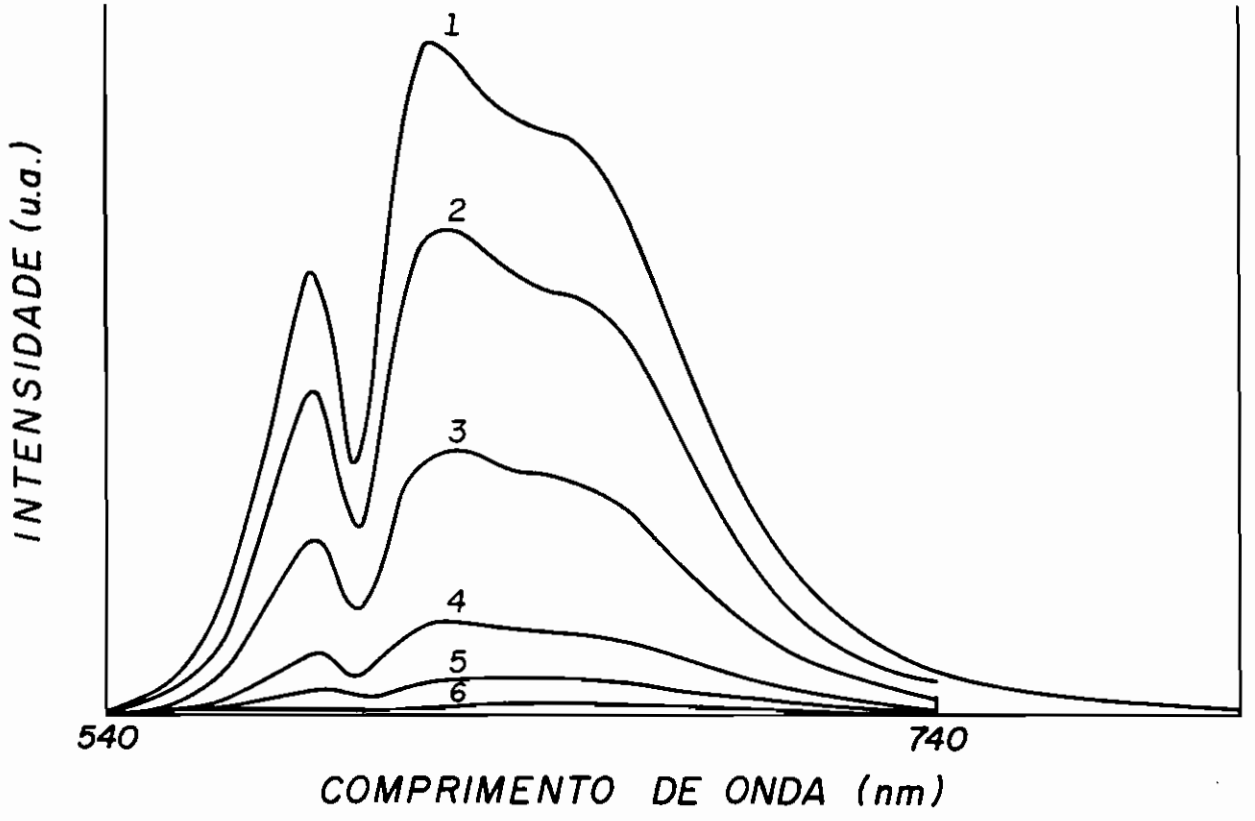


FIGURA V.2 - Fluorescência da porfirina Zn-TMPyP (12 μg/ml) para várias concentrações de melanina (μg/ml). Curvas (1) 0,0 (2) 5,0 (3) 15,0 (6) 18,0 (7) 24,0

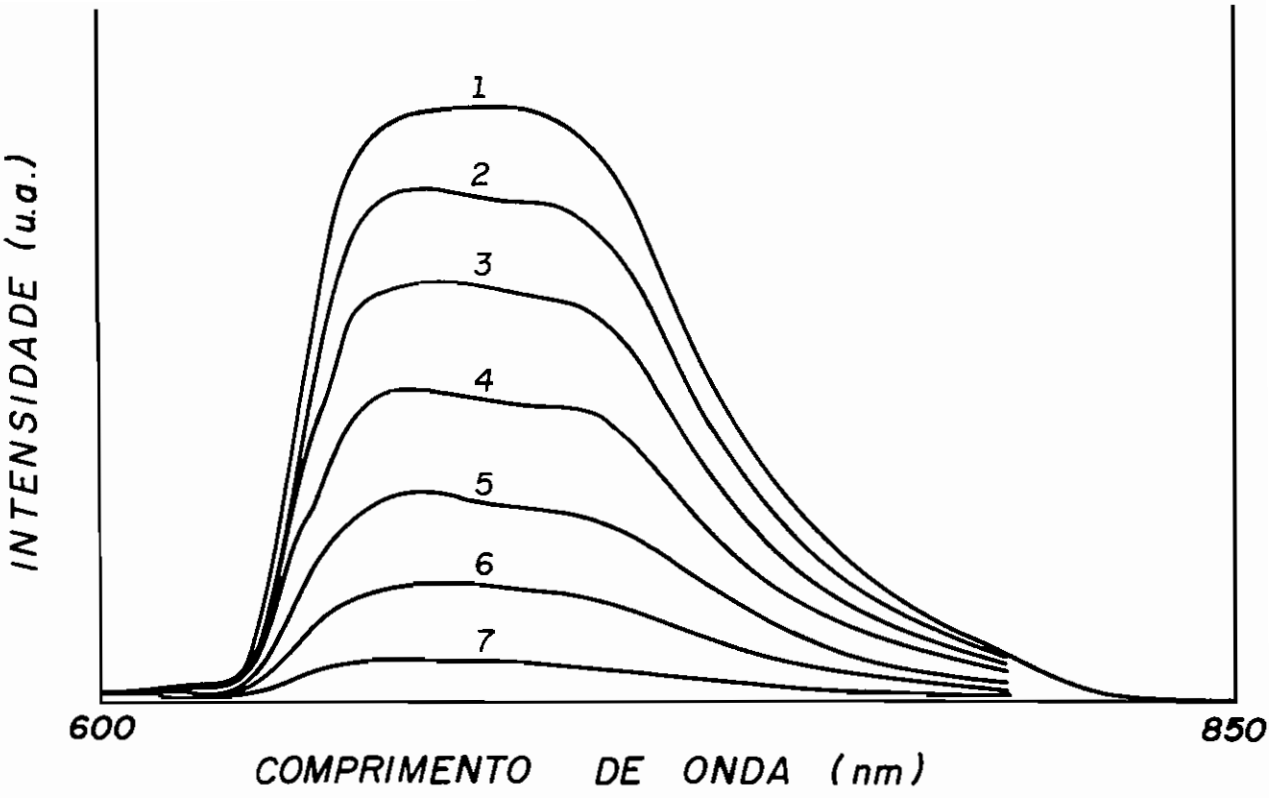


FIGURA V.3 - Fluorescência de TBzPyP (10 µg/ml) em várias concentrações de melanina (µg/ml). Curvas (1) 0,0 (2) 2,0 (3) 4,0 (4) 6,0 (5) 8,0 (6) 10,0 (7) 12,0

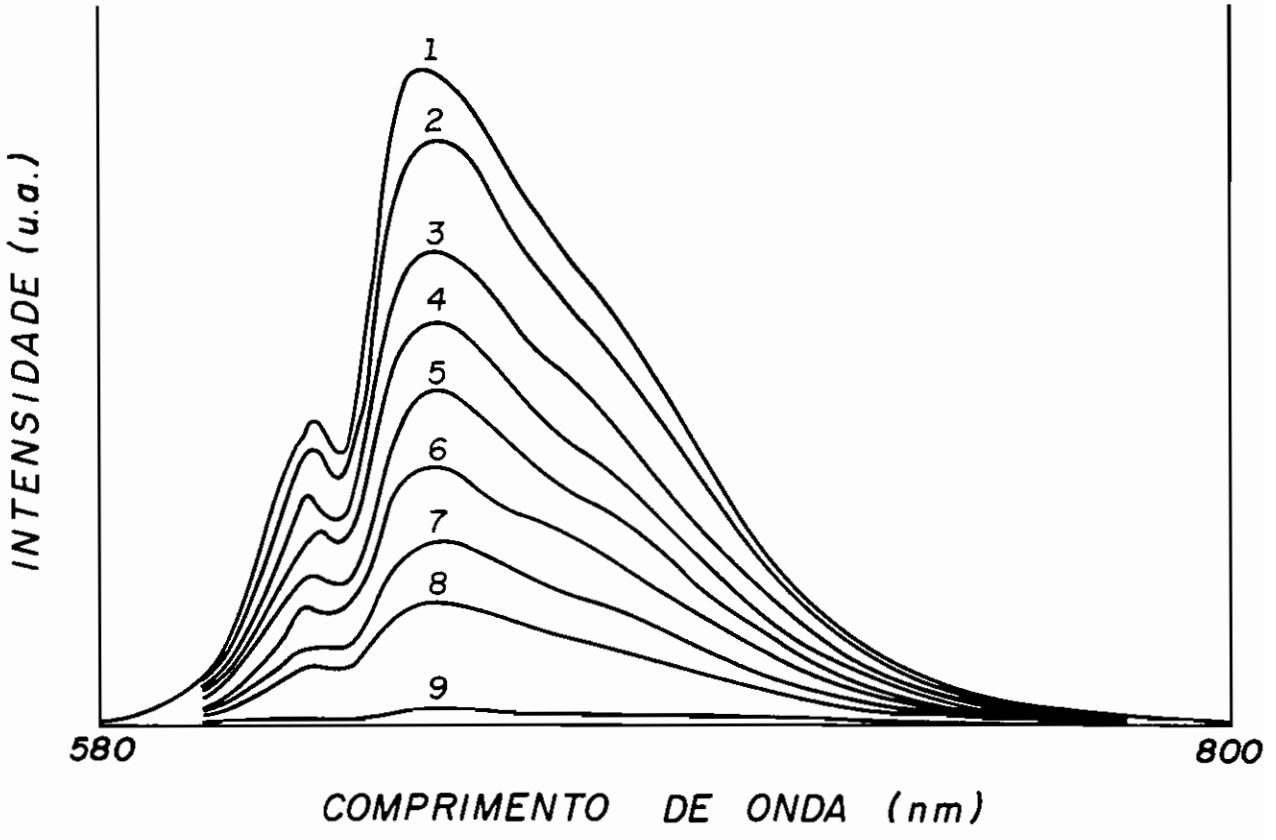


Figura V.4 - Fluorescência de Zn-TBzPyP (10µg/ml) para várias concentrações de melanina (µg/ml)

curva (1)0,0 (2)3,0 (3)6,0 (4)9,0 (5)12,0 (6)15,0 (7)18,0 (8)21,0 (9)27,0

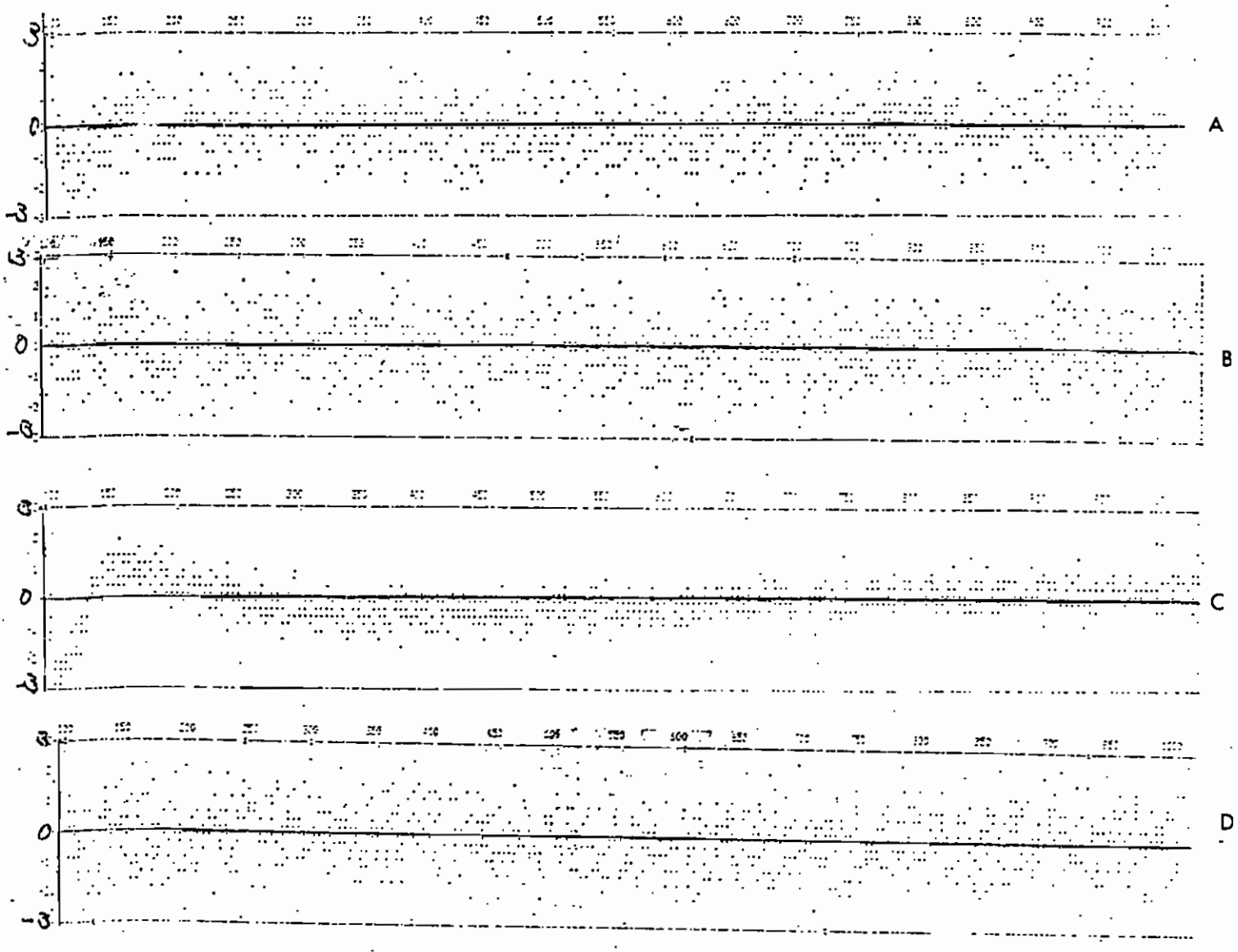


Figura V.5 - Distribuição de resíduos de ajuste do decaimento da porfirina TMPyP (10µg/ml) e TMPyP/melanina

(a) TMPyP 2 exponenciais

(b) TMPyP 3 exponenciais

(c) TMPyP + melanina (20µg/ml) 2 exponenciais

(d) TMPyP + melanina (20µg/ml) 3 exponenciais

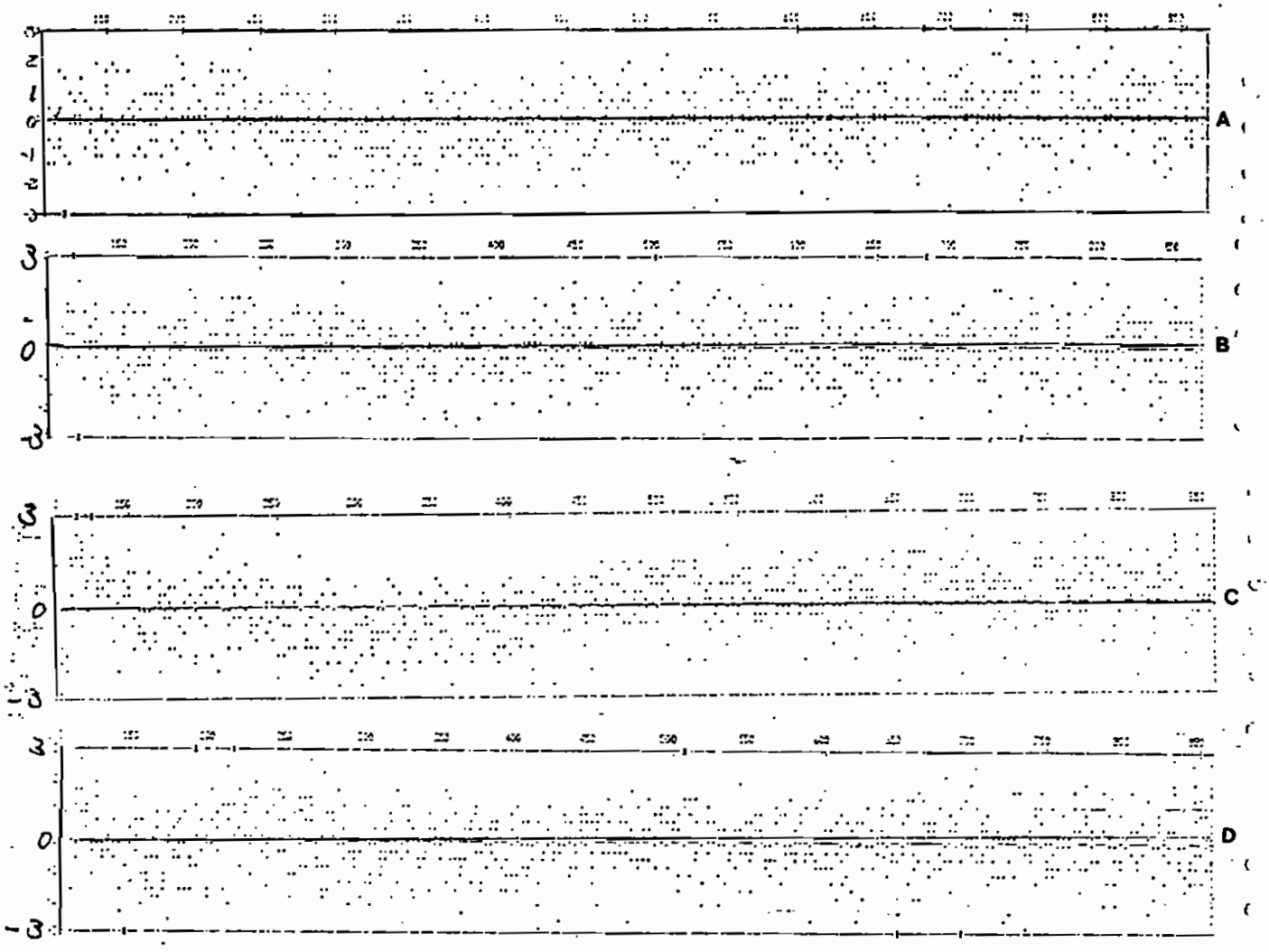


Figura V.6 - Distribuição de resíduos de ajuste do decaimento da porfirina Zn-TMPyP (12µg/ml) e Zn-TMPyP/melanina

