

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE, UNICENTRO-PR

**ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE PORFIRINAS
COMPLEXADAS COM Cu^{2+}**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JOYCE LAURA DA SILVA GONÇALVES

GUARAPUAVA-PR

2011

JOYCE LAURA DA SILVA GONÇALVES

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE PORFIRINAS COMPLEXADAS COM Cu^{2+}

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Tania Toyomi Tominaga
Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2011

JOYCE LAURA DA SILVA GONÇALVES

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE PORFIRINAS COMPLEXADAS COM Cu^{2+}

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Centro-Oeste, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, área de concentração em Química Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2011.

Profa. Dra. Katia Cristina Ugolini Mugnol – UMC.

Profa. Dra. Neide Hiroko Takata– UNICENTRO.

Profa. Dra. Tania Toyomi Tominaga
Orientadora

GUARAPUAVA-PR

2011

Aos meus pais Antonio e Maria, pois eles são a fonte incessante e inesgotável que restauram as minhas forças: meu porto seguro em todos os momentos. A Tania, por ser a minha segunda mãe. E também aos que me são queridos, pois em vocês encontro apoio e estímulo para prosseguir o meu caminho tendo a certeza de que nunca estarei sozinha nessa longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Às professoras da banca, **Kátia** e **Neide**, por atenderem prontamente o meu pedido.

Aos meus pais, **Antonio** e **Maria**, pelo amor, carinho, compreensão e incentivo além do apoio financeiro. Agradeço ainda pela dádiva da vida, além da forma sutil como me educaram e a confiança em mim depositada ao longo de todos esses anos.

À **Prof.^a Dra. Tania Tominaga**, na qualidade de amiga e orientadora, primeiramente pela confiança em mim depositada e oportunidade concedida. Posteriormente, por sua incansável paciência e atenção além do exemplo de profissional e pessoa que levarei para sempre comigo. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a dissertação, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade e de dor.

Ao **Prof. Dr. Koiti Araki**, por fornecer os compostos estudados no presente trabalho.

Aos professores **Dra. Janice Perussi** e **Dr. Hidetake Imasato**, pela colaboração neste trabalho e pela forma afável com que abriram as portas do laboratório de Fotossensibilizadores para mim.

Aos professores **Dr. Otaciro Nascimento** e **Dr. Antonio José da Costa Filho** por permitirem o uso dos equipamentos dos laboratórios do grupo de Biofísica Sérgio Mascarenhas e pelas ricas discussões sobre este trabalho.

Aos meus irmãos **Márcio** e **Sandra** por serem os primeiros a me mostrar a importância do trabalho em grupo e aos meus sobrinhos **Gabriela** e **Tiago**, por sua alegria. Aos meus cunhados **Adriana** e **Tiago** por agregarem conteúdo à palavra família.

A **Neusa** graduação pela simpatia, atenção e pelo excelente atendimento.

A **Andressa Pilonetto** por tornar cada dia mais alegre, feliz e aconchegante e por agüentar minhas infundáveis crises de existência além de sua contribuição neste trabalho.

À **Ari, Chris, Andréia** e **Andy** pelo carinho e amizade de cada uma.

Ao **Lucas, Igor** e **Cleber** por não me deixarem desanimar, pelos momentos de descontração que me proporcionaram e por estarem sempre prontos a vir ao meu encontro e salvar a minha pele.

À "**Cráudia**" por me acolher tão bem no laboratório, sua sinceridade hilária e pelos cafés divertidos.

Ao **Silvano** - certamente a minha melhor escolha, pelos momentos mais bizarros de minha vida e sobretudo pela amizade incondicional e apoio a mim prestados.

À **UNICENTRO** pela oportunidade e à **Capes** pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

E finalmente, a **Deus** por me presentear com uma vida repleta de realizações e oportunidades, me dar forças para superar todos os obstáculos que encontrei nos caminhos que escolhi e principalmente por ter colocado cada uma destas pessoas maravilhosas em minha vida.

SUMÁRIO

Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	i
Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	6
2.1. Objetivo geral.....	6
2.1. Objetivos específicos.....	6
3. REFERENCIAL TEÓRICO.	7
3.1. Porfirinas.....	7
3.2. Imagens de Ressonância Magnética.....	12
3.3. Micelas.....	16
3.4. Técnicas Espectroscópicas.....	20
3.4.1. Absorção na Região do Ultravioleta e Visível.....	23
3.4.2. Dicroísmo Circular Magnético (DCM)	26
3.4.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Materiais e Equipamentos.....	36
4.2) Procedimento experimental.....	38
4.3) Análise dos dados	40
5. Resultados e Discussão.....	42
5.1. CuTMPyP	42
5.1.1. Absorção na Região do Ultravioleta e Visível (Uv-Vis).....	42

5.1.2. Dicroísmo Circular Magnético (DCM)	51
5.1.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	54
5.2. CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄.....	60
5.2.1. Absorção na Região do Ultravioleta e Visível (Uv-Vis).....	60
5.2.2. Dicroísmo Circular Magnético (DCM)	71
5.2.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)	74
6. Conclusão.....	79
7. Referências Bibliográficas.....	81

LISTA DE ABREVIACÕES

A_{\parallel} : constante de acoplamento paralelo
 A_{\perp} : constante de acoplamento perpendicular
 A_0 : constante de acoplamento isotrópico
Brij 78: polioxietileno 20 ter estearílico
CTAB: brometo de cetiltrimetilamonio
CuTMPYP: porfirina meso-tetrakis (N-metil-4-piridil) complexada com Cu^{2+}
CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄: porfirina tetra piridil (2-bipiridinil-2-cloro-1-rutênio) complexada com Cu^{2+}
 g_{\parallel} : razão giromagnética paralela
 g_{\perp} : razão giromagnética perpendicular
 g_0 : razão giromagnética isotrópica
IRM: Imagem de ressonância magnética
DCM: Discroismo Circular Magnético
nm: nanmetros
Rm: Ressonância Magnética
RPE: Ressonância Paramagnética Eletrônica
SDS: dodecil sulfato de sódio
TC: Tomografia computadorizada
Uv-vis: Ultra violeta e visível
 λ : comprimento de onda

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Detalhes da natureza dos substituintes de alguns derivados de porfirinas com ocorrência natural.....	8
Tabela 2.	Técnicas Espectroscópicas e seus comprimentos de onda típicos.....	22
Tabela 3.	Valores típicos para espécies paramagnéticas em sistemas biológicos.....	34
Tabela 4.	Valores de concentração micelar crítica dos surfactantes SDS,CTAB e Brij 78.....	38
Tabela 5.	Valores de concentração empregados para as amostras e surfactantes SDS,CTAB e Brij 78 empregados para análise de DCM.....	39
Tabela 6.	Valores de absorvidade molar para diversas metaloporfirinas.....	45
Tabela 7.	Valores de g_0 e A_0 calculados a partir dos espectros de RPE para a porfirina CuTMPyP.....	59
Tabela 8.	Concentração de SDS nas diferentes regiões e comportamento exibido em pH 7,0.....	69
Tabela 9.	Valores de g_{\parallel} , g_{\perp} , A_{\parallel} e A_{\perp} calculados a partir dos espectros de RPE.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura geral da porfirina.....	7
Figura 2.	Formação do agregado micelar.....	17
Figura 3.	Representação esquemática de tipos de micelas.....	18
Figura 4.	Estrutura da membrana celular: a bicamada fosfolipídica cuja cadeia apolar hidrocarbônica se posiciona na parte interior da membrana e a parte polar das moléculas formam a porção posterior da membrana.....	19
Figura 5.	Propagação da radiação eletromagnética.....	20
Figura 6.	Esquema da Interação da onda eletromagnética com uma molécula.....	21
Figura 7.	Espectro Eletromagnético.....	22
Figura 8.	Diagrama esquemático das transições eletrônicas.....	24
Figura 9.	A Radiação incidente (I_0) é atenuada (I) ao passar por uma amostra.....	24
Figura 10.	Absorbância de luz polarizada na (a) ausência de campo magnético e (b) presença de campo magnético.....	26
Figura 11.	Formas de luz polarizada (a) linearmente, (b) circularmente a esquerda e (c) circularmente a direita.....	28
Figura 12.	Diagrama de níveis de energia de um elétron desemparelhado.....	30
Figura 13.	Curva de absorção de um composto paramagnético e sinal registrado no RPE (primeira derivada da absorção) deste composto.....	31
Figura 14.	Orientação de energia do momento magnético $\vec{\mu}$ mínimo, intermediário e máximo (esquerda para a direita) em função do campo magnético H_0 aplicado.....	33
Figura 15.	Estrutura molecular das porfirinas (a) CuTMPyP e (b) CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄	36
Figura 16.	Estrutura molecular dos surfactantes (a) SDS, (b) CTAB e (c) Brij 78.....	37
Figura 17.	Espectro de RPE típico de uma proteína de cobre (benzilamina oxidase) em solução congelada a -150°C.....	40
Figura 18.	(a) Espectros eletrônicos da porfirina CuTMPyP em solução de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L ⁻¹ , pH 7,0 em função do tempo (b) absorção desta porfirina em 425 nm em função do tempo. A concentração de porfirina	

	empregada foi cerca de $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	43
Figura 19.	Espectros de absorção ótica para a porfirina CuTMPyP em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0, em diferentes concentrações. Ampliação na região na banda Q.....	44
Figura 20.	Absorbância em 425 nm em função concentração da CuTMPyP, em tampão acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0.....	44
Figura 21.	Espectros eletrônicos da porfirina CuTMPyP em função da concentração de NaCl. ($[\text{CuTMPyP}] = 12 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).....	45
Figura 22.	Espectros eletrônicos da porfirina CuTMPyP em função da concentração de NaCl. ($[\text{CuTMPyP}] = 12 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).....	46
Figura 23.	Espectros de absorção ótica da porfirina em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em função da concentração de SDS em solução. ($[\text{CuTMPyP}] = 7 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).....	47
Figura 24.	(a) Componentes da deconvolução dos espectros ótico da CuTMPyP em acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$. (b) Contribuições das Frações das três espécies da CuTMPyP existentes no equilíbrio em função da concentração de SDS em solução.....	49
Figura 25.	Absorbância em 425 nm porfirina CuTMPyP em função da concentração do surfactante em pH=7,0 (a) CTAB ($[\text{CuTMPyP}] = 6 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (b) Brij 78 ($[\text{CuTMPyP}] = 8 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).....	50
Figura 26.	Espectros de absorção ótica da porfirina CuTMPyP em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e em meio micelar de SDS, CTAB e Brij 78.....	51
Figura 27.	(a) Espectros de DMC de solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ de CuTMPyP ($40 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss (a) em diferentes valores de pH e (b) na presença de CTAB e Brij 78.....	52
Figura 28.	Espectros de DMC de solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ de CuTMPyP ($40 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss e presença de SDS em diferentes concentrações e pH 7,0.....	53
Figura 29.	Espectros de RPE a temperatura ambiente de CuTMPyP em pH 3,0 e 12,0. ($[\text{CuTMPyP}] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$).....	54
Figura 30.	Espectros de RPE a temperatura ambiente de CuTMPyP pH 7,0 na presença	

	de micelas de CTAB e Brij 78. ([CuTMPyP]= 1mmol.L ⁻¹).....	57
Figura 31.	Espectros de RPE a temperatura ambiente de CuTMPyP em pH 7,0 na presença de SDS abaixo (5,0 x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹) e acima (4,2 x10 ⁻¹ mol.L ⁻¹) da CMC. ([CuTMPyP]= 1mmol.L ⁻¹).....	58
Figura 32.	Análise do comportamento espectroscópico da porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ } em solução de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L ⁻¹ e pH 7,0 . (a) Espectros eletrônicos da porfirina em função do comprimento de onda e (b) absorção em comprimento de onda máximo de 409 nm em função do tempo. A concentração de porfirina empregada foi cerca de 1,0x10 ⁻⁶ mol.L ⁻¹	61
Figura 33.	(a) Espectros de absorção ótica para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ } em solução de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L ⁻¹ em diferentes concentrações. (b) Absorbância em 409 nm em função concentração da CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ }, em tampão acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L ⁻¹ e pH 7,0.....	61
Figura 34.	(a) Espectros eletrônicos da porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ } em função da concentração de NaCl.(b) Contribuições das frações monoméricas e não monoméricas em função da concentração de NaCl.....	62
Figura 35.	Espectros de absorção na região do ultravioleta e visível da porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ } em função do pH em solução acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L ⁻¹	63
Figura 36.	Componentes da deconvolução dos espectros ótico da CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ } em acetato fosfato de sódio 0,02 mol/L em função do pH.....	64
Figura 37.	Contribuições das Frações das três espécies da CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ } existentes no equilíbrio em função do pH.....	65
Figura 38.	Absorbância em 413 nm porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ } em função da concentração do surfactante em pH=7,0 (a) CTAB ([CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ }]=0,8µmol.L ⁻¹); (b) Brij 78 ([CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ }]= 0,7 µmol.L ⁻¹) e (c) SDS ([CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ }]= 0,8 µmol.L ⁻¹).....	66
Figura 39.	Espectros de absorção ótica da porfirina em solução de acetato fosfato de	

	sódio 0,02 mol.L ⁻¹ em função da concentração de SDS em solução. ([CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄]= 1,0 μmol.L ⁻¹).....	68
Figura 40.	Componentes da deconvolução dos espectros ótico da CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ em acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L ⁻¹	69
Figura 41.	Contribuições das Frações das três espécies da CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ existentes no equilíbrio em função da concentração de SDS em solução.....	70
Figura 42.	Espectros de DMC da porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ (1x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss em diferentes meios e valores de pH.....	71
Figura 43.	Espectros de DMC da porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ (1x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss em pH 7,0 na ausência e presença de micelas de CTAB e Brij 78.....	72
Figura 44.	Espectros de DMC da porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ (1x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss em solução tampão de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L ⁻¹ na presença de SDS em diferentes concentrações.....	73
Figura 45.	Espectros de RPE a 77k da porfirina CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ em pH 2,0; 7,0 e 12,0. ([CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄]= 1mmol.L ⁻¹).....	74
Figura 46.	Espectros de RPE à 77 K de CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ em pH 7,0 na presença de micelas de CTAB e Brij 78. ([CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄]= 1mmol.L ⁻¹).....	76
Figura 47.	Espectros de RPE à 77 K de CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄ em pH 7,0 na presença de SDS abaixo (4,0 x10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹) e acima (1,0 x10 ⁻² mol.L ⁻¹) da CMC. ([CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄]= 1mmol.L ⁻¹).....	77

RESUMO

Joyce Laura da Silva Gonçalves. Estudos Espectroscópicos de Porfirinas Complexadas Com Cu^{2+} .

As porfirinas são interessantes devido as suas favoráveis características de aplicação biomédicas. Estudos mostram que as metaloporfirinas paramagnéticas têm apresentado resultados promissores como agentes de contraste em imagens por ressonância magnética nuclear. Em meio aquoso, estes compostos têm a capacidade de formar agregados moleculares que minimizam sua eficiência para fins terapêuticos. Portanto, o estudo das propriedades espectroscópicas de porfirina na presença de sistemas biofísicos modelo pode subsidiar uma maior compreensão da interação das porfirinas com tecidos existentes em meio fisiológico. No presente trabalho, foram utilizadas técnicas espectroscópicas para investigar a influência do pH, força iônica em duas porfirinas complexas com Cu^{2+} : meso-tetrakis (N-metil-4-piridil), CuTMPyP e meso-tetrakis(2-bipiridinil-2-cloro-1-rutênio) CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ e interação destas com sistemas biofísicos modelo. Como modelo simplificado de membranas utilizou-se os surfactantes iônicos brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), dodecil sulfato de sódio (SDS) e o surfactante não iônico éter estearílico de polioxietileno 20 (Brij 78) na forma micelar. Os espectros eletrônicos mostraram que o comportamento espectroscópico da CuTMPyP foi independente do pH e da força iônica, pois variando-se o pH de 0,5 a 13,0 apenas uma espécie é observada em solução. Na presença de surfactantes foi observado que devido a fatores eletrostáticos não há uma interação efetiva dessa porfirina com as micelas de CTAB e BRIJ 78. Entretanto, na presença de SDS foi observada uma interação efetiva entre a porfirina e as micelas de SDS. Com o aumento da concentração de SDS em solução observou-se um decréscimo gradual na intensidade da banda de Soret inicialmente centrada em 425 nm até que a concentração de SDS atinja $3,12 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente a essa concentração inicia-se um deslocamento espectral para comprimento de ondas maiores e a intensidade de absorção da banda de Soret passa a aumentar com o aumento da concentração de SDS. Portanto, devido à interação preferencial com micelas aniônicas, ressalta-se a importância do fator eletrostático. Esses resultados foram confirmados por RPE e DCM. A estrutura hiperfina correspondente ao acoplamento com os quatros nitrogênios do anel macrocíclico. Não foram identificadas mudanças em função do pH nos ligantes axiais ao Cu. O valor calculado foi $g_0 \approx 2,075$. Para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ foram observadas três espécies distintas em solução, cujos valores de pH de transição foram $\text{pK}_1 = 3,5 \pm 0,5$ e $\text{pK}_2 = 10,6 \pm 0,6$, para as formas diprotonada, monoprotônica e desprotonada. Neste caso, o comportamento espectral da porfirina sofre influência da força iônica, quando da presença de NaCl com concentração superior a $5,9 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$. Não há interações efetivas entre a porfirina e os surfactantes CTAB e Brij 78. Todavia, a uma intensa interação com o surfactante aniônico. Um decréscimo da banda de Soret centrada em 417 nm foi observado com o aumento da concentração de SDS em solução até uma concentração igual a $5,1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente, um discreto efeito batocrômico foi observado. Cita-se novamente, a influência dos fatores eletrostáticos. Os resultados de DCM e RPE corroboram com os obtidos por UV-Vis. A estrutura hiperfina resultante da interação dos elétrons π delocalizados sobre os núcleos de nitrogênios foram observado apenas na presença de micelas de SDS. Os espectros de RPE a 77K apresentam simetria axial com $g_{\parallel} \approx 2,345$ e $g_{\perp} \approx 2,026$ na presença e ausência de micelas.

Devido à alta concentração de ambas as porfirinas empregadas, apenas a forma livre da porfirina e sua interação com micelas de SDS foram observadas através de DCM e RPE. Em suma, os fatores eletrostáticos se apresentaram como o fator mais importante no processo de interação das porfirinas.

Palavras chaves: porfirina, espectroscopia, micelas.

ABSTRACT

Joyce Laura da Silva Gonçalves. Spectroscopies studies of porphyrins complexed with Cu^{2+}

Porphyrins are very interesting because their favorables characteristics on biomedical applications. Paramagnetic metalloporphyrins have been studied and were exhibited promising results as contrast agents in nuclear magnetic resonance imaging. In aqueous medium, these compounds have the ability to form aggregates that minimize their effectiveness for therapeutic purposes. Therefore, the investigation of properties of porphyrin in the presence of biological systems model can support a better understanding of the interaction of porphyrins with tissues in the blood. In the present study we used spectroscopic techniques, to investigated the influence of pH, ionic strength in the two porphyrins complexed with Cu^{2+} : meso-tetrakis (N-methyl-4-pyridyl), CuTMPyP and meso-tetrakis(2-bipyridinil-2-chlorine-1-ruthenium) CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl₄}, and their interaction with biological model systems. As model systems we used the cationic surfactant cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), the nonionic polyoxyethylene stearyl ether (20) (Brij 78) and anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) in micellar form. The optical absorption showed that the CuTMPyP was insensitive in the pH range of 0,5 to 13,0 and only one specie was observed. This porphyrin were not influenced by ionic strength. No significant interaction of porphyrin with micelles of CTAB and Brij 78 were occurred. However, in the presence of SDS an effective interaction of porphyrin and SDS was observed. Optical spectra reveal a decrease of de Soret band at 425 nm with increasing SDS concentration until $3,12 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Over this range there is a small red shift in the Soret band and its absorbance increasing with SDS concentration. In conclusion, due to preferential interaction with anionic micelles, the electrostatic factor seems to be more relevant. This result was confirmed by EPR and MCD results. A superhyperfine structure corresponds to four equally coupled nitrogens, i.e., nine lines pattern was observed. Then in the used pH range there is neither change in the binding of Cu in the porphyrin ring nor axial ligands exchanges. The value of $g_0 \approx 2,075$ was calculated. Three distinct species in solution equilibrium to the optical absorption spectrum for CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl₄} were showed. The $\text{pK}_1 = 3,5 \pm 0,5$ and $\text{pK}_2 = 10,6 \pm 0,6$, whose forms are diprotonated, monoprotonated and no protonated were reported. In this case, the ionic strength above $5,9 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ were denoted. No significant interaction of porphyrin with micelles of CTAB and Brij 78 were occurred again. However, there was a high interaction with anionic surfactant. A decrease of de Soret band at 417 nm with increasing SDS concentration until $5,1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ were observed. Thereafter, a small red shift in the Soret band and its absorbance increasing with SDS concentration were observed. One more time, the electrostatic factor was very relevant. The MCD and EPR were in agreement with this results. The hyperfine structure resulted from the interaction between delocalized π electron and N magnetic nuclei was just observed in presence of SDS micelles. EPR data at 77 K presented a typical axial spectrum with $g_{//} \approx 2.345$ and $g_{\perp} \approx 2.026$ for all situations. Due to high concentration of both porphyrins used, only free form of porphyrin and theirself interaction of SDS micelles were observed in MCD and EPR spectra. Moreover, the electrostatic factor proved to be the most important factor in interactions of porphyrins.

Keywords: porphyrins, spectroscopy, micelles.

1. INTRODUÇÃO

Porfirinas são sistemas cíclicos conjugados constituídos de quatro pirróis ligados por pontes de carbono. Estes compostos são capazes de sofrer complexação a íons metálicos através dos átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos, denominadas, então porfirinas metaladas.

Devido ao sistema conjugado presente nas porfirinas formado por grupos de átomos ligados covalentemente, denominados cromóforos, suas transições de mais alta energia ocorrem principalmente na região do visível do espectro eletromagnético, próximo a 410 nm.

A alta simetria e a combinação do grande número de anéis aromáticos coordenados ao metal central tornam as porfirinas versáteis do ponto de vista químico. Na natureza as porfirinas e macrociclos semelhantes como clorinas e bacterioclorinas são encontradas com diferentes funções, particularmente as complexadas a metais. Como exemplo, cita-se o grupo prostético da heme proteína que tem seu papel biológico diversificado incluindo transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), transferência eletrônica (citocromos) e biocatálise (catalase, peroxidase, citocromo P450) ¹. Dentre as metaloporfirinas, cita-se a clorofila, uma porfirina que contém o magnésio, que é o pigmento fotossintético das plantas e a vitamina B₁₂, uma porfirina complexada com cobalto ²⁻⁵.

Os estudos com porfirinas e seus derivados têm se popularizado consideravelmente na ciência, principalmente nas áreas químicas e biológicas. Isso se deve particularmente a algumas características que esses compostos exibem: alta afinidade pelos tecidos tumorais, atividade fotodinâmica, alta fotoestabilidade, baixa toxicidade e intensa absorção espectral, em torno de 600 nm, onde os tecidos biológicos absorvem luz ⁶. Devido a essas características específicas, algumas porfirinas, têm sido exploradas na medicina. A localização preferencial de certas porfirinas em células tumorais, juntamente com a habilidade de atuar como fotossensibilizador na produção da espécie altamente reativa denominada oxigênio singlete, que por sua vez exerce ação citotóxica, tem sido usado extensivamente em Terapia Fotodinâmica (TFD) ¹. Quando complexadas com um metal paramagnético estes compostos são explorados como agente de contraste em imagens por ressonância magnética nuclear (IRM).

IRM tornaram-se uma sofisticada e promissora técnica em diagnósticos clínicos. Ressaltam-se suas características favoráveis: o não uso de radiação ionizante, a alta resolução e contraste que elas exibem e a possibilidade de obtenção de imagens funcionais ⁷. Além disso, esta técnica tem causando um impacto revolucionário no campo de imagens satisfatórias médicas não

invasivas e encontrando um crescente número de aplicações em ciências biológicas.

Com o interesse crescente e desenvolvimento de pesquisas de importância crucial da química e física dos processos biológicos, a espectroscopia de ressonância magnética aplicado a medicina surgiu como uma ferramenta útil para a caracterização do tecido humano e da organização dos sistemas biológicos. Seu uso tem rendido uma quantidade considerável de informações sobre os processos vitais, tanto em organismos simples como nos mais complexos sistemas vivos. Atualmente, utiliza-se a IRM principalmente para obter informações sobre processos metabólicos e detalhes estruturais em mamíferos in vivo.

Apesar da IRM já apresentar uma enorme potencialidade referente a contraste, ainda permite a utilização de agentes de contraste que aperfeiçoam a visibilidade das imagens. Para isso, utilizam-se substâncias que apresentem elétrons desemparelhados na camada de valência, contribuindo diretamente na formação do campo magnético local forte, modificando o tempo de relaxação spin/spin (t_1).

Espécies paramagnéticas devido a seus elétrons desemparelhados são agentes eficazes no relaxamento de prótons. Um composto é considerado um ótimo agente de contraste quando tem a capacidade de se fixar especificamente em tecidos cancerosos, podendo assim, retardar o tempo de relaxamento da água. Isso gera uma imagem diferenciada entre o tumor e os tecidos saudáveis vizinhos. Em virtude das porfirinas empregadas neste estudo serem complexadas a um metal paramagnético, neste caso, o Cu^{2+} e também devido à propriedade intrínseca das porfirinas terem adesão seletiva em tumores, justifica-se um estudo dos compostos em questão visando um potencial agente de contraste ^{1,8}.

Derivados porfirínicos tem sido estudados visando uma possível aplicação biomédica devido a uma propriedade intrínseca de adesão seletiva a tecidos tumorais. Desde as investigações iniciais, uma variedade de porfirinas complexadas com íons metálicos paramagnéticos têm sido investigadas como potenciais agentes de contraste. Isso se deve principalmente a relatos de que algumas metaloporfirinas têm alta afinidade por lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) que estão presentes em maior quantidade em tecidos de crescimento anormal e por apresentarem elétrons desemparelhados. Geralmente, os elementos químicos da série dos lantanídeos e o Mn^{2+} são utilizados como agente de contraste neste diagnóstico não invasivo de patologia. Atualmente o íon gadolínio é o elemento mais utilizado clinicamente como agente de contraste. As propriedades paramagnéticas de outros metais, especificamente do manganês e do cobre têm sido exploradas como possíveis agentes de contraste, porém o maior empecilho, até o presente momento, é a sua

toxicidade. Estudos mostram que essa desvantagem pode ser amenizada quando o metal está complexado a uma macromolécula, como por exemplo, o anel macrocíclico de uma porfirina.

Todavia, em solução aquosa as porfirinas têm a capacidade de formar agregados moleculares que minimizam sua eficiência quando utilizados para fins terapêuticos ^{6,9}. Estes agregados ocorrem devido a vários fatores distintos: estéricos e eletrostáticos, força iônica, pH, presença de membranas e proteínas ¹⁰. A protonação pode afetar de maneira crucial a estrutura eletrônica das porfirinas ^{11,12}, bem como sua simetria.

Espécies diméricas (ou poliméricas) podem se formar através de quatro maneiras distintas. A primeira situação é o resultado direto de ligações, ou pontes entre dois ou mais anéis porfirínicos, desde que o espaço existente entre os anéis seja suficiente para que aja interação intramolecular. A segunda é através de ligação covalente envolvendo o centro metálico e moléculas de oxigênio existentes no solvente, frequentemente através de pontes de μ -oxo. A terceira é a associação realizada através de ligações entre os substituintes periféricos, comumente chamada de agregados do tipo J. E, finalmente, a formação de complexos tipo sanduíche, cuja ligação é feita entre os centro metálicos das porfirinas. Para esta situação os agregados são conhecidos normalmente como agregados do tipo H.

Várias metaloporfirinas apresentam tendência a formação de polímeros. As propriedades dos dímeros vêm sendo estudadas em solução aquosa e outros meios. Uma característica interessante é a diferença do espectro ótico entre dímeros e monômeros. Ao contrário do sinal do dímero, o sinal devido ao monômero é intenso e bem definido. Isto torna a absorção eletrônica uma poderosa ferramenta na investigação de possíveis agregações de porfirinas ¹³.

Em função de a droga ser introduzida no paciente geralmente por via intravenosa, a agregação do fármaco inviabilizaria seu uso com este propósito, podendo provocar o entupimento das veias e até mesmo o óbito do paciente. Portanto, um estudo da interação de porfirina com componentes do tecido e do sangue são importantes uma vez que as drogas são introduzidas através da corrente sanguínea em concentrações relativamente altas e podem provocar efeitos colaterais.

Os sistemas biológicos, em sua grande maioria, são extremamente complexos, porém, para um estudo inicial pode-se fazer uso de sistemas mais simples capazes de mimetizar os processos fisiológicos. As membranas celulares são compostos funcionais que se fazem presente no sangue. Dentre suas funções relatam-se fenômenos de penetração, transporte, diferenciação morfológica, entre outros ^{14,15}. Devido à complexidade das membranas biológicas, pode-se fazer uso de modelos mais simples, como detergentes na forma de micelas, para uma avaliação preliminar, a fim de se

obter informações da interação de drogas com as membranas celulares ¹⁶⁻²¹.

Os surfactantes são classificados como catiônico, aniônico ou neutro dependendo do grupo funcional presente na extremidade de sua cadeia carbônica. Existem vários surfactantes diferentes, sendo sua característica comum a formação espontânea de estruturas auto-organizadas acima de uma determinada concentração, denominada micelas. Além de serem empregados como sistemas modelos podem formar agregados moleculares com propriedades especiais interessantes para uma possível aplicação tecnológica de materiais mesoscópicos que são intermediários entre moléculas e sólidos.

Algumas porfirinas iônicas áquo-solúveis interagem com moléculas de surfactantes para a formação de estruturas estáveis de complexos entre porfirinas e surfactantes, isto é, agregados moleculares. A cinética para a formação desses agregados e sua forma estrutural são suscetíveis ao tipo de surfactante (catiônico, aniônico ou neutro). A estrutura destes agregados podem ser controladas pela concentração do surfactante e normalmente são agregados do tipo J e H. Estudos mostram que o processo de formação de agregados do tipo J para a porfirina aniônica H_4TPPS_2 é mais rápido e eficiente na presença de surfactantes catiônicos, sendo que esta agregação pode ser controlada variando-se a concentração do surfactante ²².

