

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.

2. Fluorescência

Os dados obtidos pelos métodos de absorção ótica estão em concordância com os dados que foram obtidos através de medidas de fluorescência estática e com resolução temporal.

O espectro de emissão de fluorescência da porfirina $TPPS_4$ em pH 4.0 é caracterizado por uma banda com máximo em 671 nm. A adição de NaCl não modifica o perfil do espectro de fluorescência da $TPPS_4$ porém reduz a intensidade de emissão de fluorescência (I_{fl}). O valor de I_{fl} foi corrigido de acordo com as mudanças na absorção da solução:

$$I_{fl} = (A_m/A_{in})I_m \quad (3.5)$$

em que A_{in} é a absorbância inicial no comprimento de onda de excitação (antes da adição de NaCl) e A_m e I_m são as absorbâncias e intensidade de fluorescência medidas na presença de NaCl. A Figura 3.9a mostra os espectros de fluorescência corrigidos na presença de NaCl em função do tempo.

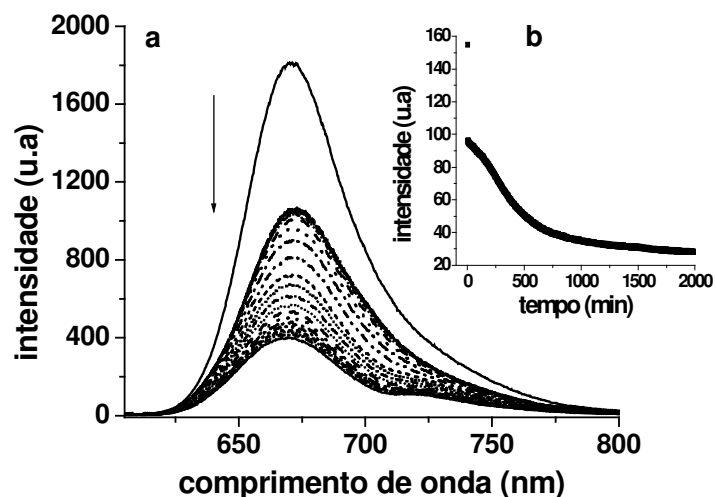


Figura 3.9) (a) Espectro de fluorescência de $[TPPS_4] = 10 \mu M$ em solução aquosa em pH 4.0 na presença de $[NaCl] = 0.4 M$ em função do tempo. (b) Mudanças na intensidade de emissão em 671 nm em função do tempo.

Pode-se ver que a redução no valor de I_{fl} não é devido à redução na absorvância da solução mas refere-se à redução do rendimento quântico de fluorescência (φ_{fl}). De modo similar às mudanças na absorção, a redução observada de φ_{fl} também pode ser dividida em 3 fases.

Primeiramente a adição de NaCl induz a uma forte queda no φ_{fl} que acontece durante um tempo < 10 s. Explicamos esta queda pela supressão da fluorescência devido à formação de uma nuvem de contra íons de Na^+ ao redor das moléculas de $H_4^{2+}TPPS_4^{4-}$. Realmente, o rendimento quântico da fluorescência pode ser apresentado como [95]:

$$\varphi_{fl} = \tau_{fl} / \tau_{rad} \quad (3.6)$$

em que τ_{fl} é o tempo de vida de fluorescência medido e τ_{rad} é o tempo de vida radiativo, o qual pode ser apresentado aproximadamente como

$$\tau_{rad} \cong 1 / (10^4 \epsilon_{max}) \quad (3.7)$$

em que ϵ_{max} é o coeficiente de absorção molar da banda de absorção gerada pela transição $S_1 \leftarrow S_0$. Portanto, a diminuição do φ_{fl} pode estar relacionada à redução de τ_{fl} e/ou de ϵ_{max} . Para a forma biprotonada de $TPPS_4$ esta banda de absorção $S_1 \leftarrow S_0$ possui máximo em 644 nm.