(a) Zn-TMPyP 2 exponenciais

(b) Zn-TMPyP 3 exponenciais

(c) Zn-TMPyP + melanina (24µg/ml) 2 exponenciais

(d) Zn-TMPyP + melanina (24µg/ml) 3 exponenciais

Tabela V.1 - Tempos de vida, contribuição da componente e variação de intensidade (I_o/I) da porfirina TMPyP em várias concentrações de melanina. λ_{exc} = 586nm; λ_{emis} = 675nm

[melanina] (μg/ml)	I_o/I	tempos de vida(ns)			contribuição da componente(%)		
		τ_1	τ_2	τ_3	F_1	F_2	F_3
0	1,00	5,016	1,435	0,048	92	8	0
1,6	1,10						
3,3	1,30						
5,0	1,50	5,004	1,412	0,028	90	10	0
6,5	1,90						
8,1	2,20						
10,0	2,80	5,000	1,338	0,009	90	9	0
11,5	3,60						
13,0	5,40						
14,5	9,30						
15,0		5,000	1,310	0,003	91	9	1
20,0		4,990	1,300	0,002	89	9	1

Tabela V.2 - Tempos de vida, contribuição da componente e variação de intensidade (I_0/I) da porfirina Zn-TMPyP em várias concentrações de melanina. λ_{exc} = 580nm; λ_{emis} = 650nm

[melanina] (μg/ml)	I_0/I	tempos de vida			contr. da componente(%)		
		τ_1	τ_2	τ_3	F_1	F_2	F_3
0	1,00	1,372	1,110	0,008	65	36	0
5	1,25						
6		1,298	0,862	0,120	95	5	0
10	2,50						
12		1,313	0,880	0,057	91	8	1
15	7,10						
18		1,298	0,589	0,021	95	4	1
24	71,9	1,310	0,762	0,004	90	3	7

Tabela V.3 - Tempos de vida, contribuição da componente e variação de intensidade (I_o/I) da porfirina TBzPyP em várias concentrações de melanina. λ_{exc} = 586nm; λ_{emis} = 675nm

[mel] (µg/ml)	I_o/I	tempo de vida(ns) τ_1	τ_2	τ_3	contr. componente(%) F_1	F_2	F_3
0	1,00	4,184	1,661	0,254	88	11	2
2	1,14						
4	1,45						
6	2,00	4,151	1,765	0,079	89	11	0
8	3,10						
12	16,0	4,169	1,914	0,057	87	13	1
18		4,098	1,700	0,037	88	11	1
24		4,110	1,713	0,002	86	12	2

Tabela V.4 - Tempos de vida, contribuição da componente e variação de intensidade(I_o/I) da porfirina Zn-TBzPyP em várias concentrações de melanina. λ_{exc} = 566nm; λ_{emis} = 620nm

[mel] (µg/ml)	I_o/I	tempo de vida(ns) τ_1	τ_2	contr. componente(%) F_1	F_2
0	1,00	1,167	0,042	99	1
3	1,12				
5		1,168	0,063	99	1
6	1,38				
10		1,168	0,001	96	4
15	3,06	1,169	0,003	94	6
21	5,29				
27	39,3				

V.1- SOBRE A ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

O ESPECTRO DE EMISSÃO DE UMA MOLÉCULA "SIMPLES"

O fenômeno de emissão (fluorescência e fosforescência) é observado em muitas substâncias aromáticas e envolve essencialmente transições dos elétrons-π dessas substâncias. Para as moléculas mais simples, o espectro de fluorescência pode ser representado esquematicamente pela participação de um estado singleto fundamental S_0 , um estado singleto excitado S_1 , um estado tripleto excitado T_1 e as componentes vibrônicas destes estados (os estados de Franck-Condon). Neste caso, o espectro de emissão é aproximadamente uma imagem especular do espectro de absorção.

De S_1 o sistema pode decair para o estado fundamental $S_1 \Rightarrow S_0$ seja por emissão de um fóton (fluorescência), com taxa de decaimento k_f ou por processo não radiativo com constante k_1, onde k_f é equivalente à probabilidade de emissão espontânea k_e. Ainda de S_1 o sistema pode se converter de singleto em tripleto através da transição não radiativa $S_1 \Rightarrow T_1$ com taxa k_2. De T_1 o sistema pode decair para o estado fundamental pela transição $T_1 \Rightarrow S_0$ por processo não radiativo com taxa k_3 ou por emissão de fóton (fosforescência) com taxa de decaimento k_p. Ainda do estado T_1 pode haver uma repopulação do estado S_1 através do cruzamento intersistema $T_1 \Rightarrow S_1$ com taxa k_{-2}. A representação esquemática das etapas envolvidas no processo de emissão é mostrada no diagrama de Jablonski da figura V.7.

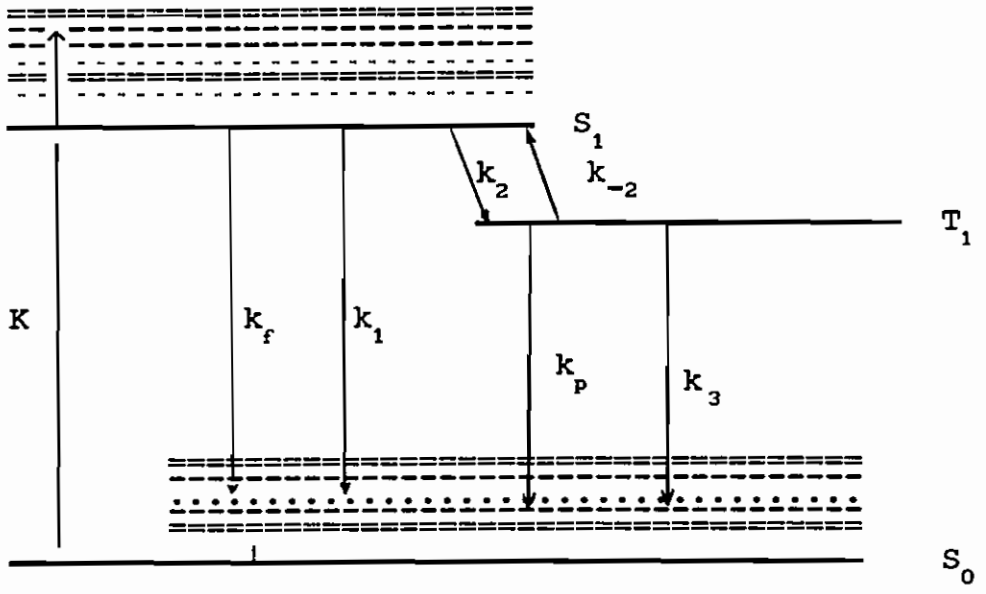


Figura V.7 - Diagrama de Jablonski simplificado da fluorescência

Geralmente existe uma diferença muito grande entre as meias-vidas dos estados singleto τ_f entre 10^{-7} a 10^{-10}s e estados tripleto $\tau_p \gg 10^{-6}$s. Dependendo de τ_p e da distância e acoplamento entre os estados T_1 e S_1, a repopulação de S_1 via cruzamento intersistema $S_1 \leftarrow T_1$ pode se tornar significativa e provocar a chamada fluorescência atrasada. De acordo com o diagrama de Jablonski, a cinética de excitação e emissão de um sistema de moléculas pode ser descrita pelas três equações a seguir [51]:

$$dS_0/dt = -kS_0 + (k_f + k_1)S_1 + (k_p + k_3)T_1 \qquad (V.1)$$

$$dS_1/dt = kS_0 - (k_f + k_1 + k_2)S_1 + k_{-2}T_1 \qquad (V.2)$$

$$dT_1/dt = k_2S_1 - (k_p + k_3 + k_{-2})T_1 \qquad (V.3)$$

Em regime estacionário (iluminação contínua) a população média dos estados excitados é constante e temos:

$dS_0/dt = dS_1/dt = dT_1/dt = 0$

com isto as equações V.1 a V.3 tornam-se:

$$kS_0 = (k_f + k_1)S_1 + (k_p + k_3)T_1 \qquad (V.4)$$

$$kS_0 = (k_p + k_1 + k_2)S_1 - k_{-2}T_1 \qquad (V.5)$$

$$k_2S_1 = (k_p + k_3 + k_{-2})T_1 \Rightarrow T_1 = (k_2S_1)/(k_p + k_3 + k_{-2}) \qquad (V.6)$$

Substituindo T_1 em a' ou b', temos:

$$kS_0 = \left[(k_f + k_1) + \frac{(k_p + k_3)k_2}{k_p + k_3 + k_{-2}} \right] S_1 =$$

$$= \frac{(k_f + k_1 + k_2)(k_p + k_3) + k_{-2}(k_f + k_1)}{k_p + k_3 + k_{-2}} S_1 \qquad (V.7)$$

Mas S_0 é o total de moléculas excitadas e k_fS_1 é o total de moléculas que fluorescem. Definimos o rendimento quântico φ_f para a fluorescência como:

$$\varphi_f = (k_fS_1)/(kS_0) = \frac{k_f(k_p + k_3 + k_{-2})}{(k_f + k_1 + k_2)(k_p + k_3) + k_{-2}(k_f + k_p)} \qquad (V.8)$$

Analogamente, eliminando S_1 em V.4 ou V.5 e substituindo em V.6, temos o rendimento quântico φ_p para a fosforescência:

$$\varphi_p = \frac{k_2k_p}{(k_f + k_1 + k_2)(k_p + k_3) + k_{-2}(k_f + k_1)} \qquad (V.9)$$

Em sistemas onde a taxa de repopulação de S_1 via cruzamento intersistema k_{-2} é negligenciavel, as fórmulas para os rendimentos quânticos ϕ_f e ϕ_p reduzem-se simplesmente a:

$$\varphi_f = \frac{k_f}{k_f + k_1 + k_2} \qquad (V.10)$$

$$\varphi_p = \frac{k_2 k_p}{(k_f + k_1 + k_2)(k_p + k_3)} \qquad (V.11)$$

Podemos resolver as equações de emissão fluorescente e fosforescente, partindo de uma condição de não iluminação (k=0) imediatamente após um pulso de luz que popula o estado S_1. Nessas condições podemos escrever as equações V.2 e V.3 como:

$$\frac{dS_1}{dt} = -(k_f + k_1 + k_2)S_1 + k_{-2}T_1 \qquad (V.12)$$

$$\frac{dT_1}{dt} = k_2 S_1 - (k_p + k_3 + k_{-2})T_1 \qquad (V.13)$$

Se a taxa de repopulação k_{-2} tiver origem unimolecular, não envolvendo processos de colisões ou interações com o meio, as soluções das equações acopladas V.12 e V.13 são dadas por:

$$S_1(t) = S_1^{\circ}\left(1 - \frac{\hat{k}}{k_f^*}\right) e^{-(k_f^* + \hat{k})t} + S_1^{\circ}\frac{\hat{k}}{k_f^*} e^{-(k_p^* - \hat{k})t} \qquad (V.14)$$

$$T_1(t) = \frac{S_1^{\circ} k_2}{k_f^*}\left[e^{-(k_p^* - \hat{k})t} - e^{-(k_f^* + \hat{k})t} \right] \qquad (V.15)$$

onde

$$k_f^* = k_f + k_1 + k_2 \quad e \quad k_p^* = k_p + k_3 + k_{-2}$$

$$\hat{k} = 1/2\left\{ \left[(k_f^* - k_p^*)^{1/2} + 4k_2k_{-2} \right] - (k_f^* - k_p^* \right\}$$

O termo k_{-2} embutido em $\hat{k}$ dá a repopulação de S_1 a partir de T_1 e é responsável pela fluorescência atrasada, uma componente da emissão fluorescente cujo tempo de vida é essencialmente aquele da fosforescência. É importante notar que as equações (V.14) e (V.15) descrevem um processo de desexcitação monomolecular que é válido no limite de soluções diluídas onde se pode desprezar os efeitos das colisões moleculares. Esta análise tampouco leva em conta as interações das moléculas com o ambiente.
No limite para $k_{-2} \Rightarrow 0$, também $\hat{k} \Rightarrow 0$ e as equações para a fluorescência e fosforescência tornam-se desacopladas:

$$S_1 = S_1^0 \, e^{-k_f^* t} \qquad (V.16)$$

$$T_1 = \frac{S_1^0 \, k_2}{k_f^*} \, e^{-k_p^* t} \qquad (V.17)$$

Na maioria dos sistemas reais, a taxa k_{-2} de repopulação de S_1 a partir de T_1 é muito pequena, além do que fluorescência atrasada ocorre numa escala de tempo muito maior que a da fluorescência normal. Deste modo, as equações para a emissão podem ser escritas como em (V.16) e (V.17) sem se cometer erro considerável.

O MODELO PARA O ESPECTRO DE FLUORESCÊNCIA DAS PORFIRINAS

O espectro de emissão das porfirinas é mais complexo pois as mesmas têm um espectro de absorção óptica muito particular, como vimos no capítulo III. A interpretação do espectro de fluorescência deve levar em conta os detalhes do espectro de absorção.

Consideremos algumas evidências experimentais que devem ser levadas em conta no processo de absorção/emissão das porfirinas:

a) Qualquer que seja o estado excitado na absorção, a

fluorescência se dá sempre a partir do estado singleto de energia mais baixa. As tentativas de se observar o "espectro de emissão da banda Soret" têm sido mal sucedidas.

b) Nas porfirinas de base livre, onde o estado e_g $(c_1=c_2)$ se desmembra em b_{2g} e b_{3g}, a fluorescência é uma imagem especular da banda Q_x, de energia mais baixa. Não tem sido observado o espectro de emissão correspondente à banda Q_y.

Comecemos analisando o espectro de fluorescência da metaloporfirina, que aparentemente é mais simples que o da base livre.

Nas metaloporfirinas os dois orbitais moleculares superiores ocupados (HOMO) são próximos em energia e são bastante misturados por interação de configuração. Os estados excitados podem ser ocupados a partir de qualquer dos estados definidos por esses dois orbitais. Com isso, para as porfirinas não podemos definir um "estado fundamental" no sentido usual do termo. De acordo com o modelo de Gouterman, a banda Soret e a banda Q vêm de transições dos estados a_{2u} e a_{1u} para o mesmo estado degenerado e_g. Considerando a fluorescência como uma propriedade do estado excitado, deveríamos observar a fluorescência tanto a partir da banda Q quanto da banda Soret. Na literatura não encontramos uma explicação de porque se observa apenas a transição $e_g \Rightarrow a_{1u}$ e não a transição $e_g \Rightarrow a_{2u}$, que seria responsável pela fluorescência da banda Soret.

Neste trabalho, é proposta uma explicação simples para a fluorescência da metaloporfirina, considerando a participação de dois elétrons no processo e usando alguma analogia com a luminescência dos semicondutores.

