

METALOCLOROFILAS DE MAGNÉSIO, COBRE E ZINCO: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PRIMEIRA ESFERA DE COORDENAÇÃO SOBRE SUAS PROPRIEDADES DE SOLVATOCROMISMO E AGREGAÇÃO

Leonardo M. Moreira¹, Vagner R. Batistela², Adriana P. Gerola², Noboru Hioka², Priscila Afonso Martins¹, Mauricio S. Baptista³, Antônio E. da Hora Machado⁴, Máira R. Rodrigues¹, Lucia Codognoto¹, Hueder P. M. de Oliveira^{1*}

¹Universidade do Vale do Paraíba / FCS. Av. Shishima Hifumi, 2911 – São José dos Campos – SP / Brasil

²Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Química. Av. Colombo, 5790 – Maringá – PR / Brasil

³Universidade de São Paulo / Instituto de Química. Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo – SP / Brasil

⁴Universidade Federal de Uberlândia / Instituto de Química – Laboratório de Fotoquímica. Av. João Naves de Ávila, 2121 – Bloco 5K – 38408-100 Uberlândia – MG / Brasil

Resumo: Metaloclorofilas de zinco e cobre têm sido estudadas em análise comparativa com a “tradicional” clorofila de magnésio como função da relação de concentração envolvendo várias relações da mistura de solvente água-álcool com o objetivo de avaliar a diferença das propriedades fotofísicas apresentadas pelas diferentes clorofilas, uma vez que a presença dos diferentes centros metálicos deveria ser um fator determinante para acentuar o caráter hidrofílico destes compostos macrocíclicos, favorecendo a solubilidade no meio em questão e, por consequência, a ocorrência da forma monomérica. Está bem estabelecido que a agregação dos macrociclos fluorescentes diminui o rendimento quântico destes compostos quando comparados com as unidades monoméricas isoladas. Isto ocorre porque a menor agregação implica em uma maior concentração das espécies monoméricas isoladas, acentuando, consequentemente, 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. Os resultados indicaram que a clorofila de magnésio e a de zinco apresentam maior potencial para serem empregadas como fotosensibilizadores em terapia fotodinâmica (TFD), quando comparados com a clorofila de cobre. Isto se deve em função da absorção e da emissão mais intensas observadas destas clorofilas quando comparadas com a clorofila de cobre.

Palavras – chave: Clorofila α ; feofitina; fluorescência; agregação.

Área de conhecimento: Química; Engenharia Biomédica.

Introdução

Pigmentos fotosintéticos representam um tipo de “sangue da vida” de todos os organismos fotoautotróficos da natureza, sendo que existem basicamente três classes: clorofilas; carotenóides e ficobilinas [Vokácová, 2007]. De fato, existem aproximadamente 10 tipos de clorofilas na natureza, as quais têm sido isoladas a partir da porção verde das plantas. Em alguns organismos, somente a clorofila é detectada, enquanto em outras espécies, a clorofila é acompanhada por outros pigmentos verdes. Este principal componente é a clorofila α , que é encontrada juntamente com as clorofilas b , c , d e a protoclorofila [Dolphin, 1978]. É importante registrar que a versão sem centro metálico da clorofila α é chamada feofitina α , onde o íon Mg^{2+} é substituído por dois átomos de hidrogênio, a qual tem sido avaliada em artigo anterior [Lima, 2008]. Clorofila α apresenta uma ubíqua função como um doador de elétron nas reações fotoquímicas de fotossíntese, onde dois tipos de foto-sistema, denominados foto-sistema I e foto-sistema II, cooperativamente dirigem o fluxo de elétrons fotossintéticos a partir da água para

