

**Estudos Espectroscópicos da Porfirina Aniônica
Hidrossolúvel Meso-tetrakis (P-fenilsulfonato) em Meio
Micelar**

**Optical Spectra Studies of Water-soluble Anionic Tetra
Porphyrin**

Tania Toyomi Tominaga

Departamento de Física

Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

ttominaga@unicentro.br

Daiana Kotra Deda

Departamento de Química

Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)

Christiane Philippini Ferreira Borges

Departamento de Química

Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG)

Resumo: Este trabalho teve como objetivo investigar a influência do pH e da presença dos surfactantes SDS, CTAB e HPS nas propriedades óticas da porfirina meso-tetrakis (p-fenilsulfonato), TPPS₄. A análise dos espectros eletrônicos obtidos em função do pH revelou a presença de duas espécies em equilíbrio na solução, as formas protonada (H₄TPPS₄)²⁻ e desprotonada (H₂TPPS₄)⁴⁻ da porfirina, sendo que o equilíbrio entre elas foi atingido no pH 4,7. A presença de micelas de CTAB e HPS modificou a forma e a intensidade do espectro de absorção, indicando a interação da porfirina com os surfactantes. A análise dos dados experimentais mostrou que na presença de CTAB e HPS a transição entre as formas (H₂TPPS₄)⁴⁻ e (H₄TPPS₄)²⁻ ocorre em um pH muito próximo de zero. A diminuição do valor de pK_a com relação ao obtido em solução aquosa indica que a porfirina interage com a micela de CTAB e HPS, e que essa interação protege a porfirina dificultando a sua protonação. Na presença de micelas aniônicas não

se observou modificações significativas no valor de pKa. Estes resultados mostram que a porfirina aniônica TPPS₄ é melhor incorporada em micelas de CTAB e HPS do que em micelas de SDS e portanto, quando ambas as moléculas são carregadas, a interação é determinada predominantemente por fatores eletrostáticos.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; surfactantes; espectroscopia.

Abstract: This paper reports the investigation of the pH influence and of the presence of SDS, CTAB and HPS upon the optical properties of tetra(4-sulfonatophenyl)porphyrin(TPPS₄). The analysis of optical spectra obtained as a result of the pH revealed that two different species clearly appeared to be in equilibrium in the solution: the protonated form (H₄TPPS₄)²⁻ and deprotonated porphyrin form (H₂TPPS₄)⁴⁻, while their equilibrium was reached when the pH value was 4,7. The presence of CTAB and HPS micelles modified the absorption spectra form and intensity, indicating the interaction of the surfactants with porphyrin. The experimental data analysis showed that when CTAB and HPS are present, the transition from deprotonated to protonated form occurs when the pH is close to zero. Without the water solution, a lower value of pKa was obtained, indicating that the porphyrin interacts with the CTAB and HPS micelles, which protects porphyrin and makes its protonation difficult. In the presence of SDS, no significant pKa value changes were observed. These results show that the Anionic Tetra Porphyrin TPPS₄ is better incorporated in CTAB and HPS than in SDS micelles, so that when both molecules are charged, the interaction is significantly modulated by electrostatic factors.

Key words: photodynamic therapy; surfactant; spectroscopy.

Introdução

As porfirinas são compostos que têm em comum um anel tetrapirrólico chamado porfina. 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 e pela coordenação de diferentes íons de metais dá-se origem à uma grande variedade de metaloporfirinas (MURRAY et al., 2000).

Algumas porfirinas desempenham papéis vitais em sistemas bioquímicos. O organismo produz essencialmente uma só porfirina chamada protoporfirina-IX que aparece na hemoglobina. O complexo vermelho de íon Fe^{2+} e de protoporfirina-IX chama-se heme, e é responsável pela cor vermelha da hemoglobina. As outras porfirinas encontradas no organismo são em grande parte ou precursores da protoporfirina ou produtos da degradação destes precursores (ANNINO, 1978). Existem ainda outros compostos de grande importância na natureza. Pode-se citar, por exemplo, a clorofila, uma porfirina que contém o magnésio, que é o pigmento fotossintético das plantas (MURRAY et al., 2000).

