

CAPÍTULO 3

Resultados

3.1 Efeitos do pH e da força iônica nas características espectroscópicas de TPPS₄ e TMPyP em soluções aquosas homogêneas.

É conhecido que a eficácia biológica de derivados de porfirina depende tanto da sua estrutura quanto das características físico-químicas do ambiente, como por exemplo, concentração de íons, polaridade e viscosidade do solvente e presença de outras moléculas [9-12]. Por esse motivo, estudamos inicialmente o mecanismo e a dinâmica de agregação das porfirinas TPPS₄, aniônica, e TMPyP, catiônica, em função da estrutura dessas porfirinas e de fatores externos (concentração de porfirina, pH e força iônica), através dos métodos de absorção ótica, fluorescência e RLS.

3.1.1 TPPS₄

A Figura 3.1 mostra o espectro de absorção da TPPS₄ em pH 4.0 e 7.0. A mudança espectral observada ocorre devido a protonação dos átomos de nitrogênio presentes no anel central da TPPS₄. Foi demonstrado previamente que existem dois pontos de pK_a muito próximos, em torno de pH = 5.0 [81]. Portanto, em pH 4.0 TPPS₄ existe na forma biprotonada (H₄²⁺TPPS₄⁴⁻) e formalmente sua carga total é 2⁻. Esta forma é caracterizada por bandas de absorção centradas em $\lambda = 433$ nm e um ombro entre 411-414 nm (Região de bandas Soret) e $\lambda = 550, 593$ e 644 nm (Região de bandas Q). Em pH 7.0 a TPPS₄ está desprotonada (H₂TPPS₄⁴⁻) e sua carga total é 4⁻. Seu espectro de absorção é caracterizado por bandas centradas em 413 nm (Região de bandas Soret) e 515, 552, 578 e 632 nm (Região de bandas Q).

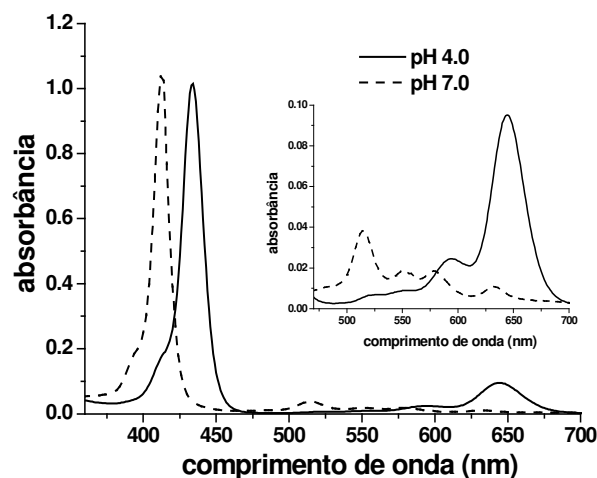


Figura 3.1) Espectros de absorção de $[TPPS_4] = 15 \mu\text{M}$ em pH 4.0 e 7.0. Caminho ótico = 0.2 cm.

Determinação dos coeficientes de absorção molar (ϵ) de $TPPS_4$

Não conseguimos encontrar na literatura os valores para os coeficientes de absorção molar de $TPPS_4$ em pH 7.0 e 4.0 na região espectral de nosso interesse. A determinação desses coeficientes foi realizada através de medidas de absorção ótica de várias concentrações da porfirina, partindo de uma concentração mais baixa possível para excluir a influência de interações entre as moléculas em estudo.

Retirado o espectro de absorção para cada concentração, e sabendo que podemos escrever:

$$A = \epsilon c l \quad (3.1)$$

em que ϵ é o coeficiente de absorção molar, c é a concentração do composto (mol L^{-1}) e l é a espessura da cubeta (cm), fizemos um gráfico de absorção por concentração de porfirina nos comprimentos de onda máximos das bandas Q.

Na ausência de interações entre as moléculas, a dependência entre a absorbância e a concentração do composto deve ser linear, o que realmente foi observado (veja, por exemplo, Figura 3.2). Deste modo, a tangente do ângulo formado é equivalente ao coeficiente de absorção molar, ou seja, $\text{tg } \alpha = \epsilon$.