$NADP^+$. Clorofila α é um derivado de porfirina classificado como clorina, sendo metalada como íon Mg^{2+} . Clorinas apresentam um de seus anéis pirrólicos em uma forma reduzida quando comparadas com porfirinas, originando uma elevada absorvidade molar para as bandas Q (transições eletrônicas $\pi-\pi^*$) devido a uma diminuição de simetria do macrociclo. Desta forma, estes compostos macrocíclicos têm sido considerados interessantes protótipos de fotosensibilizadores para ser aplicados na metodologia terapêutica chamada TFD. Entretanto, uma das principais limitações das clorinas com respeito a seu emprego como fotosensibilizadores está relacionada com o elevado caráter hidrofóbico destes compostos. Esta característica apolar provoca significativa agregação destes macrociclos, que ocorre em solvente aquoso, uma vez que este meio apresenta alta polaridade. Consequentemente, diversos testes têm sido desenvolvidos com o objetivo de empregar metaloclorinas como fotossensibilizadores, haja vista a presença do centro de coordenação metálico que deveria diminuir o caráter hidrofóbico do macrociclo. Este fato é causado pela carga catiônica do íon que

age como centro de coordenação do composto macrocíclico, aumentando sua polaridade e inibindo, no mínimo parcialmente, a ocorrência de um intenso processo de agregação. A presença do cátion metálico deve gerar significativa repulsão eletrostática nos outros centros catiônicos metálicos. Além disso, o íon metálico atrai moléculas do solvente aquoso para uma maior solvatação através de ligações de hidrogênio, tornando o sistema macrocíclico mais polar e com menor tendência à auto-agregação. Os fotossensibilizadores mais amplamente empregados e estudados até 1990 eram hematoporfirinas e derivados de hematoporfirinas, tais como Photofrin I, e dihematoporfirina (DHE, Photofrin II) [Juzeniene, 2007]. De fato, Photofrin[®] é um eficiente sensibilizador de primeira geração recentemente aprovado para aplicações em TFD [David, 2005]. Neste contexto, a avaliação de novos potenciais fotossensibilizadores é um relevante esforço em prol da melhoria da compreensão das propriedades físico-químicas assim como de suas possibilidades de aplicação em TFD. No presente trabalho, foi avaliado o solvatocromismo, assim como o processo de auto-organização envolvendo metaloclorinas de magnésio, zinco e cobre.

Materiais e Métodos

Onze misturas de solvente (água/etanol em diferentes relações) contendo clorofila ou feofitina foram investigadas (50 μL de solução estoque com concentração $5,89 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de clorofila e $3,95 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de feofitina em 2 mL). As medidas foram desenvolvidas em 298,15 K. A água empregada foi grau Milli-Q, enquanto etanol foi grau espectroscópico. Clorofila α foi extraída a partir do espinafre seguindo descrição registrada em Dolphin [43]. Feofitina foi obtida a partir de clorofila α "pura" através da reação com ácido clorídrico (2 mol L^{-1}) em etanol. A purificação de ambos fotossensibilizadores foi desenvolvida utilizando cromatografia circular de camada fina - *Chromatotron* (Harrison Research, model 8924) empregando sílica como fase estacionária. Suas respectivas caracterizações foram efetuadas por ressonância magnética nuclear de hidrogênio RMN¹H (Varian, Gemini 300 MHz). Os espectros de excitação e emissão foram obtidos através de um espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex FluoroMax-2. Os espectros de emissão foram analisados empregando o máximo de intensidade das respectivas bandas a partir do espectro de excitação das amostras. As amostras foram avaliadas usando cubetas de quartzo com 1 centímetro de caminho ótico. Espectros de espalhamento de luz ressonante (ELR) foram obtidos através de medidas monocromáticas concomitantes, abrangendo o intervalo de comprimento de onda entre 200 e 800

nanômetros com $\Delta\lambda$ correspondendo a 0 nanômetros, com o objetivo de investigar eventuais processos de auto-agregação.

Resultados

A Figura 1 apresenta os espectros óticos das clorofilas de magnésio, zinco e cobre. É possível observar a ocorrência de um significativo deslocamento para o azul da transição eletrônica $\pi-\pi^*$ para a clorofila de zinco quando comparada com o espectro referente à clorofila de magnésio. Provavelmente, este efeito é produzido pela diminuição do contato entre o solvente aquoso e o macrociclo, como função da presença do íon Zn^{2+} como centro de coordenação. De fato, Mg^{2+} pode apresentar a configuração hexacoordenada, sendo um potencial ácido de Lewis para as moléculas do solvente. Além disso, os metais das famílias 1A e 2A usualmente geram cátions metálicos com alto caráter higroscópico, que acentua o caráter hidrofílico da clorina, favorecendo a acessibilidade do solvente aquoso ao macrociclo, sobretudo no que se refere à primeira esfera de coordenação do centro metálico.