A importância dos estudos com porfirinas e derivados nas últimas décadas se deve a algumas de suas propriedades. Elas possuem uma alta afinidade por tecidos tumorais, fotoatividade, fotoestabilidade e absorvem luz na região espectral em torno de 600nm, onde a luz apresenta maior penetração nos tecidos (BONNETT, 1995; DOUGHERTY, 1993; BORISSEVITCH et al., 1996). As porfirinas tendem a se localizar no tecido doente, mas o mecanismo para essa seletividade ainda não é muito conhecido. No entanto, sabe-se que essa seletividade decorre da associação do composto a lipoproteínas do plasma, que o transporta preferencialmente para as células anormais, já que estas possuem um número exageradamente alto de receptores de lipoproteínas em comparação com as células sadias (MACHADO, 2000; SIMPLÍCIO et al., 2002).

Uma aplicação interessante das propriedades fotofísicas das porfirinas é a sua utilização na Terapia Fotodinâmica (TFD), uma modalidade relativamente nova no tratamento de câncer e outras moléstias, tais como degeneração macular da retina, psoríase (CANNON, 1993). O princípio desse método é introduzir no paciente o composto fotossensível, que se acumula preferencialmente no tecido doente. Posteriormente, aplica-se irradiação seletiva (tipicamente 600 a 800nm) via laser que ativa o composto, gerando formas de oxigênio tóxicas que necrosam ou afetam convenientemente o tumor, levando-o ao colapso e à ação curativa do paciente (MACHADO, 2000).

Derivados porfirínicos têm sido altamente empregados em TFD, porém sofrem auto-agregação em água. A agregação pode alterar seus estados eletrônicos e, dessa forma, suas características energéticas. A formação de agregados, também, reduz drasticamente a capacidade do composto de gerar oxigênio singlete, espécie responsável pela morte tumoral e, conseqüentemente, a atividade fotodinâmica das porfirinas. Podem ainda provocar o entupimento de artérias, levando o paciente à morte. Dessa forma, para uma maior eficiência é necessário que o composto se apresente solubilizado e na forma monomérica (BORISSEVITCH 2004; SIMPLICIO et al., 2002).

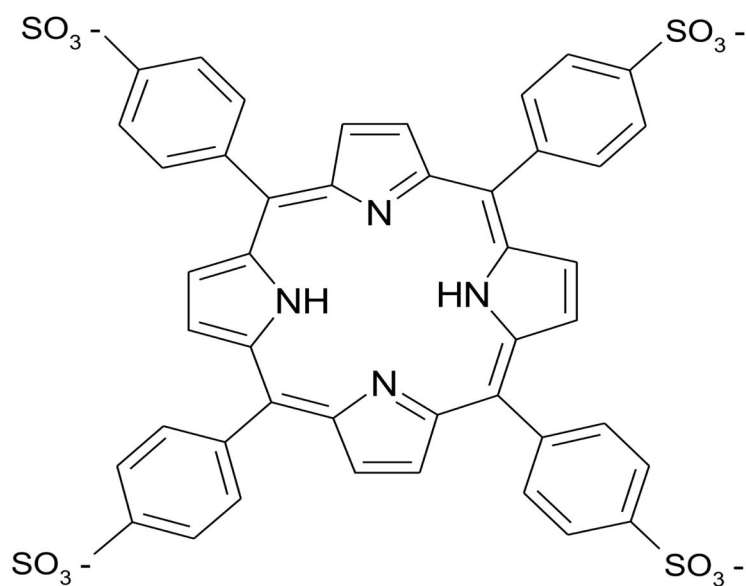
Estudos têm revelado (TOMINAGA et al., 1997; GANDINI et al., 1999) que as propriedades dessas porfirinas, inclusive a agregação, são influenciadas por vários fatores. Dentre esses destaca-se a acidez, alcalinidade, força iônica do meio, e a presença de macromoléculas e membranas. Como essas drogas são normalmente administradas no paciente por via intravenosa em concentrações relativamente altas, podem provocar efeitos colaterais, portanto, torna-se relevante prever como suas propriedades serão influenciadas pela presença de estruturas presentes no sangue tais como membranas e proteínas. Devido à complexidade das membranas biológicas, utilizam-se modelos simplificados, como detergentes na forma de micelas, para um estudo inicial de um grande número de fenômenos que ocorrem nas membranas, a fim de se obter informações da interação de drogas com as membranas celulares (SONG et al., 1998; MAITI et al., 1998, GANDINI et al., 1999). Estes estudos demonstram que a interação de porfirinas com micelas depende principalmente da carga presente no surfactante, ou seja, de fatores eletrostáticos.

