

## EFEITO DO SOLVENTE SOBRE AS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS DA FEOFITINA E DA CLOROFILA $\alpha$ .

Adriana Lima<sup>1</sup>, Mirian Marcolan<sup>1</sup>, Priscila Afonso Martins<sup>1</sup>, Noboru Hioka<sup>2</sup>, Antônio Eduardo da Hora Machado<sup>3</sup>, Leonardo Marmo Moreira<sup>1</sup>, Maira R. R. Magini<sup>1</sup>, Lucia Codognoto<sup>1</sup>, Hueder P. M. de Oliveria<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade do Vale do Paraíba / Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12244-000, São José dos Campos – SP, Brasil, \*[hueder@univap.br](mailto:hueder@univap.br)

<sup>2</sup>Departamento de Química / Universidade Estadual de Maringá

<sup>3</sup>Instituto de Química / Universidade Federal de Uberlândia

**Resumo:** Clorofila e feofitina (clorofila sem o centro catiônico de magnésio) foram estudadas espectroscopicamente em função da relação de concentração entre os solventes água e álcool. Desta forma, as diferentes razões da mistura de solvente foram elaboradas com o objetivo de avaliar a diferença das propriedades fotofísicas apresentadas pelas diferentes clorofilas, uma vez que a presença ou não do centro metálico pode alterar suas propriedades espectroscópicas e, também, favorecer a solubilidade no meio em questão e, por consequência, a ocorrência da forma monomérica. Isto ocorre porque a menor agregação implica em uma maior concentração das espécies monoméricas isoladas, acentuando, conseqüentemente, o rendimento quântico, o qual é um relevante pré-requisito relacionado à habilidade do fotosensibilizador para gerar uma significativa quantidade de espécies reativas de oxigênio, que são diretamente responsáveis pela ação fotodinâmica.

**Palavras – chave:** Clorofila  $\alpha$ ; feofitina; fluorescência; agregação.

**Área de conhecimento:** Química; Engenharia Biomédica.

### Introdução

Clorofila  $\alpha$  é um pigmento importante que apresenta papel fundamental em fotossíntese e executa duas importantes funções em diferentes membranas ligadas a complexos enzimáticos [Micali, 2002]. Entretanto, clorinas, como a clorofila  $\alpha$ , também possuem uma longa cadeia apolar gerando um pronunciado efeito hidrofóbico na sua estrutura, responsável pela significativa tendência à auto-agregação destes compostos em solventes polares como a água. A formação de agregados tem sido observada em vários sistemas para clorofilas, clorinas e várias porfirinas sintéticas. O fenômeno de agregação de porfirinas e metaloporfirinas representa um papel altamente representativo nas propriedades fotofísicas das mesmas em solução aquosa [Hambright, 1994]. Atualmente, a agregação de algumas porfirinas usadas como drogas como benzoporfirinas está associada ao emprego clínico inadequado de um entregado biológico [Dolphin, 2002]. Particularmente, feofitina apresenta alta tendência à auto-agregação quando comparada à clorofila devido à ausência de um centro catiônico, de onde se origina sua alta hidrofobicidade. Clorofila e feofitina possuem alta absorção na chamada “janela terapêutica” em Terapia Fotodinâmica (TFD), o que torna suas aplicações altamente promissoras.

### Resultados e Discussão

Diferentes proporções da mistura de solventes água/etanol contendo clorofila ou feofitina

(50  $\mu$ L de solução estoque  $5.89 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de clorofila e  $3.95 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> de feofitina) foram avaliadas espectroscopicamente. As medidas foram efetuadas a 25 °C. Os solventes utilizados possuem grau espectroscópico e a água utilizada foi Milli-Q. Clorofila e feofitina foram fornecidas pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Os espectros foram coletados em um espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex FluoroMax-2.

Estudos de ELR (Espalhamento de Luz Ressonante) foram realizados por meio de um processo de varredura espectral simultânea de monocromadores de emissão e excitação, no intervalo de 200 a 800 nm com  $\Delta\lambda$  de 0 nm, a fim de verificar o processo de auto-agregação. De fato, a intensidade de luz ressonante espalhada depende do tamanho da partícula em questão, de maneira que o agregado tende a apresentar intensidade de espalhamento significativa, o que não ocorre com o monômero isolado. Os espectros de fluorescência são largos e apresentam características muito similares, sendo que as intensidades das bandas variam com a proporção de solventes. Para ambos os corantes, os dados evidenciam uma dependência da fluorescência com a proporção de água.