Podemos supor que a excitação da molécula na banda Soret gera a deficiência de um elétron no orbital a_{2u}, que é energeticamente inferior ao orbital a_{1u}. Essa deficiência de elétron é equivalente ao "buraco" gerado na banda de valência de um semicondutor ao se arrancar um elétron para a banda de condução. Devido à forte interação de configuração entre os estados a_{1u} e a_{2u}, imediatamente após a excitação da molécula, um elétron "decai" de a_{1u} para a_{2u}, transportando o "buraco" para o orbital a_{1u}. Por "imediatamente", é suficiente pensarmos numa escala de

tempo de picossegundos, a ordem de grandeza envolvida nos processos de conversão interna.

Quando o sistema decai de e_g , o orbital a_{2u} já está ocupado, restando o orbital a_{1u} como o único caminho para desativação fluorescente do estado excitado. Esse processo é mostrado esquematicamente na figura V.8.

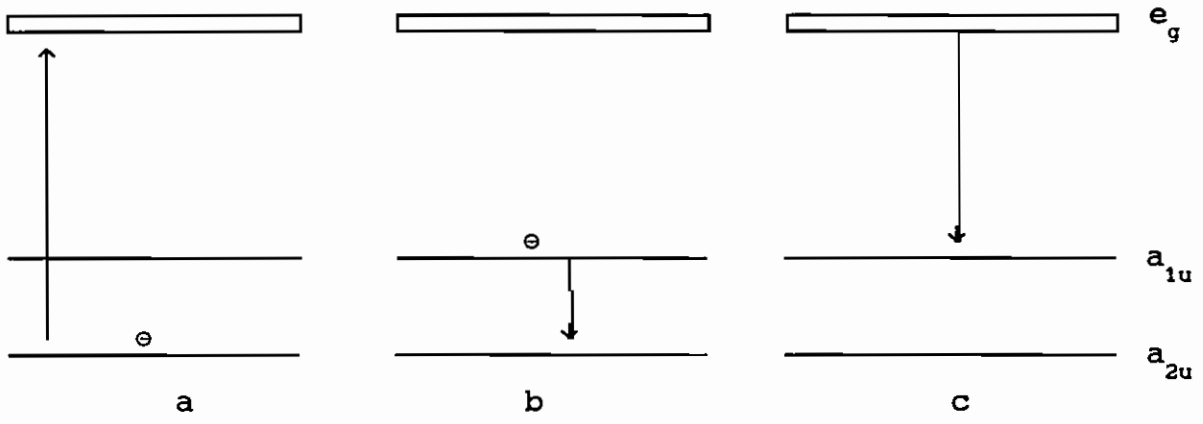


Figura V.8 - Modelo para o espectro de fluorescência de uma metaloporfirina

a) absorção de um fóton com excitação na banda Soret, criando um buraco no orbital a_{2u}

b) rearranjo dos orbitais a_{1u} e a_{2u} , com o buraco indo para o orbital superior

c) emissão de um fóton na região da banda Q, com o sistema decaindo para o "estado fundamental" a_{1u}.

Nas porfirinas de base livre devemos ter em conta que o orbital e_g não é mais degenerado, levando aos orbitais b_{2g} (superior) e b_{3g} (inferior). Os resultados experimentais mostram que a emissão fluorescente se dá apenas a partir do orbital b_{3g}, pois a forma do espectro de emissão é a mesma para excitação nas bandas Q_x , Q_y ou na banda Soret. Isso mostra que se o sistema é levado ao orbital b_{2g} , decai para b_{3g} por um processo de conversão interna num intervalo de tempo suficientemente curto para minimizar a fluorescência com origem em b_{2g} .

A partir destas constatações e usando as considerações feitas no caso das metaloporfirinas, podemos construir um "Diagrama de

Jablonski modificado" para fluorescência de uma porfirina de base livre, quando excitada na região da banda Soret. Este diagrama é mostrado na figura V.9, onde não consideramos a participação dos estados tripleto no processo de emissão da porfirina. Como podemos observar neste diagrama, para a absorção óptica podemos chamar de estado fundamental ao estado A_{2u} , a partir do qual o sistema é excitado. Já para a fluorescência, o estado fundamental deveria ser atribuído ao estado A_{1u} , onde termina o processo.

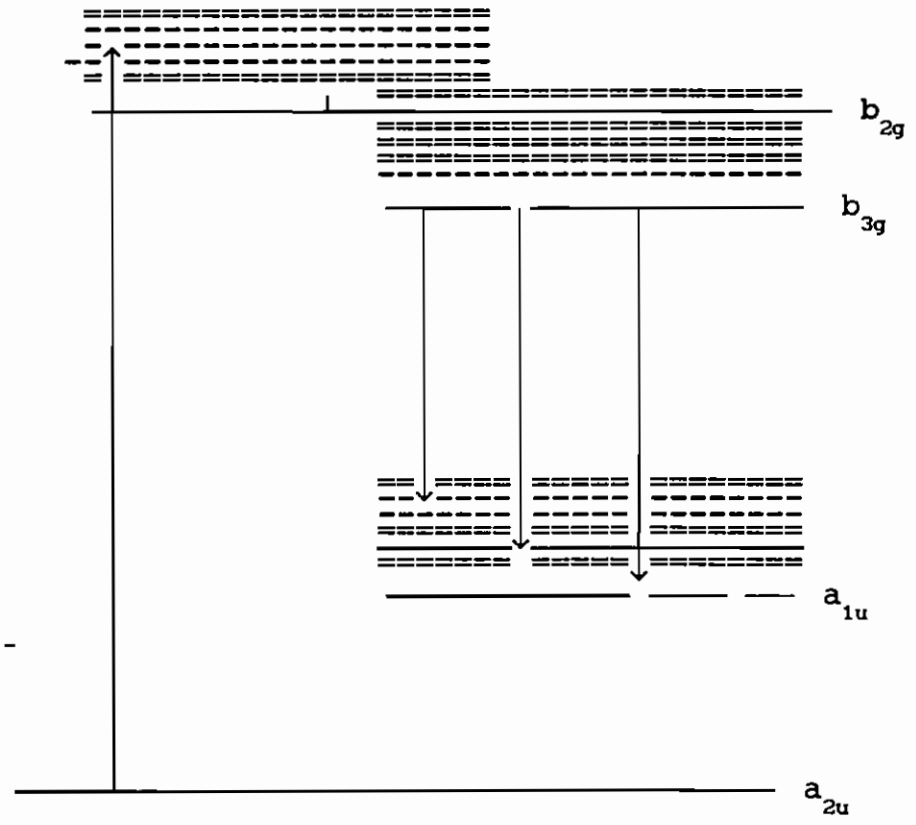


Figura V.9 - "Diagrama de Jablonski" da fluorescência de uma porfirina de base livre, excitada na banda Soret

De um modo geral, para estudarmos as propriedades do espectro de emissão de uma porfirina, é suficiente considerarmos como origem de todo o processo a população do estado e_g (nas metaloporfirinas) ou b_{3g} (na porfirina de base livre). Neste caso, não é relevante se o estado foi populado a partir de a_{2u} (excitação na banda Soret) ou de a_{1u} (excitação na banda Q).

Podemos designar o estado B_{3g} (ou E_g) como S_1, o "primeiro estado singleto excitado" e o estado A_{1u} como S_0 , o estado fundamental da porfirina.

Esta interpretação do espectro de fluorescência das porfirinas pode ser usada para explicar o "fundo contínuo" que aparece nos espectros Raman dessas moléculas.

Nas Zn-porfirinas obteve-se sem problemas os espectros Raman ressonantes com excitação na região do violeta (457,9 nm) ao verde (514,5 nm). Para as porfirinas de base livre o espectro com excitação em 514,5 nm apresenta um fundo contínuo que mascara a intensidade das bandas do espectro Raman.

Comparando esses comprimentos de onda com os espectros de absorção óptica dessas moléculas, observamos que no caso das metaloporfirinas tanto a excitação quanto a radiação espalhada ($\nu_{ex} - \Delta\nu_{Raman}$) ocorrem no intervalo de energia entre a banda Soret e a banda Q(0,1). Nas porfirinas de base livre, para excitação no violeta e no azul (488,0 nm), o espectro Raman também cai entre os máximos das bandas Soret e da banda $Q_y(0,1)$. Já para excitação em 514,5 nm, a varredura do espectro Raman é feita no intervalo de energia entre as bandas $Q_y(0,1)$ e $Q_y(0,0)$.

Podemos interpretar esse fundo como uma "fluorescência rápida" ou uma fluorescência que é emitida a partir de uma configuração de não equilíbrio entre os estados B_{3g} e B_{2g} . A não observação deste tipo de fluorescência com varredura do espectro Raman seria devido a que a aniquilação do par "elétron-buraco" entre os estados A_{1u} e A_{2u} ocorreria num tempo muito menor que o tempo de relaxamento dos estados vibracionais excitados.

A SUPRESSÃO DA FLUORESCÊNCIA

Como já vimos anteriormente, a fluorescência de uma substância isolada corresponde ao decaimento do estado singleto excitado:

$$\frac{dS_1^*}{dt} = -(k_f + k_{nr})S_1 = -(1/\tau_f')S_1 \qquad (V.18)$$

que podemos escrever em termos da concentração da substância em questão, que chamaremos de agora em diante de doador (D).

$$\frac{d[D^*]}{dt} = -(k_f + k_{nr})[D^*] = -(1/\tau_f^o)[D^*] \qquad (V.19)$$

A presença de uma substância aceptora de energia na solução (que chamaremos de substância A) pode criar outros mecanismos de desativação do estado excitado D^* da molécula doadora. A esses mecanismos adicionais não fluorescentes de desativação de D^* chamamos de supressão dinâmica de fluorescência . Por outro lado, se as moléculas A e D formarem alguma espécie de agregado no estado fundamental, temos que levar em conta este "quenching estático" provocado pela retirada de moléculas livres D da solução. Este tipo de complexos no estado fundamental ocorre com muita frequência entre substâncias iônicas com cargas de sinais contrários.

No caso de ocorrer simultaneamente supressões de fluorescência por processos estático e dinâmico, com fluorescência do complexo formado, a cinética de desativação do estado excitado pode tornar-se complicada.

No caso geral, as etapas envolvidas no processo de excitação/desexcitação do sistema doador/aceptor podem ser agrupadas como segue [60]:

I) $D + h\nu \xrightarrow{I\delta} D^*$ (excitação de D por absorção de um fóton de enegia $h\nu$)

II) $D^* \xrightarrow{k_f} D + h\nu'$ (fluorescência de D^*)

III) $D^* \xrightarrow{k_{nr}} D$ + calor (decaimento não radiativo de D^*)

IV) $D^* + A \longrightarrow D + A^*$ (supressão por transferência de energia)

V) $D^* + A \xrightarrow{k_1} (D\text{---}A)^*$ (formação de complexo no estado excitado, "exciplex")

VI) $D + A \xrightarrow{K} (D\text{--}A)$ (formação de complexo no estado fundamental)

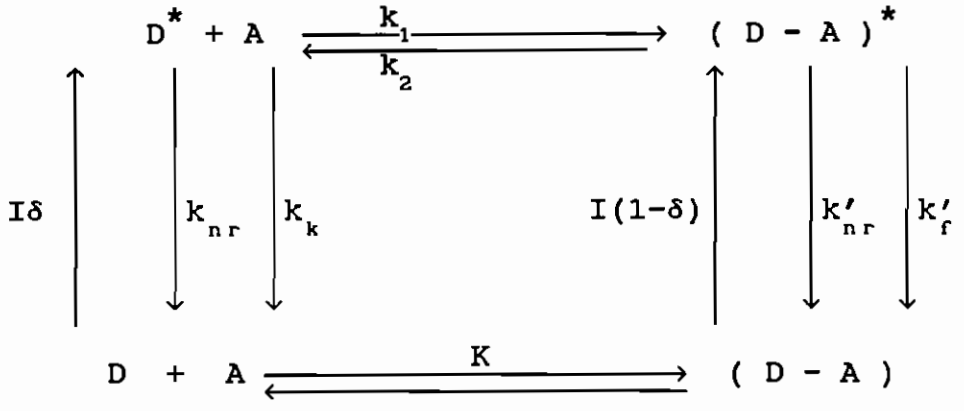
VII) $(D\text{--}A) + h\nu \xrightarrow{I(1-\delta)} (D\text{--}A)^*$ (excitação do complexo)

VIII) $(D\text{--}A)^* \xrightarrow{k'_f} (D\text{--}A) + h\nu''$ (fluorescência do complexo)

IX) $(D\text{--}A)^* \xrightarrow{k'_{nr}} (D\text{--}A)$ + calor (decaimento não radiativo do complexo $(D\text{--}A)^*$)

X) $(D\text{--}A)^* \dashrightarrow D^* + A$ (dissociação do exciplex)

As etapas I-IX podem ser visualizadas no esquema abaixo [66]



Neste esquema geral, a solução do problema da supressão de fluorescência leva a uma equação com um grande número de parâmetros, dificultando a análise do processo como um todo. Não

levando em conta a possibilidade de formação de exciplex, o número de parâmetros reduz-se bastante.

Neste caso, é ainda ilustrativo partir da situação mais simplificada, o que permite uma compreensão razoável da supressão da fluorescência.

Analisaremos as seguintes situações:

1) - Não ocorre a formação de complexo no estado fundamental (K=0)

2) - Ocorre a formação de complexo no estado fundamental, mas o mesmo não é fluorescente

3) - Há a formação de complexo no estado fundamental, e tanto este como o doador podem emitir independentemente

1) No primeiro caso, a supressão de fluorescência ocorre devido ao chamado "quenching dinâmico". Esse processo é limitado pela difusibilidade das moléculas na solução, sendo portanto dependente da viscosidade do meio e da concentração do aceptor.

Despresando a absorção do aceptor no comprimento de onda de excitação, a equação (V.19) pode ser escrita neste caso como:

$$\frac{dD^*}{dt} = k_{ex}D - (k_f + k_{nr} + k_Q[A])\, D^* \qquad (V.20)$$

Resolvendo esta equação para o estado estacionário temos:

$$k_{ex}D = \left\{ k_f + k_{nr} + k_Q[A] \right\} D^* \qquad (V.21)$$

A eficiência quântica da fluorescência na ausência e na presença do aceptor é dada por:

$$\varphi_o = k_f/(k_f + k_{nr}) \propto I_o$$

$$\varphi = k_f/(k_f + k_{nr} + k_Q[A]) \propto I$$

$$\varphi_o/\varphi = I_o/I = 1 + \tau_0 k_Q[A] = 1 + K_{sv}[A] \qquad (V.22)$$

onde $K_{sv} = \tau_0 k_Q$ é a contante de Stern-Volmer
I_0/I é a relação entre as intensidades de fluorescência da porfirina isolada e da solução porfirina/melanina.

Resolvendo a equação (V.20) para condições de ausência de luz tem-se:

$$dD^*/dt = -\left\{k_f + k_{nr} + k_Q[A]\right\} = -(1/\tau)D^*$$

na ausência de A:

$$dD^*/dt = -\{k_f + k_{nr}\}D^* = (1/\tau_o)D^*$$

$$\tau_0/\tau = 1 + \tau_0 k_Q[A] = 1 + K_{sv}[A] \qquad (V.23)$$

Nessas condições as medidas feitas em estado estacionário I_o/I levam ao mesmo resultado que as feitas com resolução temporal τ_0/τ . Em ambos os casos obtem-se uma função linear que será proporcional à concentração do doador [A].

2) No segundo caso, o equilíbrio do complexo doador/aceptor no estado fundamental é dado por:

$$D + A \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} DA \qquad (V.24)$$

$$K = \frac{[DA]}{[D][A]}$$

Podemos escrever a equação (V.19) como:

$$dD^*/dt = k_{ex}D\delta - \{ k_f + k_{nr} + k_Q[A] \}D^* \qquad (V.25)$$

onde

$$\delta = \left(1 + \frac{\varepsilon_{DA}}{\varepsilon_D} k[A]\right)^{-1} = \frac{1}{1 + \beta k[A]}$$

ε_{DA} e ε_D são os coeficientes de extinção do complexo (DA) e do doador livre D, respectivamente.

$k_{ex}D_0\delta$ é a fração da energia total que é absorvida pelas moléculas do doador que continuam livres. O restante da energia $k_{ex}D_0(1-\delta)$ é absorvida pelo complexo [AD].

