



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Patrícia Sangaletti

Fotoquímica de pigmentos fotossintéticos: avaliação estrutural e do ambiente

FLORIANÓPOLIS

2019

Patrícia Sangaletti

Fotoquímica de pigmentos fotossintéticos: avaliação estrutural e do ambiente

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do grau de Mestre em Química.
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Adriana Passarella Gerola

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra

Sangaletti, Patrícia

Fotoquímica de pigmentos fotossintéticos : avaliação estrutural e do ambiente / Patrícia Sangaletti ; orientadora, Adriana Passarella Gerola, 2019.

91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Química. 2. fotofísica. 3. fotoquímica. 4. clorofilas. 5. feofitinas. I. Passarella Gerola, Adriana. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Química. III. Título.

Patrícia Sangaletti

Fotoquímica de pigmentos fotossintéticos: avaliação estrutural e do ambiente

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Maria da Graça Nascimento, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Marta Elisa Rosso Dotto, Dr(a).
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ricardo Ferreira Affeldt, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em química.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Programa

Prof. Dr.(a) Adriana Passarella Gerola
Orientadora

Florianópolis, 02 de setembro de 2019.

Este trabalho é dedicado à minha mãe Eladir, que sempre me apoiou, aconselhou e incentivou. Obrigada por tudo, mãe! Te amo.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais Eladir e Ademar, e à minha irmã Larissa por todo o apoio que me deram até aqui, e por serem a minha base, sempre apoiando minhas escolhas.

Gostaria também de agradecer ao Professor Dr. Faruk Nome (*in memoriam*), pela oportunidade de ingressar no LACFI e pelo incentivo acadêmico, sua humildade com toda a certeza ficará marcada em todos os seus alunos para sempre. Agradeço muito à minha orientadora Professora Dra. Adriana Passarella Gerola por todo o ensinamento e atenção concedidos a mim durante estes meses de mestrado, nos momentos fáceis e difíceis. Sem ela nada disso teria sido possível, serei eternamente grata por isso!

Não poderia deixar de agradecer ao meu namorado Yuri, que sempre me incentivou a seguir em frente independente das condições. Também agradeço aos meus colegas do laboratório 203 e 312, pela amizade e por tornarem o ambiente de trabalho sempre agradável. Em especial, agradeço aos que estiveram mais próximos de mim nos últimos anos: Honorato, Bruno, Felipe, Larissa, Fernanda, Jhonatan e principalmente ao Paulo Fernando A. Costa pela contribuição neste trabalho, que foi muito importante.

Por fim, agradeço à UFSC, ao CNPQ e ao INCT-Catálise pela infraestrutura e pelo apoio financeiro.

“Ser um cientista é ser ingênuo, focamo-nos tanto na procura pela verdade, que não consideramos que poucos querem que a encontremos. Mas ela está sempre lá, quer vejamos ou não, escolhamos ou não. A verdade não se importa com o que queremos ou precisamos, não se importa com nossos governos, ideologias, religiões. Já temi o preço da verdade, mas agora apenas pergunto, qual o preço da mentira?”

Valery Alekseyevich Legasov, retirado da minissérie Chernobil.