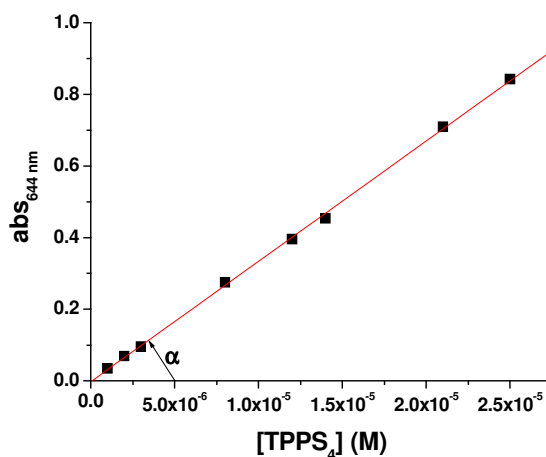


Figura 3.2) Determinação do ϵ em 644 nm para TPPS₄ em pH 4.0.

Os valores de ϵ obtidos para TPPS₄ no pH 7.0 são: $\epsilon^{515\text{nm}} = (1.3 \pm 0.01) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon^{552\text{nm}} = (5.9 \pm 0.08) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{578\text{nm}} = (5.5 \pm 0.09) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\epsilon^{632\text{nm}} = (3.16 \pm 0.07) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e no pH 4.0 temos $\epsilon^{593\text{nm}} = (9.0 \pm 0.2) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon^{644\text{nm}} = (3.26 \pm 0.04) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Entretanto, foi observado que a dependência entre a concentração da porfirina e a absorvância da solução permanece linear em toda região de concentrações utilizadas. Isso significa que nessa região de concentrações em soluções aquosas homogêneas a TPPS₄ não se agrega.

Efeito da presença de NaCl nas características da forma biprotonada da TPPS₄.

1. Absorção ótica

Em pH 4.0 a adição de NaCl induz a complexas mudanças no espectro de absorção. Inicialmente observamos uma queda rápida (tempo característico < 10s) da intensidade de todas as bandas de absorção na mesma proporção. Na região de concentrações de NaCl entre 0.08 e 0.6 M o valor da queda não depende da concentração de NaCl. Por exemplo, para [TPPS₄] = 10 μM em $\lambda = 644 \text{ nm}$ a razão entre as absorvâncias na ausência de NaCl ($A_1^{644\text{nm}}$) e na sua presença ($A_2^{644\text{nm}}$) sempre é $A_1^{644\text{nm}}/A_2^{644\text{nm}} = 1.2 \pm 0.02$ para todas as concentrações de NaCl usadas.

A segunda fase das mudanças espectrais está relacionada à contínua redução da absorção do monômero da porfirina e a um simultâneo aumento da absorção em 413 nm (Figuras 3.3 e 3.4). Este efeito é maior quando é maior a concentração de NaCl.

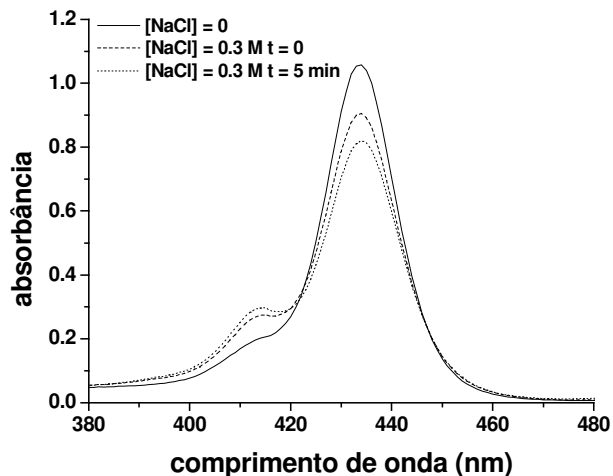


Figura 3.3) Mudanças no espectro de absorção da solução aquosa de [TPPS₄] = 10 μM em pH 4.0 na presença de [NaCl] = 0.3 M em função do tempo. Caminho óptico 0.2 cm.

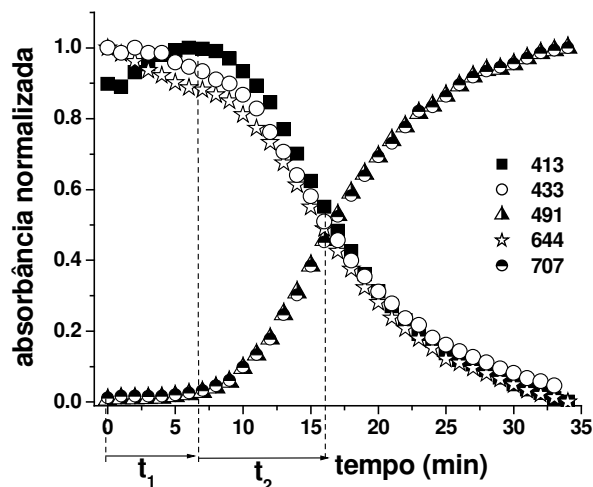


Figura 3.4) Mudanças na intensidade de absorção da solução aquosa de [TPPS₄] = 10 μM em pH 4.0 na presença de [NaCl] = 0.3 M em função do tempo.