Com o intuito de realizar uma avaliação preliminar da potencialidade de porfirina como agente de contraste em IRM, no presente trabalho, investigou-se a influência do pH, força iônica e presença de micelas através de análise espectroscópica da porfirina. Para tanto selecionou-se as porfirinas catiônicas denominadas meso-tetrakis (N-metil-4-piridil) complexada com Cu^{2+} , CuTMPyP e a porfirina tetra piridil (2-bipiridinil-2-cloro-1-rutênio) complexada com Cu^{2+} , CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄. Como sistema biofísico modelo utilizou-se micelas de surfactantes iônicos brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) com propriedades catiônicas, dodecil sulfato de sódio (SDS) com propriedades aniônicas e o surfactante não iônico éter estearílico de polioxietileno 20 (Brij 78).

São comuns os estudos de interações entre porfirinas e os surfactantes aniônico SDS, catiônico CTAB e HPS e o neutro TRITON X-100. Normalmente estes compostos são vastamente empregados devido a sua abundância, uma vez que são facilmente encontrados, bem como pelo seu baixo custo e baixa toxicidade. Entretanto os surfactantes da família Brij são pouco explorados em trabalhos publicados na literatura, apesar de apresentarem as mesmas características favoráveis dos outros surfactantes acima citados. Isto torna seu comportamento perante as porfirinas interessante e também favorece seu uso com o intuito estudos inéditos.

Neste trabalho propõem-se um estudo através de técnicas espectroscópicas: absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), Dicroísmo Circular Magnético (DCM) e Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR). Cita-se que alguns processos como espalhamento de luz, mudanças químicas, agregação e dimerização podem ser observados através das técnicas aqui empregadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Para uma potencial utilização como fármacos, visando o seu uso como agente de contraste em imagem de ressonância magnética, investigar as propriedades eletrônicas das porfirinas CuTMPyP e CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ e a interação destas porfirinas com sistemas biofísicos modelo.

2.1. Objetivos específicos

Analisar a influência do pH e da força iônica no comportamento espectral das porfirinas empregadas.

Investigar a interação das porfirinas complexadas com Cu²⁺ com os surfactantes SDS, CTAB e BRIJ 78 na forma micelar.

Para a realização desse estudo se fez uso de técnicas espectroscópicas: absorção na região do ultravioleta e visível (UV-Vis), Dicroísmo Circular Magnético (DCM) e Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Porfirinas

As porfirinas são compostos cíclicos que contêm quatro anéis pirrólicos ligados entre si por átomos de carbono. A disposição alternada das ligações simples e duplas constitui um sistema eletrônico altamente conjugado possibilitando a visualização de cor da amostra, mesmo que em solução, uma vez que suas transições eletrônicas ocorrem na faixa do visível e ultravioleta próximo do espectro eletromagnético^{3,10}.

As porfirinas em um meio não perturbado normalmente encontram-se em conformação próxima a planar, com espaço suficiente para a inserção de íon metálico central, porém tem a flexibilidade suficiente para que os pirróis, que a compõem, sofram desvios relativos entre si. Efeitos dos ligantes extras em solução podem causar alguns desvios da planaridade. No caso das porfirinas bases livres a protonação e desprotonação pode distorcer o plano molecular. Em metaloporfirinas, este mesmo efeito pode ser causado pela adição de ligantes extras assimétricos²³.

Na Figura 3.1 a estrutura geral de um anel porfirínico pode ser visualizada. A nomenclatura das porfirinas é dada numerando-se com algarismos romanos os anéis pirrólicos de I a IV, e identificando os átomos de carbono pelas letras gregas α , β , γ e δ . A posição dos substituintes é indicada com algarismos arábicos de 1 a 8, sendo ambas as discriminações no sentido horário.

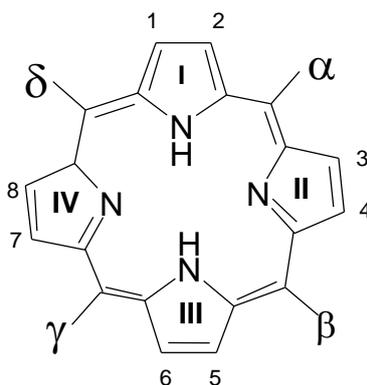


Figura 1. Estrutura geral da porfirina.

Devido a complexidade da nomenclatura, pode-se fazer uso de uma nomenclatura trivial para algumas porfirinas, como mostrado na Tabela 1:

Tabela 1. Detalhes da natureza dos substituintes de alguns derivados de porfirinas com ocorrência natural²³.

Porfirina (carga periférica)	Substituintes							
	1	2	3	4	5	6	7	8
OEP (0)	Et	Et	Et	Et	Et	Et	Et	Et
Etio-P III (0)	Me	Et	Me	Et	Me	Et	Me	Et
Uro-P III (8-)	Ac	P	Ac	P	Ac	iPr	iPr	Ac
Copro-P III (4-)	Me	P	Me	P	Me	iPr	iPr	Me
Meso-P IX (2-)	Me	Et	Me	Et	Me	P	P	Me
Hemato-P IX (2-)	Me	HE	Me	HE	Me	P	P	Me
Proto-P IX (2-)	Me	V	Me	V	Me	P	P	Me
Deutero-P IX (2-)	Me	H	Me	H	Me	C	P	Me
Rhodo-P XV	Me	MEt	Me	Et	Me	H	P	Me
Pyrro-P XV	Me	Et	Me	Et	Me	H	P	Me

onde Me= CH₃; Et=CH₂CH₃; P=CH₂CH₂COOH; V= CH₂=C; HE= CH(OH)CH₃; iPr= CH(CH₃)COOH; Ac=CH₂COOH; C=COOH²³.

As pontes de carbono também são conhecidas como posição meso, logo, porfirinas sintéticas com substituintes nas pontes de carbono são chamadas de meso- porfirinas ou porfirinas β- substituídas. As porfirinas substituídas nas posições 5-, 10-, 15-, e 20- também são conhecidas como meso porfirinas. Exemplos típicos para esta classe são a tetrakis (fenil) porfirina (TPP) e tetrakis (piridil) porfirina (TPyP) e seus derivados. A maior diferença entre as porfirinas denominadas TMPyP e TPyP é o grupo que se encontra ligado aos nitrogênios piridínicos. A classe das TMPyP é em sua maioria catiônicas ou zwitteriônicas apresentando substituintes alquílicos, ou seja, pequenos grupos insaturados, ligados aos nitrogênios piridínicos. Já as denominadas TPyP apresentam grupos mais volumosos e complexos ligados aos mesmos nitrogênios^{23,24}.

As porfirinas podem ser classificadas, basicamente, em duas classes: uma série que ocorre naturalmente com dois ou mais substituintes presentes nos anéis periféricos e uma série sintética de porfirinas com substituintes nas pontes de carbono. Outra classificação das porfirinas é relativo a sua solubilidade em água: insolúveis e água solúveis. Dentre as solúveis em água, classifica-se, ainda em: as que ocorrem naturalmente com grupos periféricos de ácidos carboxílicos e as e porfirinas sintéticas ou meso substituídas, cita-se como exemplo a uroporfirina que é solúvel em solução alcalina e as porfirinas meso substituídas TPPS e TMPyP, respectivamente. Muitas das porfirinas que ocorrem naturalmente incluindo a clorofila são insolúveis em água.

Uma das propriedades mais importantes das porfirinas é a capacidade de sofrer complexação com íons metálicos ligados com os átomos de nitrogênio dos anéis pirrólicos. O macrociclo

porfirínico possui dois átomos de nitrogênio capazes de aceitar prótons e dois grupos NH capazes de perder prótons. Com a remoção dos prótons do nitrogênio do NH da porfirina base livre e pela coordenação de diferentes íons de metais dá-se origem a uma gama de metaloporfirinas^{3,25}. Isto ocorre devido ao sistema da porfirina apresenta dois prótons ionizáveis, isto é, ligados aos nitrogênios do macrociclo de forma extremamente fraca em meio que podem ser substituídos facilmente por vários íons metálicos que se dá através da reação 1:



Para que ocorra a neutralização de carga, porfirinas com íons metálicos tri ou tetra valente se ligam através de quelatos com ligantes no plano perpendicular ao plano da porfirina: $M^{3+}PL$; $M^{4+}PL_2$, onde M é o metal, P é porfirina e L é o ligante. Há alguns casos cujas porfirinas com íons metálicos divalentes apresentam os sítios penta e hexa coordenados ocupados por um ligante neutro como por exemplo CO, O₂, piridina e água ($M^{2+}PL_2$).

As metaloporfirinas são possuidoras de características funcionais em diferentes ramos da ciência. Elas exibem sítios ativos em várias proteínas cujas funções vão desde transporte e armazenamento de oxigênio (hemoglobina, mioglobina) passando por transporte de elétrons (citocromo c, citocromo oxidase) até a conversão de energia (clorofila). O mecanismo utilizado pelas metaloporfirinas provém de diversas funções das mesmas que continuam sob foco de uma extensiva investigação espectroscópica. Esse tipo de composto é altamente colorido e apresenta forte absorção na região do visível devido ao grupo cromóforo conjugado entre o macrociclo e o tetrapirrol presente na molécula. Porfirinas complexadas a metais são importantes exemplos de macrociclos complexos que têm atraído muito interesse de estudo em várias reações de oxigenação de hidrocarbonetos sob determinadas condições. Os estudos dessa classe de compostos imobilizadas com polímeros orgânicos amorfos e materiais inorgânicos cristalinos têm sido explorado consideravelmente. O processo de imobilização de metaloporfirinas pode auxiliar a prevenção de agregação molecular ou reações de autodestruição biomolecular^{23,26}.

As propriedades dos compostos porfirínicos têm sido exploradas na química supramolecular devido a relativa facilidade com que podem ser sintetizadas e a sua estabilidade e diversidade de propriedades por conta das modificações no centro e na periferia do anel²⁷. Outra aplicação para estes compostos é como sensibilizadores e catalisadores em um grande número de sistemas químicos e fotoquímicos²³. A síntese de modelos biomiméticos constituídos por porfirinas vem sendo

realizada com o objetivo de compreender os detalhes da fotossíntese e propiciando o desenvolvimento de materiais óptico-eletrônicos devido, principalmente, a característica que as porfirinas têm de atuarem tanto como doador quanto como receptor de energia ²⁸.

A riqueza e diversidade da fotoquímica de metaloporfirinas sugerem sua potencial aplicação como sondas para estudo de estruturas e propriedades dinâmicas de um grande número de sistemas biológicos. Uma área que recebe atenção especial é o estudo de metaloproteínas, em particular heme proteínas, que contém uma ferro porfirina como centro do grupo prostético que é responsável pela cor vermelha da hemoglobina encontrada no sangue. A porfirina mais importante produzida naturalmente pelo organismo é a chamada protoporfirina-IX que complexada com o Fe²⁺ dá origem ao grupo heme. Na forma de hemoglobina, cujo metal central tem número de oxidação (II), apresenta como função ligar o oxigênio nos pulmões; já na forma de mioglobina, a função é armazenar o oxigênio nos músculos ^{4-5,23}. Outros compostos porfirínicos de grande importância são encontrados na natureza, como por exemplo, a clorofila, uma porfirina que contém o magnésio, que é o pigmento fotossintético das plantas e a vitamina B₁₂, uma metaloporfirina complexada com cobalto ²⁻⁵. Estudos mostram que as porfirinas e metaloporfirinas são de importância vital em sistemas biológicos tanto no reino animal quanto no reino vegetal.

Porfirinas regulares são definidas como aquelas que a absorção óptica e emissão espectral são determinadas essencialmente pelos elétrons π do anel porfirínico com perturbação mínima dos elétrons do centro ligante, dentro dessa classe se encontram as porfirinas base livres as metaladas com metais com valência única. As porfirinas cujo centro metálico é um metal de transição em estados de valência diferentes (subníveis d ou f desemparelhados) são classificadas como porfirinas irregulares. Nessas porfirinas os elétrons não ligantes dos subníveis d ou f do metal interagem fortemente com os elétrons π e π^* do anel porfirínico. Isso é evidenciado pela perturbação na absorção espectral típica desse grupos de porfirinas quando comparada com as porfirinas regulares. A causa dessa perturbação pode ser atribuída a presença de ligantes nas posições axiais na quinta e sexta coordenação, geralmente causando mudanças significativas na absorção e nas propriedades fotofísicas desses compostos ²³.

Compostos porfirínicos são de grande interesse, principalmente do ponto de vista biomédico, devido a uma gama de potenciais aplicações. Cada vez mais estes compostos vêm sendo empregados em fotodiagnósticos e procedimentos fotodinâmicos. Portanto, há uma necessidade urgente de entendimento básico do fotoprocessos associado com métodos clínicos empíricos que vem obtendo sucesso clínico. Como exemplo geral do seu uso voltado à medicina cita-se os

modelos inorgânicos e farmacêuticos para aplicações em biosensores. E como exemplos específicos têm-se principalmente o uso destes compostos como agentes fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica, fotoinativador de vírus e bactérias e como agentes de contraste em Imagens por Ressonância Magnética.

A Terapia Fotodinâmica, do inglês Photodynamic therapy (PDT), é uma das mais novas e promissoras técnicas que vêm sendo exploradas para o controle e tratamento de doenças com crescimento anormal dos tecidos. Esta técnica é baseada no uso de um fotossensibilizador que absorva luz em comprimento de onda próximo a 600nm e, quando irradiado na presença de oxigênio, produza radicais citotóxicos, como exemplo: o oxigênio singleto. Quando este radical é formado reage com lipídeos insaturados, aminoácidos e ácido nucléicos. Como os lipídeos insaturados e proteínas são os principais constituintes das membranas biológicas em presença de oxigênio singleto elas são facilmente foto-oxidadas, causando a morte tumoral via necrose ou apoptose ^{29,30}. Porfirinas são comumente utilizadas como fotossensibilizadores pois exibem fotoatividade, ou seja, elas se ativam na incidência de luz. Além de baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade não prolongada e farmacocinética favorável, alta afinidade e penetração seletivamente ao tecido doente, entre outras. No Brasil, a PDT teve início em 1998 no Hospital Amaral de Carvalho em Jaú-SP e no Hospital Sírio Libanês em São Paulo ^{31,32}. Os trabalhos iniciais utilizavam um composto porfirínico denominado ALA com a finalidade de tratamento de tumores cutâneos, acne, sardas entre outras modalidades ³³.

Um subgrupo da Terapia Fotodinâmica é a chamada Inativação viral fotodinâmica, do inglês Photodynamic Viral Inactivation (PDI). Esta técnica consiste no uso de uma droga fotossensível sob ativação de luz para a erradicação fotodinâmica de um vírus ou outro organismo patogênico indesejado. Portanto, a PDI se faz uma importante ferramenta em manipulações de bancos de sangue, onde atuaria como um possível removedor de partículas virais na corrente sanguínea. Cita-se a remoção do vírus da AIDS ou hepatite, sem haver a remoção de tecidos necessários no sangue. Posteriormente, esta idéia foi generalizada para a PDI atuar como um agente esterilizante para produtos biotecnológicos ²⁹.

Ao complexar as porfirinas a um metal paramagnético, este inibe a sua propriedade fotoativa e, portanto, não podem ser utilizadas como agentes fotossensibilizadores em PDT, entretanto estudos recentes mostram um futuro promissor como agente de contraste em imagens por ressonância magnética ³⁴ sendo as porfirinas complexadas com Fe (III) e Mn (II) entre outras as que

têm apresentado resultados promissores ³⁵. O estudo de porfirinas como agente de contraste em IRM será detalhado mais adiante.

Devido a complexidade dos sistemas biológicos e, com a intenção de um melhor entendimento desses processos utiliza-se modelos simplificados. Vários modelos simplificados de porfirinas ligadas covalentemente a diferentes moléculas receptoras e doadoras tem sido sintetizados para esta finalidade. Sistemas agregados compostos por surfactantes e/ou moléculas lipídicas são sistemas biofísicos simplificados onde pode-se estudar processos fotossintéticos. Todavia, compostos porfirínicos têm a capacidade de formar agregados moleculares em meio aquoso que minimizam sua eficiência para fins terapêuticos como agentes fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica, e agentes de contraste em Imagens por Ressonância Magnética, por exemplo ^{6,9}. Dentre os fenômenos que determinam essas modificações, destaca-se a agregação, que pode ocorrer devido a vários fatores distintos: estéricos e eletrostáticos, força iônica, pH, presença de membranas e proteínas ¹⁰.

3.2. Imagens de Ressonância Magnética

Atualmente as imagens de Ressonância Magnética (IRM) tornaram-se uma técnica promissora e difundida em diagnósticos clínicos por usar radiação ionizante, apresentar alta resolução e contraste e a possibilidade de obtenção de imagens funcionais ⁷. Este método é considerado rápido, seguro e fornecedor de informações sobre o estado químico e físico dos materiais, bem como sobre o estado fisiológico e as condições de metabolismo em sistemas biológicos, sem qualquer extração ou destruição da amostra ^{36,37}. Esta técnica é capaz de produzir imagens muito detalhadas e com enorme resolução dos tecidos macios e órgãos de qualidade comparável e superior a tomografia computadorizada (TC) sem os seus efeitos secundários potencialmente adversos resultantes do uso de raio-X. Os trabalhos iniciais para o desenvolvimento da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) datam de 1920. Desde então, esta técnica vem sendo aperfeiçoada para estudos *in vivo* até mesmo no próprio homem, com as mais variadas amostras, inclusive líquidas e diluídas ³⁸.

As aplicações clínicas da IRM são amplas, contudo a neurologia é uma das áreas em que ela é mais explorada, principalmente no diagnóstico de tumores. Entretanto, outras doenças degenerativas, inflamatórias ou cardiovasculares podem ser detectadas através desta técnica. Como

exemplo clínico cita-se imagens da coluna vertebral onde se visualiza tumores, compressões ou qualquer má formação na coluna. Outro exemplo são imagens da região do abdômen onde pode ser visualizada qualquer lesão ou alteração de estrutura com nitidez de todos os órgãos.

A IRM fundamenta-se em princípios físicos requerentes de três etapas: alinhamento magnético dos átomos, excitação e detecção de radiofrequência ^{39,40}. O alinhamento se refere à propriedade magnética de núcleos de alguns átomos, que tendem a se orientar paralelamente quando sofrem a influência de um campo magnético. É necessário um campo magnético intenso (cl clinicamente utiliza-se 1,5 Tesla a uma frequência de 64 MHz para o hidrogênio) para que ocorra a excitação. A detecção é feita da seguinte maneira: o equipamento detecta ondas de ressonância e determina a posição no espaço e a intensidade da energia. Essa intensidade é mostrada como “brilho” na imagem. Usualmente, utiliza-se o núcleo de hidrogênio (próton) para produzir imagens de ressonância magnética, principalmente devido a abundância de água em tecidos biológicos.

Em casos em que a visualização precisa da IRM é dificultada, a injeção intravascular de um agente de contraste torna o resultado mais claro. Um agente de contraste em IRM pode ser administrado no paciente na intenção de alterar o tempo de relaxação dos prótons da água nos tecidos. Isso provoca o aumento do contraste da imagem entre os tecidos normais e doentes. Pode ainda ser usado como um indicativo do estado funcional de órgãos ou fluxo sanguíneo ⁴¹.

Vários fatores contribuem de forma direta para uma avaliação positiva da segurança de um agente de contraste. Dentre eles os principais estão relacionados à toxicidade inerente do composto, à sua estabilidade na circulação e ao seu grau de depuração no corpo humano. A eficiência de um contraste empregado com o intuito de otimizar uma IRM depende de vários parâmetros característicos dos tecidos: densidade de prótons (que depende do conteúdo de água e de gordura), mobilidade, difusão e fluxo em vasos sanguíneos. A incidência de adversidades ao uso de agente de contraste em RM varia, aproximadamente, entre 2% e 4%, sendo as reações gerais encontradas comumente náuseas, vômitos, entre outras ⁴².

As micro e nanopartículas magnéticas foram primeiramente usadas como agentes de contraste em imagem de ressonância magnética ⁴³. Utiliza-se, de um modo geral, os elementos químicos da série dos lantanídeos devido a esses serem paramagnéticos. Dentre os lantanídeos, atualmente, o íon gadolínio é o único elemento utilizado clinicamente como agente de contraste ^{44,45}. Os agentes de contraste que utilizam o íon Gd^{2+} são considerados bons porque este íon paramagnético metálico apresenta sete elétrons desemparelhados e alta eficiência sobre o tempo de relaxamento. Atualmente, os dois quelantes de gadolínio mais estáveis são o Magnevist® e o

MultiHance®, há também o Primovist® que é relativamente novo no mercado europeu e ainda não foi aprovado para uso nos Estados Unidos.

A Food and Drug Administration (FDA), agência americana de regulamentação de drogas, têm realizado pesquisas com enfoque em compostos que utilizam o gadolínio como princípio ativo de agentes de contraste, desde que doenças vêm sendo associadas com o seu uso em altas concentrações ou em pacientes com histórico de insuficiência renal, alergias entre outras. Dentre as recomendações feitas por este órgão estão: evitar o uso em pacientes com insuficiência renal, evitar o uso em gestantes e crianças, considerar a possibilidade de uma medicação prévia na intenção de evitar o desencadeamento de processos alérgicos, etc.

Todavia, é importante diferenciar os agentes à base de gadolínio daqueles à base de partículas de ferro e à base de manganês, os quais têm indicações mais restritas, pois apresentam outros tipos de complicações e são muito menos utilizados na rotina diária dos serviços de RM em todo o mundo. No Brasil, inclusive, tais contrastes ou não foram introduzidos ou têm seu uso muito restrito, devido ao alto custo ⁴².

Comparando-se os agentes de contraste à base de gadolínio em relação aos contraste iodado utilizado na radiologia convencional e nos exames de TC, o gadolínio é considerado mais seguro, pois o volume administrado no paciente que faz uso de RM é de 5 a 15 vezes menor do que o utilizado na TC. E, ainda que a distribuição corporal seja semelhante em ambos os casos, a sensibilidade da RM ao Gd é comprovadamente maior que a da TC ao contraste iodado.

As IRM representam não só a densidade de prótons dos tecidos que contem uma informação anatômica muito rica, quando comparável a da TC. Tais informações são utilizadas como ferramentas para conhecimento sobre o estado fisiológico dos tecidos, fornecendo meios para uma discriminação mais sensível entre tecidos saudáveis e patológicos.

Referente a estrutura óssea, a IRM e a TC se equivalem, já que nos ossos a densidade protônica é baixa, porém na primeira técnica pode-se avaliar estruturas como hipocampos, núcleos da base e cerebelo e em alguns casos é uma ferramenta útil para pesquisa de transtornos mentais ⁴⁰. Cada composto químico detectado no cérebro humano tem uma distribuição diferente de frequências e pelas variações locais se obtém a informação química ⁷. Estudos mostram que a IRM é preferível a radiologia convencional e a TC, em investigações de existência de corpos estranhos deixado após procedimentos clínicos. Através das imagens obtidas por esta técnica é possível confirmar a hipótese da existência de um fragmento de gaze cirúrgico envolvido por processo inflamatório. Portanto, esta técnica pode induzir uma rápida definição de más condutas cirúrgicas ⁴⁶.

Estudos realizados por Chen e colaboradores ⁴⁷, analisaram o efeito da presença metaloporfirinas aniônicas sobre o tempo de relaxamentos de água, resultando que o mesmo aumenta linearmente com a presença de porfirinas complexadas com Pd²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺ e Mn³⁺. Ni e colaboradores ⁴⁷ avaliaram a potencialidade de uma meso-porfirina complexada com gadolínio como agente de contraste para determinação de necroses no miocárdio através de IRM. Zhang e colaboradores ⁴⁸ realizaram estudos comparativos entre o comumente usado agente de contraste Gd(DTPA)²⁻ e derivados de ácido dietileno triamina pentacético e isoniazida complexados com íons metálicos Mg²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ e Cu²⁺, cujos resultados mostraram que apenas o íon Mg²⁺ conseguiu superar o Gd(DTPA)²⁻ na eficiência no relaxamento da água. A síntese bem como um estudo comparativo *in vitro* e *in vivo* entre uma Mn²⁺- porfirina e o agente de contraste usado comumente foi realizado, sendo que a porfirina apresentou baixa citotoxicidade, ligação específica com o tumor além de um melhor tempo de relaxamento da água ⁴⁹.

A análise da influência de agente de contraste porfirínico complexado metais (Gd-MP ou MnTPP) em ratos que sofreram infarto do miocárdio, mostrou que as metaloporfirinas de Gd e Mn aumentaram o contraste da imagem do miocárdio infartado quando comparado com o miocárdio normal em aproximadamente 300 % e 200 %, respectivamente ⁵⁰. Outro estudo encefálico em ratos fez uma comparação da eficiência de metaloporfirinas como agente de contraste em RM. Os resultados mostraram que a porfirina Mn-(DPA-C₂)₂-TPPS₃ é mais eficiente quando comparada porfirina Mn-TPPS₄, pois além de uma melhor nitidez na imagem, o composto permanece por mais tempo *in vivo*, sugerindo-se um tempo de meia vida de aproximadamente 10 dias. Concluíram, ainda, que as principais vantagens do uso de metaloporfirinas como agente de contraste em IRM são a permeabilidade dos tecidos e possibilidade de analisar as estruturas neurais *in vivo* nos cérebros de mamíferos, sem aparentes efeitos colaterais tóxicos ⁵².

Contudo, têm-se feito uso da IRM como uma ferramenta útil na fase de diagnóstico de patologias clínicas. O uso de agente de contraste para aperfeiçoar a visibilidade da imagem vem maximizar a eficiência desta técnica promissora, fazendo com que seu uso possa ser expandido ao diagnóstico de diversas patologias não limitadas às cerebrais. Os estudos de porfirinas complexadas a metais paramagnéticos para o uso como agente de contraste em IRM vêm se difundindo pelos resultados satisfatórios de influência no tempo de relaxação dos prótons da água na presença desses íons paramagnéticos complexados a macromoléculas com adesão seletiva a tecidos com crescimento anormal.

3.3.Micelas

A palavra surfactante, uma simplificação do termo agente ativo de superfície, é empregada para designar compostos naturais ou sintéticos anfifílicos, ou seja, compostos que apresentam na mesma molécula uma parte apolar (hidrófoba) e uma parte polar (hidrófila)^{52,53}. Os tensoativos são amplamente utilizados na Química, cujas principais finalidades são modificar o meio reacional permitindo a solubilização de espécies de baixa solubilidade ou otimizar o meio para influenciar a velocidade reacional, a posição e o tempo que as reações químicas necessitam para atingirem o equilíbrio e em alguns casos até mesmo a estereoquímica da reação. Neste último caso, as características dependem da natureza da reação, do tipo de reativo (eletrofílico, nucleofílico, etc) e do tipo e forma (catiônica, aniônica, etc) da micela⁵⁴. Cita-se ainda os biosurfactantes que são cuja principal aplicação é na solubilização de lipídeos e de proteínas das membranas biológicas⁵⁵.

A classificação dos tensoativos é efetuada com base nos grupos polares encontrados na molécula, comumente conhecidos como cabeça do surfactante. Um tensoativo típico possui uma estrutura que pode ser generalizada por R-X, onde R é uma cadeia de hidrocarboneto variando de 8 –18 átomos (normalmente linear) e X é o grupo cabeça, polar (ou iônico). Dependendo de X, os tensoativos podem ser classificados como não iônicos catiônicos, aniônicos ou anfóteros.

São denominados iônicos quando carregados com cargas elétricas (aniônicos, catiônicos ou zwitteriônicos) e não iônicos quando neutros⁵³. O tensoativo catiônico possui em geral a fórmula R_nX+Y , onde R representa uma ou mais cadeias hidrofóbicas, X é um elemento ou grupo com carga positiva e Y é um contra íon. Já o tensoativo aniônico é proprietário das mesmas características, com exceção que X é carregado negativamente.

A parte apolar dos surfactantes conhecida como cauda é composta por grupos hidrofóbicos, em geral hidrocarbonetos. Esta parte da molécula apresenta uma baixa solubilidade em água devido a alta hidrofobicidade, provocada pela dificuldade em romper as fortes interações entre as moléculas de água. Os grupos polares não iônicos apresentam um menor caráter hidrofílico quando comparados aos grupos carregados, visto que sua energia de interação com a água também é mais baixa^{56,57}. A principal característica dos tensoativos anfóteros é que dependendo do pH da solução e da estrutura, pode prevalecer a espécie aniônica, catiônica ou neutra.

Os surfactantes podem ser insolúveis ou solúveis em solução aquosa. Os primeiros formam cristais líquidos ou precipitados insolúveis em meio aquoso e incluem os principais grupos de lipídios das membranas biológicas, como os fosfolipídios, os esteróides, e as proteínas de

membrana. Já os solúveis são os que acima de uma determinada concentração crítica (CMC), se associam espontaneamente para formar as micelas ^{52,56}.

As micelas são agregados coloidais termodinamicamente estáveis e facilmente reproduzíveis existentes antes da CMC na forma de monômeros. Quando a concentração está abaixo, porém próxima da CMC, existe um equilíbrio dinâmico entre monômeros e micelas. A combinação destas propriedades distintas confere à molécula características únicas na dissolução aquosa ⁵³. Atingindo-se esta concentração as micelas normais passam a se auto organizarem formando uma esfera com caudas hidrofóbicas voltadas para o seu interior e os grupos hidrofílicos ou carregados, voltados para fora como pode ser visualizado na Figura 2 ⁵⁹. Cada micela é formada por um dado número de agregação (número de moléculas do surfactante que compõe a micela), que geralmente rege o tamanho e o formato do sistema micelar. Geralmente, possui um diâmetro entre 3-6 nm o que representa de 30-200 monômeros. Estes agregados podem participar de numerosas reações nas quais a solubilização de um ou mais reagentes na micela leva a uma significativa alteração na cinética reacional ^{60,61}.

