

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE PORFIRINAS E
EUMELANINA SINTÉTICA**

Dilcelli Soares

Dissertação de Mestrado

Gianluca Camillo Azzellini

ORIENTADOR

São Paulo

2005

A Deus, por tudo que consegui em minha vida.
Aos meus pais, pelo constante apoio e por acreditarem em mim,
até mesmo quando eu não acredito.
À minha irmã querida e agora também meu sobrinho lindo,
por toda compreensão e alegria.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pela confiança e incentivo em tudo na minha vida.

À minha irmã pelo companheirismo, amizade e dicas preciosas neste meu trabalho.

Aos meus avós pelo apoio, carinho e exemplo de pessoas que são.

Ao prof. Gianluca, pela orientação, pelo convívio informal e conselhos durante todo tempo que estive aqui em São Paulo.

Aos meus amigos queridos Vanessa, Carlinhos e Carlão, por estarem comigo em todos os momentos desde que cheguei aqui em São Paulo.

Um agradecimento especial ao Gabriel, pelo companheirismo, carinho e incentivo ao meu trabalho.

Às grandes amigas que aqui conquistei, Andressa, Juliana Luz, Ligia, Suelen e Vanessa.

À querida amiga Andressa, pela paciência e dicas na escrita deste trabalho.

Às minhas grandes amigas Adelaine, Letícia, Mara e Marines, pois apesar da distância sempre estiveram muito presente.

Aos meus amigos de laboratório Andressa, Ligia, Suelen, Mônica, Grazille, Talita, Marcela e Ruy, pelo convívio amigável, companheirismo e ajudas na realização deste trabalho.

À Cida pelo apoio e ajudas preciosas no decorrer deste trabalho.

À Ivone por preservar a limpeza e a ordem no laboratório.

Aos amigos da SPG pela paciência e dicas preciosa, tanto profissional quanto pessoal.

À Capes e Fusp pelas bolsas concedidas.

RESUMO

Foram investigadas através da técnica de absorção eletrônica Uv-Vis e emissão de fluorescência a interação entre uma série de porfirinas e zinco-porfirinas com o polímero de eumelanina sintética obtida pela auto-oxidação da L-DOPA (dihidroxi-fenilalanina).

Ocorre a formação de dois complexos na interação entre as porfirinas catiônicas e a eumelanina. Um complexo mais fraco em concentrações mais baixas e intermediárias de eumelanina, e um complexo mais forte em concentrações maiores. Estes complexos podem ser observados pelas variações obtidas nos espectros de absorção em função da concentração da melanina.

A eumelanina suprime eficientemente a fluorescência das porfirinas catiônicas, em um processo de supressão por esfera de ação. Este processo ocorre particularmente para os complexos fracos entre a porfirina e a eumelanina, podendo ser inferido pela natureza de polieletrólito da eumelanina que deve apresentar uma ampla superfície de contato carregada negativamente, facilitando a orientação das porfirinas em uma disposição planar em relação ao polímero. A determinação das constantes de supressão estáticas aparentes (K_{EA}) mostra que os substituintes alquílicos influem consideravelmente na formação destes complexos com a eumelanina. As diferentes interações são devidas aos fatores estruturais tais como dimensão da porfirina, polarização dos substituintes e formação de interações de natureza hidrofóbica. As zinco-porfirinas são de forma geral menos suprimidas que as bases livres. Este comportamento pode ser uma evidencia da aproximação planar em relação ao polímero da melanina, uma vez que zinco porfirinas apresentam moléculas de água ligadas axialmente, logo estas moléculas coordenadas axialmente impediriam uma aproximação mais efetiva.

Foi realizado um estudo da formação de filmes baseados na técnica de auto-montagem eletrostática entre as porfirinas e a melanina utilizando como substrato o vidro. Observa-se que a adsorção das porfirinas em vidro é

diferenciada sendo a TBzPyP a base livre que apresenta a maior adsorção. Pelos espectros de emissão dos filmes de porfirina em vidro foi possível verificar que alguns derivados interagem com uma participação mais efetiva dos piridínios que outros em que a interação é menos direcionada.

Nos filmes porfirina melanina também é observada a supressão de fluorescência da porfirina. A diferença na magnitude de supressão nos filmes sugere que estes derivados possam ser utilizados em sistemas de diagnóstico relacionados à detecção de tumores melanóticos.

Em um estudo paralelo, foram investigadas as propriedades de fotoisomerização de grupos azobenzênicos coordenados axialmente a uma ftalocianina de Silício(IV). Este sistema apresenta fotoisomerização E-Z e isomerização térmica e sensibilizada para o processo Z-E. As conversões E-Z e Z-E seguem uma cinética de primeira ordem, sendo o processo térmico Z-E cerca de dez vezes mais lento que o fotoquímico E-Z. A intensidade de fluorescência da ftalocianina é dependente do estado de isomerização dos grupos axiais, sendo que a forma E apresenta maior emissão de fluorescência que a forma Z. Portanto este sistema se constitui em um dispositivo molecular do tipo "on-off", onde a intensidade de fluorescência pode ser controlada por um estímulo externo, no caso o comprimento de onda de excitação para a reação E-Z direta ou Z-E sensibilizada.

ABSTRACT

In this work we have investigated the interaction between a series of cationic porphyrins and zinc-porphyrins and the synthetic eumelanin polymer obtained by the auto-oxidation of L-DOPA (dihydroxy-phenylalanine) by means of UV-Vis and fluorescence emission techniques.

Weak and strong porphyrin-melanin complexes are formed, and the evolution from weak to strong complexes can be monitored by the UV-Vis changes in the porphyrin spectra as the melanin concentration increases.

The porphyrin fluorescence emission is quenched efficiently by eumelanin in a "quenching sphere of action" mechanism. This quenching sphere of action process is mainly observed for the weak complexes, and can be rationalized considering the polyelectrolyte nature of the eumelanin polymer which provides a broad contact area coated negatively, that enables a planar approximation of the porphyrins. The apparent static quenching constants (K_{EA}) show that the nature of the alkyl substituents markedly influences the complex formation. Total porphyrin size, different polarization induced by substituents and specific hydrophobic interactions are probably responsible for the different porphyrin – melanin association, which in turn reflects in the quenching properties of each particular porphyrin - melanin complex. The corresponding Zinc-porphyrins are less efficiently quenched by eumelanin, probably due the fact this molecules are axially coordinated by a water molecule, precluding a more close approximation between zinc-porphyrin and the eumelanin polymer.

Electrostatically self-assembled films of porphyrins and eumelanin on glass have been studied. Different porphyrin adsorption on glass were observed, and TBzPyP derivative shown the highest adsorption in the investigated porphyrin series. Fluorescence emission suggests different interaction properties of the adsorbed porphyrin on glass, with specific pyridinium participation for some porphyrin derivatives.

Fluorescence quenching of the porphyrins is observed in porphyrin – melanin films. The differences observed in the quenching for each derivative suggest a possible application of these compounds for diagnostic procedures related to melanotic tumors.

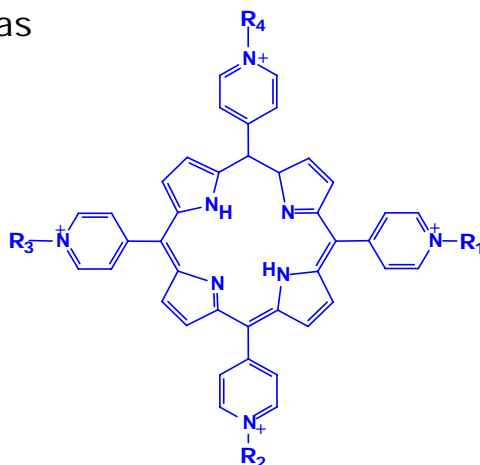
In a complementary study, have been investigated the photoisomerization properties of a Si(IV)-phthalocyanine axially coordinated by azobenzene groups. Photochemical E-Z and thermal and sensitized Z-E isomerization processes were observed. Both E-Z photochemical and Z-E thermal follow first-order kinetics. Z-E process as expected is considerably slower than E-Z. The pthalocyanine emission is dependent on the isomerization state of the apendent azobenze groups, and the E form is more emissive than the Z form. This system can be considered a molecular device since the emission properties of the phthalocyanine moiety can be modulated by the isomerization state of the axially coordinated azoarenes, creating an on-off (*E-Z* states) fluorescence signal, and differently from other reported systems the recovery of the initial state does not depend only on the rate of the thermal reaction, since it can be controlled by a sensitized mechanism. This system seems promising taking into account the stability of the axially coordinated moieties, the greater versatility in the achievement of the desired isomerization state and the broad spectral region considering both direct and sensitized excitation.

ÍNDICE

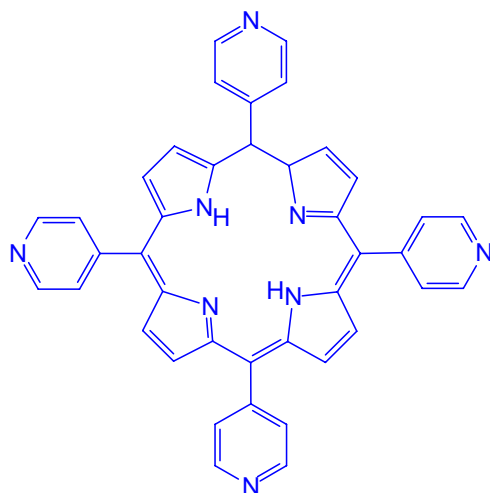
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fototerapia	1
1.1.1 Terapia Fotodinâmica	4
1.2 Melanina	12
1.2.1 Pele e câncer de pele	19
1.3 Aspectos Gerais da Síntese e Caracterização das Porfirinas	22
1.3.1 Nomenclatura	23
1.3.2 Síntese: aspectos gerais	24
1.3.2.1 Síntese de meso-piridínioporfirinas	26
1.3.3 Espectros Eletrônicos de Absorção	29
1.3.4 Espectros Eletrônicos de Emissão	32
1.3.4.1 Supressão de fluorescência	37
2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO DA DISSERTAÇÃO - OBJETIVOS	42
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Reagentes	43
3.2 Instrumentação	43
3.3 Sínteses	44
3.3.1 Síntese da TBzPyP	44
3.3.2 Síntese da TMPyP	45
2.3.3 Síntese da TNO ₂ BzPyP	45
3.3.4 Síntese da TMeOBzPyP	46
3.3.5 Síntese da TCIBzPyP	46
3.3.6 Síntese da TBrBzPyP	46
3.3.7 Síntese da TCO ₂ HBzPyP	47
3.3.8 Síntese da TCH ₃ BzPyP	47
3.3.9 Síntese das Zinco porfirinas	48
3.3.10 Síntese da MHDPyTrisPyP	49

	X
3.3.11 Síntese da TrisMPyHexDPyP	49
3.3.12 Síntese da TrisBzPyHexDPyP	49
3.3.13 Síntese da THDTPyP	50
3.3.14 Síntese da Dopa-melanina	50
3.3.15 Preparação dos filmes	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 Sínteses	51
4.2 Síntese dos derivados porfirínicos anfífilico separação da MHDPyTrisPyP	56
4.3 Espectroscopia UV-Vis	63
4.4 RMN – 1H	70
4.5 Emissão de Fluorescência das Porfirinas	75
4.6 Interação Porfirina-melanina	80
4.6.1 Espectroscopia Eletrônica de Absorção	80
4.5.2 Espectroscopia Eletrônica de Emissão	89
4.4 Filmes	98
5 CONCLUSÕES	108
6 REFERENCIAS	112

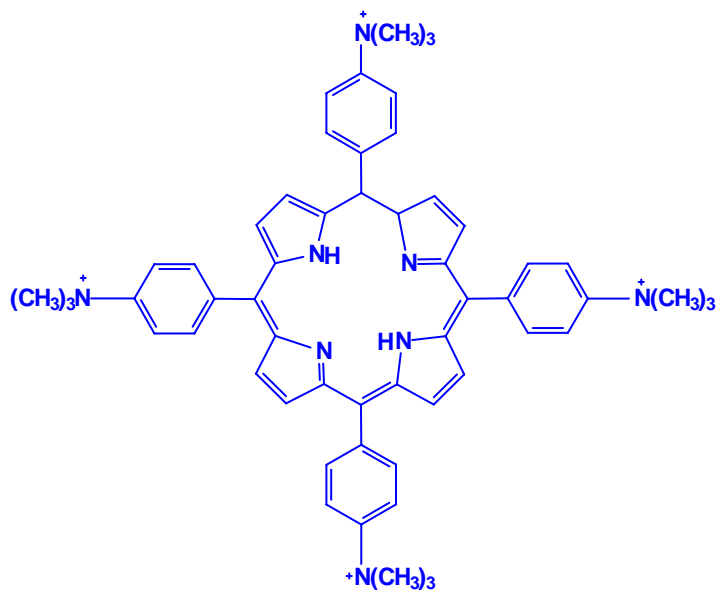
Estrutura Porfirinas



$R_1 = R_2 = R_3 = R_4$		R_1	
$-\text{CH}_3$	TMPyP	$-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$	TrisMPyHexDPyP
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	TBzPyP	$R_2 = R_3 = R_4$	
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NO}_2$	TNO₂BzPyP	$-\text{CH}_3$	
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Cl}$	TCIBzPyP	R_1	TrisBzPyHexDPyP
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OCH}_3$	TMeOBzPyP	$-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$	
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Br}$	TBrBzPyP	$R_2 = R_3 = R_4$	
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COOH}$	TCO₂PyP	$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$	
$-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$	TCH₃BzPyP		
$-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_{14}-\text{CH}_3$	THexDecPyP		



TPyP



TMAPP

ABREVIATURAS

TPyP	5,10,15,20-tetrakis(4-piridil)-porfirina
TMPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-metilpiridínio-4-il)-porfirina
TBzPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-benzilpiridínio-4-il)-porfirina
TNO ₂ BzPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-(4-nitro)benzilpiridínio-4-il)-porfirina
TCIBzPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-(4-cloro)benzilpiridínio-4-il)-porfirina
TMeOBzPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-(4-metoxi)benzilpiridínio-4-il)-porfirina
TBrBzPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-(4-bromo)benzilpiridínio-4-il)-porfirina
TCO ₂ BzPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-(4-carboxi)benzilpiridínio-4-il)-porfirina
TCH ₃ BzPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-(4-metil)benzilpiridínio-4-il)-porfirina
THexDecPyP	5,10,15,20-tetrakis(1-hexadecilpiridínio-4-il)-porfirina
TrisPyMHDPyP	5,10,15,-tris(4-piridil)-20-(1-hexadecilpiridínio-4-il)-porfirina
TrisMPyHexDPyP	5,10,15,-tris(1-metilpiridínio-4-il)-20-(1-hexadecilpiridínio-4-il)-porfirina
TrisBzPyHexDPyP	5,10,15,-tris(1-benzilpiridínio-4-il)-20-(1-hexadecilpiridínio-4-il)-porfirina
TMAPP	5,10,15,20-tetrakis(trimetilaminofenil)-porfirina
TPP	5,10,15,20-tetrakis(4-fenil)-porfirina
TPPS	5,10,15,20-tetrakis(4-sulfonatofenil)-porfirina

1. INTRODUÇÃO

A luz é responsável pela realização de uma variedade de funções essenciais dos sistemas biológicos. Pode-se dizer que uma das mais importantes funções da luz é a transmissão de informações de ambientes resultando em movimento, orientação e visão. Na visão, por exemplo, este mecanismo se resume basicamente na ativação enzimática, passando por um efeito cascata que é iniciado com a fotoexcitação da enzima rodopsina e termina com a ativação da enzima fotoesterase¹. A luz também é fundamental na fotossíntese onde temos a clorofila como molécula principal neste processo, sendo que os carotenóides e as ficobilinas também participam no mecanismo de captação de luz². Além destes processos mencionados acima, existe outro exemplo já bem conhecido da necessidade da luz, na síntese de vitamina D³.

1.1 FOTOTERAPIA

O uso da luz visível, ou de região próxima ao visível, é conhecido como fototerapia que pode ser dividida em duas categorias:

→ *Direta* - quando moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos, absorvem a luz e sofrem alterações. A absorção de luz pode ativar mudanças no DNA e conseqüentemente na regulação de suas funções biológicas. Mudança na estrutura secundária e terciária originadas pela absorção de luz UV são induzidas pela variação das bases constituintes do DNA. A afinidade entre o DNA e as proteínas numa seqüência de interações específicas, varia de acordo com a densidade super helicoidal do DNA. Desta forma a modificação de um dos parâmetros qual como, conformação helicoidal, ângulo entre duas bases adjacentes, ângulo entre os pares de base e outros são muito importantes na regulação das funções biológicas das proteínas. Além disso, interações específicas entre proteínas e DNA podem gerar outras alterações na estrutura do DNA.

No tratamento de psoríase, por exemplo, utiliza-se bastante este método onde geralmente emprega-se uma fonte artificial de luz com raios ultravioletas (UV) B, que correspondem à região de 280-315 nm, sendo esta região a mais adequada para o tratamento⁴. Geralmente são utilizadas câmaras ou pistolas de raios UVB, que também podem estar associados a remédios biológicos, atuando no sistema imunológico induzindo a apoptose.

No tratamento da hiperbilirrubinemia também é utilizada a fototerapia direta. A hiperbilirrubinemia é caracterizada por uma concentração anormalmente elevada de bilirrubina no sangue. A luz sobre a pele do recém-nascido produz uma alteração química nas moléculas de bilirrubina localizadas nos tecidos subcutâneos.

A configuração original da bilirrubina é 4Z,15Z (figura 1(1)). Nesta configuração, a bilirrubina é capaz de assumir uma conformação na qual todos os grupos funcionais polares estão internamente ligados através de pontes de hidrogênio. Esta conformação preferencial explica as propriedades lipofílicas deste composto e a necessidade de adição de grupos polares para sua secreção. Quando exposto à luz visível, preferencialmente na região de 450 nm, ocorre uma rápida reação de isomerização da bilirrubina de Z para E. Esta reação pode ocorrer na posição 4 ou 15. O rendimento quântico de formação de 4Z,15E-bilirrubina (figura 1(2)) da bilirrubina ligada à albumina humana a 37° C é aproximadamente 0,2. A forma E é mais solúvel em água que a molécula de bilirrubina inicial, visto que nesta configuração nem todos os grupos funcionais polares estão envolvidos em ligações de hidrogênio internas. A 4Z,15E-bilirrubina é termicamente instável, e na ausência do efeito estabilizante da ligação com albumina, rapidamente converte à forma inicial. A reação fotoquímica de Z para E é reversível e ocorre rapidamente devido à sobreposição dos espectros de absorção das duas moléculas, um fotoequilíbrio pode ser rapidamente formado quando a bilirrubina está ligada a albumina e é irradiada em um sistema fechado. A composição do fotoequilíbrio depende do comprimento de onda utilizado na reação, a luz na região azul favorece a formação do composto 4Z,15E-bilirrubina e luz em comprimentos de onda maiores favorece a formação do composto 4Z,15Z-bilirrubina⁵.

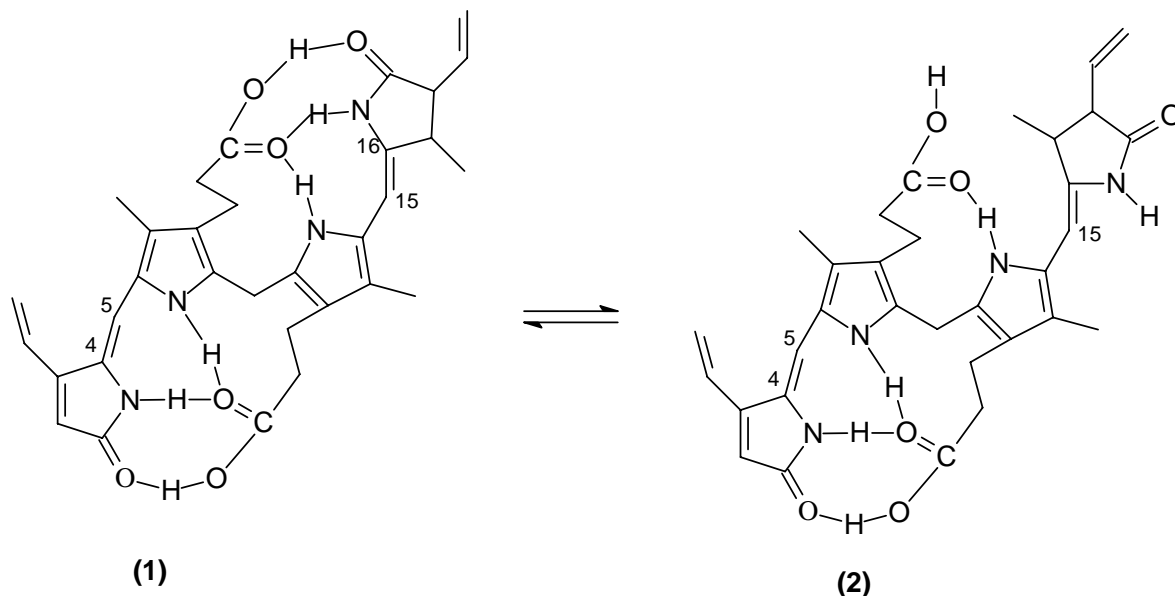


Figura 1. Reação de fotoisomerização da Bilirrubina. 1, 4Z,15Z-bilirrubina; 2, 4Z,15E-bilirrubina

Após ser alterada, a bilirrubina pode ser mais rapidamente excretada pelo fígado, sem necessidade de ser previamente alterada (conjugada) pelo fígado.

→ *Indireta* - quando o efeito é promovido por um fotossensibilizador administrado que atua como o absorvedor efetivo da luz utilizada no tratamento fototerápico. Uma vez que ocorre a absorção de luz pelo fotossensibilizador, ocorre a formação de um estado excitado, que é o estado reativo responsável pelo efeito terapêutico. A desativação deste estado excitado no efeito terapêutico pode ocorrer através de diversos processos como a transformação da própria droga ou através de reações de transferência de elétrons, ou energia, com moléculas endógenas⁶.

Outro aspecto importante da terapêutica indireta está relacionado com a utilização de fotossensibilizadores no diagnóstico de tumores através da emissão de fluorescência. Esta técnica de diagnóstico é baseada na propriedade de acumulação seletiva em tecidos tumorais apresentada por alguns

fotossensibilizadores que, mesmo interagindo com tais tecidos, ainda apresentam emissão de fluorescência, como é o caso de algumas porfirinas⁷.

Apesar do grande desenvolvimento tanto no diagnóstico como no tratamento através da fototerapia, é necessária a análise do efeito fotobiológico da radiação que está sendo utilizada em cada tipo de tratamento. Isto é, para o uso de uma determinada condição experimental é necessário um conhecimento exato da sensibilidade espectral do meio biológico e, conseqüentemente, do efeito fotobiológico no tratamento⁸. Nos seres humanos existem várias moléculas capazes de absorver luz. Este é o motivo pelo qual deve-se ter um exato controle da luz que está sendo absorvida pelas moléculas evitando-se a possível ocorrência de reações de transferência de elétrons ou de energia indesejáveis. O DNA é um exemplo de molécula que absorve luz na região UV o que pode levar à clivagem de suas ligações e conseqüentemente mutações no DNA⁹.

1.1.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

O uso de luz em combinação com a administração de um fotossensibilizador é o princípio básico da terapia fotodinâmica (TFD).

As primeiras experiências visando a aplicação do efeito fotodinâmico no tratamento de tumores, em humanos, foram feitas em 1903 por Tappernier e Jesionek, empregando eosina como fotossensibilizador. Em 1924 Policard observou que porfirinas podiam ser encontradas em elevadas concentrações em tumores malignos¹⁰. Observou também que porfirinas não apresentavam toxicidade, no entanto na presença de luz visível e oxigênio elas se tornavam altamente tóxicas ao tecido celular¹¹.

No final dos anos 60, Lipson apresentou um caso de tratamento de câncer de seio, utilizando derivados de hematoporfirina e irradiação seletiva do tumor com luz visível.

No fim dos anos 70, a partir dos trabalhos de Dougherty e colaboradores, a TFD passou a ser reconhecida como uma alternativa para o tratamento de câncer¹².

O mecanismo da terapia fotodinâmica consiste na injeção de uma droga sensibilizadora que apresenta seletividade pelos tecidos tumorais. Quando o diferencial de concentração da droga em tecidos normais e tumorais é máximo, o tumor é irradiado com luz visível, levando a molécula a um estado excitado singlete ($^1S^*$). A molécula excitada pode sofrer processos simples de desativação por colisão ou fluorescência (mecanismos desfavoráveis à TFD), reagir com substratos biológicos ou sofrer processo não-radiativo de cruzamento inter sistemas (CIS) levando ao estado tripleto (3T) que transfere energia para o oxigênio molecular (3O_2) gerando oxigênio singlete (1O_2). Esta espécie é altamente reativa e pode reagir com moléculas do sistema biológico levando à fotonecrose do tumor^{6,13,14}. Quando a espécie que reage com o substrato biológico é $^1S^*$, chamamos de TFD tipo I, já quando a espécie reativa é 3T que transfere energia para o 3O_2 , chamamos de TFD tipo II. A seguir temos o diagrama de Jablonski que mostra as reações fotoquímicas e as espécies citotóxicas da TFD.

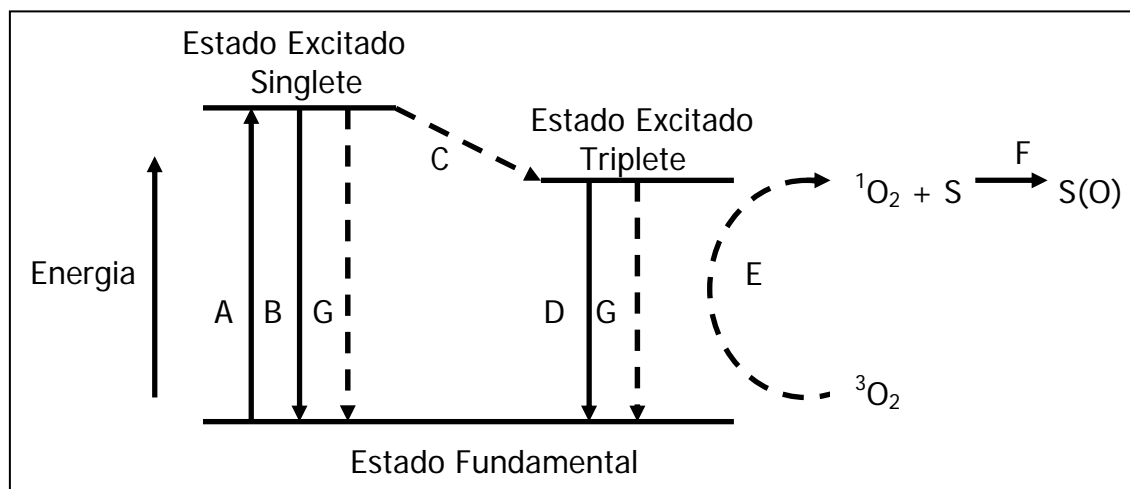


Figura 2. Diagrama de Jablonski mostrando as várias formas de excitação e relaxação do cromóforo: (A) excitação; (B) fluorescência; (C) cruzamento intersistema; (D) fosforescência; (E) transferência de energia não radiativa para formação de oxigênio singlete; (F) oxidação do substrato pelo oxigênio singlete; (G) conversão interna.

Os primeiros fotossensibilizadores aceitos para o uso clínico foram os derivados de hematoporfirina (HpD) com os nomes comerciais de *Photofrin*, *Photosan*, *Photogem* e *Photocarcinorin*. Estes sensibilizadores ficaram conhecidos como fotossensibilizadores de primeira geração.

Photofrin, o fotossensibilizador mais comumente usado e estudado, é facilmente sintetizado reagindo a hematoporfirina em uma mistura dos ácidos sulfúrico e acético para formar os acetatos de hematoporfirina-IX (mono e di). O tratamento posterior com uma base, forma uma mistura geralmente conhecida como derivado de hematoporfirina (HpD).

Em comprimento de onda adequado para a TFD - 630 nm ($\epsilon_{630} \approx 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), o *Photofrin* apresenta uma banda-Q com absorção que pode atingir até 0,5 cm de espessura na pele.

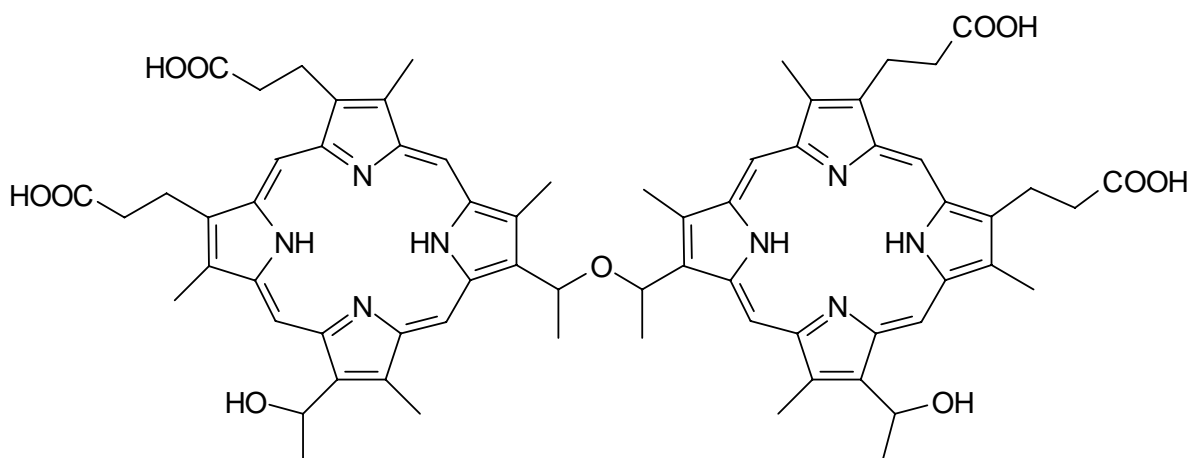


Figura 3. Estrutura da hematoporfirina que compõe alguns produtos, como o *Photofrin*²³

O Photofrin foi o primeiro medicamento aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento de câncer com a técnica de TFD, sendo utilizado principalmente para o tratamento de câncer no esôfago, no pulmão (endobrônquios) e trato genitourinário.

Apesar do sucesso clínico da primeira geração de fotossensibilizadores, a aplicação apresenta uma série de limitações, pois são formados por misturas de compostos, que necessariamente não apresentam reprodutibilidade no processo de síntese. Isto dificulta a preparação, tornando impossível determinar com maior exatidão a relação estrutura/atividade. Além de serem pouco seletivos, causam sensibilidade na pele por algumas semanas e apresentam baixa absorção na região espectral onde há maior penetração nos tecidos¹⁵.

Além destas desvantagens, os HpDs têm se mostrado ineficientes no tratamento de alguns tipos de câncer como melanoma pigmentado, devido à sobreposição espectral do fotossensibilizador pela melanina encontrada nos tecidos malignos¹⁶. Entretanto, os fotossensibilizadores da primeira geração ainda apresentam efeitos colaterais bem inferiores comparados aos métodos tradicionais de tratamento de câncer.

Estes aspectos desfavoráveis dos HpDs, fizeram com que esforços fossem direcionados na obtenção de uma segunda geração de fotossensibilizadores. A elaboração destes fotossensibilizadores de segunda geração leva em consideração uma série de propriedades consideradas ideais como: a) devem ser substâncias simples, para que possam ser facilmente reproduzidas; b) possuir alto grau de pureza; c) apresentar uma alta seletividade pelo tecido tumoral e ser facilmente eliminado do organismo, de modo que a incidência de luz não danifique os tecidos adjacentes normais¹⁷. Sob o aspecto fotoquímico é necessário: a) que apresentem absorção na região de 675-800 nm, o que permite uma maior penetração da luz através da pele (2-3 cm); b) que sejam estáveis cinética e termodinamicamente, tanto no estado fundamental quanto no estado excitado e; c) serem eficientes na geração de espécies citotóxicas através de processos de transferência eletrônica ou de energia entre o fármaco e moléculas endógenas^{18,23}.

Nesta segunda geração de fotossensibilizadores já existem alguns compostos bem conhecidos para a TFD, que podem ser encontrados na literatura^{6,11,12,16,18,19}. A seguir, são apresentados de forma simplificada os principais compostos pertencentes à segunda geração:

i- O ácido 5-amino-4-oxopentanoico (ALA) que é um fotossensibilizador endógeno baseado na administração oral e tópica simultaneamente, é o precursor metabólico da protoporfirina IX (Pp IX) que é a espécie fotodinamicamente ativa.

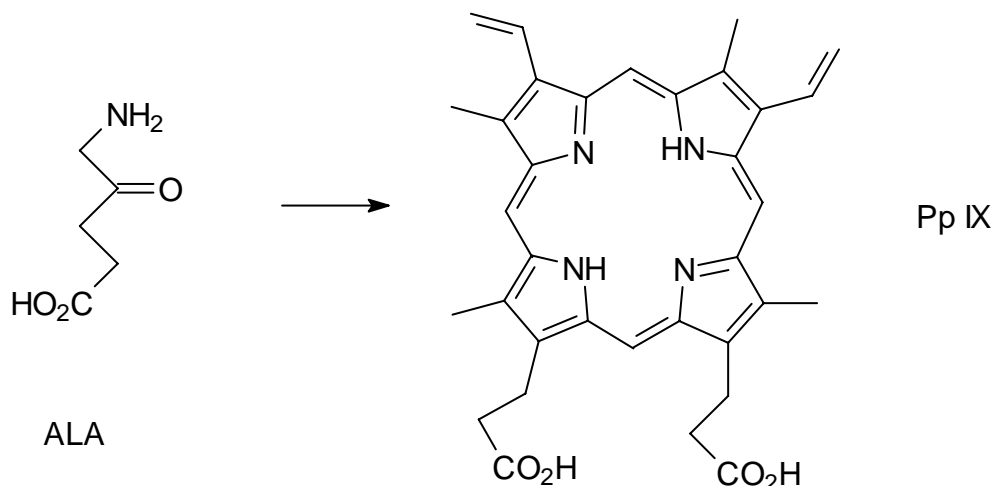


Figura 4. Síntese da Pp IX a partir do ALA (Levulan[®])

Quando aplicado na pele, o ALA é ciclizado por biossíntese gerando a PpIX, após 14 a 18 h é então excitado através de lâmpada azul (BLU-U[®]), 400-500 nm. Este medicamento é usado no tratamento de lesões pré-câncer de pele e em câncer de bexiga em fases I e II, acnes e outros.

ii- *meta*-Tetrahidroxifenilclorina (*m*-THPC), conhecido comercialmente com o nome de *Foscan*, é uma droga sintética análoga a *meso*-tetrafenilporfirina. Apesar de simples, ela apresenta rotação na ligação fenil-porfirina, sendo composta por quatro atropisômeros. No entanto, à temperatura corpórea a rotação é rápida o suficiente para impedir que os componentes biológicos reconheçam e façam distinções entres os isômeros.

A *m*-THPC apresenta atividade fotodinâmica mais acentuada que o *Photofrin*, visto que o composto possui maior tempo de vida do estado tripleto, maior absorvidade molar ($\epsilon_{652} \approx 2,24 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), maior hidrofobicidade (levando a uma maior incorporação celular), maior seletividade e pode ser excitada em comprimento de onda maior (652 nm). Entretanto, persistem os efeitos

indesejáveis de fotossensibilidade na pele durante longos períodos, de forma análoga aos compostos de primeira geração.