Algum tempo depois (tempo t₁), a intensidade de todas as bandas do monômero continuam diminuir e a absorção em 413 nm também começa a diminuir. Indicamos este momento como o começo da terceira etapa das mudanças. Neste momento, aparecem e começam a crescer duas bandas centradas em 491 nm 707 nm (Figura 3.5). Este processo está caracterizado por um tempo característico t₂, definido como um tempo

médio de crescimento. O procedimento da determinação dos tempos t_1 e t_2 é apresentado na Figura 3.4.

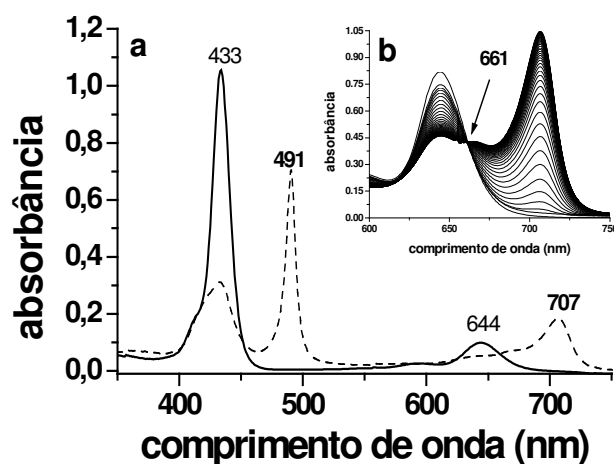


Figura 3.5) (a) Espectros de absorção de $[TPPS_4] = 15 \mu\text{M}$ em pH 4.0 na ausência (–) e na presença de $[\text{NaCl}] = 0.3 \text{ M}$ após 60 min (---); caminho ótico 0.2 cm. (b) Espectros de absorção de $[TPPS_4] = 25 \mu\text{M}$ na presença de $[\text{NaCl}] = 0.1 \text{ M}$, em função do tempo.

Ambos os tempos t_1 e t_2 diminuem de horas para segundos quando as concentrações de porfirina e/ou NaCl aumentam, conforme mostra a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Características temporais das mudanças de absorção ótica de TPPS₄ em função da concentração de NaCl e porfirina.

[NaCl] (M)	[TPPS ₄] = 15 μM			[TPPS ₄] = 25 μM		
	A ₇₀₇	t ₁ (min)	t ₂ (min)	A ₇₀₇	t ₁ (min)	t ₂ (min)
0.6	0.65	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.3	---	---	---
0.5	0.80	1.6 ± 0.3	1.0 ± 0.3	---	---	---
0.4	0.84	2.7 ± 0.3	2.1 ± 0.3	1.52	0.5 ± 0.3	0.77 ± 0.3
0.3	0.84	3.1 ± 0.3	1.9 ± 0.3	1.50	1.0 ± 0.3	0.6 ± 0.3
0.2	0.75	4.0 ± 0.3	5.0 ± 0.3	1.45	0.7 ± 0.3	1.1 ± 0.3
0.15	0.62	11.0 ± 0.3	10.3 ± 0.3	1.34	1.3 ± 0.3	1.5 ± 0.3
0.08	---	> 60	---	0.92	11.3 ± 0.3	12.8 ± 0.3

Assim, pode-se verificar que o efeito de NaCl nas características espectrais da TPPS₄ é complexo e inclui várias etapas. A primeira etapa referente à queda rápida da absorção associamos com a formação, devido a atração eletrostática, de uma nuvem de cátions Na⁺ ao redor da molécula aniônica (H₄²⁺ TPPS₄⁴⁻). Confirmamos a formação dessa nuvem através da determinação do pK_a da porfirina na presença e na ausência de NaCl (apresentado na próxima sessão) e dados de fluorescência discutidos posteriormente.

Determinação do ponto de pK_a de TPPS₄ na ausência e na presença de NaCl

Titulações de soluções de TPPS₄ em função do pH foram realizadas na ausência e na presença de NaCl, sendo medidos em seguida os respectivos espectros de absorção para cada solução. A região de pH variou entre 2.0 e 10 na ausência de NaCl e entre 3.0 e 7.0 na presença do sal. A concentração de NaCl utilizada foi de 0.3 M.