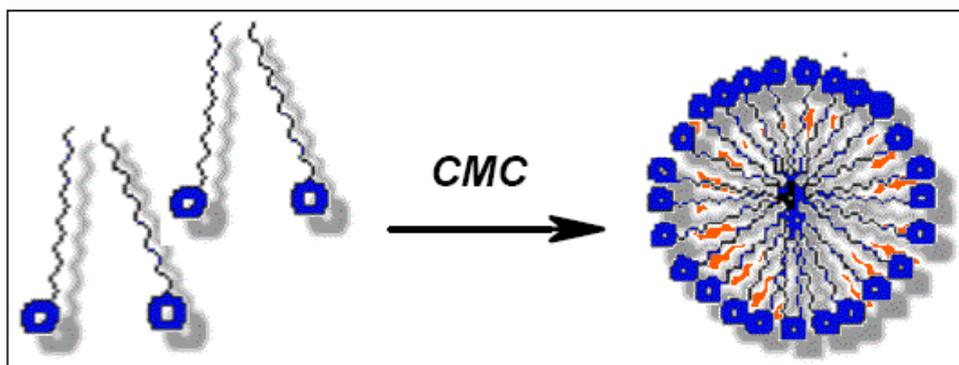


Figura 2. Formação do agregado micelar.

(Fonte: <http://quark.qmc.ufsc.br/qmcweb/micela/>)

O termo “micela normal” é empregado para sistemas micelares onde o grupo cabeça hidrofílico está direcionado para o contato com a solução aquosa formando uma superfície polar, enquanto que a cadeia linear (cauda) está em sentido inverso ao da água, formando um núcleo central não polar. Nos sistemas de micelas reversas, as cabeças polares dos anfífilos estão concentradas no interior do agregado e por esta razão formam um núcleo central hidrofílico (Figura 3). Em contraste com a micela normal, o efeito catalítico das micelas reversas possuem um conjunto mais complicado envolvendo outros fatores em adição ao eletrostático e a consideração hidrofóbica.

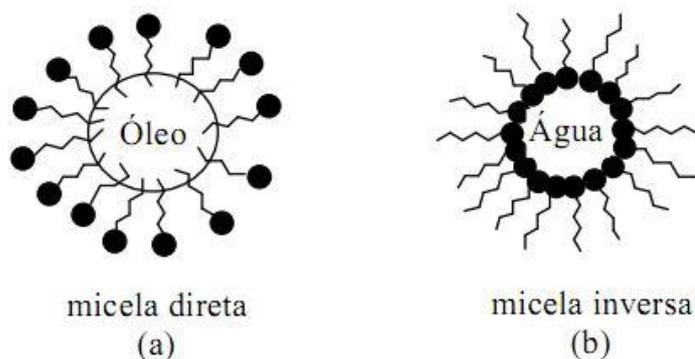


Figura 3. Representação esquemática de tipos de micelas.

(Fonte: <http://www.scielo.br/img/revistas/rbcf/v41n3/a03fig02.gif>)

Uma propriedade importante das micelas é aumentar a solubilidade dos compostos pouco solúveis. Normalmente, a quantidade de soluto solubilizada é diretamente proporcional à concentração do surfactante na forma micelar. Este fenômeno é atribuído ao balanço das interações de hidrofobicidade e eletrostática ocorrendo entre os reagentes e o sistema micelar. Isto é esperado porque a taxa da reação nucleofílica que envolve um extrato solubilizado neutro e um nucleófilo pode ser acelerada por uma micela catiônica e inibida por uma micela aniônica. Efeito micelar oposto pode ser esperado para uma reação eletrofílica envolvendo um substrato e um eletrófilo. Quando sistemas envolvendo micelas não iônicas ou anfóteras são empregados, somente pequenos efeitos na cinética reacional são esperados. Deve-se salientar que nem todos os incrementos ou inibição da reação podem ser explicados pela simples consideração eletrostática. Em vários casos, a interação hidrofóbica tem mais valor do que o desfavorável efeito eletrostático sendo necessário levá-la em consideração.

Outra propriedade importante das micelas é apresentarem uma estrutura muito similar às membranas biológicas. As membranas celulares são sistemas funcionais onde ocorrem fenômenos de penetração e transporte (Figura 4). Constituídas por uma dupla camada de fosfolípidios organizados analogamente às micelas: cadeia apolar hidrocarbônica apontando para dentro da membrana e a parte polar das moléculas formam a superfície da membrana.

Entretanto, devido à complexidade das membranas biológicas, estudos mostram que através da substituição destas por sistemas biométricos constituídos de surfactantes pode-se obter resultados satisfatórios para um estudo inicial, devido a semelhança existente entre a estrutura de uma micela e as membranas biológicas^{16-20, 62}.

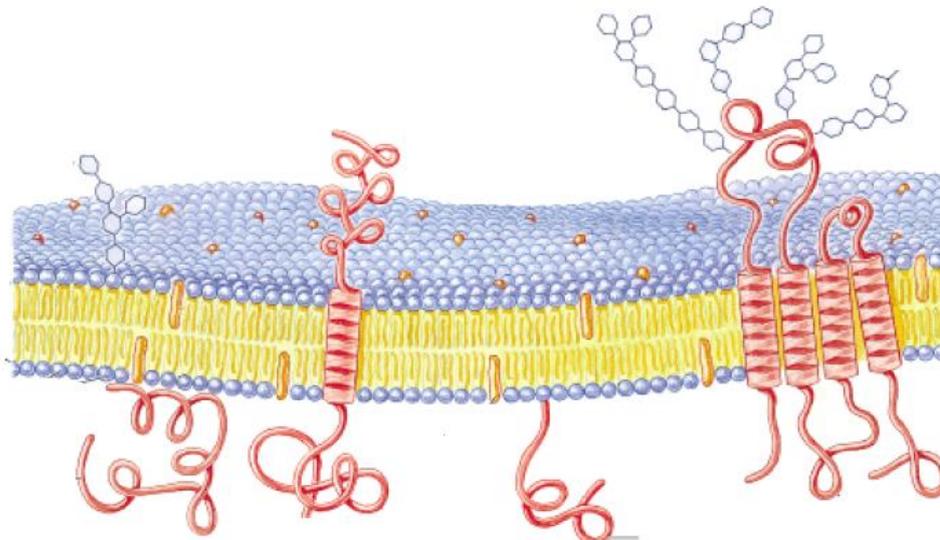


Figura 4. Estrutura da membrana celular: a bicamada fosfolipídica cuja cadeia apolar hidrocabônica se posiciona na parte interior da membrana e a parte polar das moléculas formam a porção posterior da membrana.

(Fonte: <http://www.qued.com.br>)

Estudos em que os surfactantes são empregados como sistemas simplificados para mimetizar membranas são comumente encontrados na literatura. Santiago e colaboradores ⁶³ realizou um estudo do processo de agregação da porfirina TMPyP na presença de sistemas biofísicos modelo fazendo-se uso de absorção e espalhamento de raio-X de baixo ângulo. Os surfactantes empregados foram o aniônico SDS, zwitteriônico HPS e não iônico TRITON X-100. Tulumello e Deber ⁶⁴ observaram que as micelas de SDS são amplamente capazes de mimetizar interações terciárias de proteínas, lipídeos e superfícies aquo-expostas helicoidais presentes em proteínas.

Dentre os estudos em que se utilizam sistemas modelos, destacam-se os referentes à interação de porfirinas e seus derivados com diferentes micelas, visto que para a viabilização de qualquer fármaco é necessária a investigação da interação das drogas com as membranas biológicas. Micelas formadas por fosfolipídios têm sido manipuladas para encapsular fármacos, podendo então ser introduzidos com maior facilidade e liberados de forma controlada no organismo ⁶².

As características fotofísicas das porfirinas podem ser afetadas por sua agregação com surfactantes, acarretando a diminuição de sua eficiência quando utilizados para fins terapêuticos. Isso pode ocorrer devido a formação de estruturas estáveis de complexos porfirina-surfactante de várias formas distintas. Esses agregados podem não ter estrutura definida ou apresentarem

estruturas de agregados do tipo H e J. Um fator determinante na cinética de formação desses agregados é o tipo de surfactante empregado e ainda o fator concentração relativa entre a porfirina e o surfactante ⁶⁵.

Para Maniasso ⁶¹, atribui-se os efeitos micelares aos aspectos eletrostáticos. Isto é explicado em consequência de uma micela catiônica interagir preferencialmente a uma aniônica com um extrato aniônico, ocorrendo o oposto com uma micela aniônica. Quando são empregados surfactantes não iônicos ou anfóteros acima da CMC, esperam-se somente pequenos efeitos na cinética reacional.

3.4. Técnicas Espectroscópicas

A espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética com a matéria, sendo um dos seus principais objetivos a determinação dos níveis de energia de átomos ou moléculas. Através dos espectros atômicos e moleculares pode-se obter informações detalhadas sobre a estrutura das moléculas (simetria molecular, distâncias e ângulos de ligação) e sobre as propriedades químicas (distribuição eletrônica, força de de ligação, processos intra e intermoleculares) ⁶⁶. A radiação eletromagnética é um tipo de energia que é transmitido através do espaço a enormes velocidades, consistindo em uma componente de campo elétrico com uma componente do campo magnético, perpendiculares entre si na direção da propagação ^{67,68}.

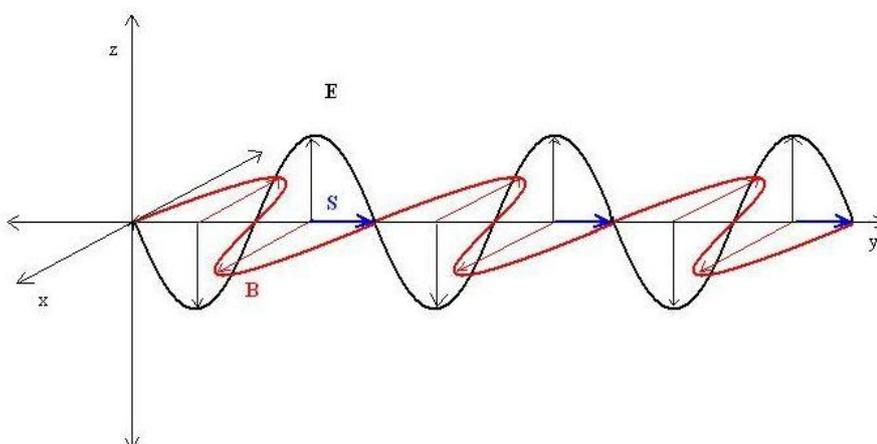


Figura 5. Propagação da radiação eletromagnética.

(Fonte: <http://static.infoescola.com>).

Para ondas eletromagnéticas que se propagam em uma dada direção têm-se variáveis que são o número de ondas por segundo, chamado de frequência e o comprimento de onda (λ) da onda eletromagnética definida pela distância linear entre os pontos máximos e mínimos de onda sucessivos. A unidade de frequência empregada normalmente é o hertz (Hz), que é equivalente a um ciclo por segundo. Estas variáveis estão relacionadas através da equação (2), onde c é a velocidade da luz.

$$c = h\nu \quad (2)$$

A interação entre uma molécula e a radiação eletromagnética origina uma diferença na energia eletrônica ΔE , e o efeito desta interação da radiação com a matéria torna-se uma poderosa ferramenta para obter-se informações sobre a estrutura microscópica da matéria.

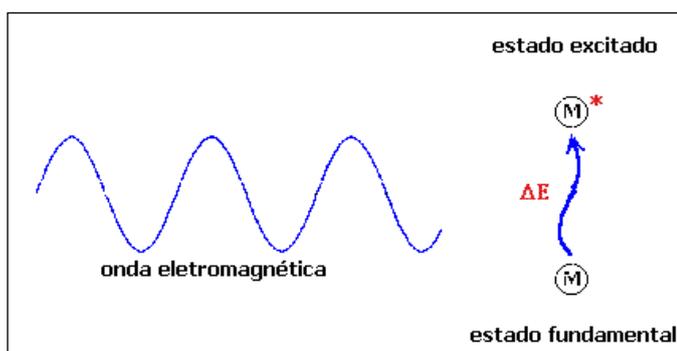


Figura 6. Esquema da Interação da onda eletromagnética com uma molécula.

As técnicas espectroscópicas fundamentam-se na detecção e análise do feixe de radiação eletromagnética proveniente da amostra do material sob investigação. Essa radiação pode ser proveniente de um feixe que incidiu sobre a amostra e atenuada (espectroscopia de absorvância ou transmitância); um feixe que após incidir sobre a amostra foi espalhado ou difratado (espectroscopia de espalhamento); ou ainda ter se originado na própria amostra, como resultado de processos distintos (espectroscopia de emissão). A espectroscopia abrange uma ampla faixa da radiação eletromagnética, sendo classificada de acordo com a região do espectro eletromagnético, como ilustra a Figura 7. Essa região inclui Raios-X, Ultravioleta, Visível, Infravermelho, Microondas e Rádio-frequência ⁶⁹.

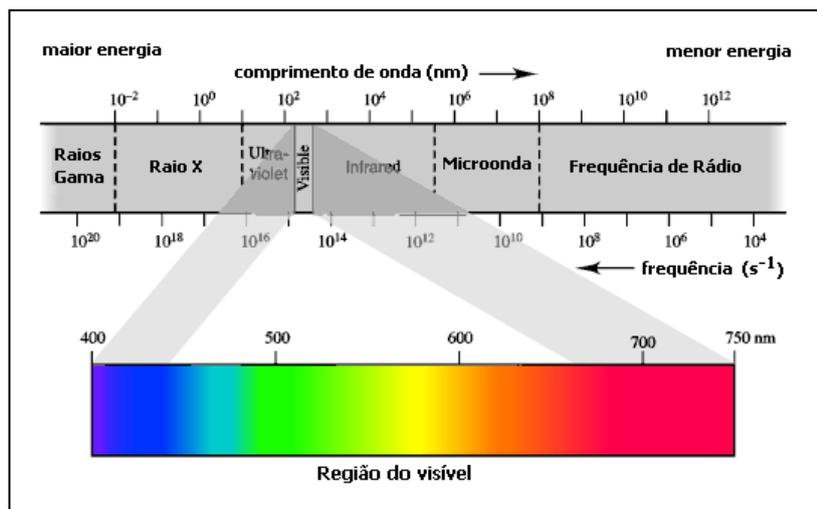


Figura 7: Espectro Eletromagnético.

(Fonte: <http://200.156.70.12/sme/cursos/EQU/EQ20/modulo1/aula0/intro/luz.html>)

A Tabela 2 mostra algumas técnicas espectroscópicas e faixas típicas de comprimento de onda, que são utilizadas em sistemas biológicos:

Tabela 2. Técnicas Espectroscópicas e seus comprimentos de onda típicos ⁶⁶.

	Fenômeno	Frequência	Comprimento de onda
Radiofrequência	Ressonância magnética nuclear	10^6 a 10^8	300 a 3m
Micro-ondas	Ressonância paramagnética eletrônica	10^{10} a 10^{12}	30 a 0,3 m
Infravermelho	Rotação molecular	10^{12} a 3×10^{14}	300 a $1 \mu\text{m}$
Visível e ultravioleta	Transição eletrônica (elétrons externos)	3×10^{14} a 10^{16}	$1 \mu\text{m}$ a 300 \AA
Raios-X	Transição eletrônica (elétrons internos)	3×10^{16} a 10^{19}	100 a $0,3 \text{ \AA}$
Raio γ	Transições nucleares	10^{19} a 10^{22}	$0,3$ a $0,003 \text{ \AA}$

As porfirinas absorvem luz em comprimento de onda na faixa do visível, tipicamente próximo de 400 nm, porém, o meio em que elas se encontram pode modificar significativamente seu comportamento. Sendo assim, algumas técnicas de espectroscopia se tornam ferramentas úteis para caracterizar essas modificações.

3.4.1. Absorção na Região do Ultravioleta e Visível

A região do espectro eletromagnético denominada visível é definida em termos de faixa de comprimento de onda que é perceptível ao olho humano. A faixa usual de comprimento de onda citado compreende de 380 nm na região do azul/violeta até 750nm caracterizada pela região do vermelho. A região do ultravioleta estende-se desde 380 até aproximadamente 100 nm ⁶⁷.

As medidas de concentração de espécies através de técnicas óticas são de grande valia. Primeiramente, elas não introduzem nenhum “corpo estranho”no sistema e, portanto, não perturbam o mesmo. Perturbações por sondas físicas podem mascarar os resultados obtidos e introduzir incertezas significativas. Diagnósticos óticos podem ser realizados com uma pequena quantidade de amostra e através desta técnica é possível a realização um estudo detalhado de estruturas não uniformes. O método também pode apresentar excelente resolução temporal, possibilitando monitorar transições em um relativo curto espaço de tempo ⁷⁰.

Ao se incidir um feixe de radiação eletromagnética em uma amostra transparente, uma parte dessa radiação pode ser absorvida. Essa absorção ocorre devido ao fato de todas as moléculas possuírem elétrons que podem ser excitados, possivelmente na região do UV-Visível ou em outras faixas de comprimento de onda. Neste processo “pacotes” de energia quantizada, denominada fótons são transferidos para átomos, íons ou moléculas que compõem a amostra, promovendo essas partículas para estados excitados de energia mais elevada. A relação entre a energia absorvida em uma transição eletrônica e a frequência (ΔE), o comprimento de onda (λ) e o número de ondas ($\bar{\nu}$) da radiação que produz a transição é dada por:

$$\Delta E = h\nu = h\frac{c}{\lambda} = hc\bar{\nu} \quad (3)$$

onde h é a constante de Planck, c é a velocidade da luz e ΔE é a energia absorvida pela molécula na transição eletrônica entre um estado de menor energia (estado fundamental) e um estado de maior energia (estado excitado). As radiações ultravioleta e visível tem energia apenas para provocar as transições dos elétrons de valência, ou dos elétrons de ligação ⁶⁸.

No caso da espectroscopia UV-Visível, as transições resultantes da absorção da radiação eletromagnética dessa região do espectro são transições provenientes de níveis energéticos eletrônicos. Como a molécula absorve energia, um elétron é promovido de um orbital ocupado a um orbital não ocupado com um potencial de maior energia. Geralmente, a transição mais provável é do

orbital ocupado de maior energia (HOMO) para o orbital molecular não ocupado de menor energia (LUMO) ⁷¹.

Vários tipos de absorção de energia são possíveis dependendo na natureza da ligação da molécula. Na maioria das moléculas orgânicas são encontrados três tipos distintos de orbitais moleculares. Os orbitais σ envolvidos em ligações simples, os orbitais π em ligações múltiplas e os orbitais n são ocupados por pares de elétrons livre não ligantes. A absorção de radiação pode ocasionar transições eletrônicas distintas, entre elas quatro tipos principais: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, onde os orbitais indicados pelo asterisco são os orbitais não ligantes. Algumas transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ em compostos de ligações simples acontecem em cerca de 200nm na região do ultravioleta de vácuo e compostos contendo apenas ligações simples são transparentes na região do ultravioleta próximo e visível. Já absorções do tipo $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ ocorrem na região do ultravioleta próximo e visível devido aos grupos cromóforos da molécula que contêm elétrons de valência com energia de excitação relativamente baixas. Destas transições, a primeira é a que requer maior energia para ocorrer como pode ser visualizado na Figura 8. Quanto menor for essa diferença, maior será o comprimento de onda da absorção ^{67,68,72}.

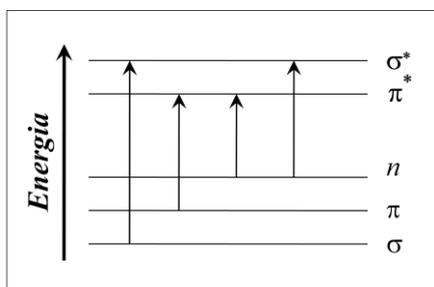


Figura 8. Diagrama esquemático das transições eletrônicas.

Na técnica de UV-Visível, a intensidade de um feixe de luz transmitido (I) através de uma amostra, é comparada com a intensidade de luz incidente (I_0), como ilustrado na Figura 9.

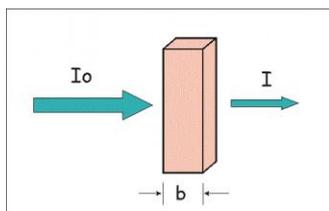


Figura 9. A Radiação incidente (I_0) é atenuada (I) ao passar por uma amostra.

Esta relação pode ser dada através da transmitância (T) ou Absorbância, como mostram as equações (4) e (5):

$$T(\%) = \frac{I}{I_0} \times 100\% \quad (4)$$

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (5)$$

A relação entre intensidade de absorção, a espessura da amostra e a concentração das espécies absorventes é dada pela Lei de Beer- Lambert:

$$\log \frac{I_0}{I} = A = \epsilon bc \quad (6)$$

onde ϵ (L/mol.cm) é a absorptividade molar do composto, c a concentração do soluto e b o caminho óptico percorrido através da amostra^{68,72,73}.

Em alguns casos, quando a concentração molar for alta, trazendo a absorptividade molar como uma função da concentração molar, a lei de Beer- Lambert não é obedecida. Isto pode ser consequência do espalhamento ou mudanças estruturais como dimerização, agregação, ou mudanças químicas.

As porfirinas apresentam um sistema eletrônico altamente conjugado³ portanto, suas transições eletrônicas encontram-se na faixa do visível e ultravioleta próximo¹⁰. Em consequência disto, a técnica de Uv-Vis é altamente difundida no estudo desta classe de compostos. Várias monoazo (MAP) e diazo (DAP) porfirinas bases livre e complexadas com Cu^{2+} foram estudadas por técnicas espectroscópicas e eletroanalíticas. As análises foram realizadas separadamente entre as porfirinas metaladas e não metaladas. Especificamente através de Uv-Vis foram comparados os comprimentos de onda máximos das bandas de Soret e bandas Q das porfirinas H_2MAP , H_2DAP e OEP, sendo esta denominada octaetilporfirina. Posteriormente, a mesma análise foi efetuada para as porfirinas CuMAP, CuDAP e CuOEP. Os resultados de absorção ótica foram confirmados pela técnica de Dicroísmo Circular Magnético, Infravermelho, Voltametria cíclica e ainda cálculos de orbital molecular⁷⁴. Lan e colaboradores⁷⁵ caracterizaram a banda de Soret e banda Q para cinco porfirinas diferentes da família TPP por Uv-Vis e RPE. Através dos resultados obtidos por Uv-vis foi possível atribuir as transições eletrônicas que geram as bandas em questão. Um estudo semelhante foi realizado por Zheng e colaboradores⁷⁶ utilizando-se da mesma técnica, onde

atribuíram as transições eletrônicas as referidas bandas características das porfirinas e também a simetria molecular do composto estudado.

3.4.2. Dicroísmo Circular Magnético (DCM)

A técnica de Dicroísmo Circular (DC) fundamenta-se no princípio de que a radiação eletromagnética é composta por vetores de campo elétrico e magnético em direções aleatórias quando não está sofrendo ação de nenhum fator externo. Caso estes vetores sejam alinhados de forma que todos os pontos da radiação permaneçam numa mesma direção dá-se o nome de luz polarizada.

Tanto a espectroscopia de DC como de DCM medem a diferença de intensidade de luz polarizada circularmente a esquerda e a direita. Entretanto, em contraste com a espectroscopia DC, os compostos não precisam exibir atividade ótica, e a análise do espectro de DCM gera informações dos estados eletrônicos, em particular, dos estados excitados ⁷⁷. No DCM, a amostra sofre a ação de um campo magnético degenerado cujo nível de energia é separado de acordo com o valor de J como mostra a Figura 10. Este método baseia-se na diferença na chamada regra de seleção para luz polarizada a esquerda (LPE) e luz polarizada a direita (LPD). Para luz LPE a regra de seleção apresenta $\Delta J = +1$ enquanto para LPD a regra de seleção é $\Delta J = -1$ ⁷⁸. Uma amostra absorve em comprimento de onda específico, mas pode absorver em quantidades distintas a luz polarizada circularmente à direita ou a esquerda.

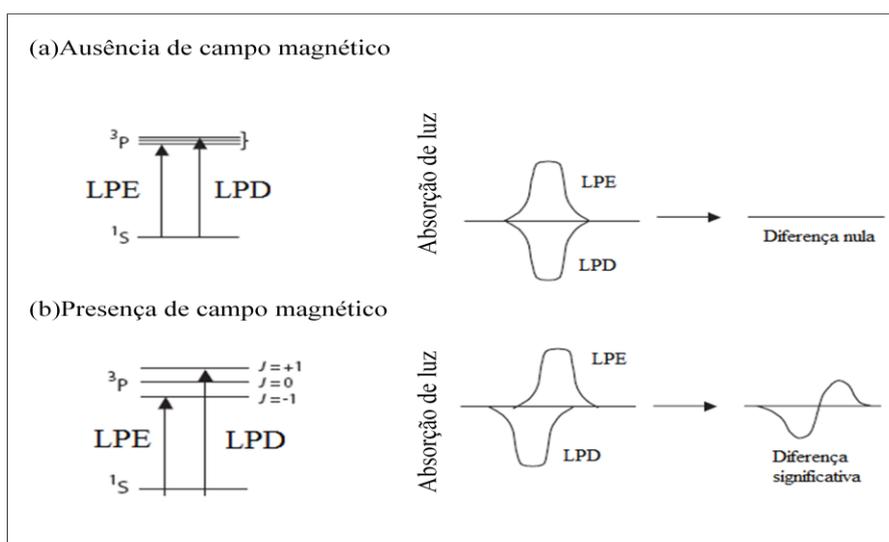


Figura 10. Absorbância de luz polarizada na (a) ausência de campo magnético e (b) presença de campo magnético.

Sem a presença de um campo magnético tanto LPE como LPD absorvem a mesma quantidade de energia, sendo a diferença entre suas absorções nula. Porém na presença de um campo magnético uma das absorções (LPD ou LPE) será relativamente em maior quantidade que a outra provocando uma diferença entre suas absorções e tornando-a diferente de zero. A diferença entre a curva de absorção entre LPE e LPD produz um espectro de dicroísmo circular magnético ⁷⁸. Dessa forma, o espectro de DCM é um gráfico da diferença dos coeficientes de absorção molar para a luz polarizada circularmente para a esquerda e para a direita em função do comprimento de onda. Estes espectros são úteis para visualizar detalhes que nos espectros de absorção UV-Vis não são perceptíveis, além de serem empregados em estudos de isomeria geométrica e óptica ⁷⁹. O Dicroísmo Circular Magnético atua como uma sonda ótica de paramagnetismo que detalha as propriedades elétricas e magnéticas do estado de oxidação do centro metálico. Também pode ser usada para identificar e atribuir as propriedades do centro metálico.

O sinal de DCM é proveniente de algumas transições observadas nos espectros de UV Vis, porém as regras de seleção são diferentes, uma vez que o mecanismo de seleção depende da intensidade do momento dipolar podendo fornecer informações sobre a degenerescência do estado fundamental e excitado, sendo estas essenciais para o entendimento da estrutura eletrônica molecular de alta simetria. O sinal de DCM é dado por:

$$\Delta = \frac{\alpha(\lambda)^- - \alpha(\lambda)^+}{\alpha(\lambda)^- + \alpha(\lambda)^+} \quad (7)$$

Sendo $\alpha(\lambda)^-$ e $\alpha(\lambda)^+$ os coeficientes de absorção de luz polarizada circularmente a esquerda e a direita, respectivamente. A intensidade do sinal, convencionando-se a luz polarizada circularmente a direita (lpd) $\Delta m = -1$, enquanto que para a luz é dada por:

$$I \sim [A_1 \left(-\frac{\partial f(E)}{\partial E} \right) + \left(B_0 + \frac{C_0}{kT} \right) f(E)] \quad (8)$$

Através dessa equação de DCM constata-se que a intensidade do sinal exibido nos espectros de DCM são analisados em termos de três parâmetros de Faraday, denominados termos A, B e C. O termo A é observado apenas em casos onde o elétron no estado excitado encontra-se localizado em um orbital degenerado. Caso o elétron em seu estado fundamental localize-se em um orbital degenerado, o termo C é observado. Os termos A e C de Faraday aparecem apenas em moléculas

que apresentam mais de dois eixos de simetria, enquanto o termo B está presente em todas as moléculas¹³.

O efeito de polarização pode ser induzido de modos diferentes, entre eles destaca-se a polarização linear e a polarização circular. A Figura 11.a ilustra a primeira forma: a radiação se propaga como setas paralelas a um determinado eixo. A radiação ainda pode-se propagar em formato de espiral ao longo de um determinado eixo podendo ser circularmente polarizada a esquerda (Figura 11.b) ou a direita (Figura 11.c)⁷⁸.

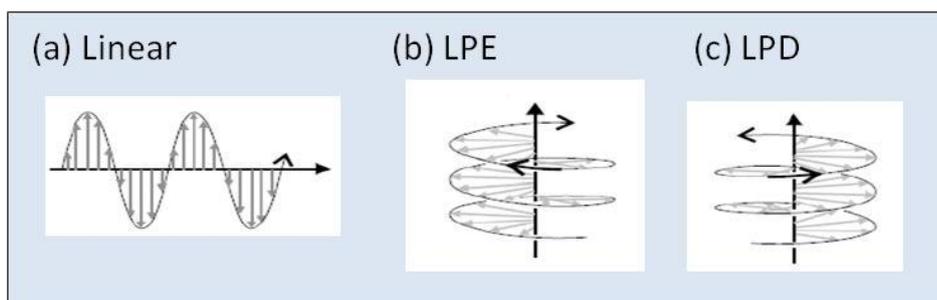


Figura 11. Formas de luz polarizada (a) linearmente, (b) circularmente a esquerda e (c) circularmente a direita.

A espectroscopia de Dicroísmo Circular Magnético (DCM) é uma técnica muito utilizada nos estudos espectroscópicos de metaloporfirinas devido estas apresentarem um centro paramagnético⁸⁰. Os sinais magnéticos observados no espectro de DCM dependem da simetria e das propriedades magnéticas, por isto esta técnica pode detectar transições que no espectro de absorção são de baixa intensidade já que as bandas maiores de transições mais fortes inibem as bandas menores de pequenas transições. Portanto, os espectros de DCM complementam os espectros de absorção no monitoramento das transições eletrônicas⁸¹. Esta técnica pode ser usada juntamente com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e espectroscopia de absorção eletrônica para facilitar a atribuição do estado de oxidação e as transições eletrônicas da entidade molecular.