Outra vez, resolvendo o problema para estado estacionário, temos:

$$k_{ex}D_0\delta = \left(k_f + k_{nr} + k_Q[A]\right) D^* \qquad (V.26)$$

Agora, a fração das moléculas iniciais que foi excitada é:

$$\frac{\left(k_f + k_{nr} + k_Q[A]\right)}{\delta} = D^*$$

A razão entre as intensidades na ausência e na presença do aceptor, agora é dada por:

$$\frac{I_0}{I} = \frac{k_f \;/\; (k_f + k_{nr})}{k_f\delta \;/\; (k_f + k_{nr} + k_Q[A])} =$$

$$= (1 + \tau_0 k_Q[A])\ (1 + \beta K[A]) \qquad (V.27)$$

Por outro lado, resolvendo a equação V.25 em condições de ausência de luz, encontramos ainda:

$$\frac{dD^*}{dt} = -(k_f + k_{nr} + k_Q[A])D^* \qquad (V.28)$$

o que dá a relação de Stern-Volmer:

$$\frac{\tau_0}{\tau} = 1 + \tau_0 k_Q[A] \qquad (V.29)$$

Das equações V.27 e V.28, temos:

$$Io/I = (\tau_0/\tau)(1 + \beta K[A]) \qquad (V.30)$$

3) No terceiro caso, podemos escrever as equações para a desexcitação de D^* e $(DA)^*$ como:

$$dD^*/dt = k_{ex}Do\delta - (k_f + k_{nr} + k_Q[A])D^* \qquad (V.31)$$

$$d(DA)^*/dt = k_{ex}Do(1-\delta) - (k'_f + k'_{nr})[DA]^* \qquad (V.32)$$

Nesta última equação, k'_f é a constante de decaimento por fluorescência e k'_{nr} é a constante para a soma de todos os processos não radiativos para o complexo doador-aceptor

Resolvendo as equações (V.31) e (V.32) para $k_{ex} = 0$ (experimento com resolução temporal), temos:

$$D^*(t) = Do^* e^{-t/\tau_D} \qquad (V.33)$$

$$(DA)^*(t) = (DA)^*_0 e^{-t/\tau_{DA}} \qquad (V.34)$$

onde $1/\tau = (k_f + k_{nr} + k_Q[A])$ e $1/\tau_{DA} = (k'_f + k'_{nr})$

Neste caso, a fluorescência passa a ter duas componentes tempos de vida independentes entre si. O tempo de vida do doador dependerá da concentração do aceptor livre [A], enquanto o tempo de vida do complexo $(DA)^*$ será independente da concentração do

aceptor livre. Resolvendo essas equações para estado estacionário, temos:

$$D^* = (k_{ex} Do\delta)/(k_f + k_{nr} + k_Q[A]) \qquad (V.35)$$

A intensidade da fluorescência do doador livre será:

$$I_D = k_f D^* = \frac{k_f k_{ex} D_0 \tau_0 \delta}{1 + \tau_0 k_Q [A]}$$

$$(DA)^* = [k_{ex} D_0 (1-\delta)]/ (k'_f + k'_{nr}) = k_{ex} \tau_{DA} D_0 (1 - \delta) \qquad (V.36)$$

A intensidade da fluorescência do complexo $(DA)^*$ será:

$$I_{DA} = k'_f [(DA)^*] = k'_f k_{ex} \tau_{DA} D_0 (1 - \delta)$$

A relação entre as intensidades de fluorescência medidas na ausência e na presença do supressor neste caso será dada por:

$$Io/I = Io/(I_D + I_{DA}) = \frac{k_f k_{ex} \tau_0 D_0}{I_D + I_{DA}}$$

Substituindo os valores de I_D e I_{DA} temos:

$$I_0/I = \frac{1 + \tau_0 k_Q [A]}{\delta + (1 - \delta)(\varphi_{DA}/\varphi_D^0)(1 + \tau_0 k_Q [A])} \qquad (V.37)$$

onde $\varphi_{DA}/\varphi_D^0 = k'_f \tau_{DA}/k_f \tau_0$

fazendo $\delta + (1 - \delta)B = \delta\ [1 - B\ (1 - 1/\delta)]$

e lembrando que $1 - 1/\delta = - \beta K[A]$, no divisor da equação V.37, temos:

$$1 \Big/ \left\{\delta + (1 - \delta) \frac{\varphi_{DA}}{\varphi_D^0} (1 + \tau_0 k_Q [A]\right\} =$$

$$= \frac{1 + \beta K[A]}{1 + \beta K[A] \frac{\varphi_{DA}}{\varphi_D^o} \{ 1 + \tau_o k_Q [A] \}}$$

Substituindo esse valor na equação V.37, obtemos finalmente:

$$Io/I = \frac{(1 + \tau_o k_Q [A]) \ (1 + \beta k[A])}{1 + \beta k[A] \frac{\varphi_{DA}}{\varphi_D^o} (1 + \tau_o k_Q [A])} \qquad (V.38)$$

Numa situação em que os coeficientes de extinção molar da porfirina livre e do complexo porfirina/melanina sejam aproximadamente iguais, temos $\beta \simeq 1$, esta equação torna-se:

$$Io/I = \frac{(1 + \tau_o k_Q [A]) \ (1 + K[A]}{1 + K[A](\varphi_{DA}/\varphi_D^o)(1 + \tau_o k_Q [A])} \qquad (V.39)$$

Quando a eficiência quântica da fluorescência do complexo for insignificante, ou seja, quando $\varphi_{DA} \Rightarrow 0$ a equação V.39 torna-se equivalente à equação V.27 que dá a relação de intensidade para o complexo não fluorescente.

A partir da situação mais simples proposta no início desta secção, chegamos às equações V.22 e V.23, que afirmam que as variações de intensidade (I_o/I) e de tempo de vida (τ_o/τ) para os complexos porfirina/melanina são as mesmas, o que evidentemente não concorda com nossos resultados experimentais.

As medidas de fluorescência dos complexos porfirina/melanina mostram que a melanina provoca uma variação muito brusca na intensidade relativa da fluorescência (supressão) das porfirinas, enquanto os tempos de vida das mesmas são muito pouco alterados. Isto mostra que a supressão estática tem um papel muito mais importante que a dinâmica no total da supressão da fluorescência da porfirina pela melanina. Temos então que partir das equações V.27 e V.39 para analisar a fluorescência dos complexos porfirina/melanina.

V.2 - A TAXA DE TRANSFERÊNCIA DE ENERGIA PORFIRINA ⇒ MELANINA

A equação V.39 pressupõe uma fluorescência do complexo porfirina/melanina com um rendimento quântico:

$$\varphi_{DA} = k'_f/(k'_f + k'_{NR})$$

onde k'_f e k'_{NR} são respectivamente as taxas de fluorescência e de decaimento não radiativo do estado excitado do complexo porfirina/melanina. Podemos admitir k'_f igual à taxa k_f de fluorescência da porfirina pura pois ambos só dependem da meia vida radiativa do estado excitado da porfirina.

Conforme se observa nas tabelas V.1 a V.4 (pag. 104), para concentrações mais altas de melanina, a fluorescência dos complexos porfirina/melanina apresenta uma componente com tempo de vida ultra curto ($\tau < 5$ ps). É difícil precisar o tempo de vida desta componente, pois o mesmo está no limite de resolução do equipamento utilizado. Considerando esta componente como devida à fluorescência do complexo porfirina/melanina, podemos estimar a taxa de transferência de energia da porfirina para a melanina no estado excitado.

Tomando, por exemplo, a porfirina TMPyP cuja fluorescência tem rendimento quântico de 0,024 e tempo de vida de 5,0 ns, determinamos a taxa de fluorescência k_f :

$$\varphi_D = \frac{k_f}{k_f + k_{NR}} = k_f \tau_o$$

$$k_f = \varphi_D / \tau_o = \frac{0,024}{5,0 \cdot 10^{-9}\ s} \cong 4,8 \cdot 10^6\ s^{-1}$$

Para um tempo de vida de aproximadamente 3 ps para o complexo porfirina/melanina, temos:

$$\varphi_{DA} = k_f \tau_{DA} \cong 4,8 \cdot 10^6 s^{-1} \cdot 3.10^{-12} s \cong 1,5 \cdot 10^{-5}$$

Podemos escrever o tempo de vida para o complexo porfirina/melanina como:

$$\tau_{DA} = \frac{1}{k_f + k_{NR} + k_{TE}} \qquad (V.40)$$

Nesta equação, admitimos que as taxas de emissão radiativa e não radiativa da porfirina pura permanecem inalterados, com o termo k_{TE} representando a taxa de transferência de energia de excitação da porfirina para a melanina. Para estimar o valor desta taxa, escrevemos:

$$\varphi_{DA} = \frac{k_f}{k_f + k_{NR} + k_{TE}}$$

$$k_{TE} = k_f/\varphi_{DA} - 1/\tau_o = \frac{4,8 \cdot 10^6 s^{-1}}{1,5 \cdot 10^{-5}} - 2,0 \cdot 10^8 s^{-1}$$

$$\boxed{k_{TE} \geq 3 \cdot 10^{11} s^{-1}}$$

Para os outros complexos porfirina/melanina encontramos taxas de transferência de eletrons da mesma ordem de grandeza.

A CONSTANTE DE ASSOCIAÇÃO DO COMPLEXO PORFIRINA/MELANINA - GRÁFICO DE SCATCHARD-

Como acabamos de ver, a possível fluorescência do complexo porfirina/melanina tem um rendimento quântico tão baixo que o termo φ_{DA}/φ_D na equação V.39 pode ser negligenciado com relação à unidade ($\varphi_{DA}/\varphi_D \leq 10^{-3}$). Desse modo, para analisarmos as relações entre as intensidades de fluorescência da porfirina pura e da porfirina/melanina podemos usar a equação V.27 em vez de V.39. Também podemos reescrever a equação V.27 na forma:

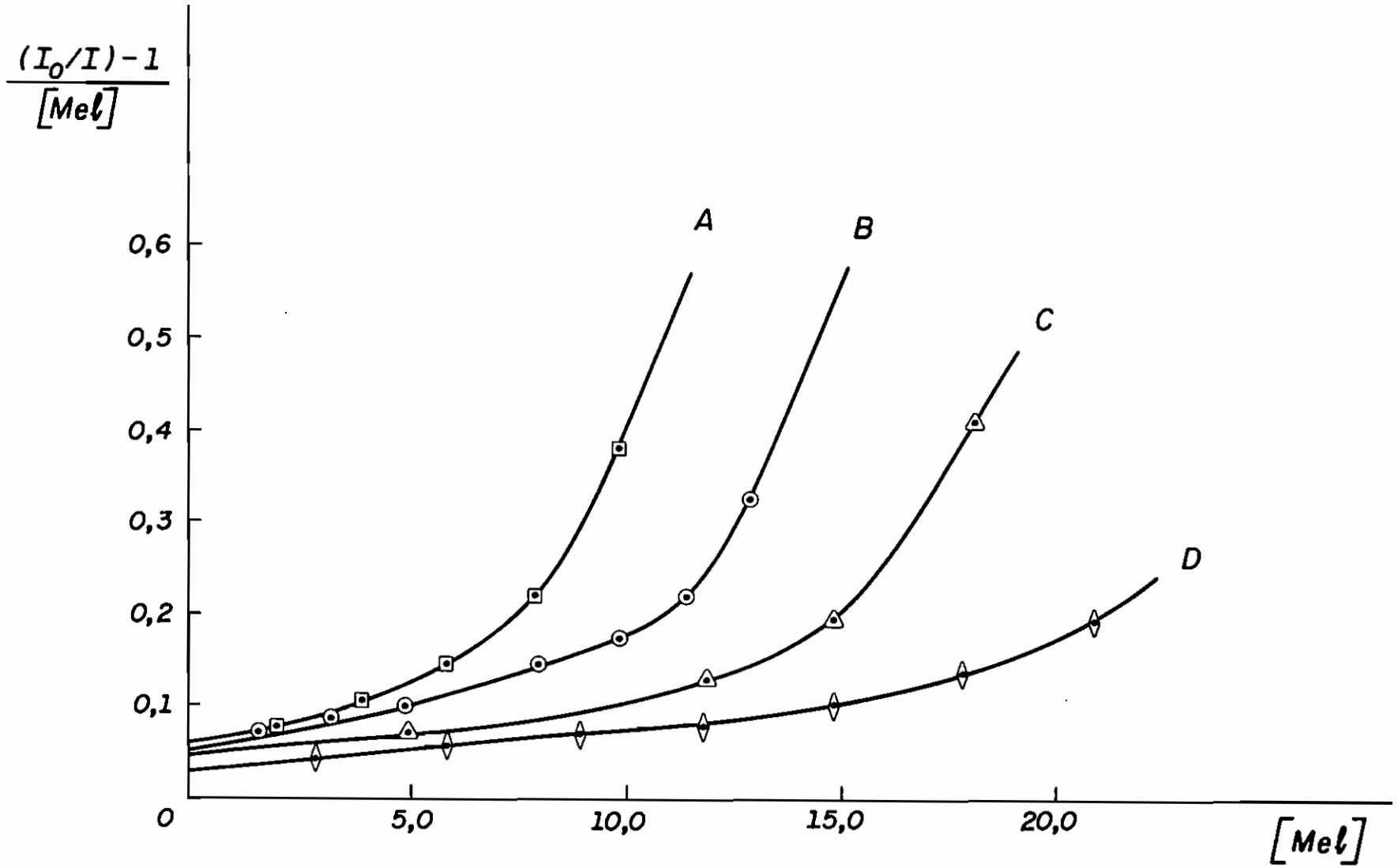
$$I_0/I = 1 + (K_{SV} + K)[A] + K_{SV}K[A]^2$$

$$[(I_0/I) - 1](1/[A]) = [K_{SV} + K] + K_{SV}K[A] \qquad (V.41)$$

Usando os dados de fluorescência das tabelas V.1 a V.4, construímos os gráficos de $[(I_0/I)-1](1/[A])$ versus [A] para as quatro porfirinas (FIG. V.10). De acordo com a equação V.41 era de se esperar que esses gráficos se ajustassem para uma reta, de onde se poderia obter o termo constante (K_{SV} + K) e o coeficiente angular ($K_{SV}.K$).

O desvio positivo da linearidade nos quatro gráficos da figura V.10 implica que o termo que multiplica [A] na equação V.41 não deve ser constante com o aumento da concentração de melanina. Estes dados nos obrigam a levar em conta alguns aspectos da interação porfirina/melanina que não foram considerados até agora na discussão da supressão da fluorescência. No modelo proposto nesta secção consideramos a interação porfirina/melanina como ocorrendo entre duas moléculas simples na porporção de uma molécula de porfirina para uma de melanina.

As porfirinas tetracatiônicas têm quatro sítios equivalentes que a princípio poderiam ligar-se à melanina (os quatro radicais piridil). Consideremos que a ligação da porfirina à melanina por qualquer um desses sítios já seja suficiente para suprimir a fluorescência. Consideremos também que esses sítios sejam totalmente independentes com respeito à associação com a melanina,



Figgura V.10- Curvas de supressão de fluorescência das porfirinas em função da concentração de melanina(µg/ml)
A) TBzPyP B) TMPyP C) ZnTMPyP D) ZnTBzPyP

ou seja, numa porfirina já ligada à melanina por um sítio, os três restantes têm igual probabilidade de ligação que aqueles das porfirinas livres. Segundo este raciocínio, o aumento da concentração de melanina aumentaria também a probabilidade de "moléculas" de melanina se associarem a porfirinas já ligadas e portanto não fluorescentes. Isto levaria necessariamente a um desvio negativo da lineaaridade dos gráficos dados pela equação V.41, exatamente o contrário do que foi observado experimentalmente.

Consideremos agora o problema do ponto de vista dos sítios de ligação da melanina.

As melaninas são polímeros de estrutura heterogênea, com uma grande quantidade de cargas negativas que são estabilizadas principalmente por grupos carboxílicos e fenólicos, os quais se localizam principalmente nas extremidades do polímero. Com base neste modelo podemos supor que a melanina pode se ligar à porfirina através de vários sítios equivalentes (com mesma constante de dissociação) ou mesmo de diferentes espécies de sítios (com diferentes constantes de dissociação)

Para analisar o problema deste ponto de vista contruímos, a partir da emissão de soluções de porfirina/melanina, os gráficos conhecidos como "Plot Scatchard". Para a construção destes gráficos são feitas as seguintes aproximações:

a) A porfirina ligada à melanina é considerada não fluorescente. Com isto, toda a fluorescência observada é atribuída à porfirina não complexada.

b) A porfirina é considerada como uma molécula pequena, com um único sítio disponível para associação com a melanina.

c) A melanina, por sua vez, é encarada como uma macromolécula com vários sítios possíveis de ligação com a porfirina, podendo inclusive haver sítios não equivalentes, (com diferentes constantes de dissociação).