A razão entre o rendimento quântico de fluorescência inicial φ_{fl1} e aquele imediatamente após a adição de NaCl, (φ_{fl2}), pode ser escrita como:

$$\varphi_{fl1}/\varphi_{fl2} = \tau_{fl1}\varepsilon_{max1}CL/\tau_{fl2}\varepsilon_{max2}CL = \tau_{fl1}A_1^{644nm}/\tau_{fl2}A_2^{644nm} \quad (3.8)$$

em que C é concentração da TPPS₄, L é o caminho ótico, $A_1^{644nm} = \varepsilon_{max1}CL$ é a absorção inicial da solução em 644 nm e $A_2^{644nm} = \varepsilon_{max2}CL$ é aquela após a adição de NaCl.

Por outro lado, a razão $\varphi_{fl1}/\varphi_{fl2}$ pode ser calculada diretamente através do espectro de fluorescência como:

$$\varphi_{fl1}/\varphi_{fl2} = I_{fl1}/I_{fl2} \quad (3.9)$$

em que I_{fl1} e I_{fl2} são as intensidades de fluorescência integradas de todo espectro na ausência e na presença de NaCl, respectivamente.

As medidas dos espectros da fluorescência da TPPS₄ foram acompanhadas das medidas do seu tempo de vida usando a técnica de contagem de um único fóton. O τ_{fl} medido na ausência de sal foi de (4.0 ± 0.04) ns, enquanto na presença de todas as concentrações de sal utilizadas este valor foi reduzido para (3.0 ± 0.03) ns (Figura 3.10).

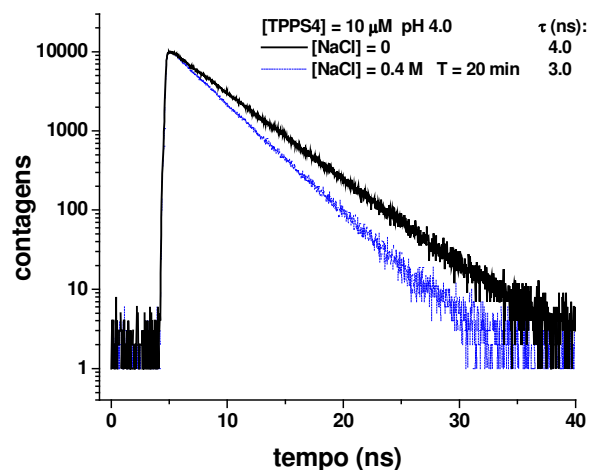


Figura 3.10) Cinética de decaimento da fluorescência de [TPPS₄] = 10 μM em pH 4.0 na ausência e na presença de [NaCl] = 0.4 M.

Na Tabela 2 são apresentadas as razões entre os rendimentos quânticos da fluorescência na ausência (φ_{fl1}) e na presença (φ_{fl2}) de NaCl calculadas através das equações 3.8, $(\varphi_{fl1}/\varphi_{fl2})_1$, e 3.9, $(\varphi_{fl1}/\varphi_{fl2})_2$, usando [TPPS₄] = 15 μM e [NaCl] = 0.3 M.

Tabela 3.2 Rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) da TPPS₄ na presença de [NaCl] = 0.3 M obtido pela análise da absorbância em $\lambda = 644$ nm e pela intensidade de fluorescência em $\lambda = 671$ nm.

[NaCl] (M)	τ_f (ns)	$A_{644\text{ nm}}$	$(\phi_{f1}/\phi_{f2})_1$	I_f (u.a)	$(\phi_{f1}/\phi_{f2})_2$
0	4.0	0.48	1.6	104000	1.6
0.3	3.0	0.40		65000	

Pode-se ver, que os valores de ϕ_{f1}/ϕ_{f2} obtidos por ambos os métodos são iguais. Baseados nestes resultados podemos afirmar que a queda inicial da I_f ocorre devido à redução do ϕ_f induzida pela formação da nuvem de contra-íons ao redor das moléculas de porfirina. O efeito da formação da nuvem inclui dois fatores:

1. Redução do tempo radiativo τ_{rad} que é refletido pela redução da absorção;
2. Redução do tempo de vida do estado S_1 , devido ao aumento da probabilidade da perda da energia de excitação pelos processos não radiativos.