A Figura 1 ilustra a relação entre a intensidade de absorção para a clorofila  $\alpha$  e a porcentagem de água no sistema solvente. É possível perceber uma maior intensidade de absorção em etanol puro, com o composto apresentando-se na forma monomérica. Na medida em que a proporção de água na mistura cresce, a

intensidade de absorção cai, o que está associado com o fenômeno da auto-agregação da porfirina.

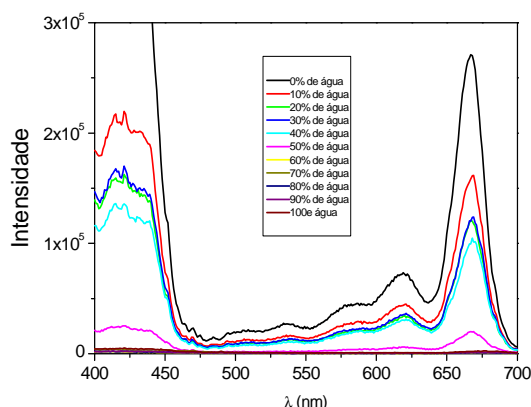


Figura 1: Variação na absorção de luz pela clorofila  $\alpha$  em misturas água/etanol.

A figura 2 ilustra a emissão de fluorescência para a clorofila  $\alpha$  em mistura água/etanol. É possível perceber que o pico da intensidade de fluorescência apresenta um decréscimo gradativo a partir de 40% de água, sendo que quando a relação é de 50% a banda apresenta baixa intensidade em relação às amostras com teor menor de água. A partir de 60% de água, a fluorescência da clorofila  $\alpha$  praticamente desaparece, o que permite inferir que a partir dessa porcentagem a porfirina está completamente agregada.

Durante a formação da espécie agregada, as unidades monoméricas se associam e se estabelecem de maneiras diversas, sendo possíveis diferentes orientações de momentos dipolares de transição para cada monômero [KASHA, 1963; ARBELOA et al 1982].

Na Figura 2, é possível perceber a total supressão da fluorescência da clorofila  $\alpha$ , a partir de 60% de água.

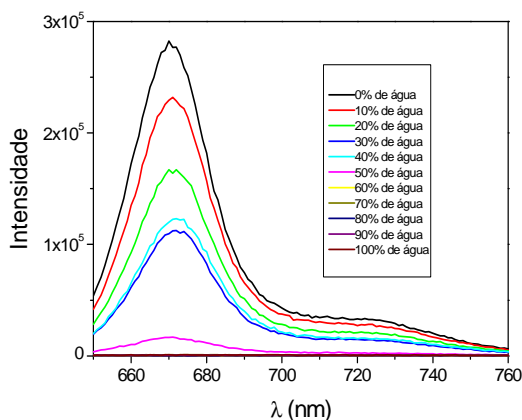


Figura 2 - Variação de emissão da clorofila  $\alpha$  em misturas água/etanol.

A Figura 3 apresenta o espectro de excitação da feofitina. Em etanol puro, o comportamento é o mesmo: elevada intensidade de fluorescência, sugerindo a presença apenas de monômeros na solução. A partir de 50% de água, a intensidade de excitação é praticamente nula.

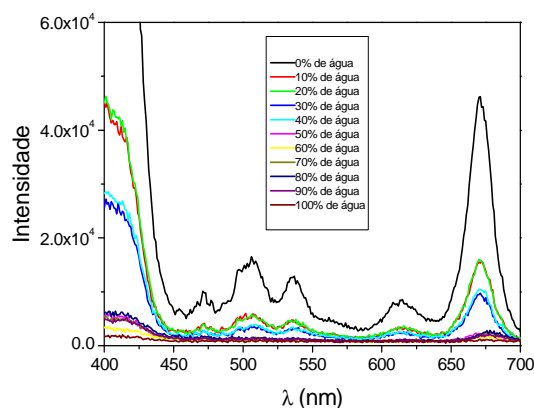


Figura 3 - Variação no espectro de excitação da feofitina em misturas água/etanol.

Com o máximo de excitação da feofitina (Figura 3), obtiveram-se as emissões para as misturas (Figura 4), de acordo com o volume de água.

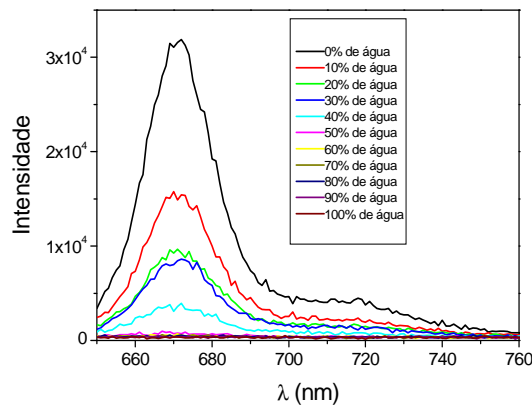


Figura 4 - Variação da emissão da feofitina em misturas água/etanol.