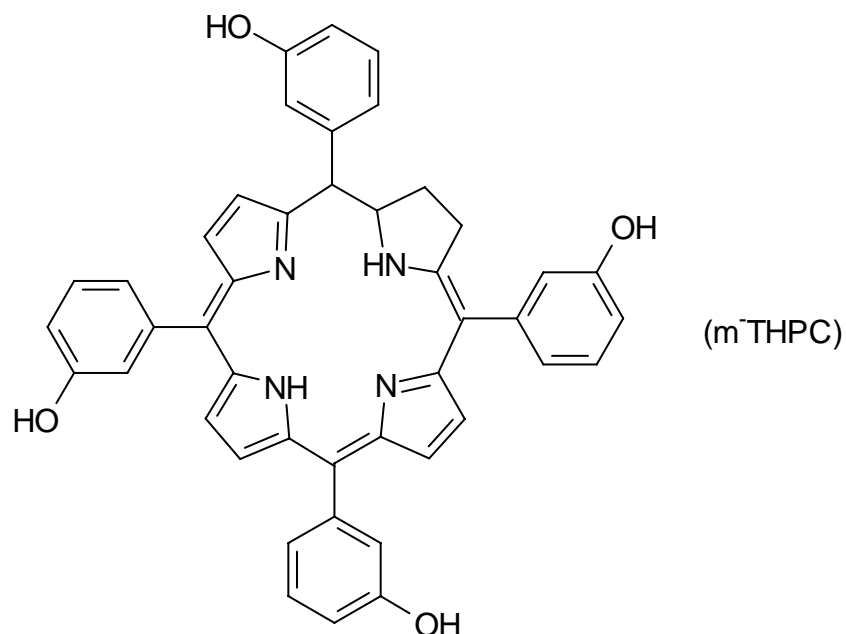


Figura 5. Estrutura da m-THPC (Foscan®)

Este composto vem sendo estudado para o tratamento de cânceres de cabeça e pescoço, principalmente como paliativo para pacientes onde as cirurgias e radioterapia não podem ser empregadas.

iii- O derivado de benzoporfirina (BPDMA), com o nome comercial de *Visudyne*, é uma clorina sintetizada a partir da reação de Diels-Alder entre a porfirina natural (PpIX) com dimetilacetilenodicarboxilato, formando uma mistura equimolar de dois isômeros. Este composto tem se mostrado eficiente na TFD, pois apresenta fotossensibilidade na pele bem inferior ao *Photofrin* e tem um tempo de meia vida de 6 horas em seres humanos. O *Visudyne* é utilizado principalmente para o tratamento de degeneração macular.

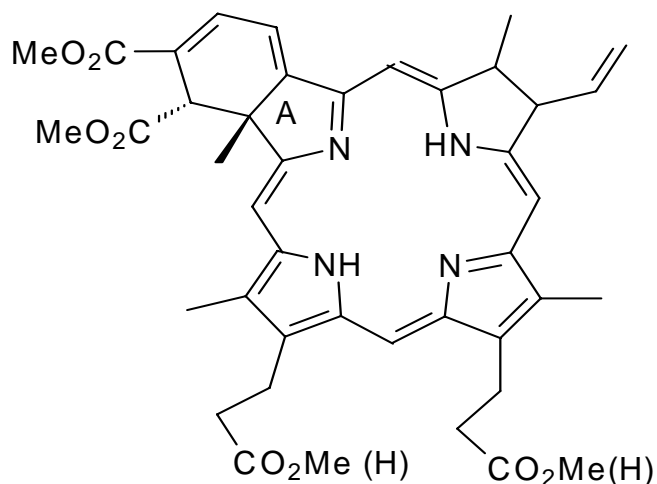


Figura 6. Estrutura da BPDMA (Visudyne®)

iv- Além destes compostos mencionados acima, existem outros possíveis fotossensibilizadores como: bacterioclorinas; ftalocianinas e naftalo-cianinas.

Embora já exista o conhecimento da eficácia do tratamento de câncer através da TFD, ainda existe uma resistência pela comunidade médica devido ao tradicionalismo às técnicas utilizadas. Acredita-se que futuramente a TFD será muito mais utilizada, no entanto, persiste a necessidade de melhor entendimento de todos os processo envolvidos como: efeito biológico, problemas com dosagem e seletividade do fotossensibilizador²⁰.

Atenção especial vem sendo direcionada nas porfirinas e compostos análogos visto que apresentam a maioria das características ideais de um bom fotossensibilizador^{21, 22}. Além disso, as porfirinas têm a capacidade de absorver luz em vários comprimentos de onda (banda B e bandas Q), representando importantes componentes da luz solar. Elas também apresentam um longo tempo de vida do estado tripleto, alto rendimento quântico, possibilidade de incorporação de diversos tipos de substituintes no macrociclo e de metais coordenados²³.

Um importante ponto que deve ser analisado no desenvolvimento de novos fármacos é a relação quantitativa estrutura-atividade (Quantitative structure-activity relationships - QSAR). Esta relação é estudada para identificar as

características estruturais do metabolismo biológico e também as contribuições das características físico-químicas dos compostos na sua atividade biológica. Sabe-se que a atividade biológica dos compostos é determinada pela habilidade de se ligar ao receptor e que a afinidade do receptor está relacionada com impedimento estérico, hidrofobicidade e interações entre o composto e o receptor. O conhecimento destes fatores é importante, podendo assim determinar quais modificações na estruturas dos compostos é necessária para uma melhor resposta biológica.

Como mencionado anteriormente, a TFD ocasiona a morte celular através do oxigênio singlete formado na célula. A células eucarióticas podem morrer através de dois processos:

Necroses – quando a célula é impedida de manter seus processos vitais por lesões físicas ou químicas causadas por fatores externos, como temperaturas extremas, radiação, traumas, produtos tóxicos e falta de oxigênio (como no infarto do miocárdio e na gangrena). As lesões podem ter ainda origem biológica, como nas infecções por bactérias ou vírus.

A necrose é caracterizada pelo não transporte de ATP, havendo morte celular devido à impossibilidade de produção de ATP.

Apoptoses – morte *programada* de uma população celular, é um tipo de "autodestruição celular" que requer energia e síntese protéica para a sua execução. Está relacionada com a homeostase na regulação fisiológica do tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose. Este suicídio celular ocorre no desenvolvimento embrionário, na organogênese, na renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, na atrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou hormônios, na involução de alguns órgãos e ainda na regressão de tumores.

A apoptose é caracterizada por uma série de mudanças celulares que podem ser visualizadas através de um microscópio. Pode-se detectar a apoptose através da análise do DNA, que é clivado em fragmentos múltiplos de 180 kDa.

O mecanismo mais aceito de morte celular, através da TFD, é a apoptose. A fotodegradação da célula é iniciada através de um efeito cascata. Durante o tratamento, o oxigênio singlete ataca as proteínas da mitocôndria alterando a estrutura de seus aminoácidos forçando outras conformações que destroem sua função normal. Além disso, a ativação da fosfolipase faz aumentar a concentração intracelular de cálcio, que leva à formação de óxido nítrico (NO), uma importante molécula bioativa que está envolvida do processo de apoptose mediado pela TFD. O mecanismo da morte celular não depende apenas da célula, mas também do fotossensibilizador, da sua localização e da eficiência da droga administrada.

1.2 MELANINA

Pelo fato de os procedimentos relacionados com a TFD requererem ativação por uma fonte de luz, o tratamento é particularmente indicado para áreas do organismo que possam ser facilmente iluminadas. Portanto, tumores externos são particularmente indicados sob este aspecto da TFD.

A pele é o maior órgão do corpo humano sendo responsável pelo recobrimento externo do corpo. Um dos tipos mais agressivos de tumores encontrados na pele é o melanoma que está associado, entre outros fatores, a um aumento na quantidade de melanina produzida nos melanócitos. Portanto, considerando tratamentos de TFD direcionados a tumores do tipo melanoma, é necessário entender o processo de interação melanina-fotossensibilizador. A seguir serão apresentadas algumas características desta biomolécula.

As melaninas formam uma importante classe de macromoléculas pigmentadas encontradas em muitas partes da biosfera. A feomelanina e a eumelanina são as formas predominantes em humanos e atuam como fotoprotetores.

As melaninas são classificadas de acordo com sua coloração. A *Eumelanina* inclui os pigmentos negros e marrons encontrados na pele e cabelos, sendo esta classe de melaninas a mais estudada. As *Feomelaninas* são pigmentos vermelhos

ou amarelos encontrados em animais e as *Alomelaninnas* são pigmentos negros ou marrons encontrados em plantas e fungos.

A coloração marrom ou preta da melanina é resultado de sua banda de absorção praticamente contínua na região do UV-vis, e um baixo rendimento de emissão fluorescência e fosforescência, levando a dissipação de calor ao invés de emissão de luz^{34,24}.

As melaninas apresentam estrutura de polímeros heterogêneos em relação aos constituintes monoméricos (heteropolímeros) e ligações cruzadas que se distribuem aleatoriamente pela estrutura polimérica^{25, 26}.

Ambas, eumelanina e feomelanina são derivadas de um precursor comum no sistema biológico, a dopaquinona, que é formada pela oxidação da tirosina através da tirosinase, formando a dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) que a seguir é reoxidada para a produção da dopaquinona. A dopaquinona é um intermediário altamente reativo, que na ausência de compostos tiol sofre ciclização intermolecular, levando a formação da eumelanina^{27,28}.

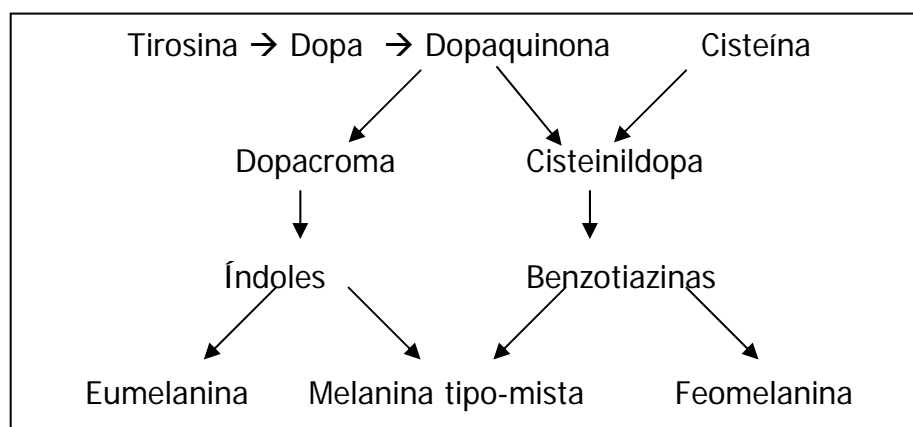


Figura 7. Etapas principais da formação da melanina²⁹

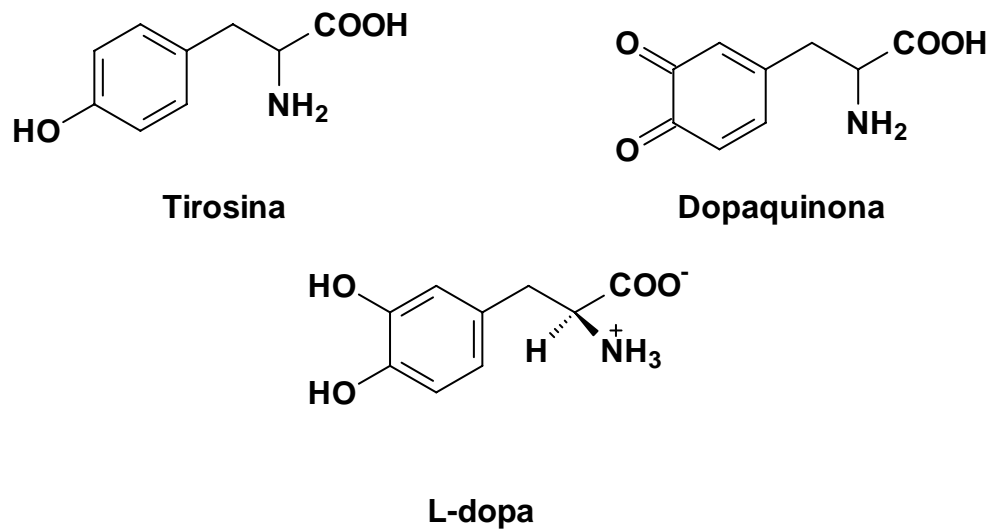


Figura 8. Estrutura da tirosina, L-dopa e dopaquinona.

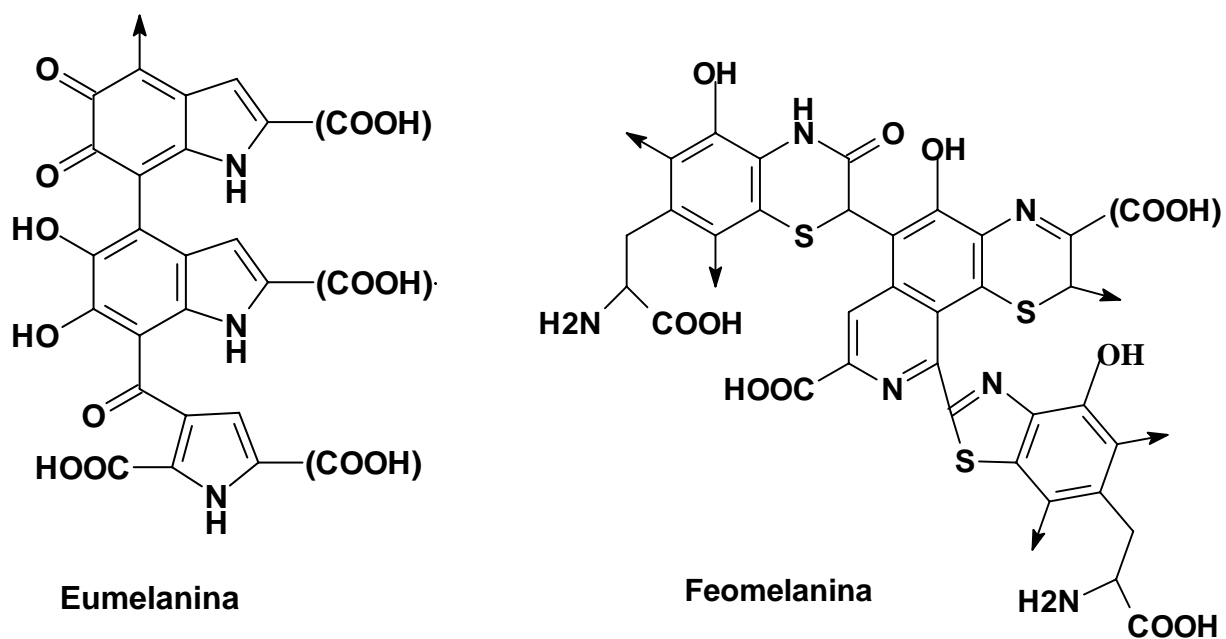


Figura 9. Estrutura simplificada da eumelanina e da feomelanina.

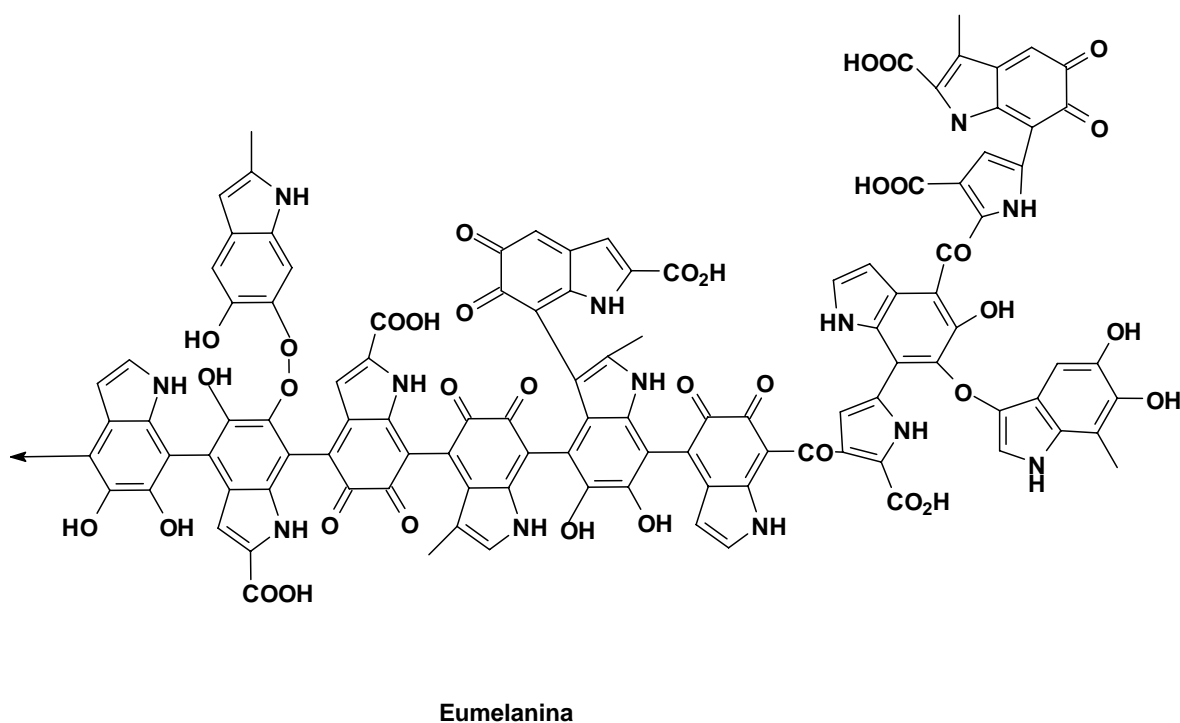


Figura 10. Estrutura da eumelanina.

A melanina encontra-se em órgãos que recebem luz como pele, cabelo, olhos e em órgãos que não recebem luz como o cérebro, sendo que o papel deste polímero depende de suas propriedades intrínsecas como a estabilização de radicais livres e a interação com outras moléculas.

A principal função biológica das melaninas é a fotoproteção celular. Entretanto, mesmo na ausência de luz a melanina participa de processos de transferência de elétrons^{30,31}, um exemplo é a presença de melanina no cérebro, onde ela se liga ao metabolismo neurotóxico MPP⁺ (Metilfenilpiridina) com relevantes conseqüências relacionadas à doença de Parkinson³². A sua reatividade perante o oxigênio também é importante uma vez que conduz à formação de peróxido de hidrogênio e de radicais hidroxilas³³. Apesar das várias funções,

apenas a fotoproteção é amplamente aceita, mas seu mecanismo ainda não é bem determinado³⁴.

A cor de cabelos, pele e olhos em animais são dependentes da quantidade, qualidade e distribuição dos pigmentos de melanina. A coloração do cabelo é uma das mais diversificadas na variação da quantidade de pigmentação. Estudos mostram que o fenótipo do cabelo nem sempre reflete o tipo de melanogênese. Cabelos preto, castanho, castanho claro e loiro diferem somente na quantidade de melanina presente, enquanto cabelos vermelhos apresentam quantidade quatro vezes maior de feomelanina comparado com castanhos claros e loiros³⁵.

Embora sua função principal seja a fotoproteção, ambas (feomelanina e eumelanina) estão envolvidas no desenvolvimento de câncer de pele do tipo melanoma. Por este motivo, existe um grande interesse científico nas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotobiológicas das melaninas. Apesar da grande quantidade de estudos realizados, ainda é pouco conhecida a relação entre a estrutura e a função biológica destas moléculas³⁶.

Atualmente existe uma continua discussão sobre a estrutura química das melaninas, visto que são encontradas na forma de agregados na natureza. Em nível molecular, a estrutura básica é formada por pequenas subunidades de oligômeros planares constituídos geralmente por quatro a oito unidades indoquinólicas (5,6-dihidroindólico (DHI)/5,6-dihidroindólico-2-ácido carboxílico (DHICA)), com diferentes estágios de oxidação³⁷. Vem sendo proposto que estas unidades fundamentais formam blocos, constituído por quatro ou cinco destas subunidades planares associadas através de um empacotamento- π . Estudos através de microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (SEM), mostram que a melanina é formada por agregados esféricos de aproximadamente 150 nm de diâmetro, o qual reúne-se para formar partículas com diâmetro 3 a 286 μm ³⁸. Sabe-se também que a melanina produzida nos

melanossomos, que se encontram nos melanócitos, está associada a proteínas, o que confere à melanina uma estrutura supramolecular³⁹.

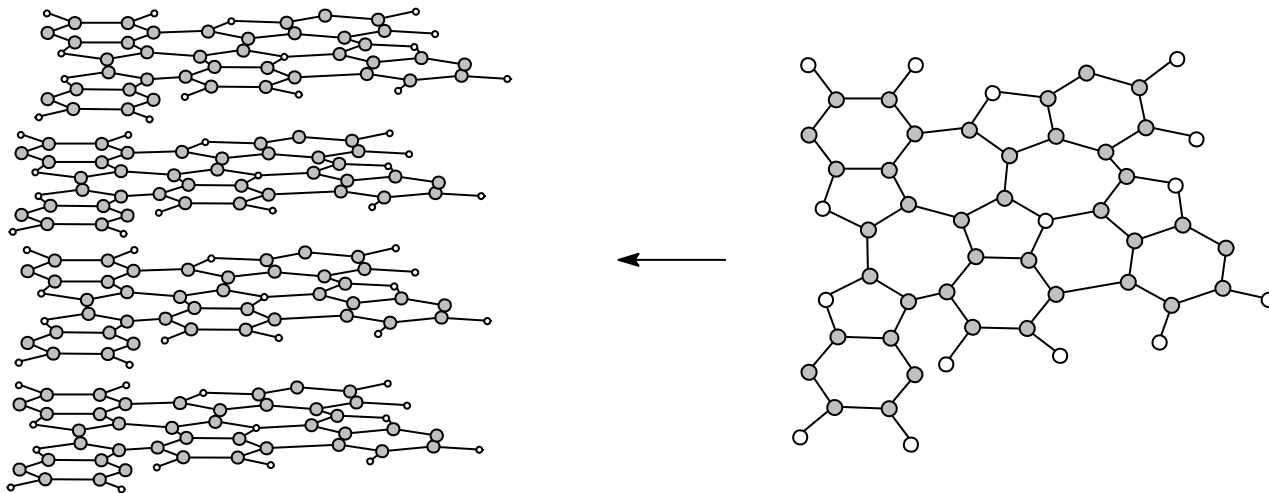


Figura 11. Estrutura proposta para a melanina, constituída de monômeros de DHI^{40,38}.

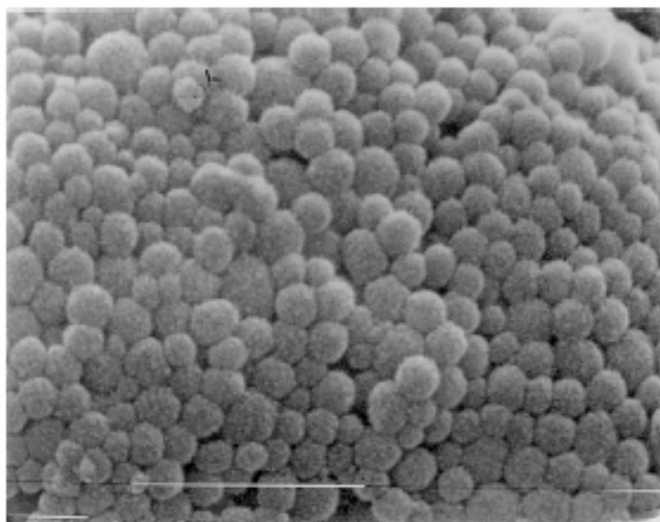


Figura 12. Imagem SEM da eumelanina *Sépia officinalis* (x 56.000). A linha tracejada branca é de 714 nm.

Devido à grande diversidade na formação das melaninas, vários métodos vêm sendo utilizados para a determinação da estrutura, assim como na associação da melanina com fármacos. Dentre estes existe a espectroscopia de infravermelho, espectroscopia de absorção, microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e emissão de raio-X^{41, 42, 43,44}.

As melaninas naturais são polímeros insolúveis na maioria dos solventes orgânicos e em solução aquosa, mas solúveis algumas vezes em soluções básicas. Desta forma, alguns polímeros sintéticos podem servir como modelos para o estudo de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas. Dentro dos modelos sintéticos, o mais utilizado para a obtenção da melanina é obtido através da autooxidação da dihidroxilfenilalanina (dopa) que foi utilizado neste trabalho⁴⁵.

Comparando-se a fotorreatividade das eumelaninas naturais e sintéticas, observa-se que há diferenças. Um exemplo é que tanto a eumelanina sintética quanto a eumelanina de olho bovino formam radicais livres e reagem com oxigênio com a radiação UV-vis. No entanto, a sintética tem uma fotorreatividade mais baixa se comparada com a natural⁴⁶. Isto está relacionado ao tamanho dos agregados formados, pois a absorção e a relaxação não radiativa da molécula muda em função do estado de agregação.

A interação da melanina com fármacos pode ter uma significativa consequência farmacológica. O acúmulo de fármacos nos tecidos melanóticos como na retina epitelial pigmentada (RPE) pode levar a efeitos toxicológicos na retina através do aumento na concentração do tecido, alterando as propriedades fotoquímicas do complexo melanina-fármaco. Apesar de muitas investigações na natureza da interação melanina-fármaco, o exato mecanismo de interação ainda é desconhecido. Acredita-se na interação iônica em muitos sistemas onde existem fármacos carregados positivamente, mas

outros fatores também podem contribuir: lipofilicidade dos fármacos, forças de van der Waals e os processos de transferência de carga.

1.2.1 PELE E CÂNCER DE PELE

A pele é a primeira defesa de nosso organismo, protege os órgãos internos de ambiente químicos e físicos, regulariza a temperatura corpórea e as funções sensoriais (calor, frio, pressão, dor e tato). A pele pode ser dividida em duas camadas principais; a camada mais próxima da superfície, que é conhecida como epiderme e a camada mais interna, a derme. Há ainda vários órgãos anexos, como folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas e unhas; e nos animais penas, escamas, cascos e chifres. A pele é praticamente idêntica em todos os grupos étnicos humanos.

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso (células escamosas em várias camadas). A célula principal é o queratinócito (ou ceratinócito) que produz a queratina. Existem também ninhos de melanócitos (produtores de melanina); e células imunitárias, principalmente células de Langerhans, gigantes e com prolongamentos membranares.

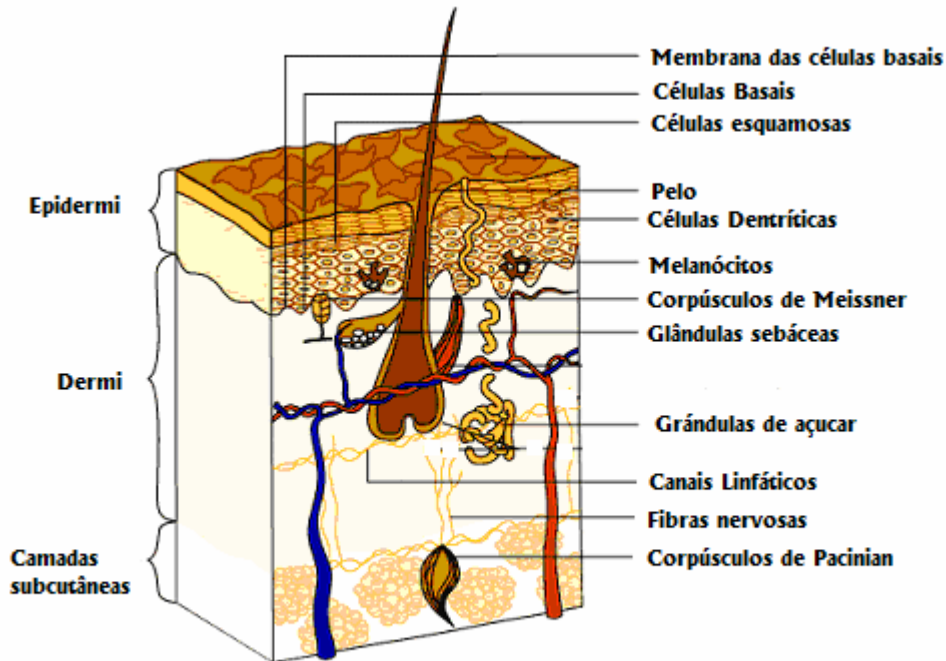


Figura 13. Estrutura da pele

A radiação ultravioleta é um dos maiores fatores ambientais que influenciam na função, sobrevivência e proliferação de muitos tipos de células.

A principal causa de doenças e câncer de pele é a exposição aos raios ultravioleta UV-B e UV-A⁴⁷. A exposição aos raios UV-A (>320 nm) produz imediatamente um escurecimento na pele que depende das reações químicas que ocorrem nos melanossomos, formando melanina. Estudos realizados nos melanócitos após a exposição da pele aos raios UV-A têm demonstrado que a maior mudança que ocorre é a rápida delocalização do melanossomo e que não existem mudanças estruturais das organelas melanóticas.

Poucos estudos sistemáticos da quantidade de eumelanina e feomelanina em tecidos melanoma de humanos são encontrados. Estes estudos mostram que o melanoma está intimamente relacionado com a quantidade de melanina presente nestas células^{48, 35}.

Metade dos novos casos de câncer são atualmente câncer de pele. Em todas as partes de mundo o câncer de pele tem aumentado (tanto melanoma quanto os não melatóticos). Nos Estados Unidos, por exemplo, houve um aumento de 600% de incidência de câncer de pele desde 1930 e o que mais leva à morte é o melanoma. A exposição aos raios ultravioleta induz a uma resposta fisiológica, que em geral ocorre através da geração fotoquímica de espécies como: oxigênio singlete e/ou espécies como superóxidos, peróxidos e radicais hidroxilas. Como mencionado acima, esta fotoproteção é realizada pela melanina. Desta forma, torna-se muito importante o entendimento da presença deste pigmento em câncer do tipo melanoma⁴⁹.

Os tipos mais freqüentes de câncer da pele são:

Carcinoma Basocelular: é o mais freqüente e com o menor potencial de malignidade. Seu crescimento é lento e muito raramente se dissemina à distância. Pode se manifestar de várias maneiras, feridas que não cicatrizam ou lesões que sangram com facilidade devido a pequenos traumatismos. Esse tipo de câncer é mais comum em adultos, com picos de incidência por volta dos 40 anos. Porém, com a constante exposição de jovens aos raios solares, a média de idade dos pacientes vem diminuindo.



Figura. 14 - Carcinoma basocelular:

Carcinoma Espinocelular: tem crescimento mais rápido e as lesões maiores podem enviar metástases à distância. Também conhecido como carcinoma

epidermóide, é bem menos freqüente que o basocelular. Surge geralmente em áreas de mucosa aparente, como a boca, cicatrizes de queimaduras antigas ou áreas que sofreram irradiação (raios X). Pode ocorrer também a partir de lesões pré-cancerosas decorrentes da exposição prolongada e repetida da pele ao sol.



Figura 15. Carcinoma Espinocelular

Melanoma Maligno: tumor maligno muito grave que se origina das células que produzem o pigmento da pele (melanócitos). Frequentemente envia metástases para outros órgãos, sendo de extrema importância o diagnóstico precoce para a sua cura. Pode surgir a partir da pele sadia ou a partir de "sinais" escuros (os nervos pigmentados) que se transformam no melanoma. O melanoma pode surgir em áreas da pele não exposta ao sol, porém, é mais freqüente nas áreas expostas.

Algumas características do melanoma são:

- ◆ Assimetria: formato irregular
- ◆ Bordas irregulares: limites externos irregulares
- ◆ Coloração variada (diferentes tonalidades de cor)
- ◆ Diâmetro: maior que 6 milímetros



Figura 16. Melanoma maligno

1.3 ASPECTOS GERAIS DA SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS PORFIRINAS

Essa seção tem como objetivo nos fornecer alguns subsídios para um melhor entendimento dos estudos realizados no presente trabalho.

Cada item procura ser sucinto e direto para introduzir dados da literatura relacionados às discussões dos resultados experimentais obtidos. Quando necessário, serão indicados textos que abordam de maneira mais completa a química das porfirinas.

As porfirinas são estruturas que se encontram associadas à diversas proteínas, atuando como cofatores nos sistemas biológicos. Nos seres vivos diversos processos bioquímicos são realizados por proteínas associadas a porfirinas: transporte de O_2 (hemoglobina), armazenamento de O_2 (mioglobina), respiração celular, cadeia de transporte de elétrons (citocromo C), catálise de reações de hidroxilações e epoxidações (citocromo P-450), decomposição de peróxidos (catalase). Textos gerais sobre a importância dos derivados porfirínicos nas diversas etapas do metabolismo bioquímico e o mecanismo de biossíntese desses derivados podem ser encontrados em livros básicos de bioquímica^{50,51}.

1.3.1 NOMENCLATURA

As porfirinas são compostos que apresentam um macrociclo central contendo 20 átomos de carbonos e 4 átomos de nitrogênio, denominado porfina, e grupos substituintes ao redor deste anel. A Figura 17 apresenta a estrutura da porfina e a numeração sugerida pela IUPAC.

As posições 5, 10, 15, 20 que correspondem aos carbonos metilênicos da estrutura da porfina são também denominadas de posições α ou *meso* e as posições 2, 3; 7, 8; 12, 13 e 17, 18 que correspondem aos carbonos pirrólicos não diretamente ligados às posições meso, são também denominadas de posições β .

As porfirinas que apresentam átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios 21 e 23 são chamadas de "bases livres"; e porfirina resultante da substituição destes hidrogênios por um metal coordenado pelos quatro nitrogênios é denominada metaloporfirina. A incorporação de prótons aos nitrogênios 22 e 24 origina a forma diácida, e a remoção dos hidrogênios 21 e 23 origina a forma dibásica.

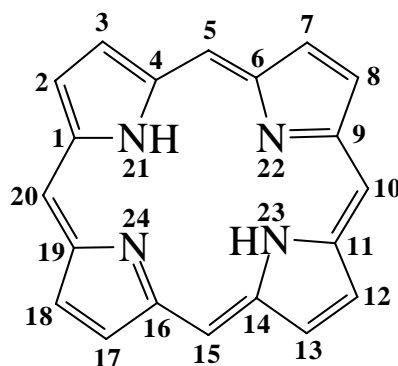


Figura 17. Estrutura da porfina e numeração do anel segundo a IUPAC⁵².

As porfirinas naturais são substituídas, geralmente, por resíduos metil, etil, vinil, acetil e propionil, ligados nas posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18. Nos seres vivos as porfirinas geralmente são encontradas na forma de metalocomplexos, sendo o íon Fe^{3+} o centro metálico mais comum. Por se tratarem de porfirinas assimétricas, as rotas sintéticas para obtenção destes derivados naturais são

extremamente complicadas, restando a alternativa de extração de material biológico, o que implica em diversas etapas de purificação.

1.3.2 SÍNTESE: ASPECTOS GERAIS

As porfirinas podem ser sintetizadas a partir de monopirróis, pelo acoplamento de intermediários dipirrólicos, pela ciclização de tetrapirróis e através de intermediários de oxobilanos⁵³.