Mack e colaboradores⁸² fizeram uma análise extensiva das porfirinas tetrabenzotriazoporfirinas substituídas periféricamente (TBTrAP) e tetraaftotriazoporfirina (TNTrAP) utilizando absorção eletrônica, dicroísmo circular magnético e fluorescência de emissão e excitação. Os resultados mostraram que para a porfirina tetraneopentoxitetra-benzo[5,10,15]triazoporfirina, a banda da absorção máxima está centrada em 652 e 699 nm, para a tetra-*terc*butiltetra-benzo[5,10,15]triazoporfirina está em 646 e 688 nm e para

tetraneopentoxitetraafto[5,10,15]triazoporfirina em 742 e 788nm. Também determinaram a simetria molecular bem como a presença do termo B de Faraday através dos espectros de dicroísmo circular magnético.

Derivados de ferro porfirinas substituídas por grupos altamente retiradores de elétrons foram estudadas através de absorção ótica, dicroísmo circular magnético e ressonância paramagnética eletrônica. Os espectros da adição do imidazol ao derivado porfirínico etilporfirinato complexado com Fe^{3+} em clorofórmio mostraram quatro pontos isobésticos em 396, 472, 523 e 588 nm. Entretanto, foi observado que em baixas concentrações havia um desvio desses pontos isobésticos atribuídos a formação de um agregado intermediário. Observaram ainda que conforme o número de grupamentos CF_3 aumentava, o potencial redox tornava-se mais positivo e portanto a redução da porfirina era facilitada. A constante de equilíbrio para o imadazol teve uma ligeira diminuição com o aumento no número de grupamentos CF_3 . A banda de Soret tanto do cloreto como do agregado intermediário foram deslocadas para comprimentos de ondas maiores com o potencial da porfirina tornando-se mais positivo, embora as bandas de absorção visíveis sejam aparentemente independentes do potencial redox nesses comprimento de ondas. A banda spectral de DCM mostra que tanto o Fe^{3+} quanto as porfirinas cloradas estão no estado de spin alto, aparentemente semelhantes entre si na região visível da banda Q, enquanto eles são muito diferentes na região da banda Soret. O espectro de DCM na região visível da Q banda é composto aparentemente de um termo A de Faraday juntamente com um termo B de Faraday. A intensidade do pico de DCM em torno de 400 nm varia de acordo com o potencial redox da porfirina, enquanto as intensidades em torno de 540 e 645 nm variam apenas ligeiramente. Isso indica que a banda no DCM para o Fe^{3+} e porfirinas cloradas são sensíveis a pequenas alterações no potencial redox da porfirina ou a retirada dos grupos retiradores de elétrons dos substituintes porfirina⁸³.

3.4.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) é uma técnica que detecta espécies paramagnéticas, isto é, que apresentam elétrons desemparelhados⁷⁹. Esta técnica tem sido amplamente utilizada em estudos envolvendo compostos que exibem essa propriedade, tais como íons de metais de transição (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} , Cr^{3+} , entre outros), metaloproteínas (citocromos) e radicais livres intermediários formados em reações bioquímicas. Cita-se ainda o uso em sítios fisiológicos de ação do ligante da hemoglobina e mioglobina por oxigênio^{84,86}.

As propriedades fundamentais de um elétron são massa, carga, momento magnético e momento angular intrínseco, denominado spin. O componente mensurável do spin eletrônico tem a magnitude de $h/2\pi$, produzindo dois estados quânticos de spin: $m_s = \pm 1/2$. O momento magnético do elétron $\vec{\mu}$ se relaciona com o momento angular intrínseco através da seguinte expressão:

$$\vec{\mu} = \gamma \hbar \vec{S} \quad (9)$$

onde $\hbar = h/2\pi$ e h é a constante de Planck cujo valor é igual a $6,63 \times 10^{-27} \text{J}\cdot\text{s}^{-1}$ e γ é a razão giromagnética.

Quando um elétron livre é submetido a um forte campo magnético externo (H_0), seu momento magnético $\vec{\mu}$ se alinha a favor do mesmo (Figura 12). A diferença de energia entre os dois níveis depende do campo magnético aplicado.

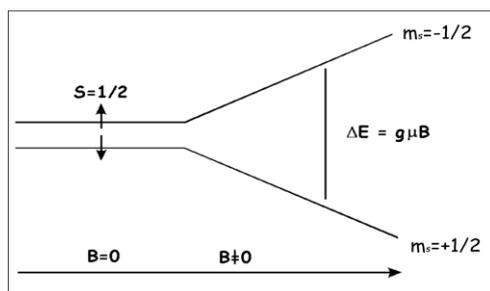


Figura 12. Diagrama de níveis de energia de um elétron desemparelhado.

As transições entre os dois estados de spin eletrônico ($\pm 1/2$) podem ser induzidas através da aplicação de radiação eletromagnética de frequência adequada para satisfazer a equação 10:

$$\Delta E = h\nu = g\beta H_0 \quad (10)$$

onde h é a constante de Planck, ν a frequência de radiação, β o magneton de Bohr cujo valor é 2,00232 para o elétron livre, H_0 é o campo magnético externo aplicado e g é a constante giromagnética. O valor de g próximo a 2 é uma característica do comportamento de radicais livres, entretanto não é uma propriedade exclusiva desse tipo de molécula.

Quando a frequência da radiação eletromagnética e o campo aplicado satisfazem a condição de ressonância (equação 10) a transição é efetuada, sendo que a posição exata das linhas do campo magnético do espectro de RPE caracterizada pelo valor da constante giromagnética é específica

para cada molécula. Esta separação de energia entre os dois estados é chamada de separação de Zeeman e aumenta linearmente com o aumento do campo magnético.

Um espectrômetro de RPE normalmente opera a uma frequência fixa e variando-se o campo magnético até condição de ressonância (equação 10) seja satisfeita ocorrendo, portanto, a absorção de energia de microondas pelo sistema de spins. A energia do fóton $h\nu$ deve corresponder exatamente a separação de energia ΔE , para que isto ocorra. Esta absorção de energia ocorre sempre que o vetor da componente magnética do campo oscilante seja perpendicular com o campo magnético estático H_0 .

A intensidade do sinal na ressonância paramagnética eletrônica é dada por diversos fatores interligados. Dentre eles destaca-se a frequência utilizada no experimento – geralmente 9,5 GHz, a concentração da amostra paramagnética, a quantidade de radiação ressonante aplicada, a probabilidade de transição e a temperatura⁸⁷. O espectros de RPE registrará a primeira derivada da absorção detectando apenas as mudanças na absorção da amostra (Figura 13). Através dessa detecção o número de centros paramagnéticos é proporcional a área sob a curva de absorção ressonante, que é dada pela integral dupla do sinal exibido no mesmo⁸⁸. Uma das formas de se efetuar essa quantização é através da largura da linha e amplitude do sinal existente no espectro da primeira derivada da intensidade do sinal de absorção⁸⁹, expressado matematicamente por:

$$\text{Área} = I \cdot \Delta H^2 \quad (11)$$

onde I é a amplitude do sinal e ΔH é a largura da linha. Fazendo-se uso de programas computacionais a área sob a curva é gerada através da dupla integração sob o sinal adquirido.

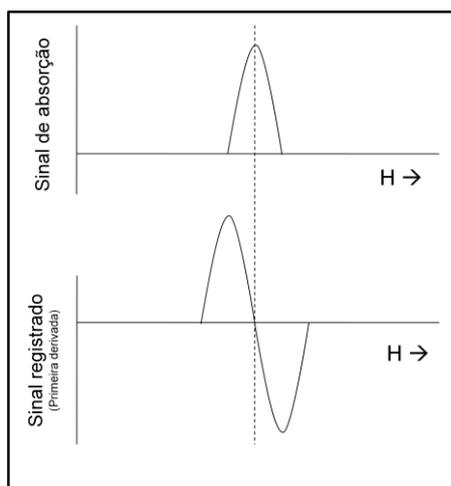


Figura 13. Curva de absorção de um composto paramagnético e sinal registrado no RPE (primeira derivada da absorção) deste composto.

A interação entre os momentos magnéticos de íons paramagnéticos muito próximos produz

um forte acoplamento dipolar. Este efeito é caracterizado no espectro de RPE pela presença de linhas muito largas. Este tipo de sinal dificulta a aquisição de informações a respeito das características físicas e químicas da amostra⁹⁰.

Portanto, para que haja a observação de um sinal no espectro de RPE, é necessária a existência de diferença entre a população encontrada no estado de maior energia e no estado de menor energia. Os efeitos provocados pela interação nuclear da amostra com o campo magnético externo aplicado resulta na largura de linha e a forma da mesma no espectros de RPE, sendo denominado tempo de relaxação. Ao tempo necessário para o spin do estado excitado retornar ao estado de menor energia denomina-se relaxamento de spin.

As interações magnéticas observadas entre o spin eletrônico e o spin nuclear produzem no espectro de RPE um conjunto de várias linhas. Vários íons metálicos contêm mais de um elétron desemparelhado, gerando a presença de um número elevado de dipolos muito próximos numa molécula que causa o alargamento das linhas do espectro de RPE. Esta é, em geral, a principal responsável pela dificuldade em se observar amostras em solução. O resultado produzido por este conjunto de linhas no espectro de RPE é conhecido como estrutura hiperfina do espectro. A maior razão para isto ocorrer é que o elétron não interage apenas com o campo magnético externo aplicado, porém há também uma interação magnética com o núcleo da amostra, em maior ou menor intensidade. Através do número de linhas e suas intensidades relativas pode-se deduzir o número e o spin do núcleo que cada elétron está interagindo. A separação entre as linhas é determinado pelo momento magnético do núcleo e a forte interação entre o spin eletrônico e cada spin nuclear⁸⁷. A estrutura hiperfina em um espectro de RPE ajuda a identificar os radicais presentes na amostra, bem como mapear o orbital molecular ocupado pelo elétron^{62,79,84}.

O momento magnético nuclear é restringido a poucas orientações espaciais em relação ao campo magnético aplicado externamente. A energia magnética do elétron é diretamente influenciada pela orientação do momento magnético nuclear (Figura 14). Como resultado desta interação denominada acoplamento hiperfino, o espectro de RPE é desdobrado em multipletes, sendo que cada nível do spin eletrônico gera a degenerescência $2S + 1$ componentes, onde S é o spin da molécula.

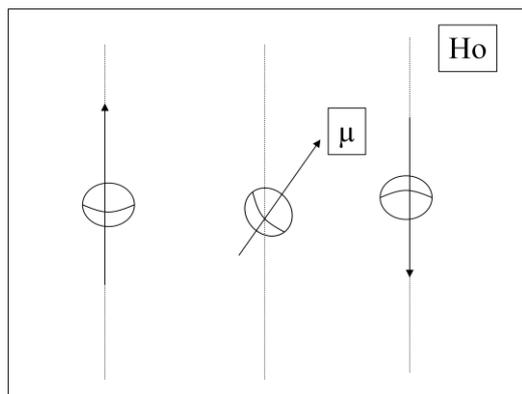


Figura 14. Orientação de energia do momento magnético $\vec{\mu}$ mínimo, intermediário e máximo (esquerda para a direita) em função do campo magnético H_0 aplicado.

No caso de sólidos e as soluções congeladas, em que acoplamentos produzidos na RPE dependem da direção do campo magnético, uma vez que movimento rotacional randômico das moléculas é lento, diz-se que o tipo de acoplamento existente é anisotrópico. Portanto, há valores de g e A paralelos e perpendiculares. Devido ao rápido movimento rotacional randômico das moléculas em solução, a orientação do campo magnético é irrelevante, sendo que quando não há anisotropia o espectro é o mesmo indiferente do campo magnético. Por isso, é feita uma média de todos os acoplamentos da amostra e diz-se que o seu comportamento é isotrópico, sendo que o valor de g e A são conhecidos como constante de acoplamento isotrópico, α_0 e valor de g isotrópico, g_0 .

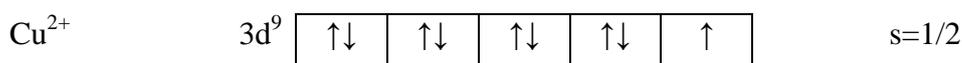
Uma das características do espectro de RPE é que em alguns casos a posição do acoplamento de linhas (dado especificamente pelos valores de g e constantes hiperfinas) depende da direção do campo magnético relativo aos eixos moleculares. Essa anisotropia espectral não é encontrada em sistemas onde o elétron livre é extensivamente delocalizado e portanto a anisotropia é pequena, e também porque o movimento de rotação randômico rápido deles é relativamente pequeno. A anisotropia espectral é muito importante na interpretação dos espectros de íons de metais de transição. Cita-se ainda que amostras solubilizadas em solução não viscosa normalmente perdem as características anisotrópicas. Nesse caso, espectro permanece o mesmo, independente da orientação do campo magnético, valores de g e estrutura do acoplamento hiperfino, são na realidade a média dos valores do eixo principal conhecidos como constante de acoplamento hiperfino isotrópico ⁸⁴.

Os espectros de RPE normalmente são analisados através dos parâmetros g e A . A Tabela 3 apresenta alguns valores característicos de g para sistemas biológicos.

Tabela 3. Valores típicos para espécies paramagnéticas em sistemas biológicos ⁸⁴.

	Valores de g
Fe ³⁺ (spin baixo)	1,4-3,1
(spin alto)	2,0-9,7
Cu ²⁺	2,0-2,4
Spin label nitróxido	2,0020-2,0090

Os espectros provenientes de íons de metais de transição são mais complexos que de radicais livres. Os elétrons com spins desemparelhados que são identificados no espectro de RPE são inicialmente localizados nos orbitais d de transição do íon metálico. A configuração eletrônica do íon metálico Cu²⁺ apresenta nove elétrons no orbital d, sendo cinco deles com spin positivo e quatro deles com spin negativo, o que resulta em $s = +1/2$.



As porfirinas são compostos que podem ser analisadas por RPE, desde que apresentem elétrons desemparelhados. Especificamente as porfirinas complexadas a metais paramagnéticos fazem uso dessa técnica. Entretanto se a porfirina for diamagnética é possível introduzir no ambiente da amostra um agente externo que atua como um marcador de spin chamado spin label. Kadish e colaboradores⁹¹ investigaram espectroscopicamente o efeito micelar na agregação de porfirinas. Utilizando-se de RPE analisaram as porfirinas CuTPPS e VoTPPS. Para a primeira porfirina determinou-se os valores de g na ausência de surfactante e na presença de NaCl, SDS e TX-100. Não foi observado a estrutura hiperfina nem na forma monomérica e nem na forma agregada, ou seja, os resultados são independente da concentração da porfirina. O mesmo ocorre na presença de NaCl. Ao se adicionar surfactante abaixo da CMC não é observado nenhuma mudança no espectro. Acima da CMC é possível observar a interação entre a porfirina e o surfactante TX-100, bem como realizar o cálculo da constante de acoplamento superhiperfino. Para a porfirina VoTPPS foram realizados experimentos na ausência de surfactante e na presença de CTAB e SDS, sendo que não há interação entre a porfirina e o surfactante aniônico.

Algumas porfirinas da família TPP (TPP, TPP-COOH, TPP-NO₂ e TPP-NH₂) foram

analisadas espectroscopicamente sem a adição de spin-label e em temperatura ambiente por RPE e UV-Vis. Isto foi possível devido ao elétron desemparelhado existente no macrociclo porfirínico. Através dos espectros de RPE caracterizou-se o valor de g de cada porfirina, bem como a presença da estrutura hiperfina exclusivamente no espectro da TPP. Nesse caso, esta estrutura foi gerada pela interação entre o elétron desemparelhado no anel porfirínico com os núcleos magnéticos (átomos de hidrogênio e nitrogênio) provenientes do mesmo anel. Este estudo ainda determinou-se os fatores que influenciam o espectro de RPE das porfirinas sendo: a natureza do radical ligado ao macrociclo porfirínico, as condições de disposição dos elétrons do centro metálico e o efeito eletrônico do impedimento estérico, bem como a cristalinidade da estrutura do composto ⁷⁵. Análises de diferentes porfirinas base livres e metaladas foram feitas sob condições distintas (temperatura ambiente, baixas temperaturas com a amostra imersa em nitrogênio líquido e presença de luz) sem influenciar diretamente o espectro. Para as porfirinas base livres é possível observar a estrutura hiperfina resultante da interação do elétron desemparelhado do macrociclo com os átomos de nitrogênio existentes no mesmo. Para as porfirinas complexadas com metais diamagnéticos (Zn e Ni) os resultados foram semelhantes aos obtidos para as porfirinas base livres. Em metaloporfirinas paramagnéticas (Fe-Cl, Mn, Co) o sinal existente no espectro de RPE é intenso devido ao elétron desemparelhado do centro metálico, mascarando o sinal devido a interação do elétron desemparelhado do anel porfirínico ⁷⁶.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e Equipamentos

Para a realização deste trabalho utilizou-se as porfirinas catiônicas meso-tetrakis (N-metil-4-piridil) complexada com Cu^{2+} , CuTMPyP e a porfirina tetra piridil (2-bipiridinil-2-cloro-1-rutênio) complexada com Cu^{2+} , CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄, sintetizadas ^{92,93} pelo Laboratório de Química Supramolecular e Nanotecnologia da USP, coordenado pelo professor Koiti Araki e gentilmente cedidas para o nosso estudo. Suas estruturas moleculares estão representadas na Figura 15.

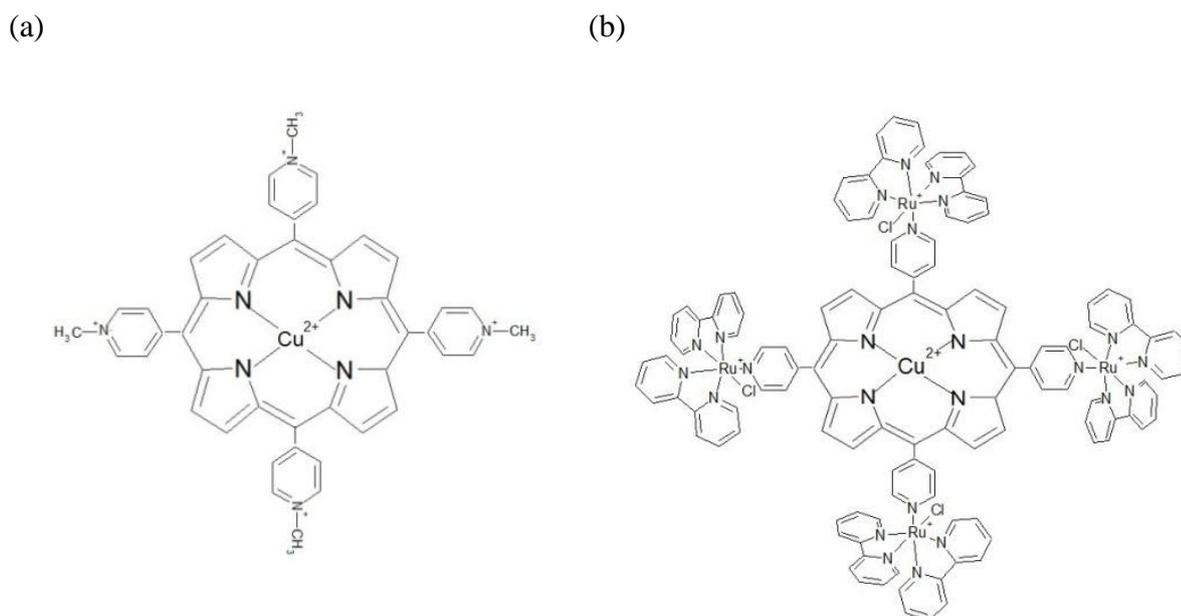


Figura 15. Estrutura molecular das porfirinas (a) CuTMPyP e (b) CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄.

Como modelos simplificados de membranas foram utilizados os surfactantes iônicos dodecil sulfato de sódio (SDS) da Sigma e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) da Riedel de Haën, e o não iônico polioxietileno 20 éter estearílico (Brij 78), também da Sigma, cujas estruturas moleculares estão apresentadas na Figura 16.

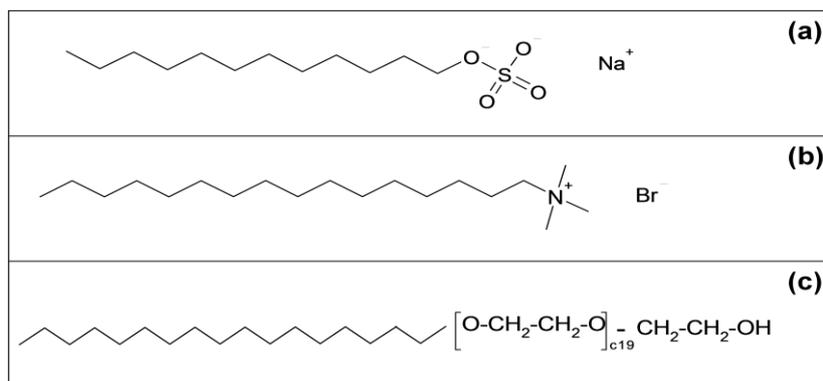


Figura 16. Estrutura molecular dos surfactantes (a) SDS, (b) CTAB e (c) Brij 78.

As mudanças de valores de pH das soluções foram controladas por meio do pHmetro da marca Noxtron modelo Nox-68, equipado com eletrodo de vidro Ag/AgCl.

Os espectros eletrônicos na região ultravioleta e visível foram obtidos através de um espectrofotômetro modelo Cary 50 BIO da marca Varian, no laboratório Multiusuário da Pós Graduação em Química Universidade Estadual do Centro-Oeste, campus de Guarapuava, utilizando-se uma cubeta de quartzo, com duas faces polidas e caminho ótico $l = 1,00$ cm.

Os espectros de Dicroísmo Circular Magnético foram obtidos no espectropolarímetro pertencente ao grupo de Biofísica Molecular do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo, campus de São Carlos, marca Jasco modelo J-720 equipado com eletroímã (8600 Gauss) com configuração Faraday. Foram realizadas medidas utilizando-se uma cubeta de quartzo com $l = 0,5$ cm.

As medidas de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram realizadas em um espectrômetro também pertencente à Biofísica, modelo Elexsys E580 da marca Bruker operando em banda-X (9,5 GHz). Para a porfirina CuTMPyP foram obtidos espectros em temperatura ambiente e para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ as amostras foram congeladas em temperatura próxima de 70K. As amostras em temperatura ambiente foram colocadas em tubos capilares de vidro e posteriormente inseridas em um tubo de quartzo de 3,0 mm de diâmetro interno. Já as amostras resfriadas foram inseridas diretamente no tubo de quartzo e resfriadas por uma serpentina imersa em nitrogênio líquido.

Com exceção das análises de RPE para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄, as medidas restantes foram realizadas a 25°C e em todas as análises os reagentes utilizados foram de grau analítico e sem purificações prévias.

4.2) Procedimento experimental

Para análise de absorção ótica de ambas as porfirinas realizou-se titulações em função do pH em solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ empregando-se varredura entre 300nm a 700nm, sendo a concentração da porfirina na ordem de $10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. O pH foi variado na faixa de 0,5 a 13,5 utilizando-se alíquotas de soluções estoques de HCl e NaOH em várias concentrações, e tomando-se medidas a cerca de 0,5 unidade de pH.

Com o intuito de se investigar a interação da porfirina com os surfactantes, foram realizados experimentos da porfirina CuTMPyP em acetato fosfato de sódio $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH fixo e igual a 7,0 adicionando-se alíquotas de diferentes concentrações dos surfactantes empregados neste estudo (SDS, CTAB e Brij 78) até que atingissem a CMC. Os valores das CMCs dos surfactantes estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de concentração micelar crítica dos surfactantes SDS,CTAB e Brij 78.

Surfactante	CMC(mol.L^{-1})
SDS ⁹⁴	$8,1 \times 10^{-3}$
CTAB ⁹⁵	$9,2 \times 10^{-4}$
Brij78 ⁹⁶	$4,6 \times 10^{-5}$

Para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ o mesmo experimento foi realizado em três valores de pH distintos: 2,0; 7,0 e 12,0. Para o experimento em pH 2,0 a porfirina foi solubilizada em solução tampão de acetato de sódio $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$. No experimento realizado em pH 7,0 o solvente empregado foi o acetato fosfato de sódio $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ e em pH 12,0 utilizou-se o borato de sódio $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ para a solubilização da porfirina.

Os espectros de Dicroísmo Circular Magnético foram obtidos num intervalo de 350 a 700 nm para a porfirina CuTMPyP em solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$ nos valores de pH 3,0; 7,0; e 12,0 e na presença de surfactantes SDS, CTAB e Brij 78. A análise de DCM para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ foi realizada no intervalo de 300 a 650 nm nos valores de pH 2,0; 7,0; e 12,0, sendo o solvente empregado acetato de sódio, acetato fosfato de

sódio e borato de sódio $0,020 \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente. Em cada pH foi realizado o experimento em presença dos surfactantes. As concentrações de porfirinas bem como de surfactantes utilizados estão mostrados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de concentração empregados para as amostras e surfactantes SDS,CTAB e Brij 78 empregados para análise de DCM.

	pH	[Porfirina] (mol.L ⁻¹)	[CTAB] (mol.L ⁻¹)	[Brij 78] (mol.L ⁻¹)	[SDS ₁] (mol.L ⁻¹)	[SDS ₂] (mol.L ⁻¹)
CuTMPyP	3,0; 7,0 e 12,0	$4,0 \times 10^{-5}$	$2,2 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-5}$	$5,0 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-1}$
CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl ₄ }	2,0; 7,0 e 12,0	$1,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-2}$

Para a análise de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram preparadas amostras da porfirina CuTMPyP com concentração igual a $1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução tampão nos valores de pH 3,0; 7,0; e 12,0. A concentração empregada para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl₄} foi de $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e o experimento realizado em valores de pH 2,0; 7,0; e 12,0. Para ambas as porfirinas foram realizados experimentos em pH fixo e igual a 7,0 em presença dos surfactantes, cujas concentrações empregadas são iguais aos empregados nas análises de DCM e estão listados na Tabela 5. Para tais experimentos foram utilizadas as seguintes condições: modulação dos sinais em 100 KHz, amplitude de modulação 4 Gauss e a potência de microondas de 20mW e quatro repetições de ciclos. Os demais parâmetros foram escolhidos de modo a se obter espectros sem distorção instrumental, ou seja, com velocidade de varredura menor que $\frac{\Delta H}{\tau}$ onde ΔH é a largura da linha e τ a constante de tempo utilizada. A calibração dos espectros foi realizada medindo-se a microonda em um freqüencímetro HP.

4.3) Análise dos dados

Os espectros de UV-Vis foram analisados utilizando-se o algoritmo "Convex Constraint Algorithm" (CCA) desenvolvido por Perczel e colaboradores⁹⁷. O CCA é um método geral de deconvolução para um conjunto completo de funções que são obtidas pela combinação linear de outras funções. Este programa requer a definição do número de funções base (f_i), isto é, é necessário definir o número de componentes puras. Teoricamente qualquer conjunto de funções pode ser processado desde que exista um conjunto confiável de dados experimentais.

Os espectros de DCM foram analisados fazendo-se uso de *smoothing*, do tipo Percentile Filter com número de pontos igual a 5 e porcentagem de 40.

Os cálculos de valores de g e A foram realizados da seguinte forma: considere a posição de g e A indicados no espectro hipotético de RPE que está representado na Figura 17.

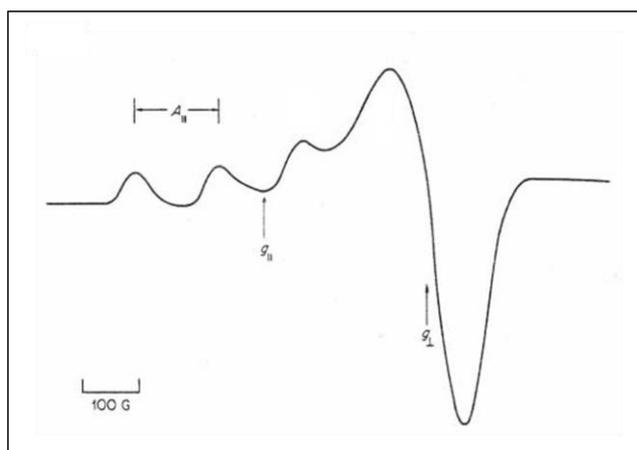


Figura 17. Espectro de RPE típico de uma proteína de cobre (benzilamina oxidase) em solução congelada a -150°C ⁸⁴.

Para os cálculo de $g_{||}$ e g_{\perp} , utilizou-se as seguintes equações:

$$g_{||} = \frac{h \cdot \nu_x}{\beta \cdot H_x} \quad (12)$$

$$g_{\perp} = \frac{h \cdot \nu_x}{\beta \cdot H_x} \quad (13)$$

onde h é a constante de Planck, ν a frequência de radiação, β o magneton de Bohr cujo valor é $9,2700 \cdot 10^{-24} \text{ J.T}^{-1}$ para o elétron livre, H_0 é o campo magnético externo aplicado. O valor da frequência de radiação é proveniente das condições do espectro e para a banda X é próxima a 9,5GHz.

Para a porfirina CuTMPyP os experimentos foram realizados em temperatura ambiente, portanto os valores de g e a são isotrópicos como descrito na sessão 3.4.3. Portanto os valores de g_0 e A_0 são calculados utilizando-se as seguintes equações:

$$g_0 = \frac{1}{3} (g_{\parallel} + 2g_{\perp}) \quad (14)$$

$$A_0 = \frac{1}{3} (A_{\parallel} + 2A_{\perp}) \quad (15)$$

Para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ os valores anisotrópicos de g_{\parallel} , g_{\perp} , A_{\parallel} e A_{\perp} foram calculados segundo as equações (12) e (13), e a Figura 17, respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CuTMPyP

5.1.1. Absorção na Região do Ultravioleta e Visível (Uv-Vis)

Um estudo inicial para a verificação da estabilidade foi realizada para a porfirina CuTMPyP, visto que, algumas porfirinas são degradáveis. Os espectros eletrônicos da degradação para esta porfirina em tampão de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0, em função do tempo, são mostrados na Figura 18(a) cujos resultados mostram claramente que não há decréscimo significativo na absorbância nem deslocamento espectral, evidenciando a não existência de degradação. A Figura 18(b) apresenta detalhadamente o comportamento espectroscópico da absorção em função do tempo para a mesma porfirina. Observa-se um aumento da absorbância em 435 nm com o decorrer do tempo, explicado provavelmente porque há uma maior solubilização desta porfirina em solução após um dado período de tempo, ou seja, o estado de equilíbrio desta porfirina em solução é atingido cerca de 3 horas após o seu preparo. Verifica-se que após 3 horas, a absorbância em 425 nm não varia em função do tempo. Após 7 horas de experimento a porfirina permanece estável, contudo, conclui-se que a porfirina CuTMPyP não é degradada neste intervalo de tempo.