A feofitina apresentou o fenômeno da auto-agregação com uma quantidade menor de água, quando comparada à clorofila. A Figura 5 ilustra o decréscimo e a dependência de água no máximo de intensidade de emissão da feofitina.

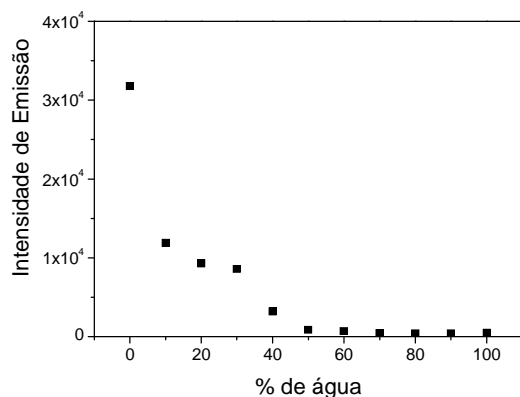


Figura 5 - Variação da intensidade de emissão da feofitina em função da porcentagem de água.

A adição do solvente orgânico, o etanol, favorece a existência da clorofila e da feofitina na forma monomérica, manifestando altas intensidades de excitação e emissão.

Ambos os corantes apresentam características favoráveis para aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD) como a absorção de luz na faixa terapêutica entre 660 e 670 nm apresentando elevadas absorvidades molares. Devido à alta hidrofobicidade, o processo de auto-agregação ocorre facilmente, de acordo com o aumento no teor de água, sendo que para a feofitina isso ocorre antes da ocorrência para a clorofila  $\alpha$ , muito possivelmente em função da ausência do centro metálico [Gandini, 1998; Marzilli, 1992; Mukundan, 1994; Pasternack, 1993; Pasternack, 1995]. Está bem estabelecido na literatura que a formação de agregados macrocíclicos depende da estrutura da molécula em questão, abrangendo a presença e o tipo do centro metálico de coordenação entre outros fatores [Gandini, 1998; Marzilli, 1992; Mukundan, 1994; Pasternack, 1993; Pasternack, 1995]. Estes dados servirão de apoio para estudos posteriores, com o intuito de definir a proporção adequada de solvente orgânico para uma melhor emissão/absorção da clorofila e da feofitina, levando em consideração o fenômeno de auto-agregação.

Uma mudança na intensidade relativa das bandas pode indicar a formação de um agregado [Gandini, 2001]. Os espectros de fluorescência em álcool são sempre mais largos que os espectros obtidos em solução aquosa, o que pode advir da emissão de uma distribuição mais larga de tamanhos dos segmentos emissores e de diferentes conformações espaciais. Propôs-se que as cadeias em álcool assumam uma conformação mais estendida. É importante registrar que as cadeias não agregadas permitem interações soluto-solvente, facilitando a difusão de éxciton tridimensional intercadeia.

Nota-se, portanto, que mesmo tendo parâmetros de solubilidade muito próximos e, sendo bons solventes para os corantes, as interações entre as diferentes relações entre os sistemas de solvente e os corantes são significativamente diferentes, pois

estes últimos solvatam de modo também diferenciado as cadeias em questão. Vários trabalhos, incluindo alguns onde se utilizam técnicas de deconvolução dos espectros de excitação e de emissão, indicam a presença de bandas vibrônicas em corantes, sendo que as mesmas podem ser afetadas pelas diferentes interações entre o solvente e as respectivas cadeias. Os trabalhos sugerem que alguns corantes que apresentam espectros largos podem ter contribuições de dois, três ou mais bandas vibrônicas. Estes valores podem sofrer desvios em função do tipo de solvente utilizado que alteraria os centros das bandas entre outros efeitos.

Ao se analisar as variações sofridas pelos espectros de excitação e emissão em diferentes solventes (considerando a constante dielétrica do meio) conforme ilustrado nas figuras anteriores, o que se verifica é que há uma melhor estabilização dos corantes e, por conseqüência, do estado excitado. O momento de dipolo do estado excitado provavelmente é maior do que no estado fundamental. Isto reflete uma melhor estabilização no estado excitado do corante em relação ao respectivo estado fundamental. Isto pode ser atribuído às características da cadeia que possui grupamentos terminais que podem sofrer interações do tipo dipolo induzido- dipolo induzido e também ligação hidrogênio. As cadeias possuem grupamentos que podem acarretar uma desativação do estado excitado, via processos de transferência de carga intramolecular. Este processo, analisando a cadeia como um todo, é extremamente rápido em função da pequena distância que separa os cromóforos.