Uma vez que o estudo das propriedades espectroscópicas das porfirinas nas micelas pode dar subsídios importantes para a compreensão da interação das porfirinas com as membranas biológicas, e para realizar uma avaliação preliminar da potencialidade destes compostos como droga terapêutica, investigou-se a influência do pH e das micelas de dodecil sulfato de sódio (SDS), N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS), e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) nas propriedades da porfirina aniônica meso-tetrakis (p-fenilsulfonato), (TPPS4).

Materiais e métodos

Na realização deste trabalho, utilizou-se a porfirina aniônica aquo-solúvel, sal de sódio meso-tetrakis (p-fenilsulfonato), TPPS₄, da Midcentury Chemicals, cuja estrutura molecular está apresentada na figura 1. Os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS) e N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato (HPS), ambos da Sigma, e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) da Riedel de Haën foram utilizados sem purificações prévias. Todas as soluções foram preparadas em água destilada e deionizada, e as medidas foram realizadas em temperatura de 20°C. Em todos os experimentos, foram utilizadas soluções frescas de porfirinas e surfactantes.

Figura 1. Estrutura da porfirina aniônica TPPS₄



Os espectros de absorção na região ultravioleta e visível, analisados na faixa de 350 a 700 nm, foram obtidos em um espectrofotômetro Cary 100 Varian, utilizando-se uma cubeta de quartzo, com duas faces polidas e caminho ótico $l = 1,00$ cm. Assegurou-se que a absorbância das porfirinas fosse menor que 1,0 na banda de Soret. As medidas de pH das soluções foram realizadas em um pHmetro Digimed equipado com eletrodo de vidro de Ag/AgCl.

Para determinação dos pKs foram realizadas titulações das soluções da porfirina em função do pH em solução aquosa, em solução acetato-fosfato 20 mmol/L na ausência e na presença de micelas de SDS, HPS e CTAB. O pH das soluções foi variado de 0,5 a 14,0, utilizando-se soluções estoque de NaOH e HCl, tomando-se medidas a cada 0,5 unidade de pH. Nos experimentos em presença de surfactantes, as concentrações de detergentes utilizadas foram maiores que a concentração micelar crítica, cmc, para garantir a completa interação porfirina-micela. Na realização deste trabalho, foram utilizadas concentrações de 40 mmol/L para SDS e 20 mmol/L para CTAB e HPS. Os valores tabelados das cmc's dos surfactantes utilizados para os experimentos foram $8,0 \times 10^{-3}$ mol.L⁻¹ (SDS); $5,0 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ (HPS), $9,2 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ (CTAB).

Os espectros de absorção obtidos foram analisados utilizando o algoritmo "Convex Constraint Analysis" (CCA), que permitiu a decomposição de um conjunto de espectros em espectros bases que correspondem às diferentes formas no equilíbrio em função do pH. (PERCZEL et al., 1992; BORISSEVITCH et al., 1996). Os valores de pKs da porfirinas na ausência e na presença de micelas foram determinados através do ajuste dos dados utilizando-se a função sigmoideal. Para cada experimento, foram realizados pelo menos três titulações independentes e os resultados apresentados representam a média dos dados obtidos.