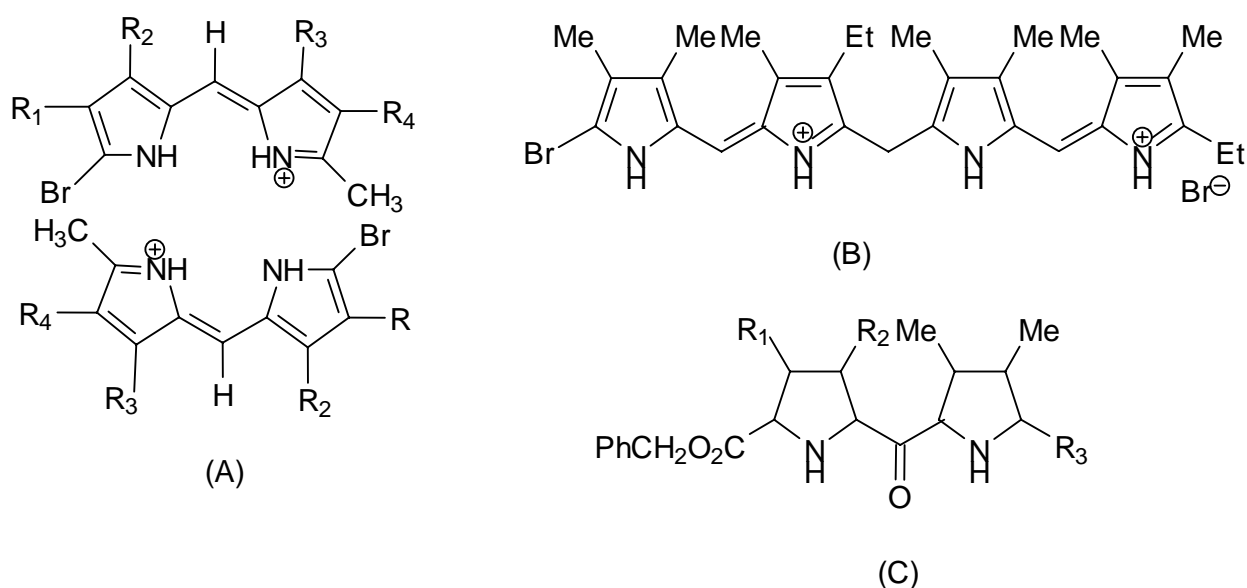


Figura 18. Estrutura dos intermediários dipirrólicos (A), tetrapirrólicos (B) e oxobilanos (C).

Porfirinas que apresentam os pirróis substituídos são preferencialmente preparadas utilizando intermediários di ou tetrapirrólicos, a síntese dos intermediários geralmente envolve várias etapas e os rendimentos das reações de acoplamento e ciclização para a formação da porfirina são de aproximadamente 40%.

As porfirinas “meso” substituídas são preferencialmente preparadas a partir de reações de condensação entre pirróis e aldeídos. Porfirinas tetrasubstituídas na posição meso foram primeiramente preparadas por Rothmund⁵⁴ em 1935 pelo aquecimento de uma mistura de pirrol, aldeído e piridina em tubo selado. O rendimento desta reação é de aproximadamente 5% e apresenta como contaminante “clorin” que corresponde a porfirina reduzida nas posições 17 e 18 (17,18-diidroporfirina).

A síntese de porfirinas meso-substituídas a partir da condensação de pirrol e aldeídos foi intensamente investigada por Adler e colaboradores^{55,56}. Através destes estudos os rendimentos foram sensivelmente ampliados para 35-40% para algumas porfirinas simetricamente substituídas como a tetra-fenilporfirina (TPP), obtida pela condensação de pirrol e benzaldeído, embora para muitos outros aldeídos utilizados nestas reações de condensação os rendimentos ainda sejam consideravelmente baixos.

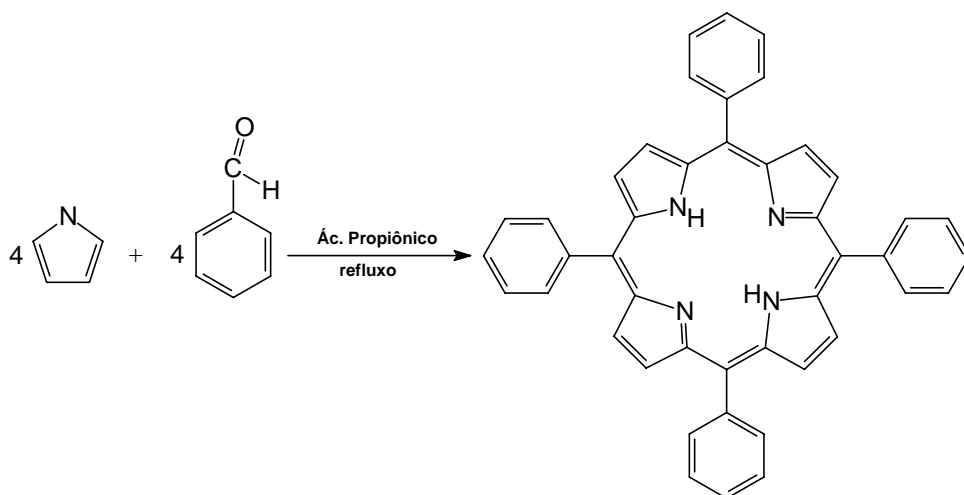


Figura 19. Síntese da tetra-fenilporfirina (TPP) pela condensação de pirrol e benzaldeído.

Esta reação de condensação foi novamente investigada por Lindsey⁵⁷ que, utilizando condições mais brandas e oxidantes adequados, otimizou as condições de reação para uma série de aldeídos, ampliando a validade do método de obtenção de porfirinas meso-tetrasubstituídas. Recentemente, através da utilização da condensação de dipirrometanos e aldeídos, foi obtido um avanço significativo

na obtenção de porfirinas do tipo A_2B_2 , onde as posições 5,15 e 10,20 apresentam substituintes diferentes⁵⁸.

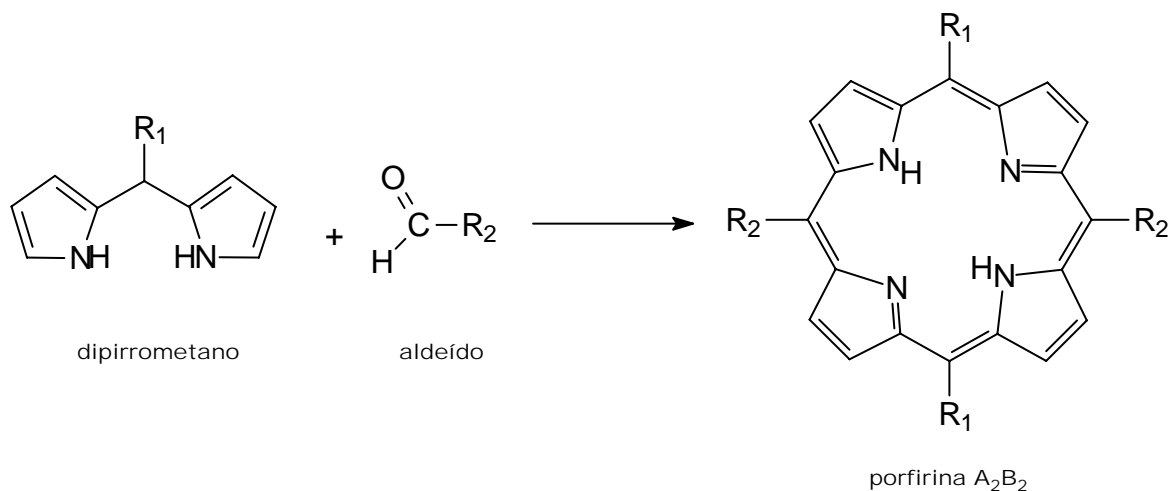


Figura 20. Síntese de uma porfirina simétrica do tipo A_2B_2 pela condensação de dipirrometanos e aldeídos.

1.3.2.1 Síntese de meso-piridínioporfirinas

Porfirinas catiônicas podem ser obtidas através da reação de quaternização dos nitrogênios piridínicos da TPyP (tetra-piridilporfirina), utilizando agentes alquilantes adequados, geralmente haletos ou tosilatos de alquila. A reação pode ser classificada como uma reação de substituição nucleofílica.

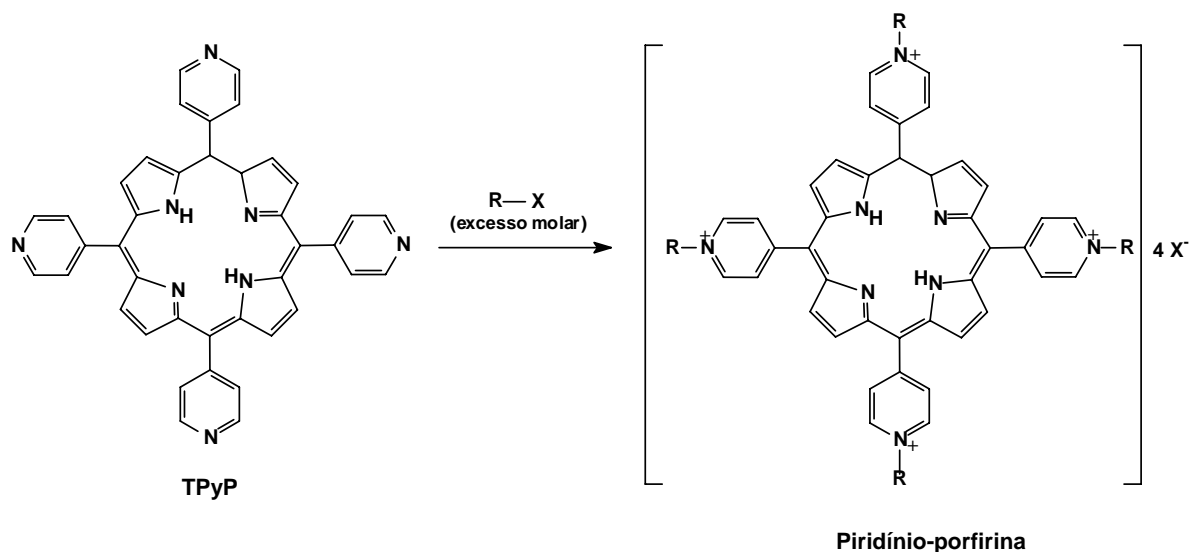


Figura 21. Reação da TPyP com um haleto de alquila R-X, onde R representa a porção alquílica e X o haleto.

Dois produtos secundários podem ser formados nessa reação: a) porfirinas semi-alquiladas, ou seja, aquelas que apresentam nitrogênios piridínicos não alquilados; e b) porfirinas N-pirrol alquiladas, que correspondem ao produto de alquilação do nitrogênio pirrólico interno.

A formação do produto N-pirrol alquilado só ocorre em condições reacionais geralmente mais drásticas⁵⁹ que a da alquilação das piridinas, visto que o nitrogênio pirrólico é pior nucleófilo que o nitrogênio piridínico, pois o par de elétrons desemparelhado do nitrogênio no pirrol está comprometido com a aromaticidade do anel, enquanto que o nitrogênio piridínico possui um par de elétrons livre^{60,61}. Dessa maneira, esse produto só se forma na presença de agentes alquilantes muito reativos, que apresentam um bom grupo de partida e a formação de um carbocátion estável^{62,63}. Reações entre piridil porfirinas assimétricas com brometo de benzila em DMF resultam na formação de produtos N-pirrol alquilados⁶⁴, entretanto, a reação da TPyP com cloreto de benzila em DMF não apresenta nenhuma evidência de alquilação do nitrogênio pirrólico^{72,73}.

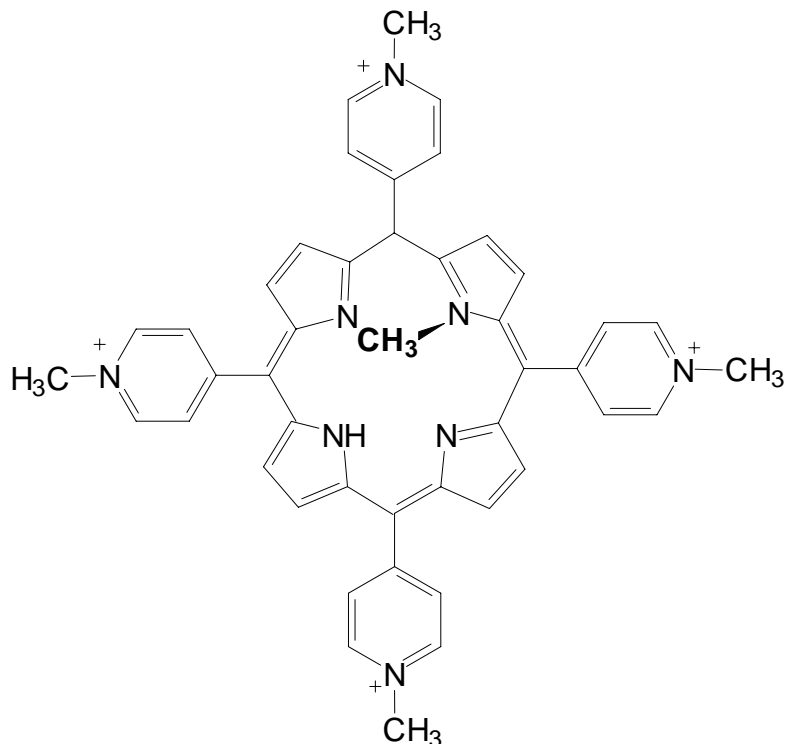


Figura 22. Estrutura da porfirina TMPyP e N-pirrol alquilada.

A formação de porfirinas semi-alquiladas pode ser evitada prolongando-se o tempo de reação, aumentando-se a temperatura da reação, o excesso do alquilante ou a concentração dos reagentes. Estas condições permitem um maior número de choques entre o anel piridínico e o alquilante, facilitando a ocorrência de um choque efetivo e a conseqüente alquilação.

Em trabalho anterior^{72,73}, desenvolvido neste laboratório, foram estudadas diversas condições experimentais, variando-se tempo de reação, solvente, concentração dos reagentes e grupos de partida, conseguindo-se otimizar as condições de reação para a obtenção de porfirinas benzil piridínio substituídas. Essas condições também se mostraram aplicáveis para as demais porfirinas piridínio substituídas, aumentando o rendimento da reação e a pureza do produto obtido.

A condição reacional que apresenta um melhor rendimento de porfirina tetra-alquilada está sumarizada nos itens abaixo^{73,87}:

- Temperatura de reação em torno de 130°C, pois reações realizadas em refluxo de DMF apresentam uma maior decomposição do solvente, diminuindo o rendimento da reação, e que reações realizadas em temperaturas abaixo de 100°C não produzem um rendimento de porfirinas tetra-alkilada razoável;
- Concentração da TPyP entre 1 e 3 mmol.L⁻¹, concentrações inferiores prolongam o tempo de reação, aumentando a decomposição do solvente e dificultando o isolamento do produto principal, enquanto que concentrações superiores podem ocasionar a precipitação da porfirina durante a reação, obtendo-se quantidade considerável do produto semi alkilado;
- Excesso molar do alkilante entre 160 a 300 vezes, dependendo da reatividade do mesmo. Entretanto, o excesso de alkilante dificulta o isolamento da porfirina tetra-alkilada devido a sua solubilidade no agente alkilante;
- DMF utilizado deve ser recém destilado, armazenado sob atmosfera inerte em geladeira. A reação deve ser realizada no escuro, evitando-se a decomposição do DMF.

O produto isolado nessas condições reacionais pode ser purificado a partir de recristalizações em mistura metanol/éter dietílico, não sendo necessária a preparação de colunas de separação, obtendo-se um produto compatível com a porfirina tetra-alkilada, de acordo com a análise elementar e RMN-¹H.

1.3.3 ESPECTROS ELETRÔNICOS DE ABSORÇÃO

Nessa seção pretendemos familiarizar o leitor aos termos básicos e às atribuições usuais dos espectros eletrônicos das porfirinas, sendo que uma descrição mais completa dos aspectos teóricos podem ser encontrados em algumas teses^{65,66,67} e publicações^{53,68}.

O espectro eletrônico das porfirinas na forma base livre apresenta, usualmente, cinco bandas características. A mais intensa, a banda Soret, possui máximo de absorção entre de 410 e 450 nm. Essa banda é também designada como banda B(0,0) e apresenta, no caso das porfirinas piridínio substituídas, absorvidades por mol (ϵ) na ordem de $2 \times 10^5 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$. As demais bandas apresentam máximos de absorção na região entre 500 e 650 nm e absorvidades cerca de dez vezes menores que a da banda Soret. Essas bandas são denominadas, genericamente, bandas Q e são, na ordem decrescente de energia, Qy(1,0), Qy(0,0), Qx(1,0), Qx(0,0).

As cinco bandas têm origem na transição $\pi^* \leftarrow \pi$ com simetria das bases livres (D_{2h})^{72,67}. As metaloporfirinas e porfirinas diprotonadas possuem uma maior simetria (D_{4h}), e um número menor de bandas Q: Q(1,0) e Q(0,0), na ordem decrescente de energia.

O modelo dos quatro orbitais de fronteira de Gouterman^{66,53} atribui à banda Soret a transição do orbital molecular ocupado de alta energia (HOMO), a_{1u} , para o orbital molecular desocupado de menor energia (LUMO), e_g , enquanto que as bandas Q para a simetria D_{4h} são atribuídos às transições do orbital a_{2u} para os níveis vibracionais 0 e 1 do orbital excitado e_g , resultando em duas bandas Q. Com a perda de simetria observada nas bases livres, passando para D_{2h} , há o desdobramento da transição $e_g \leftarrow a_{2u}$, formando as transições $b_{3g} \leftarrow b_{1u}$, referente ao eixo y e $b_{2g} \leftarrow b_{1u}$ referente ao eixo x.

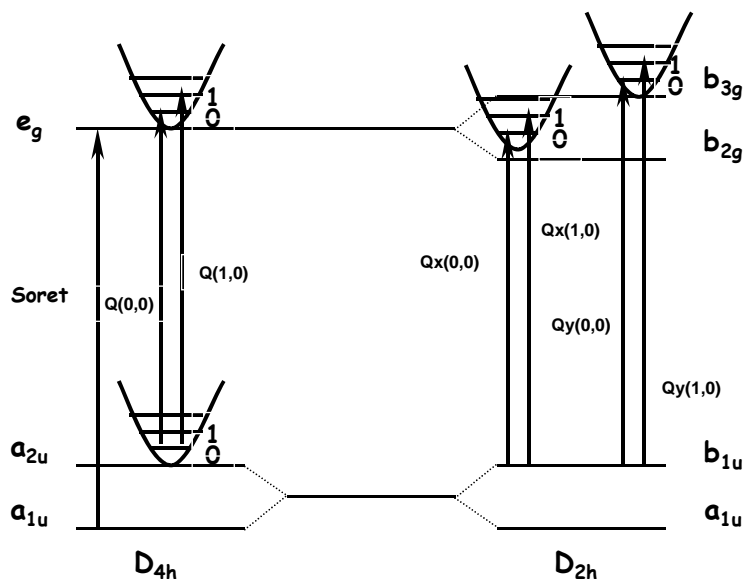


Figura 23. Representação esquemática das transições entre os diferentes níveis eletrônicos e vibracionais de porfirinas (D_{2h}) e metaloporfirinas (D_{4h}).

Nas transições LUMO \leftarrow HOMO as densidades eletrônicas dos orbitais HOMO, a_{1u} e a_{2u} , e do orbital LUMO, e_g , existem deslocamentos da densidade eletrônica do centro para a periferia do anel, ou seja mudanças estruturais que representam uma expansão do sistema π resultando em um deslocamento das bandas para a região do vermelho. A inserção de íons metálicos pouco eletronegativos, como o zinco(II), por exemplo, também resulta em deslocamentos batocrômicos da banda Soret .

Abaixo temos um espectro eletrônico, onde podemos observar o perfil espectral da porfirina TPPS base livre e metalada, e suas respectivas bandas de energia.

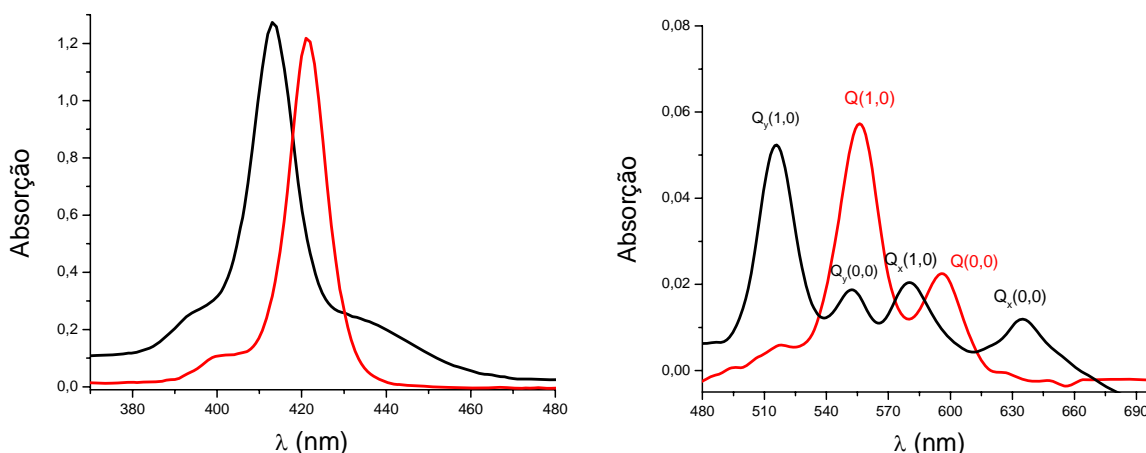


Figura 24. Espectros eletrônicos da ZnTPPS (—) e da H₂TPPS (—) em água.

1.3.4 ESPECTROS ELETRÔNICOS DE EMISSÃO

Após a absorção de luz, o estado excitado formado pode ser desativado, por diversos caminhos, ao estado fundamental, formando o composto mais estável e de menor energia. Os processos de decaimento energético podem ser classificados em radioativos, com emissão de luz, e não radioativos, havendo apenas liberação de calor^{69,70}.

Em temperatura ambiente os elétrons estão preferencialmente no estado vibracional mais baixo do estado fundamental singlete (S_0). Com a absorção de energia ocorrem transições para níveis vibracionais mais altos (1,2,...,n) dos estados excitados singlete (S_1, S_2, \dots, S_n). Em seguida, a energia térmica é dissipada, atingindo-se o nível vibracional mais baixo do estado excitado S_1 , em um processo chamado de conversão interna. Nesse momento, várias etapas podem ocorrer simultaneamente. A desativação do estado excitado acontece em duas vias: uma transição térmica (não radioativa) $S_1 \rightarrow S_0$ (conversão interna) e uma transição radioativa com emissão de luz $S_1 \rightarrow S_0$, chamada fluorescência. Essa transição pode ocorrer para um nível vibracional do estado fundamental diferente de zero, originando diferentes bandas no espectro de emissão.

Existe ainda a possibilidade de ocorrer uma transição proibida, uma transição entre estados de multiplicidade diferentes, ou seja, uma transição singlete-triplete, geralmente $S_1 \rightarrow T_1$. Essa etapa é denominada de cruzamento inter sistemas. O estado T_1 também pode ser depopulado pela via não radioativa (conversão interna) ou num processo com emissão de luz, chamado fosforescência. Todo esse processo é ilustrado pelo diagrama de Jablonski simplificado apresentado na figura 25.

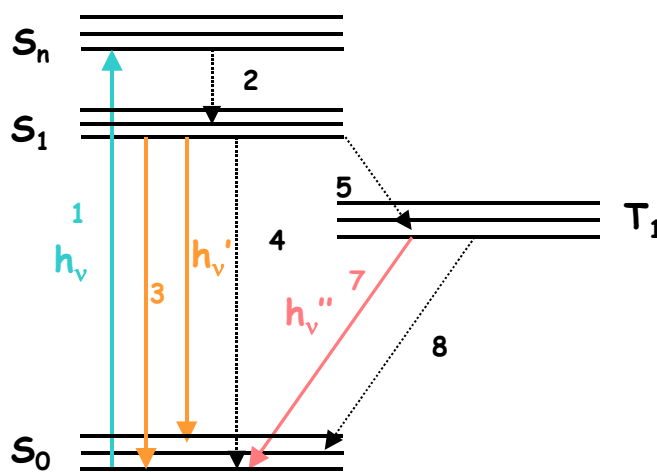


Figura 25. Representação esquemática das possíveis transições eletrônicas após excitação por $h\nu(1)$: decaimento não radiativo $S_n \rightarrow S_1(2)$; emissão de fluorescência $S_1 \rightarrow S_0(3)$; decaimento não radiativo $S_1 \rightarrow S_0(4)$ e $T_1 \rightarrow S_0(8)$; cruzamento intersistemas $S_1 \rightarrow T_1(5)$; e emissão de fosforescência $T_1 \rightarrow S_0(7)$.

A caracterização desses processos se dá pela determinação das constantes de velocidade dos processos radioativos e não radioativos e dos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F), de fosforescência (Φ_P) e de formação do estado triplete (Φ_T), ou seja, a razão entre os fótons emitidos em cada um desses processos pelos fótons absorvidos na excitação da espécie.

Na caracterização dos processos que conduzem à formação e desativação dos estados excitados deve-se considerar as constantes de velocidade e os rendimentos quânticos. A magnitude destes dois parâmetros determina as propriedades fotoquímicas intrínsecas da molécula.

Um ponto importante que deve ser comentado antes da descrição das propriedades luminescentes dos compostos porfirínicos é denominado efeito do átomo pesado (heavy atom effect), esse efeito altera consideravelmente alguns processos de desativação do estado excitado.

Pela regra da seleção somente transições entre dois estados de mesma multiplicidade são permitidas, sendo assim transições entre estados singlete e triplete são "proibidas". Contudo, a transição entre estados singlete e triplete é possível desde que uma perturbação interna ou externa origine uma mistura dos estados envolvidos gerando estados singletes e tripletes impuros. Estas misturas são originadas de interações magnéticas entre o movimento orbital do elétron e o momento magnético do spin, sendo este fenômeno denominado de acoplamento spin-órbita.

Estas perturbações são originadas pelo campo magnético gerado próximo ao núcleo e a magnitude deste campo é diretamente proporcional à massa nuclear, sendo assim estas perturbações são chamadas de efeito de átomo pesado uma vez que átomos leves originam pequenas misturas.

A maioria das bases livres e um grande número de metaloporfirinas são luminescentes, segundo Gouterman⁵³ as porfirinas são classificadas como fluorescentes ou fosforescentes segundo a magnitude dos rendimentos quânticos. Desta forma, são classificadas como fluorescentes quando apresentam rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_f) entre 0,2 e 10^{-3} e fosforescentes quando apresentam rendimentos quânticos de fosforescência (ϕ_p) entre 0,2 e 10^{-4} .

As porfirinas bases livres e metaloporfirinas com metais de camada cheia são fluorescentes. A fluorescência desses derivados é observada à temperatura ambiente, enquanto que a fosforescência só é verificada a baixas temperaturas⁷¹ e em meio congelado, diminuindo-se a conversão interna $T_1 \rightarrow S_0$.

Metaloporfirinas dos elementos de transição não apresentam fluorescência devido à formação de novos estados gerados pelos orbitais d, permitindo novas vias de decaimento não-radiativo.

Metaloporfirinas contendo íons metálicos diamagnéticos com orbitais *d* semipreenchidos são preferencialmente fosforescentes, sendo que os complexos de Pd(II) e Pt(II) apresentam alto rendimento quântico de fosforescência mesmo em temperatura ambiente na ausência de O₂.

Os complexos metálicos paramagnéticos são geralmente não luminescentes, as exceções, como no caso de algumas Cu(II)-porfirinas, apresentam baixo rendimento quântico de emissão, emissão esta que não é necessariamente atribuída à fluorescência ou fosforescência, visto que os estados moleculares não são classificados como singletes ou tripletes, devido à interação entre estados de transferência de carga e o sistema π do macrociclo^{72,73}.

Os parâmetros de emissão das porfirinas aquossolúveis TMPyP, TPPS, TMAPP e seus metalo derivados foram exaustivamente estudados na década de 80 como parte da caracterização destes promissores fotossensibilizadores em sistemas de conversão de energia. A tabela I apresenta os rendimentos quânticos de fluorescência de algumas porfirinas e seus respectivos tempos de vida. Também apresenta os parâmetros de fosforescência, que foram determinados pela técnica de fotólise por pulso de laser⁷⁴.

As metaloporfirinas de Pd(II), Sn(II) e Zn(II) dos derivados *meso* substituídos aquossolúveis apresentam longos tempo de vida do estado triplete (τ_T) e alto rendimento quântico de formação do estado triplete (Φ_T), sendo propriedades importantes para aplicação como fotossensibilizadores em processos de transferência de energia e/ou elétrons.

Tabela I- Parâmetros fotofísicos de porfirinas meso substituídas e seus metalo complexos

Porfirinas	Φ_F	τ_S (ns)	Φ_T	τ_T (ms)
H ₂ TPPS ¹	0,08	10,4	0,78	0,42
H ₂ TMAPP ¹	0,07	9,3	0,80	0,54
H ₂ TMPyP ²	0,047	6,0	0,95	0,17
ZnTMAPP ²	---	1,75	0,82	1,2

¹ ref. ⁵⁴; ² ref. ⁷⁵. Φ_F – rendimento quântico de fluorescência; τ_S – tempo de vida do estado singlete; Φ_T – rendimento quântico de formação do estado triplete; τ_T – tempo de vida do estado triplete.

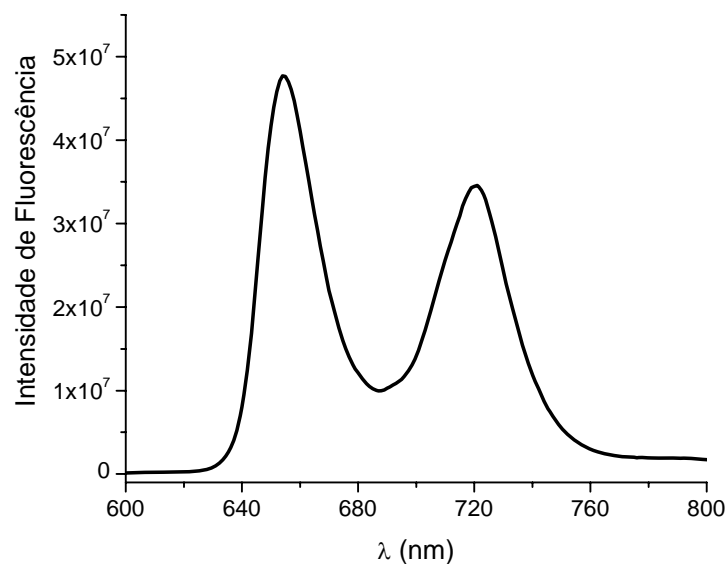


Figura 26. Espectro de emissão da tetrafenil porfirina (TPP) em clorofórmio.

1.3.4.1 Supressão de fluorescência

Vários processos podem resultar na supressão da fluorescência de uma molécula. Os dois processos principais são a supressão dinâmica (difusional) e a supressão estática. A desativação do estado excitado destes processos pode ocorrer através de vários mecanismos como por exemplo; reações do estado excitado, transferência de energia, transferência de elétrons ou formação de complexos.

O processo colisional de supressão de fluorescência pode ser descrito pela equação de Stern-Volmer (1):

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV} [Q] \quad (1)$$

Onde F_0 e F são as intensidades de fluorescência na ausência e presença do supressor, respectivamente, k_q é a constante de supressão bimolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do supressor, $[Q]$ é a concentração do supressor, e $K_{SV} = k_q \tau_0$ é a constante de Stern-Volmer. Quando construímos um gráfico de F_0/F versus $[Q]$ é esperado uma reta, onde o coeficiente angular é igual K_{SV} .

A supressão de fluorescência pode também ser resultado da formação de um complexo "de estado fundamental", não fluorescente entre o fluoróforo e o supressor. Isto ocorre quando este complexo absorve luz e retorna ao estado fundamental sem a emissão de um fóton de luz.

A dependência da variação de fluorescência com a adição do supressor poder ser encontrada através da constante de associação do complexo de estado fundamental.



onde F-Q representa o complexo de estado fundamental.

A constante pode ser escrita como:

$$K_S = \frac{[F-Q]}{[F][Q]} \quad (2)$$

onde [F-Q] é a concentração do complexo e [F] é a concentração do fluoróforo não complexado. Se o complexo é não fluorescente, então a fração fluorescente (F/F_0) é dada pela fração total de fluoróforo que não está complexado (f). Sendo assim, temos:

$$[F_0] = [F] + [F-Q] \quad (3)$$

substituindo na equação acima temos:

$$K_S = \frac{[F_0] - [F]}{[F][Q]} = \frac{[F_0]}{[F][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (4)$$

rearranjando a equação acima temos:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S[Q] \quad (5)$$

Na equação 5 temos a equação de supressão estática onde notamos que esta é idêntica à equação de supressão dinâmica, isto é a constante de Stern-Volmer é igual a constante de equilíbrio da reação ($K_S = K_{eq}$). Para distinguirmos entre supressão estática e dinâmica temos que analisar outros parâmetros como, tempo de vida, temperatura e viscosidade. Outra análise importante para diferenciar entre supressão estática e dinâmica é o espectro de absorção; na supressão dinâmica não existe mudança apreciável no espectro de absorção, uma vez que afeta apenas o estado excitado do fluoróforo. Em contraste, na supressão estática existe a formação de um complexo do estado fundamental, modificando o espectro de absorção do fluoróforo.

Em muitos casos o fluoróforo pode ser suprimido por ambos os processos, colisional ou estático com um mesmo supressor^{76,77}. Isto ocorre geralmente quando existe um desvio positivo dos pontos experimentais, não podendo ser tratado por uma regressão linear^{78,79}. Desta forma a fração fluorescente remanescente (F/F_0) é dada pelo produto da fração não complexada (f), e fração não suprimida pelo encontro colisional.

$$\frac{F}{F_0} = f \frac{\Gamma}{\Gamma + k_q[Q]} \quad (6)$$

Sabendo que $f^{-1} = 1 + K_s[Q]$ e rearranjando e invertendo a equação acima temos:

$$F_0/F = (1 + K_{SV}[Q])(1 + K_s[Q]) \quad (7)$$

Esta forma modificada da equação de Stern-Volmer é de segunda ordem em [Q], o qual gera um desvio positivo da curva, quando ambos processo de supressão, estático e dinâmico, estão ocorrendo para um mesmo fluoróforo.

A porção dinâmica da supressão de fluorescência pode ser determinada através das medidas de tempo de vida, que é $\tau_0/\tau = 1 + K_{SV}[Q]$. No entanto, quando a medida do tempo de vida se torna inviável, a equação (7) pode ser modificada, separando graficamente K_s e K_{SV} . Multiplicando os termos entre parênteses na equação 7 temos:

$$F_0/F = 1 + (K_{SV} + K_s)[Q] + K_{SV}K_s [Q]^2 \quad (8)$$

$$F_0/F = 1 + K_{app}[Q] \quad (9)$$

Onde:

$$K_{app} = (K_{SV} + K_s) + K_{SV}K_s [Q] = \frac{F_0/F - 1}{[Q]} \quad (10)$$

A constante aparente de supressão é calculada para cada concentração do supressor. E então um gráfico do K_{app} em função da concentração do supressor, sendo que o intercepto do eixo y= $K_{SV} + K_s$ e o coeficiente angular da reta é $K_{SV}K_s$ como mostrado na figura 27.

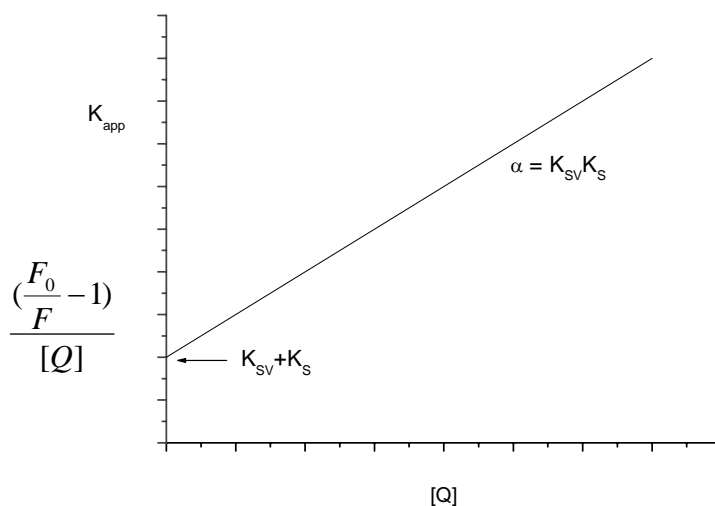


Figura 27. Gráfico da supressão dinâmica e estática.