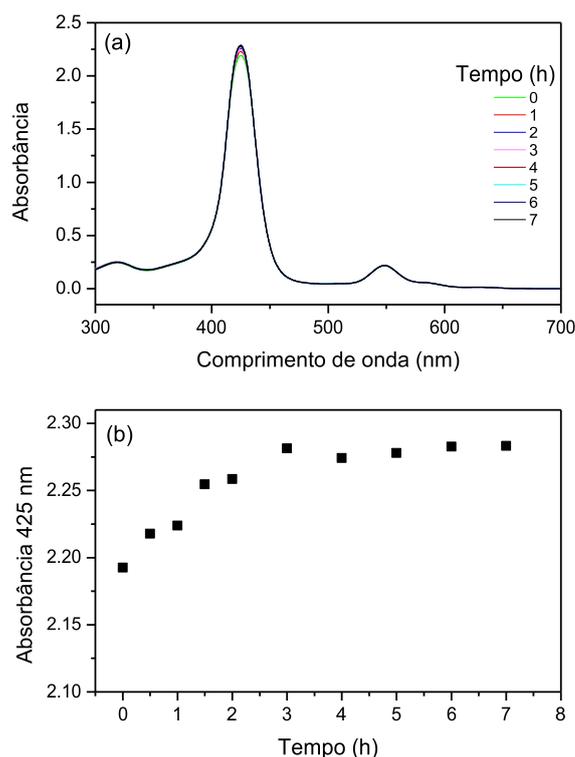


Figura 18. (a) Espectros eletrônicos da porfirina CuTMPyP em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0 em função do tempo (b) absorção desta porfirina em 425 nm em função do tempo. A concentração de porfirina empregada foi $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$.

Determinou-se a absorvidade molar para a porfirina CuTMPyP em solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH 7,0 a temperatura ambiente. A Figura 19 mostra os espectros de absorção ótica da porfirina em diferentes concentrações e verifica-se que há um aumento de intensidade do sinal em função da concentração. Observa-se a presença de uma banda bem definida característica de todas as porfirinas centrada em 425nm, denominada banda de Soret e duas bandas de menor intensidade centradas em 550nm e 590nm na região da banda Q características de metaloporfirinas. As transições eletrônicas devido ao macrociclo são responsáveis pela produção do sinal na banda de Soret, enquanto que as transições produzidas nos anéis periféricos produzem a banda Q ⁹⁸. Pode-se observar ainda que através dessa figura a visualização da banda Q se faz possível apenas quando a concentração da porfirina se encontra relativamente alta.

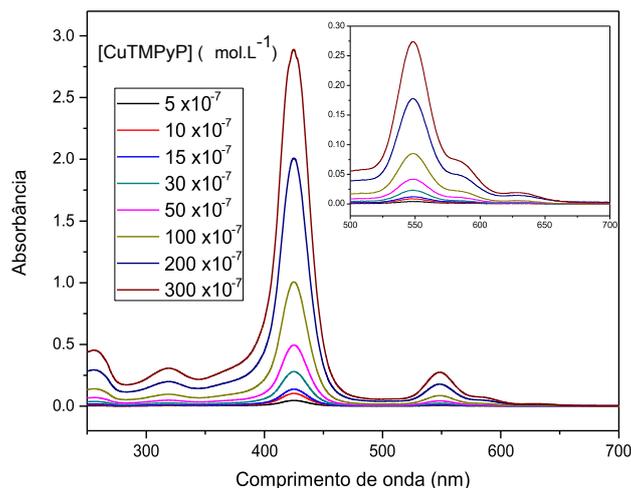


Figura 19. Espectros de absorção ótica para a porfirina CuTMPyP em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0, em diferentes concentrações. Ampliação na região na banda Q.

O gráfico da absorbância em 425 nm da porfirina em função da concentração da CuTMPyP, mostrado na Figura 20, permite a determinação do valor da absorvidade molar para esta porfirina cujo valor é de $9,77 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, em pH 7,0. Dados relativos a um estudo semelhante, porém em solventes distintos podem ser encontrados na literatura. Komath e colaboradores⁹⁹ determinaram para a mesma porfirina o valor de $2,75 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em comprimento de onda 424 nm e meio tamponado de PBS ($0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ de tampão de fosfato contendo $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl em pH= 7.4). Os resultados apresentam algumas discrepâncias dos encontrados aqui em virtude dos diferentes solventes utilizados.

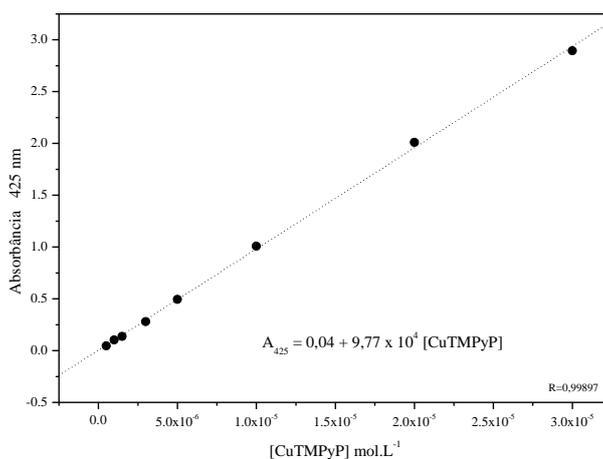


Figura 20. Absorbância em 425 nm em função concentração da CuTMPyP, em tampão acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0.

O gráfico da Figura 20 ainda mostra que na faixa investigada, isto é, de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ até $3,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ a Lei de Beer-Lambert é obedecida. Este fato é relevante, pois a literatura mostra que algumas porfirinas tem tendência a se agregarem acima de uma determinada concentração¹⁰⁰. Deste modo, assegurou-se que em todos os experimentos realizados ao longo do estudo em questão a porfirina CuTMPyP obedeceu à lei de Beer-Lambert.

A Tabela 6 apresenta alguns valores de absorvidade molar para diversas porfirinas.

Tabela 6. Valores de absorvidade molar para diversas metaloporfirinas⁹⁹.

Porfirina	$\lambda_{\text{máximo}}$	$\epsilon_{\text{máx}} \times 10^5 (\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$
CuTPPS	411	1,91
ZnTPPS	422	3,70
CuTCPP	412	1,53
ZnTCPP	422	1,62

Para a verificação da influência da força iônica nas propriedades eletrônicas da CuTMPyP, também foram realizados experimentos de titulações desta porfirina com concentração de $12 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de NaCl até praticamente a saturação do meio. Os resultados mostraram que na faixa estudada, o comportamento espectral desta porfirina é independente da concentração de sal presente no meio, sugerindo a existência de apenas uma única espécie em solução, como pode ser observado na Figura 21.

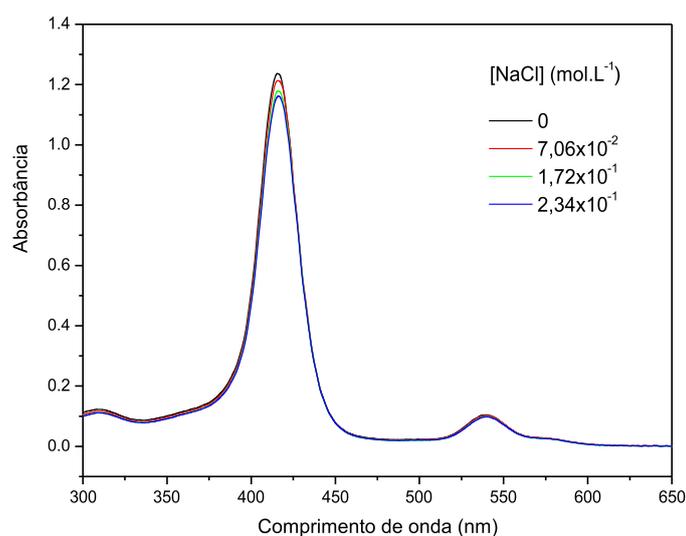


Figura 21. Espectros eletrônicos da porfirina CuTMPyP em função da concentração de NaCl. ($[\text{CuTMPyP}] = 12 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Os espectros eletrônicos da titulação da porfirina CuTMPyP, em solução tampão acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, em função do pH estão apresentados na Figura 22.

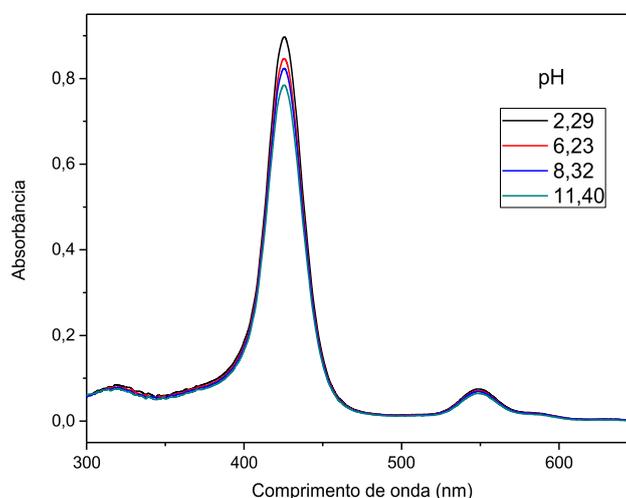


Figura 22. Espectros de absorção óptica da porfirina em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em diferentes pH. ($[\text{CuTMPyP}] = 9 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Na Figura 22 pode-se observar que variando-se o pH na faixa sob investigação, cujo intervalo estende-se desde 0,5 a 13,5 os espectros eletrônicos não sofreram alterações significativas. Uma discreta diminuição na banda de Soret foi observada que pode ser atribuída à perturbação do sistema, devido a variação do pH modificado com alíquotas de soluções de diferentes concentrações de HCl e NaOH. Nenhum ponto isobéstico é observado, sugerindo a existência de apenas uma espécie em solução, ou seja, a CuTMPyP não sofre processo de dimerização ou agregação influenciado pelo pH do meio.

Estudos mostram que as porfirinas catiônicas sofrem agregações influenciadas pelo meio em que se encontram solubilizadas. O processo de dimerização na presença de KCl da porfirina base livre H_2TPPC foi observado¹⁰¹. Gandini e colaboradores¹⁰² analisaram a influencia do pH e da força iônica para porfirina complexada com Fe^{3+} , FeTMPyP e observou-se a presença de quatro valores de pH críticos em meio tamponado e de apenas três em presença de NaCl.

Para investigar a interação da porfirina com os surfactantes catiônico CTAB, aniônico SDS e não iônico Brij 78 através das propriedades eletrônicas da porfirina catiônica CuTMPyP em solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em pH fixo e igual a 7,0, realizou-se titulações desta porfirina em presença destes compostos variando-se a concentração de surfactante em solução desde 0 mol.L^{-1} até concentrações superiores a CMC.

A Figura 23 mostra alguns espectros da porfirina CuTMPyP em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0 em função da concentração do surfactante aniônico em solução. Na presença de moléculas de SDS esperava-se uma grande interação porfirina-micela visto que os fatores eletrostáticos são de grande importância no processo de interação das porfirinas. Através da titulação da CuTMPyP em função da concentração de SDS a interação porfirina-micela pode ser observada ¹⁰³⁻¹⁰⁵.

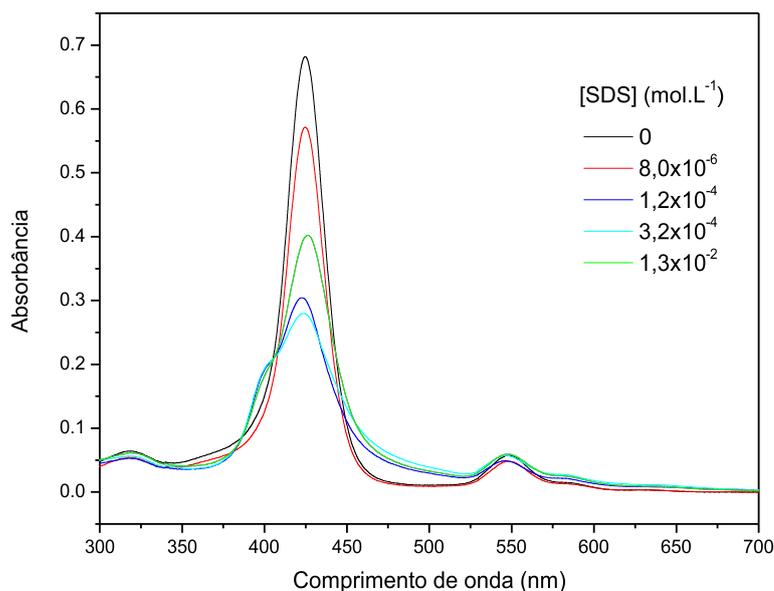


Figura 23. Espectros de absorção óptica da porfirina em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em função da concentração de SDS em solução. ($[\text{CuTMPyP}] = 7 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Com o aumento da concentração de SDS em solução observou-se um decréscimo gradual na intensidade da banda de Soret inicialmente centrada em 425 nm até que a concentração de SDS atinja $3,12 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Posteriormente a essa concentração inicia-se um deslocamento espectral para comprimento de ondas maiores e a intensidade de absorção da banda de Soret passa a aumentar com o aumento da concentração de SDS. Em meio micelar a interação porfirina-micela de SDS é evidenciada pelo deslocamento batocrômico do espectro cuja banda de Soret encontra-se centrada em 429 nm. Após a concentração de $1,77 \times 10^{-3}$ a banda de Soret, se mantém praticamente constante até o final da titulação. O processo de interação porfirina-SDS, abaixo da CMC pode ser observado macroscopicamente pelo desaparecimento na coloração da solução contendo porfirina, seguido do seu reaparecimento com o aumento da concentração de SDS em solução.

Um estudo semelhante foi realizado por Yaffe e colaboradores¹⁰⁴ através de absorção ótica, ressonância de espalhamento de luz, potencial ξ e espectroscopia de energia dispersiva de raio -X para a porfirina catiônica cloreto de ferro meso-tetrakis (N-metil-4-piridil), FeTMPyP em concentrações de SDS abaixo da CMC, cujos resultados mostraram duas transições de fase macroscópica, precipitação e redissolução como função da concentração de SDS. Como ocorre para a CuTMPyP, para a FeTMPyP também foi observado macroscopicamente a mudança na coloração da porfirina até atingir uma concentração de SDS, na qual ocorre uma interação entre a porfirina e o agregado pré-micelar e posteriormente, com o aumento da concentração de SDS ocorre o reaparecimento da coloração da porfirina.

Para um detalhamento do comportamento espectroscópico da porfirina CuTMPyP, o conjunto de espectros experimentais da Figura 23 foi submetido à análise computacional considerando-se a existência da combinação linear de três componentes puras em solução. Como resultado desta análise, obteve-se os espectros da deconvolução das três espécies puras neste equilíbrio apresentados na Figura 24(a). As contribuições das três espécies, em função da concentração de SDS em solução estão mostradas na Figura 24(b). Pela análise deste gráfico obteve-se os valores de pK da transição da primeira espécie para a segunda e da transição da segunda para a terceira espécie. Os valores de pK encontrados foram $pK_1 = 4,37 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $pK_2 = 8,01 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Atribuiu-se ao espectro com a banda de Soret centrada em 425 nm a forma livre da porfirina, a centrada em 424 nm a agregado pré-micelar e para a forma de interação porfirina-micela a centrada em 429 nm.

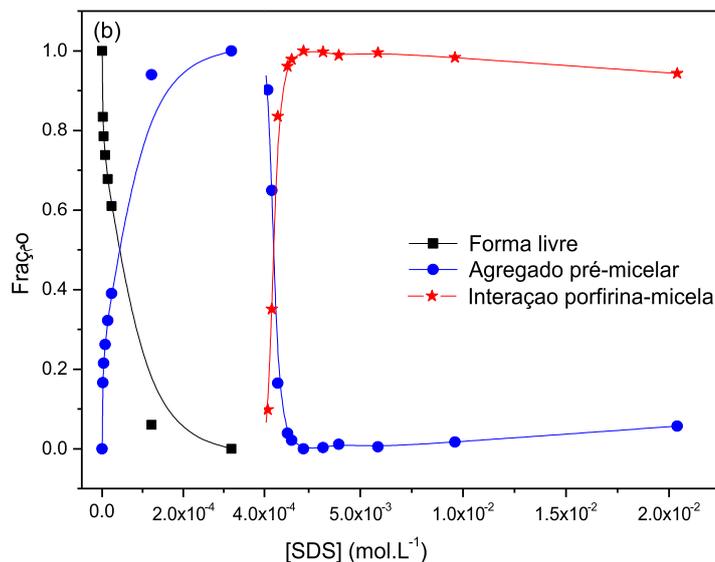
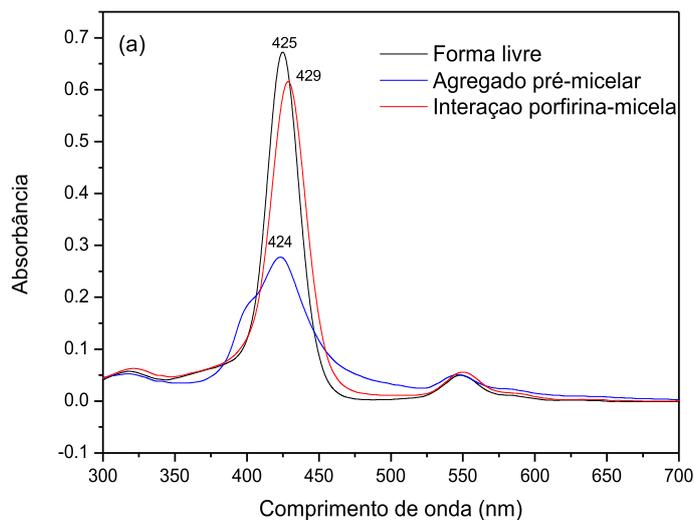


Figura 24. (a) Componentes da deconvolução dos espectros ótico da CuTMPyP em acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$. (b) Contribuições das Frações das três espécies da CuTMPyP existentes no equilíbrio em função da concentração de SDS em solução.

As interações da porfirinas $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ com o surfactante SDS foram analisadas através de absorção eletrônica, bem como de outras técnicas espectroscópicas. Os resultados mostraram um comportamento análogo ao da porfirina CuTMPyP aqui demonstrados. A interação ocorre através

de um equilíbrio duplo entre monômero, agregado pré micelar e o monômero solubilizado em micelas de SDS. Os resultados obtidos por UV-vis para esta porfirina foram confirmados a com a espectroscopia de emissão de fluorescência que afirma que três espécies diferentes estão presentes ao longo da titulação da porfirina $\text{H}_2\text{TMPyP}^{4+}$ com este surfactante aniônico²².

Os gráficos das Figura 25(a) e 25(b) apresentam a absorbância porfirina em 425nm em função da concentração do surfactantes CTAB e Brij 78.

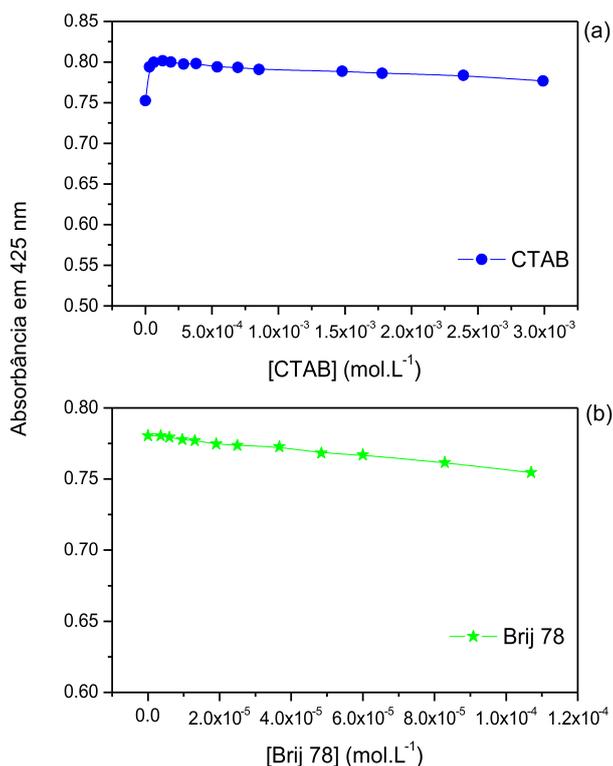


Figura 25. Absorbância em 425 nm porfirina CuTMPyP em função da concentração do surfactante em pH=7,0 (a) CTAB ($[\text{CuTMPyP}] = 6 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e (b) Brij 78 ($[\text{CuTMPyP}] = 8 \mu\text{mol.L}^{-1}$).

Observa-se, através das Figura 25(a) e 25(b), que a interação da porfirina com o surfactante catiônico e não iônico é praticamente nulo, pois a absorbância em 425 nm se mantém em toda a faixa de concentração investigada. Considerando que a porfirina CuTMPyP é catiônica e que o surfactante CTAB também apresentam uma superfície hidrofóbica com carga positiva, devido a repulsão de cargas observa-se a não interação porfirina-CTAB ao longo de toda a faixa de concentração estudada para este surfactante. Um fenômeno semelhante ocorre para o surfactante não iônico Brij 78. Não se observam mudanças espectrais significativas, quando aumenta-se

gradativamente a concentração deste surfactante, indicando assim que não ocorre uma interação entre a CuTMPyP e o surfactante não iônico.

Os resultados até aqui obtidos podem ser resumidos no gráfico da Figura 26, os espectros eletrônicos da porfirina CuTMPyP (pH 7,0) em solução tampão de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ e em outros três diferentes meios micelares.

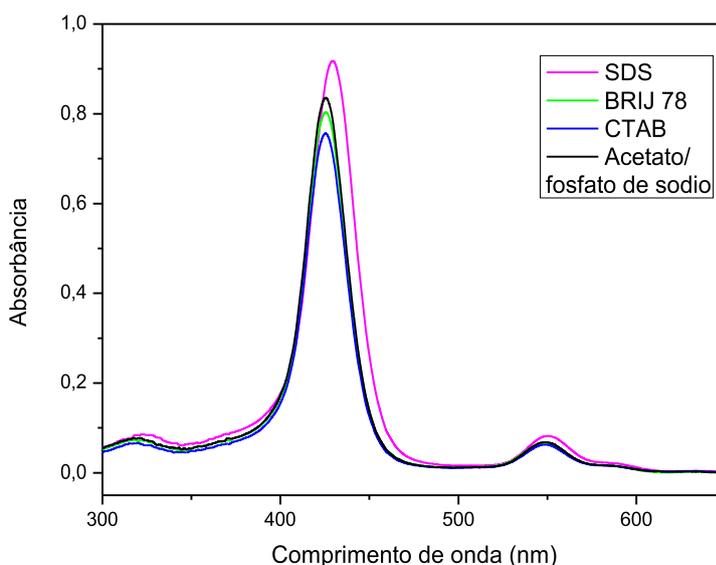


Figura 26. Espectros de absorção óptica da porfirina CuTMPyP em solução de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ e em meio micelar de SDS, CTAB e Brij 78.

Na presença do surfactante aniônico SDS ocorre um deslocamento batocrômico de ambas as bandas no espectro desta porfirina, enquanto que na presença dos outros surfactantes catiônico e o não iônico esse fenômeno não é observado. Isto sugere que há uma interação entre a porfirina catiônica CuTMPyP e as micelas do surfactante aniônico como também reportado por Kadish e colaboradores¹⁰⁴.

5.1.2. Dicroísmo Circular Magnético (DCM)

Com o intuito de se caracterizar o comportamento espectroscópico da porfirina CuTMPyP em solução tampão de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹, a titulação da mesma foi realizada em valores de pH distintos utilizando o Dicroísmo Circular Magnético. Observa-se na Figura 27(a), que

os espectros são constituídos por dois picos positivos em 409 e 452 nm e um pico negativo de grande intensidade em 427 nm na região da banda de Soret (350 a 500nm). Na região na banda Q (500 a 750 nm) é possível observar a presença de dois picos positivos centrados em 540 e 595 nm e dois picos negativos de menor intensidade com mínimos em 578 e 562nm. É possível afirmar que não há nenhum ponto isosbético, portanto sugere-se a existência de apenas uma espécie em solução independente do pH do meio. Através da Figura 27(b) é observado que também não ocorrem mudanças quando os surfactantes CTAB e Brij 78 estão presentes em solução na forma micelar.

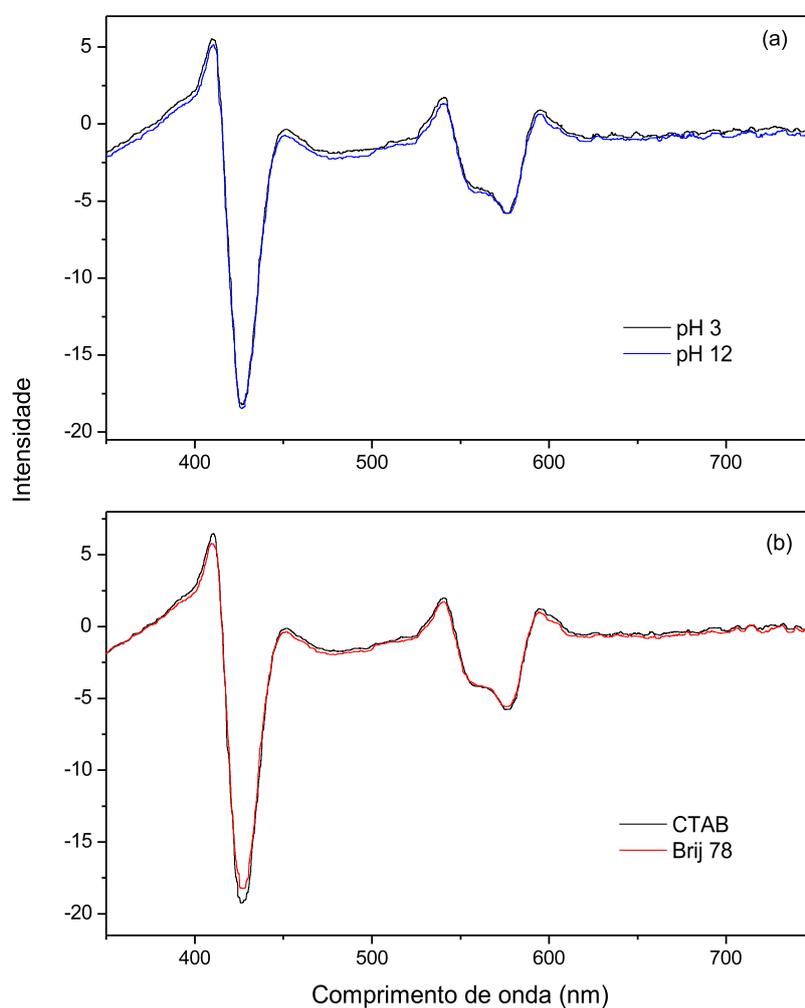


Figura 27. (a) Espectros de DMC de solução tampão de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ de CuTMPyP (40×10^{-6} mol.L⁻¹) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss (a) em diferentes valores de pH e (b) na presença de CTAB e Brij 78.

Os espectros de DCM para diferentes concentrações de SDS estão apresentados na Figura 28.

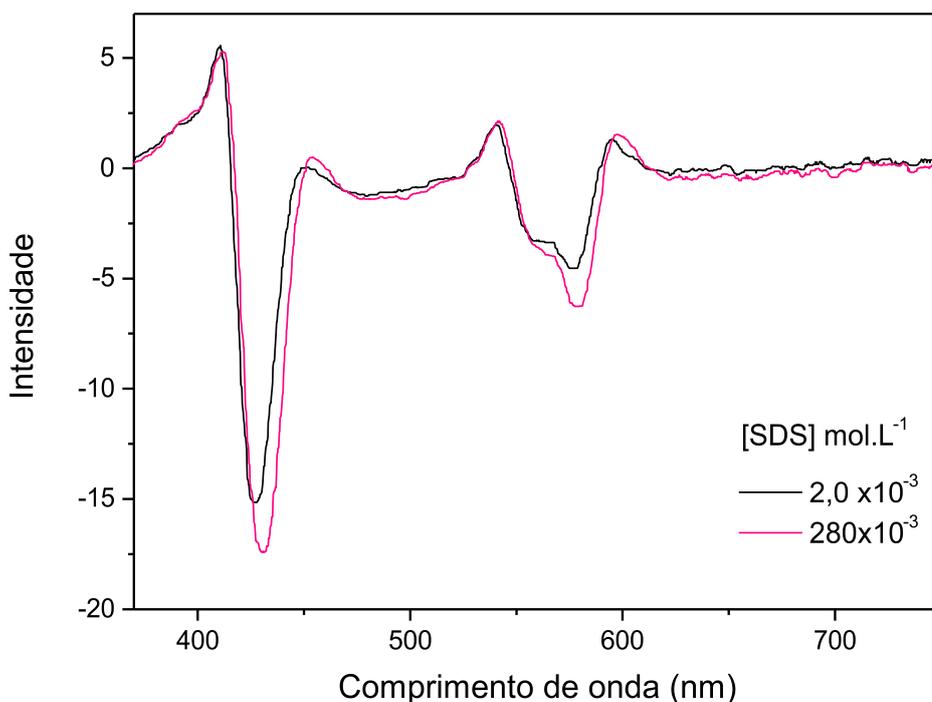


Figura 28. Espectros de DCM de solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ de CuTMPyP ($40 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss e presença de SDS em diferentes concentrações e pH 7,0.