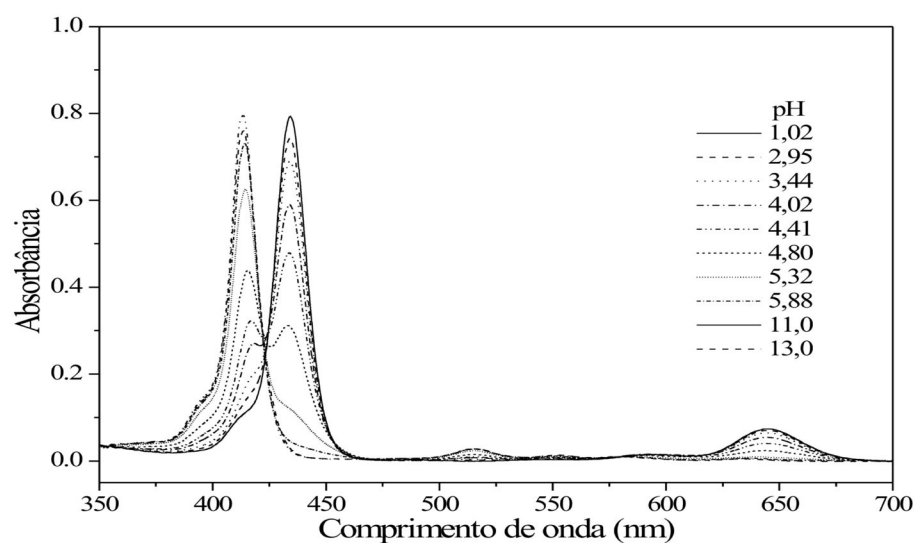
Resultados

A figura 2 mostra a titulação da porfirina aniônica TPPS₄, em solução aquosa, em função do pH na faixa de pH de 0,5 a 13. A alcalinização da solução resultou em um deslocamento espectral para comprimentos de onda menores e observou-se a presença de um ponto isobéptico em 422 nm, indicando a existência de pelo menos 2 espécies distintas neste equilíbrio. É conhecido que esta alteração espectral se deve à desprotonação dos nitrogênios pirrólicos do centro do anel porfirínico, tendo como resultado o aumento da carga negativa líquida da molécula (PASTERNAK et al., 1976). Portanto, o conjunto de espectros experimentais apresentados na figura 2 foi analisado considerando-se como sendo resultante da combinação linear de duas componentes puras:

a espécie protonada e a desprotonada. O equilíbrio entre as duas espécies encontra-se representado abaixo:



Figura 2. Espectros de absorção ótica da porfirina TPPS4 em solução aquosa em função do pH na faixa de 0,5 a 13,0