Neste caso, o gráfico de Scatchard é dado pela equação [61]:

$$\frac{\nu}{[L]} = \frac{n}{K} - \frac{\nu}{K} \qquad (V.42)$$

onde:

[L] ⇒ é a concentração do ligante (porfirina) livre

ν ⇒ é o número de moles de ligantes ligados por mol da macromolécula (ν = [P]b/[Mel]

n ⇒ é o número de sítios ligados por macromolécula

K ⇒ constante de dissociação

Neste experimento empregou-se a fluorescência estática e usou-se uma concentração fixa de melanina, de modo que o valor de ν só depende da concentração da porfirina. A essa concentração fixa de melanina são adicionadas alíquotas conhecidas de porfirina. Em seguida é medida a intensidade da fluorescência da solução do composto e comparada com a fluorescência da solução de porfirina na mesma concentração . Como admitimos que a fluorescência é devida unicamemente à porfirina livre $[P]_f$, pode-se determinar as concentrações de porfirina livre e complexada com melanina, $[P]_b$. Os valores de $[P]_f$ e $[P]_b$ assim obtidos para várias concentrações totais de porfirina $[P]_t$, assim como os parâmetros ν e $\nu/[P]_f$ são mostrados nas tabelas V.5 a V.8. Os respectivos gráficos de Scatchard são mostrados nas figuras V.11 a V.14.

Para uma macromolécula com uma única classe de sítios de ligação (um único valor de K) o gráfico de $\nu/[P]_f$ vs ν (equação V.42) dá uma reta com coeficiente angular -1/K. A interseção com o eixo das abscissas dá o valor de n (n = ν), enquanto no limite $\nu \rightarrow 0$ tem-se n/K = ν/L (interseção com o eixo das ordenadas). Os gráficos correspondentes às soluções porfirina/melanina, no entanto, podem ser ajustados para duas retas distintas. Isto evidencia a existência de dois valores diferentes de K e de duas classes distintas de sítios de ligação. A análise desses gráficos é feita como segue.

Consideramos a princípio que a melanina tem duas classes de sítios de ligação com constantes muito diferentes entre si (por exemplo, $K_1 \ll K_2$). Então no limite para $\nu \rightarrow 0$ temos:

TABELA V.5 Dados para obtenção do gráfico de Scatchard para o complexo TMPyP/melanina. (As concentrações são dadas em μg/ml)

[Mel]	I/I_0	$[P]_{total}$	$[P]_f$	$[P]_B$	ν	$\nu/[P]_f$
1,020	------	0,1364	-----	-----	-----	-----
1,020	0,0333	0,2055	0,007	0,198	0,194	28,40
1,020	0,0489	0,273	0,013	0,259	0,254	19,03
1,020	0,0772	0,348	0,026	0,322	0,315	12,16
1,015	0,1210	0,409	0,049	0,360	0,355	7,23
1,015	0,1680	0,480	0,083	0,397	0,391	4,70
1,013	0,2253	0,551	0,130	0,421	0,416	3,21
1,010	0,2566	0,620	0,164	0,456	0,451	2,75
1,004	0,2975	0,690	0,211	0,479	0,477	2,26
1,002	0,3360	0,764	0,256	0,507	0,506	1,98
1,000	0,444	0,818	0,282	0,536	0,536	1,90

I/I_0 = intensidade relativa da fluorescência do complexo porfirina/melanina em relação à mesma concentração de porfirina livre.

$\nu = [P]_b / [Mel]$

TABELA V.6 Dados para obtenção do gráfico de Scatchard para o complexo ZnTBzPyP/melanina. (As concentrações são dadas em μg/ml)

[Mel]	I/I_o	$[P]_{total}$	$[P]_f$	$[P]_B$	ν	$\nu/[P]_f$
0,615	0,009	0,0940	0,00574	0,0907	0,148	25,697
0,614	0,002	0,141	0,00230	0,139	0,226	98,174
0,612	0,038	0,187	0,00689	0,181	0,295	42,816
0,611	0,056	0,234	0,0126	0,221	0,362	28,662
0,610	0,105	0,280	0,0295	0,250	0,411	13,919
0,608	0,150	0,326	0,0489	0,277	0,455	9,313
0,608	0,222	0,372	0,0828	0,289	0,476	5,749
0,606	0,262	0,417	0,109	0,308	0,509	4,659
0,605	0,309	0,463	0,143	0,320	0,530	3,703
0,604	0,347	0,508	0,176	0,332	0,550	3,118
0,602	0,390	0,553	0,216	0,337	0,560	2,592
0,601	0,420	0,599	0,251	0,347	0,577	2,298
0,600	0,446	0,643	0,286	0,356	0,594	2,074
0,599	0,476	0,688	0,328	0,360	0,601	1,832
0,598	0,494	0,731	0,361	0,370	0,620	1,716
0,596						

I / I_0= intensidade relativa da fluorescência do complexo porfirina/melanina em relação à mesma concentração de melanina livre.

$\nu = [P]_B / [Mel]$

TABELA V.7 Dados para obtenção do gráfico de Scatchard para o complexo TBzPyP/melanina. (As concentrações são dadas em μg/ml)

[Mel]	I/I_o	$[P]_{total}$	$[P]_f$	$[P]_B$	ν	$\nu/[P]_f$
0,520	0,034	0,895	0,003	0,086	0,166	54,74
0,519	0,070	0,134	0,010	0,124	0,240	24,86
0,514	0,097	0,178	0,017	0,161	0,313	18,17
0,513	0,126	0,222	0,028	0,194	0,380	13,55
0,512	0,177	0,266	0,047	0,219	0,428	9,07
0,511	0,232	0,310	0,072	0,238	0,466	6,47
0,510	0,264	0,354	0,093	0,260	0,511	5,47
0,509	0,307	0,397	0,122	0,275	0,541	4,44
0,508	0,325	0,440	0,143	0,297	0,586	4,09
0,507	0,358	0,483	0,173	0,310	0,612	3,54
0,506	0,380	0,526	0,200	0,326	0,645	3,22
0,505	0,403	0,569	0,229	0,340	0,672	2,93
0,504	0,425	0,611	0,260	0,352	0,697	2,69
0,503	0,445	0,654	0,291	0,363	0,721	2,48

I/I_0 = intensidade relativa da fluorescência do complexo porfirina/melanina em relação à mesma concentração de porfirina livre.

$\nu = [P]_b$ / [Mel]

TABELA V.8 Dados para obtenção do gráfico de Scatchard para o complexo ZnTMPyP/melanina. (As concentrações são dadas em μg/ml)

[Mel]	I/I_o	$[P]_{total}$	$[P]_f$	$[P]_B$	ν	$\nu/[P]_f$
1,227	0,021	0,138	0,003	0,135	0,110	37,70
1,224	0,034	0,183	0,006	0,177	0,144	23,04
1,222	0,048	0,228	0,011	0,217	0,178	16,19
1,220	0,086	0,273	0,024	0,249	0,204	8,48
1.217	0,120	0,318	0,038	0,280	0,231	6,12
1,215	0,157	0,362	0,056	0,306	0,252	4,47
1,212	0,182	0,407	0,074	0,333	0,274	3,69
1,210	0.229	0,452	0,103	0,348	0,288	2,78
1,207	0,252	0,496	0,125	0,371	0,307	2,46
1,205	0,284	0,540	0,156	0,384	0,318	2,04
1,202	0.306	0,584	0,179	0,405	0,337	1,88
1,200	0,341	0,627	0,214	0,413	0,345	1,61
1,198	0,372	0,671	0,250	0,421	0,352	1,41
1,195	0,390	0,713	0,279	0,435	0,364	1,30

I/I_0 = intensidade relativa da fluorescência do complexo porfirina/melanina em relação à mesma concentração de porfirina livre.

$\nu = [P]_b$ / [Mel]