Um outro processo de supressão de fluorescência é o conhecido como *modelo de supressão por esfera de ação (SEA)*⁸⁰. Este tipo de supressão ocorre quando no momento da excitação o emissor e o supressor encontram-se em contato e não ocorre a emissão de fluorescência. Este tipo de supressão é um processo, na verdade, intermediário entre os processos puramente difusional e estático. Para sistemas simples onde o supressor e o fluoróforo são moléculas discretas pode-se assumir que no momento da excitação estas moléculas encontram-se juntas na mesma estrutura de solvatação ou "gaiola do solvente" (solvent cage), e pela proximidade entre as duas espécies ocorre a supressão da fluorescência com eficiência unitária ou praticamente unitária⁸¹.



Esta maior proximidade entre o supressor e a espécie emissora no momento da excitação também pode ser originada pela existência de um micro-ambiente gerado por uma espécie macromolecular⁸², por um sistema micro-heterogêneo^{83,84} ou quando a excitação ocorre em um sistema sólido.

Assim como no caso da supressão estática são observados desvios positivos nas curvas de Stern-Volmer dinâmicas, entretanto, estes desvios geralmente ocorrem para concentrações muito menores de supressor.

A contribuição para o processo de supressão de fluorescência pode ser expressa pela fórmula:

$$\frac{I_0}{I} = e^{K_{EA}[Q]}$$

onde I_0 e I correspondem às intensidades de emissão na ausência e na presença do supressor, K_{EA} é a constante de supressão de esfera de ação e $[Q]$ é a concentração do supressor. A constante K_{EA} é também denominada *constante estática aparente*, uma vez que o processo se assemelha a uma supressão estática, sendo que K_{EA} é o produto de duas outras constantes:

$$K_{EA} = \nu N$$

onde ν é definido como o volume da esfera efetiva de supressão, ou seja, o volume dentro do qual o emissor pode ser considerado em contato com o supressor e N é o número de Avogadro. Logo o raio desta esfera corresponde à distância de contato entre emissor e supressor que origina a supressão⁸⁵.

O processo de esfera de ação pode ocorrer simultaneamente ao processo de supressão difusional. Neste caso, a equação de Stern-Volmer pode ser modificada de forma a descrever os dois processos:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(e^{K_{EA}[Q]})$$

2. JUSTIFICATIVA DA PROPOSIÇÃO DA DISSERTAÇÃO - OBJETIVOS

A distribuição do sensibilizador entre tecidos normais e tumorais, assim como a sua localização celular (por exemplo, mitocôndria, núcleo) são aspectos primordiais em sistemas de TFD. Tanto a distribuição como a localização celular são governados em grande parte por fatores hidrofóbicos/hidrofílicos presentes na molécula do fotossensibilizador.

A proposição geral desta dissertação é o estudo de uma série de porfirinas tetra-catiônicas com o polímero sintético da eumelanina. Estas porfirinas tetra-catiônicas são a princípio hidrofílicas, porém apresentam substituintes alquílicos que conferem diferentes contribuições hidrofóbicas à molécula. Este fator hidrofóbico é obtido tanto pela utilização de grupos R-benzil, onde R é um substituinte na posição 4 do anel benzílico, como pela síntese de derivados porfirínicos contendo cadeias alquílicas hexadecil. Os grupos R presentes nos derivados benzílicos apresentam contribuições eletrônicas diferenciadas, podendo influenciar não só os aspectos gerais de distribuição de carga na molécula como gerar interações específicas com substratos biológicos. O fato de esses derivados serem catiônicos deve resultar em uma grande especificidade pela melanina, uma vez que este polímero apresenta grupos aniônicos e os diferentes substituintes da porfirina podem influenciar na cinética e na fração efetivamente incorporada pelo tumor pigmentado.

Em uma etapa preliminar aos ensaios clínicos, faz-se necessária uma avaliação geral das características da interação em solução através de técnicas espectroscópicas de absorção e emissão de fluorescência, utilizando um modelo simplificado de melanina, obtido pela auto-oxidação da L-DOPA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

A meso-(tetrakis piridil) porfirina (TPyP) (Midcentury) foi utilizada sem tratamento prévio.

LiCl, NaClO₄ e Zn(ac)₂ (Merck) foram utilizados sem purificações prévias.

Cloreto de p-metóxi benzila, brometo de p-nitrobenzila e cloreto de benzila (todos Aldrich) foram utilizados sem tratamento prévio.

Acetonitrila foi utilizada sem purificações prévias (Mallinckrodt).

O metanol (Synth) foi refluxado com iodo e magnésio e posteriormente destilado. O clorofórmio (Synth) foi lavado duas vezes com água destilada para eliminar traços de etanol e seco por uma noite em CaCl₂, para então ser destilado.

A acetona (Synth) foi seca com sulfato de cálcio, e então destilada para eliminar traços de água. O éter etílico (Synth) foi lavado com uma solução de SnCl₂ em H₂SO₄ 6%, seco com CaCl₂ para então ser destilado.

A L-dopa (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina) foi utilizada sem purificações prévias (Merck).

Foram realizados diferentes tratamentos com a N,N-dimetilformamida (DMF), e o que produziu os melhores resultados é descrito a seguir. A DMF (Merck) foi seca com MgSO₄ (o MgSO₄ foi anteriormente ativado em mufla a 200° C) por 24h e destilada à pressão reduzida de 6mmHg, na ausência de luz e recolhida a 42° C⁸⁶.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os espectros eletrônicos foram obtidos no espectrofotômetro HP 8453, utilizando cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm e capacidade de 3 cm³.

Os espectros de RMN-¹H foram obtidos em um equipamento Bomen AC 200MHz.

Os espectros eletrônicos de emissão foram obtidos no fluorímetro Spex-Fluorolog FL 212. Os espectros de emissão foram obtidos utilizando a geometria *front face*. Foram utilizadas cubetas de quartzo de caminho óptico de 1,00 cm e capacidade volumétrica de 3,5 cm³.

3.3 SÍNTESES

Aspectos Gerais

Todas as sínteses dos compostos porfirínicos foram acompanhadas por espectroscopia UV-Vis.

As sínteses realizadas seguiram os métodos já desenvolvidos pelo grupo^{87,72,73}.

Os compostos foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis, RMN-¹H e análise elementar. Antes de serem submetidas à análise as amostras permaneceram por 12h em Abderhalden.

3.3.1 SÍNTESE DA TBzPYP

Em um balão de 250 mL foram adicionados 200 mg de TPyP ($3,2 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) e 8 g de cloreto de benzila (0,6 mol.L⁻¹) dissolvidos em 100 mL de DMF. A reação foi mantida a 130^o C, sob agitação magnética durante 2 horas.

O solvente foi destilado a pressão reduzida em evaporador rotatório e o excesso de alquilante foi eliminado lavando-se com clorofórmio. O produto foi posteriormente recristalizado de uma mistura metanol/éter etílico, obtendo-se um sólido púrpura. TBzPyP.9H₂O: C₆₈H₅₄N₈Cl₄.9H₂O, MM=1286 g.mol⁻¹, %C 63,5 (63,6 calc); %H 5,41 (5,60); %N 8,83 (8,71). Rendimento 60%.

3.3.2 SÍNTESE DA TMPyP

Em um balão de 250 mL foram adicionados 100 mg de TPyP ($1,2 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) e 2 g de p-toluenossulfonato de metila (0,1 mol.L⁻¹) dissolvidos em 140 mL de DMF. A reação foi mantida a 130° C, sob agitação constante durante 3 horas.

O solvente foi destilado a pressão reduzida em evaporador rotatório e o excesso de alquilante foi eliminado lavando-se com clorofórmio. O produto foi posteriormente recristalizado de uma mistura metanol/éter etílico, obtendo-se um sólido púrpura. TMPyP. 8H₂O: C₇₂H₆₆N₈S₄O₁₂.8H₂O, MM=1507 g.mol⁻¹, %C 57,3 (57,4 calc); %H 5,49 (5,44); %N 7,40 (7,43). Rendimento 60%.

2.3.3 SÍNTESE DA TNO₂BzPyP

Em um balão de 250 mL foram adicionados 100 mg de TPyP ($1,5 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) e 7 g de brometo de p-nitrobenzila (0,4 mol.L⁻¹) dissolvidos em 160 mL de DMF. A reação foi mantida a 130° C, sob agitação constante durante 2,5 horas.

O solvente foi destilado a pressão reduzida em evaporador rotatório e o excesso de alquilante foi eliminado lavando-se com clorofórmio. Obteve-se um sólido de coloração verde, indicando a presença de impureza na síntese da porfirina. O produto foi posteriormente recristalizado de uma mistura metanol/éter etílico, persistindo o sólido verde. Realizamos uma nova síntese utilizando o alquilante purificado através da recristalização em etanol absoluto e posteriormente com uma mistura de ciclo hexano, hexano e benzeno (1:1:1). Observamos que mesmo com o alquilante recristalizado mais uma vez foi obtido o sólido com impurezas. Este produto foi recristalizado de uma mistura metanol/éter etílico e foi dissolvido em metanol a quente, e acidentalmente uma pequena porção do sólido verde caiu na chapa de aquecimento, onde observamos que com aquecimento o sólido se tornou cor púrpura. Desta forma o sólido foi aquecido em um Kugelrhor por 3 horas a 120° C e pressão de 1 mmHg. A porfirina foi

posteriormente analisada, obtendo-se os seguintes resultados. TNO₂BzPyP. 7H₂O: C₆₈H₅₀N₁₂Br₄O₈.7H₂O, MM=1616 g.mol⁻¹, %C 50,9 (50,5 calc); %H 3,87 (3,96); %N 10,2 (10,3). Rendimento 60%.

3.3.4 SÍNTESE DA TMEOBzPyP

Em um balão de 125 ml foram adicionados 50 mg de TPyP (1×10^{-3} mol.L⁻¹) e 3,16 g de cloreto de *p*-metóxi benzila ($0,25$ mol.L⁻¹) dissolvidas em 80 ml de DMF. A reação foi mantida a 130°C durante aproximadamente 3 horas. O solvente foi rotoevaporado à pressão reduzida, e o excesso de alquilante foi eliminado, lavando-se o sólido obtido com clorofórmio. O produto foi obtido após recristalização em metanol/éter etílico. O sólido obtido apresentou coloração púrpura. Rendimento: 70%.

3.3.5 SÍNTESE DA TClBzPyP

Em um balão de 250 ml foram adicionados 70 mg de TPyP (1×10^{-3} mol.L⁻¹) e 4,75 g de cloreto de *p*-clorobenzila ($0,26$ mol.L⁻¹) dissolvidas em 113 ml de DMF. A reação foi mantida a 130°C durante aproximadamente 3 horas.

O solvente foi rotoevaporado a pressão reduzida, e o excesso de alquilante foi eliminado, lavando-se o sólido obtido com clorofórmio. O produto foi obtido após recristalização em metanol/éter etílico. O sólido obtido apresenta coloração púrpura. Rendimento: 40%.

3.3.6 SÍNTESE DA TBRBzPyP

Em um balão de 250 ml foram adicionados 70 mg de TPyP (2×10^{-3} mol.L⁻¹) e 5,64 g de brometo de *p*-bromobenzila ($0,4$ mol.L⁻¹) dissolvidas em 57 ml de DMF. A reação foi mantida a 130°C durante aproximadamente 3 horas.

O solvente foi rotoevaporado a pressão reduzida, e o excesso de alquilante foi eliminado, lavando-se o sólido obtido com clorofórmio. O produto foi obtido após recristalização em metanol/éter etílico. O sólido obtido apresentou coloração púrpura. TBrBzPyP. $8\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_{68}\text{H}_{50}\text{N}_8\text{Br}_8 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{MM}=1762 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, %C 46,3 (46,3 calc); %H 3,63 (3,74); %N 6,12 (6,36). Rendimento: 70%.

3.3.7 SÍNTESE DA TCO_2BzPyP

Em um balão de 125 ml foram adicionados 48 mg de TPyP ($2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 3,35 g de ácido α -bromo-*p*-toluico ($0,4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dissolvidas em 40 ml de DMF. A reação foi mantida a 130°C durante aproximadamente 1 horas.

O solvente foi rotoevaporado a pressão reduzida, e o excesso de alquilante foi eliminado, lavando-se o sólido obtido com clorofórmio, obtendo-se um sólido de coloração verde clara. O produto foi recristalização duas vezes em metanol/éter etílico para retirar a impureza. O sólido obtido apresentou coloração púrpura. $\text{TCO}_2\text{HBzPyP} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_{72}\text{H}_{54}\text{N}_8\text{Br}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{MM}=1622 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, %C 53,2 (53,3 calc); %H 4,06 (4,31); %N 6,32 (6,90). Rendimento: 70%.

3.3.8 SÍNTESE DA TCH_3BzPyP

Em um balão de 125 ml foram adicionados 80 mg de TPyP ($2 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) e 3,6 g de brometo de *p*-metilbenzila ($0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) dissolvidas em 65 ml de DMF. A reação foi mantida a 130°C durante aproximadamente 3 horas.

O solvente foi rotoevaporado à pressão reduzida, e o excesso de alquilante foi eliminado, lavando-se o sólido obtido com clorofórmio. O produto foi obtido após recristalização em metanol/éter etílico. O sólido obtido apresentou coloração púrpura. $\text{TCH}_3\text{BzPyP} \cdot 8\text{H}_2\text{O}$: $\text{C}_{72}\text{H}_{66}\text{N}_8\text{Br}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, $\text{MM}=1502 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, %C 57,4 (57,6 calc); %H 5,01 (5,19); %N 7,47 (7,45). Rendimento: 70%.

3.3.9 SÍNTESE DAS ZINCO PORFIRINAS

Foram sintetizados os metaloderivados das porfirinas TMPyP, TBzPyP, TNO₂BzPyP, TCH₃BzPyP, TBrBzPyP, TCIBzPyP e da TMeOBzPyP

Em um balão de 250 ml foram adicionados 60 mg da porfirina e um excesso molar de 10 de ZnCl₂ dissolvidos em 100ml ml de água deionizada. A reação permaneceu em refluxo por 1 hora, até quando não observou mais mudanças no espectro UV-Vis. Adicionou-se então à mistura reacional, previamente resfriada, solução gelada de NaClO₄ 4 mol.L⁻¹. O sólido obtido foi lavado com água deionizada gelada para eliminar o excesso de sal. O produto final foi obtido após recristalização em metanol/éter etílico. Todos os derivados apresentaram coloração verde.

Para a obtenção da ZnTMPyP(ClO₄)₄, adicionou-se à ZnTMPyP(ClO₄)₄ dissolvida em acetonitrila, solução de LiCl 3M em acetonitrila. O sólido precipitado foi filtrado e lavado com acetona para eliminar o excesso de LiCl. A ZnTMPyP(ClO₄)₄ apresentou coloração verde.

Abaixo temos as análises elementares e os respectivos rendimentos das zinco-pofirinas:

ZnTMPyP(ClO₄)₄: C₆₈H₅₄N₈Cl₄.11H₂O, P.M.=1181,6 g mol⁻¹, %C 48,86 (48,95 calc), %H 5,30 (4,74), %N 10,35 (10,52). Rendimento: 80%

ZnTBzPyP(ClO₄)₄: ZnC₆₈H₅₂N₈O₁₆Cl₄.4H₂O, P.M.=1515,9 g mol⁻¹, %C 53,98 (54,09 calc), %H 3,90 (3,88), %N 7,38 (7,41) Rendimento: 60%

ZnTNO₂BzPyP(ClO₄)₄: ZnC₆₈H₄₈N₁₂O₂₄Cl₄.9H₂O, P.M.=1724,89 g mol⁻¹, %C 47,50 (47,52 calc), %H 3,80 (3,42), %N 9,70 (9,20). Rendimento: 72%

ZnTBrBzPyP(ClO₄)₄: ZnC₆₈H₄₈N₈Br₄Cl₄.8H₂O, P.M. = 1647 g mol⁻¹, %C 49,5 (49,6 calculado); %H 4,05 (3,89); %N 6,44 (6,80). Rendimento 80%.

3.3.10 SÍNTESE DA TRISPYMHDPYP

Em um balão de 250 mL foram adicionados 100 mg de TPyP (2×10^{-3} mol.L⁻¹) e 0,6 g de 1-bromohexadecano (0,024 mol.L⁻¹) dissolvidos em 80 mL de DMF. A reação foi mantida a 130° C, sob agitação constante durante 3 h.

O solvente foi destilado a pressão reduzida em evaporador rotatório e o excesso de alquilante foi eliminado lavando-se três vezes com éter etílico. O produto foi dissolvido em metanol para extrair o excesso de TPyP. O filtrado foi rotoevaporado e os produtos separados através de colunas de Sephadex LH-20 e Alumina. Obtendo um sólido de coloração púrpura.

3.3.11 SÍNTESE DA TRISMPYHEXDPYP

Em um balão de 50 mL foram adicionados 30 mg de monoHexTrisPyP (2×10^{-3} mol.L⁻¹) e 1,149 g de p-toluenossulfonato de metila (0,4 mol.L⁻¹) dissolvidos em 16,5 mL de DMF. A reação foi mantida a 130° C, sob agitação magnética durante 2 horas.

O solvente foi destilado a pressão reduzida em evaporador rotatório e o excesso de alquilante foi eliminado lavando-se com éter etílico. Rendimento 40%. O produto da reação foi purificado em coluna de Sephadex-HL20, utilizando como solvente o metanol. O sólido obtido apresentou coloração púrpura.

3.3.12 SÍNTESE DA TRISBZPYHEXDPYP

Em um balão de 50 mL foram adicionados 30 mg de monoHexTrisPyP (2×10^{-3} mol.L⁻¹) e 0,822 g de cloreto de benzila (0,4 mol.L⁻¹) dissolvidos em 16,5 mL de DMF. A reação foi mantida a 130° C, sob agitação magnética durante 2 horas.

O solvente foi destilado a pressão reduzida em evaporador rotatório e o excesso de alquilante foi eliminado lavando-se com éter etílico. Rendimento 40%.

O produto da reação foi purificado em coluna de Sephadex-HL20, utilizando como solvente o metanol. O sólido obtido apresentou coloração púrpura.

3.3.13 SÍNTESE DA THEXDECTPyP

Em um balão de 125 ml foram adicionados 50 mg de TPyP ($1,2 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹) e 6,2 g de 1-bromohexadecano ($0,3$ mol.L⁻¹) dissolvidas em 68 ml de DMF. A reação foi mantida a 130°C durante aproximadamente 2 horas.

O solvente foi rotoevaporado a pressão reduzida, e o excesso de alquilante foi eliminado, lavando-se o sólido obtido 3 vezes com éter etílico. Como o excesso de alquilante continuava impregnado o sólido foi aquecido no Kugelrohr por 3 horas, à pressão de 1 mmHg. O produto obtido foi analisado através de cromatografia em camada delgada, onde observamos que a amostra ficava toda retida na placa, como era esperado. Rendimento: 70%.

3.3.14 SÍNTESE DA DOPA-MELANINA

A síntese da melanina foi preparada através de método já descrito por Sealy^{88,89}. Foram adicionados 2,5 g de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-dopa) em 510 mL de água MiliQ que se encontrava em pH 8,2, obtido pela adição de hidróxido de amônio concentrado. Após a dissolução da L-dopa o pH da solução se encontrava em torno de 7,0, sendo então ajustado novamente para 8,0. Esta mistura foi deixada sob agitação magnética e sob fluxo de O₂ por três dias

O precipitado foi lavado com ácido clorídrico $0,01$ mol.L⁻¹, e depois três vezes com água MiliQ. Parte do precipitado de melanina dissolveu em pH 5,0 não foi possível a sua recuperação por centrifugação. Então foi ajustado até 2,0 novamente, para a precipitação da melanina e sua posterior centrifugação. O sólido foi ressuspensionado em acetona e seco sob vácuo.

A formação deste polímero ocorre de maneira irregular, existindo uma variedade muito grande de peso molecular no produto final. Para um melhor controle do peso molecular a melanina foi tratada com uma membrana de separação (Millipore) 5000 u.m.a., através de centrifugação. Para todas as medidas deste trabalho foi utilizado polímero com peso molecular maior que 5000.

3.3.15 PREPARAÇÃO DOS FILMES

Os slides de vidro foram utilizados como suporte dos filmes. Estes foram tratados com uma solução "piranha" (mistura 7:3 de ácido sulfúrico concentrado e peróxido de hidrogênio concentrado), sendo que esta solução deve ser utilizada logo após o preparo. Posteriormente os slides foram lavados com água MiliQ e secos em atmosfera de argônio⁹⁰.

Os filmes foram obtidos através do método de imersão onde a concentração da solução aquosa de porfirina utilizada foi 5×10^{-3} mol. L⁻¹ e a concentração melanina 5 mg.mL⁻¹. O tempo de imersão foi de 30 minutos e após cada imersão o slide foi lavado com água miliQ e seco em atmosfera de argônio.

Foram construídos filmes formados pela deposição de camadas sucessivas apenas de porfirinas ou de melanina. Também foram construídos filmes formados pela deposição alternada de camadas de porfirina e melanina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SÍNTESES

As porfirinas foram sintetizadas pela reação entre a TPyP e os correspondentes haletos de alquila.

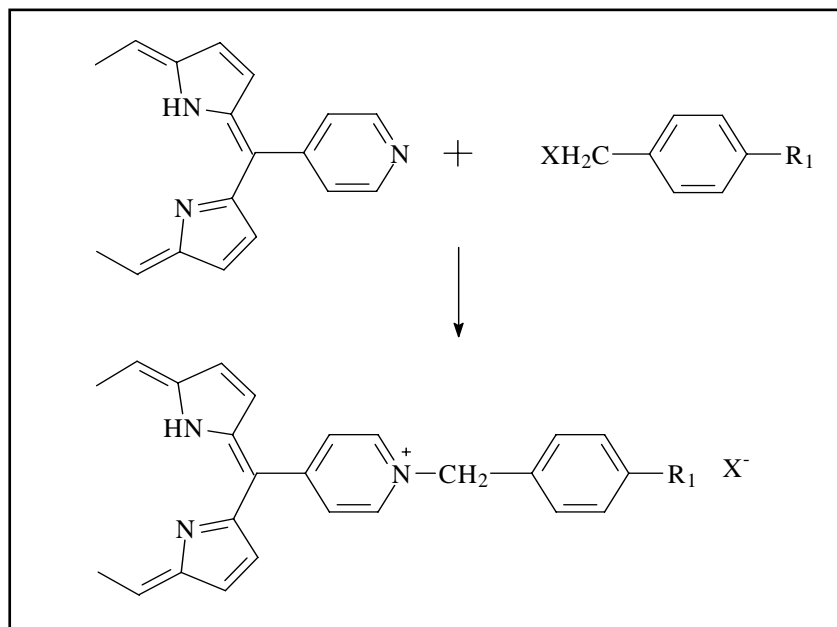


Figura 28. Representação Esquemática da Reação de Quaternização dos Nitrogênios Piridínicos do TPYP.

Foram reproduzidas as condições experimentais anteriormente utilizadas em nosso grupo^{73,74}, desta forma não serão discutidos aspectos relativos à reatividade dos diversos haletos de alquila em reações de quaternização, serão apresentados apenas os aspectos gerais e caracterização dos compostos porfirínicos obtidos.

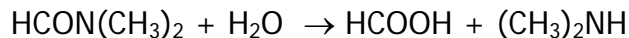
Apesar das rotas sintéticas já serem conhecidas do grupo, durante as sínteses realizadas foram encontrados vários problemas relacionados aos rendimentos das reações e com a pureza dos produtos obtidos. Em várias reações, embora tenham sido utilizadas as condições pré-determinadas, os produtos obtidos formavam um material oleoso após a eliminação do solvente. Este material é característico de produto semi-alquilado (porfirinas mono, di e tri- alquiladas), que forma com o alquilante e resíduos de solvente um material com as características oleosas descrita acima.

Outro problema encontrado foi que em muitas sínteses, obtivemos o produto tetra-alquilado (confirmado pelo espectro de absorção), porém acompanhado de quantidades variáveis de um produto secundário não porfirínico.

A separação/purificação cromatográfica de *porfirinas catiônicas* não é um processo viável uma vez que só são solúveis em solventes polares e apresentam uma alta retenção na fase estacionária tanto em sílica como em alumina, sendo purificadas normalmente por precipitação pela troca conveniente do contra-íon, ou através de recristalização. Estes métodos, entretanto, não foram adequados na maioria das reações que apresentaram um comportamento anômalo.

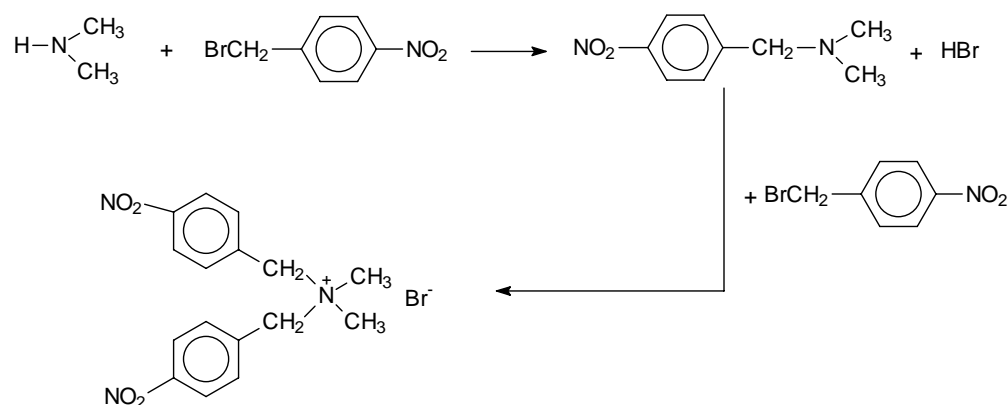
Os problemas encontrados nestas sínteses podem ser provenientes da pureza do DMF ou do alquilante.

O DMF apesar de ser um solvente muito utilizado pode sofrer decomposição, por exemplo, na presença de traços de água sofre hidrólise lentamente, de acordo com a equação abaixo:



Por sua vez, a degradação térmica do DMF produz dimetilamina e monóxido de carbono, e a presença de impurezas ácidas ou básicas também levam à decomposição do DMF. Portanto, levando em consideração tanto a possível hidrólise e a decomposição térmica, o ácido fórmico e a dimetilamina são as principais impurezas do DMF^{91,92}. Por sua vez, traços de ácidos e bases catalisam a decomposição da DMF, ou seja, a própria decomposição da DMF gera espécies ácidas e básicas que auxiliam na decomposição deste solvente.

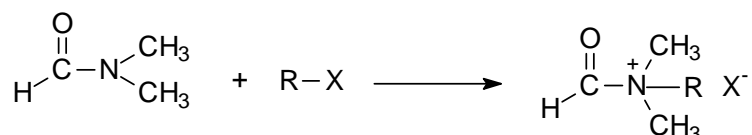
A dimetilamina pode reagir com o alquilante, uma vez que se trata de uma amina secundária e os agentes alquilantes empregados são bastante reativos, podendo gerar as respectivas aminas terciária e quaternária como indicado abaixo:



i- esquema da reação entre a dimetilamina e brometo de nitrobenzila

Esta reação além de consumir o alquilante gera produtos secundários que contaminariam o produto final.

Uma outra possibilidade é a da reação direta entre o alquilante e a DMF, resultando na alquilação da amida como indicado abaixo, entretanto a reatividade do nitrogênio da amida é muito mais baixa que os nitrogênios das aminas:



ii- representação da reação de alquilação da DMF.

Os menores rendimentos também podem estar relacionados a uma mudança na polaridade do meio reacional devido à presença dos produtos de decomposição do DMF, ou pelos produtos de alquilação da dimetilamina. Esta alteração nas condições do meio poderiam resultar em alterações na solubilidade tanto da TPyP como dos produtos tetra-alquilados, modificando a reatividade ou dificultando a separação e purificação destas porfirinas catiônicas.

Adicionalmente, verificamos também, que a utilização de DMF recuperado não é aconselhável para a realização das sínteses, pois, apesar dos métodos empregados para o tratamento do DMF, é relativamente difícil a obtenção de um solvente adequado.

Além dos problemas encontrados com o solvente temos que considerar a reatividade dos alquilantes utilizados. Devido a grande reatividade dos alquilantes eles podem se decompor, como por exemplo, no caso do cloreto de benzila pode ocorrer hidrólise formando ácido clorídrico, o que também levaria a um menor rendimento das reações. Resultados semelhantes foram obtidos em reações atípicas que utilizaram tanto *haletos de benzila purificados* como com haletos utilizados sem prévia purificação. Logo, a decomposição ou contaminação do alquilante não deve ser a causa principal destas anomalias, mas sim os fatores mencionados acima para o solvente DMF (vide, por exemplo, na parte experimental, a síntese da TNO₂BzPyP).

A seguir temos uma breve descrição dos métodos que foram empregados na purificação de algumas das porfirinas, em sínteses que tiveram resultados anômalos.

i- Na obtenção da TNO₂BzPyP, por exemplo, foi obtido um sólido esverdeado que não apresentava características de material porfirínico, além do que a quantidade do material obtido era muito superior à massa esperada, indicando a existência de um subproduto na reação. Para otimizarmos o método ideal de purificação foram realizadas varias tentativas de recristalização; no entanto, notou-se que esta impureza permanecia após a precipitação da porfirina. Foi observado que esta impureza só era eliminada através de aquecimento. Uma vez que o aquecimento elimina este sólido, o produto das reações foi aquecido em sistema Kugelhorn sob vácuo (aprox. 5 mmHg). Observa-se que à medida que ocorre o tratamento térmico a massa no balão que contém a amostra diminui e a coloração púrpura da porfirina torna-se visível e no balão de resfriamento ocorre a condensação de um sólido branco. Não foram realizados testes no sentido de analisar este sólido.

ii- nas sínteses em que ocorreu a formação de quantidades apreciáveis de produtos semi-alkilados, tentamos completar a reação de quaternização de todas as piridinas da TPyP, reagindo novamente a mistura com o haleto de alkila,

correspondente. Na maioria dos casos não foram obtidos resultados satisfatórios, persistindo ainda uma fração de porfirinas semi-alquiladas que dificulta o processo de purificação.

iii- Na demais sínteses outros métodos para a purificação foram utilizados; na TCO₂BzPyP foram realizadas duas recristalizações, devido à presença de um sólido verde claro. Nas porfirinas TCH₃BzPyP e TMeOBzPyP foi necessária a centrifugação do material, pois o sólido obtido era muito fino impossibilitando a separação por filtração. Após estes tratamentos estas porfirinas foram aquecidas em sistemas Kugelhorn, como descrito acima.

Após todos os tratamentos aplicados, para a purificação das porfirinas, foram realizadas análise elementar e RMN (figura 36), para nos certificarmos da pureza das amostras obtidas.

4.2 SÍNTESE DOS DERIVADOS PORFIRÍNICOS ANFIFÍLICO SEPARAÇÃO DA MHDPYTRISPYP

A biodistribuição de uma determinada droga depende, entre outros fatores, de suas características hidrofílicas/hidrofóbicas. Uma vez que a ação fotodinâmica dependerá também da localização do fotossensibilizador, preparamos alguns derivados catiônicos pela alquilação do nitrogênio piridínico com grupos hexadecila. A preparação de derivados mono-funcionalizados com grupos hexadecila é interessante, pois disponibiliza ainda os três grupos piridínicos da TPyP para alquilação posterior gerando uma porfirina anfifílica.

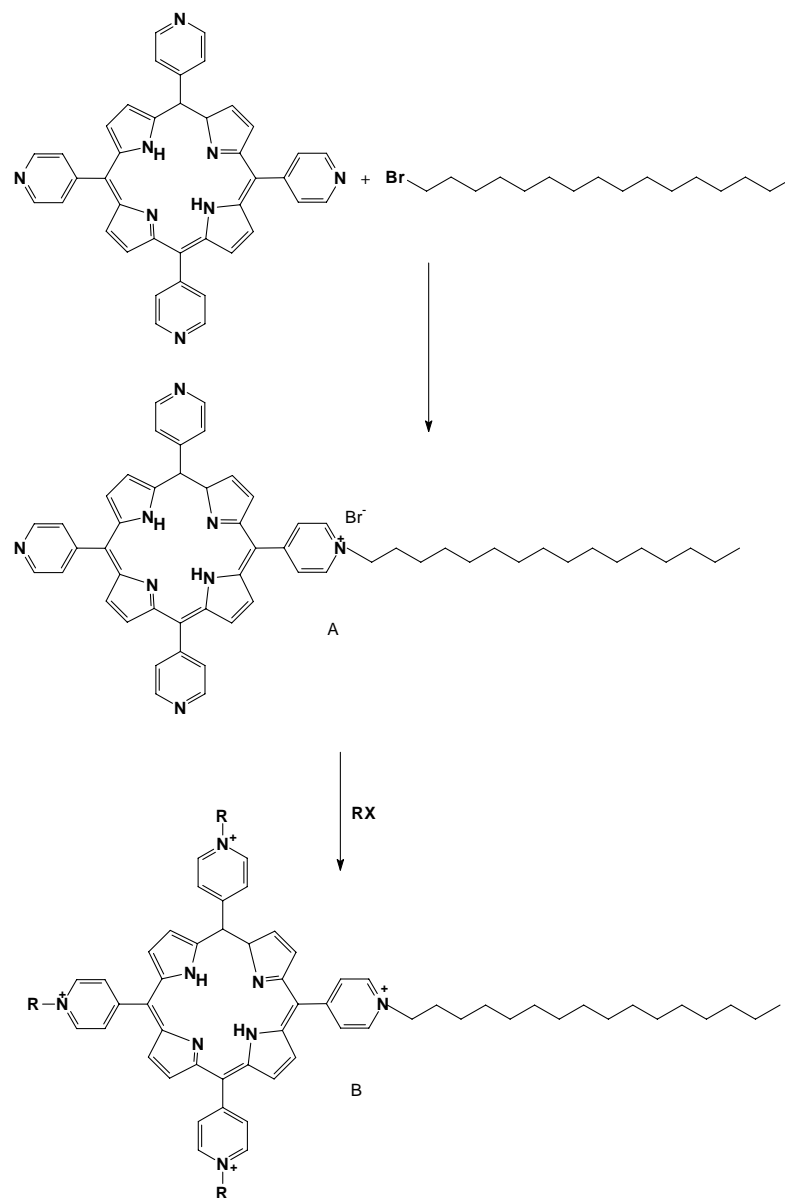
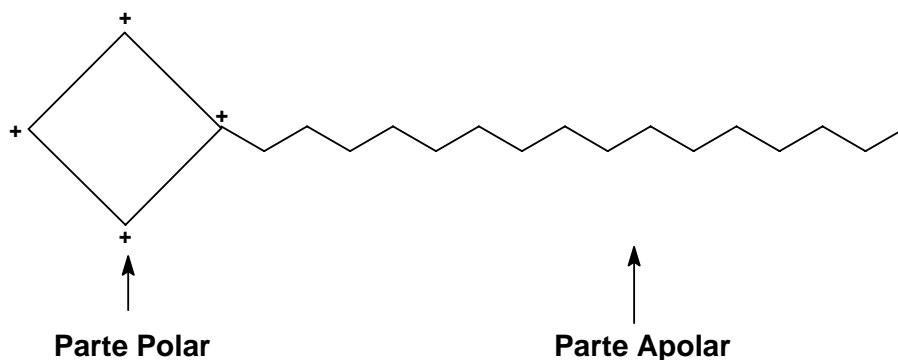


Figura 29. Reações de obtenção produto porfirínico anfifílico. A: produto mono-hexadecilpiridínio; B: produto tetra-alkilado, sendo R um grupo metila ou benzila.