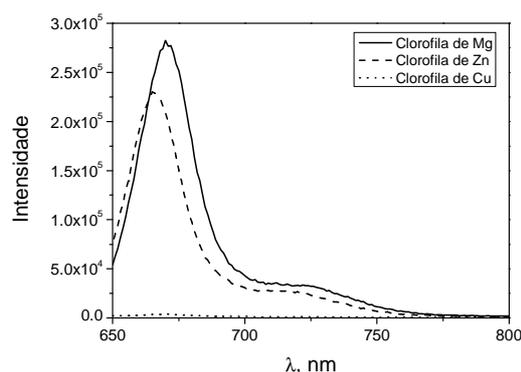


Figura 1 – Espectros de emissão das clorofilas estudadas em etanol, $T = 298,15 \text{ K}$.

Desta forma, considerando que estas bandas intensas correspondem às transições $\pi-\pi^*$, o maior contato das moléculas de água, no caso do magnésio como centro metálico (clorofila "normal"), afetaria mais intensamente os orbitais π^* , como consequência de seu caráter mais polarizável e externo, quando comparados com os orbitais π ligantes. Assim, a maior acessibilidade do solvente ao macrociclo, que deve diminuir a energia dos orbitais ligantes e anti-ligantes (π e π^*), afetaria mais representativamente os orbitais π anti-ligantes (orbitais π^*), implicando que a variação de energia (ΔE) associada à transição eletrônica da clorofila "normal" apresenta um deslocamento para o vermelho quando comparada com a clorofila que apresenta o íon de zinco como centro de coordenação. Interessantemente, a Figura 1 também demonstra uma intensa supressão de

fluorescência provocada pelo paramagnetismo da clorofila de cobre. De fato, a configuração eletrônica d^9 do íon Cu^{2+} , apresenta um elétron desemparelhado, isto é, um elétron paramagnético. Este elétron desemparelhado promove uma extraordinária perda de rendimento quântico (Φ), que é a principal causa da intensidade de fluorescência muito baixa para a clorofila de cobre. Ademais, está bem estabelecido que complexos metálicos com configuração eletrônica d^9 , incluindo compostos de coordenação de Cu^{2+} , favorecem a configuração hexacoordenada. Desta forma, com seis potenciais ligantes, provavelmente os sítios axiais de coordenação são ocupados por moléculas do solvente, uma vez que, no presente trabalho, as moléculas do sistema de solvente empregado nos estudos espectroscópicos têm significativas propriedades coordenantes. Realmente, água e etanol são bases de Lewis consideradas como ligantes σ -doadores, podendo, portanto, coordenar Cu^{2+} e originar um complexo metálico hexacoordenado com uma típica distorção tetragonal (Efeito Jahn-Teller). Por conseguinte, um segundo fator associado à intensa supressão de fluorescência observada para a clorofila de cobre poderia ser o contato direto das moléculas do solvente, que agem como ligantes na primeira esfera de coordenação do íon metálico em questão.

Todavia, esta segunda influência deve ser muito menos efetiva do que o efeito paramagnético do elétron desemparelhado. Em virtude disso, o processo de solvatação observado para a clorofila de cobre não pode ocorrer na clorofila de zinco, por exemplo, uma vez que a configuração eletrônica deste centro metálico é d^8 e, conseqüentemente, não apresenta ligantes axiais. Isto ocorre como função de uma repulsão eletrônica muito intensa no eixo z, em concordância com a Teoria do Campo Cristalino (TCC), que favorece, no caso da configuração d^8 , o arranjo geométrico denominado "quadrado-planar". Por outro lado, o íon Mg^{2+} poderia apresentar alguma ligação axial com as moléculas do solvente, que denotam que este efeito é menos decisivo do que o paramagnetismo propriamente dito. O inserto na Figura 2 demonstra que o máximo de excitação da clorofila de magnésio é maior do que o máximo de excitação referente às clorofilas de zinco e cobre para praticamente todas as relações de mistura do sistema de solvente. Este resultado demonstra a maior absorvidade molar (coeficiente de extinção molar) da clorofila de magnésio. Contudo, a figura 2 apresenta dados semelhantes de intensidade de emissão de fluorescência, indicando que, independentemente da intensidade de absorção eletrônica, a supressão de fluorescência diminui a diferença