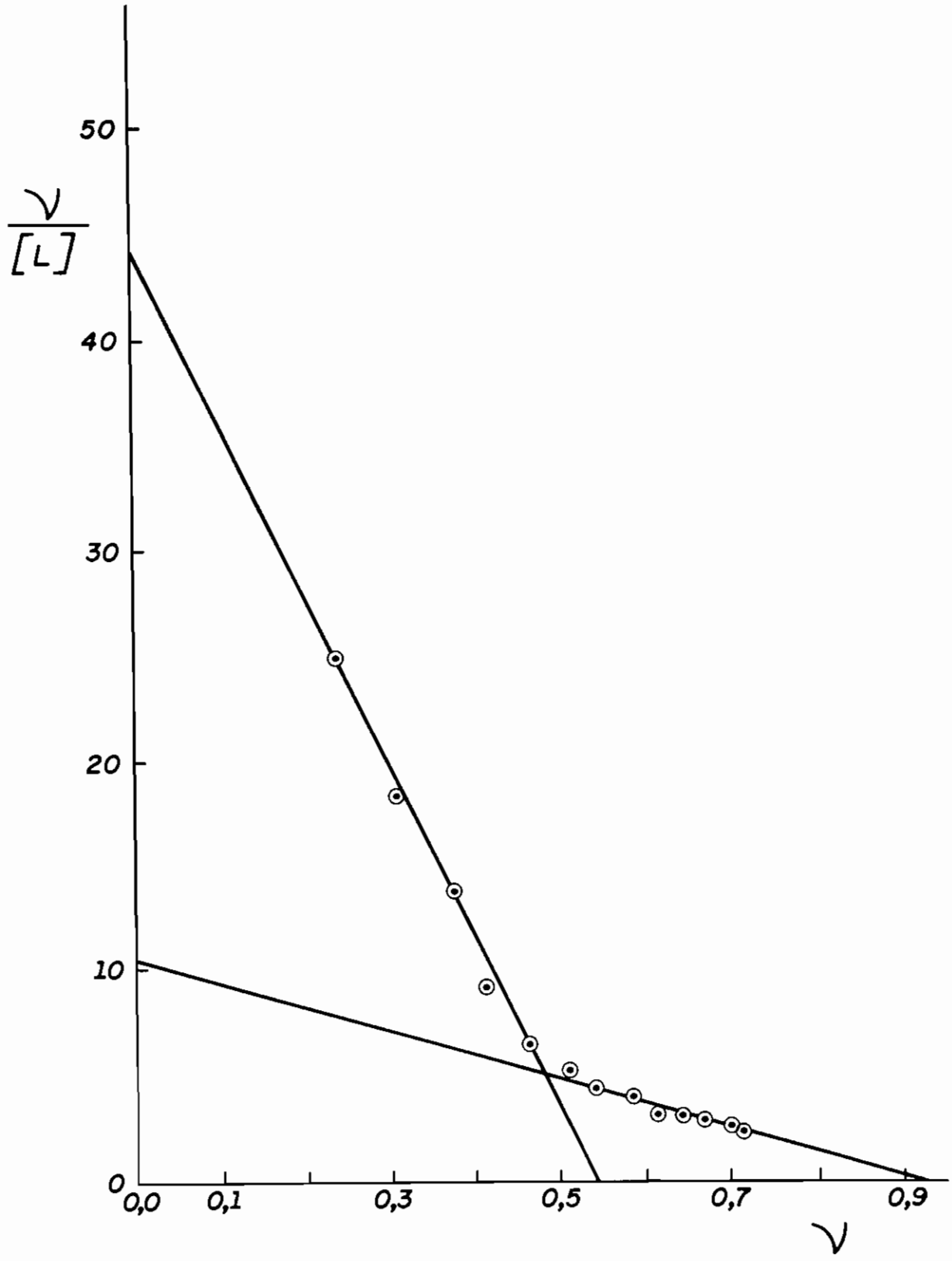


Figura V.11 - Gráfico de Scatchard da complexação TBzPyP/melanina

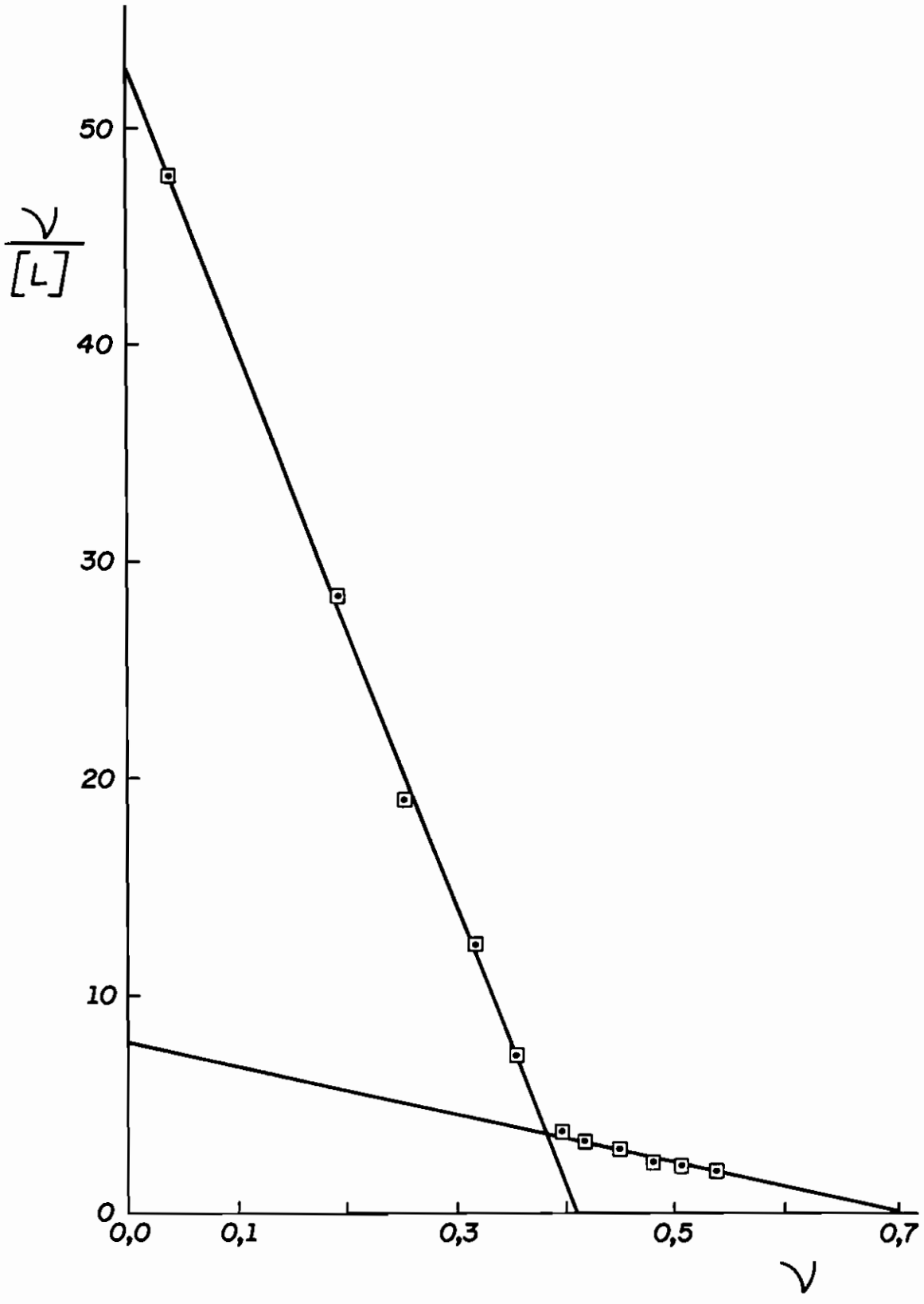


Figura V.12 - Gráfico de Scatchard da complexação TMPyP/melanina

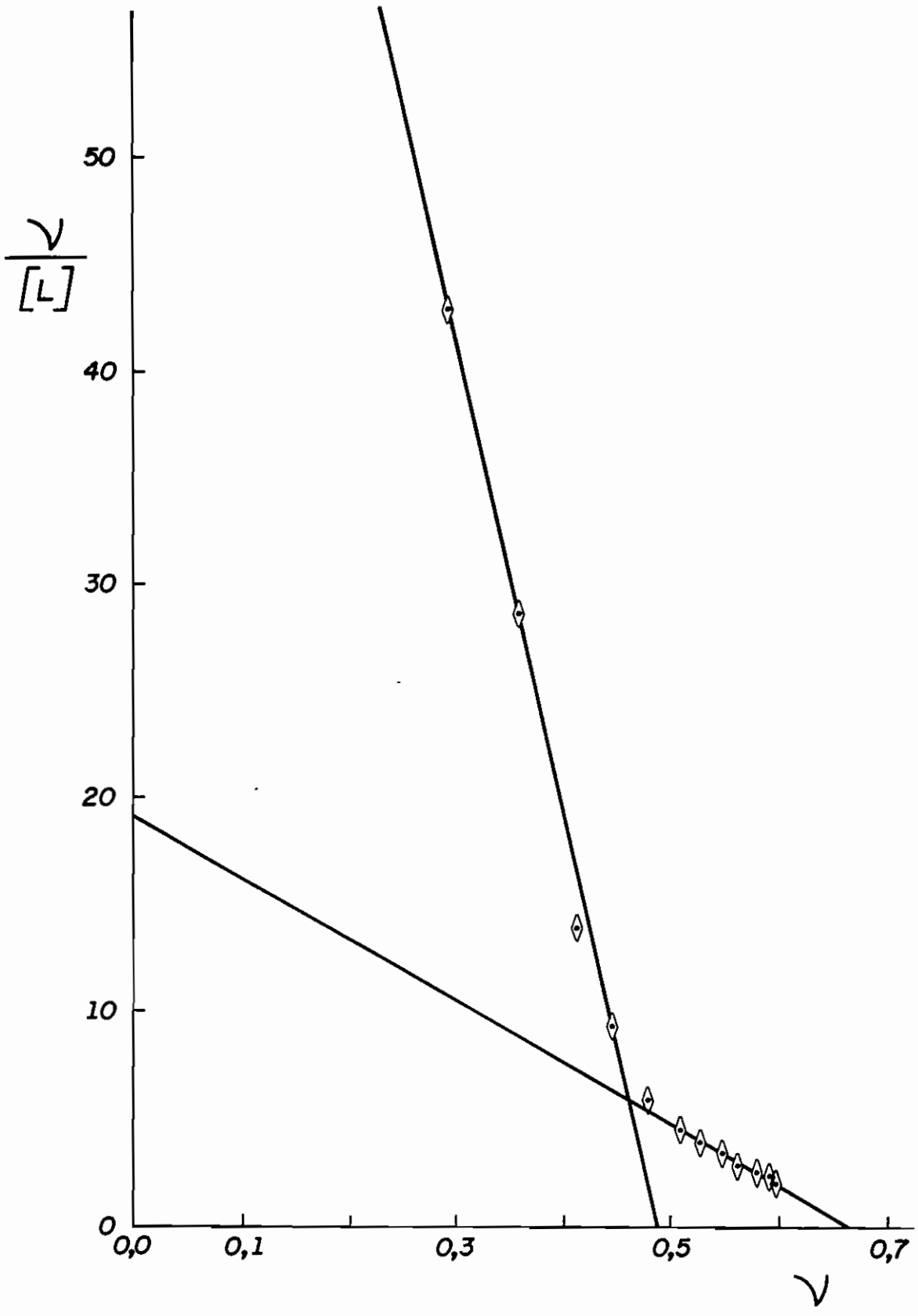


Figura V.13 - Gráfico de Scatchard da complexação Zn-TBzPyP/melanina

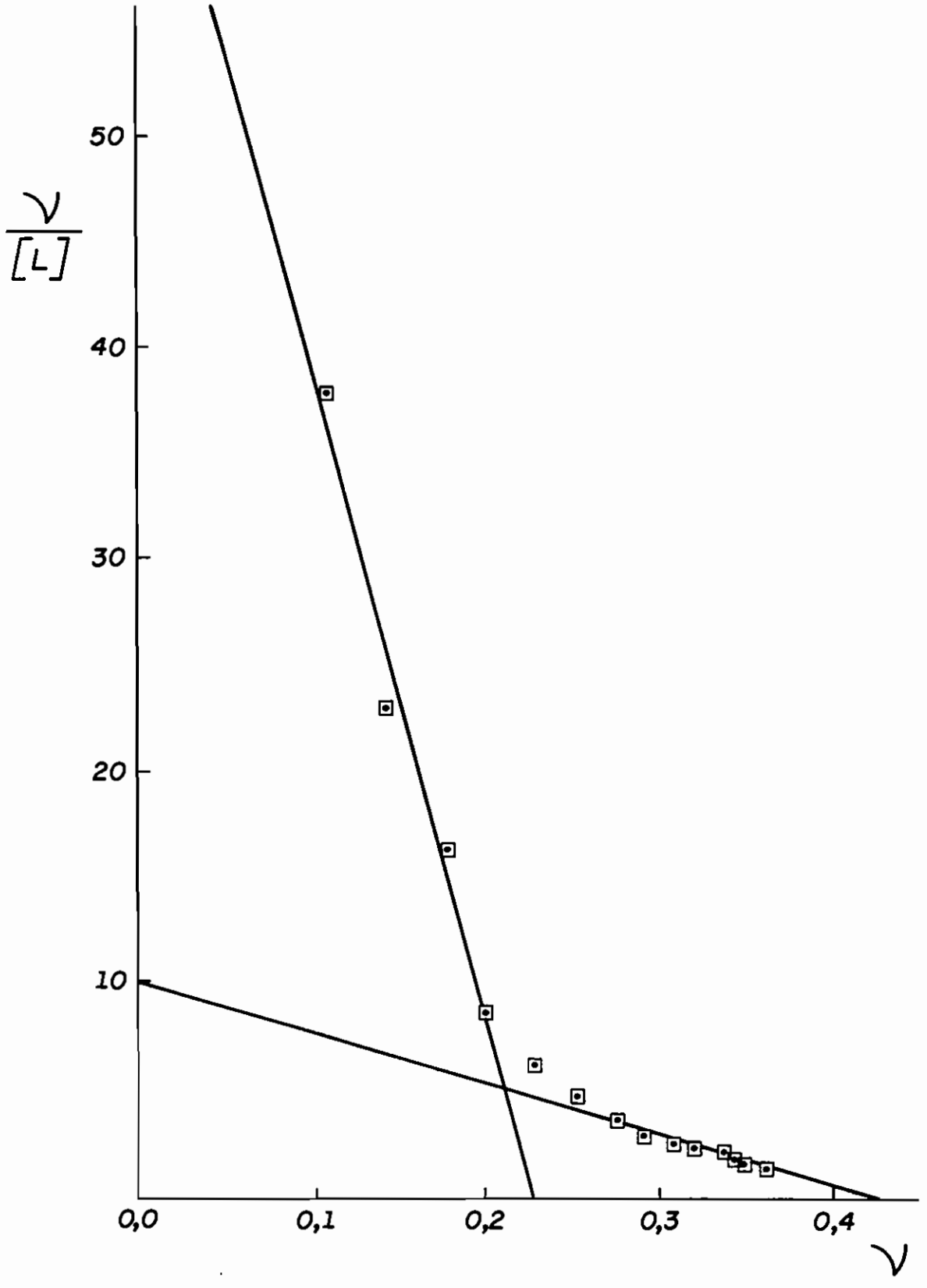


Figura V.14 - Gráfico de Scatchard da complexação Zn-TMPyP/melanina

$$\nu/[P]_f = n_1/K_1 + n_2/K_2 \simeq n_1/K_1$$

Também para baixas concentrações a ligação porfirina/melanina privilegia aqueles sítios com constantes de dissociação mais baixa. Com isto, para baixas concentrações de porfirina (menores valores de ν) a equação V.42 pode ser escrita como:

$$\nu/[P]_f = n_1/K_1 - \nu/K_1 \qquad \text{V.43}$$

Com essa equação determinamos os valores de n_1 e K_1.

À medida que se aumenta a concentração de porfirina, o sítio de constante K_1 vai se tornando saturado e a porfirina tende a se ligar ao sítio de menor constante de dissociação. Agora escrevemos a equação V.42 como

$$\nu/[P]_f = n_2/K_2 - \nu/K_2 \qquad \text{V.44}$$

e determinamos os valores de K_2 e n_2.

Com base nas equações V.42 e V.43, ajustamos retas aos pontos experimentais das figuras V.11 a V.14. Com essas retas determinamos os valores das constantes de dissociação K_1 e dos parâmetros n_1 para associação da melanina com as quatro porfirinas. Esses valores são mostrados na tabela V.9.

Tabela V.9 - Constantes de dissociação K_1 em mg/l e concentração de porfirinas ligadas por unidade de concentração de melanina (n_1). Os valores entre parêntesis são dados μmol/l.

	K_1	K_2	n_1	n_2
TBzPyP	12 (11)	88 (81)	0,55	0,52
TMPyP	7,8 (5,7)	87 (64)	0,41	0,28
ZnTBzPyP	4,6 (4,0)	87 (76)	0,49	0,28
ZnTMPyP	3,3 (3,0)	41 (37)	0,23	0,18

Da tabela V.9 podemos concluir claramente que a melanina apresenta com relação à ligação com as porfirinas dois sítios de ligação com constante de dissociação diferindo de quase uma ordem de grandeza. Essa diferença poderia ser devida aos diferentes sítios da melanina que se associam à porfirina, como por exemplo grupos carboxílicos e grupos fenólicos. Além diso, a tabela V.9 fornece alguns pontos a serem discutidos:

As constantes de dissociação para ligação da melanina com as quatro porfirinas podem ser agrupadas na seguinte ordem:

K_1(TBzPyP) > K_1 (TMPyP) > K_1 (ZnTBzPyP) > K_1 (ZnTMPyP)

ou seja, as zinco-porfirinas apresentam maior afinidade de ligação (menores valores das constantes K_1) que as respectivas porfirinas de base livre, enquanto as porfirinas com grupos benzil apresentam menor afinidade de ligação que aquelas com grupos metil.

Os parâmetros n_1, que dão o número de sítios da melanina disponíveis para ligação com as porfirinas são maiores para as tetrabenzilpiridil que para as tetrametilpiridil porfirinas e são agrupados na seguinte ordem:

n_1 (TBzPyP) > n_1 (ZnTBzPyP) > n_1 (TMPyP) > n_1 (ZnTMPyP)

Sabe-se que as melaninas podem-se ligar com íons metálicos divalentes e trivalentes como Mg^{+2}, Zn^{+2} e Al^{+3}, que formam quelatos com os resíduos carboxílicos e semi-quinonas [67]. Na porfirina, o íon zinco já está ligado em tetracoordenação com os nitrogênios dos anéis pirrólicos. A ligação da porfirina com os resíduos negativamente carregados da melanina ocorreria então através da quinta coordenação com o resíduo localizado na posição axial do anel da porfirina. Esse arranjo estrutural poderia levar a um abaixamento da constante de dissociação das metalo-porfirinas mas, por problemas de impedimento estérico, o acesso dos resíduos da melanina seria dificultado, causando um abaixamento dos

parâmetros n_1 nas zinco-porfirinas com relação às de base livre. Por outro lado, devemos considerar também que a distribuição dos grupos ionizados na melanina não é totalmente homogênea. Cálculos de orbitais moleculares [67] sugerem que na melanina as cargas negativas se localizam preferencialmente nas extremidades do polímero. Esta distribuição de grupos carregados pode criar regiões com caráter hidrofóbico em torno do polímero, facilitando uma maior interação da melanina com as porfirinas mais hidrofóbicas. Considerando que o radical benzilpiridil é mais fortemente hidrofóbico que o metilpiridil e que o esqueleto da Zn-porfirina tem caráter hidrofílico, podemos dizer que os valores dos parâmetros n_1 dados pelo gráfico de Scatchard são diretamente proporcionais à hidrofobicidade das respectivas porfirinas. Isto poderia explicar a aparente contradição de que a melanina suprime mais fortemente a fluorescência da TBzPyP (ver fig. V.10) e ao mesmo tempo esta porfirina apresenta menor afinidade de ligação (maior valor de constante de dissociação) com aa melanina. A interação porfirina/melanina seria facilitada pelo caráter hidrofóbico de ambas, o que permitiria o acesso da porfirina a um número maior de sítios negativamente carregados do polímero.

VI . CONCLUSÕES

Com base no modelo de Gouterman de quatro orbitais, foi dada uma interpretação qualitativa para os espectros de absorção óptica das quatro porfirinas e dos respectivos complexos porfirina-melanina.

A partir do espectro de absorção óptica das porfirinas foram construídos diagramas de níveis de energia onde são quantificadas as perturbações causadas por cada um dos substituintes sobre os orbitais moleculares das porfirinas. Os espectros de absorção óptica dos complexos porfirina/melanina mostraram uma forte interação entre as estruturas-π da melanina com as das porfirinas, responsável pelo abaixamento da energia orbital destas últimas. Este abaixamento ocorre de modo quase igual tanto nas metaloporfirinas quanto nas porfirinas de base livre, o que sugere que o metal tem pouca participação na interação eletrônica porfirina/melanina.

Também foi proposto um modelo para o espectro de fluorescência das porfirinas, onde a não observação de emissão correspondente à banda Soret foi atribuída à forte interação entre os orbitais a_{1u} e a_{2u}. De acordo com esse modelo, nas porfirinas de base livre a fluorescência normal é correspondente à banda Q_x. Pode também ocorrer a emissão envolvendo a banda Q_y, mas essa emissão corresponde a uma "fluorescência rápida" emitida a partir de uma configuração de não equilíbrio e sua intensidade é algumas ordens de grandeza inferior à da fluorescência normal.

Foi feita uma atribuição de bandas para as quatro porfirinas com base nos espectros Raman ressonantes das mesmas dispersas em KBr. Em alguns casos, foram utilizados os dados dos espectros obtidos em solução aquosa. Os resultados mostraram que o acoplamento entre os elétrons-π do macrociclo e dos grupos piridil pode levar a intensificação dos modos de vibração destes grupos. Estes resultados estão de acordo com os dados da literatura sobre o espectro Raman da porfirina NiTPP, onde as bandas do grupo fenil são intensificadas devido ao acoplamento com modos do

macrociclo.

Os espectros Raman dos complexos porfirina-melanina apresentaram poucas diferenças em relação ao das respectivas porfirinas puras. Estes dados são consistentes com a teoria do espalhamento Raman ressonante segundo a qual apenas os modos de vibração acoplados ao cromóforo são intensificados. Como se prevê que a associação porfirina-melanina se dê através dos grupos positivos dos substituintes, espera-se que esta não afete significativamente o espectro Raman das mesmas. As principais diferenças entre os respectivos espectros foram observadas na região dos modos de baixa frequência, onde são esperados os modos de vibração fora do plano(O.O.P.). Essas diferenças puderam então ser atribuídas à deformação do macrociclo com relação à estrutura planar, o que pode tornar ativos alguns modos O.O.P. no complexo que são inativos na porfirina pura.

Os dados de fluorescência estática e resolvida no tempo para soluções de melanina-porfirina mostraram que a supressão de fluorescência das porfirinas pela melanina deve-se essencialmente à formação de complexo no estado fundamental com forte supressão de fluorescência e quase nenhuma variação nos tempos de vida dos estados excitados das porfirinas em função da concentração de melanina.

A partir dos dados de supressão de fluorescência estática das soluções porfirina-melanina e usando a aproximação de que o complexo porfirina-melanina é não fluorescente, foi feito um estudo da formação do complexo através da análise dos gráficos de Scatchard. Para as quatro porfirinas foram encontradas duas constantes de dissociação bastante distintas, o que pode ser atribuído a diferentes sítios de ligação da melanina. Na melanina supõe-se que os principais centros possíveis de ligação com uma porfirina catiônica sejam os grupos fenólicos e carboxílicos que apresentam diferentes reatividades. Há que se notar que a porfirina que apresentou a constante de dissociação mais alta (TBzPyP) foi a que teve a fluorescência mais fortemente suprimida pela melanina. Esta contradição foi explicada pela análise dos parâmetros n_1 do gráfico de Scatchard, que fornece a densidade de sítios que a melanina oferece para ligação com a porfirina. No

caso da TBzPyP, o alto valor dos parâmetros n_1 sugere que além da interação de caráter eletrostático, a interação de caráter hidrofóbico tem uma contribuição relevante na formação do complexo porfirina/melanina.

Os dados de fluorescência com resolução temporal para altas concentrações de melanina mostraram uma componente de fluorescência com tempo de vida ≈ 5ps. A partir desta componente, que atribuímos à fluorescência residual do complexo, foi estimada a taxa de transferência de energia da porfirina para a melanina em $K_{TE} > 10^{11}s^{-1}$. Essa dissipação poderia envolver tanto a formação de radicais livres via um estado tripleto na melanina como processos térmicos relacionados a relaxação vibracional dessa molécula.

Estes resultados mostraram a importante propriedade do polímero de melanina em atuar como eficiente meio para dissipação não radiativa de energia de excitação da porfirina.

Estudos da interação porfirina/melanina por EPR contínuo[68] mostraram que no complexo porfirina/melanina sob iluminação há um pequeno aumento do número de radicais livres fotoinduzidos na melanina. O problema de se analisar radicais livres por EPR contínuo é que esta técnica só consegue detectar radicais livres estabilizados, enquanto no processo de desexcitação da porfirina pela melanina podem aparecer radicais livres transientes com tempo de vida demasiado curtos para serem detectados via EPR.

Um outro processo de dissipação não radiativa poderia envolver a relaxação dos estados eletrônicos excitados via interação direta com vibrações moleculares na melanina. Foi verificado por técnicas de espectroscopia fotoacústica que isto ocorre em amostras puras de melanina sintética [69]. O uso destas técnicas no estudo do complexo porfirina/melanina poderia ser bastante elucidativo.