Em seguida a intensidade I_f continua a diminuir (Figura 3.9b). Na figura 3.11 é apresentado o perfil de decaimento da I_f (curva a) da solução de [TPPS₄] = 15 μ M na presença de [NaCl] = 0.2 M em comparação ao perfil da mudança na absorção em $\lambda = 413$ nm, associado à mudança na concentração de agregados H, (curva b) e em $\lambda = 707$ nm, associado à formação de agregados J (curva c).

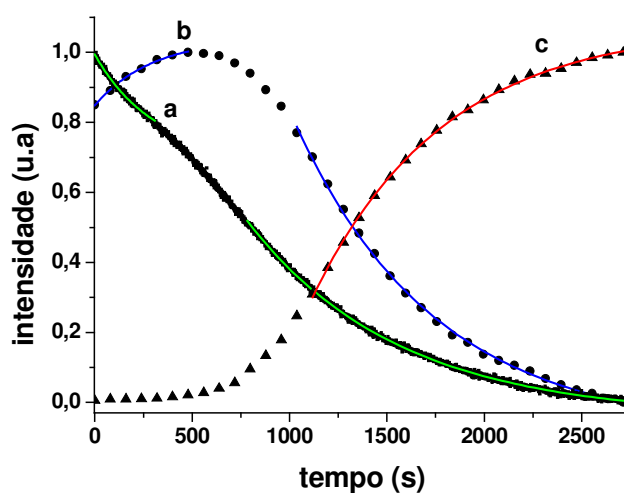


Figura 3.11) Perfis cinéticos de decaimento da intensidade de fluorescência em 671 nm (curva a) da solução de [TPPS₄] = 15 μ M na presença de [NaCl] = 0,2 M em comparação com os perfis de mudança de absorção em $\lambda = 413$ nm (curva b) e em $\lambda = 707$ nm (curva c).

O perfil de decaimento da I_{fl} mostra que este processo pode ser separado em duas fases. Nós associamos a redução de I_{fl} nas fases 1 e 2 à formação de dois tipos de agregados: agregados H formados na fase 2 que são transformados em agregados J durante a fase 3. Esta conclusão é confirmada pela análise do ajuste das curvas das cinéticas de absorção e fluorescência.

Os ajustes do aumento observado na curva de absorção ótica em 413 e 707 nm foram feitos através da seguinte equação:

$$y = y_0 + B [1 - \exp(-t/\tau)] \quad (3.10)$$

Os ajustes das fases 2 e 3 na curva de I_{fl} foram realizados usando a equação

$$y = y_0 + B \exp(-t/\tau) \quad (3.11)$$

Os ajustes mostram que o tempo característico da primeira fase relativa à redução da I_{fl} (360 ± 30 s) está de acordo com aquele observado na formação dos agregados H (330 ± 40 s), e o da parte na redução da I_{fl} (770 ± 30 s) possui o tempo característico igual aquele observado para a formação dos agregados J (740 ± 40 s). Baseados nisso podemos associar as duas fases de decaimento da I_{fl} à redução do ϕ_{fl} induzida pela formação seqüencial de dois tipos de agregados da $H_4^{2+}TPPS_4^{4-}$. O fato que a agregação diminui o rendimento quântico da fluorescência é conhecido na literatura [12, 46].

3. Espalhamento de Luz Ressonante (RLS)

A fim de confirmar que o NaCl realmente estimula a formação dos agregados da $H_4^{2+}TPPS_4^{4-}$ foram realizadas medidas de espalhamento de luz ressonante (RLS). A intensidade do RLS é proporcional ao quadrado do volume da partícula espalhadora e portanto, pode fornecer informações sobre a formação e a dinâmica deste processo.

Na ausência de NaCl foi observado somente um fraco espalhamento dos monômeros de porfirina (Figura 3.12, curva a). Infelizmente, devido a necessidade de estabilizar a amostra, a resolução temporal do método não é suficiente para medir as mudanças do espalhamento relacionadas à etapa inicial que aparece após a adição de NaCl. Por isso observamos o espalhamento relacionado já a segunda etapa das mudanças dos espectros de absorção, que associamos à formação dos agregados H da

porfirina. Este espalhamento é caracterizado por um espectro diferente daquele do monômero, com uma intensidade várias vezes maior (Figura 3.12, curva b). Em seguida este espectro de RLS é substituído por outro (Figura 3.12, curva c). A dinâmica desse processo é mostrada na Figura 3.13.