Desta forma o macrociclo porfirínico com os quatro grupos piridínicos simétricos positivos consistiria a porção polar da molécula e a cadeia formada pelo grupo hexadecil seria a porção apolar da molécula:



A obtenção do produto mono alquilado não é um processo simples, uma vez que a reação de alquilação pode ocorrer em qualquer um das quatro piridinas da TPyP, sendo necessário para a obtenção deste produto em quantidades razoáveis uma adequação do excesso molar do alquilante e dos tempos de reação. Uma vez que no meio reacional, além da TPyP que não reagiu, formam-se também produtos com outros graus de substituição, a metodologia normalmente empregada é cromatografia por exclusão de peso molecular usando Sephadex como fase estacionária. Este método a princípio deveria resultar em uma separação razoável, já que cada grupo hexadecila incorporado na molécula representa uma aumento de peso molecular de 304,9 u.m.a incluindo o contra-íon brometo.

Após realizarmos a reação nas condições que favorecem a formação do produto mono-alkilado, foram realizados vários testes para a separação da porfirina mono-substituída.

Primeiramente foi realizado uma pequena coluna em Sephadex LH-20 de (1,8 x 24 cm) e como eluente o metanol, para a separação dos produtos através dos diferentes pesos moleculares dos compostos formados, conforme descrito na literatura⁹³. No entanto, as frações obtidas indicaram que o processo cromatográfico não apresentou uma resolução eficaz, e não foi possível a separação dos compostos durante a eluição da coluna, sendo observada apenas uma mancha que foi separada em varias porções. Foi realizada cromatografia em camada delgada, onde a fase estacionaria foi a alumina e fase móvel uma mistura

de clorofórmio/metanol (85:15). Analisando as porções obtidas, observamos que a porfirina mono-substituída está presente em todas as porções, sendo que a maior concentração se encontra nas frações 3 e 4. Além da porfirina mono-substituída, uma porção de peso molecular maior (produto mais alquilado) e traços de TPyP também estão presentes em todas as porções. Desta forma este procedimento não foi eficiente na separação da porfirina desejada, visto que apresenta uma mistura muito complexa. Abaixo temos as placas cromatográficas em camada delgada da coluna realizada.

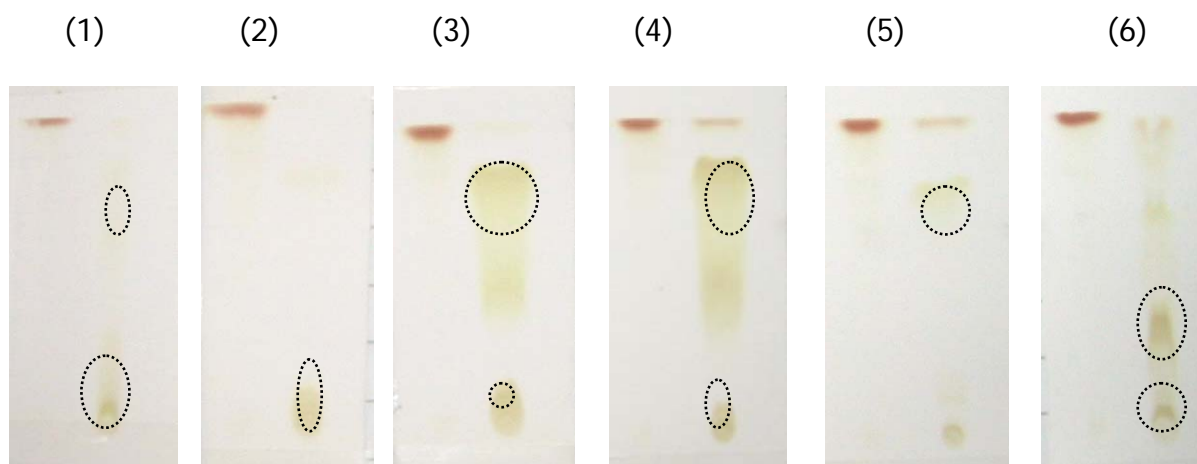


Figura 30. Frações obtidas do procedimento de cromatográfico em camada delgada, com fase estacionária de alumina e fase móvel clorofórmio/metanol (85:15), a primeira amostra de cada placa é a porfirina TPyP utilizada como padrão, os números de 1 a 6 são as frações recolhidas. Os compostos encontrados em cada placa estão circulos para melhor visualização.

Uma vez que a resolução das colunas em Sephadex LH-20 não foi eficaz, realizaram-se colunas em Alumina neutra com eluente clorofórmio e metanol, sendo variada a proporção destes solventes para que pudéssemos analisar o efeito da polaridade no processo de separação.

Para podermos encontrar a proporção ideal de clorofórmio/metanol para a separação do produto mono-alquilado, foi necessário a realização de vários processos cromatográficos. Abaixo citamos os resultados encontrados para as diferentes proporções utilizadas.

Os resultados da coluna realizada utilizando $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (85:15) demonstraram que a polaridade da mistura dos solventes não era ideal para separar as frações, visto que foi observada apenas uma porção alargada na coluna, não havendo separação dos produtos.

Analisando o produto que desejamos obter e observando que na maioria das amostras ainda existia uma pequena quantidade de TPyP, foi realizada uma coluna em Alumina neutra utilizando como eluente o Clorofórmio, através desse procedimento observou que a TPyP presente nas amostras pode ser removida, ficando apenas os produtos aquilados retidos no topo da coluna, isto devido à polaridade da alumina e do solvente utilizado. Para a extração da mono-THDPyP a melhor proporção de clorofórmio/metanol foi a de (97:3), podendo desta maneira separar a mono-porfirina das porfirinas mais alquiladas.

Uma vez que este procedimento foi eficiente na separação do produto desejado, foram realizadas as colunas para separação do produto mono-alkilado. Na figura abaixo apresentamos uma placa cromatográfica da coluna realizada nestas condições. A primeira aplicação é a TPyP utilizada como padrão, a segunda aplicação é a TPyP que não reagiu na síntese e as porções 2 e 3 foram identificadas como a porfirina mono-substituída.



TPyP (1) (2) (3)

Figura 31. Frações obtidas do procedimento cromatográfico da coluna realizada em alumina neutra com eluente clorofórmio e posteriormente clorofórmio/metanol (97:3). Proporção de (1:3000) de porfirina para alumina. Placas cromatográficas, com fase estacionária de alumina e fase móvel clorofórmio/metanol (85:15), a primeira amostra da placa é a porfirina TPyP utilizada como padrão. A (2) é a TPyP que foi eluída com clorofórmio e as amostras (3) e (4) são as frações da mono-porfirina.

Em outra reação realizada, a mistura resultante após a filtração para retirada do excesso de mono- porfirina foi obtido um sólido pastoso. Este sólido foi aquecido no Kugelrohr para purificação da porfirina. Após o aquecimento da porfirina ela tornou-se insolúvel em clorofórmio, esta amostra foi passada em coluna de Sephadex LH-20 tornando-se solúvel em clorofórmio, ou seja, encontramos problemas semelhantes aos descritos para as porfirinas tetra-catiônicas benzílicas.

Nesta coluna realizada a proporção de porfirina e Sephadex LH-20 utilizada foi maior que nas colunas realizadas anteriormente (1:8500), onde observamos uma separação mais eficaz, porém nas porções que temos a porfirina mono-substituída ainda temos uma pequena quantidade de TPyP.

Realizados os vários procedimentos cromatográficos mencionados anteriormente, observou-se que a separação da TrisPyMHDPyP é um procedimento bastante complexo. Isto devido às características da TPyP e a TrisPyMHDPyP

serem muito semelhante, tornando-se necessário vários procedimentos cromatográficos de uma mesma porção para a obtenção de uma amostra pura, comprometendo o rendimento final. Apesar da grande demanda de tempo necessário para a separação deste produto, algumas considerações gerais a respeito da forma mais adequada de obtenção deste produto podem ser formuladas:

- apesar de não ser solúvel em metanol, a TPyP sempre contamina as colunas de Sephadex na separação do produto mono-alquilado. A maneira mais conveniente de eliminar a TPyP é por cromatografia em alumina utilizando clorofórmio, sendo esta porfirina separada dos produtos alquilados utilizando clorofórmio como eluente. O produto mono-alquilado pode ser separado a seguir, aumentando-se a polaridade do solvente pela adição de metanol (97:3 clorofórmio:metanol). Obtido o produto, este é purificado por sephadex LH20 utilizando metanol.

- outra maneira é a utilização direta de sephadex LH20, utilizando grandes relações material aplicado:fase estacionária (1:8500). Desta forma é separado o material mono-alquilado. Entretanto, persiste a contaminação com TPyP, que pode ser eliminada por cromatografia em alumina como descrito acima.

A partir da porfirina mono-alquilada foram realizadas reações para a obtenção dos derivados tetraalquilados com diferentes substituintes.

Tanto na reação da TrisMPyHexDPyP quanto da TrisBzPyHexDPyP foram utilizados condições de excesso molar de alquilante semelhante à síntese das porfirinas tetra-alquiladas, visto que tínhamos três grupos piridínicos disponíveis para reagir.

As reações foram acompanhadas espectrofotometricamente, sendo observado o deslocamento do máximo de absorção da banda Soret, semelhante ao comportamento das porfirinas tetra alquiladas, indicando a alquilação dos grupos piridínicos remanescentes, tanto pelo grupo CH_3 como pelo grupo benzila. A formação da porfirina tetra-alquilada também foi confirmada por testes TCC, onde

não ocorreu o desenvolvimento da banda da porfirina alquilada, comportamento este esperado para as espécies tetra catiônicas. Após a separação do solvente da reação foi realizada uma coluna cromatográfica em sephadex LH20 com eluente metanol, com parte do produto obtido, para a confirmação da pureza. Uma porção razoável do composto aplicado na coluna ficou retida, impossibilitando sua extração. Este comportamento foi observado para os dois compostos sintetizados. Este não é o perfil esperado para uma porfirina tetracatiônica, este comportamento atípico é devido à menor hidrofobicidade destes composto comparado as suas análogas tetra-alquiladas.

4.3 ESPECTROSCOPIA UV-VIS

Os máximos de absorção dos espectros eletrônicos são mostrados nas tabelas II e III, e a figura 32 representa o perfil espectral típico da base livre e do respectivo complexo de Zinco(II) das porfirinas catiônicas investigadas.

Tabela II. Absortividades molares (ϵ) e máximos de absorção (λ_{max}) das porfirinas bases livres em meio de tampão fosfato.

Porfirina		B(0,0)	Qy(1,0)	Qy(0,0)	Qx(1,0)	Qx(0,0)
TMPyP	λ (nm)	421	517	555	583	641
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	241	16,1	5,90	6,96	1,60
TbzPyP	λ (nm)	425	520	556	586	641
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	191	13,1	5,55	6,02	1,32
TmeOBzPyP	λ (nm)	424	520	556	585	640
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	240	17,7	8,37	8,97	2,48
TNO₂BzPyP	λ (nm)	428	522	559	586	642
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	176	13,5	5,80	6,00	1,00
TbrBzPyP	λ (nm)	426	520	556	586	642
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	173	15,2	7,39	7,52	2,26
TCH₃BzPyP	λ (nm)	425	520	556	585	640
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	204	16,3	7,54	7,86	1,83
TclBzPyP	λ (nm)	425	520	556	585	640
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	165	12,6	6,11	6,24	1,99
TCO₂BzPyP	λ (nm)	426	520	555	585	642
	ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	-	-	-	-	-

Tabela III. Máximos de absorção para as Zn(II)porfirinas benzilpiridínio substituídas em tampão fosfato.

Porfirina	Soret (nm)	Q _y (1,0) (nm)	Q _y (0,0) (nm)
ZnTMPyP	436	563	607
ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	191	-	-
ZnTBzPyP	440	565	607
ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	141	-	-
ZnTNO ₂ BzPyP	444	567	610
ϵ ($10^3 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{dm}^3$)	200	-	-
ZnTMeOBzPyP	440	566	609
ZnTBrBzPyP	443	567	611

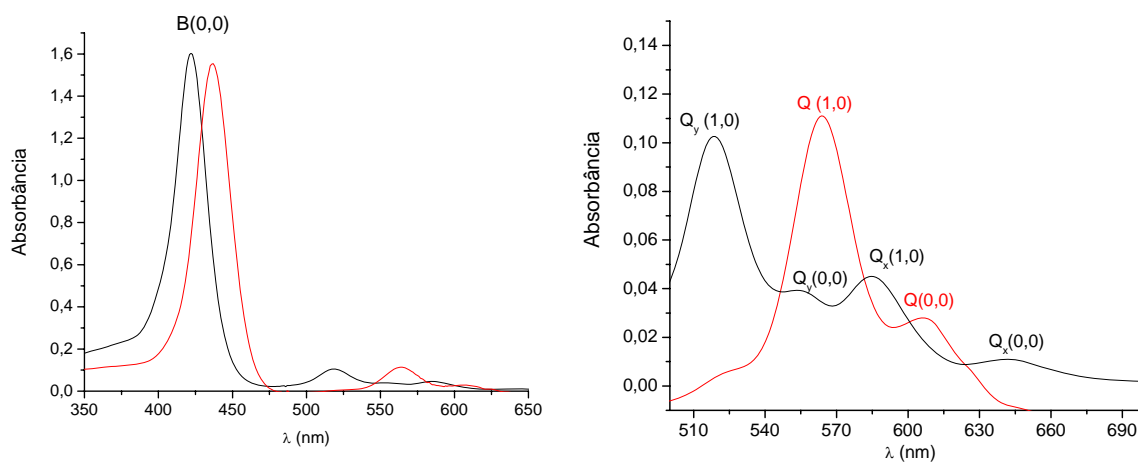


Figura 32. Espectros Eletrônicos Qualitativos da (—) TMPyP e da (—) ZnTMPyP em solução tampão pH 7,4.

As porfirinas simétricas *meso* substituídas como por exemplo a TPP (tetrafenilporfirina) e a TPyP (tetrapiridilporfirina) apresentam espectro do tipo *etio*, que é caracterizado pelas intensidades relativas das bandas Q na ordem: $Q_y(1,0) > Q_y(0,0) > Q_x(1,0) > Q_x(0,0)$. Os derivados catiônicos investigados, por sua

vez apresentam espectro em meio aquoso do tipo *phyllo*, no qual as interações relativas das bandas Q são, $Q_y(1,0) > Q_x(1,0) > Q_y(0,0) > Q_x(0,0)$. A figura 33 representa os perfis espectrais encontrados das bandas Q de porfirinas na forma base livre.

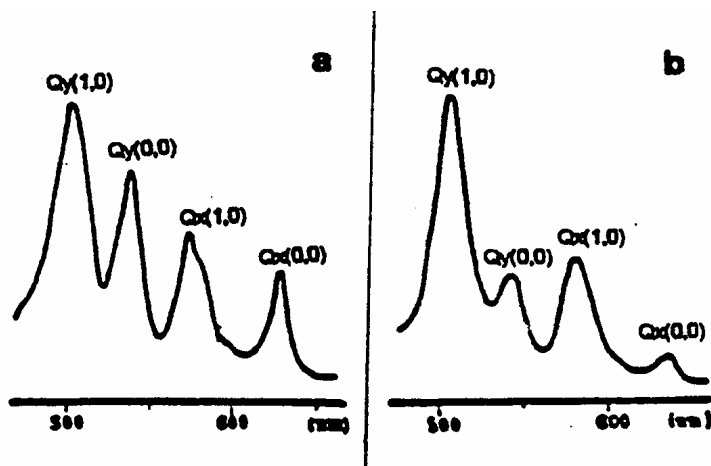


Figura 33. Exemplos de espectros tipo: a- etio e b- phyllo.

O espectro do tipo *phyllo* encontrado nestas porfirinas ao invés do tipo *ethio* que é o esperado, deve ser uma consequência da natureza elétron-aceptora dos grupos piridínio presentes nas posições *meso*. Na discussão dos espectros de emissão o papel destes grupos nos níveis de energia da molécula será discutido de forma mais detalhada.

Um aspecto interessante, porém de difícil interpretação, relaciona-se com o comportamento da posição dos máximos de absorção em função dos substituintes alquílicos presentes nestes compostos. Um primeiro ponto que deve ser mencionado é que a posição dos máximos de absorção da TMPyP é mais deslocados para o vermelho do que uma série de outras porfirinas aquosolúveis como as aniônicas TPPS e TCPP e a catiônica TMAPP, que apresentam máximos de absorção mais próximos da TPP (neutra).

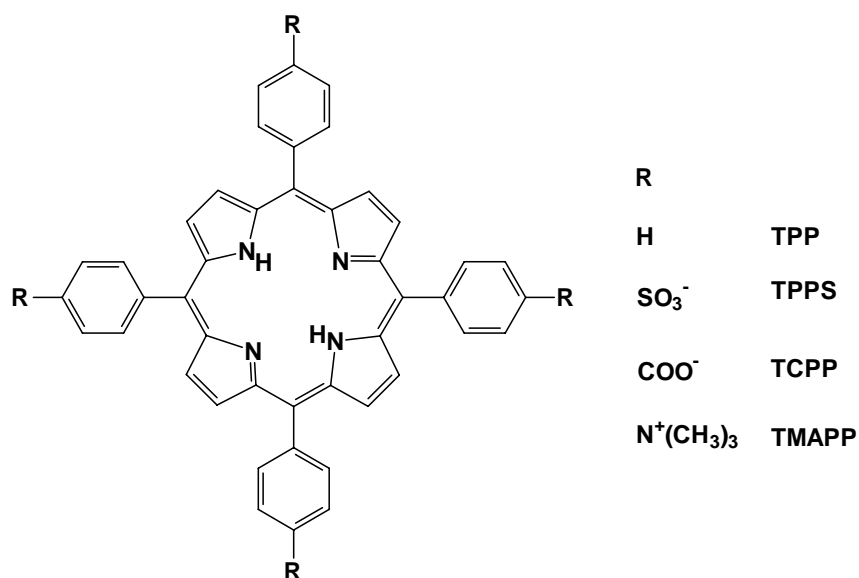
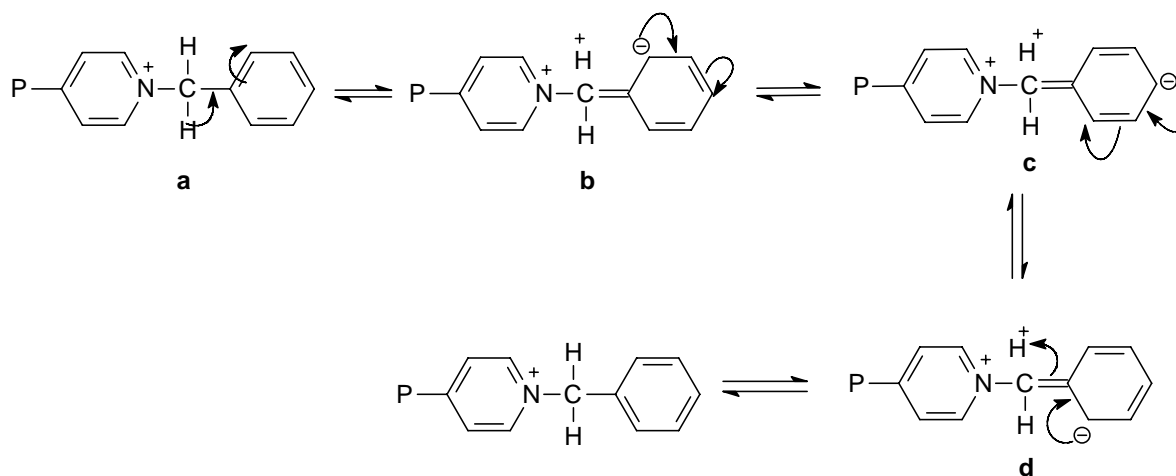


Figura 34. Estrutura da TPP e de algumas porfirinas aquossolúveis

Estes deslocamentos batocrômicos observados na TMPyP podem ser atribuídos ao efeito das cargas positivas dos grupos piridínios que originam uma expansão do sistema π do macrociclo porfirínico, diferentemente do que ocorre com as porfirinas fenil substituídas com grupos polares, até mesmo no caso da TMAPP também catiônica⁹⁴.

Como pode ser observado na Tabela II existe um deslocamento batocrômico de 4 nm na posição do máximo da banda Soret da TBzPyP em relação à TMPyP, portanto a substituição dos grupos metil por grupos benzil resulta em uma alteração dos máximos de absorção da banda Soret o mesmo ocorrendo com as bandas Q, porém os deslocamentos são menores. Quando comparamos a posição do máximo de absorção da banda Soret da TMPyP com as porfirinas que apresentam substituintes no grupo benzila observamos dois comportamentos distintos: aquelas que apresentam substituintes com características elétron-doadoras como é o caso da TMeOBzPyP, que apresentam máximos praticamente idênticos ao da TBzPyP e das que apresentam grupos elétron-aceptores como é o caso da TNO₂BzPyP que apresenta deslocamentos batocrômicos mais acentuados que os da TBzPyP.

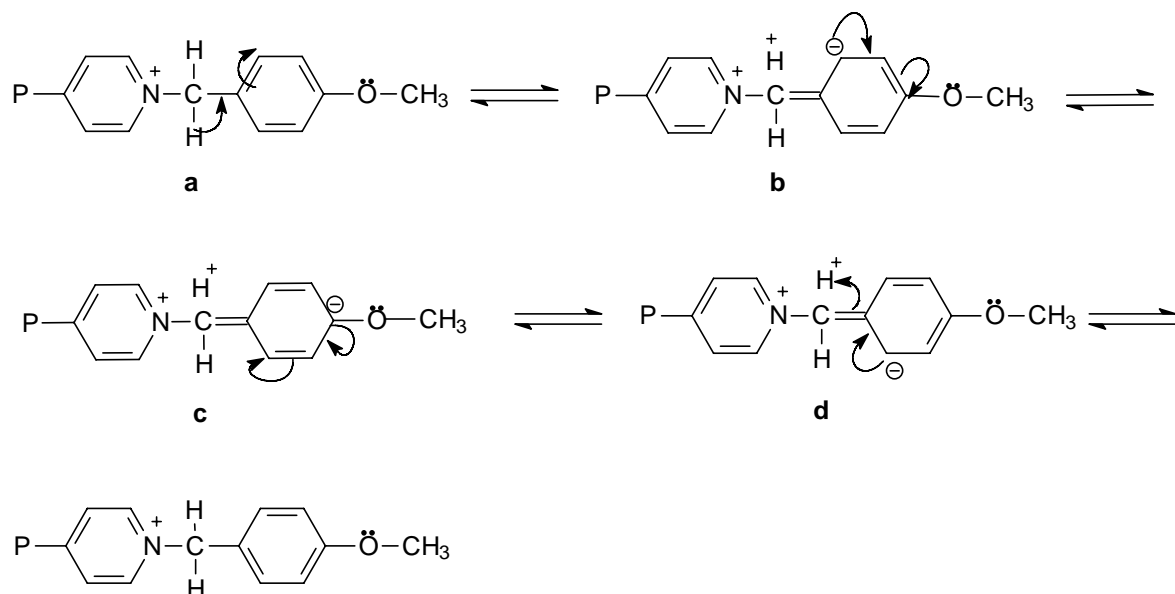
Este comportamento pode, à princípio, ser racionalizado analisando-se as estruturas de ressonância originadas pela hiperconjugação em cada derivado.



esquema i: estruturas de ressonância originadas da hiperconjugação do grupo benzil

Como pode ser observado no esquema acima a hiperconjugação no substituinte benzila se dá pela participação do grupo CH₂ que se encontra na posição α em relação ao anel benzênico e quando isto ocorre forma-se formalmente um próton associado à estrutura, que então aumenta a densidade de carga positiva, o que favoreceria a expansão do sistema π da porfirina resultando no deslocamento batocrômico observado.

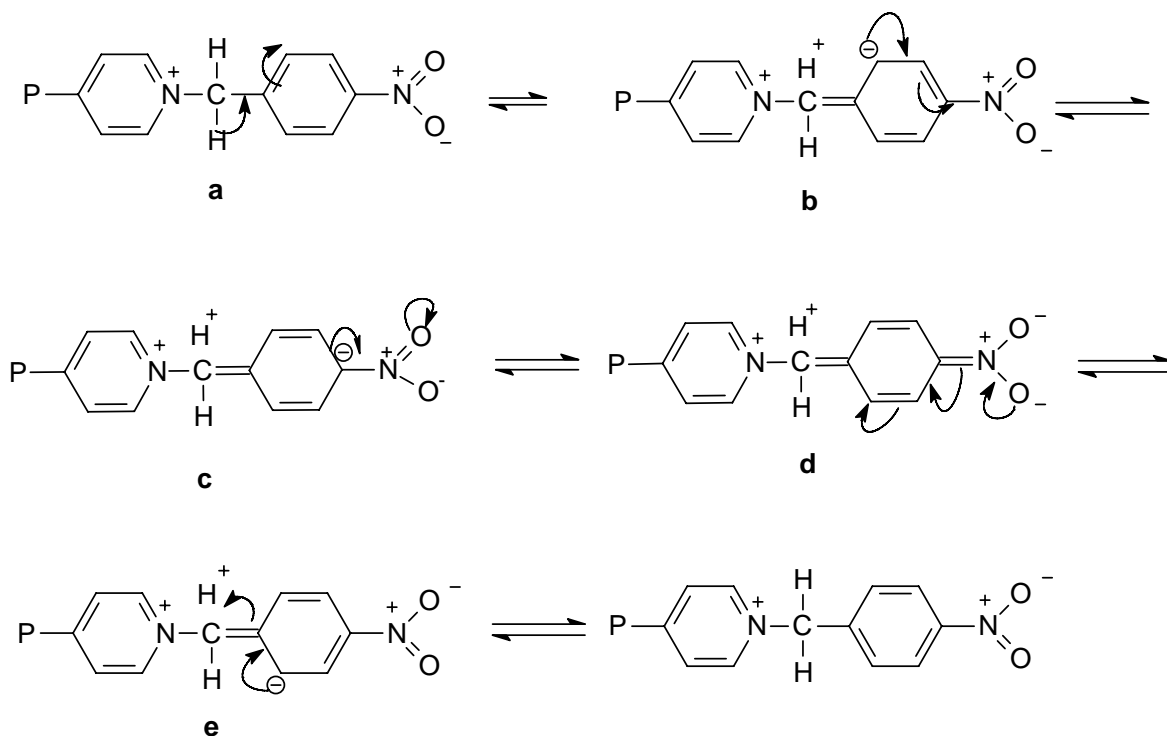
As porfirinas com grupos elétron-doadores não apresentariam estruturas de ressonância devidas à hiperconjugação significativamente diferentes das apresentadas pelo grupo benzílico:



esquema ii: estruturas de ressonância originadas da hiperconjugação do grupo metóxi-benzil

A presença dos grupos elétron-doadores não favoreceriam a estabilização da carga negativa em ressonância no anel benzênico, e os pares de elétrons no oxigênio do grupo O-CH₃ também não favoreceriam a deslocalização de carga para o resíduo metóxi à partir da estrutura de ressonância **c**.

A hiperconjugação quando o substituinte alquílico é o grupo nitrobenzila, por sua vez, origina estruturas de ressonância adicionais e como pode ser observado no esquema abaixo a carga negativa é transmitida para o substituinte NO₂ aumentando a separação de carga (vide estruturas de ressonância **c** e **d**).



esquema iii: estruturas de ressonância originadas da hiperconjugação do grupo nitrobenzil

Desta forma a densidade de carga positiva δ^+ é maior quando o substituinte na posição 4-benzílica é um grupo aceptor de elétrons e praticamente igual quando é o hidrogênio ou um grupo com características doadoras de elétrons.

4.4 RMN - ^1H

A tabela IV apresenta os deslocamentos químicos e as atribuições para os prótons das moléculas sintetizadas, apresentados na figura 35.

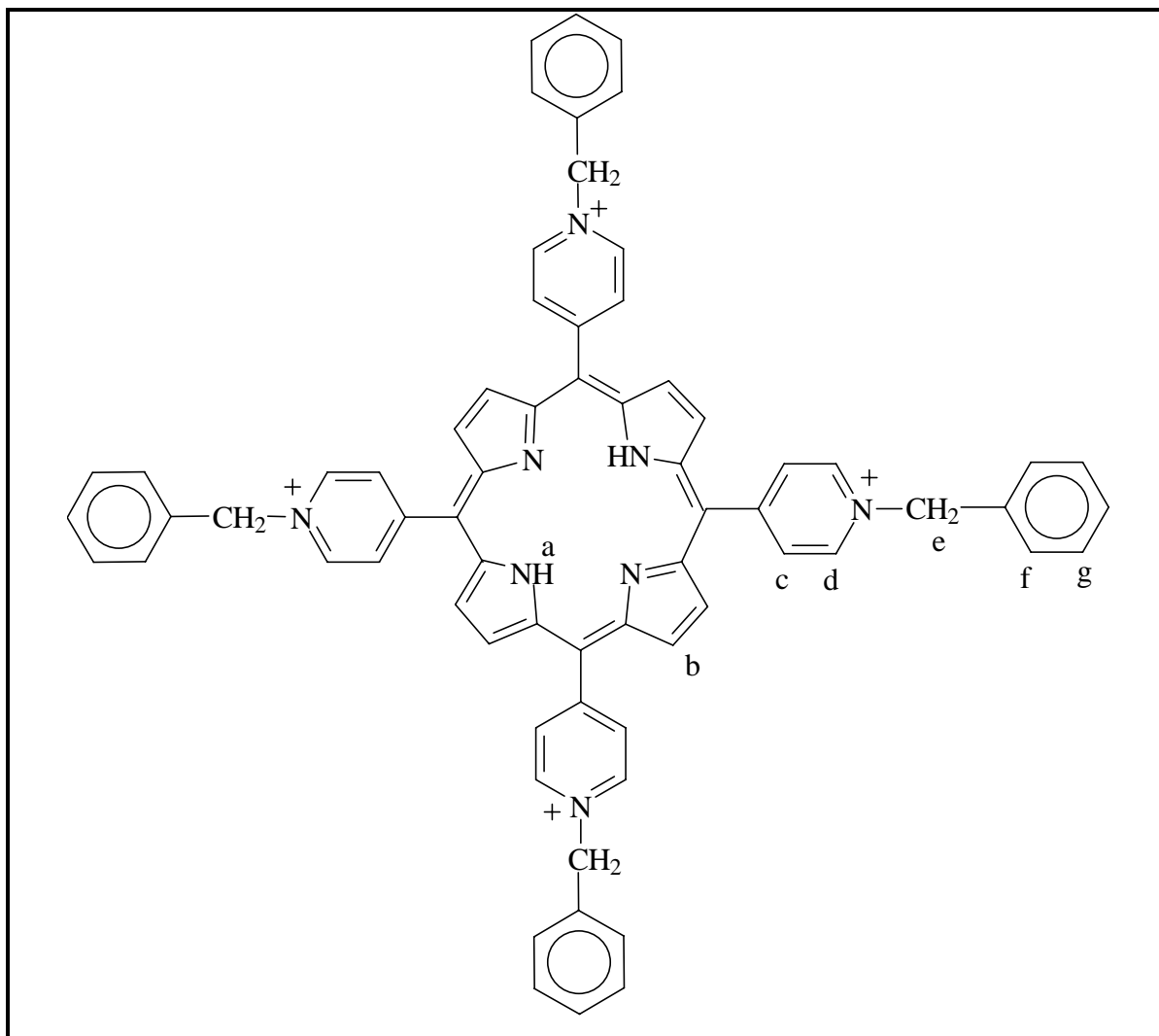


Figura 35. Estrutura das porfirinas sintetizadas: Identificação dos prótons atribuídos por RMN - ^1H .

Tabela IV. Atribuições de RMN - ¹H

Porfirina	a	b	c	d	E	f	G
	(δ ppm)	(δ ppm)	(δ ppm)	(δ ppm)	(δ ppm)	(δ ppm)	(δ ppm)
TbzPyP	-3.12 s	9.21 s	9.02 d	9.68d	6.25 s	7.88 d	7.59 m
TMeOBzPyP ¹	-3.13 s	9.17 s	9.02 d	9.66 d	6.17d	7.86 d	7.19 d
TNO ₂ BzPyP	-3.10 s	9.27 s	9.07 d	9.76 d	6.43 s	8.17 d	8.49 d
ZnTMPyP ²	---	9.00 s	8.84 d	9.43 d	---	---	---
ZnTBzPyP	---	9.03 s	8.90 d	9.59 d	6.21 s	7.90 d	7.63m
ZnTMeO ³ BzPyP	---	8.97 s	8.89 d	9.56 d	6.15 s	7.91 d	7.18 d
ZnTNO ₂ BzPyP	---	9.06 s	8.96 d	9.69 d	6.43 s	8.49 d	8.15 d

s- singlete, d - duplete, m - multiplete; solvente: dmso - d₆.

Para a porfirina TMeOBzPyP e TCH₃BzPyP, temos um pico adicional. Apresentados a seguir: δ CH₃= 4.70 ppm, δ OCH₃= 3,85 ppm

Contrariamente ao espectro eletrônico, onde não são observados grandes diferenças nas posições dos máximos de absorção, os espectros de RMN - ¹H revelam que o efeito do substituinte presente no resíduo benzílico, reflete-se em todo o conjunto de prótons da molécula, e é proporcional ao efeito eletrônico exercido pelo substituinte.

Os sinais dos prótons representados pela letra **g** na figura 35, aparecem como um multiplete para a TBzPyP e para seu respectivo zinco complexo, uma vez que, para este caso, o substituinte R é um hidrogênio. Na figura 36 está apresentado o espectro de RMN-¹H da porfirina TBzPyP. Para os derivados TMeOBzPyP e TNO₂BzPyP e seus respectivos zinco complexos substituídos, este sinal aparece como um dublete, uma vez que o hidrogênio foi substituído pelos grupos nitro e metóxi.

Observando os dados a tabela IV, pode-se dizer que a inserção do metal no macrociclo faz desaparecer o sinal correspondente aos prótons internos, uma vez que os mesmos são substituídos pelo metal. Nota-se também que a inserção do metal desloca os sinais dos prótons **b**, **c** e **d** para campo alto, devido à diminuição da corrente no anel do macrociclo porfirínico. Pode-se observar que os sinais referentes aos prótons benzílicos não sofrem influência do metal.