Cabe também analisar como a porfirina ligando-se à melanina pode atuar como auxiliar na terapia fotodinâmica de tumores. Considera-se que o mecanismo mais eficiente de atuação das porfirinas neste processo de tratamento seja a geração de oxigênio singleto que pode detruir as células cancerosas. No complexo porfirina/melanina, a supressão de fluorescência da porfirina pela melanina cumpre o papel de impedir a formação de

oxigênio singleto. Com isso a melanina desempenharia exatamente o papel de proteção contra a ação da porfirina, a menos que consideremos o aparecimento de radicais livres transientes como uma etapa possivel neste processo. Fica então a questão de se o mecanismo de atuação das porfirinas se dá via radicais livres transientes ou por processos de dissipação térmica.

APÊNDICE

ALGUMAS CONSIDERAÇÕES SOBRE A FLUORESCÊNCIA

A absorção e emissão de luz por um sistema eletrônico pode ser descrita por meio da quantização do campo eletromagnético. O campo eletromagnético quantizado é equivalente a um comjunto de infinitos osciladores harmônicos quantizados com frequência igual à frequência dos quanta de luz. A hamiltoniana total do sistema campo de radiação mais sistema eletrônico pode ser escrita como a soma de uma hamiltoniana do sistema eletrônico (H_{el}) mais campo de radiação (H_{rad}) com uma hamiltoniana de interação do sistema eletrônico com o campo de radiação (H_{int}) [60]:

$$H = H_0 + H_{int} \qquad (A.1)$$

onde $H_0 = H_{el} + H_{rad}$

O estado estacionário não perturbado do sistema é dado por autofunções de H_0 que podem ser escritas como:

$$\psi_m = \psi_m^{el}(r)\ \phi_{n1n2}^{ph} \qquad (A.2)$$

Onde ψ_m^{el} representa o m-ésimo estado eletrônico do sistema com energia E_m^{el} e $\phi_{n1,n2}$ significa que existem n_1 fótons com energia E_1^{eh}; n_2 fótons com energia E_2^{ph}, e assim por diante. A transição a um estado Ψ_n ocorre devido à perturbação H_{int}:

$$\psi_n = \psi_n^{el}(r).\phi_{n1n2}^{ph} \qquad (A.3)$$

onde deve ser satisfeita a relação

$$E_m^{el} - E_n^{el} = \Sigma_\lambda\ (n'_\lambda - n_\lambda)\ E_\lambda^{ph} \qquad (A.4)$$

A probabilidade de transição é proporcional ao quadrado do elemento de matriz

$$< \psi_m | H_{int} | \psi_n > \qquad (A.5)$$

Os processos de emissão espontânea e absorção de um fóton são devidos ao termo $(e/mc)\mathbb{P}.\mathbb{A}(r)$ em H_{int}, onde $\mathbb{P}$ é o momento do elétron e $\mathbb{A}(r)$ o potencial vetor do campo de radiação. Se assumirmos que $E_m > E_n$, a probabilidade de emissão espontânea de um fóton será dada por [62] :

$$W_{mn} = \frac{64\pi^4 \nu^3 n}{3hc^3} | M_{nm} |^2 \qquad (A.6)$$

e a probabilidade de absorção W_{nm} será dada por:

$$W_{nm} = \frac{8\pi^3}{3\hbar^2 \hbar^2} | M_{nm} |^2 \rho(\nu) \qquad (A.7)$$

onde

$$\nu = (1/h) (E_m^{el} - E_n^{el})$$

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} \left(\exp\{h\nu/kT\} - 1 \right)^{-1}$$

$\rho(\nu)$ é a densidade de fótons com frequência ν

$$M_{nm} = e < \psi_n^{el}(r) \mid \sum_i r_i \mid \psi_m^{el}(r) > \qquad (A.8)$$

é o momento de transição eletrônica entre os estados m e n
n = índice de refração do meio

Consideremos um sistema de moléculas num estado eletrônico excitado m. Admitamos a princípio que as moléculas não interagem entre si e que o único caminho de desativação do estado excitado é via emissão de um fóton e transição para o estado fundamental. Se num instante t=0 havia n_0 moléculas no estado excitado m, esse número decrescerá com o tempo de acordo com a equação:

$$dn/dt = -k_e n \qquad (A.9)$$

onde k_e é aproximadamente igual à probabilidade de emissão espontânea W_{mn}. Temos então:

$$n(t) = n_o \exp(-k_e t) = n_o \exp(-t/\tau_o) \qquad (A.10)$$

onde τ_o é a meia vida radiativa do estado excitado

Existe uma quantidade adimensional chamada força de oscilador ("oscilator strenght"), f_{nm}, que é usada para expressar a probabilidade de transição. O "oscilator strenght" é relacionado com a probabilidade de emissão espontânea e com o coeficiente B de Einstein, como segue:

$$f_{mn} = \frac{mc^2}{8\pi^2 e^2 \nu^2} k_e \qquad (A.11)$$

$$f_{nm} = \frac{mh\nu}{\pi e^2} B_{nm} = \frac{8\pi m\nu}{3he^2} |M_{nm}|^2 \qquad (A.12)$$

deve ser notado que $f_{nm} = - f_{mn}$

Dessas equações pode-se encontrar quantidades experimentais que estão relacionadas com o "oscilator strenght".

Seja $\rho(\nu)$ a densidade de energia de radiação com frequência entre ν e $\nu + d\nu$. De acordo com a lei de Beer, a variação desta densidade após o fluxo de energia incidente atravessar uma espessura dx de uma determinada substância será dada por:

$$d\rho(\nu) = -(\ln 10).\varepsilon_\nu [M]\rho(\nu,0)dx \qquad (A.13)$$

onde ε_ν é o coeficiente de extinção molar e [M] é a concentração molar da substância.

A energia $d\rho d\nu$, absorvida por uma espessura dx será dada por:

$$-d\rho(\nu)d\nu = (\ln 10)\varepsilon_\nu [M]\rho(\nu,0)d\rho dx \qquad (A.14)$$

A taxa de absorção de energia (energia absorvida por segundo será:

$$-cd\rho d\nu = (\ln 10)c\varepsilon_\nu[M]\rho(\nu,0)d\nu dx \qquad (A.15)$$

e o número de fótons absorvidos por segundo será:

$$-(c/h\nu)d\rho(\nu)d\nu = (c/h\nu)(\ln 10)\varepsilon_\nu[M].\ \rho(\nu,0)d\nu dx \qquad (A.16)$$

Seja n o número de moléculas no estado fundamental que podem absorver luz. Definindo $\Delta n(\nu)d\nu$ como o número de moléculas que são excitadas por segundo por absorção de luz com energia entre $h\nu$ e $h(\nu + d\nu)$, temos:

$$\Delta n\ (\nu)d\nu = -(c/h\nu)d\rho(\nu)d\nu = (c/h\nu)(\ln 10)\varepsilon_\nu[M]\rho(\nu,0)d\nu dx \qquad (A.17)$$

$$\frac{\Delta n(\nu)d\nu}{n} = \left(\frac{10^3 c \ln 10}{Nh}\right)\ \rho(\nu)\ \varepsilon_\nu\ \frac{d\nu}{\nu} \qquad (A.18)$$

Como na prática tanto a absorção como a emissão ocorrem num intervalo finito de frequência, precisamos integrar a equação sobre esse intervalo. Considerando o intervalo de frequência suficientemente estreito para que $\rho(\nu)$ possa ser considerado constante, temos:

$$\frac{\Delta n}{n} = \frac{10^3 c \ln 10}{Nh}\rho(\nu)\int \varepsilon_\nu\ d\nu/\nu \qquad (A.19)$$

De acordo com a definição $\Delta n/n = W_{nm} = B_{nm}\rho(\nu)$. Então:

$$B_{nm} = \frac{10^3 c \ln 10}{Nh}\int \varepsilon_\nu\ d\nu/\nu \qquad (A.20)$$

Pelo fato de que o espectro tem uma largura finita e pela equação A.12, temos:

$$f_{nm} = \int (\partial f_{nm}/\partial \nu)\, d\nu = \frac{mc\, 10^3 \ln 10}{\pi e^2 N} \int \varepsilon_\nu d\nu \qquad (A.21)$$

Escrevendo a frequência ν em termos de número de onda ($\bar{\nu}=\nu/c$), a equação A.21 fica sendo (em unidades cgs):

$$f_{nm} = \left(\frac{2{,}303 \,.\, 10^3 mc^2}{\pi e^2 N}\right) \int \varepsilon_\nu d\nu = 4{,}32 \,.\, 10^{-9} \int \varepsilon_\nu d\nu \qquad (A.22)$$

Das relações entre B e k_e, temos:

$$k_e = (2/3)\nu^2 f_{nm} = 2{,}88 \,.\, 10^{-9} \nu^2 \int \varepsilon_\nu d\nu \qquad (A.23)$$

Quando o sistema estudado está imerso num meio com índice de refração n, a equação 24 terá a forma:

$$k_e = 2{,}88 \,.\, 10^{-9} n^2 \nu^2 \int \varepsilon_{\bar{\nu}}\, d\bar{\nu} \qquad (A.24)$$

A integral acima pode ser calculada numericamente sobre a região da banda de absorção em questão. Num caso simples onde a banda de absorção tem a forma gaussiana, esta integral poderá ser aproximada para:

$$\int \varepsilon_{\bar{\nu}} d\bar{\nu} \cong \varepsilon_{max} \Delta\bar{\nu}_{1/2} \qquad (A.25)$$

onde ε_{max} é o coeficiente de extinção molar no máximo da banda de absorção e $\Delta\bar{\nu}_{1/2}$ é a largura em cm da banda onde o ε tem a metade de seu valor máximo. Neste caso podemos escrever:

$$k_e = 1/\tau_o \cong 2{,}88 \,.\, 10^{-9}\, n^2\, \bar{\nu}^2_{max} \varepsilon_{max} \Delta\bar{\nu}_{1/2} \qquad (A.26)$$

As equações A.24 e A.25 são equivalentes experimentais das equações teóricas A.11 e A.12, onde se pode escrever:

$$f_{nm} = \frac{8\pi^2 m\nu}{3he^2} \,|\, M_{nm} \,|^2 = 1{,}085 \,.\, 10^{11}\, \bar{\nu} \,|\, Q_{nm} \,|^2 \qquad (A.27)$$

onde

$$Q_{nm} = \langle \psi_n | \Sigma r | \psi_m \rangle = (1/e) M_{nm}$$

$$k_e = (2/3)\, \bar{\nu}^2 f_{nm} = 1{,}085 \cdot 10^{11} \bar{\nu}^3 |Q_{nm}|^2 \qquad (A.28)$$

O ACOPLAMENTO VIBRÔNICO DAS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS E O PRINCÍPIO DE FRANCK-CONDON

As transições eletrônicas são geralmente acompanhadas de transições vibracionais e rotacionais. Para amostras em solução em geral e para moléculas complexas, mesmo em estado gasoso, as estruturas rotacionais não são resolvidas, seja por problemas de equipamentos ou por problemas de largura de linha dos próprios espectros, de modo que a contribuição rotacional não é levada em conta no estudo do espectro eletrônico de moléculas complexas. A contribuição vibracional no entanto, tem um papel importante no estudo das transições eletrônicas e no próprio fenômeno da fluorescência.

A forma da estrutura vibracional no espectro vibrônico pode ser compreendida com base na aproximação de Born-Oppenheimer e no princípio de Frank-Condon. Na aproximação de Born-Oppenheimer, as funções de onda do estado fundamental ψ_n^{el} e de um estado vibrônico excitado ψ_m^{el} podem ser escritas como:

$$\psi_n^{el} = \psi_{nv''} \cong \psi_n \phi_{nv''}$$

$$\psi_m^{el} = \psi_{mv'} \cong \psi_m \phi_{mv'} \qquad (A.29)$$

e os momentos de transição M_{nm} em termos dessas novas funções podem ser escritas como:

$$M_{nm} = e < \psi_n^{el} \mid \Sigma_i r_i \mid \psi_m^{el} > =$$

$$= e < \phi_{nv''}(R) \mid Q_{nm}(R) \mid \phi_{mv'}(R) > = eQ_{nv'',mv'} \qquad (A.30)$$

onde

$$Q_{nm}(R) = \int \psi_n^* (R,r) \sum r \, \psi_m(R,r) \, dr \qquad (A.31)$$

e $Q_{nv'',mv'}$ representam a contribuição relativa da transição $nv'' \Rightarrow mv'$ ao momento de transição M_{nm} que é a soma sobre todas as contribuições vibrônicas.

A probabilidade de transição total ou a força de oscilador da transição $n \Rightarrow m$ é dada pela soma sobre todos os níveis vibracionais do estado excitado mediados pelo fator populacional g_ν (no caso de equilíbrio térmico g_ν é o fator de Boltzman). No equilíbrio térmico a população de níveis vibracionais excitados do estado eletrônico fundamental é muito pequena (exceto para temperaturas muito altas), pois a energia vibracional é muito maior que kT. Com isso a força de oscilador em equilíbrio térmico pode ser escrita como:

$$f_{nm} = \sum_{v''} g_{v''} f_{nv',m} \cong f_{no,m} = -\frac{4\pi mc}{3\hbar} \Sigma_{v'} \nu_{no,mv'} |Q_{no,mv'}|^2 \qquad (A.32)$$

como Q_{nm} é uma função de R, pode-se expandi-lo em série de Taylor em torno da configuração de equilíbrio nuclear, obtendo:

$$Q_{nm}(R) = Q_{nm}(R_e) + \Sigma_i \left(\frac{\partial Q_{nm}(R)}{\partial R_i} \right)_{Re} R_i .. + ... \qquad (A.33)$$

onde R_i representa o i-ésimo modo normal de vibração. Para uma transição simetricamente permitida Q_{nm} (Re) $\neq 0$, enquanto que para uma transição proibida por simetria Q_{nm} (Re)=0.

Para uma transição simetricamente permitida, quando se puder desprezar os termos de ordem superior na equação A2.33, a

força de oscilador é dada por:

$$f_{nv'',mv'} \cong f_{n0,m} =$$

$$=(4\pi mc / 3h) \; | Q_{nm}(R_e) |^2 \sum_{v'} \nu_{n0,mv'} \; | S_{n0,mv'} |^2 \qquad (A.34)$$

onde

$$S_{n0,mv'} = \int \phi^*_{n0}(R)\,\phi_{nv'}(R)\,dR \qquad (A.35)$$

As equações A.34 e A.35 mostram que a contribuição de cada componente vibrônico para a força de oscilador e para a probabilidade de transição é proporcional ao quadrado da integral de recobrimento vibracional $S_{n0,mv'}$. Este resultado contém a essência do princípio de Franck-Condon segundo o qual durante uma transição eletrônica a molécula permanece praticamente em sua configuração de equilíbrio inicial.

Fenomenologicamente podemos interpretar o princípio de Franck-Condon considerando que as transições eletrônicas ocorrem numa escala de tempo de 10^{-15} a 10^{-16} segundos, enquanto as transições puramente vibracionais, que correspondem a mudanças de configurações nucleares, ocorrem tipicamente numa escala de 10^{-13} segundos. Devido a essa diferença de escala de tempo, o tempo de transição eletrônica é demasiado curto para que ocorra uma alteração significativa na configuração nuclear da molécula.

Quando a configuração de equilíbrio de um estado eletrônico excitado é diferente da do estado fundamental (Fig. A.1) a transição eletrônica acontece para um estado vibracional do estado eletrônico excitado, o chamado "estado Franck-Condon". Como a relaxação para a configuração de equilíbrio de energia mais baixa ocorre num tempo muito menor que o tempo de vida do estado eletrônico excitado, a emissão da fluorescência ocorre da configuração de equilíbrio do estado eletrônico excitado para um estado de Franck-Condon do estado eletrônico fundamental. O princípio de Franck-Condon é responsável pelo "red shift" observado na fluorescência.

Na figura A.2 é mostrado o esquema dessas transições em termos das coordenadas de configuração da molécula. Quanto maior a

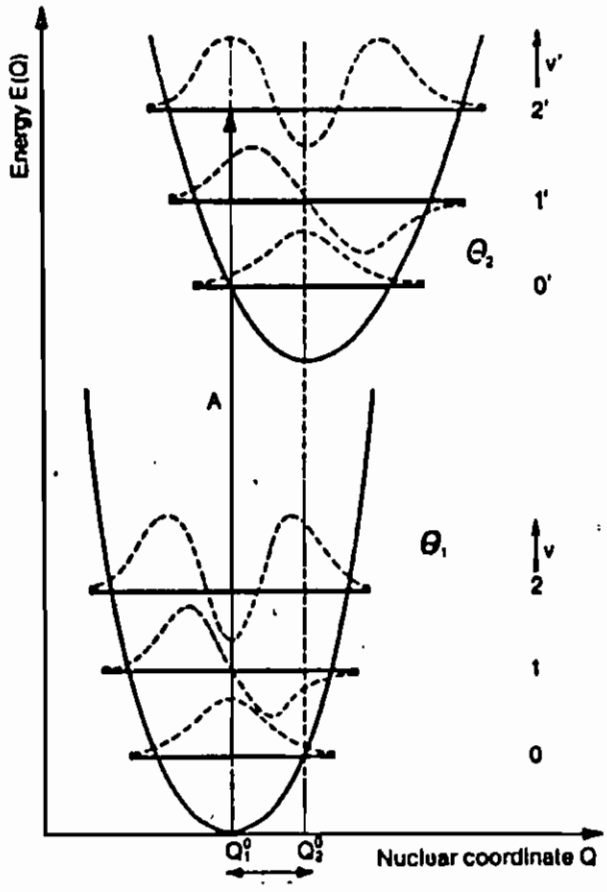


FIGURA A.1 -Curvas de energia potencial mostrando dois estados eletrônicos e níveis vibracionais (estados de Franck-Condon).