RESUMO

Neste trabalho investigaram-se propriedades fotofísicas e fotoquímicas de pigmentos fotossintéticos metalados com Mg^{2+} (clorofila *a* – Chla e clorofila *b* – Chlb) e desmetalados (feofitina *a* – Pheoa e feofitina *b* –Pheob), em diferentes solventes próticos e apróticos. As propriedades espectroscópicas dos pigmentos foram dependentes das interações específicas com os solventes, como coordenação axial ao metal e formação de ligação hidrogênio com a clorofila. Destaca-se a importância das ligações hidrogênio para as clorofilas tipo b que apresentam um grupo –CHO ligado diretamente a parte cromofórica da molécula influenciando significativamente suas propriedades espectroscópicas. As propriedades fotofísicas dos pigmentos como rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e tempo de vida de fluorescência (τ_F) foram dependentes das estruturas das moléculas e das interações específicas com os meios. De maneira similar, o processo fotoquímico de fotobranqueamento foi influenciado pela estrutura dos pigmentos sendo que as feofitinas desmetaladas foram fotoestáveis, enquanto os rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}) das clorofilas metaladas foram maiores para as moléculas tipo b. Investigações do mecanismo de fotodegradação, usando agentes sequestrantes de espécies radicalares e de oxigênio singlete (1O_2), indicam que os fotoprocessos devem passar pela formação de espécies radicalares de oxigênio (EROS), enquanto não se observou uma relação direta da importância do 1O_2 para reações de foto-oxidação dos pigmentos. Adicionalmente, avaliaram-se possíveis sistemas fotoprotetores baseados em micelas de sulfobetaina (SB3-14) e plurônico (F-127) em uma abordagem simples para mimetizar membranas. Enquanto as micelas de F-127 atuaram como fotoprotetores, as micelas de SB3-14 aumentaram a fotorreatividade dos pigmentos. Estes fatos foram relacionados ao tipo e tamanho das micelas, que resultaram na incorporação das clorofilas em microambientes com diferentes polaridades e acessibilidades ao ambiente aquoso, de maneira que as diferentes fotorreatividades são consequência das interações específicas com os ambientes. Assim, a compreensão dos caminhos de fotodegradação e fotoproteção das Chls podem ser usadas como modelo para um entendimento mais profundo de clorofilas em plantas, e também para o planejamento de sistemas fotossintéticos estáveis frente a luz em ambientes aquosos.

Palavras-chave: fotofísica. fotoquímica. clorofilas. feofitinas.

ABSTRACT

In this study, we have investigated the photophysical and photochemical properties of photosynthetic pigments with Mg^{2+} ion as a central metal (chlorophyll *a* – Chl*a*, and chlorophyll *b* – Chl*b*) and without central metal (pheophytin *a* – *Pheo a*, and pheophytin *b* – *Pheo b*), in several solvents (protic and aprotic). Spectroscopic properties of the pigments were dependent on the specific interactions with the solvents, such as axial coordination to the metal and hydrogen bond with chlorophyll. We emphasized the significance of the hydrogen bond to the chlorophylls type *b*, that has a -CHO group directly bonded to the chromophoric part of the molecule, influencing in its spectroscopic properties. Photophysical properties of pigments such as quantum yields of fluorescence (Φ_F) and lifetime of fluorescence (τ_F) were dependent on the structure of the molecules and their specific interactions with the media. In a similar way, the photobleaching processes was related by the molecular structure of the pigments, and in this sense, pheophytins showed to be completely photostable, on the other hand the photobleaching quantum yields of the metal chlorophylls were higher to the chlorophylls type *b*. Investigations of the photobleaching mechanism, using sequestering agents of radical species of singlet oxygen (1O_2) have shown that the photoprocesses must form radical species of oxygen, while was not observed a direct relation to 1O_2 to the photooxidation reactions of the pigments. Additionally, we evaluated photoprotection systems based in sulfobetaine micelles (SB3-14) and Pluronic micelles (F-127) in a simple approach in order to mimic membranes. While F-127 micelles acted in photoprotection, the SB3-14 micelles increased the pigments photoreactivity. This behavior was related to the type and size of the micelles, as a result of the incorporation of chlorophylls in distinct microenvironments with different polarities and accessibility to the aqueous media, consistent with the fact that we have seen photoreactivities as a function of the specific interactions with the solvent environments. Furthermore, the comprehension of the photobleaching and photoprotection pathways of chlorophylls can be used as a model towards a deeper understanding of chlorophylls in plants, and also supports the development of light stable photosynthetic systems in aqueous media.