entre o rendimento quântico para as diferentes clorofilas analisadas neste trabalho.

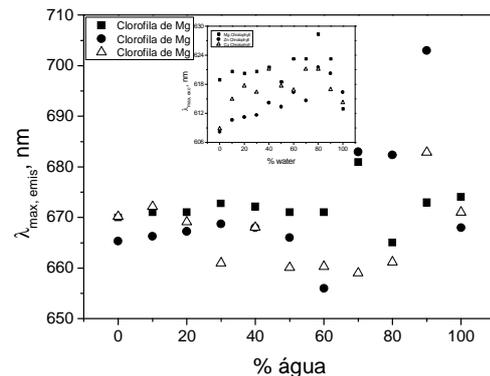


Figura 2 – Variação dos máximos de emissão das clorofilas avaliadas como função da composição do sistema de solvente, $T = 298,15$ K. Inseto: Variação do máximo de excitação das clorofilas como função da composição do sistema de solvente, $T = 298,15$ K.

A figura 3 e o inserto nesta mesma figura demonstram que entre 40 e 60% de água na mistura de solventes propiciam drásticas transições de intensidade de excitação e emissão, respectivamente. De fato, nos valores maiores do que 60% de água, as intensidades de excitação e emissão, respectivamente, atingem uma condição óptica ótima, indicando que esta faixa de contribuição de água, nas misturas água/etanol, constitui uma razão de potencial aplicação em testes empregando esta clorofila como protótipo de fotossensibilizador em TFD.

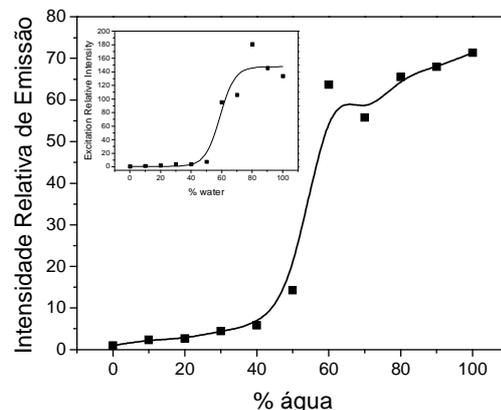


Figura 3 – Variação da intensidade relativa de emissão da clorofila de magnésio como função da composição do sistema de solvente, $T = 298,15$ K. Inseto: Variação da intensidade relativa de excitação da clorofila de magnésio da composição do sistema de solvente, $T = 298,15$ K.

A figura 4 e o inserto na mesma figura também apresentam a faixa entre 40 e 60% de água na mistura de solventes como um ponto de inflexão relacionado a uma mais drástica alteração da intensidade do fenômeno óptico em questão (excitação e emissão, respectivamente).

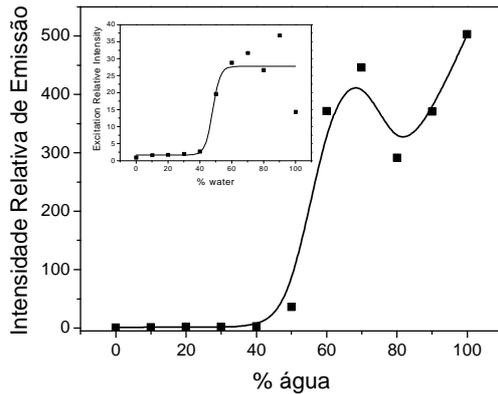


Figura 4 – Variação da intensidade relativa de emissão da clorofila de zinco como função da composição do sistema de solvente, T = 298,15 K. Inseto: Variação da intensidade relativa de excitação da clorofila de zinco como função da composição do sistema de solvente, T = 298,15 K.