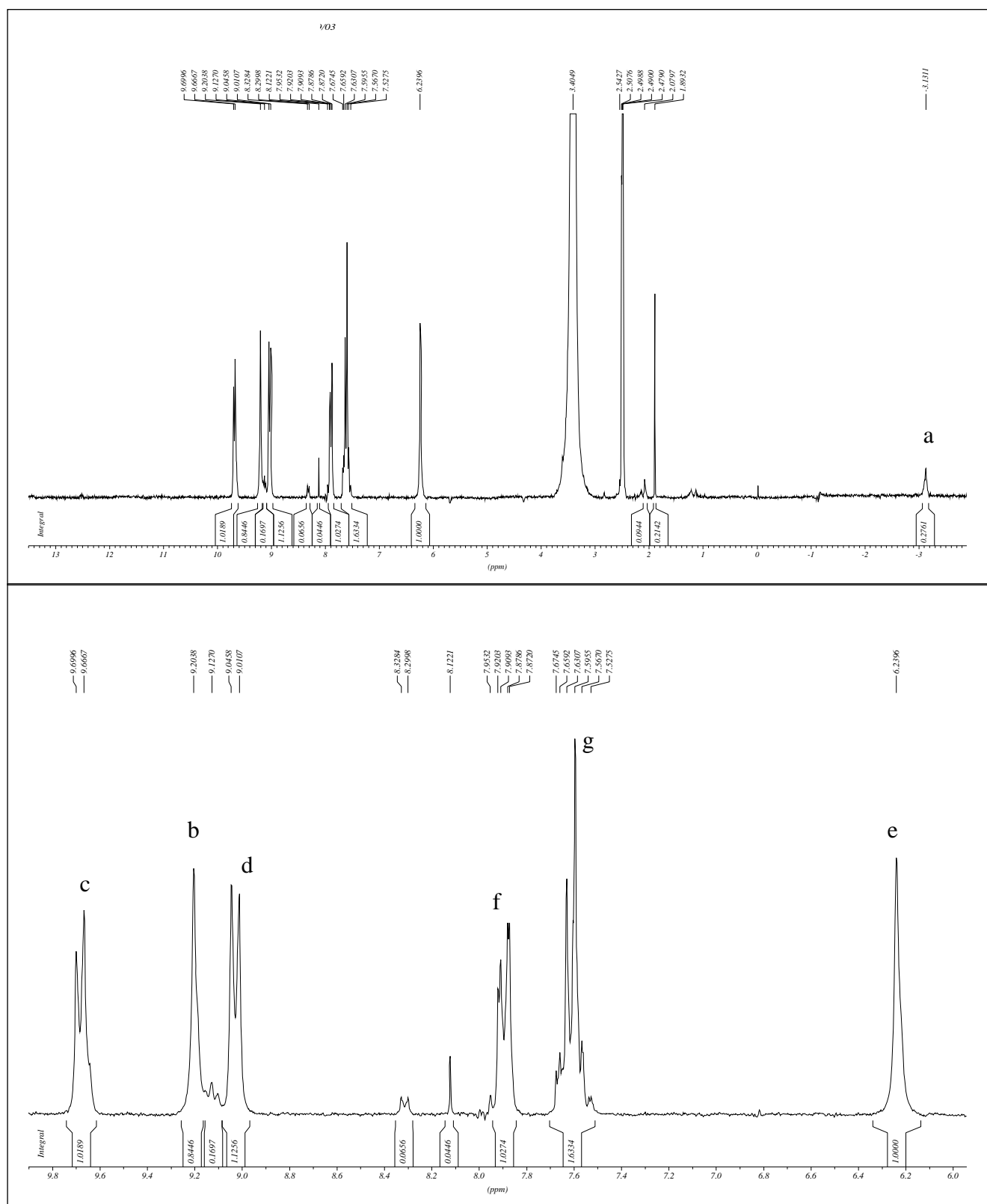


Figura 36. Espectro de RMN H^1 da porfirina TBzPyP em solvente $DMSO-d_6$, representando os picos descritos anteriormente.

4.5 EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DAS PORFIRINAS

Similarmente ao que ocorre com os espectros de absorção, os espectros de emissão das porfirinas catiônicas piridínio-substituídas são atípicos, e como pode ser observado nas figuras 37 e 38 não apresentam uma resolução das bandas Q(0,0) e Q(0,1). As respectivas zinco-porfirinas apresentam uma melhor resolução, entretanto esta resolução é significativamente menor que a apresentada por outras bases livres e zinco-porfirinas *meso*-substituídas, como por exemplo, a ZnTPPS (figura 39).

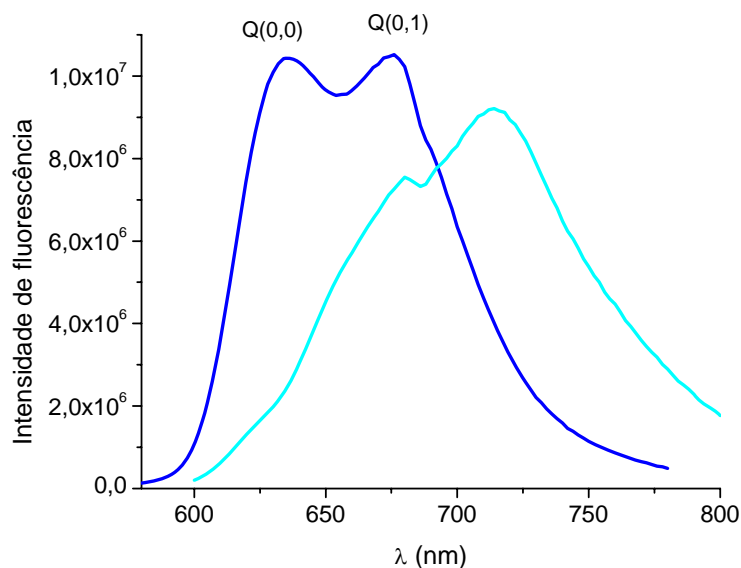


Figura 37. Espectros de emissão das porfirinas TMPyP (—) e ZnTMPyP (—), em solução tampão pH 7,4 e concentração de porfirina $3 (\pm 0,5) \times 10^{-6}$ mol/L.

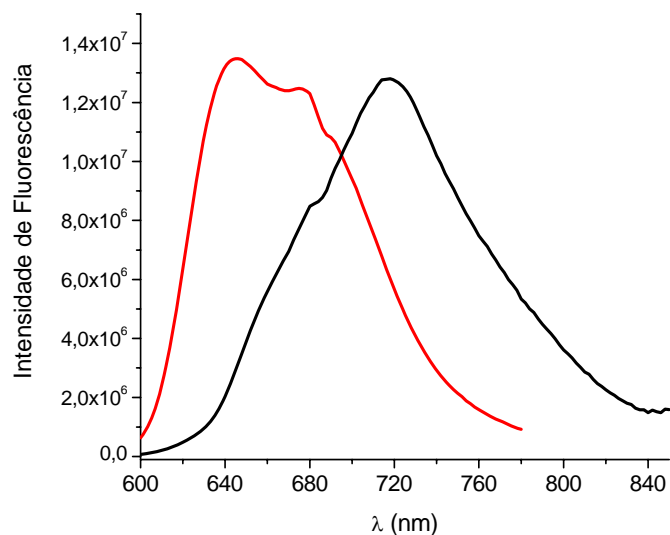


Figura 38. Espectros de emissão das porfirina TBrBzPyP (—) , ZnTBrBzPyP (—), em solução tampão pH 7,4 e concentração de porfirina $3 (\pm 0,5) \times 10^{-6}$ mol/L.

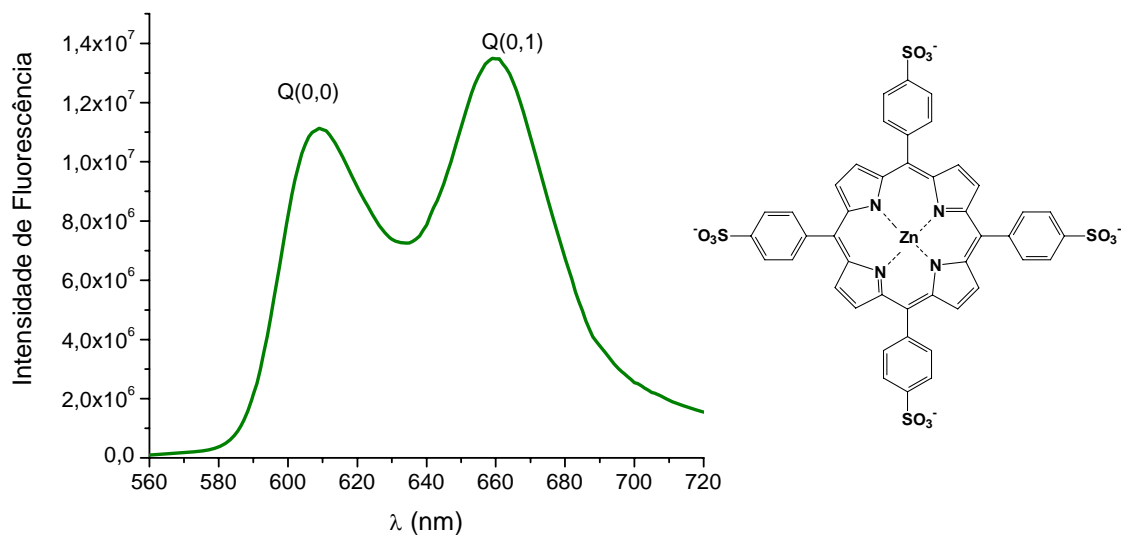


Figura 39. Espectros de emissão da porfirina ZnTPPS (—), em solução tampão pH 7,4 e concentração de porfirina $3 (\pm 0,5) \times 10^{-6}$ mol/L.

A baixa resolução dos espectros de fluorescência da TMPyP foi inicialmente atribuída à existência de dímeros em solução aquosa mesmo em concentrações da ordem de micromolar desta porfirina. Esta suposição foi defendida e confrontada

por diversos autores inclusive por nossos estudos anteriores da emissão desta classe de porfirinas⁹⁵, sendo que esta controvérsia persistiu por mais de 15 anos até a proposição de Vergeldt e colaboradores⁹⁶, do efeito dos *meso*-piridínios nos níveis de energia da TMPyP. Um apanhado destas discussões que envolveram os defensores da existência de monômeros e dímeros é descrita por Kano⁹⁷, que era um defensor da dimerização e reconheceu que na verdade a dimerização só ocorre em condições especiais e para alguns derivados catiônicos menos carregados.

A baixa resolução das transições Q(0,0) e Q(0,1) observada nos espectros da TMPyP é devida a presença dos grupos piridínicos nestas moléculas, que possuem características elétron-aceptoras. A presença destes grupos origina um estado de transferência de carga com energia muito próximo ao do primeiro estado excitado singlete destas porfirinas (S_1) que resulta em uma mistura destes dois estados de energia (transferência de carga e S_1). A proximidade energética entre estes dois estados energéticos na molécula depende principalmente da polaridade do solvente e do grau de rotação dos grupos piridínicos ligados na posição *meso* das porfirinas. Quanto menor for a polaridade do solvente e menor for a coplanaridade dos *meso* substituintes em relação ao anel porfirínico, maior será o distanciamento entre o estado de transferência de carga e o estado S_1 . Conseqüentemente, a mistura dos estados é menor e a resolução das transições se torna mais acentuada. Estes dois fatores, polaridade do solvente e rotação do solvente são verificados experimentalmente. Observa-se uma maior resolução das transições Q(0,0) e Q(0,1) em solventes menos polares que a água, como por exemplo, metanol e acetona, como exemplificado na Figura 40 pelo espectro de emissão da TMPyP em metanol.

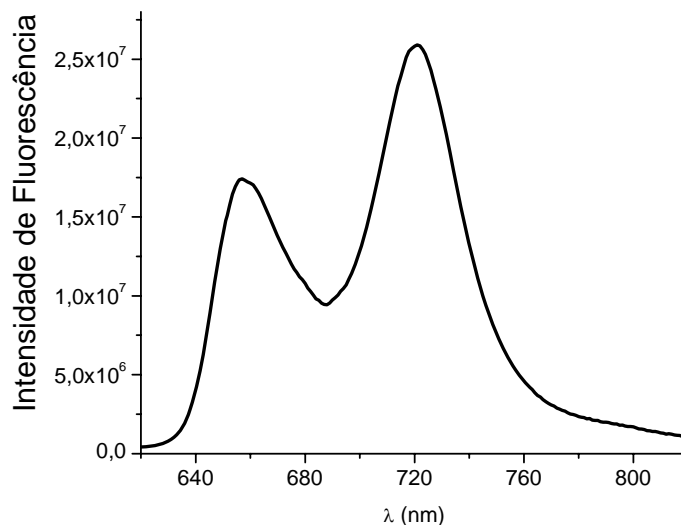


Figura 40. Espectro de emissão de fluorescência da porfirina TMPyP em metanol.

A questão da influência da rotação dos piridínios em relação ao macrociclo porfirínico, foi verificada tanto através de cálculos de modelagem molecular, e experimentalmente pode ser inferida através do estudo de um isômero da TMPyP, em que o nitrogênio da piridina ocupa a posição 2. Neste caso não existe a possibilidade de rotação dos piridínios devido ao impedimento estérico entre o grupo metila e os hidrogênios pirrólicos como pode ser observado abaixo, sendo que este isômero apresenta uma boa resolução das transições Q(0,0) e Q(0,1) em água.

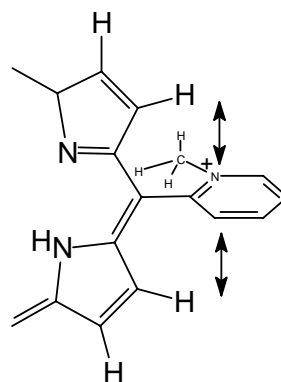


Figura 41. Disposição não coplanar entre o grupo 2-piridínio e o macrociclo da porfirina.

Estas considerações relacionadas aos espectros de emissão da TMPyP podem ser estendidas aos derivados catiônicos que possuem grupos benzílicos. Para todos os derivados benzílicos investigados não é observada uma resolução nos espectros de fluorescência, sendo observada uma melhoria na resolução quando o espectro é obtido em solventes menos polares que a água e também a baixa temperatura (77K) em estado vítreo quando a rotação dos meso-benzilpiridínios fica restrita.

A ZnTMPyP apresenta uma melhor resolução em relação à correspondente base livre TMPyP, porém uma menor resolução do que a esperada para uma metaloporfirina contendo um metal de transição de camada preenchida. Estas características do espectro de emissão da ZnTMPyP não têm sido abordadas na literatura apesar de sua grande importância como fotossensibilizador em sistemas homogêneos e microheterogêneos de conversão de energia⁹⁸. A melhor resolução da ZnTMPyP em relação à TMPyP provavelmente é devida a uma alteração da energia do sistema π do macrociclo porfirínico devido à presença do íon Zn(II) coordenado. Fica claro pelo espectro de absorção que a energia das bandas Q das duas porfirinas é diferente, sendo a energia destas transições maior no caso da ZnTMPyP. Conclusão semelhante pode ser obtida analisando os máximos de emissão da ZnTMPyP que são mais deslocados para o azul do que os respectivos máximos da TMPyP. Este aumento de energia do estado S_1 origina um distanciamento do estado de transferência de carga minimizando a mistura entre os estados, o que resulta em uma melhor resolução do espectro de emissão.

Observa-se que de forma geral os espectros de emissão tanto das bases livres como dos complexos de Zn(II) das porfirinas catiônicas benzílicas, apresentam uma menor resolução dos espectros de emissão que as correspondentes TMPyP e ZnTMPyP, vide figuras 37 e 38. Estes resultados são indicativos de que os substituintes benzílicos devem estabilizar o estado de transferência de carga dos piridínios, originando um maior mistura entre o estado S_1 e o estado de transferência de carga.

Os rendimentos quânticos de emissão tanto das bases livres como dos complexos de Zn(II) não são significativamente diferentes da TMPyP e ZnTMPyP, sendo da ordem de 0,03 e 0,025 respectivamente para as bases livres e Zn-porfirinas em água.

4.6 INTERAÇÃO PORFIRINA-MELANINA

Apesar de terem sido sintetizados uma série de compostos, apenas alguns com características mais representativas foram investigados quanto a sua interação com a eumelanina. Os resultados serão apresentados, pelos estudos de espectroscopia eletrônica Uv-Vis e pelos estudos de emissão de fluorescência.

4.6.1 Espectroscopia Eletrônica de Absorção

O espectro de absorção eletrônica da melanina apresenta absorção em praticamente toda a região UV-vis. O polímero obtido pela auto oxidação da L-dopa possui um espectro sem estrutura definida, sendo que esta banda tem uma intensidade de absorção maior na região UV^{38,99}.

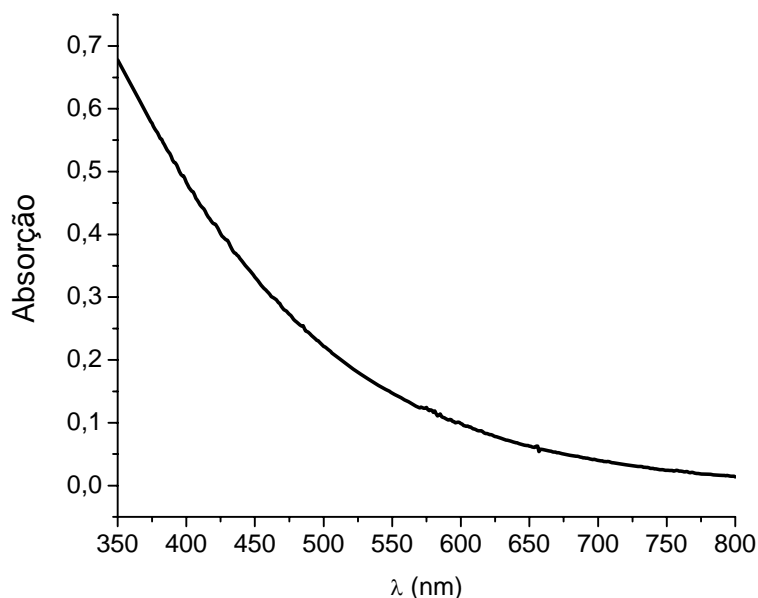


Figura 42. Espectro de absorção da melanina em solução tampão pH 7,4 e concentração $4,43 \cdot 10^{-2} \text{ mg.mL}^{-1}$.

A interação entre a porfirina e a eumelanina muda o espectro de absorção da porfirina. De um modo geral, a interação da eumelanina com as porfirinas estudadas causa um deslocamento para o vermelho, uma redução da intensidade de absorção e um alargamento das bandas.

A análise das variações espectrais no espectro de absorção da porfirina em função do aumento da concentração de melanina é dificultada, uma vez que a eumelanina absorve em toda a região do visível, originando uma sobreposição espectral entre as duas espécies em solução. A Figura 43 mostra as variações espectrais obtidas durante a titulação da TBzPyP com eumelanina, ficando evidente que a partir de um determinado ponto a alta absorção da melanina resulta em uma absorção de fundo que impede uma análise clara das alterações que ocorrem nas bandas de absorção da porfirina. Em virtude da alta absorção da eumelanina e da sobreposição espectral, as variações no espectro de absorção da porfirina foram obtidas pela subtração da contribuição espectral da eumelanina do espectro total, para cada alíquota de melanina adicionada. Desta forma, tem-se apenas a variação espectral da porfirina para cada novo incremento da

concentração de eumelanina em cada adição durante a titulação. Na figura 44 temos as variações espectrais da melanina em função da concentração.

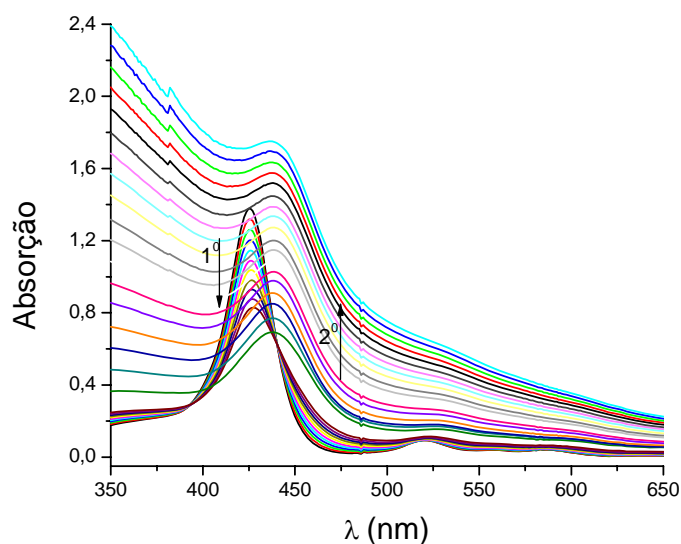


Figura 43. Titulação espectrofotométrica da porfirina TBzPyP através da adição de melanina, espectro sobreposto porfirina-melanina em solução tampão pH 7,4.

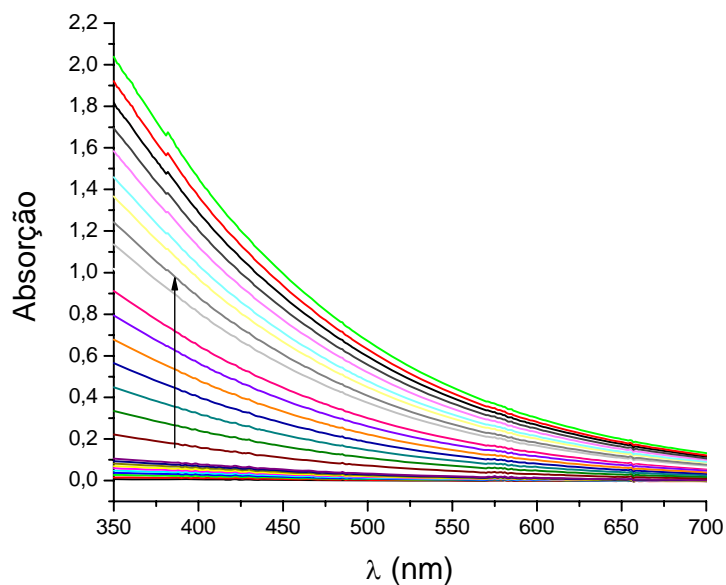


Figura 44. Espectro de absorção da melanina utilizado para subtração nos experimentos de absorção, em solução tampão pH 7,4. Aumento da absorção com o aumento da concentração de melanina.

Na figura 45 temos o espectro da TBzPyP após a subtração do espectro de absorção da eumelanina. Através destes espectros é possível verificar a real alteração no espectro da porfirina. Como podemos observar na Figura 46 temos três situações distintas em função da concentração de eumelanina:

- À medida que aumenta a concentração de eumelanina, até $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ observa-se uma diminuição da intensidade da banda Soret, sem alteração da posição do máximo de absorção. As bandas Q, particularmente a banda $Q_y(1,0)$, aumentam as suas intensidades de absorção com um ligeiro deslocamento batocrômico de aproximadamente 5 nm. É também observado um ponto isobéstico em 442 nm.
- A partir de $4,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ temos uma situação de transição em que ocorre uma diminuição mais acentuada da intensidade da banda Soret e um deslocamento batocrômico de 12 nm.
- O aumento posterior da concentração de eumelanina resulta em um novo deslocamento para o vermelho, agora menos pronunciado (3 nm), e as variações de intensidade são muito pequenas para novas adições de melanina e a partir de $15 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ não ocorrem mais alterações tanto da intensidade de como na posição dos máximos de absorção. Nas bandas Q ocorre um ligeiro deslocamento de aproximadamente 4 nm e um pequeno aumento da absorção (figura 46b – linha vermelha do espectro).

O comportamento espectral descrito acima é similar para todos os derivados catiônicos investigados, tanto para as bases livres como para os complexos de zinco, sendo obviamente diferenciados os deslocamentos e as intensidades dos máximos de absorção para cada derivado porfirínico.

Analisando estas variações espectrais, observamos que existem dois tipos principais de interação neste sistema: primeiramente temos uma interação mais fraca (complexo fraco) para concentrações baixas de melanina que resulta na diminuição da intensidade da banda Soret sem deslocamento do máximo de absorção e depois temos a formação de um complexo mais forte entre a melanina e as porfirinas caracterizado por uma banda Soret de baixa intensidade, e de

máximo de absorção deslocado para o vermelho em relação à porfirina livre. Entre estas duas situações principais temos um estado de intermediário de difícil caracterização uma vez que ocorre para uma faixa muito estreita de variação de concentração de melanina. Um aspecto interessante é o fato de que na medida em que se forma o complexo fraco a intensidade de absorção da banda Soret diminui e a intensidade das bandas Q aumenta (se bem que não na mesma proporção), indicando provavelmente uma orientação definida na formação do complexo fraco e a existência de uma maior rigidez da porfirina devido à interação com a eumelanina. A existência de pontos isobésticos, também indica a formação de espécies bem definidas na formação de cada tipo de complexo.

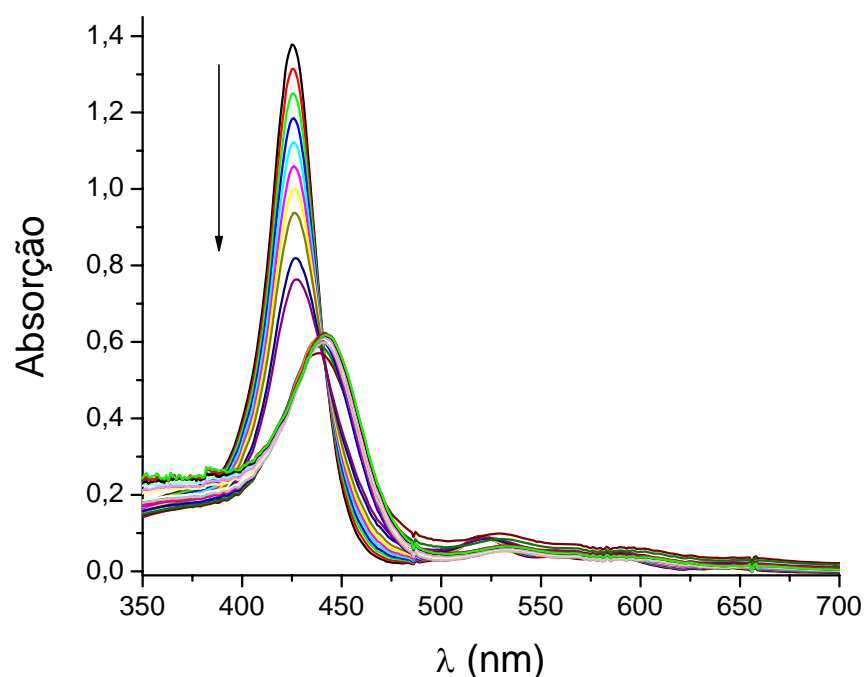


Figura 45. Titulação espectrofotométrica da porfirina TBzPyP através da adição de melanina, espectro subtraído. Experimento realizado em solução tampão pH 7,4 e concentração de porfirina $6 (\pm 2) \times 10^{-6}$ mol/L.

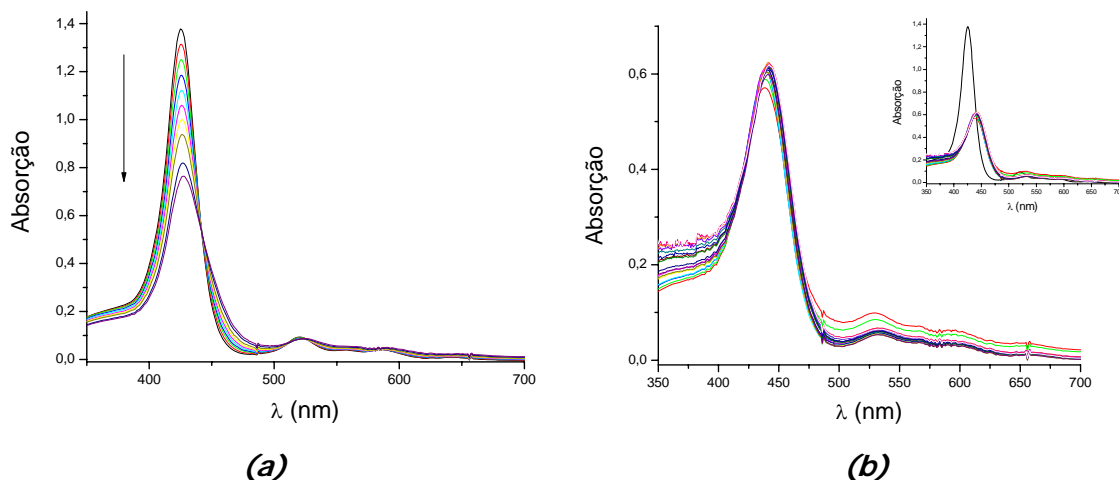


Figura 46. Titulação espectrofotométrica da porfirina TBzPyP através da adição de melanina: (a) primeira porção da titulação; (b) transição e concentrações mais elevadas de melanina, na figura inserida em (b) observamos o deslocamento do complexo formado pela comparação com o espectro inicial. Experimento realizado em solução tampão pH 7,4 e concentração de porfirina $6 (\pm 2) \times 10^6$ mol/L.

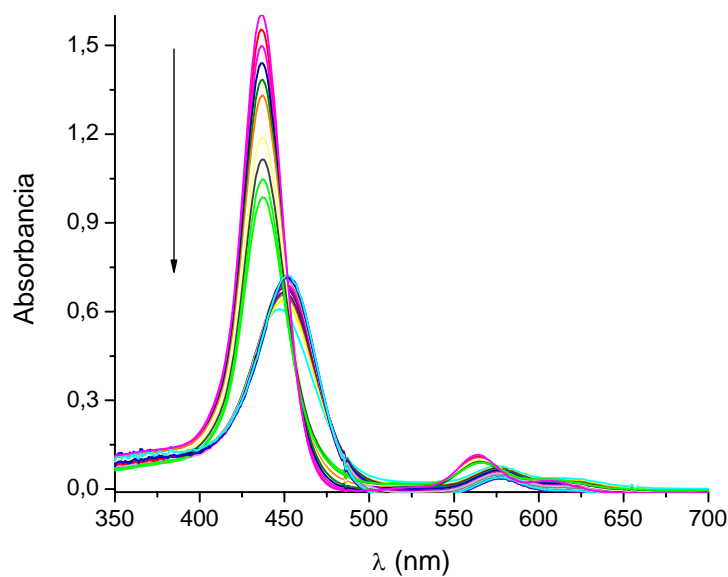


Figura 47. Titulação espectrofotométrica da porfirina ZnTMPyP através da adição de melanina, espectro subtraído. Experimento realizado em solução tampão pH 7,4 e concentração de porfirina $6 (\pm 2) \times 10^6$ mol/L.

A Tabela V apresenta os deslocamentos máximos observados na formação do complexo forte para cada derivado.

Tabela V. Deslocamentos encontrados nos espectros de absorção na interação porfirina-melanina na formação do complexo forte em solução aquosa.

Porfirina	Deslocamento
TMPyP	422 → 437
TBzPyP	425 → 442
TNO ₂ BzPyP	428 → 439
TBrBzPyP	426 → 442
ZnTMPyP	437 → 453
ZnTBrBzPyP	443 → 461
ZnTBzPyP	441 → 455
ZnTNO ₂ BzPyP	445 → 458

Uma maneira aproximada de quantificarmos esta interação é através da análise da variação das concentrações de porfirina ligada em função porfirina livre, pela construção de gráficos $C_b/C_f \times C_b$, onde C_b corresponde a concentração de porfirina ligada ao polímero e C_f é a porfirina livre. A concentração de porfirina ligada foi determinada pela variação de absorção da banda Soret, considerando que o complexo fraco não absorve nesta região.

Através deste método obtivemos uma aproximação dos valores das constantes de associação porfirina-melanina, no entanto não é o tratamento matemático adequado para tratamos os resultados obtidos, visto que neste procedimento o conjunto de dados obtidos não forma uma reta o que dificulta a análise destes pontos experimentais. Na literatura encontramos tratamentos similares, como por exemplo o trabalho realizado por Kozik que trata através deste

método a associação de melanina e riboflavina, porém com auxílio de programas matemáticos auxiliares.

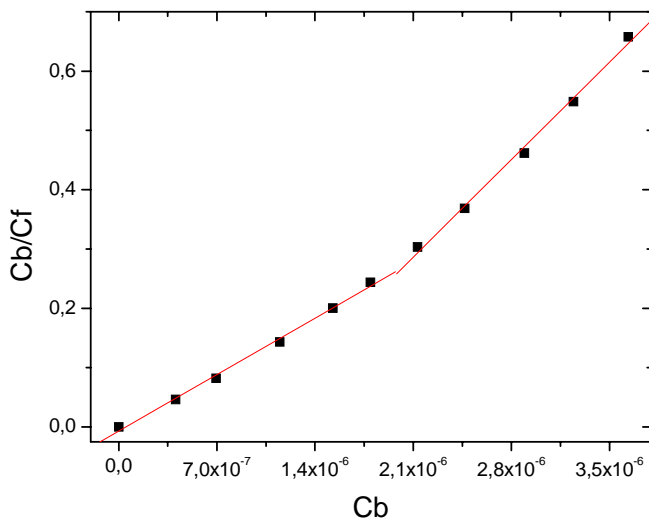


Figura 48. Gráfico da análise da variação da concentração de porfirina TNOBzPyP ligada, dividido pela concentração de porfirina livre em função da concentração de porfirina ligada.

Como podemos observar na figura 48 neste tratamento é possível visualizarmos dois segmentos de retas. Para a obtenção da constante aproximada foi utilizada a primeira porção, visto que esta apresentou melhor correlação para as porfirinas. Analisando os valores obtidos observamos que a porfirina que apresenta o maior valor de constante é a TBrBzPyP ($3,38 \times 10^5$ mol/L), valor este aproximadamente duas vezes maior que os valores encontrados para as porfirinas TBzPyP e a TNOBzPyP ($\approx 1,50 \times 10^5$ mol/L). Para a porfirina TMPyP a constante de associação encontrada foi de $2,3 \times 10^5$ mol/L. Todas as zinco porfirinas apresentaram valores muito próximos de associação ($\approx 1,40 \cdot 10^5$ mol/L). Estes valores encontrados são pouco confiáveis para fazermos uma análise das constantes de associação.

Com base nos resultados encontrados através deste método, e analisando a complexidade do sistema, estudamos vários outros métodos matemáticos para uma possível aplicação na avaliação da constante de associação através dos espectros de absorção, foram estes: Benesi-Hildebrand, Scott e Scatchard¹⁰⁰. Embora estes métodos sejam bastante utilizados, não foi possível a análise dos dados, visto que estes são particularmente adequados quando a estequiometria é 1:1, o que provavelmente não é encontrado em nosso sistema. A utilização destes métodos para outras estequiometrias na formação de complexos exige formulações mais elaboradas, porém é baseada na utilização de uma série de aproximações que nem sempre resultam em um resultado confiável. Abaixo estão representados os gráficos de alguns dos tratamentos utilizados para a determinação levando em consideração uma estequiometria 1:1, e que não apresentam um comportamento linear.

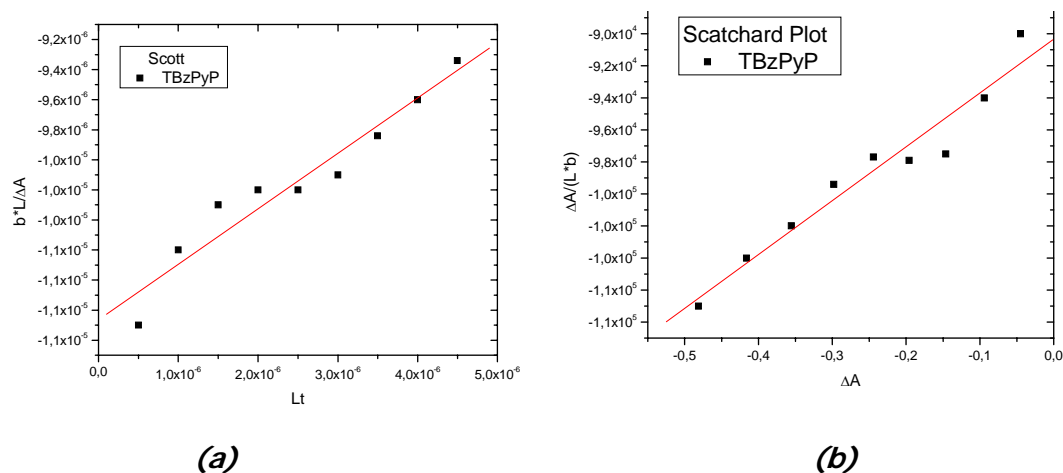


Figura 49. Gráfico do tratamento matemático da porfirina TBzPyP através da constante Scatchard Plot (a) e da constante Scott (b), em solução aquosa.