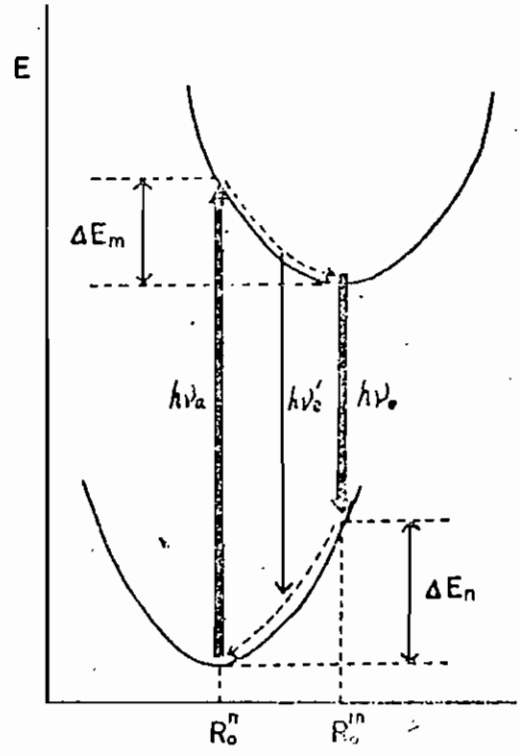


FIGURA A.2 - Diagramas de coordenadas de configuração mostrando os estados de Franck-Condon e o estado de equilíbrio no processo de absorção e emissão de luz.

diferença $\Delta R = R_n^0 - R_m^0$,maior será a diferença em energia entre o espectro de absorção e o de emissão.

Pode-se considerar a possibilidade de a molécula emitir a partir de qualquer configuração do estado de Franck-Condon. Admitindo a taxa de emissão k_e constante em qualquer estado de Franck-Condon, é de se esperar que durante o processo de rearranjo das configurações nucleares uma fração das moléculas possa emitir com uma energia $h\nu'_e$(Fig.A.2) maior que $h\nu_e$. Essa emissão terá um espectro contínuo e será desprezível com relação ao total de fluorescência mas pode mascarar o Raman do sistema que é algumas ordens de grandeza mais fraco que a fluorescência normalmente observada.

TRANSIÇÕES SPIN-PROIBIDAS E TRANSIÇÕES NÃO RADIATIVAS

A parte eletrônica da função de onda molecular (eq.A.29) pode ser escrita como o produto de uma função espacial por uma função de spin:

$$\psi_m = \Phi_m(r)\ \Theta_m(s) \qquad (A.36)$$

Um estado molecular pode ter multiplicidade de spin singleto, dubleto, tripleto, etc, dependendo de que o número quântico de spin seja 0, 1/2, 1, etc. Para estados de mesma multiplicidade, a integral da parte de spin (eq. A.36) é igual à unidade e não altera a probabilidade de transição eletrônica, ou seja:

$$\int \Theta_m^*(s)\ \Theta_n(s)d\tau_s = 1 \qquad (A.37)$$

Para estados de multiplicidades diferentes a mesma integral será nula devido à ortogonalidade das funções de onda de spin. Com isso , as transições eletrônicas entre estados de diferentes multiplicidades são "spin proibidas". No entanto, uma perturbação pode levar a uma "mistura" de estados de multiplicidades diferentes, permitindo transições entre tais estados

"impuros"[63].

Essa perturbação é causada pela interação do spin eletrônico com o movimento orbital dos elétrons, a interação "spin-órbita", que pode ser definida por uma hamiltoniana perturbativa H_{so}.

A única situação em que H_{so} pode ser definida precisamente é para um átomo mono-eletrônico, quando se tem [64]:

$$H_{so} = (e/2m^2c^2)\ 1/R\ \{\partial u(R)/\partial r)\mathbb{L}.\mathbb{S} = \phi(r)\ \mathbb{L}.\mathbb{S} \qquad (A.38)$$

onde $\mathbb{L}$ é o operador momento angular, $\mathbb{S}$ o operador de spin e $\phi(r)$ é uma função que só depende do potencial do núcleo. Nos casos de moléculas poliatômicas pode-se fazer uma representação aproximada da função de onda que resulta do acoplamento spin-órbita na forma:

$$\psi_{so} = \psi_T^{\circ} + \lambda\ \psi_s^{\circ} \qquad (A.39)$$

onde ψ_T° pode representar um estado tripleto não perturbado, ψ_s° um estado singleto que pode acoplar com o tripleto devido à interação e λ mede a intensidade do acoplamento. λ pode ser representada por [65]:

$$\lambda = \frac{< \psi_s^{\circ} |\ H_{so} | \psi_T^{\circ} >}{E_T - E_s} \qquad (A.40)$$

E_T e E_s são as energias dos estados tripleto e singleto, respectivamente. É assumido por simplicidade a existência de um único estado singleto e um tripleto que podem se acoplar. Devido ao acoplamento spin-órbita, o momento de transição M_{nm} pode agora ser escrito como:

$$M_{so} = < \psi_{so} |\ e\sum r\ |\ \psi_1 > \qquad (A.41)$$

onde ψ_{so} é a função de onda molecular de um estado tripleto sob a perturbação spin-órbita e ψ_1 a função de onda do estado fundamental. Temos então:

$$M_{so} = e< \psi_T^{\circ}\ |\ \sum r\ |\ \psi_1 > + \lambda e < \psi_s^{\circ}\ |\ \sum r\ |\ \psi_1 > \qquad (A.42)$$

O primeiro termo da equação A.42 é nulo pois envolve estados não perturbados de multiplicidades diferentes e o segundo contém um termo de transição independente de spin. Com isso temos:

$$M_{SO} = \frac{e < \psi_S^0 | H_{SO} | \psi_T^0 >}{E_T - E_S} < \psi_s^0 | \Sigma r | \psi_0 > \qquad (A.43)$$

Como o termo H_{SO} é uma perturbação, é muito menor que a Hamiltoniana não perturbada. Com isso, o momento de transição entre estados de multiplicidade diferentes é muito menor que entre estados de mesma multiplicidade.

Os processos de emissão envolvendo transições entre estados de mesma multiplicidade são definidos como fluorescência e aqueles entre estados de diferentes multiplicidades são chamados fosforescência. As restrições a transições spin-proibidas explicam porque a meia-vida radiativa no caso da fosforescência geralmente é maior que 10^{-3} segundos. Enquanto que na fluorescência a meia-vida radiativa na maioria das moléculas está na faixa de 10^{-9} a 10^{-6} segundos.

Os processos de fluorescência e fosforescência envolvem ainda a interação entre estados excitados com transições não radiativas entre estados excitados de mesma multiplicidade (processo de conversão interna) via estados de Franck-Condon ou entre estados de diferentes multiplicidades (cruzamento intersistema). É possível ainda a transição não radiativa dos estados excitados para o estado fundamental, também baseado no princípio de Franck-Condon. Na maioria dos sistemas moleculares o primeiro estado excitado é um estado tripleto com energia muito próxima a do estado singleto. Devido a essa proximidade em energia, os estados excitados tripleto (T_1) e singleto (S_1) sofrem uma interação tão intensa a ponto de não se poder falar na existência de estados tripleto e singleto "puros" mas numa configuração entre os dois estados. Essa proximidade pode permitir também que no equilíbrio o estado de maior energia (singleto) seja populado termicamente a partir do estado tripleto, sabendo-se que o estado tripleto tem tempo de vida muito maior que o singleto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- VOLKENSHTEIN, M.V. - Biofísica; Editorial Mir, Moscow (1981)

2- MARK,G.S. - Heme and Chlorophyll Chemical, Biochemical and Medical Aspects;D.V. Nostrand, London (1969)

3- HOFFMAN,M.Z.; BOLLETTA,F.; MOGGI,L. & HUG,G.L. - J. Phys. Chem. Ref. Data 18, 219 (1989)

4- PASTERNACK, R.F. - Ann. N. V. Acad. Sci. 206, 614 (1973)

5- KALYANASUNDARAN,K. & GRATZEL,M. - Helv. Chim. Acta 63,478 (1980)

6- DARWENT,S.R.; DOUGHLAS,P.; HARRIMAN,A.; PORTER,G. & RICHOUX,M.C. Coord. Chem. Rev. 44, 83 (1982)

7- NICOLAUS,R.A.; Melanins, Hermann, Paris (1968)

8-HORAK,V. & GILLETTE,J.R., MOLECULAR PHARMACOL. 7, 429(1971)

9- CRIPPA,P.R. & MAZZINI,A. - Physiol. Chem. Phys. and Med. NMR 15, 51 (1983)

10-ITO,A.S. & CRIPPA,P.R. - Physiol. Chem. Phys. and Med. NMR 17, 205 (1985)

11-D'AMATO,J.R.; LIPMAN,Z.P. & SNYDER,S.H. - Science 231, 987 (1986)

12-MONTEFIORI,D.C.; MODLISZEWSKI,A.; SHAFF,D.I. & ZHOU,J. - Biochem. Biophys. Res. Commun. 168, 200 (1990)

13-KORYTOWSKI,W.; PILLAS,B.; SARNA,T. & KALYANARAMAN,B. - Photochem. Photobiol. 45, 185 (1981)

14-PASCUTTI,P.G. & ITO,A.S. - J. of Photoch.and Photob., aceito para publicação (1992)

15-SEALY,R.C.; SARNA,T.;WANNER,E.J. & RESZKA,K. - Photochem. Photobiol. 4a, 453 (1984)

16-SARNA,T.;MENON,I.A. & SEALY,R.C. - Photochem. Photobiol. 42, 529 (1985)

17-HABERMAN,H.F.; PERSAD,S. & Menon,A. - Pigment Cell (1981) Proc. of the XIth Intern. Pigment Cell Conference, Sendai, Japan - Ed. Makoto Seigi (1980)

18-BIELEC,J.; PILLAS,B.; SARNA,T. & TRUSCOTT,T.G. - J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, 82, 1429 (1986)

19-GIROTTI,A. - Biochemistry, 18, 4403 (1979)

20-JORI,G. & PERRIA,C. (ed.) - Photodynamic Therapy of Tumors (Libreria Progetto, Padova, 1985)

21-HO,Y.N.; PANDEY,R.K.; MISSORT,J.R.; BELLNIER,P.A. & DOUGHERTY, T.J. - Photochem. Photobiol. 48, 445 (1988)

22-WEISHAUPT,K.R.; GOMER,C.J.& DOUGHERTY,J.T. - Cancer Res. 36, 2326 (1976)

23-FIEL,J.R. & MUNSON,B.R.- Nucleic Acid Res. 8, 2835 (1980)

24-PASTERNACK,R.F.; GIBBS,E.J. & VILLAFRANCA,J.J. - Biochemistry 22,2406 (1983)

25-NONAKA,Y.; LU,D.S.; DWIVEDI,A.; STROMMEN,D.P. & NAKANOTO,K. Biopolymers 29, 999 (1990)

26-GERAISIMOV,O.V.; LYMAR,S.V. & PARMON,V.N. - J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 56, 275 (1991)

27-Le ROUX,D.; MIALOCQ,J.-C.; ANITOFF,O. & FOLCHER,G. - J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2, 80, 909 (1984)

28-AZZELINI,G. - TESE DE DOUTORADO - IQUSP (1991)

29-ALBRECHT,C.A. - J. Chem. Phys. 34, 1476 (1961)

30-ASHER,S. & SAUER,K. - J. Chem. Phys. 64, 3115 (1976)

31-SHELNUT,J.A.; O'SHEA,D.C.; YU,N.T.; CHEUNG,L.D. & FELTON,R.H. J. Chem. Phys. 64, 1154 (1976)

32-SHELNUT,J.A. - J. Chem. Phys. 72, 3948 (1980)

33-SHELNUT,J.A. - J. Chem. Phys. 74, 6644 (1981)

34-KITAGAWA,T.; ABE,M. & OGOSHI,H.-J. Chem. Phys.69, 4156 (1978)

35-KITAGAWA,T. & OZAKI,Y.- Structure Bonding 64, 71 (1987)

36-LI,X.-Y.; CZERNUSZEWICZ,R.C.; KINCAID,J.R.; SU,Y.O. & SPIRO,T.G. - J. Phys. Chem. 94, 31 (1990)

37-LI,X.-Y.; CZERNUSZEWICZ,R.C.; KINCAID,J.R.; STEIN,P. & SPIRO,T.G. - J. Phys. Chem. 94, 47 (1990)

38-SPIRO,T.G.; CZERNUSZEWICZ,R.C. & LI,X.-Y. - Coord. Chem. Rev.100, 541 (1990)

39-LI,X.-Y.; CZERNUSZEWICZ,R.C.; KINCAID,J.R. & SPIRO,T.G. - J. Am. Chem. Soc. 111, 7012 (1989)

40-NAKAMOTO,K.; BLOON,N.;ODO,J. & STROMMEN,D.P. - J. Phys. Chem. 90, 2847 (1986)

41-ITO,A.S.; AZZELINI,G.; SILVA,S.C.; SERRA,O. & SZABO,A.G. - Biophysical Chemistry (submetido em 1992)

42-FLEISHER,E.B. - Inorg. Chem. 1, 493 (1962)

43-WILLIS,W.J. & SZABO,A.B. - Biochemistry 28, 4902 (1989)

44-MOREIRA,A. - Dissertação de Mestrado, ITA (1986)

45-LONGUETT-HIGGINS,H.C.; RECTOR,C.W. & PLATT,J.R. - J. Chem. Phys. 18, 1174 (1950)

46-MOFLITT,W. - J. Chem. Phys. 22, 320 (1954)

47-SIMPSON,W.T. - J. Chem. Phys. 17, 1218 (1949)

48-KUHN,H. - J. Chem. Phys. 17, 1198 (1949)

49-GOUTERMAN,M. - J. Chem. Phys.30, 1139 (1959)

50-GOUTERMAN,M. - J. Mol. Spect. 6, 138 (1961)

51-GOUTERMAN,M. -The Porphyrins, vol. III, pg. 1-165, ed. Dolphin (1978)

52-EDWARD,L.; DOLPHIN,D.H. & GOUTERMAN,M. - J. Molec. Spectrosc. 35, 90 (1975)

53-CRIPPA,P.R.; CRISTOFOLETTI,V. & ROMEO,N. - Biochem. Biophys. Acta 538, 164 (1978)

54-TANG,J.; ALBRECHT,A.C. - Raman Spectrosc. 2, 33 (1970)

55-BORN,M.; OPPENHEIMER,R. - Ann. Phys. 84, 457 (1927)

56-BORN,M.; HUANG,K. - Dynamical Theory of Crystal Lattice, Oxford, Univ. Press, Oxford (1954)

57-LI,X.-Y. & ZGIERSKI,M.C. - J. Phys. Chem. 95, 4268 (1991)

58-SONG,O.K.; YOON,M.J. & KIM,D.- J.Raman Spect. 20, 739 (1989)

59-COTTON,F.A. - Chemical Applicationof Group Theory - 2 ed. Willey, New York (1963)

60-MATAGA,M. & KUBOTA,T. - Molecular Interactions and Eletronic Spectra, M. Dekker, N. York (1970)

61-CANTOR, C.R. & SCHIMMEL,P.R. - Biophysical Chemistry - Part III W.H. Freeman and Co., San Francisco (1980)

62-HEITLER,W. - The Quantun Theory of Radiation, Oxford, N. York(1957)

63-GOODMAN,L. & KRISNA,V.G. - Rev. Mod. Phys. 35, 541 (1963)

64-GOTTFRIED,K. - Quantun Mechanics Fundamentals, Addison-Wesley (1989)

65-TURRO,J. - Modern Molecular Photochemistry, Benjamin & Cummins Publishing Co., Menlo Park, CA (1978)

66-RYBAC,W.; HALM,A.; NETZEL,T.L. & SUTIN,N. - J. Phys. Chem. 85, 2856 (1981)

67-GALVÃO,D.S. & CALDAS,M.J. - J. Chem. Phys. 88, 4088 (1988)

68-RIDENTE,Y. - Dissertação de Mestrado, IFUSP (1991)

69-CRIPA,P.R. & VIAPPIANI,C. - Eur. Biophys.J. 17, 299(1990)