A figura 5 e o inserto na mesma figura indicam que, para a clorofila de cobre, esta transição é menos drástica e este comportamento espectroscópico varia em uma faixa mais larga, a partir de aproximadamente 40% até 70% de contribuição de água. Considerando que o elétron desemparelhado do íon Cu^{2+} é o principal fator determinante do comportamento ótico da clorofila de cobre, é possível que este paramagnetismo esteja associado à pequena diferença nas condições ótimas de rendimento quântico desta clorofila, quando comparada com as outras clorofilas analisadas neste trabalho.

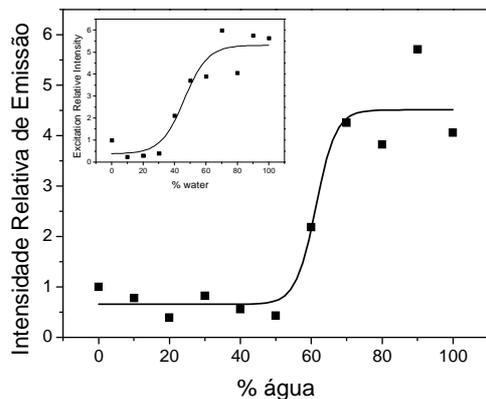


Figura 5 - Variação da intensidade relativa da emissão da clorofila de cobre como função da composição do sistema solvente, T = 298,15 K. Inseto: Variação da intensidade relativa de excitação da clorofila de cobre como função da composição do sistema de solventes, T = 298,15 K.

A figura 6 e os insertos A e B demonstram que aproximadamente nesta faixa de contribuição de água na mistura de solventes, a intensidade de espalhamento de luz ressonante é menos significativa do que com maior

contribuição alcoólica. Realmente, a clorofila de cobre apresenta um ponto de inflexão menos drástico e definido, apesar do comportamento espectroscópico apresentar tendência semelhante, quando comparado com as clorofilas de zinco e de cobre. Portanto, os dados apresentados indicam que a partir de aproximadamente 60% de contribuição de água, ocorre um espalhamento de luz mínimo, demonstrando que nestas condições o processo de agregação é minimizado. É bem conhecido que o fenômeno da agregação é um fator decisivo para determinar o rendimento quântico de um sistema químico. Assim sendo, a condição de solventes ótima para uma possível aplicação em TFD de no mínimo, 60% de água ocorre devido ao menor processo de agregação entre as unidades de clorofilas.

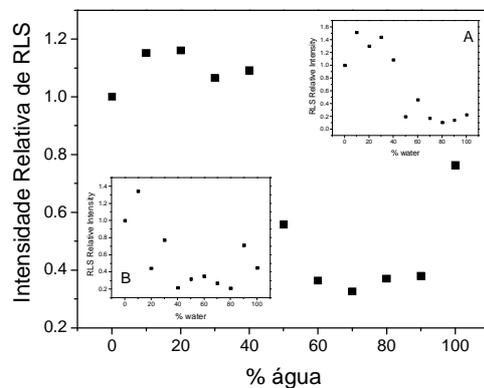


Figura 6 – Variação da intensidade relativa de espalhamento de luz ressonante da clorofila de magnésio como função da composição do sistema de solvente, T = 298,15 K. Insetos: **A** – Variação das intensidades relativas de ELR da clorofila de zinco como função da composição do sistema de solventes, T = 298,15 K e **B** - Variação da intensidade relativa de ELR da clorofila de cobre como função da composição do sistema de solvente, T = 298,15 K.