A determinação da constante de associação porfirina-melanina não é um procedimento fácil. A melanina é um polímero heterogêneo, o que possibilita a existência de mais de um sítio de ligação no polímero de melanina^{101,102}.



Onde M é a melanina, P é a porfirina, n é o número de sítios de ligação existente no polímero e MP_n é o complexo formado.

Além dos métodos mencionados acima para o tratamento dos dados, também analisamos o programa LIGAND desenvolvido por Munson¹⁰³, uma vez que este programa possibilita a análise de regressões não lineares. Porém concluímos que este não era o método adequado para o nosso sistema, visto que não possuíamos os todos os dados necessários para a utilização do referido programa.

4.6.2 ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA DE EMISSÃO

As propriedades de emissão de fluorescência das porfirinas investigadas neste estudo são influenciadas pela presença de eumelanina em solução. Observa-se tanto para as bases livres como para os metalocomplexos de zinco uma supressão da fluorescência em função do aumento da concentração de eumelanina. De forma geral não foram observadas alterações significativas dos máximos de emissão dos compostos porfirínicos na presença da melanina. As titulações fluorimétricas foram realizadas de tal forma a evitar efeito de filtro interno devido ao aumento da concentração da melanina utilizando-se a geometria "front-face", e para evitar erros na quantidade de luz de excitação efetivamente absorvida em cada ponto da titulação devido à variação espectral proveniente da formação dos complexos eumelanina-porfirina, cada amostra foi excitada no comprimento de onda do respectivo ponto isobéstico (tabela V).

Uma vez que ocorre a supressão da fluorescência, que é função da concentração de eumelanina, foi investigado o provável processo de desativação

do estado excitado da porfirina, ou seja, se a supressão ocorre via difusão, um mecanismo estático ou pelo modelo de esfera de ação.

Na figura 50 temos as variações das intensidades de emissão da porfirina TBzPyP com o aumento da concentração de melanina em solução tampão 7,4.

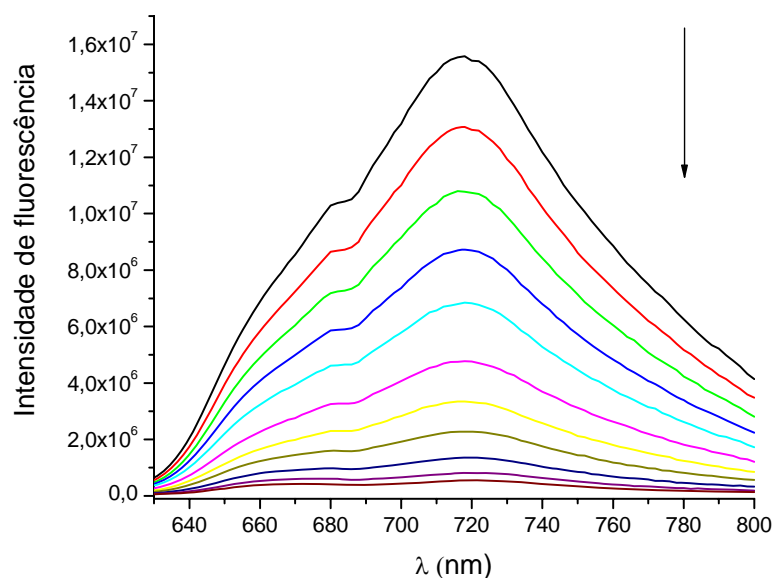


Figura 50. Variação da intensidade de fluorescência da porfirina TBzPyP com o aumento da concentração de melanina em solução tampão pH 7,4.

A Figura 51 representa um gráfico de Stern-Volmer para a supressão de fluorescência da TBzPyP, e como pode ser observado, a curva não é linear, sendo observado um desvio da linearidade mesmo para concentrações baixas de eumelanina. Comportamento similar foi observado para as demais porfirinas e zinco-porfirinas. Portanto, a supressão de fluorescência destes compostos porfirínicos pela eumelanina não ocorre tanto por um processo puramente difusional ou por um processo puramente estático, como poderia se esperar em função dos dados de espectroscopia de absorção discutidos no item anterior.

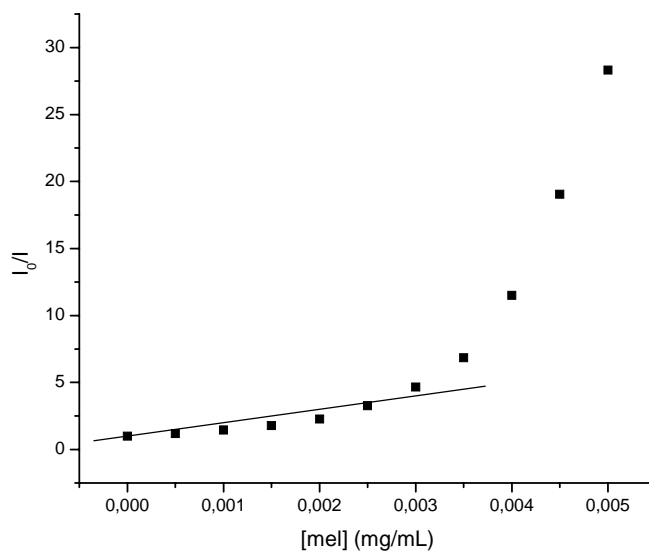


Figura 51. Gráfico do tratamento de Stern-Volmer da porfirina TBzPyP em tampão pH 7,4.

Desvios das curvas de Stern-Volmer de I_0/I em função da concentração do supressor normalmente são observados quando existe a combinação dos dois processos simultaneamente, ou seja, dinâmico e estático. Neste caso, uma curva

linear é esperada para $\frac{F_0}{F} - 1 = (K_{ap}) [Q]$.

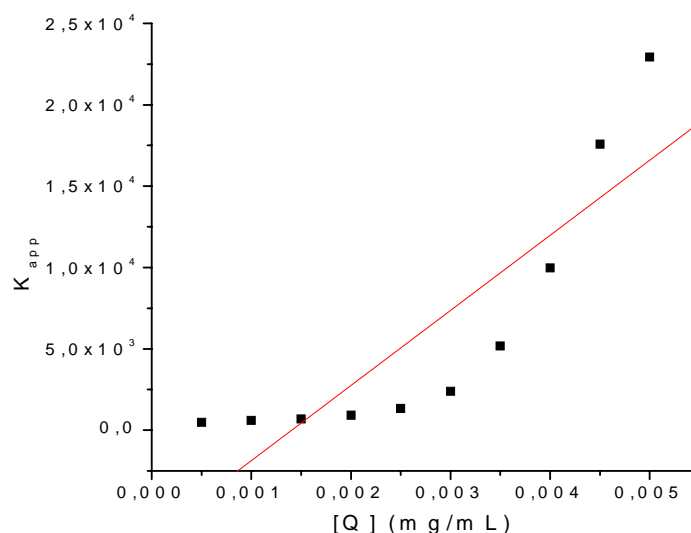


Figura 52. Gráfico da análise de supressão para constante de Stern-Volmer para um modelo dinâmico-estático simultâneo, para a porfirina TNO₂BzPyP em solução tampão pH 8.

Os resultados obtidos através do tratamento dos dados experimentais para a supressão dinâmica-estática simultânea também não apresentaram o comportamento linear esperado, indicando que a supressão simultânea pelos dois processos não ocorre.

Investigamos então o modelo de supressão por esfera de ação (*SEA*). Foram realizados dois procedimentos, um onde consideramos a existência da supressão dinâmica associada a *SEA* ($\frac{I_0}{I} = (1 + K_{SV}[Q])(e^{K_{EA}[Q]})$, eq. A) e considerando apenas a existência da *SEA* ($\frac{I_0}{I} = e^{K_{EA}[Q]}$, eq. B). A Figura 53 mostra as regressões exponenciais obtidas pela aplicação dos dois modelos. Observa-se que nos dois casos existe um pequeno desvio entre os dados experimentais (pontos negros) e a regressão exponencial (linha vermelha).

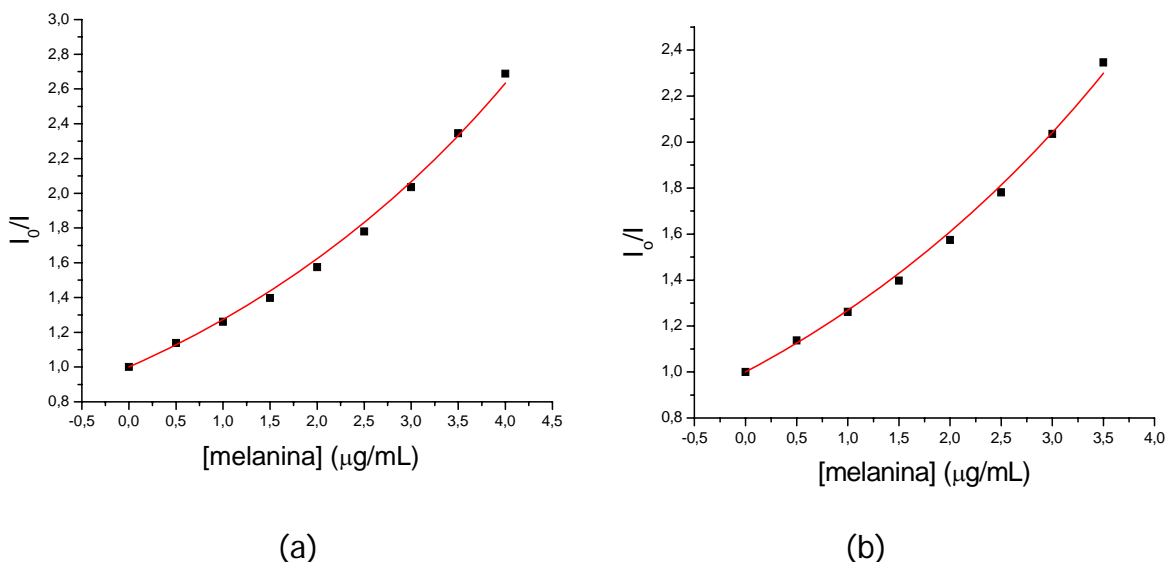


Figura 53. Análise para obtenção da supressão dinâmica associada a SEA (a) e considerando apenas a existência da SEA (b) para a porfirina TMPyP em pH 8,0.

Os valores de K_{SV} obtidos a partir das curvas de supressão dinâmica associada à SEA podem ser considerados iguais a zero, logo o primeiro termo da eq. A se anula e a expressão resultante é a eq. B. Este resultado é um indicativo de que o único processo que é efetivo na supressão é o SEA, não ocorrendo a supressão dinâmica concomitantemente à esfera de ação.

Portanto, no momento da excitação as moléculas de porfirina já se encontram a uma distância suficientemente próxima do polímero da eumelanina, resultando na supressão de fluorescência.

A interação entre as porfirinas catiônicas e a melanina apresenta um forte caráter iônico, uma vez que o polímero da melanina apresenta em sua estrutura uma série de grupos aniônicos como carboxilatos e fenolatos (vide figuras 9 e 10) distribuídos pelo polímero. Em solução este polímero não deve apresentar grandes distorções ("coiling") uma vez que a cadeia principal é formada pelas unidades dihidróxi-indólicas formadas por estruturas planares rígidas, portanto configurando uma estrutura de folhas com pouca distorção planar. Esta estrutura "planar"

carregada facilitaria a aproximação das moléculas de porfirina que também são planares e de carga oposta.

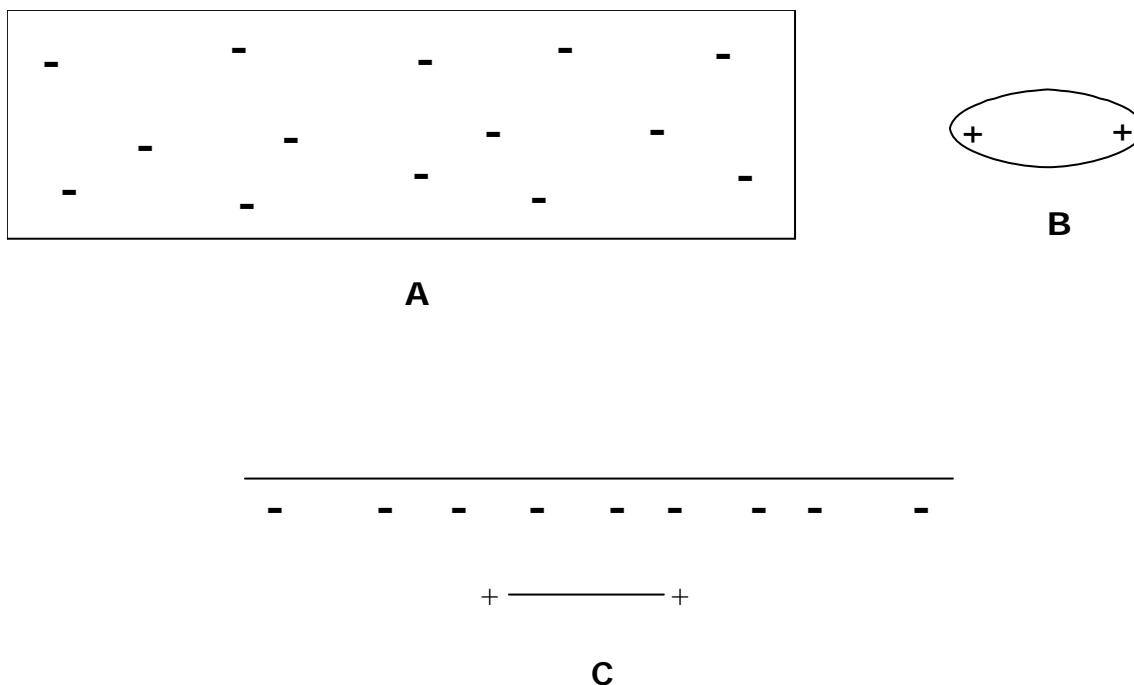


Figura 54. Representação esquemática da superfície do polímero de melanina carregado negativamente (A); e da porfirina carregada positivamente (B). Em C é representada a interação entre as duas superfícies com cargas opostas, em uma situação planar.

Estas características estruturais explicariam o fato da existência de uma grande área de contato fornecida pela melanina em solução mesmo quando em concentrações muito baixas. Desta forma, as porfirinas se orientariam preferencialmente próximas a esta superfície, porém não caracterizando um complexo forte típico de uma supressão estática. Nesta situação temos o que na discussão dos espectros de absorção denominamos “complexo fraco”, uma vez que não são observados deslocamentos do máximo de absorção da banda Soret, apenas uma diminuição da intensidade de absorção, e as bandas Q são pouco afetadas.

A magnitude da supressão originada pela esfera de ação da eumelanina para cada derivado porfirínico, pode ser obtida pela determinação das constantes de supressão estáticas aparentes, K_{EA} . Fica evidenciado que as porfirinas benzílicas são suprimidas de forma mais eficiente pela eumelanina que a TMPyP e ZnTMPyP. Comparando-se a TMPyP, com o derivado benzílico mais simples, a TBzPyP, observa-se que a eficiência de supressão é praticamente 2,5 vezes maior quando o grupo alquílico é o grupo benzil.

Tabela VI. Valores obtidos na interação porfirina-melanina através da supressão de fluorescência pelo modelo de esfera de ação.

Porfirina	$K_{EA} (\mu\text{g/mL})^{-1}$			
	pH 7,4	r^2	pH 8,0	r^2
TMPyP	0,230	0,994	0,239	0,995
TBzPyP	0,560	0,966	0,586	0,993
TNOBzPyP	0,502	0,989	0,507	0,989
TBrBzPyP	0,784	0,971	0,756	0,984
ZnTMPyP	0,280	0,988	0,278	0,985
ZnTBzPyP	0,494	0,983	0,421	0,979
ZnTNOBzPyP	0,4794	0,995	0,769	0,981
ZnTBrBzPyP	0,650	0,983	1,037	0,985

A maior supressão observada para os derivados benzílicos pode estar relacionada com a maior dimensão destes compostos que permitiriam um contato maior com a superfície do polímero, a fatores eletrostáticos relacionados a estabilização das estruturas de ressonância ou ainda à criação de interações adicionais, além das eletrostáticas de caráter hidrofóbico com o polímero.

Observa-se que não existe uma diferença acentuada nos valores de K_{EA} entre a os compostos com substituintes benzila e nitrobenzila, porém quando o substituinte é bromo-benzila este valor aumenta consideravelmente. Tanto a TBrBzPyP como a ZnTBrBzPyP, apresentam os maiores valores de K_{EA} nas respectivas séries (bases livres e Zn-porfirinas), sendo observadas variações significativas na intensidade de fluorescência em função da concentração de melanina. Os valores de K_{EA} apresentados na Tabela VI foram obtidos para relações de I_0/I de 3, porém para relações maiores observa-se um desvio do modelo de esfera de ação para a TBrBzPyP e ZnTBrBzPyP. Estes dados são indicativos de que estes derivados originam interações mais fortes com o polímero de eumelanina. Estes comportamento fica evidenciado pelo perfil espectral de emissão apresentado pela TBrBzPyP na presença de concentrações maiores de eumelanina.

Para concentrações de eumelanina maiores que $3\mu\text{g/mL}$ tanto em pH 7,4 como pH 8, observa-se uma definição das bandas Q(0,0) e Q(0,1). A resolução apresentada pelo espectro de emissão é uma evidencia clara da participação dos grupos piridínicos na interação com a eumelanina. Portanto, neste derivado cria-se uma interação específica dos grupos com o polímero, que impede a livre rotação do substituinte minimizando a mistura dos estados de transferência de carga e o estado S_1 . Esta interação mais específica faria com que tivéssemos a formação de um complexo mais forte, sendo criada uma situação intermediária entre a esfera de ação e uma supressão estática. A formação de ligações mais específicas neste derivado pode ser resultante do estabelecimento de ligações de hidrogênio entre o Br e estruturas OH do polímero dos grupos dihidroxi-indol, porém não temos evidencias experimentais que confirmem esta proposição.

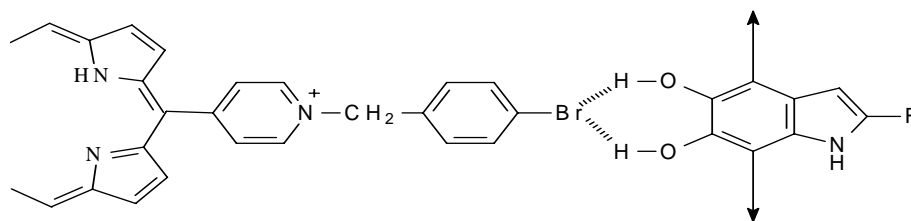


Figura 55. Interação do átomo de bromo da TBrBzPyP com a hidroxila dos grupos DHI da melanina. Essa interação dificulta a rotação do piridínio da porfirina.

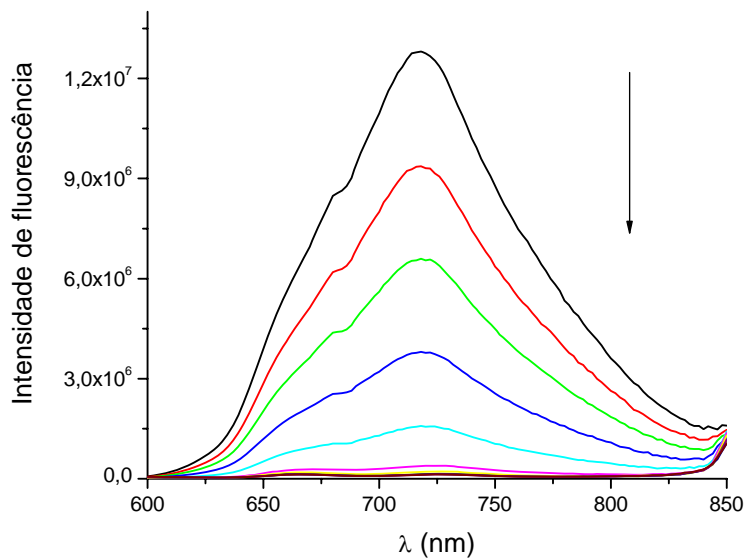


Figura 56. Variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de melanina na porfirina TBrBzPyP em solução tampão pH 7,4.

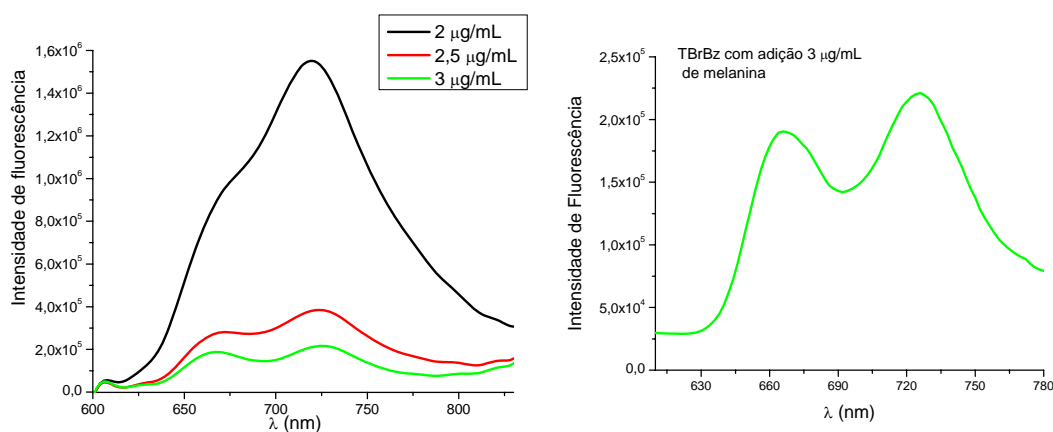


Figura 57. Espectro de emissão da porfirina TBrBzPyP com adição de melanina, resolução das bandas de emissão da porfirina.

Não existe uma diferença significativa dos valores de K_{EA} comparando-se a variação de pH 7,4 a pH 8 para a maioria dos derivados com exceção da ZnTNO₂BzPyP e ZnTBrBzPyP, que apresentam valores significativamente maiores em pH 8. Esperava-se um aumento maior para todos os derivados visto que nesta condição uma maior dissociação dos grupos aniônicos da eumelanina é esperada. Os resultados anômalos destas duas Zn-Porfirinas podem estar relacionados a diferenças na polarização nas moléculas de água coordenadas axialmente, resultando em interações adicionais com o polímero.

4.7 FILMES

O interesse em materiais nanoestruturados tem crescido exponencialmente nos últimos anos, e entre estes materiais a formação de filmes finos através da *auto-organização eletrostática* é extremamente promissora. Vários polieletrólitos, biopolímeros (proteínas e ácidos nucleicos), lipídios e partículas inorgânicas vêm sendo utilizados para a produção de filmes em multicamadas. Controlando as propriedades físicas e químicas das camadas constituinte do filme intercalada por polieletrólitos carregados, pode-se obter uma estrutura final com propriedades físicas e químicas particulares¹⁰⁴.

A técnica para a construção destes filmes está baseada na adsorção de camadas alternadas de espécies aniônicas e catiônicas sucessivamente, sendo que, a estrutura final dos filmes é determinada através das interações eletrostáticas entre os poli-íons e a superfície do substrato^{105,106, 107}.

O grande interesse deste método está na capacidade de criar filmes finos de uma grande variedade de grupos funcionais incorporados dentro da estrutura do filme. Desde a utilização dos polieletrólitos em multicamadas, um número muito grande de experimentos vem sendo desenvolvido, para o entendimento do mecanismo de formação. Embora a idéia básica da formação dos filmes seja

simples, a descrição teórica é bastante complexa, isto devido interações Colômbicas envolvidas entre as camadas dos filmes¹⁰⁸.

A formação de filmes contendo fotossensibilizadores é muito importante para diversas aplicações como a formação de diodos emissores¹⁰⁹, a obtenção de sensores¹¹⁰ e dispositivos fotovoltaicos¹¹¹. Uma vez que porfirinas e metaloporfirinas são importantes fotossensibilizadores e por possuírem propriedades eletroquímicas e de coordenação atrativas, a investigação do comportamento destas moléculas na formação de filmes é de grande interesse^{112,113}.

Realizamos um estudo preliminar da formação de filmes entre as porfirinas catiônicas e o polímero de eumelamina em substrato de vidro uma vez que:

- A melanina pode ser considerada de certa forma um polieletrólito, uma vez que as cargas negativas estão distribuídas ao longo do polímero, portanto é uma molécula interessante do ponto de vista da formação de filmes auto-montados pela interação eletrostática com as porfirinas catiônicas.
- Devido às características da melanina e das porfirinas, a intercalação na estrutura do filme pode apresentar propriedades de transferência de elétrons ou de energia, importantes na obtenção de dispositivos moleculares.
- O estudo dos filmes de melanina-porfirina pode dar uma melhor idéia da interação existente, no caso da aplicação destas porfirinas em sistemas de TFD direcionados ao tratamento de melanoma, que é um tipo de tumor sólido.

Na figura 58 está esquematizada a seqüência de etapas utilizadas para a formação dos filmes.

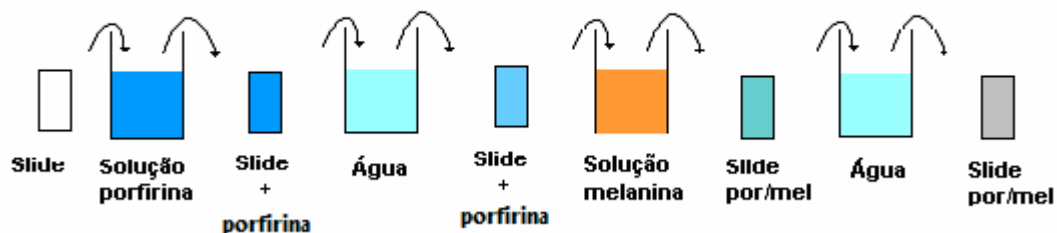


Figura 58. Esquema da formação dos filmes de porfirina. Os slides de vidro previamente tratados foram imersos na solução de porfirina por 30min, após foram lavados com água miliQ e então imersos na solução de melanina e posteriormente lavados novamente. Entre cada imersão os slides foram secos em atmosfera de argônio.

Foram realizados filmes de algumas bases livres e de seus respectivos complexos de zinco. Comparando os espectros de absorção das porfirinas nos filmes e em solução observa-se um deslocamento batocrômico significativo da banda Soret. Este deslocamento pode ser atribuído à maior rigidez que as porfirinas se encontram na forma sólida e à interação do sistema π com a superfície do vidro. Abaixo temos uma tabela apresentando estes deslocamentos.

Tabela VII. Deslocamentos do máximo de absorção nos filmes das porfirinas estudadas em relação solução tampão fosfato.

Porfirina	λ_{\max} (nm)		$\Delta\lambda$ (filme-solução) (nm)
	Filme	Solução	
TBzPyP	446	425	21
TMPyP	449	421	28
TNO ₂ BzPyP	444	428	16
ZnTBzPyP	459	440	19
ZnTMPyP	453	436	17
ZnTNO ₂ BzPyP	464	444	20

Apesar da concentração das soluções utilizadas na preparação dos filmes ser a mesma para todas as porfirinas, as absorções dos filmes resultantes para cada porfirina foi diferente. Este resultado provavelmente reflete uma diferença de afinidade de cada derivado pelo vidro, resultando em uma maior ou menor incorporação de material no substrato. Outra possibilidade seria de que as diferenças fossem apenas devidas às variações de absorvidade molar de cada derivado, porém a TMPyP que é base livre que apresenta a maior absorvidade molar, é a que apresenta a menor absorção, logo as diferentes absorções devem ser devidas à quantidade de material adsorvido.

Na figura abaixo apresentamos o espectro de absorção dos filmes obtidos das porfirinas na forma base livre.

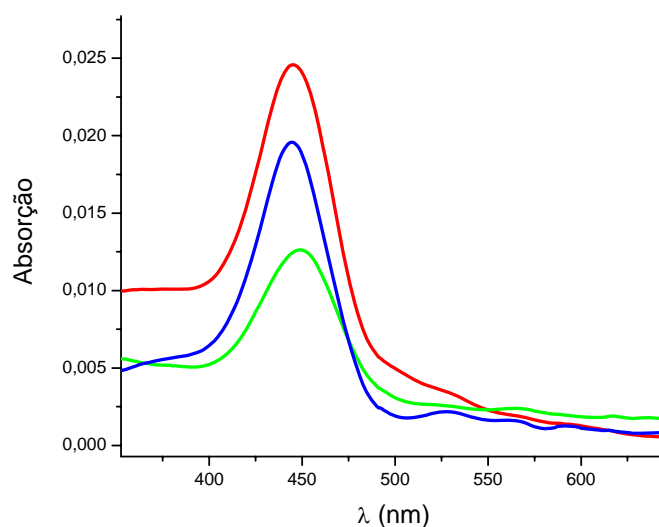


Figura 59. Variações das intensidades dos espectros de absorção das porfirinas TBzPyP (—), TNO₂BzPyP (—) e TMPyP (—) em filme. Tempo de imersão 30 min e concentração das soluções $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

Diferenças também são observadas quando comparamos a absorção resultante entre os filmes das bases livres e os complexos de Zinco, sendo a absorção das Zn-porfirinas. Esta menor afinidade das Zn-porfirinas pode estar associada ao fato de que os complexos de zinco apresentam moléculas de água coordenadas axialmente, e considerando uma adsorção planar das porfirinas na

superfície do vidro, estas moléculas de água dificultariam a aproximação com o substrato. No gráfico abaixo temos uma comparação das absorções dos filmes da TBzPyP e da ZnTBzPyP.

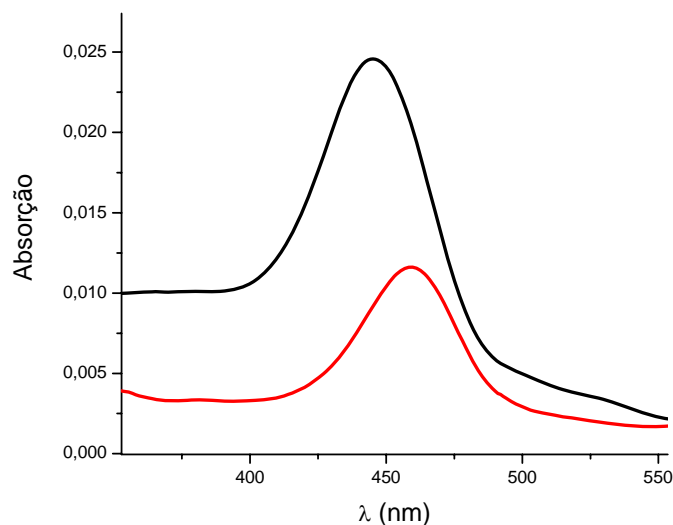


Figura 60. Variações das intensidades dos espectros de absorção das porfirinas TBzPyP (—), ZnTBzPyP (—) em filme. Tempo de imersão 30 min e concentração das soluções $5 \cdot 10^4 \text{ mol.L}^{-1}$.

Analisando os espectro de fluorescência dos filmes e comparando com os espectros obtidos em solução tampão pH 7.4, observamos que para a TBzPyP, ocorre uma maior resolução das bandas Q(0,0) e Q(0,1) que não eram observadas em solução, sendo um indicativo de uma interação mais direcionada mediada pelos grupos piridínio, como já discutido anteriormente ao longo desta dissertação. Os filmes da TMPyP e a TNO₂PyP, por sua vez, não apresentam uma resolução significativa de seus espectros de emissão.

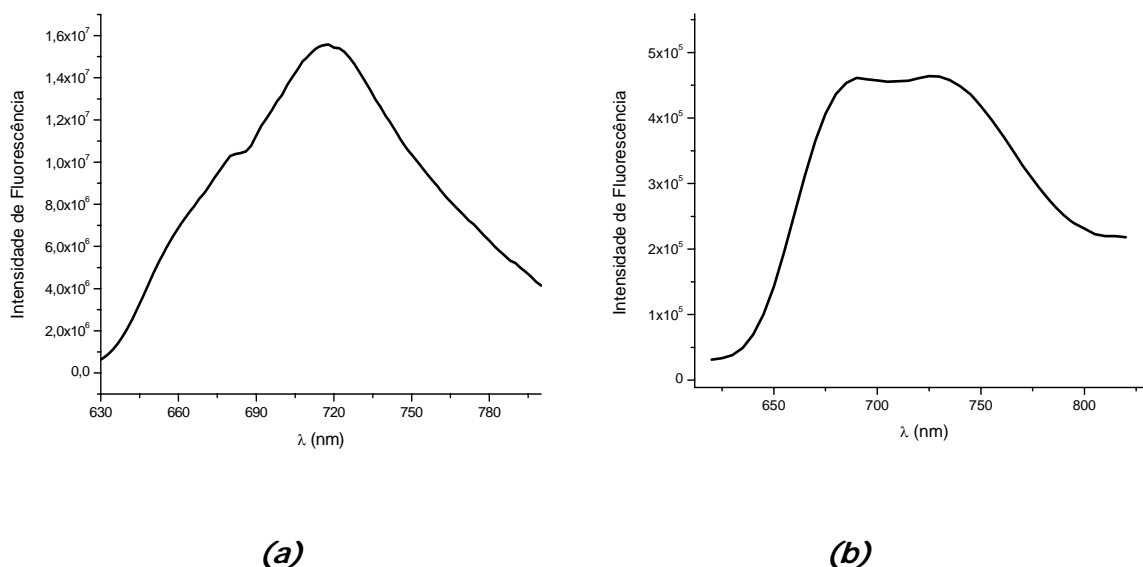


Figura 61. Espectros de fluorescência da porfirina TBzPyP em solução tampão pH 7,4 (a) e em filme com uma camada de adsorção de porfirina de solução $5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (b).

Quando comparamos as zinco-porfirinas, o comportamento encontrado é o contrário ou seja, os espectros de fluorescência que em solução apresentam uma resolução melhor que suas base livres, nos filmes tem suas bandas menos definidas que suas respectivas bases livres. A figura a seguir nos mostra este comportamento para a porfirina ZnTMPyP.

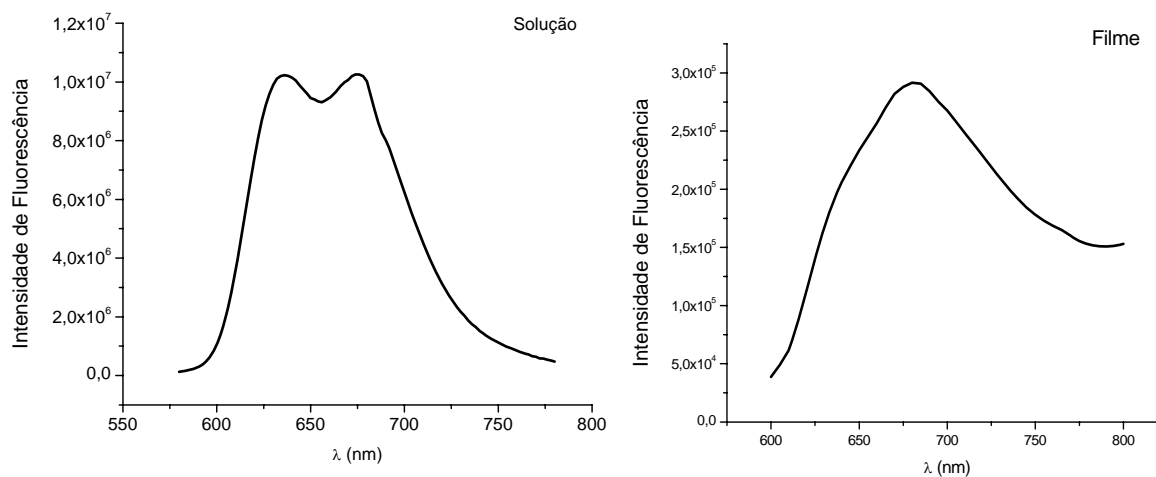


Figura 62. Espectros de fluorescência da porfirina ZnTMPyP em solução e em filme.