Com o aumento da concentração de SDS em solução não houve o surgimento de nenhum novo pico, porém um deslocamento discreto para comprimento de ondas maiores em ambas as bandas do espectro foi observado indicando uma interação entre a porfirina e as micelas de SDS. Diferentemente do observado em ótica, não foi possível observar as três espécies existentes em equilíbrio em função da concentração de SDS propostas pela absorção ótica no estudo realizado por DCM. Este fato se justifica em consequência da alta concentração da amostra empregada para DCM, cerca de cinco vezes, em relação ao experimento realizado utilizando absorção ótica.

5.1.3. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

A porfirina CuTMPyP foi estudada por RPE em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em temperatura ambiente, em diferentes valores de pH e na presença de surfactantes. Os experimentos foram realizados de modo a monitorar o estado de oxidação do centro metálico e/ou possíveis modificações estruturais decorrentes da formação de agregados moleculares. Os picos observados nos espectros de RPE são unicamente referentes ao centro metálico da porfirina uma vez que o macrociclo bem como os radicais não apresentam elétrons desemparelhados, cuja presença é necessária para análise por RPE, visto que esta técnica baseia-se na detecção de espécies paramagnéticas.

O número de linhas da interação é dado pela multiplicidade dos estados de spin nuclear é dado por $2S+1$, no caso do Cu^{2+} , $S=3/2$ ⁸⁴, portanto espera-se que os espectros exibissem um quarteto e, como os momentos nucleares e magnéticos deste íon são similares, as linhas são próximas e nem sempre é possível distingui-las, principalmente quando elas são largas. A Figura 29 apresenta os espectros de RPE para a CuTPMPyP em diferentes valores de pH.

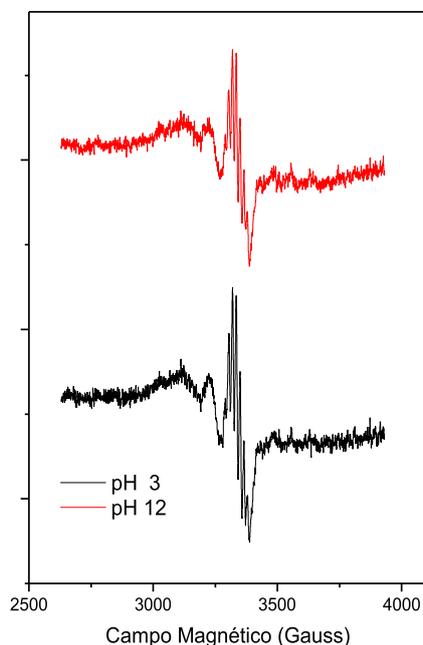


Figura 29. Espectros de RPE a temperatura ambiente de CuTMPyP em pH 3,0 e 12,0. ($[\text{CuTMPyP}] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$).

Os experimentos para a porfirina CuTMPyP foram realizados em solução e temperatura ambiente, o valor de g_0 e A_0 para o Cu^{2+} , nestas condições é isotrópico. Observa-se na Figura 29, a presença de quatro linhas de RPE com $g=2,075$ para ambos os valores de pH. O acoplamento hiperfino é evidenciado por nove linhas presentes no espectro correspondente a interação do acoplamento do Cu^{2+} com os quatro nitrogênios equivalentes existentes no macrociclo porfirínico. Não foi observada nenhuma mudança espectral nos ligantes axiais e nem nos equatoriais em função do pH, portanto confirma-se o modelo proposto pela absorção ótica e DCM da existência de apenas uma espécie em solução independente do pH do meio.

Normalmente em complexos de Cu (II) coordenado com átomos de nitrogênio pode-se observar nos espectros de RPE no sinal perpendicular ao Cu^{2+} , um conjunto de linhas separadas por 10 a 30 Gauss. Este conjunto de linhas é devido à interação super-hiperfina proveniente da interação do elétron desemparelhado do Cu^{2+} com o núcleo do nitrogênio ligante. Em alguns casos, o elétron desemparelhado pode estar deslocalizado sobre diversos átomos idênticos, então, o número de linhas será dado por $2nI+1$, onde n é o número de núcleos equivalentes com quem o elétron desemparelhado interage. Para a porfirina CuTMPyP existem quatro nitrogênios equivalentes do macrociclo porfirínico, e, como I para o nitrogênio é igual a 1, a interação hiperfina deve ser composta por nove linhas ressonantes.

O cobre (^{63}Cu ou ^{65}Cu) tem spin nuclear $S = 3/2$, o qual dá origem a quatro linhas ressonantes e ao desdobramento hiperfino, devido aos elétrons d estarem deslocalizados, por sobre os nitrogênios do macrociclo porfirínico. O centro metálico da porfirina CuTMPyP é composto pelo íon cobre no seu estado de oxidação (II). Nesta configuração os nove elétrons de valência do Cu^{2+} , localizados no subnível d . O íon metálico está coordenado a seis ligantes, cujas ligações axiais diferem em comprimento das equatoriais. O elétron desemparelhado está localizado no orbital dx^2-y^2 , portanto as transições possíveis são $dx^2-y^2 \rightleftharpoons d_{xy}$ e $dx^2-y^2 \rightleftharpoons d_{xz}, d_{yz}$.⁸⁴

A interação hiperfina só pode ocorrer quando o elétron desemparelhado possuir uma probabilidade finita de densidade de núcleo. Logo, elétrons em orbitais p , d , f e superiores, que têm funções de onda com nós no núcleo (densidade eletrônica nula) precisam ter algum caráter de orbital s para que possa ocorrer a interação via interação de contato. Como o elétron desemparelhado do Cu^{2+} está localizado no orbital dx^2-y^2 , as ligações formadas são do tipo σ , visto que estão em orbitais moleculares ligantes híbridos e apresentam um ligeiro caráter s . Quanto maior a densidade eletrônica nestes orbitais moleculares maior será o valor de A e maior o caráter covalente das ligações.

Basu e colaboradores¹⁰³, estudaram a porfirina Cu(TPP) através de RPE solubilizada em tolueno a temperatura ambiente e em solução congelada. A temperatura ambiente os espectros de RPE desta porfirina exibiram quatro linhas características dos isótopos naturais de maior abundância do cobre (⁶³Cu, ⁶⁵Cu). O Cu²⁺ possui S=3/2, portanto apresenta quatro ($2nI+1 = 2 \times 1 \times 3/2 + 1 = 4$) linhas de ressonância. Sob condições experimentais, os dois isótopos não podem ser diferenciados. O valor de g isotrópico obtido para esta porfirina foi de 2.117. O espectro apresenta ainda o acoplamento hiperfino composto por nove linhas distintas devido ao acoplamento da porfirina com átomos de nitrogênio do anel macrocíclico. A teoria do campo cristalino prediz que o elétron desemparelhado para esta porfirina está localizado no orbital $3dx^2-y^2$, localização esta, direcionada aos nitrogênios. Complexos de cobre foram analisados por Gancheva e colaboradores¹⁰⁶ através técnicas espectroscópicas com o objetivo de observar a influência do solvente empregado. Os resultados obtidos para os dois complexos empregando-se RPE a temperatura ambiente apresentaram $g_0 = 2,065$ e $2,060$ em DMFA, e $g_0 = 2,067$ e $2,063$ em DMSO. Os valores de A_0 variaram de 570 a 580 Gauss para DMFA e de 520 a 530 Gauss para DMSO. Utilizou-se um complexo de cobre solubilizado em tolueno como referência para análise dos dados, uma vez que $g_0 = 2,047$ e $A_0 = 720$ Gauss. Estes resultados condizem com o número de linhas encontrados nos espectros de RPE bem como os valores de g_0 obtidos para a porfirina CuTMPyP. Como reportado¹⁰⁶, o solvente empregado influencia de forma significativa no comportamento espectroscópico dos compostos, portanto, as discrepâncias podem ser atribuídas aos diferentes solventes empregados nos estudos.

Os espectros de RPE da porfirina CuTMPyP na presença de micelas do surfactante catiônico CTAB e Brij 78 estão apresentados na Figura 30. Os resultados experimentais obtidos foram semelhantes ao da porfirina CuTMPyP em solução tampão de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ na ausência de micelas, indicando assim que não há mudanças no comportamento espectral da porfirina quando micelas catiônicas estão presentes. As quatro linhas de RPE em $g = 2,073$ podem ser observados também na presença de CTAB, e $g = 2,079$ na presença de Brij 78. Na presença de ambos os surfactantes a estrutura super-hiperfina é composta por nove linhas ressonantes devido ao acoplamento Cu²⁺ com os quatro nitrogênios também estão presentes. Devido à carga na parte hidrofóbica da micela, o surfactante catiônico CTAB exibe um potencial de superfície positivo e considerando a existência de uma também carga positiva localizada nos anéis periféricos da porfirina, esperava-se realmente que houvesse uma repulsão entre as cargas, de modo a não haver uma interação porfirina-micela. Um comportamento espectral semelhante é observado quando

micelas do surfactante não iônico Brij 78 estão presentes em solução. A ausência de mudanças espectrais significativas na presença de micelas de CTAB e Brij 78 caracteriza a existência de somente uma espécie em solução sugerindo a não existência de interação porfirina micela de surfactante catiônico e não iônico.

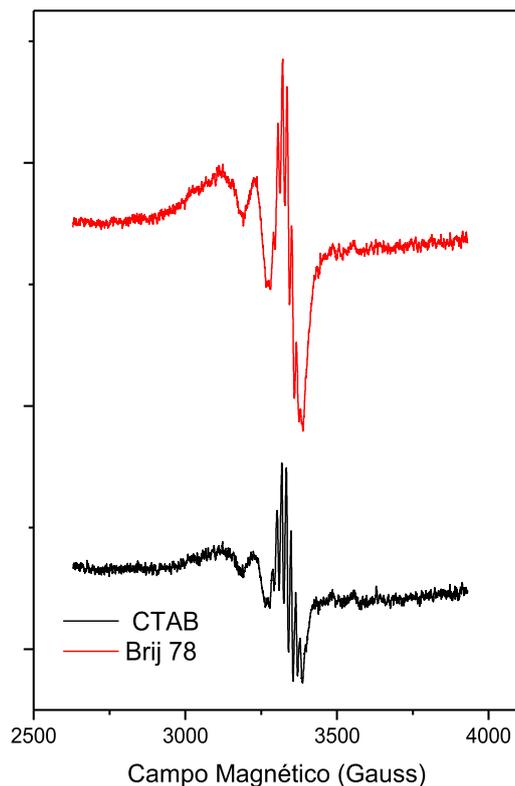


Figura 30. Espectros de RPE a temperatura ambiente de CuTMPyP pH 7,0 na presença de micelas de CTAB e Brij 78. ($[CuTMPyP]= 1\text{mmol.L}^{-1}$).

Na presença de surfactante aniônico, ocorreram dois comportamentos distintos dependentes da concentração de SDS presente em solução que estão ilustrados na Figura 31. O experimento realizado com concentração de $SDS= 5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, isto é, abaixo da CMC apresentou um espectro semelhante à ausência de surfactante em solução: as quatro linhas de RPE em $g= 2,075$ estão presentes no espectro bem como as nove linhas de ressonância da estrutura super-hiperfina. Portanto, nestas condições experimentais, não foi observado nenhuma interação entre a porfirina e

surfactante aniônico. Todavia, quando micelas de SDS estão presentes no meio ($[SDS]= 4,2 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$) é possível a identificação de uma forte interação entre a porfirina e as micela de SDS através da um afinamento das linhas. As quatro linhas de RPE estão presente no espectro que apresenta $g=2,077$. A estrutura hiperfina é, novamente, composta por nove linhas de ressonância. Além da permanência do sinal de RPE, não há deslocamento espectral, conclui-se, portanto que a interação entre a porfirina e as micelas de SDS não se dá através de processos de agregação. Cita-se que não foi possível observar a interação entre a porfirina e o ambiente pré-micelar com precisão, pois a alta concentração de porfirina empregada ($1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ para RPE) pode ter mascarado esta interação. Apenas a forma livre da porfirina CuTMPyP e a forma solubilizada em micelas de SDS foram observadas por esta técnica.

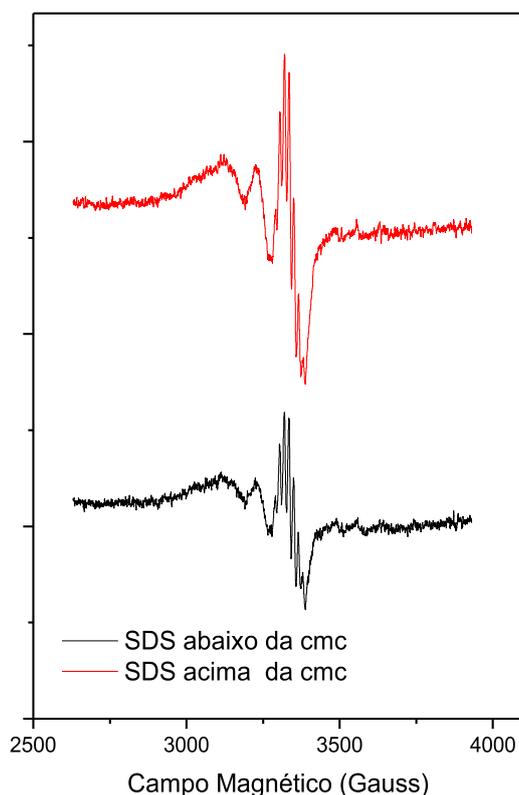


Figura 31. Espectros de RPE a temperatura ambiente de CuTMPyP em pH 7,0 na presença de SDS abaixo ($5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) e acima ($4,2 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$) da CMC. ($[CuTMPyP]= 1 \text{ mmol.L}^{-1}$).

A Tabela 7 exhibe um resumo dos resultados obtidos através da técnica de RPE. Nela são encontrados os valores de g_0 e A_0 calculados a partir dos espectros de RPE para a porfirina CuTMPyP (vide ítem 4.3).

Tabela 7. Valores de g_0 e A_0 calculados a partir dos espectros de RPE para a porfirina CuTMPyP.

	g_0	A_0 (Gauss)
CuTMPyP em pH 3	2,075	134
CuTMPyP em pH12	2,075	136
CuTMPyP +CTAB	2,073	135
CuTMPyP +Brij 78	2,079	135
CuTMPyP +SDS ₁	2,075	134
CuTMPyP +SDS ₂	2,077	130

5.2. CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄

5.2.1. Absorção na Região do Ultravioleta e Visível (Uv-Vis)

A avaliação da estabilidade da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ foi realizado em tampão de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ e pH 7,0 e os resultados obtidos encontram-se na Figura 32.

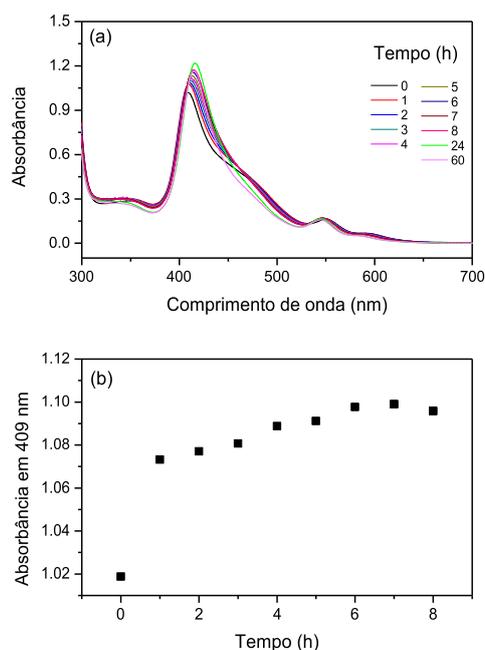


Figura 32. Análise do comportamento espectroscópico da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ em solução de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ e pH 7,0 . (a) Espectros eletrônicos da porfirina em função do comprimento de onda e (b) absorção em comprimento de onda máximo de 409 nm em função do tempo. A concentração de porfirina empregada foi cerca de 1,0x10⁻⁶ mol.L⁻¹.

Ao contrário do que ocorre com a porfirina CuTMPyP, os espectros da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ são modificados significativamente com o decorrer do experimento. É possível observar na Figura 32(a) a existência de um deslocamento batocrômico e também um aumento da absorbância ao longo do tempo, sendo que o tempo de decorrência deste experimento foi superior ao realizado para a CuTMPyP devido as mudanças significativas para esta porfirina. Nas primeiras oito horas decorrentes do experimento, a flutuação nos valores de absorção é pequena e a formação de um patamar estável de valores de absorção é observado. Porém, devido a mudanças espectrais, sugere-se que decorrido a este período a porfirina inicie um processo de queda de

estabilidade. A Figura 32(b) detalha o comportamento espectral da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ onde, como ocorre para a porfirina CuTMPyP, também é observado o aumento da dissolução da porfirina em solução ao longo do tempo.

A determinação da absorvidade molar em solução tampão de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹, pH 7,0 e temperatura ambiente também foi realizada para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄. Na Figura 33(a) são apresentados os espectros obtidos neste experimento.

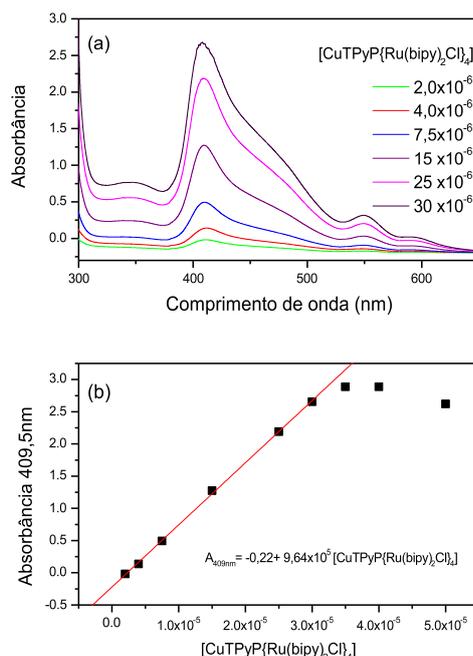


Figura 33. (a) Espectros de absorção ótica para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ em solução de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ em diferentes concentrações. (b) Absorbância em 409 nm em função concentração da CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄, em tampão acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ e pH 7,0.

É possível observar espectros típicos de metaloporfirinas, ou seja, as transições eletrônicas devido ao macrociclo geram uma banda de Soret bem definida centrada em 409 nm e as transições produzidas nos anéis periféricos produzem duas bandas Q de menor intensidade centradas em 549 e 593 nm. A intensidade de absorção aumenta com o aumento da concentração, porém essa relação não é diretamente proporcional. A partir da concentração de CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ em solução maior a 3 × 10⁻⁵ mol.L⁻¹ é possível observar o fenômeno de auto agregação desta porfirina, evidenciado pelo alargamento da banda de Soret e desvio da Lei de Beer- Lambert, que pode ser

melhor visualizado na Figura 33(b). O valor da absorvidade molar para esta porfirina é de $9,64 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, em pH 7,0, sendo este determinado pelo mesmo método já descrito anteriormente para a porfirina CuTPyP. Cita-se que a lei de Beer-Lambert foi seguida na realização dos experimentos utilizando-se as técnicas de ultravioleta e visível e dicroísmo circular magnético, ao contrário do que ocorreu nos experimentos de ressonância paramagnética eletrônica. Este fato é justificado pelas diferentes concentrações exigidas para que o aparelho instrumental detecte o sinal da amostra.

Para verificar a influência da força iônica nas propriedades eletrônicas da CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄, realizou-se titulações desta porfirina em uma concentração fixa em função da concentração de NaCl. Ao longo desta adição, verificou-se que a presença deste sal alterou significativamente os espectros ópticos da porfirina, como mostra a Figura 34.

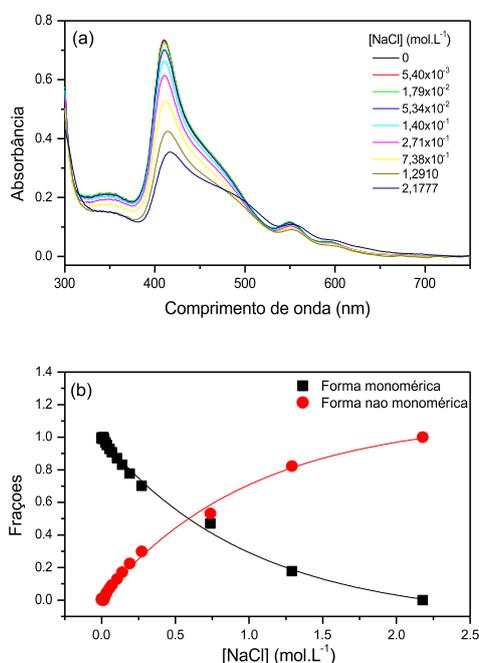


Figura 34. (a) Espectros eletrônicos da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ em função da concentração de NaCl.(b) Contribuições das frações monoméricas e não monoméricas em função da concentração de NaCl.

Pode-se observar nesta figura que há um ligeiro deslocamento para comprimentos de onda maiores e alterações na intensidade da banda de Soret dos espectros, indicando que há um considerável efeito da força iônica nas propriedades eletrônicas desta porfirina. Pode-se observar que abaixo de $5,9 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$ de NaCl em solução esta porfirina existe predominantemente na

forma monomérica. Acima desta concentração há uma transição para a forma não monomérica. Deste modo assegura-se que em todos os experimentos realizados, com a porfirina em solução tampão acetato fosfato de $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, inicialmente a porfirina em solução encontrava-se na forma monomérica.

Com a finalidade de descobrir as diferentes formas possíveis da $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ ao longo do pH investigado, bem como analisar possível formação de agregados, visto que a auto agregação foi anteriormente observada para esta porfirina, foram realizados experimentos variando-se o pH do meio de 0,5 a 13,5. Os espectros eletrônicos da titulação da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$, em solução tampão acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$, em função do pH estão apresentados na Figura 35. Neste experimento observa-se a presença da banda de Soret próxima a 415 nm em meio ácido, bem como o seu deslocamento para comprimento de ondas menores com a alcalinização do meio, e as duas banda Q centradas em 549 e 593 nm.

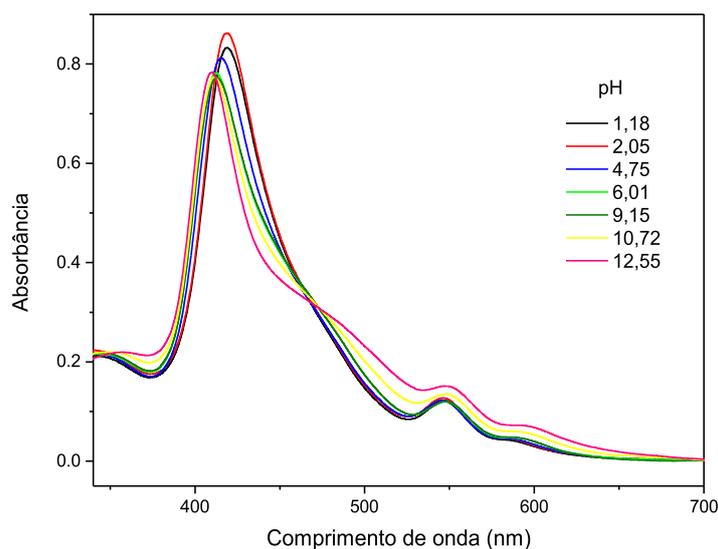
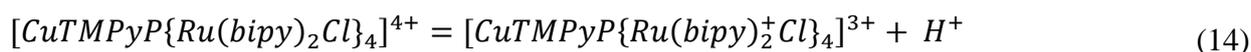


Figura 35. Espectros de absorção na região do ultravioleta e visível da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ em função do pH em solução acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$.

As bandas centradas em 292, 356 e a banda larga em torno de 490 nm são características dos grupos $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}(\text{pyP})]^+$. A banda em 292 nm pode ser atribuída à transição $\pi \rightarrow \pi^*$ das bipyridinas, enquanto que a banda em 356 e 490 nm podem ser atribuídos, respectivamente, à transição de campo ligante e a transição de transferência de carga metal-ligante, dos elétrons π localizados no subnível d do Ru^{2+} para o subnível p na sua forma π^* da piridina, por analogia com a atribuição do espectro eletrônico $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$. As bandas centradas em 415 são atribuídas às

transições devido ao macrociclo porfirínico e as bandas centradas em 544 e 582 são atribuídas às transições devido ao anel periférico, sendo denominadas $Q_{(1-0)}$ e $Q_{(0-0)}$, respectivamente⁹². As bandas na região do ultravioleta foram retiradas dos espectros exibidos neste trabalho, visto que se projetavam de forma concomitante com as bandas de Soret e Q apresentas nos espectros.

Os espectros da $CuTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4$ apresentados na Figura 35 mostram que houve mudanças significativas com a alteração do pH do meio. Observa-se um deslocamento hipsocrômico, ou seja, um deslocamento espectral para comprimentos de ondas menores com a alcalinização da solução desta porfirina. Observa-se ainda nesta figura a presença de pelo menos um ponto isobéstico, centrado em 475nm, indicando a presença de pelo menos duas espécies distintas neste equilíbrio. Baseando-se na literatura^{107,108}, sugere-se que o equilíbrio existente para a porfirina $CuTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4$ apresenta três transições devido a protonação da biperidina do radical periférico, conforme mostra o esquema descrito abaixo:



O conjunto de espectros experimentais apresentados na Figura 35 foi submetido à análise computacional considerando-se a existência da combinação linear de três componentes puras em solução. Como resultado desta análise, obteve-se os espectros da deconvolução das três espécies puras neste equilíbrio apresentados na Figura 36.

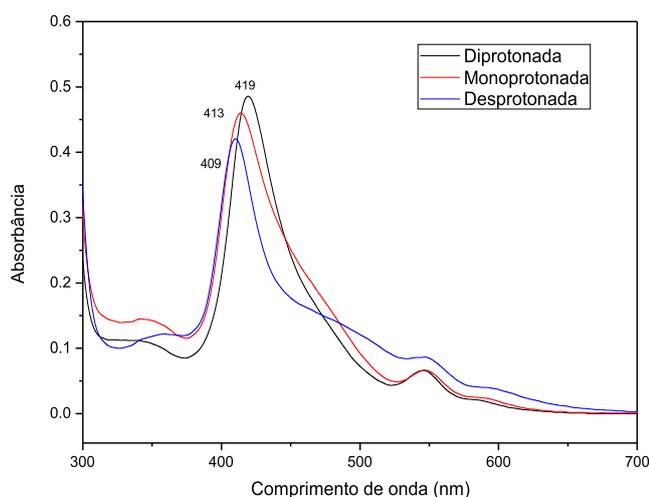


Figura 36. Componentes da deconvolução dos espectros óptico da $CuTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4$ em acetato fosfato de sódio 0,02 mol/L em função do pH.

As contribuições das três espécies, em função do pH estão mostradas na Figura 37. Pela análise deste gráfico obteve-se os valores de pK da transição da primeira espécie para a segunda e da transição da segunda para a terceira espécie. Os valores de pK encontrados foram $pK_1=3,5\pm 0,5$ e $pK_2= 10,6\pm 0,6$. Atribuiu-se ao espectro com a banda de Soret centrada em 419 nm a forma diprotonada, monoprotionada centrada em 413 nm e para a desprotonada em 409 nm.

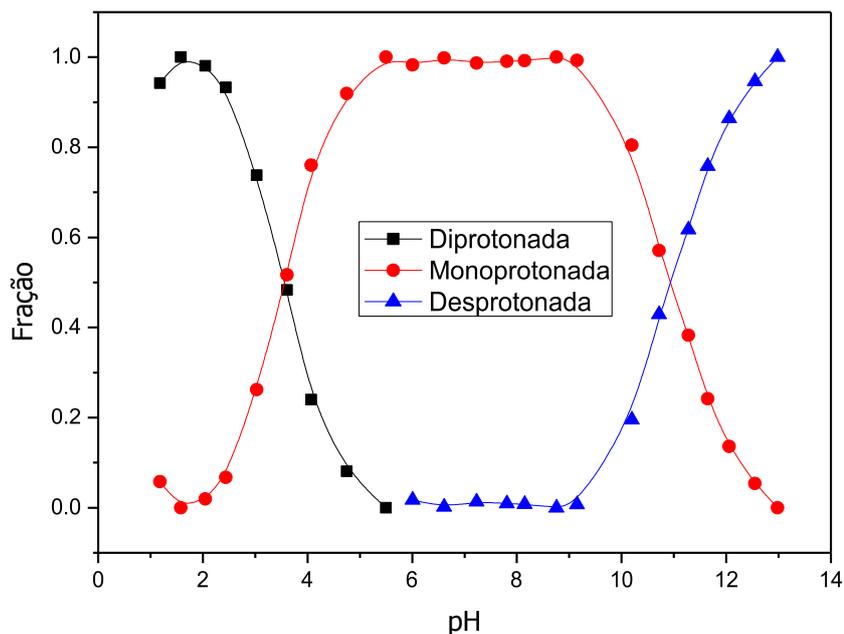
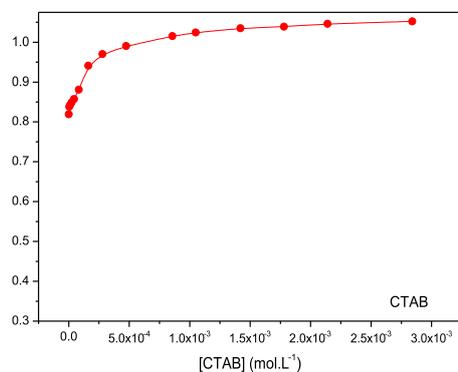


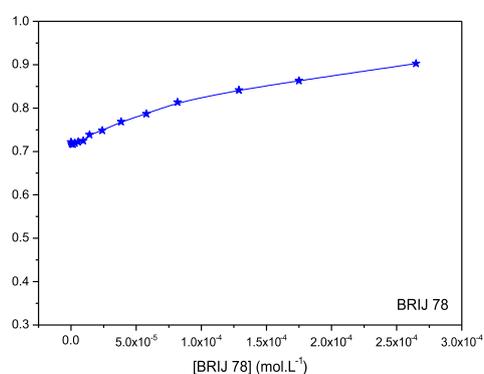
Figura 37. Contribuições das Frações das três espécies da $CuTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4$ existentes no equilíbrio em função do pH.