Discussão

Os resultados obtidos demonstram que o rendimento quântico das clorofilas de zinco (Zn^{2+}) e cobre (Cu^{2+}) são menores quando comparados com a clorofila de magnésio. De fato, o rendimento quântico de Cu^{2+} é quase completamente suprimido, denotando que o elétron desemparelhado é decisivo no comportamento fotofísico nesta metaloclorofila. Por outro lado, apesar do rendimento quântico representado pela clorofila de zinco ser menor do que o rendimento demonstrado pela clorofila de magnésio, esta diferença é pouco significativa. Neste caso, considerando que o comprimento de onda específico do máximo de emissão da clorofila de zinco é encontrado inserido dentro da chamada "janela terapêutica" do TFD, este tipo de clorofila poderia ser também empregado como

potencial fotossensibilizador. Além disso, os resultados obtidos permitem inferir que a presença mínima de 60% de água na mistura água/etanol representa uma condição ótima visando a aplicações do sistema químico em questão em TFD, como consequência das elevadas intensidades de excitação e emissão da clorofila analisada neste trabalho. Provavelmente, este fato ocorre devido ao menor processo de agregação que ocorre com estas relações de solventes. É possível que nestas condições o arranjo de moléculas de etanol e água se apresente em uma forma adequada para inibir a agregação, impedindo um processo mais pronunciado de supressão da interação ótica destas clorofilas com a radiação eletromagnética, permitindo, desta forma, uma maior intensidade destes fenômenos óticos.

De fato, estas maiores intensidades de excitação e emissão são parâmetros altamente relevantes que indicam que, nestas condições de meio, estes compostos macrocíclicos podem originar uma maior concentração de espécies reativas de oxigênio, tais como oxigênio singlete, que é um importante pré-requisito para ser considerado em um processo seletivo de protótipos de fotossensibilizadores.

Conclusões

Os resultados mostraram que a clorofila de magnésio e a de zinco têm maior potencial para ser empregados em TFD como fotossensibilizadores. Isto ocorre em função das mais elevadas intensidades de excitação e emissão observadas por estas clorofilas. Ademais, independentemente da clorofila analisada nas medidas espectroscópicas, a presença de no mínimo 60% de água na mistura de solventes gera maiores intensidades de absorção e emissão. Provavelmente, este fato é uma consequência direta do menor processo de agregação, em concordância com os dados de espalhamento de luz ressonante. Estas condições ótimas devem ser consideradas em um processo de preparação de novos fotossensibilizadores para ser aplicado em TFD. Novos estudos estão sendo desenvolvidos em nosso grupo para melhorar nossa compreensão com respeito aos mecanismos moleculares da influência do solvente sobre as propriedades fotofísicas dos compostos macrocíclicos.

Agradecimentos

Agradecemos à FAPESP (06/56701-3; 02/00272-6), FAPEMIG (EDT-515/05 and CEX-652/05) e CNPq (Universal). A. Lima (IC), Antonio E.H. Machado (PQ 1-C) e N. Hioka (PQ 2) são gratos ao CNPq e à Fundação Araucária - Brasil pelos respectivos suportes financeiros.

Referências

- Z. Vokacová, J.V. Burda, Computational study on spectral properties of the selected pigments from various photosystems: structure-transition energy relationship, *J. Phys. Chem. A* 111 (2007) 5864-5878.
- Dolphin, D.; *The porphyrins. Physical Chemistry. Part C (vol v).* Academic Press Inc., New York, EUA, 1978.
- A. Lima, L.M. Moreira, A. Gracetto, V. Batistella, A.P. Gerola, N. Hioka, D. Severino, A.E.H. Machado, M.R. Rodrigues, H.P.M. de Oliveira, Influence of different water-ethanol solvent systems on the spectroscopic and physico-chemical properties of the macrocyclic compounds Pheophytin and Chlorophyll α , unpublished work, 2008.
- J.G. Moser (ed) in *Photodynamic Tumor Therapy – 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*, Harwood, India, 1998]
- Juzeniene A, Moan J. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2007; 4: 3.
- David O, Bourré L, Krika Y, Durand M, Patrice T. *Photodiag. Photodyn. Ther.* 2005;2: 25.
- Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Ravizza R, Gariboldi M, Monti E. *J. Organometallic Chem.* 2007; 692: 1269.