Quando realizamos a imersão do slide de vidro na solução de melanina não foi possível observar nenhuma adsorção. Isto já é esperado, visto que os slides de vidro possuem os grupos silanóis de carga negativa. A adsorção de melanina nos slides de vidro foi possível em slides que haviam sido previamente recobertos com as porfirinas catiônicas. A adsorção de um filme de melanina sobre um filme de porfirina diminui significativamente a intensidade de absorção de todas as porfirinas estudadas, comportamento similar ao encontrado em solução. Quando a esta bicamada porfirina-melanina foi adicionada uma nova camada de porfirina, observa-se um novo aumento na absorção do filme, sendo a absorção maior que a absorção do slide que continha apenas a porfirina. Este comportamento é observado para os filmes da TMPyP e da TNO₂PyP. Na figura 63 podemos observar as variações de absorção da TMPyP e da TNO₂BzPyP para cada situação no slide, à medida que vão sendo formadas as camadas.

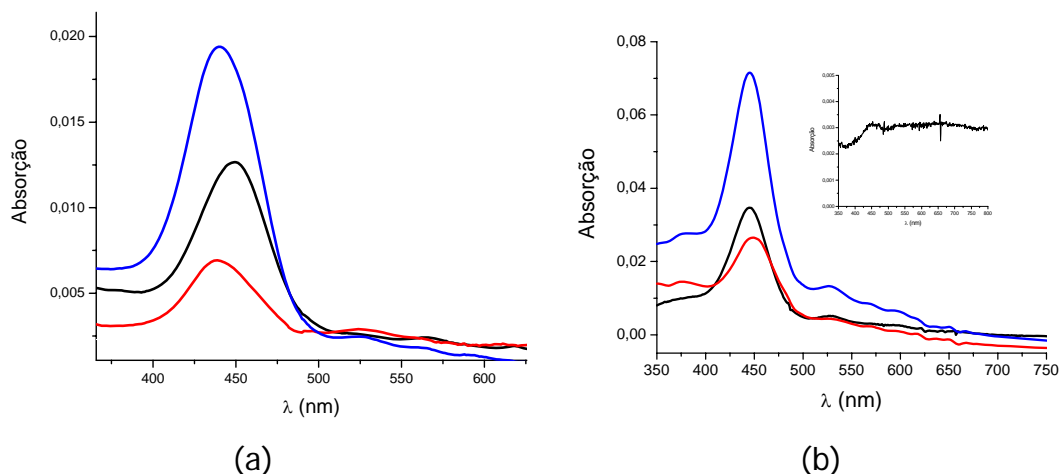


Figura 63. Espectro de absorção do filme da porfirina TMPyP (a) e TNOBzPyP (b) em filme. Uma camada de porfirina (P) (—), uma camada de porfirina e uma de melanina (P-M) (—) e duas camadas de porfirina e uma de melanina (P-M-P) (—). A figura inserida em (b) é referente a absorção da melanina.

Para a TBzPyP a adição de uma nova camada de porfirina a uma bicamada porfirina-melanina não resulta em um aumento adicional da absorção, sendo a absorção muito próxima da absorção obtida apenas com uma camada de porfirina sobre o substrato.

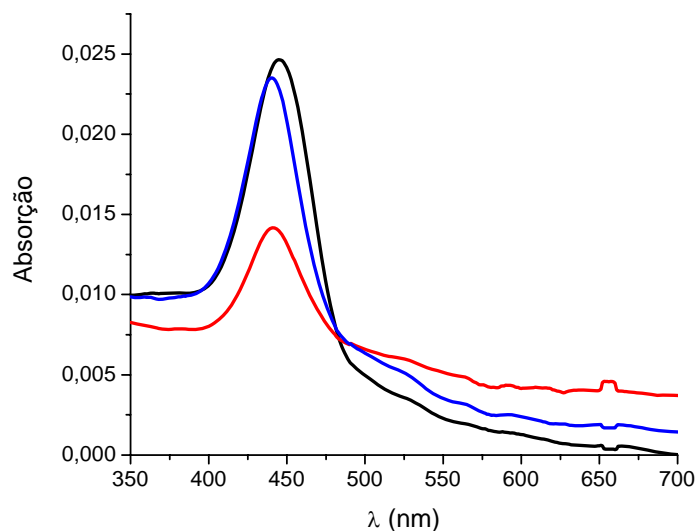


Figura 64. Espectro de absorção do filme da porfirina TBzPyP em filme. Uma camada de porfirina (P) (—), uma camada de porfirina e uma de melanina (P-M) (—) e duas camadas de porfirina e uma de melanina (P-M-P) (—).

Estes resultados indicam que a adsorção das porfirinas sobre camadas de melanina também é influenciada pelos substituintes alquílicos. A menor adsorção da TBzPyP sobre uma camada de melanina deve ser consequência do maior comprometimento da melanina com a primeira camada de porfirina já existente no slide de vidro, não disponibilizando de forma efetiva os sítios aniônicos para a ligação posterior com a segunda camada de TBzPyP.

A emissão obtida dos filmes porfirina-melanina (p-m) apresenta uma menor intensidade de fluorescência e no caso da TMPyP observa-se uma maior resolução das transições Q(0,0) e Q(0,1), indicando uma interação forte com o polímero. A adição de uma nova camada de porfirina (p-m-p) resulta em um aumento da intensidade de fluorescência, sendo mantida a resolução do espectro de emissão.

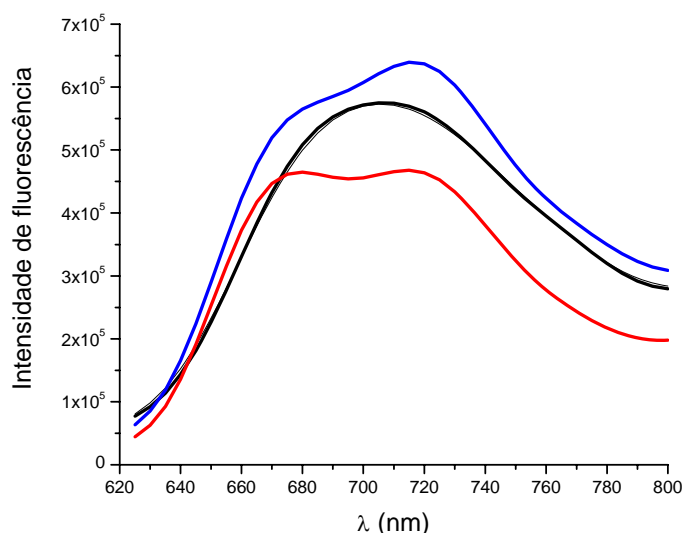


Figura 65. Espectro de emissão de fluorescência TMPyP em filme. Uma camada de porfirina (P) (—) , uma camada de porfirina e uma de melanina (P-M) (—) e duas camadas de porfirina e uma de melanina (P-M-P) (—).

A TNO₂BzPyP apresenta comportamento semelhante, porém para a segunda camada de porfirina (p-m-p) a intensidade de emissão é intermediária entre a inicial (p) e a obtida com uma camada de melanina (p-m).

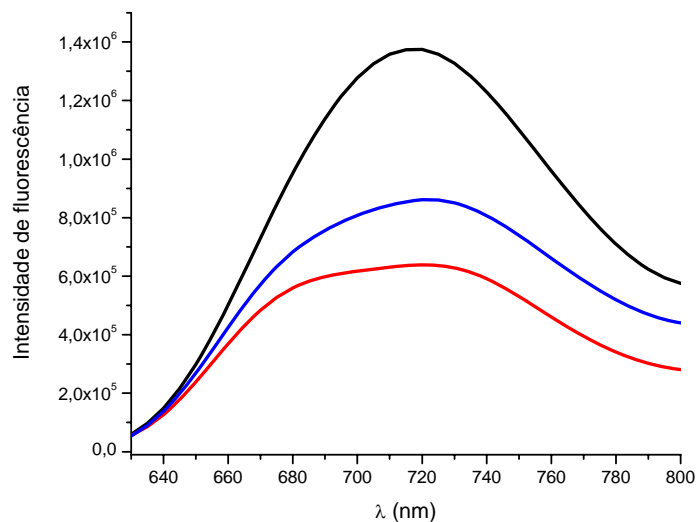


Figura 66. Espectro de emissão de fluorescência do filme da porfirina TNOBzPyP em filme. Uma camada de porfirina (P) (—), uma camada de porfirina e uma de melanina (P-M) (—) e duas camadas de porfirina e uma de melanina (P-M-P) (—).

A TBzPyP apresenta um comportamento similar ao da TNO₂Py no que se refere às intensidades relativas de emissão em cada situação, sendo observada uma resolução espectral na ausência ou na presença de melanina.

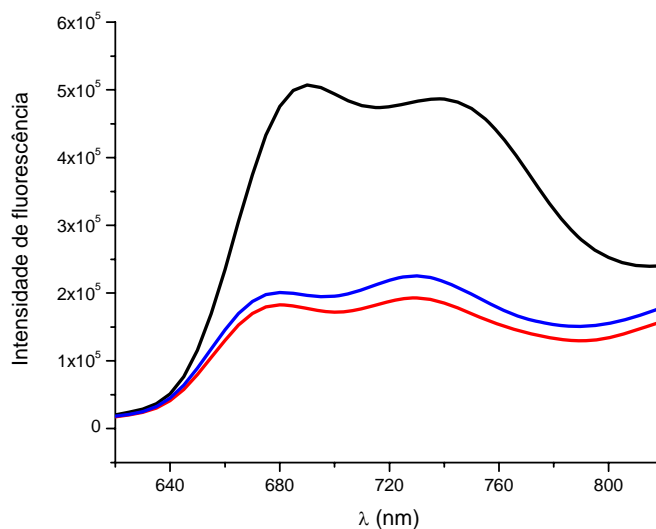


Figura 67. Espectro de emissão de fluorescência do filme da porfirina TBzPyP em filme. Uma camada de porfirina (P) (—), uma camada de porfirina e uma de melanina (P-M) (—) e duas camadas de porfirina e uma de melanina (P-M-P) (—).

Estes resultados evidenciam também que a supressão de fluorescência nos filmes é diferenciada, sendo a emissão da TMPyP menos suprimida pela melanina de que a emissão da TBzPyP e da TNO₂PyP. Este resultado se evidencia para a TNO₂PyP, que mesmo apresentando uma maior absorção para a situação p-m-p, que indica maior disponibilidade de porfirina, apresenta uma emissão apenas ligeiramente superior que nos filmes p-m.

No caso das Zn-Porfirinas a adição de melanina resulta em uma diminuição da intensidade de fluorescência, assim como observado para as bases livres, entretanto, a formação de filmes com camadas adicionais de porfirina p-m-p e p-m-p-m-p, não apresentaram um comportamento reprodutível como no caso das bases livres, portanto um estudo mais detalhado da formação destas deposições ainda precisa ser realizado.

5. CONCLUSÕES

- O desenvolvimento desta dissertação possibilitou uma melhor avaliação dos procedimentos sintéticos normalmente utilizados na obtenção de porfirinas catiônicas derivadas da TPyP. A importância não só das condições de síntese, como principalmente uma avaliação das impurezas do DMF, solvente normalmente utilizado nestas reações de alquilação puderam ser verificadas. Foram observados produtos secundários atípicos não-porfirínicos em várias reações ao longo do desenvolvimento deste trabalho que são devidos provavelmente a reação entre os alquilantes e produtos de decomposição do DMF. Estes produtos de decomposição do DMF também dificultam a reatividade e o isolamento das porfirinas, uma vez que influenciam a polaridade do meio. Progressos consideráveis também foram obtidos na síntese de derivados porfirínicos anfifílicos, onde uma metodologia geral pode ser estabelecida para

a separação do produto mono-alquilado com grupos hexadecila. Nesta metodologia, a separação da TPyP que não reagiu e que acompanha a separação mesmo utilizando Sephadex LH-20 foi obtida por cromatografia em coluna utilizando alumina. O produto mono-alquilado é então separado aumentando a polaridade do solvente. Uma vez obtido este produto realiza-se uma nova cromatografia em sephadex LH-20 para completar a purificação. Foram também obtidos em escala teste alguns derivados catiônicos contendo uma cadeia hexadecil e três substituintes metilas ou benzilas.

- Foi proposta uma explicação geral para os deslocamentos observados nos máximos de absorção das porfirinas catiônicas baseada nas possíveis estruturas de ressonância dos substituintes devidas à hiperconjugação. Derivados que apresentam máximos de absorção mais deslocados para o vermelho são os que possuem substituintes que originam estruturas de ressonância adicionais e estabilizam a carga negativa gerada pela hiperconjugação. Desta forma a densidade de carga positiva localizada no carbono α benzílico contribui na expansão do sistema π do macrociclo originando os deslocamentos dos máximos de absorção de forma mais acentuada de que outros derivados que não apresentam as possibilidades de estabilização de carga.
- Ocorre a formação de dois complexos na interação entre as porfirinas catiônicas e a eumelanina. Um complexo mais fraco em concentrações mais baixas e intermediárias (4 a 4,5 $\mu\text{g/mL}$) de eumelanina, e um complexo mais forte em concentrações maiores. Estes complexos podem ser observados pelas variações obtidas nos espectros de absorção em função da concentração da melanina. As tentativas de estimar a constantes de formação destes complexos através dos dados de absorção Uv-Vis utilizando tratamento convencionais baseados na formação de complexos 1:1 não foram bem sucedidas, uma vez que o polímero apresenta mais de um sítio de ligação e métodos mais elaborados levando em consideração interações múltiplas precisam ser empregados.

- A eumelanina suprime eficientemente a fluorescência das porfirinas catiônicas, em um processo de supressão por esfera de ação. Este processo ocorre particularmente para os complexos fracos entre a porfirina e a eumelanina, podendo ser inferido pela natureza de polieletrólito da eumelanina que deve apresentar uma ampla superfície de contato carregada negativamente, facilitando a orientação das porfirinas em uma disposição planar em relação ao polímero. A determinação das constantes de supressão estáticas aparentes (K_{EA}) mostra que os substituintes alquílicos influem consideravelmente na formação destes complexos com a eumelanina. As diferentes interações são devidas aos fatores estruturais tais como dimensão da porfirina, polarização dos substituintes e formação de interações de natureza hidrofóbica.
- A formação de ligações específicas também pode ser observada no caso da TBrBzPyP, provavelmente devida à formação de ligações de hidrogênio entre o átomo de bromo e os grupos dihidroxi-indol do polímero. Esta interação altera a rotação dos grupos piridínio da molécula que altera a mistura entre os níveis eletrônicos de transferência de carga do piridínio e o estado excitado S_1 da porfirina. Como consequência desta alteração energética ocorre uma melhor definição das transições $Q(0,0)$ e $Q(0,1)$ no espectro de emissão.
- As zinco-porfirinas são de forma geral menos suprimidas que as bases livres. Este comportamento pode ser uma evidencia da aproximação planar em relação ao polímero da melanina, uma vez que zinco porfirinas apresentam moléculas de água ligadas axialmente, logo estas moléculas coordenadas axialmente impediriam uma aproximação mais efetiva. Entretanto, em pH 8 a ZnTNO₂PyP e a ZnTBrBzPy apresentam valores elevados de K_{EA} dentro da série investigada.
- Foi realizado um estudo da formação de filmes baseados na técnica de auto-montagem eletrostática entre as porfirinas e a melanina utilizando como substrato vidro. Observa-se que a adsorção das porfirinas em vidro é

diferenciada sendo a TBzPyP a base livre que apresenta a maior adsorção. Pelos espectros de emissão dos filmes de porfirina em vidro foi possível verificar que alguns derivados interagem com uma participação mais efetivas dos piridínios que outros, onde a interação é mais direcionada com o sistema π .

- A formação de filmes mistos porfirina – melanina e porfirina – melanina – porfirina mostra que a TBzPyP apresenta uma menor capacidade de incorporação da segunda camada de porfirina. Este comportamento deve-se provavelmente ao fato de que a primeira camada de TBzPyP forma interações muito mais fortes com a melanina, indisponibilizando assim os sítios do polímero para a formação de ligações com a segunda camada.
- Nos filmes porfirina melanina também é observada a supressão de fluorescência da porfirina. A diferença na magnitude de supressão nos filmes sugere que estes derivados possam ser utilizados em sistemas de diagnóstico relacionados a detecção de tumores melanóticos.
- Em um estudo paralelo (*vide apêndice*), foram investigadas as propriedades de fotoisomerização de grupos azobenzênicos coordenados axialmente a uma ftalocianina de Silício(IV). É observada a isomerização E-Z dos grupos azobenzênicos coordenados pela irradiação tanto na região da absorção das bandas π - π^* como das bandas n- π^* do grupo azobênzenico. A reação térmica de retorno Z-E é observada, porém não foi obtida a correspondente reação fotoquímica. Os processos fotoquímicos E-Z e Z-E seguem uma cinética de primeira ordem, sendo a reação térmica Z-E cerca de dez vezes mais lenta que o processo fotoquímico E-Z.
- Neste sistema pudemos observar o processo de sensibilização Z-E, pela irradiação na região das bandas Q da ftalocianina. Este processo de sensibilização corresponde a uma transferência de energia não-vertical uma vez que o estado excitado triplete do azobenzeno apresenta maior energia do que o estado triplete da ftalocianina.

- A intensidade de fluorescência da ftalocianina é função do estado de isomerização dos grupos coordenados axialmente. A intensidade de fluorescência é maior para a forma E do que a forma Z, sendo então possível modular a intensidade de fluorescência em função do estado de isomerização do grupos axiais.
- O conjunto de características descritas acima faz deste sistema um importante modelo de dispositivo molecular, onde existe uma interdependência da função desejada, no caso a intensidade de fluorescência, e uma característica estrutural que é o estado de isomerização, em função de um estímulo externo, que é realizado pela luz de excitação. Outro aspecto importante é que a velocidade do processo Z-E pode ser controlada. A reação térmica é lenta e a reação sensibilizada é rápida. O conjunto destas características apresentadas por esta molécula é único, constituindo-se em um dispositivo molecular do tipo on-off.

6. REFERÊNCIAS

-
- ¹ I. Pete, e I. Pantoli, *in Light in Biology and Medicine*: New York; Plenum Press; 1988, p. 357-361.
- ² A. L. Lehninger, D. L. Nelson e M. M. Cox, *Princípios de Bioquímica*: São Paulo; Sarvier, 1995, p.426-430.
- ³ K. L. How, H. A. Hazewinkel e J. A. Mol. *Gen. Comparative Endocrinology*, **96** (1994) 12-18.
- ⁴ B. E. Johnson, C. Green, T. Laksmipathi e J. Ferguson, *in Light in Biology and Medicine*: New York; Plenum Press; 1988, p. 173-179.
- ⁵ T. Christensen, A. S. G. Brunborg e J. B. Reitan, *in Light in Biology and Medicine*: New York; Plenum Press; 1988, p. 153-159.
- ⁶ R. Bonnett, *Chem. Soc. Reviews*, **24** (1995) 19-33.

-
- ⁷ H. J. C. M. Sterenborg, A. E. Saarnak, R. Frank, M. Motamedi, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **35** (1996) 159-165.
- ⁸ D. Kockott e J. Kochmann, *in Light in Biology and Medicine*: New York; Plenum Press; 1988, p. 39-44.
- ⁹ G. Ciarrocchi, A. Montecucco, G. Pedrali-Noy e S. Spadari, *in Light in Biology and Medicine*: New York; Plenum Press; 1988, p. 219-226.
- ¹⁰ A. E. H. Machado, *Química Nova*, **23-2** (2000) 237-243.
- ¹¹ F. I. Simplicio, F. Maionchi e N. Hioka, *Quim. Nova*, **25** (2002) 801-807.
- ¹² I. J. Macdonald e T. J. Dougerty, *J. Porphyrins and Phtalocyanines*, **5** (2001) 105-129.
- ¹³ M. La Penna, M. G. Alvarez, E. I. Islas, V. Rivarola, E. N. Durantini, *Bioorganic Chemistry*, **29** (2001) 130-139.
- ¹⁴ R. Bonnett, A. N. Nizhnik, S. G. White, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **6** (1990) 29-37.
- ¹⁵ R. Hudson e R. W. Boyle, *J. Porphyrins and Phtalocyanines*, **8** (2004) 954-975.
- ¹⁶ C. M. Allen, W. M. Sharman e J. E. Van Lier, *J. Porphyrins and Phtalocyanines*, **5** (2001) 161-169.
- ¹⁷ S. E. Braslavsky, M. Müller, D. O. Martire, S. Pörting, S. G. Bertolotti, S. Chakravorti, G. Koç-Ewier, B. Knipp, K. Schaffner, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **40** (1997) 191-198.
- ¹⁸ H. Ali, J. E. van Lier, *Chem. Rev.*, **99** (1999) 2379-3450.
- ¹⁹ R. M. Szeimies, P. G. Calzavara-Pinton, S. Karrer, B. Ortel, M. Landthaler, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **36** (1996) 213-219.
- ²⁰ S. G. Bown, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **6** (1990) 1-12.
- ²¹ M. Toriya, M. Yamamoto, K. Saeki, Y. Fujii, K. Matsumoto, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65** (2001) 363-370.
- ²² T. Ando, K. Irie, K. Koshimizu, T. Takemura, H. Nishino, A. Iwashima, N. Takeda, S. Nakajima e I. Sakata, *Photochem. Photobiol.*, **57** (1993) 629-633.
- ²³ M. C. DeRosa, R. J. Crutchley, *Coord. Chem. Rev.*, **233-234** (2002) 351-371.

-
- ²⁴ K. Teuchner, J. Ehlert, W. Freyer, D. Leupold, P. Altmeyer, M. Stücker, K. Hoffmann, *J. Fluorescence.*, **10** (2000) 275-281.
- ²⁵ R. C. Sealy, C. C. Felix, J. S. Hyde e H. M. Swartz in "*Free Radicals in Biology*", editor W.A. Pryor, Academic Press, New York, 1980, cap. 4.
- ²⁶ M. S. Blois in "*Photochem. Photobiol. Rev.*", K. C. Smith, Plenum Press, New York, 1978, vol. 3, cap. 3.
- ²⁷ K. Wakamatsu, S. Ito, *Pigment Cell Res.*, **15** (2002) 174-183.
- ²⁸ S. Ito, *Biochimica Biophysica Acta*, **883** (1986) 155-161.
- ²⁹ H. Rorsman, in *Light in Biology and Medicine*: New York; Plenum Press; 1988, p. 321-327.
- ³⁰ E. V. Gan, H. F. Haberman e I. A. Menon, *Arch. Biochem. Biophys.*, **173** (1976) 666-672.
- ³¹ A. S. Ito e P. R. Crippa, *Physiol. Chem. And Phys. and Med. NMR*, **17** (1985) 205-209.
- ³² R. J. D'Amato, Z. P. Lipman e S. H. Snyder, *Science*, **231** (1986) 987-989.
- ³³ T. Sarna, A. Duleba, W. Korytowski e H. Swartz, *Arch. Biochem. Biophys.*, **200** (1980) 140-148.
- ³⁴ T. Sarna, *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **12** (1992) 215-258.
- ³⁵ S. Ito, K. Wakamatsu, *Pigment Cell Res.*, **16** (2003) 523-531.
- ³⁶ B. J. Powell, T. Baruah, N. Bernstein, K. Brake, R. H. McKenzie, P. Meredith, M.R. Pederson, *J. Chem. Phys.*, **120**-18 (2004) 8608-8615.
- ³⁷ M. J. Koeberle, P. M. Hughes, G. G. Shellern, C. G. Wilson, *Pharmaceutical Research*, **20**-10 (2003) 1702-1709.
- ³⁸ J. B. Nofsinger, J. D. Simon, *Photochem. Photobiol.*, **74** (2001) 31-37.
- ³⁹ Y. Iiu e J. D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **16** (2003) 606-618.
- ⁴⁰ L. Mosca, C. De Marco, M. Fontana e M. A. Rosei, *Arch. Biochem. Biophys.*, **371** (1999) 63-69.
- ⁴¹ B. Bilinska, *Spectrochimia Acta Part A*, **52** (1996) 1157-1162.

-
- ⁴² B. Bilinska, *Spectrochimia Acta Part A*, **57** (2001) 2525-2533.
- ⁴³ K. L. Double, L. Zecca, P. Costi, M. Mauer, C. Griessinger, S. Ito, D. Bem-Shachar, G. Bringmam, R. G. Fariello, P. Riederer, M. Gerlach, *J. Neurochemistry*, **75** (2000) 2583-2589.
- ⁴⁴ M. G. Bridelli, D. Tampellini, L. Zecca, *FEBS Letters*, **457** (1999) 18-22.
- ⁴⁵ D. Wróbel, A Planner, I. Hanyz, A. Wielgus, T. Sarna, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **41** (1997) 45-52.
- ⁴⁶ J. B. Nofsinger, S. E. Forest, L. M. Eibest, K. A. Gold, J. D. Simon, *Pigment Cell Res.*, **13** (2000) 179-184.
- ⁴⁷ S. E. Forest, W. C. Lam, d. P. Millar, J. B. Nofsinger, J. D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **104** (2000) 811-814.
- ⁴⁸ V. Marmol, S. Ito, L. Jackson, J. Vactenheim, P. Berr, G. ghanem, R. Morandini, K. Wakamatsu, G. Huez, *FEBS Lett*, **237** (1993) 307-310.
- ⁴⁹ J. B. Nofsinger, S. E. Forest, J. D. Simon, *J. Phys. Chem. B*, **103** (1999) 11428-11432.
- ⁵⁰ L. Stryer, 'Biochemistry', W.H. Freeman, Nova York, 1995
- ⁵¹ D. Voet and J. G. Voet, 'Biochemistry', John Wiley and Sons, Nova York, 1995.
- ⁵² IUPAC, *J. Am. Chem. Soc.*, **82** (1960) 5581.
- ⁵³ M. Gouterman, 'The Porphyrins', Academic Press, 1978
- ⁵⁴ P. Rothmund, *J. Am. Chem. Soc.*, **57** (1935) 2010-2011.
- ⁵⁵ A. D. Adler, F.R. Longo e W. Shergalis, *J. Am. Chem. Soc.*, **86** (1964) 3145.
- ⁵⁶ J. B. Kim, J.J. Leonard e F.R. Longo, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, (1972) 3986.
- ⁵⁷ J. S. Lindsay, H.C. Hsu, P.C. Kearney e A.M. Marguerettaz, *J. Org. Chem.*, **52** (1987) 827-836.
- ⁵⁸ G.R. Geiger III, B.J. Litter e J.S. Lindsey, *J. Chem. Soc. Perkin 2*, **5** (2001) 701-711.
- ⁵⁹ D. K. Lavalley, *Inorg. Chem.*, **17** (1978) 231-236.
- ⁶⁰ R. Boyd e R. Morrison, 'Química Orgânica', Fundação Calouste Gulberian, Lisboa, 1990.

-
- ⁶¹ K. P. C. Vollhardt e N. E. Schore, 'Organic Chemistry - Structure and Function', W.H. Freeman, Nova York, 1998.
- ⁶² P. Sykes, 'Guia de Mecanismos da Química Orgânica', Ao Livro Técnico, São Paulo, 1969.
- ⁶³ J. March, 'Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structure', Ed. Wiley Interscience, Nova York, 1992.
- ⁶⁴ L. R. Milgrom, J. P. Hill, e P. J. F. Dempsey, *Tetrahedron*, **50** (1994) 13447-13484.
- ⁶⁵ M. Ribeiro, 'Química Supramolecular de Heterodímeros Constituídos por Metaloporfirinas Catiônicas Planares e não Planares e Metaloftalocianinas Aniônicas', Tese de Doutorado, USP, 2003.
- ⁶⁶ S. Dovidauskas, 'Química Supramolecular de Porfirino-Clusters', Tese de Doutorado, Instituto de Química-USP, São Paulo, 2001.
- ⁶⁷ L. R. R. Essias, 'Complexos Modelo para Hemoproteínas Respiratórias: N - Alquilpiridilporfirinas', Dissertação de Mestrado, Instituto de Química-USP, São Paulo, 1986.
- ⁶⁸ J. E. Falk, 'Porphyrins e Metalloporphyrins', Elsevier, Amsterdam, 1964.
- ⁶⁹ C. A. Parker, 'Photoluminescence of Solutions', Elsevier, Amsterdam, 1968.
- ⁷⁰ N. J. Turro, 'Modern Molecular Photochemistry', Benjamin/Cummings, Mento Park, 1978.
- ⁷¹ K. Kalyanasundaram, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, **79** (1983) 1365-1374.
- ⁷² G. C. Azzellini, 'Síntese de Porfirinas e Metaloporfirinas N-Alquilpiridil Substituídas: estudo da Influência dos Substituintes Alquílicos em Processos de Fotossensibilização', Tese de Doutorado, USP, 1992.
- ⁷³ R. M. Liegel, 'Porfirinas e Metaloporfirinas Catiônica Aquossolúveis: Síntese e Caracterização de derivados Benzilpiridínio Substituídos', Dissertação de Mestrado, USP, 1996.

-
- ⁷⁴ R. M. Liegel, 'Aspectos da Sensibilização em Terapia Fotodinâmica: Avaliação das Propriedades Fotofísicas de Metaloporfirinas Catiônicas em Meio Homogêneo e Micro-Heterogêneo', Tese de Doutorado, USP, 2002.
- ⁷⁵ K. Kalyanasundaram, *Inorg. Chem.*, **23** (1984) 2453-2459.
- ⁷⁶ R. H. Schmehl e D. G. Whitten, *J. Phys. Chem.* **85** (1981) 3473-3480.
- ⁷⁷ F. Bolletta, M. Maerstri, L. Moggi e V. Balzani, *J. Phys. Chem.* **78** (1974) 1374-1377.
- ⁷⁸ E. L. Rachofsky, R. Osman e J. B. A. Ross, *Biochemistry*, **40** (2001) 946-956.
- ⁷⁹ J. N. Demas e J. W. Addington, *J. A. C. S.*, **98-19** (1976) 5800-5806.
- ⁸⁰ J.R. Lakowicz, "Principles of Fluorescence Spectroscopy", Plenum Press, New York, 1983, cap. 9.
- ⁸¹ A. Ogunsipe e T. Nyokong, *J. Porphyrins and Phtalocyanines*, **9** (2005) 121-129.
- ⁸² J. Wang, D. Wang, E. K. Miller, D. Moses, G. C. Bazan e A. J. Heeger, *Macromolecules*, **33** (2000) 5153-5158.
- ⁸³ M. Panda, A. Mishra, P.K. Behera, B.K. Mishra e G.B. Behera, *J. Luminescence*, **69** (1996) 95-104.
- ⁸⁴ M. R. Eftink e C. A. Ghiron, *J. Phys. Chem.*, **80** -5 (1976) 486-493.
- ⁸⁵ M. A. R. B. Castanho, M. J. E. Prieto, *Biochim. Biophys. Acta*, **1373** (1998) 1-16.
- ⁸⁶ D. D. Perrin e D. D. Perrin, *Purification of Laboratory Chemical*, Pergamon Press, 1966.
- ⁸⁷ M. G. Ribeiro, G. C. Azzellini, *J. Braz. Chem. Soc.* **14** (2003) 914-921.
- ⁸⁸ R. C. Sealy, *Methodos Enzymol*, **105**, 479-483.
- ⁸⁹ C. C. Felix, J. S. Hyde, T. Sarna, R. C. Sealy, *J. Am. Chem. Soc.*, **100** (1978) 3922-3926.
- ⁹⁰ P. G. V. Patten, A. P. Shereve, R. J. Donohoe, *J. Phys. Chem. B*, **104** (2000) 5986-5992.
- ⁹¹ J. Julliard, *Pure & Appl. Chem.*, **49** (1977) 885-892.
- ⁹² J. Julliard, *J. Chim. Phys.*, **67** (1970) 691-700.
- ⁹³ Y. Okuno, W. E. Ford, M. Calvin, *Synthesis*, **7** (1980) 537-539.

-
- ⁹⁴ K. Kalyanasundaram, M. Neumannspallart, *J. Phys. Chem.*, **86**, (1982) 5163-5169.
- ⁹⁵ K. Kano, K. Fukuda, H. Wakami, R. Nishiyabu e R.F. Pasternack, *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (2000) 7494-7502.
- ⁹⁶ F.J. Vergeldt, R.B.M. Koeshorst, A. van Hoek e T.J. Scaafsma, *J. Phys. Chem.*, **99**, 4397-4405.
- ⁹⁷ K. Kano, K. Fukuda, H. Wakami, R. Nishiyabu e R.F. Pasternack, *J. Am. Chem. Soc.*, **122** (2000) 7494-7502.
- ⁹⁸ M. Halmann, *in Energy Resources through Photochemistry and Catalysis*, Academic Press, São Paulo, 1983 cap. 15.
- ⁹⁹ K. Teuchner, W. Freyer, D. Leupold, A. Volkmer, D. J. Birch, P. Altmeyer, M. Stücker e K. Hoffmam, *J. Photochem. Photobiol.* **70-2** (1999) 146-151.
- ¹⁰⁰ K.A. Connors "Binding Constants – The Measurement of Molecular Complex Stability" John Wiley and Sons, New York, 1987.
- ¹⁰¹ A. S. Ito, G. C. Azzellini, S. C. Silva, O. Serra, A. G. Szabo, *Biophys. Chem.*, **45** (1992) 79-89.
- ¹⁰² A. Kozik, W. Korytowski, T. Sarna, A. S. Bloom, *Biophys. Chem.*, **38** (1990) 39-48.
- ¹⁰³ P. J. Munson, D. Rodbard, *Anal. Biochem.*, **107** (1980) 220-239.
- ¹⁰⁴ M. Schonhoff, *Curr. Opin. Coll Interface Sci.*, **8** (2003) 86-95.
- ¹⁰⁵ G. Decher, *Science*, **277** (1997) 1232-1237.
- ¹⁰⁶ R. R. Netz, J. F. Joanny, *Macromolecules*, **32** (1999) 9013-9025.
- ¹⁰⁷ P. T. Hammond, *Curr. Opin. Coll Interface Sci.*, **4** (2000) 430-442.
- ¹⁰⁸ M. Castelnovo, J. F. Joanny, *Langmuir*, **16** (2000) 7524-7532.
- ¹⁰⁹ H. Hong, M. Tarabia, H. Chayet, S. Davidov, E. Z. Faraggi, Y. Avny, R. Neumann e S. Kristein, *J. Appl. Phys.*, **79** (1996) 3082-3088
- ¹¹⁰ D. Q. Li, A. Bishop, Y. Gim, X. B. Shi, M. R. Fitzsimmons e Q. X. Jia, *Appl. Phys. Lett.*, **73** (1998) 2645-2647.

¹¹¹ D. M. Kaschak, J. T. Lean, C. C. Waraksa, G. B. Saupe, H. Usami e T. E. Mallouk, *J. Am. Chem. Soc.*, **121** (1999) 3435-3445.

¹¹² P. Gregory Van Patten, A. P. Shreve e R. J. Donohoe, *J. Phys. Chem. B*, **104** (2000) 5986-5992.

¹¹³ W. Quin, P. Parzuchowski, W. Zhang, M. E. Meyerhoff, *Anal Chem.*, **75** (2003) 332-340.