Keywords: photophysics. photochemistry. chlorophylls. pheophytins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Jablonski, esquema ilustrativo dos possíveis caminhos de desativação do estado excitado. Os processos radiativos estão representados por linhas retas e os não radiativos por linhas curvas.	20
Figura 2 – A: diagrama de energia potencial segundo o princípio de Franck-Condon. B: forma das bandas de absorção, onde a linha pontilhada representa a absorção em fase vapor, enquanto o espectro contínuo é esperado em solução.	21
Figura 3 - Estrutura da quinina, primeiro fluoróforo estudado.....	23
Figura 4 - Demonstração de relaxamento do solvente ao redor de um fluoróforo....	24
Figura 5 - Diagrama de Jablonski com relaxamento do solvente.	25
Figura 6 - À esquerda: vagalume emitindo bioluminescência, emissão de luz que ocorre a partir de uma reação química em organismos vivos. À direita: caminho principal básico até então elucidado para emissão de bioluminescência.....	26
Figura 7 - Dois exemplos de fotossensibilizadores, a acridina e a protoporfirina IX, com aplicação em terapia fotodinâmica.	29
Figura 8 - Diagrama de orbitais moleculares para o oxigênio no estado fundamental triplete ($^3\text{O}_2$) e estado excitado singlete ($^1\text{O}_2$).....	30
Figura 9 - Estrutura da porfirina (a), clorina (b) e bacterioclorina (c).	33
Figura 10 - Esquema estrutural das clorofilas (1-2) e feofitinas (3-4).	35
Figura 11 - Representação de um cloroplasto, evidenciando a localização das membranas tilacóides, onde ficam as clorofilas.	36
Figura 12 - Coordenação axial para o centro metálico da clorofila, podendo resultar em número de coordenação igual a 5 para um ligante, e 6 para dois ligantes.	38
Figura 13 - Separação energética entre os orbitais S_1 e T_1 com a coordenação do íon Mg^{+2} e para os demais íons.	40
Figura 14 - Estrutura do β -caroteno.....	43
Figura 15 - Modelo de estrutura da membrana celular vegetal, composto por uma bicamada fosfolipídica.....	44
Figura 16 - Estrutura do surfactante SB3-14, que dá origem à micelas de sulfobetaína zwitteriônicas, e leva este nome por conter 14 carbonos em sua cauda apolar.....	46
Figura 17 - Estrutura do surfactante F-127 ($\text{OE}_{106}\text{OP}_{70}\text{OE}_{106}$), que forma as micelas poliméricas.	46

Figura 18 - Ordem de eluição da coluna cromatográfica com coloração dos compostos, de onde foram obtidos β -caroteno, Pheoa, Chlb e Chla, nesta sequência. A Pheob foi obtida por via reacional.....	50
Figura 19 - Estrutura do feoforbídeo.....	51
Figura 20 - Espectro de absorção da clorofila a em solventes próticos (A) e apróticos (B). [Chla] = $3,7 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	56
Figura 21 - Espectro de emissão de fluorescência da clorofila a nos solventes polares próticos (A) e apróticos (B), $\lambda_{exc} = 411$ nm, a 25 °C, [Chla] = 5×10^{-7} mol L ⁻¹	57
Figura 22 - Espectro de absorção da clorofila b em solventes próticos (A) e apróticos (B). [Chlb] = $3,6 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	58
Figura 23 - Espectro de emissão de fluorescência da clorofila b em solventes próticos (A) e apróticos (B), $\lambda_{exc} = 411$ nm, a 25 °C, [Chlb] = 5×10^{-7} mol L ⁻¹	58
Figura 24 - Sobreposição dos espectros de absorção e emissão de fluorescência de Chla em acetona. [Chla _{ABSORÇÃO}] = $3,7 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹ e [Chla _{EMISSÃO}] = 5×10^{-7} mol L ⁻¹	60
Figura 25 – Variação nos deslocamento de Stokes dos pigmentos em função do parâmetro π^* de Kamlet-Taft para solventes polares próticos (A) e apróticos (B).	63
Figura 26 – Perfil de decaimento de fluorescência para a Pheoa em ACN e resíduo do ajuste cinético de 1ª ordem.	66
Figura 27 – Sobreposição dos espectros de absorção dos pigmentos em acetonitrila com o espectro de emissão do LASER ($\lambda_{max} = 660$ nm, P = 100 mW).	67
Figura 28 - Espectros de absorção eletrônica da Chla e cinética de fotobranqueamento, em acetonitrila (A) e tolueno (B), na faixa de comprimento de onda de 400-800 nm.	69
Figura 29 - Correlação entre as constantes dielétricas dos solventes e os valores de Φ_{FB} da Chla (A) e Chlb (B).	71
Figura 30 - Cinéticas de fotodegradação da Chla com e sem o borbulhamento de N _{2(g)}	72
Figura 31 - Espectros de absorção eletrônica (A) e de emissão de fluorescência (B) da Chla nos meios micelares SB3-14 e F-127, e em dois solventes de comparação, etanol e tolueno.....	74