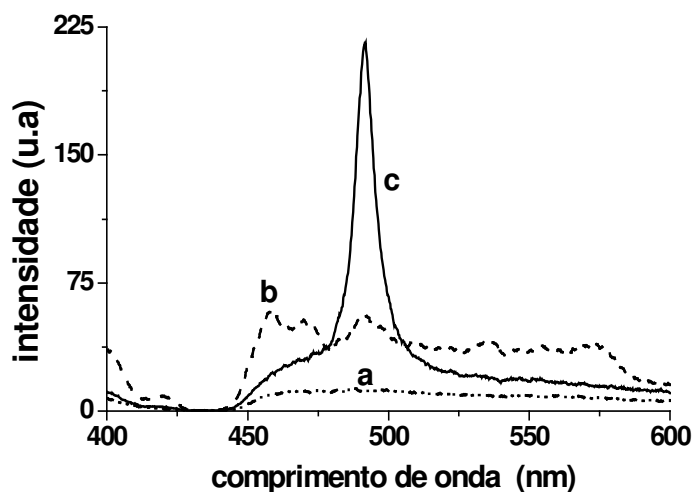


Figura 3.12) a) Espectro de espalhamento de luz ressonante de $[TPPS_4] = 10 \mu\text{M}$ em pH 4.0: (a) monômeros, na ausência de NaCl; (b) agregados H e (c) agregados J, na presença de $[\text{NaCl}] = 0.4 \text{ M}$.

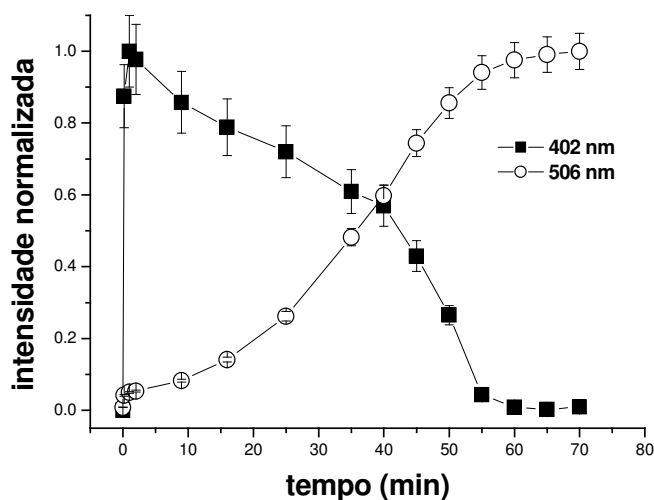


Figura 3.13) Dinâmica de espalhamento da solução aquosa de $[TPPS_4] = 10 \mu\text{M}$ em pH 4.0 na presença de $[\text{NaCl}] = 0.4 \text{ M}$ em $\lambda = 402$ e 506 nm .

O espectro de espalhamento igual ao referente à última fase das mudanças foi observado anteriormente por Pasternack e seus colaboradores [99]. Esse espectro foi associado à formação dos agregados J da $TPPS_4$. Portanto, podemos também atribuir

esta última fase à formação dos agregados J da porfirina. O aparecimento de duas formas na solução, caracterizadas por dois diferentes espectros de espalhamento, confirma nossa suposição feita com base nos dados de absorção ótica sobre a formação de dois tipos de agregados de porfirina na presença de NaCl. Inicialmente, são formados os agregados H caracterizados pelo espectro mostrado na Figura 3.12, curva b, os quais são substituídos por agregados J com espectro mostrado na Figura 3.12, curva c.

Foi observado um dramático crescimento (≈ 140 vezes) da intensidade do espalhamento no processo de formação progressiva dos agregados J (Figura 3.14). A Figura 3.15 mostra como varia a dinâmica de crescimento da intensidade do RLS em soluções de TPPS₄ na presença de diferentes concentrações de NaCl, indicando que os tempos característicos t_1 e t_2 deste processo diminuem com o aumento da concentração de NaCl presente na solução.