Baseado na premissa de que três espécies distintas estão presentes em função do pH, investigou-se o comportamento espectroscópico desta porfirina fazendo-se uso da titulação da porfirina, em uma concentração fixa, em função da concentração dos surfactantes CTAB, BRIJ 78 e SDS. Essas análises foram efetuadas em pH 2,0; 7,0 e 12,0 nos solventes previamente descritos na sessão 3.2. Os resultados obtidos para esta titulação da $CuTPyP\{Ru(bipy)_2Cl\}_4$ em função da concentração dos surfactantes em pH igual a 7,0 estão representados na Figura 38.

(a)



(b)



(c)

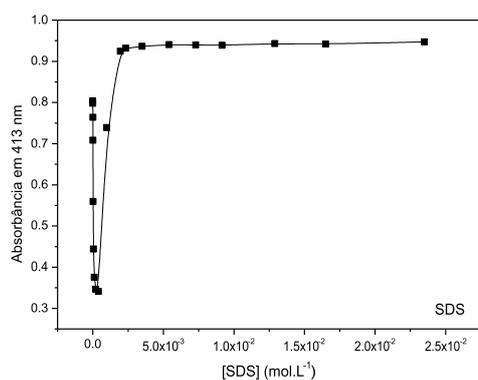


Figura 38. Absorbância em 413 nm porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ em função da concentração do surfactante em pH=7,0 (a) CTAB ([CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄]=0,8 μmol.L⁻¹); (b) Brij 78 ([CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄]= 0,7 μmol.L⁻¹) e (c) SDS ([CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄]= 0,8 μmol.L⁻¹).

É possível observar através das Figura 38(a) que não há interação entre o surfactante catiônico e a $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$, visto que a oscilação nos valores de absorção da porfirina é praticamente nulo quando comparada ao efeito causado pelos outros surfactantes. Fato este, esperado devido a repulsão eletrostática entre a carga positiva localizada na cabeça polar do surfactante e as cargas positivas nos nitrogênios periféricos da porfirina. Na presença do surfactante não iônico há um aumento discreto nos valores de absorção da porfirina com o aumento da concentração do surfactante presente em solução, indicando uma pequena interação entre a porfirina e este surfactante. A repulsão Coulombiana entre a porfirina e o surfactante opõem-se a formação de agregados pré micelares e mesmo da concretização do processo de micelização. Isto é evidenciado quando não há mudanças espectrais com o aumento da concentração de surfactante em solução ¹⁰².

Entretanto, em função da concentração de surfactante aniônico presente no meio é identificado uma grande interação entre a porfirina e o SDS, caracterizado por duas faixas diferentes de concentração do surfactante: abaixo da CMC é sugerido a existência de um interação pré micelar seguido de solubilização da porfirina na micela.

Na presença de moléculas de SDS esperava-se uma grande interação porfirina-surfactante visto que os fatores eletrostáticos são de grande importância no processo de interação das porfirinas. O comportamento complexo da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ na presença do surfactante aniônico é ilustrado na Figura 38(c) onde verifica-se comportamentos distintos em determinadas regiões de concentração. Aumentando-se a concentração de SDS em solução houve um decréscimo gradual na intensidade da banda de Soret inicialmente centrada em 417 nm até que a concentração de SDS atingisse $5,1 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ (Região I). Posteriormente a essa concentração ocorre um deslocamento espectral para comprimento de ondas maiores e a intensidade de absorção da banda de Soret passa a aumentar com o aumento da concentração de SDS, cuja absorção da porfirina supera a intensidade inicial (Região II). Após uma concentração de $2,3 \times 10^{-3}$ a banda de Soret, se mantém praticamente constante até o final da titulação (Região III). Em meio micelar a interação porfirina-micela de SDS é evidenciada pelo deslocamento batocrômico do espectro cuja banda de Soret encontra-se centrada em 419 nm ¹⁰⁰. Os espectros eletrônicos para a titulação da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$, em solução tampão acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em presença do surfactante aniônico e pH 7,0 são mostrados na Figura 39.

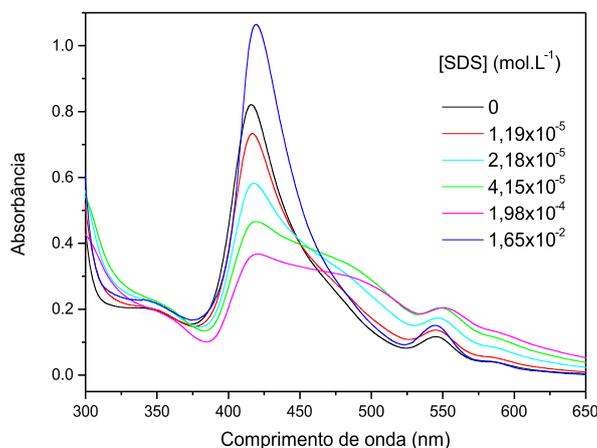


Figura 39. Espectros de absorção ótica da porfirina em solução de acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ em função da concentração de SDS em solução. $([\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4] = 1,0 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1})$.

Para algumas porfirinas, as interações entre a porfirina e o surfactante a pH neutro se dão através do equilíbrio duplo entre monômero, interação pré micelar e a micelização propriamente dita da seguinte forma:



onde M é a forma monomérica, A_{gg} é o interação pré micelar e M_c é o monômero solubilizado em meio micelar.

Em casos em que este fenômeno ocorre, o deslocamento espectral da absorção é muito pequeno e a presença de um ponto isobéstico não definido claramente é observada¹⁰². Contudo, esses agregados são atribuídos a tipos de agregados de estrutura não específica, não podendo ser atribuído como agregados do tipo J ou H.

O conjunto de espectros experimentais da Figura 39 foi submetido à análise computacional considerando-se a existência de três componentes puras. Os resultados da decomposição do conjunto de espectros, gerados pelo programa CCA, estão apresentados na Figura 40 onde diferentes espécies são caracterizadas como forma livre da porfirina, pré interação e forma solubilizada em micela, cujos valores de absorção máxima da banda de Soret estão centradas em 417, 415 e 419 nm, respectivamente.

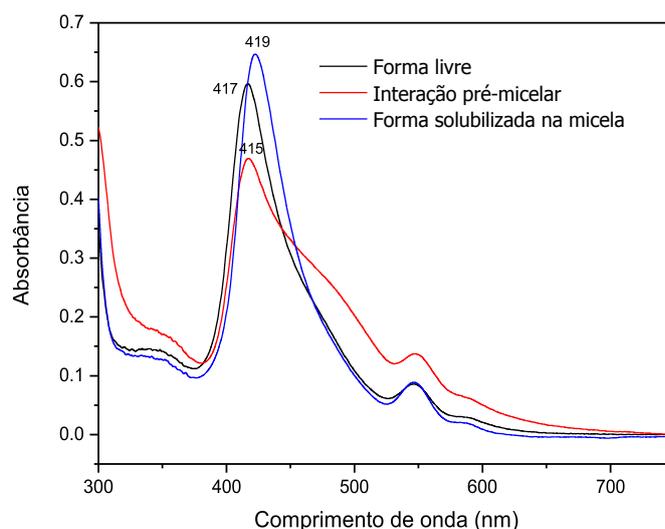


Figura 40. Componentes da deconvolução dos espectros ótico da $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ em acetato fosfato de sódio $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$.

Na Figura 41 é apresentada as contribuições das três espécies, em função da concentração de SDS presente em solução. Pela análise deste gráfico obteve-se os valores de pK da transição da primeira espécie para a segunda e da transição da segunda para a terceira espécie. Os valores de pK encontrados foram $\text{pK}_1=2,11 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e $\text{pK}_2= 8,58 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$. Para facilitar a compreensão da interação $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ -SDS na Tabela 8 são apresentados os resultados experimentais para a titulação da porfirina em função da concentração deste surfactante divididas em regiões de concentração de SDS e um resumo do comportamento exibido.

Tabela 8- Concentração de SDS nas diferentes regiões e comportamento exibido em pH 7,0.

Região	[SDS] _o (mol.L^{-1})	[SDS] _f (mol.L^{-1})	Comportamento exibido (Banda de Soret)	λ máximo (nm)	pK de transição (mol.L^{-1})
I	0	$1,98 \times 10^{-4}$	diminui	417	$\text{pK}_1=$ $2,11 \times 10^{-5}$
II	$1,98 \times 10^{-4}$	$2,3 \times 10^{-3}$	desloca λ maiores e aumenta	415	
III	$2,3 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$	praticamente constante	419	$\text{pK}_2=$ $8,58 \times 10^{-4}$

[SDS]_o= concentração inicial de SDS, [SDS]_f= concentração final de SDS.

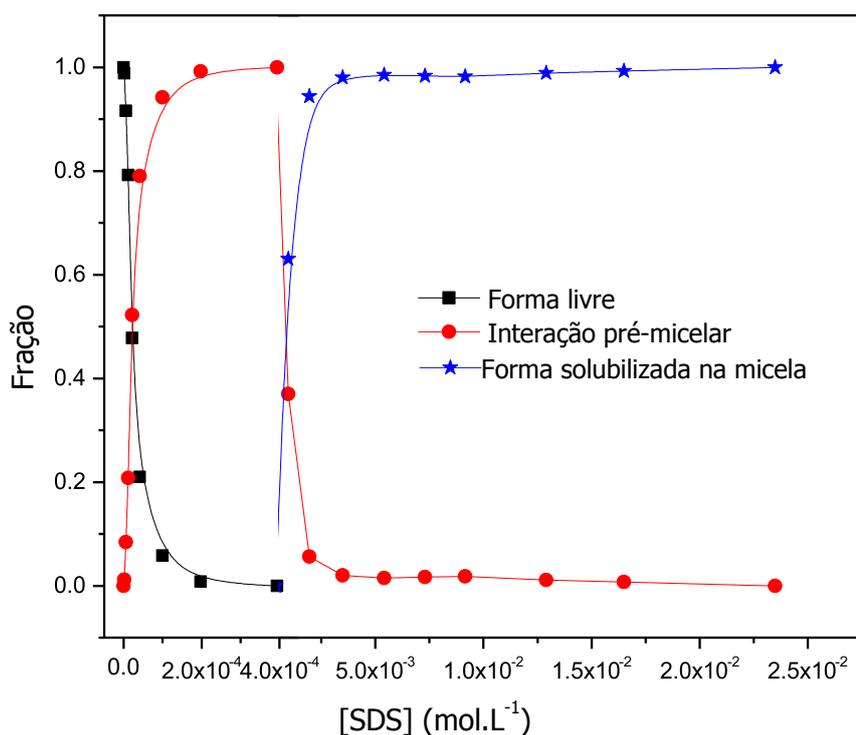


Figura 41. Contribuições das Frações das três espécies da $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ existentes no equilíbrio em função da concentração de SDS em solução.

Segundo Tanforf e colaboradores¹⁰⁹ há uma diferença entre pré-agregados micelares e micelas. Esta diferença está associada ao fato que micelas são agregadas com estrutura bem definida e número de agregados conhecidos, enquanto que agregados pré-micelares podem assumir qualquer forma e número de agregados.

A análise do comportamento espectroscópico para a porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ em função da concentração dos surfactantes CTAB, Brij 78 e SDS foi realizada para pH 2,0 e pH 12,0. Os resultados foram semelhantes aos obtidos em pH 7,0. A não interação entre a porfirina e os surfactantes catiônico e não iônico foi mais uma vez observada. A formação do pré interação micelar em concentrações de SDS abaixo da CMC e a interação da porfirina solubilizada nas micela de SDS também foram observados, analogamente ao pH 7,0.

5.2.2. Dicroísmo Circular Magnético (DCM)

Para se obter um detalhamento na caracterização do comportamento espectroscópico da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$, bem como monitorar a formação de agregados moleculares, foram realizados experimentos desta porfirina em diferentes valores de pH distintos: 2,0; 7,0 e 12,0, cujos solventes foram descritos anteriormente na sessão 3.2. Os resultados obtidos por esta técnica estão mostrados na Figura 42.

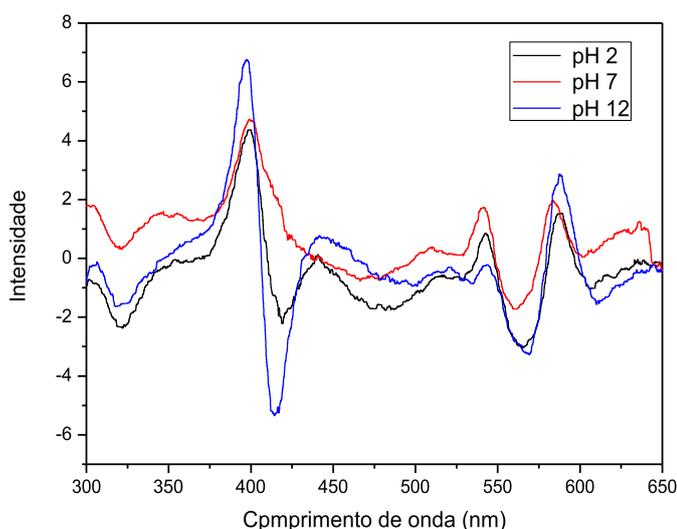


Figura 42. Espectros de DMC da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ (1×10^{-5} mol.L⁻¹) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss em diferentes meios e valores de pH.

No experimento realizado em pH 7,0 foi observado um pico bem definido positivo e de grande intensidade centrado em 400 nm decorrente das transições provenientes do macrociclo porfirínico, cujas transições originam a banda de Soret. Na região da banda Q dois picos positivos centrados em 542 e 588nm estão presentes bem como um pico negativo centrado em 564nm. Em pH 2,0 é possível observar dois picos positivos, sendo um de maior intensidade centrado em aproximadamente 400 nm e um de menor intensidade centrado em 440 nm, ambos pertencente às transições decorrentes da banda de Soret do anel porfirínico. Na região da banda Q os picos presentes são em mesma quantidade e posição aos encontrados no experimento realizado em pH 7,0. Em pH 12,0 além do intenso pico positivo centrado em 400 nm há um pico alargado em 440 nm bem como um pico negativo em 413 nm. Nas transições devido a região dos anéis periféricos há um comportamento semelhante ao pH 7,0. Em suma, mudanças na constituição de picos existentes

nos espectros obtidos em função do pH, principalmente nas transições provenientes do macrociclo porfirínico foram observadas. Nas três condições empregadas o espectro é constituído de um intenso pico positivo em aproximadamente 400 nm, porém em cada pH em que o experimento foi realizado os espectros apresentam comportamento distinto. Confirma-se, portanto, que o pH do meio é de extrema importância para o comportamento espectroscópico da porfirina, visto que, a existência de três espécies distintas em equilíbrio na solução também foi observada através dos experimento de DCM.

A interação entre a porfirina e os surfactantes catiônico e não iônico na sua forma micelar está ilustrada na Figura 43. Os espectros de DCM em pH 7,0 na ausência de micelas e na presença de micelas de CTAB e Brij 78 apresentaram algumas discrepâncias, porém há praticamente uma sobreposição de bandas de mesmo comprimento de onda de intensidade. Isto é consequência da não interação entre a porfirina e estes surfactantes. Este fato era esperado devido a repulsão de cargas entre a porfirina catiônica e o surfactante também carregado positivamente. O surfactante não iônico, apesar de não ser repellido eletrostaticamente, não exerce nenhuma influência sobre a porfirina. Cita-se que o mesmo comportamento foi observado para os valores de pH 2,0 e 12,0.

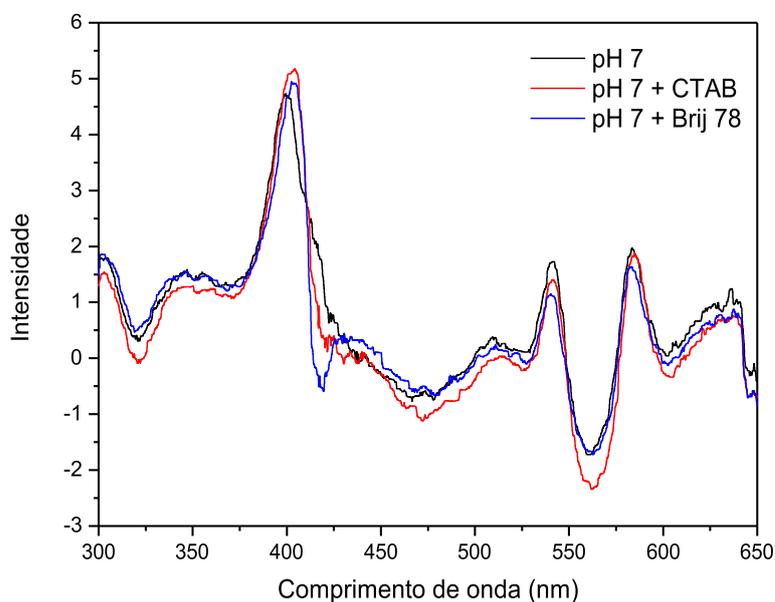


Figura 43. Espectros de DCM da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ ($1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss em pH 7,0 na ausência e presença de micelas de CTAB e Brij 78.

Os espectros de DCM para diferentes concentrações de SDS estão representadas na Figura 44.

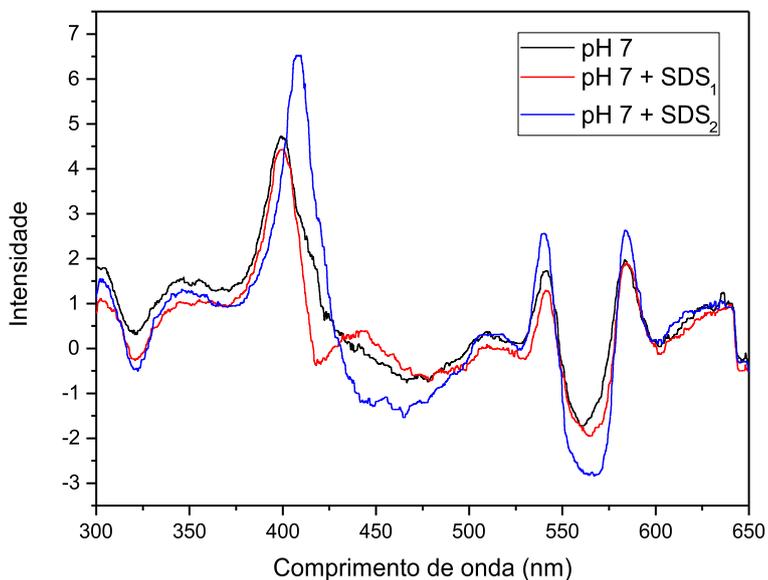


Figura 44. Espectros de DCM da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ (1×10^{-5} mol.L⁻¹) na presença de um campo magnético de 8600 Gauss em solução tampão de acetato fosfato de sódio 0,02 mol.L⁻¹ na presença de SDS₁ (4×10^{-5} mol.L⁻¹) e SDS₂ (1×10^{-2} mol.L⁻¹).

Observa-se através da Figura 43 que com o surfactante aniônico presente abaixo da CMC, não houve o surgimento de nenhum novo pico bem como nenhum deslocamento espectral é observado quando comparado ao comportamento espectral na ausência do surfactante. Quando micelas de SDS se fazem presente no meio observa-se um discreto deslocamento para comprimento de ondas maiores em ambas as bandas do espectro bem como um aumento na intensidade do sinal, desse modo caracterizando a interação entre a porfirina e as micelas de SDS.

Para os estudos de DCM utilizou-se uma concentração de 1×10^{-5} mol.L⁻¹ da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ enquanto que para os estudos de absorção eletrônica a concentração empregada foi de cerca de 1×10^{-6} mol.L⁻¹ para a mesma amostra. Portanto, a alta concentração de porfirina empregada para a obtenção do sinal para as análises de DCM, cerca de dez vezes maior, pode estar mascarando os resultados obtidos.

5.2.2. Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)

Os experimentos de RPE para a porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ foram realizados em soluções congeladas a 77K nos solventes já abordados na sessão 3.2, em três diferentes valores de pH (2,0; 7,0 e 12,0) e também na presença dos surfactantes CTAB, Brij 78 e SDS. Os experimentos foram realizados para monitorar possíveis modificações estruturais decorrentes da formação de agregados moleculares.

Esperava-se que os espectros de RPE para esta porfirina apresentassem quatro linhas distintas, pois o número de linhas da interação é dado pela multiplicidade dos estados de spin nuclear ($2S+1$) e, no caso do Cu^{2+} , $S=3/2$ ⁸⁴. Estão apresentados na Figura 45 os espectros de RPE para a $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ em diferentes valores de pH.

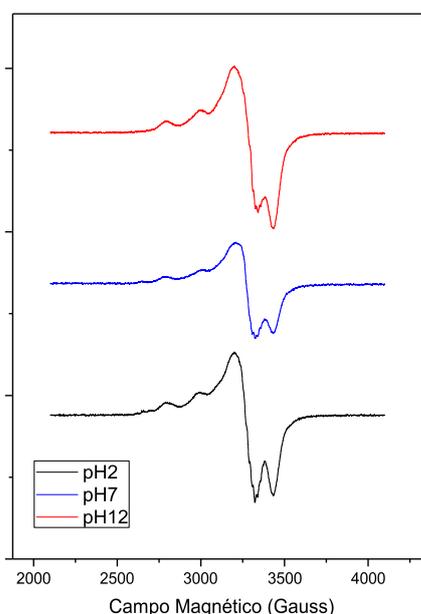


Figura 45. Espectros de RPE a 77k da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ em pH 2,0; 7,0 e 12,0. ($[\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$).

Para espectros de soluções congeladas, os acoplamentos produzidos na RPE dependem da direção do campo magnético, portanto há uma anisotropia devido ao baixo movimento rotacional randômico das moléculas. Nesse caso, há valores de g e A paralelos e perpendiculares que podem ser calculados através dos espectros, como descrito no item 4.3.

Os experimentos para a porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ foram realizados em solução congelada a 77K, portanto, os espectros de RPE apresentam valores de g paralelo (g_{\parallel}) e g

perpendicular (g_{\perp}) e A paralelo (A_{\parallel}) e A perpendicular (A_{\perp}) para o Cu^{2+} , que nestas condições, é anisotrópico. Observa-se na Figura 44, a presença de quatro linhas de RPE com g_{\parallel} igual a 2,345; 2,347 e 2,342 para o pH 2,0; 7,0 e 12,0, respectivamente. Os valores de g_{\perp} são iguais a 2,080 para pH 7,0 e 2,076 para os valores de pH 2,0 e 12,0. O acoplamento hiperfino correspondente a interação do acoplamento do Cu^{2+} com os quatro nitrogênios existentes no macrociclo porfirínico não é observado claramente em função do pH. A concentração de porfirina empregada nos três valores de pH é exatamente a mesma, porém as intensidades de sinais exibidas nos espectros diferem de forma significativa, principalmente na região de acoplamento dos ligantes axiais. Ressalta-se que todos os experimentos foram realizados com os mesmos valores de ganho. Dessa forma, conclui-se que o pH do meio exerce influência sobre o comportamento espectroscópico da porfirina, pois a existência de três espécies distintas em equilíbrio na solução foi novamente observada através dos experimento de RPE.

Como descrito na sessão 5.1.3, as linhas observadas nos espectros de RPE da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ são referentes ao Cu^{2+} inserido no centro do anel porfirínico, uma vez que o macrociclo porfirínico e os radicais periféricos não apresentam elétrons desemparelhados. O íon metálico Cu^{2+} apresenta nove elétrons em sua camada de valência, localizados no subnível d. Nesta configuração o íon metálico está coordenado a seis ligantes, cujas ligações axiais diferem em comprimento das equatoriais e o elétron desemparelhado está localizado no orbital dx^2-y^2 .

Complexos cristalínicos de $[\text{Cu}(\text{meso})]_3[\text{Co}(\text{CN})_6]_2 \cdot 9.5\text{H}_2\text{O}$ solubilizados em DMF a 77 K, foram analisados por RPE cujo espectro exhibe quatro linhas de RPE para o Cu^{2+} , $S = 3/2$. Os resultados mostraram os valores de $g_{\parallel} = 2,33$ e $g_{\perp} = 2,01$. Foi determinada a localização do elétron desemparelhado, baseado na premissa $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2$, encontrando-se no orbital dx^2-y^2 ¹¹⁰. Análises de RPE foram realizadas para dois complexos sintetizados de cobre solubilizados em metanol à 77k. Os espectros apresentaram quatro linhas e simetria axial com valores de $g_{\parallel} = 2.194$, $g_{\perp} = 2.046$ e $g_{\parallel} = 2.226$, $g_{\perp} = 2.076$, respectivamente¹¹¹. Estes resultados condizem com o número de linhas encontrados nos espectros de RPE bem como os valores de g_{\parallel} e g_{\perp} obtidos para a porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$. As sutis discrepâncias podem ser atribuídas aos diferentes solventes empregados nos estudos.

Os espectros de RPE da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ na presença de micelas do surfactante catiônico CTAB e Brij 78 estão apresentados na Figura 46. Os resultados experimentais obtidos foram semelhantes ao da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ na ausência de micelas,

indicando que não há mudanças comportamento espectral da porfirina quando micelas catiônicas e não iônicas estão presentes. As quatro linhas de RPE em $g_{\parallel}=2,342$ podem ser observados na presença de CTAB e Brij 78 e $g_{\perp}= 2,077$ e $2,084$ para o surfactante catiônico e não iônico, respectivamente. Semelhantemente ao que ocorre em função do pH, na presença de ambos os surfactantes o acoplamento hiperfino devido ao acoplamento Cu^{2+} com os quatro nitrogênios não foi identificado com precisão. Esperava-se realmente que houvesse uma repulsão eletrostática entre as cargas da porfirina catiônica e a carga positiva na cabeça polar da micela de CTAB, de modo a não haver uma interação porfirina-micela. Analogamente, quando micelas do surfactante não iônico Brij 78 estão presentes em solução não ocorrem mudanças espectrais significativas, evidenciando a não interação entre a porfirina-micela de Brij 78.

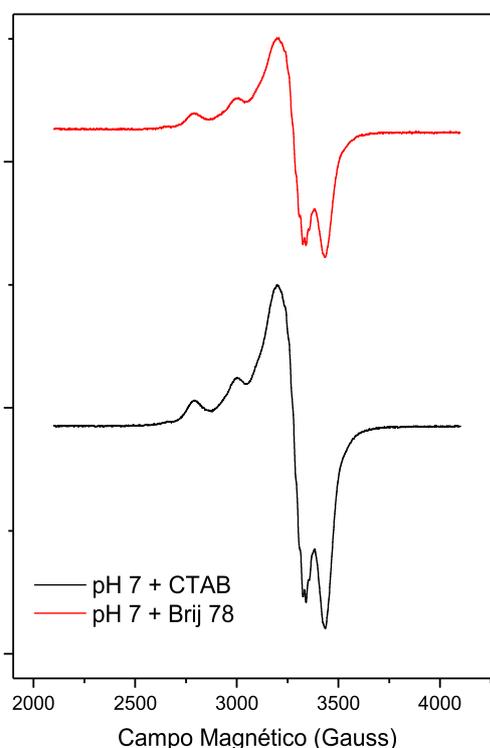


Figura 46. Espectros de RPE à 77 K de $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ em pH 7,0 na presença de micelas de CTAB e Brij 78. ($[\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$).

Na presença de surfactante aniônico, ocorreram dois comportamentos distintos dependentes da concentração de SDS presente em solução que estão ilustrados na Figura 47. O experimento realizado com concentração de $\text{SDS} = 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, isto é, abaixo da CMC apresentou um espectro semelhante à ausência de surfactante em solução: as quatro linhas de RPE em $g_{\parallel}=2,345$ e $g_{\perp} = 2,079$ estão presentes no espectro bem como um acoplamento hiperfino impreciso. Portanto,

nestas condições experimentais, não foi observado nenhuma agregação pré-micelar. Todavia, quando micelas de SDS estão presentes no meio ($[SDS] = 1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) é possível a identificação da forte interação entre a porfirina e as micela de SDS através das mudanças espectrais aparentes. As quatro linhas de RPE estão presentes no espectro que apresenta $g_{\parallel} = 2,344$ e $g_{\perp} = 2,045$. Apenas na presença de micelas de SDS é observado o acoplamento hiperfino, composto por nove linhas de ressonância devido aos elétrons d do Cu^{2+} estarem deslocalizados, por sobre os quatro nitrogênios equivalentes existentes no macrociclo porfirínico. Não foi observado nenhum deslocamento espectral, entretanto a presença nítida da estrutura hiperfina e as diferenças no valor de g_{\perp} evidenciam esta a interação da porfirina com as micelas de SDS. Sugere-se ainda que, a porfirina na sua forma monomérica, quando inserida nas micelas de SDS favoreça a interação do centro metálico com os nitrogênios do macrociclo porfirínico, uma vez que o acoplamento hiperfino apenas pôde ser observado nestas condições. Ressalta-se ainda, que a alta concentração de porfirina empregada ($1 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) para a análise de RPE pode ter mascarado a interação entre a porfirina e o surfactante aniônico abaixo da CMC, pois apenas a forma livre da porfirina $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ e a forma solubilizada em micelas de SDS foram observadas por esta técnica.

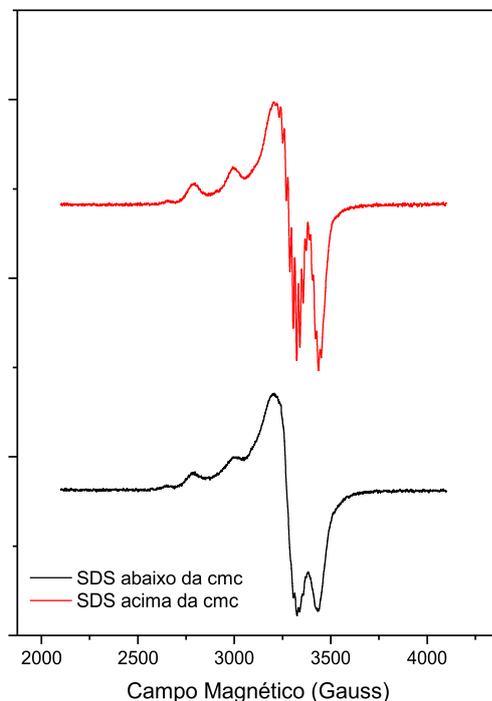


Figura 47. Espectros de RPE à 77 K de $\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4$ em pH 7,0 na presença de SDS abaixo ($4,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e acima ($1,0 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$) da CMC. ($[\text{CuTPyP}\{\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}\}_4] = 1 \text{ mmol.L}^{-1}$).