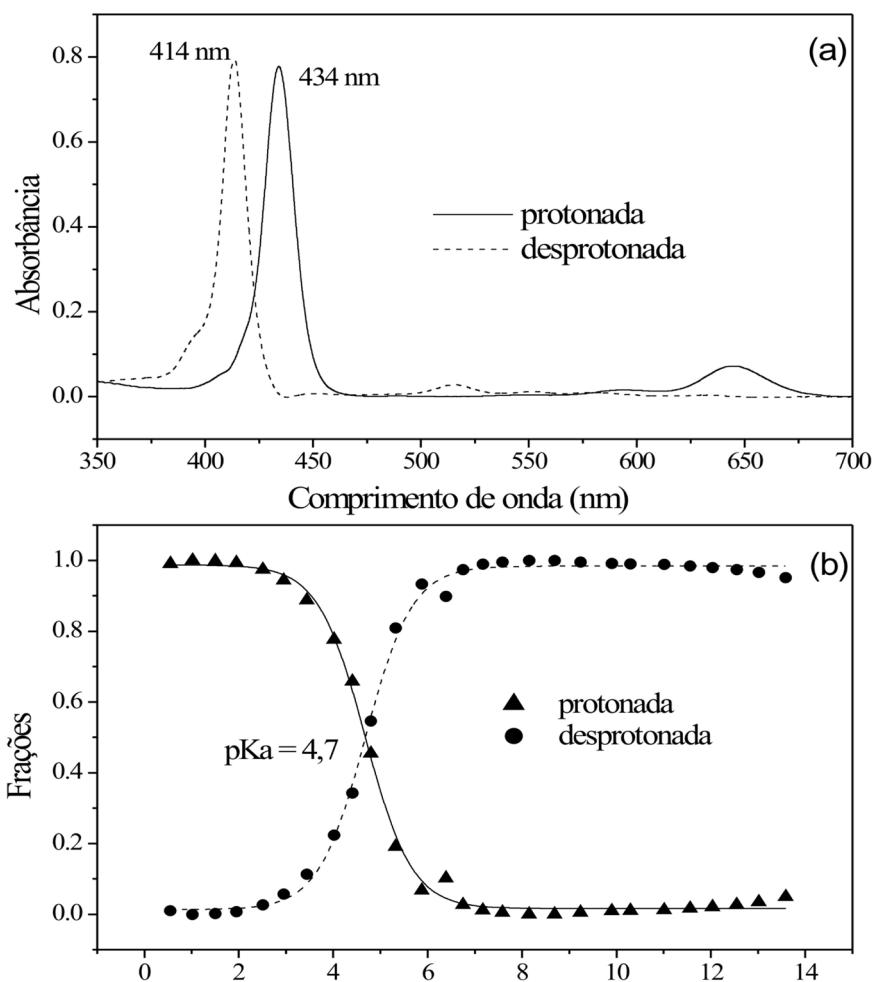


O resultado da análise dos espectros de absorção utilizando-se o algoritmo “Convex Constraint Algorithm” (CCA) está apresentado na figura 3a. O espectro com banda de Soret centrada em 434 nm foi atribuída à forma protonada $(\text{H}_4\text{TPPS}_4)^{2-}$ e o espectro com a banda de Soret centrada em 414 nm à forma desprotonada $(\text{H}_2\text{TPPS}_4)^{4-}$. Os espectros óticos mostram que a forma $(\text{H}_2\text{TPPS}_4)^{4-}$ exibe características de simetria D_{2h} caracterizado pelo desdobramento da banda Q em quatro picos como mostra a figura 3a, mas para a forma $(\text{H}_4\text{TPPS}_4)^{2-}$ esta simetria aumenta para D_{4h} caracterizado por dois picos na região da banda Q (JANSON e KATZ, 1979). A protonação de dois dos quatro nitrogênios centrais remove a degenerescência das porfirinas base-livre, aumentando dessa maneira a simetria da espécie $(\text{H}_4\text{TPPS}_4)^{2-}$.

As contribuições das duas componentes em cada espectro experimental em função do pH estão representadas na figura 3b. O ajuste destes valores empregando-se

a curva sigmoidal permitiu avaliar para o pKa um valor de 4,7. Portanto abaixo do pH 4,7 tem-se predominantemente a forma protonada H₄TPPS₄²⁻ e acima deste pH encontra-se neste equilíbrio predominantemente a forma desprotonada H₂TPPS₄⁴⁻ em solução. O comportamento dessa porfirina em função do pH também foi analisado em solução acetato-fosfato 20 e 250 mmol/L e os valores de pKa's para ambas as transições, não tiveram mudanças significativas, mostrando que nessas condições o aumento da força iônica não influencia o valor do pKa.

Figura 3. (a) Componentes da deconvolução dos espectros óticos da porfirina TPPS₄ em solução aquosa; (b) Frações das componentes em função do pH na faixa de 0,5 a 13,0