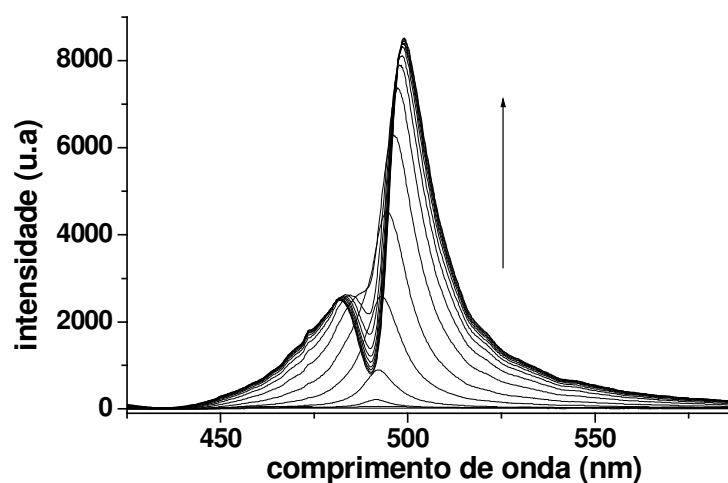


Figura 3.14) Espectro de espalhamento (3ª fase) de [TPPS₄] = 10 μ M em solução aquosa em pH 4.0 na presença de [NaCl] = 0.4 M em função do tempo.

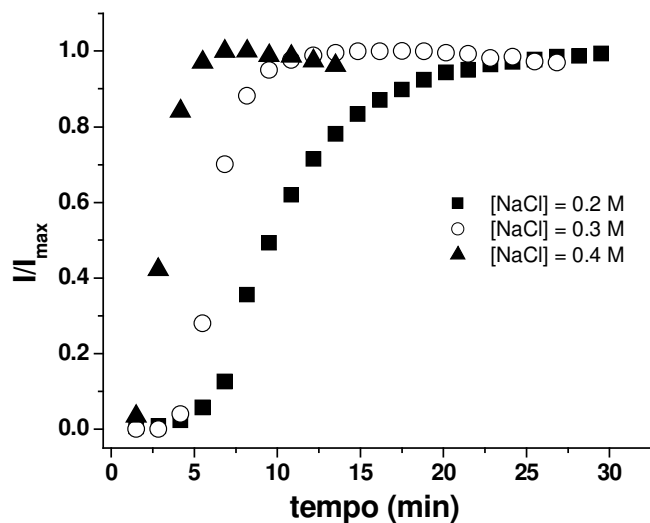


Figura 3.15) Perfil cinético do espalhamento em $\lambda = 500 \text{ nm}$ da solução aquosa de $[\text{TPPS}_4] = 15 \mu\text{M}$ em pH 4.0 em função da concentração de NaCl.

Na Figura 3.16 são comparados os perfis cinéticos de formação dessa nova espécie medidos através de absorção ótica e espalhamento. Pode-se observar que o perfil da dependência temporal das curvas de RLS é similar àquele de absorção. Entretanto o tempo característico t_2 do processo obtido por espalhamento sempre é menor do que aquele obtido por absorção. Esta diferença será discutida posteriormente.

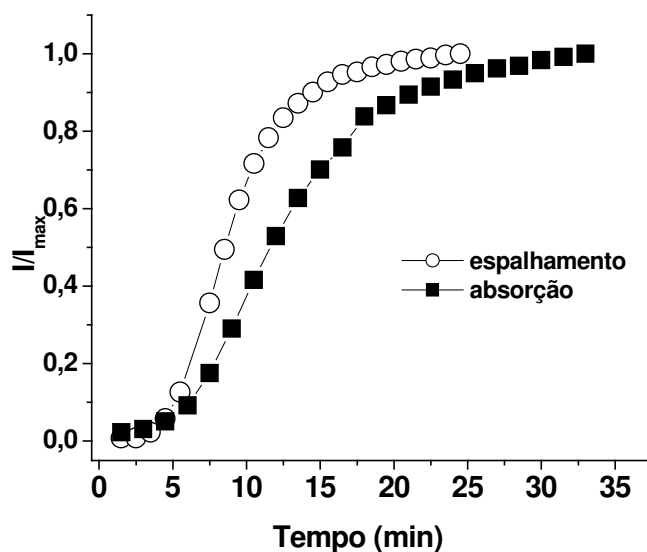


Figura 3.16) Mudanças na intensidade de absorção e espalhamento da solução aquosa de $[\text{TPPS}_4] = 15 \mu\text{M}$ em pH 4.0 na presença de $[\text{NaCl}] = 0.2 \text{ M}$ em função do tempo.