A Tabela 9 apresenta um resumo do comportamento espectroscópico da porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ através dos valores de g_{\parallel} , g_{\perp} , A_{\parallel} e A_{\perp} calculados a partir dos espectros.

Tabela 9: Valores de g_{\parallel} , g_{\perp} , A_{\parallel} e A_{\perp} calculados a partir dos espectros de RPE.

CuTPyP{Ru(bipy) ₂ Cl} ₄	g_{\parallel}	g_{\perp}	A_{\parallel}	A_{\perp}
pH 2,0	2,345	2,077	193	179
pH 7,0	2,348	2,080	205	175
pH 12,0	2,342	2,076	206	186
pH 7,0 + CTAB	2,342	2,077	209	181
pH 7,0 + Brij 78	2,342	2,084	209	180
pH 7,0 + SDS ₁	2,345	2,079	217	178
pH 7,0 + SDS ₂	2,344	2,045	205	174

Contudo, as interações da porfirina catiônica CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ ocorrem por fatores eletrostáticos, uma vez que ocorre a interação preferencial com o surfactante aniônico. Caso houvesse agregação molecular a soma líquida dos spins dos agregados de cobre seria zero e, portanto, não seria possível observar nenhum sinal de RPE. Como era esperado, o comportamento espectroscópico desta porfirina mostra que não há a formação de agregados moleculares nem em função do pH e nem na presença de micelas, visto que o sinal de RPE foi observado ao longo de todo o estudo desenvolvido.

6. CONCLUSÃO

Os resultados experimentais mostraram a porfirina CuTMPyP é estável num período de oito horas e há uma única espécie em solução em função do pH, visto que os espectros não sofreram alterações drásticas em toda a faixa de pH investigado. Cita-se ainda que o comportamento espectral desta porfirina não sofre influência da força iônica. Na presença do surfactante aniônico SDS há uma interação efetiva entre a CuTMPyP e o tensoativo na forma pré e micelar. Devido a fatores eletrostáticos, não foram observadas interações efetivas desta porfirina com as micelas catiônicas de CTAB e Brij 78.

Fazendo-se uso das técnicas de DCM e RPE pôde-se confirmar a existência de uma única espécie em solução e ambas as técnicas corroboram que não há uma interação significativa entre a porfirina e as micelas dos surfactantes CTAB e Brij 78. Calculou-se o valor de $g_0 \approx 2,075$ e observou-se a estrutura super-hiperfina composta por nove linhas ressonantes devido ao acoplamento da Cu^{2+} com os nitrogênios do anel periférico.

Para a porfirina CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄, os resultados indicam que o pH do meio é de extrema importância para o comportamento espectroscópico da porfirina, visto que os espectros de UV-Vis sofreram alterações significativas, exibindo três espécies distintas em solução ao longo do pH estudado. Os valores de pH em que essas transições ocorrem foram $\text{pK}_1 = 3,5 \pm 0,5$ e $\text{pK}_2 = 10,6 \pm 0,6$, atribuiu-se as transições da forma diprotonada, para a forma monoprotionada e posteriormente para a desprotonada da bipyridina localizada na região periférica do macrociclo porfirínico. Observou-se ainda, que esta porfirina apresenta estabilidade num período de oito horas e posteriormente inicia um processo de perda de estabilidade. O comportamento espectral da porfirina sofre influência da força iônica, quando da presença de NaCl com concentração superior a $5,9 \times 10^{-1} \text{ mol.L}^{-1}$. Na presença do surfactante aniônico SDS há uma interação efetiva entre a CuTPyP{Ru(bipy)₂Cl}₄ na forma pré e micelar do tensoativo, sendo que esta interação não ocorre com as micelas do surfactante não iônico Brij78, bem como com as micelas do surfactante catiônico CTAB.

As técnicas de DCM e RPE ratificaram a existência de três espécies distintas em solução, bem como a não interação entre a porfirina e as micelas de CTAB e Brij 78. A estrutura super-hiperfina devido ao acoplamento Cu^{2+} com os nitrogênios foi observada apenas na presença de micelas de SDS. Através da técnica de RPE foi possível calcular os valores de $g_{//} \approx 2.345$ e $g_{\perp} \approx 2.026$, bem como caracterizar que essa interação não se dá por processos de agregação e sim devido

a fatores eletrostáticos.

Ressalta-se que não foi possível observar a interação entre a porfirina e o ambiente pré-micelar para ambas as porfirinas, pois a alta concentração de porfirina exigida para a obtenção de sinal satisfatório pode ter mascarado esta interação. Apenas a forma livre de ambas as porfirina e a forma solubilizada nas micelas de SDS foram observadas por estas técnicas.

Em suma, destaca-se que devido a interação preferencial com o surfactante aniônico, conclui-se que há um efeito considerável das cargas superficiais das micelas na estrutura eletrônica das porfirinas e que fatores eletrostáticos são fundamentais no processo de interação das mesmas. Cita-se ainda que esta interação é predominantemente eletrostática, visto que não foram observados processos de agregação através da técnica de RPE.

Contudo, em razão de ambas as porfirina catiônicas não sofrerem agregação influenciada pelo pH ou força iônica do meio e ainda interagirem de forma significativa através da solubilização em micelas de surfactante de carga oposta devido a atração eletrostática, torna-se viável seu emprego com finalidade terapêuticas. Além disso, devido ao Cu^{2+} exibir paramagnetismo tem a capacidade de retardar o tempo de relaxamento dos prótons da água, portanto ostenta potencial como agente de contraste em IRM.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WIJESEKERA, T.P.; DOLPHIN, D. Syntetic Aspects of Porphyrin and Metalloporphyrin Chemistry. In: Sheldon, R.A. (Ed.): **Metalloporphyrins in catalytic oxidations**. New York: Marcel Dekker. 1994, p.193-239.
2. ANNINO, J. S. **Química Clínica - Princípios e Métodos**. 4ed. São Paulo: Manole, 1978, 440p.
3. MURRAY, R. K. Porphyrins and Bile Pigments. In: **Harper's Biochemistry**. Connecticut: Appleton & Lange, 2000, p. 359-373.
4. FOGUEL, D. Bioquímica I. In: POIAN, A.T. **Bioquímica I**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2005.p.149-151.
5. LEE, J.D. **Química inorgânica não tão concisa**. São Paulo: Edgard Blücher, 1999.527p.
6. SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, São Paulo, v.25, n. 5, p.801-807, 2002.
7. MASON, G.F. BEHAR, K.L, KRYSTAL, J.H. ROTHMAN, D. Aplicações da ressonância magnética para medidas espectroscópicas da neurotransmissão. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo n.23(Supl I), p. 6-10, 2001.
8. CHEN, C.; COHEN, J.S.; MYERS, C.E. and SOHN, M. Paramagnetic metalloporphyrins as potential contrast agents in NMR imaging. **Federation of European Blochemical Societies**, v. 168, n. 1, p. 70-74, 1984.
9. GANDINI, S.C.M.; YUSHMANOV, V.E.; BORISSEVITCH, I.E.; TABAK, M. Interaction of the Tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin with Ionic Surfactants: Aggregation and Location in Micelles. **Langmuir**, v.15, n.19, p.6233- 6243, 1999.
10. CANNON, R.K. Pharmaceutics and Drug Delivery Aspects of Heme and Porphyrin Therapy. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Chicago, v. 83, n.5, p.435-446, 1993.
11. TOMINAGA, T.T.; SOARES, D.; SANTOS, M.A.D.; SILVA, J.C.Z.; BORGES, C.P.F. Estudos espectroscópicos da porfirina catiônica meso-tetrakis (N-metil-4-piridil) (TMPyP) em presença de micelas iônicas de CTAB, SDS E HPS. **Publ. UEPG Ci. Exatas Terra, Ci. Agr. Eng.**: Ponta Grossa, v.10, n. 2, p. 7-14, 2004.
12. GONÇALVES, J.L.S.; DEDA, D.; TOMINAGA, T.T. Agregação da Porfirina Aquo-solúvel Meso-tetrakis(4-fenilsulfonato)Porfirina na Presença da Albumina de Soro Bovino. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.11 n. 2, Jul/Dez, 2009.
13. LEZNOFF, C.C.; LEVER, A.B.P. **Phthalocyanines: Properties and Applications**. New York: VCH Publishers, Inc, v.1, 1989.436p.

14. STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W.H. 4.ed. 1995, 1064p.
15. LEHNINGER, A.L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.1202 p.
16. BORISSEVITCH, I. E.; BORGES, C. P. F.; YUSHMANOV, V.E.; TABAK, M. Localization of dipyridamole molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges, **Biochemistry and Biophysica Acta**, v. 1238, p. 57-62, 1995.
17. SONG, X. Z.; JIA, S. L.; MIURA, M.; MA, J. G.; SHELNUTT, J. A. Electron transfer photosensitized by a tin lipoporphyrin in solution, micelles, and at water-organic solvent interfaces, **Journal of Photochemistry and Photobiology A; Chemistry**, v.113, p.233-241, 1998.
18. COLLINS-GOLD, L.C.; BARBER, D. C.; HAGAN W. J.; GIBSON, S. L.; HILF, R.; WHITTEN, D.G.. Synthetic porphyrin at interfaces: photosensitization and related reactions of atropisomers of o-substituted tetraphenylporphine derivatives in films, reversed micelles and membranes, **Photochemistry and Photobiology**, v. 48, n. 2, p.165-175, 1988.
19. LOMAX, E. Making the Best Use of Surfactant Interactions. **Speciality Chemicals**, v. 13, n. 4, p. 223-227, 1993.
20. KALYANASYNDARUM, K. **Photochemistry in microheterogeneous system**. Academic Press , New York , 1987.
21. TOMINAGA, T. T. **Estudos espectroscópicos de porfirinas aquo-solúveis em função do pH e da interação com albumina de soro bovino**. São Carlos: 1997. 148p. Tese (Doutorado em "Físico-Química"), Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
22. MAITI, N.C; MAZUMDAR, S.; PERIASAMY, N. J- and H-Aggregates of Porphyrin Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n.09, p. 1528-1538, 1998.
23. KALYANASUNDARAM, K. **Photochemistry of polypyridine and porphyrin complexes**. London: Academic Press,1992.626p.
24. WORTHINGTON, P. HAMBRIGTH, P. WILLIAMS, R.F.X. Reduction potentials of seventy-five free base porphyrin molecules: Reactivity correlations and the prediction of potentials. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.12, n.4, april, p.281-291, 1980.
25. SMITH, K.M. General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds. In: SMITH, K.M. **Porphyrins and Metalloporphyrins**. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Company, 1975.
26. NAKAGAKI, S. CASTRO, K.A.D.F. MACHADO,G.S. HALMA, M. DRECHSEL, S.M. WYPYCH, F. Catalytic Activity in Oxidation Reactions of Anionic Iron (III) Porphyrins Immobilized on Raw and Grafted Chrysotile. **J. Braz. Chem. Soc.** Brazil, v.17, n.8, p.1672-1678, 2006.

27. DOVIDAUSKAS, S. **Química supramolecular de porfirino-clusters**. São Paulo, 2001. 143p. Tese (Doutorado em "Química Inorgânica"), Instituto de Química, Universidade de São Paulo.
28. NERI, C.R.; SERRA, O.A.; VINHADO, F.D.; MAESTRIN, A.P.J.; IAMAMOTO, Y.; FERREIRA, A.G. Dimer Derivative Of Zn And Mn Porphirin: Synthesis, Characterization And Energy Transfer Studies . **Eclética Química**. São Paulo, v. 27, p. 231-248, 2002.
29. SESSLER, J.L.; WEGHORN, S.J. **Expanded, contracted & isomeric porphyrins**. New York: Pergamon Press, 1st ed, 1997. 520p.
30. MACHADO, A. E. da H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.2, p. 237-243, 2000.
31. ANDRADE, S. M.; COSTA, S. M. B. Aggregation Kinetics of Meso-tetrakis(4-sulfonatophenyl) Porphine in the Presence of Proteins: Temperature and Ionic Strength Effects. **Journal of Fluorescence**, v.12, n.1, 2002.
32. DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v.58, n.6, p.895-900, 1993.
33. MENEZES, P F C ; BERNAL, C; IMASATO, H ; BAGNATO, V S ; PERUSSI, J. R. Photodynamic Activity of Different Dyes. **Laser Physics**, v. 17, p. 468-471, 2007.
34. YUSHMANOV, V. E.; IMASATO, H.; TOMINAGA, T. T.; TABAK, M. 1H NMR and electronic absorption spectroscopy of paramagnetic water-soluble meso-tetraarylsubstituted cationic and anionic metalloporphyrins. New York: **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.61, p. 233-250, 1996.
35. GANDINI, S. C. M.; YUSHMANOV, V. E; TABAK, M. Interaction of Fe(III)- and Zn(II)-tetra(4-sulfonatophenyl) porphyrins with ionic and nonionic surfactants: aggregation and binding. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.85, p.263-277, 2001.
36. BOTTOMLEY, P.A. NMR imaging techniques and applications: A review. **Review of Scientific Instruments**, New York, v. 53, n. 9, p. 1319-1337, 1982.
37. CLARK, C.J.; HOCKINGS, P.D.; JOYCE, D.C.; MAZUCCO, R.A. Application of magnetic resonance imaging to pre- and post-harvest studies of fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, n. 11, p. 1-21, 1997.
38. GERALDES, C.F.G.C.; Imagem Através da ressonância Magnética Nuclear (IRM). **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**. p. 47-57, 2009.
39. GONÇALVES, L. YACUBIAN, J. MARQUES, LAFER, A.P. B.; CALIL R.; CASTRO, C. C.; CERRI G.G.; GATTAZ W.F. **Revista de Psiquiatria Clínica**. v.25, n.1, p.43-45, 1998.
40. YAMASHITA, H. AMARO, E.J. Aspectos básicos de tomografia computadorizada e ressonância magnética. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, n.23(Supl I), p.2-3,

2001.

41. YAN, G.; ZHUO, R.. Research progress of magnetic resonance imaging contrast agents. **Chinese Science Bulletin**, v.46, n.15, august, p.1233-1237, 2001.
42. ELIAS JUNIOR, J.; SANTOS, A.C.; KOENIGKAM-SANTOS, M.; NOGUEIRA-BARBOSA, M. H.; MUGLIA, V.F. Complicações do uso intravenoso de agentes de contraste à base de gadolínio para ressonância magnética. **Radiol Bras**, v.41, n.4, jul/ago, p.263–267, 2008.
43. PANKHURST, A. Q.; CONNOLY, J.; JONES, K. S.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**. v. 36, p. R167-R181, 2003.
44. PUCHE, R. S.; CARO, P.; **Rare Earths** - Cursos de Verano de El Escorial. Madrid:Editorial Complutense, 1998.
45. KOENING, S.H. SPILLER, M. BROWN, R.D III, Wolf GL. Relaxation of water protons in the intra- and extracellular regions of blood containing Gd(DTPA). **Magn. Reson. Med.**v.3, p.791-795, 1986.
46. MARTINS, M. C. B.; AMARAL, R. P. G.; ANDRADE, C.S; LUCATO, L.T.; LEITE, C.C. Características de imagem na ressonância magnética de gossipiboma intracraniano: relato de caso e revisão. **Radiol. Bras**, v.42, n.6, Nov/Dez, p.407–409, 2009.
47. CHEN, C.; COHEN, J.S.; MYERS, C.E. and SOHN, M. Paramagnetic metalloporphyrins as potential contrast agents in NMR imaging. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 168, n. 1, p. 70-74, 1984.
48. NI, Y.; PISLARU, C.; BOSMANS, H.; PISLARU, S.; MIAO, Y.; WERF, F.V.; SEMMLER, W.; MARCHAL, G. Validation of Intracoronary Delivery of Metalloporphyrin as an in Vivo "Histochemical Staining" for Myocardial Infarction with MR Imaging". **Academic Radiology**, v.5, n. 1, p. 37-41, 1998.
49. ZHANG, D.; YANG, Z.; ZHANG, S.; YANG, R. Synthesis, characterization and relaxation properties of four non-ion transition metal manganese(II), cobalt(II), nickel(II) and copper (II) complexes with derivatives from diethylene triamine pentaacetic acid and isoniazid. **Transition Metal Chemistry**, v.31, p. 333–336, 2006.
50. ZHANG, Z.; HE, R.; YAN, K.; GUO, Q.; LU, Y.; WANG, X. LEI, H.; LI, Z. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of manganese(III) porphyrin–dextran as a novel MRI contrast agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 6675–6678, 2009.
51. MARCHAL, G.; NI, Y.; HERIJGERS, P.; FLAMENG, W.; PETRÉ, C.; BOSMANS, H.; YU, J.; EBERT, W.; HILGER, C.S.; PFEFFERER, D.; SEMMLER, W.; BAERT, A.L. Paramagnetic metalloporphyrins: infarct avid contrast agents for diagnosis of acute myocardial infarction by MRI. **Eur. Radiol.** v.6, p.2-8, 1996.

52. LEE, T.; ZHANG, X.; DHAR, S.; FAAS, H.; LIPPARD, S.J.; JASANOFF, A. In Vivo Imaging with a Cell-Permeable Porphyrin-Based MRI Contrast Agent. **Chemistry & Biology**. v.17, june, p.665–673, 2010.
53. MARTÍNEZ, R. C.; GONZALO, E. R.; CORDERO, B. M.; PAVÓN, J. L. P.; PINTO, C. G.; LAESPADA, E. F. Surfactant cloud point extraction and preconcentration of organic compounds prior to chromatography and capillary electrophoresis. **J. Chromatogr.**, v. 902, p. 251-265, 2000.
54. PRAMAURO, E.; PELIZZETTI, E. Micelles: a new dimension in analytical chemistry. **Trends Anal. Chem.**, v. 7, p. 260.272, 1988.
55. WEEST, C.C; HARWELL, J.H. Surfactants and subsurface remediation. **Environ Sci. and Techn.**, v26, p.2324-2330, 1992.
56. ROCHA, J. M. S. Aplicações de agentes tensoactivos em biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**. p.5-11, 2000.
57. HELENIUS, A.; SIMONS, K. Solubilization of membranes by detergents. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 415, p.29-79, 1975.
58. LICHTENBERG, D., ROBSON, R.J. e DENNIS, E.A. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects., **Biochim. Biophys. Acta**, v.737, p.285-304, 1983.
59. HINZE, W.L. **Solution chemistry of surfactants**. K.L. Mittal, New York: Plennun Press, 1979.
60. FENDLER, J.H. **Membrane mimetic chemistry characterizations and applications of micelles, microemulsions, monolayers, bilayers, vesicles, host-guest systems, and polyions**. New York: John Wiley, 1992, 522p.
61. MANIASSO, N. Ambientes micelares em Química Analítica. São Paulo: **Química Nova**, v.24, n.1, p.87-93, 2001.
62. ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. Porto Alegre: Bookman, 2001, 914p.
63. SANTIAGO, P.S.; GANDINI, S.C.M.; MOREIRA, L.M.; TABAK, M. Interaction of cationic water-soluble *meso*-tetrakis (4-N-methylpyridiniumyl) porphyrin (TMPyP) with ionic and nonionic micelles: aggregation and binding. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.12, p. 942-952, 2008.
64. TULUMELLO, D.V.; DEBER, C.M. SDS Micelles as a Membrane-Mimetic Environment for Transmembrane Segments. **Biochemistry**, v.48 n. 51, p. 12096–12103, 2009.
65. KADISH, K.M.; SMITH, K.M.; GUILARD, R. **The Porphyrin Handbook**. San Diego: Academic Press, v.18, 2003, 354p.

66. CHANG, R. **Princípios básicos de espectroscopia**. Madrid: Ac, 1977. 312p.
67. THOMAS, M.J.K . **Ultraviolet and visible spectroscopy**. New York: J. Willey, 2ed, 1996. 229p.
68. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. **Porto Alegre**: Bookman, CARACELLI, I. et al. (trad), 5ed, 2002. 999p.
69. ITO, J.A. Técnicas Espectroscópicas em Biofísica. **Caderno de Física da UEFS**, São Paulo, v.01, n.3, p.21-29, 2004.
70. LINNE, M.A. **Spectroscopic measurement an introduction to the fundamentals**. Amsterdam: Academic Press, 2002, 414p.
71. PAVIA, D.L; LAMPMAN, M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy a guide for students of organic chemistry**. Fort Worth: Harcourt Brace College Publishers, 2 ed, 1996. 511p.
72. SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.. **Identificação espectrofotometria de compostos orgânicos**, 6.ed., Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2000. 460p.
73. PERKAMPUS, H. H. **UV-VIS Spectroscopy and its Applications**, Berlin: Springer-Verlag, 1992. 244p.
74. MIWA, H.; ISHII, K.; NOBAYASHI, N. Electronic Structures of Zinc and Palladium Tetraazaporphyrin Derivatives Controlled by Fused Benzo Rings. *Chemistry - A European Journal*, v. 10, n. 18, p. 4422–4435, September, 2004.
75. LAN, M.; ZHAO, H.; YUAN, H.; JIANG, C.; ZUO, S. JIANG, Y. Absorption and EPR spectra of some porphyrins and metalloporphyrins. **Dyes and Pigments**. 74, 2007 p.357-362, 2007.
76. ZHENG, W. SHAN, N. YU, L. WANG, X. UV -visible, fluorescence and EPR properties of porphyrins and metalloporphyrins. **Dyes and Pigments**. 77 , p.153-157, 2008.
77. KOBAYASHI N, NAKAI K. Applications of magnetic circular dichroism spectroscopy to porphyrins and phthalocyanines. **Chemical communications (Cambridge, England)**. n. 40, pp. 4077-4092, 2007.
78. BALL, D.W. The Baseline Dichroism Spectroscopy. **Spectroscopy**,v.19, n.11, p.28-31, November, 2004.
79. SHRIVER, D.F.; ATIKINS, P. **Química Inorgânica**. Porto Alegre: Bookman, 4ed, 2003. 848p.
80. SOLOMON, E. I.; PAVEL, E. G.; LOEB, K. E.; CAMPOCHIARO, C. Magnetic circular dichroism spectroscopy as a probe of the geometric and electronic structure of non-heme

- ferrous enzymes. **Coordination Chemistry Review**, v.144, October, p.369-460, 1995.
81. DOUGLAS, I.N.; RUNCIMAN, W.A. Application of Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy to the Optical Spectra of Natural and Irradiated Diamonds. **Physics and Chemistry of Minerals**, p.129-136, 1977.
 82. MACK, J.; KOBAYASHI, N.; LEZNOFF, C.C.; STILLMAN, M. Absorption, Fluorescence, and Magnetic Circular Dichroism Spectra of and Molecular Orbital Calculations on Tetrabenzotriazaporphyrins and Tetranaphthotriazaporphyrins. **Inorganic Chemistry**, v.36, n.24 p.5624-5634, 1997.
 83. YOSHIMURA, T.; TOI, J.H.; INABA, S.; OGOSHI, H. Iron(III) Porphyrins Substituted with Highly Electron-Withdrawing CF₃ Groups: Electronic Absorption, MCD, and EPR Spectral Study. **Inorganic Chemistry**, v. 30, n. 23, p. 4315-4321,1991.
 84. KNOWLES, P.F.; MARSH, D.; RATTLE, H.W.E. **Magnetic Resonance of Biomolecules**. New York: John Wiley & Sons, 1976. 343p.
 85. DONOSO, J.P.; BARBERIS, G.E. Descrição quântica de espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 19, n. 1, março, p.125-135, 1997.
 86. BERLINER, L. J. **Biological Magnetic Resonance**. New York: Plenum Press, v.14, 1998.
 87. BERSOHN, M. and BAIRD, J. **An Introduction to Electron Paramagnetic Resonance**. New York: W.A. BENJAMIM, INC ,1966. 274p.
 88. DICKSON, F. E.; PETRAKIS, L.. Application of Electron Spin Resonance and Electronic Spectroscopy to the characterization of Vanadium Species in Petroleum Fractions. **Analytical Chemistry**, v.46, n.8, p.1129-1130, 1974.
 89. FARACH, H.A.; POOLE JR, C.P. Low-Temperature Spin Orientation in Cobalt Tutton's Salt. II. **Physical Review B**, v.5, p.1879-1875, 1972.
 90. GOODMAN, B.A.; HALL, E.L. Electron paramagnetic spectroscopy. In: Wilson, M.J. **Clay Mineralogy: Spectroscopic and Chemical Determinative Methods**. London: Chapman and Hall, 1994, p.173-225.
 91. KADISH, K.M.; MAIYA, G. B.; ARAULLO, C.; GUILARD, R. Micellar Effects on the Aggregation of Tetraanionic Porphyrins. Spectroscopic Characterization of Free-Base meso-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin, (TPPS)₂, and (TPPS)_M (M = Zn(II), Cu(II), V^{0²⁺}) in Aqueous Micellar Media. **Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 14, p.2125-2131, 1989.
 92. ARAKI, K. **Propriedades supramoleculares de porfirinas polinucleares**. 1994. 171p. Tese (Doutorado em Ciências. Área: Química Inorgânica)- Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.
 93. ARAKI, K.; TOMA, H.E. Synthesis and characterization of a multibridged porphyrin

- complex ruthenium(ii) groups containing peripheral bis(bipyridine). **J. Coord. Chem**, v. 30, p. 9-17, 1993.
94. MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Quím. Nova**, 2004, v.27, n.5, p. 701-705, 2004.
 95. MODARESSI, A.; SIFAOU, H.; GRZESIAK, B.; SOLIMANDO, R.; DOMANSKA, U.; ROGALSKI, M. CTAB aggregation in aqueous solutions of ammonium based ionic liquids; conductimetric studies. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects** **296**, p.104–108, 2007.
 96. HAIT, S.K.; MOULIK, S.P. Determination of Critical Micelle Concentration (CMC) of Nonionic Surfactants by Donor–Acceptor Interaction with Iodine and Correlation of CMC with Hydrophile–Lipophile Balance and Other Parameters of the Surfactants. **Journal of Surfactants and Detergents**. v.4, n.3, July, p.303-309, 2001.
 97. PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular-dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm - a practical guide. **Analytical Biochemistry**, v.203, n.1, p.83-93 , 1992.
 98. STILLMAN, M.J e NYOKONG, T. Absorption and Magnetic Circular Dichroism Spectral Properties of Phthalocyanines Part 1:Complexes of the Dianion, Pc(-2). In: LEZNOFF, C.C e LEVER, A.B.P. **Phthalocyanines Properties and Applications**. New York: VCH,1989. p.139-158.
 99. KOMATH, S.S.; KENOTH, R.; GIRIBABU, L.; MAIYA, B.G.; SWAMY, M.J. Fluorescence and absorption spectroscopic studies on the interaction of porphyrins with snake gourd (*Trichosanthes anguina*) seed lectin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Bio**, v. 55 p. 49–55, 2000.
 100. KANO, K.; TAKEI, M. HASIMOTO, S. Cationic Porphyrins in Water. ¹H NMR and Fluorescence Studies on Dimer and Molecular Complex Formation. **Journal of Physic Chemistry**, v. 94, n. 2181-2187, 1990.
 101. HOFSTRA,U.; KOEHORST, R.B.M.; SCHAAFSMA, T.J. Excited-state properties of water-soluble porphyrin dimers. **Chemical Physics Letters**, v. 130, n. 6, p. 555-559, 1986.
 102. GANDINI, S.C.M.; VIDOTO, E.A.; NASCIMENTO, O. R.; TABAK, M. Spectroscopic study of a water-soluble iron(III) meso-tetrakis(4-Nmethylpyridiniumyl) porphyrin in aqueous solution: effects of pH and salt. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 94, p. 127–137, 2003.
 103. KADISH, K.M.; MAIYA, B.G.; McADAMS, C.A. Spectroscopic Characterization of meso-Tetrakis (1-methylpyridinium-4-yl) porphyrins, [(TMpyP)H₂I⁴⁺ and [(TMPYP)M]⁴⁺, in Aqueous Micellar Media, Where M = V⁰²⁺, Cu(II), and Zn(II). **The Journal of Physical Chemistry**, v. 95, N. 1, p.427-431,1991.

104. YAFFE, O.; KORIN, E.; BETTELHEIM, A. Interaction of Fe(III) Tetrakis(4-*N*-methylpyridinium)porphyrin with Sodium Dodecyl Sulfate at Submicellar Concentrations. **Langmuir**, v. 24, p. 11514-11517, 2008.
105. BASU, P. Use of EPR Spectroscopy in Elucidating Electronic Structures of Paramagnetic Transition Metal Complexes. **Journal of Chemical Education**, v.78, n.5, May, p.666-669. 2001.
106. GANCHEVA, V.; YORDANOV, N.D.; KOEV, L. EPR and electronic spectral properties of aryl-substituted bis(dithiophosphato)copper(II) complexes. **Spectrochimica Acta Part A**, v.69, p.1317–1321, 2008.
107. MASSTTI, M.; BOLLETTA, F.; SERPONE, N.; MOGGI, L.; BALZANI, V. Kinetics of ligand substitution of tris(2,2'-bipyridine)chromium(III) in aqueous solutions. **Inorg. Chem.**, v.15, n.9, p. 2048–2051, 1976.
108. SHINOZAKI, K.; KAIZU, Y.; HIRAI, H.; KOBAYASHI, H. Protonation and complex formation of [(2,2'-bipyrazine)bis(2,2'-bipyridine)ruthenium(II)](2+) in the lowest excited state. **Inorg. Chem.**, v.28, n.19, p.3675–3679, 1989.
109. TANFORD, C. The Hydrophobic Effect – **Formation of Micelles and Biological Membranes**. 2. Ed, New York, John Wiley & Sons, 1980. 233 p.
110. ISHIRUJI, F.H.O.; SPEZIALI, N.L.; VAZ, M.G.F.; NUNES, F. Synthesis, Crystal Structure and Properties of the Cyano-bridged Heteropolynuclear [Cu(meso)]₃[Co(CN)₆]₂·9.5H₂O Compound. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 7, p.1195-1200, 2010.
111. NANDA, P.K.; BERA, M.; FERREIRA, A.M.C.; PADUAN-FILHO.; RAY, D. A. Formation of out of plane oxime metallacycles in [Cu₂] and [Cu₄] complexes. **Polyhedron**, v.28, p.4065–4071, 2009.