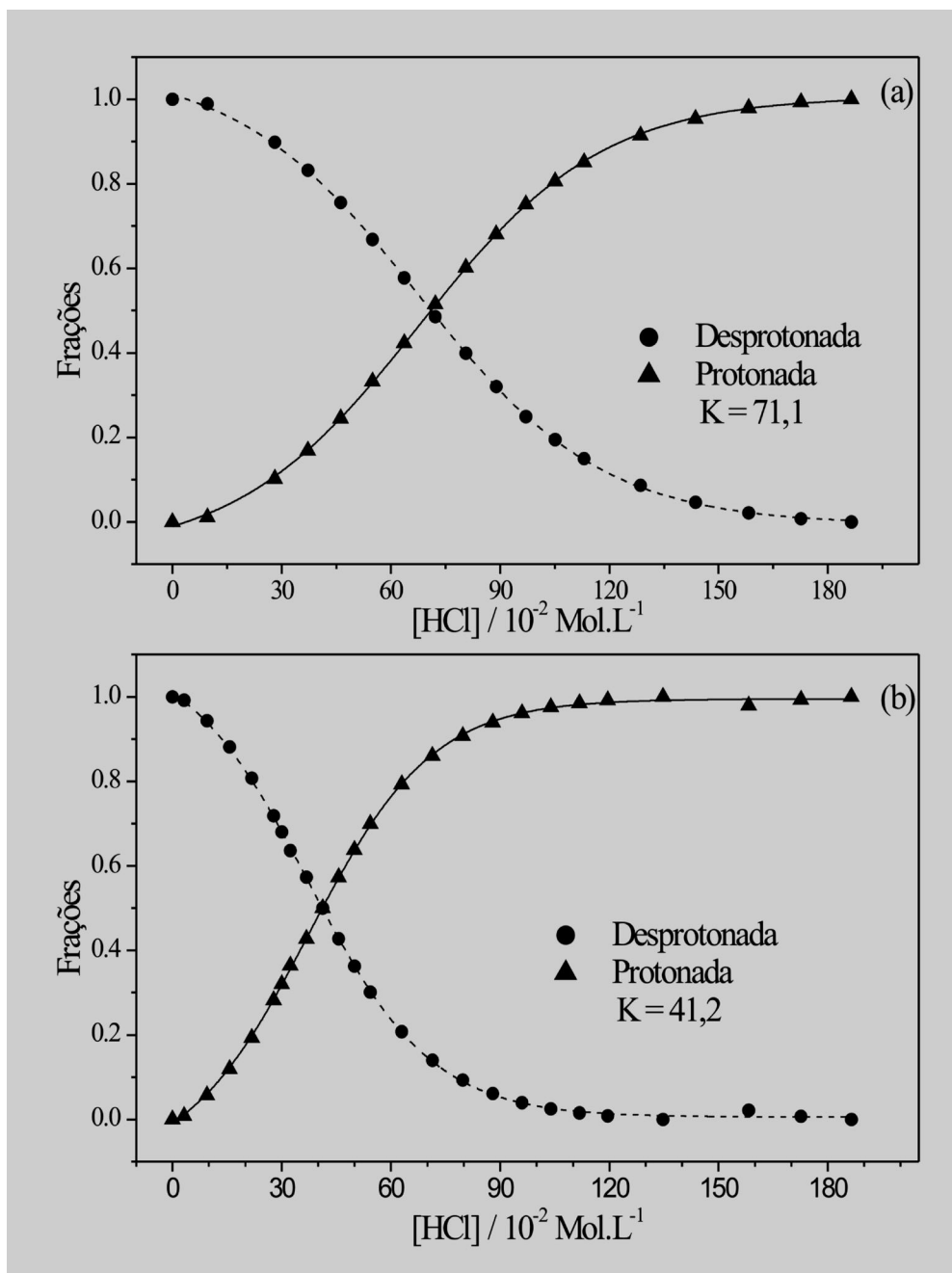
Com o intuito de se avaliar o efeito das micelas nos valores de pKa's da TPPS₄, foram realizadas titulações da TPPS₄ em função do pH em concentração fixa, tanto

da porfirina como das micelas. As mudanças espectrais das diferentes formas existentes no equilíbrio permitiram determinar os valores de pKa's na presença das diversas micelas utilizadas e, assim avaliar os deslocamentos dos pKa's devido à interação com as micelas. A dependência da absorção óptica da porfirina TPPS₄ com o pH foi estudada na presença de SDS (40 mmol/L), CTAB (20 mmol/L), e de HPS (20mmol/L). Essas concentrações de surfactantes foram utilizadas de modo que houvesse a formação de micelas e para garantir a completa interação porfirina-micela.