Discussão

Baseados nos resultados apresentados podemos concluir que o processo de agregação da porfirina TPPS₄ na sua forma biprotonada é caracterizado por 3 etapas. Inicialmente, a adição de NaCl na solução de TPPS₄ induz a formação de uma nuvem de contra íons Na⁺ ao redor das moléculas de porfirina. A segunda etapa envolve a formação de agregados H que na terceira etapa se reestruturam em agregados J.

As primeiras informações sobre a agregação da porfirina TPPS₄ foram apresentadas em [51] onde o autor demonstrou a dimerização da TPPS₄ em solução aquosa homogênea numa concentração de 3×10^{-4} M e a formação de tetrâmeros em maiores concentrações. A formação de agregados em meio ácido (pH<3.0) na presença de sal foi primeiramente demonstrada em [9] onde os autores afirmaram a formação de agregados J e H da TPPS₄ em concentrações $> 5 \times 10^{-5}$ M. Porém nossos resultados mostram que a formação de agregados pode ocorrer em menores concentrações de TPPS₄ (10^{-6} M), ainda em pHs maiores (até 4.8).

Mais do que isso, os resultados obtidos em nosso estudo estão em contradição com as conclusões do trabalho [9]. Nesse trabalho os autores afirmam que o tipo de agregado formado depende somente da concentração da TPPS₄ e que a formação dos agregados J acontece em baixas concentrações de TPPS₄, sendo que com o aumento da concentração de porfirina aparecem também os agregados H, os quais são mais energeticamente favoráveis (estáveis). Nesse contexto não é claro porque as estruturas mais energeticamente estáveis se formam somente em concentrações maiores do que as estruturas menos estáveis.

Pelo contrário, nossos resultados mostram que independentemente da concentração da TPPS₄ o processo de sua agregação envolve a formação inicial de agregados H os quais com o passar do tempo são substituídos por agregados J.

Os resultados apresentados em [9] mostram que acima de $[TPPS_4] = 10^{-4}$ M a absorção característica dos agregados J é proporcional àquela dos agregados H. Este fato pode estar associado à formação, em altas concentrações de porfirina, de agregados de estrutura mista que possuem as características espectrais de ambos os tipos J e H. A

formação de estruturas deste tipo já foi confirmada em [105], onde foi observado que em altas concentrações de porfirina os agregados possuem a estrutura em forma cilíndrica.

O fato da formação dos agregados J da TPPS₄ na forma biprotonada foi confirmado em vários trabalhos. Pasternack e seus colaboradores foram os primeiros a apresentar uma cinética do tipo S na formação de agregados J da TPPS₄ [99]. Esta cinética é caracterizada por um período de indução, cuja duração depende da concentração de TPPS₄ e das condições externas (pH, força iônica, etc). A cinética foi analisada com detalhes, incluindo sua modelagem matemática, por Pasternack e co-autores [99]. Os autores associaram a presença do período de indução à formação de uma espécie intermediária da TPPS₄. Entretanto, a natureza dessa espécie até o momento não foi esclarecida. Nós associamos este período de indução à formação dos agregados H e sua reconstrução, durante tal período, em agregados J.

Devemos anotar que além da absorção em 413 nm não observamos nenhuma outra banda de absorção que possa ser associada com a formação dos agregados H.

Um fator importante é como o espectro de absorção do agregado depende do número de agregação. Analisando as mudanças espectrais na formação dos agregados J observamos a presença de um ponto isosbético em 661 nm, que está localizado entre o pico de absorção do monômero em 644 nm e o pico de absorção dos agregados J em 707 nm (Figura 5b). Este fato indica que durante o processo de agregação somente duas espécies com absorção bem definida na região $550 < \lambda < 750$ nm estão presentes na solução. Isto significa que a absorção dos agregados J de TPPS₄ não depende do número de agregação e é determinada pela absorção de monômeros de porfirina dentro de agregados de vários tamanhos.