Solventes com parâmetro de solubilidade baixo possuem elevados valores de Parâmetro de ligação hidrogênio, o que explicaria em parte porque ocorrem grandes deslocamentos nos máximos de emissão nos sistemas. Em geral, os sistemas avaliados possuem baixíssima tendência a fazerem este tipo de interação, o que explicaria também a baixa solubilidade dos mesmos nestes solventes. O mesmo pode ser dito com relação à polarizabilidade do solvente, que também entra no cômputo do parâmetro de solubilidade. Outro fator que deve ser considerado é a viscosidade dos solventes utilizados. Apesar da pequena variação de um solvente para outro, este fator também interfere nos modos vibracionais das cadeias, afetando tanto a sua solubilidade quanto os processos de emissão de luz como pode ser visto nas figuras anteriores que mostravam a intensidade de emissão em função do solvente.

De fato, a formação de ligações de hidrogênio consiste em fator determinante para deslocamentos do comprimento de onda de máxima emissão (tanto para o vermelho como para o azul dependendo do tipo de orbitais moleculares envolvidos e do aumento ou da diminuição da constante dielétrica do meio). De qualquer maneira, mesmo no caso do etanol, a capacidade de formações de ligações de hidrogênio é significativa, implicando que a diferença observada nos deslocamentos em questão não apresentaria

tamanha intensidade, tendo somente este fator como influência para o comportamento espectroscópico. É relevante registrar que no presente trabalho nós não estamos comparando somente água e etanol puros, e mesmo pequenas alterações de razão entre os solventes promoveram significativas alterações espectrais. Entretanto, com relação ao rendimento quântico propriamente dito, isto é, em relação à intensidade de fluorescência, essa influência das polaridades dos solventes não seria tão pronunciada para justificar o aumento de fluorescência observado, denotando que a interação entre as clorinas estaria sendo afetada. Assim sendo, é plausível propor que a agregação foi afetada, o que também é suportado pelos dados de Espalhamento de Luz Ressonante.

Diferentemente do que acontece em pequenas porcentagens de água, em porcentagens superiores a 60% de água, os picos dos corantes estudados são mais intensos nas regiões de maiores energias. Para amostras mais diluídas, os picos referentes às formas monoméricas estão razoavelmente definidos, embora não estejam completamente nesta forma. Mas, nesta porcentagem de água, o pico destaca-se e é fortemente influenciado pela concentração inicial. Este fato é coerente com a atribuição deste pico a agregados.

É importante registrar que a alteração da relação de solventes, por si só, já é uma importante influência na mudança de propriedades espectroscópicas do sistema químico em questão. Entretanto, a intensidade em que tais fenômenos ocorrem, incluindo as evidências obtidas por meio de Espalhamento de Luz Ressonante, denotam uma influência significativa da questão da agregação nas propriedades em questão.

## Conclusão

Ambos os pigmentos apresentam propriedades similares e adequadas para aplicação em TFD, dependendo das razões entre os solventes do meio. Devido à alta hidrofobicidade dos pigmentos, a auto-agregação ocorre em meios com alta constante dielétrica e alta concentração de água, sendo mais intensa e originando alta supressão de fluorescência o que corrobora com dados de espalhamento de luz ressonante (RLS).

## Agradecimentos

Agradecemos ao suporte financeiro da FAPESP (Auxílio à pesquisa nº 06/56701-3), FAPEMIG (EDT-515/05 e CEX-652/05), CNPq (Universal). A. Lima, Antonio E. H. Machado e N. Hioka agradecem ao CNPq pelas bolsas concedidas.

## Referências

A. Agostiano, P. Cosma, M. Trotta, L. Monsú-Scolaro, N. Micali, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 12820-12829.

R.F. Pasternack, K.F. Schaefer, P. Hambricht, *Inorg. Chem.* 33 (1994) 2062-2065.

N. Hioka, R.K. Chowdhary, N. Chansarkar, D. Delmarre, E. Sternberg, D. Dolphin, *Can. J. Chem.* 80 (2002) 1321-1326.

Kasha, M., *Radiation Research*, 20, p.55-71 1963

Arbeloa, I. L.; Ojeda, P. R. *Chem. Phys. Letters*, 87(6), p.556-560, 1982.

Gandini e colaboradores, *Journal of Luminescence* 78 (1998) 53-61.

Marzilli e colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.* 114 (1992) 7575-7577.

Mukundan e colaboradores, *Inorg. Chem.* 33 (1994) 4676-4687

Pasternack e colaboradores, *J. Am. Chem. Soc.* 115 (1993) 5393-5399][*Science* 269 (1995) 935-939.

Gandini e colaboradores, *Journal of Inorganic Biochemistry* 85 (2001) 263-277.