Em experimentos realizados na presença do surfactante catiônico CTAB em função do pH, verificou-se apenas a presença da espécie de porfirina desprotonada em toda a faixa de pH investigada. Embora alterações no espectro estivessem sendo observadas abaixo do pH 0,5, indicando o início da protonação, as condições experimentais não permitiram a determinação do valor do pKa, devendo o seu valor estar próximo de zero. Em uma tentativa para se observar a forma protonada desta porfirina na presença de CTAB e tentar avaliar o valor de pKa desta transição, foi realizada titulação da TPPS₄ em função da concentração de HCl. Neste experimento foi possível identificar as duas formas e como mostra a figura 4a a transição da forma (H₂TPPS₄)⁴⁻ para a forma (H₄TPPS₄)²⁻ ocorre em um pH muito próximo de zero. A diminuição do valor de pKa com relação ao obtido em solução aquosa indica que a porfirina interage com a micela de CTAB. Essa interação protege a porfirina dificultando a sua protonação. E esta interação ocasiona, também, uma alteração na distribuição de carga do anel. Este efeito pode ser explicado por fatores eletrostáticos e de equilíbrio químico. A micela de CTAB é carregada positivamente e a forma desprotonada da porfirina (H₂TPPS₄)⁴⁻ possui uma carga negativa resultante maior que a forma protonada (H₄TPPS₄)²⁻. Isto faz com que a interação da forma desprotonada com a micela seja mais forte que a interação protonada-micela. Dessa maneira, o complexo porfirina desprotonada-micela é estabilizado e o equilíbrio deslocado para forma desprotonada. Assim, somente em valores de pH muito baixos ocorre a protonação da porfirina.

Na presença do surfactante zwitteriônico HPS, a porfirina TPPS₄ apresentou um comportamento semelhante, mas com um deslocamento negativo menor quando comparado com os resultados obtidos em presença de micelas de CTAB como mostra o gráfico apresentado na figura 4b.

Figura 4. Frações das componentes da deconvolução dos espectros óticos da porfirina TPPS4 na presença (a) de 20 mmol/L de CTAB em função [HCl] (b) de 20 mmol/L de HPS em função [HCl]



Os resultados experimentais do comportamento da TPPS₄ na presença do surfactante aniônico SDS mostraram que, comparando-se os resultados obtidos em presença de micelas de SDS com os obtidos em solução aquosa, não houve mudanças significativas na forma dos espectros. Além disso, observou-se apenas uma pequena variação no valor de pK_a, um deslocamento negativo com valor de 4,4. Portanto, o comportamento de protonação e desprotonação da porfirina praticamente não se altera com relação ao observado em solução aquosa, indicando pequena interação da porfirina com micelas de SDS.

Portanto, com a análise dos dados experimentais na presença dos três surfactantes investigados pode-se observar que há um deslocamento do pK_a quando micelas de CTAB e HPS estão presentes, indicando uma interação mais efetiva da porfirina com estas micelas. Estes deslocamentos podem ser explicados através de um efeito substancial das cargas das micelas na estrutura eletrônica da porfirina, e indicam uma interação maior com as micelas de CTAB do que com micelas de HPS. A interação não significativa entre a porfirina e a micela aniônica SDS pode ser atribuída à repulsão eletrostática que ocorre entre a micelas de SDS e a TPPS₄, ambas carregadas negativamente.

De acordo com Kadish et al., (1989) e Barber et al., (1991) existe a formação de agregados não comuns em alguns derivados porfirínicos meso-tetrafenil substituídos na presença de surfactantes pouco concentrados. Porém em altas concentrações de surfactantes estes agregados se solubilizam e se dispersam na forma de monômeros, então em todo o intervalo de pH estudado observa-se apenas a porfirina TPPS₄ na forma monomérica ligada às micelas.