Podemos fazer as mesmas conclusões se compararmos as cinéticas de decaimento da absorção do monômero com as cinéticas de aumento da absorção dos agregados (Figura 3.4).

De acordo com os dados experimentais,

$$\frac{dA_{707}}{dt} = -K \frac{dA_{644}}{dt} \quad (3.12)$$

em que A_{707} e A_{644} são as absorvâncias em 707 e 644 nm, respectivamente e K é uma constante de proporcionalidade.

Por outro lado,

$$\frac{dA_{644}}{dt} = \varepsilon_{644} l \frac{d[TPPS_4]}{dt} \quad (3.13)$$

portanto,

$$\frac{dA_{707}}{dt} = -K \varepsilon_{644} l \frac{d[TPPS_4]}{dt} \quad (3.14)$$

e

$$A_{707}(t) = K \varepsilon_{644} l \{ [TPPS_4]_0 - [TPPS_4]_{mon} \} = K \varepsilon_{644} l [TPPS_4]_{agr} = \varepsilon_{707} l [TPPS_4]_{agr} \quad (3.15)$$

em que ε_{644} e ε_{707} são os coeficientes de absorção molar em 644 e 707 nm, $[TPPS_4]_0$ e $[TPPS_4]_{mon}$ são as concentrações inicial e variável dos monômeros de porfirina, respectivamente, e $[TPPS_4]_{agr}$ é a concentração dos monômeros de porfirina dentro dos agregados. Portanto, podemos ver que a absorvância A_{707} é determinada pelo coeficiente de absorção molar do monômero dentro do agregado.

Dependendo do método de determinação e das condições experimentais, o número médio de agregação para os agregados J de $TPPS_4$ varia de 5 [106] até 610000 [97]. Utilizando o modelo simplificado de espalhamento Rayleigh, calculamos o número de agregação n em pH 4.0 utilizando os dados de RLS para 15 μ M de $TPPS_4$ e três concentrações de NaCl: 0.2 M, 0.3 M e 0.4 M.

A aplicação deste modelo baseia-se no fato de que a intensidade de RLS pode ser apresentada como (veja seção 2.4.3)

$$I_{RLS} = K V_1^2 C_m \quad (3.16)$$

$$I_{RLS_{ag}} = K V_{ag}^2 C_{ag} = K C_{ag} V_1^2 n^2 = K (C_{agm}/n) V_1^2 n^2 = K C_{agm} V_1^2 n = K C_{agm} n \quad (3.17)$$

em que K é um coeficiente de proporcionalidade, $V_{ag} = V_1 n$ é o volume médio do agregado e V_1 o volume do monômero, C_{ag} e C_{agm} são as concentrações dos agregados e dos monômeros agregados, respectivamente. No caso em que toda a porfirina está

agregada a concentração dos monômeros agregados é igual a concentração inicial da porfirina.

Calculando a razão entre a intensidade inicial I_{RLSi} e a final, I_{RLSf} , obtivemos o número de agregação dos agregados J:

$$n = I_{RLSf}/I_{RLSi} \quad (3.18)$$

Para as condições experimentais citadas acima obtivemos o mesmo valor, $n = 120 \pm 20$. Surpreendentemente, o número de agregação demonstrou uma fraca dependência com a concentração de sal.

A intensidade relativamente baixa do espalhamento dos agregados H mostra que seu número de agregação não é muito alto (em torno de 6).

Os experimentos mostram que o tempo t_2 , característico para a formação dos agregados J, obtido por absorção ótica é maior do que o obtido por RLS sob condições similares. Esta diferença ocorre devido ao fato de que a absorção ótica do agregado depende somente da concentração de monômeros agregados enquanto a intensidade de RLS depende do produto de sua concentração e do número médio de agregação de TPPS₄ e, portanto, cresce mais rápido que a absorção ótica do agregado.