Foram escolhidas as evoluções de dois picos de absorção da porfirina com a variação do pH, sendo um em 515 nm, que é característico para a forma desprotonada da TPPS₄ e outro em 707 nm. O aparecimento da absorção neste comprimento de onda é devido à agregação da TPPS₄ que é característica para a forma protonada da porfirina na presença de NaCl. Com estes dados, plotamos um gráfico de absorbância *versus* pH para os comprimentos de onda escolhidos.

Utilizando o método gráfico, no ponto de inflexão da curva, tem-se o equilíbrio entre as formas protonada e desprotonada da porfirina.

Sendo a equação:

$$pH = pK_a + \log \frac{[Forma.protonada]}{[Forma.desprotonada]} \quad (3.2)$$

No ponto de inflexão teremos:

$$pH = pK_a \quad (3.3)$$

As mudanças nos espectros de absorção de TPPS₄ na ausência de NaCl são apresentadas na Figura 3.6 e na Figura 3.7 são apresentadas as mudanças nos espectros de absorção de TPPS₄ na presença de NaCl.

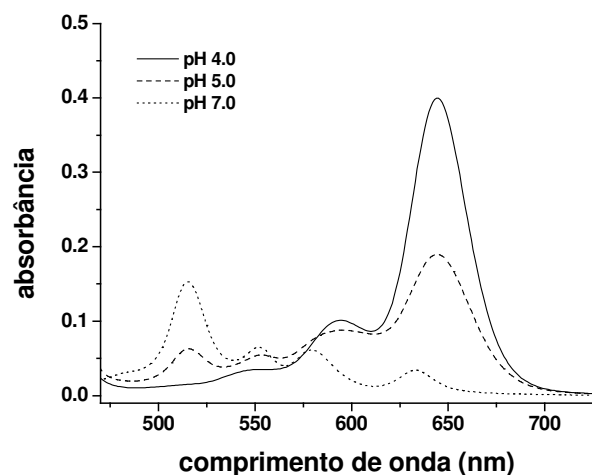


Figura 3.6) Mudanças no espectro de absorção de TPPS₄ em função do pH na ausência de NaCl.

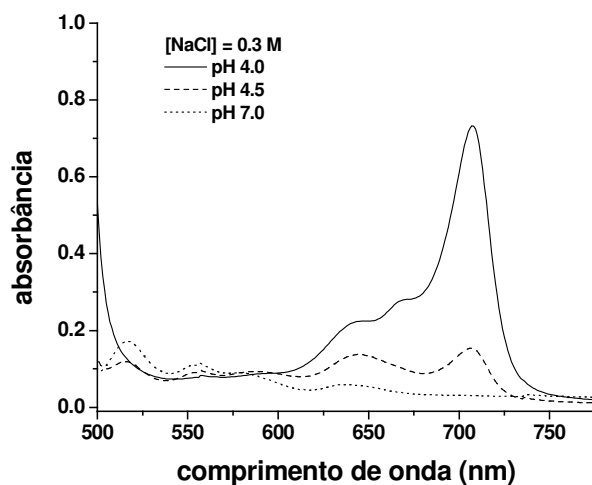


Figura 3.7) Mudanças no espectro de absorção de TPPS₄ em função do pH na presença de NaCl.

O ponto de pK_a determinado para esta porfirina na ausência de NaCl possui valor igual a 5.0 e na sua presença este valor foi reduzido para 4.5, conforme mostra a Figura 3.8.

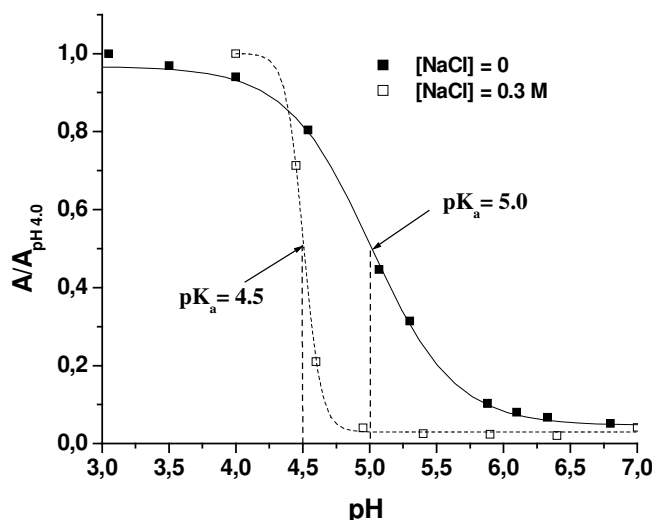


Figura 3.8) Absorvância (A) de $[TPPS_4] = 10 \mu\text{M}$ em função do pH na ausência ($-\blacksquare-$) e na presença ($-\square-$) de NaCl. Na ausência de NaCl A foi determinada em $\lambda = 515 \text{ nm}$ e na sua presença em $\lambda = 707 \text{ nm}$.