Conclusões

Os resultados obtidos mostraram que a porfirina aniônica TPPS₄ é melhor incorporada em micelas catiônicas (CTAB) e zwitteriônicas (HPS) do que em micelas aniônicas (SDS). Portanto, embora a solubilização de porfirinas em regiões apolares de micelas deva-se, geralmente, a interações hidrofóbicas não-específicas, quando ambas as moléculas são carregadas, a interação é determinada predominantemente por fatores eletrostáticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. G. D. Fasman pela gentileza de ter fornecido o programa CCA, LIMAC/CIPP/UEPG e à Fundação Araucária.

Referências

ANNINO, J. S. *Química clínica: princípios e métodos*. Manole. São Paulo, SP. 1978.

BARBER, D.C.; FREITAG-BEESTON, R.A.; WHITTEN, D.G. Atropisomer-specific formation of premicellar porphyrin J-aggregates in aqueous surfactant solutions. *J. Phys. Chem.* 95, 4074-4086, 1991.

BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrins and phtalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc.Rev.* 19-33, 1995.

BORISSEVITCH, I. E.; TOMINAGA, T. T.; IMASATO, H.; TABAK, M. Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role albumin and porphyrins aggregation. *Journal of Luminescence.* 69, 65-76, 1996.

CANNON, J. B. Pharmaceutics and drug delivery aspects of heme and porphyrin therapy. *J. Pharm. Res.* , 82, 435-446, 1993.

DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 58 (6), 895-900, 1993.

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*, 15 (19), 6233-6243, 1999.

JANSON, T.R.; KATZ, J.J. *The Porphyrins*. Dolphin, D.Ed.; Academic Press: New York, 1979; vol. IV, cap.1.

KADISH, K.M.; MAIYA, G.B.; ARAULLO, C. ; GUILARD, R. Micellar effects on the aggregation of tetraanionic porphyrins. Spectroscopic characterization of free-base mesotetrakis(4—sulfonatophenyl)porphyrin, (TPPS)H₂, and (TPPS)M (M=zinc(II), copper(II), and vanadyl) in aqueous micellar media. *Inorg. Chem.* 28, 2725-2731

KRAGH-HANSEN, U. Molecular Aspects of Ligand Binding to Serum Albumin. *Pharmacological Reviews*, 33 (1), 17-53, 1981.

KESSEL, D. Porphyrin localization a new modality for detection and therapy of tumors *Biochem. Pharmacol.* 33 (9), 1389- 1393, 1984.

MACHADO, A. E. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Química Nova*, 23.(2), 237-243, 2000.

MAITI, N.C.; MAZUMDAR, S.; PERIASAMY, N. J- and H- aggregates of Porphyrin-Surfactant Complexes. *J. Phys. Chem. B.* 102, 1528-1538, 1998.

MURRAY, R. K. et al. *Harper's Biochemistry*. Appleton & Lange. Connecticut, USA. 2000.

PASTERNAK, R. F.; SUTIN, N. ; TURNER, D. H. Some very rapid reactions of porphyrins in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* v. 98, p. 1908-1913, 1976.

PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular-dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm - a practical guide. *Anal. Biochem.*,203 (1), 83 -93, 1992.

SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*, 25, (5), 801-807, 2002.

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.

STURMER, D.M. The chemistry of heterocyclic compounds. Wiley. Nova York, 1977.

TOMINAGA, T. T.; YUSHMANOV, V. E.; BORISSEVITCH, I. E.; IMASATO, H.; TABAK, M. Aggregation phenomena in the complexes of iron tetraphenyl porphine. *J. Inorg. Biochem.* .65, 235-244, 1997.

YUSHMANOV, V. E. IMASATO, H.; TOMINAGA, T.T. ¹H NMR and electronic Absorption Spectroscopy of Paramagnetic Water-Soluble Meso-Tetraarylsubstituted Cationic and Anionic Metalloporphyrins. *J. Inorg. Biochem.* 61, 233-250, 1996.