O efeito da força iônica no deslocamento do pK_a é conhecido [9]. Esse deslocamento na presença de NaCl é associado com a formação de uma nuvem de Na^+ ao redor da $\text{H}_4^{2+}\text{TPPS}_4^{4-}$. A formação desta nuvem diminui a concentração local de prótons ao redor da molécula da porfirina devido a repulsão eletrostática entre Na^+ e H^+ aumentando assim o valor do pH local próximo da TPPS₄. Por isso para protonar a porfirina é necessário aumentar a concentração de prótons (diminuir pH). Isso se reflete no deslocamento eletrostático do ponto de pK_a (ΔpK_e) observado para valores menores:

$$\Delta pK_e = - e\psi/2.3kT \quad (3.4)$$

em que e é a carga do elétron, ψ é o potencial eletrostático na fase aquosa adjacente à molécula de TPPS₄, produzido pela carga da porfirina e pelo excesso de Na^+ [104].

O resultado obtido está em concordância com os resultados apresentados anteriormente [9] onde o deslocamento do pK_a da TPPS₄ na presença do sal também foi demonstrado.

Formação dos agregados da TPPS₄

A diminuição da absorção do monômero da porfirina nas etapas 2 e 3 indica que a concentração do monômero diminuiu devido à presença do sal. A etapa 2 é caracterizada pelo crescimento da banda em 413 nm. A natureza dessa absorção não está ainda esclarecida. Akins e colaboradores [10] atribuíram a formação desta banda na presença do sal à desprotonação da porfirina, pois a forma deprotonada da TPPS₄ é caracterizada por uma banda centrada em 413 nm. Entretanto, não está claro, neste caso, porque a absorbância relativa desta banda depende das concentrações de NaCl, pois em todos os experimentos a concentração de NaCl utilizada foi ~ 1000 vezes maior que a concentração de TPPS₄. Neste caso, a primeira adição de sal deveria solvatar todas as moléculas de porfirina e o efeito deveria ser independente da concentração de sal, como observamos na etapa 1, relacionada à formação das nuvens de contra-íons.

Além disso, nossos dados mostraram que ainda na presença de $[NaCl] = 0.3 M$ o pK_a se desloca somente até 4.5 e em pH 4.0 a TPPS₄ deveria continuar biprotonada. Foi também mostrado que o período do aumento da absorção em 413 nm pode durar de segundos até horas. Um período tão longo não pode ser associado ao processo de desprotonação.

Nós associamos o aumento da absorção em 413 nm à formação dos agregados da porfirina, cuja banda de absorção possui o máximo próximo a 413 nm. Visto que esta banda aparece deslocada para menores comprimentos de onda quando comparada com a absorção do monômero, nós podemos supor a formação de agregados do tipo H (veja a seção 1.5.3). Esta suposição foi confirmada pelos dados de RLS e fluorescência, que serão discutidos posteriormente.

A etapa 3 das mudanças está caracterizada pela diminuição da absorção dos monômeros e dos agregados H e pela formação de dois novos picos de absorção em 491 e 707 nm. Na literatura, a banda centrada em 491 nm foi atribuída à formação de agregados J da TPPS₄ [9], que se forma devido ao deslocamento da banda do monômero centrada em 433 nm para maiores comprimentos de onda, o que é característico para agregados tipo J (veja a seção 1.5.3).

A banda da absorção em 707 nm foi associada à forma biprotonada derivada da porfirina base livre [10]. Entretanto, em nossos experimentos observamos a mesma dependência temporal para ambos picos (Figura 3.4). Isso indica que a absorção em 707 nm deve ser atribuída também à formação de agregados do tipo J. Provavelmente essa banda aparece devido ao deslocamento da banda do monômero em 644 nm para maiores comprimentos de onda.

Baseados nisso podemos associar a terceira etapa das mudanças dos espectros de absorção da $H_4^{2+}TPPS_4^{4-}$ na presença de NaCl à formação dos agregados J da porfirina.