Figura 32 - Representação da molécula de clorofila na micela zwitteriônica de SB3-14 (à esquerda) e no interior da micela polimérica de F-127 (à direita). (COSTA, 2019; NOME, 2011)75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comprimentos de onda máximos de absorção e coeficientes de absorção molar em etanol, para as clorofilas (Chl) a e b, e para as Feofitinas (Pheo) a e b. ...	38
Tabela 2 – Valores de constante dielétrica e índice de refração dos solventes da literatura (Fonte: Sigma-Aldrich), associados aos valores dos deslocamentos de Stokes calculados para os pigmentos.	61
Tabela 3 - Parâmetros de Kamlet-Taft para os diferentes solventes (REICHARDT, 2003).	61
Tabela 4 - Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para os quatro pigmentos em diferentes solventes, a 25 °C e λ_{exc} = 411 nm.	64
Tabela 5 - Correlação entre Φ_F e o parâmetro π^* para os pigmentos Chla, Chlb, Pheoa e Pheob.	65
Tabela 6 - Tempos de vida de fluorescência (τ_F) para Chla e Chlb.	66
Tabela 7 - Tempos de vida de fluorescência (τ_F) para Pheoa e Pheob.	67
Tabela 8 - Constantes de velocidade (k_{FB}) da banda Q para Chla e Chlb.	68
Tabela 9 - Constantes de velocidade (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}) para os pigmentos metalados Chla e Chlb em acetonitrila, sob borbulhamento de $N_{2(g)}$	73
Tabela 10 – Propriedades fotofísicas e fotoquímicas obtidas experimentalmente para Chla e Chlb nos sistemas micelares de SB3-14 e F-127.	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS
(em ordem alfabética)

Chla: clorofila a

Chlb: clorofila b

Chls: clorofilas

CI: conversão interna

CIS: cruzamento intersistema

CMC: concentração micelar crítica

¹Chl₀: clorofila no estado fundamental singlete

³Chl: clorofila no estado excitado triplete

C₄: simetria de grupo de ponto

D_{4h}: simetria de grupo de ponto

DNA: ácido desoxirribonucleico (em tradução literal do inglês “*deoxyribonucleic acid*”)

ε: coeficiente de absorvidade molar

E: energia

EL: estado excitado local

F-127: copolímero plurorônico

HOMO: orbital molecular ocupado de maior energia (em tradução literal do inglês “*highest occupied molecular orbital*”)

IRF: função de resposta do instrumento (em tradução literal do inglês “*instrument response function*”)

LUMO: orbital molecular desocupado de menor energia (em tradução literal do inglês “*lowest unoccupied molecular orbital*”)

L1: indica uma molécula de solvente coordenada ao centro metálico

L1H: indica uma molécula de solvente coordenada ao centro metálico e uma ligação de hidrogênio

L2H: indica duas moléculas de solvente coordenadas ao centro metálico e uma ligação de hidrogênio

NC: número de coordenação

¹O₂: oxigênio singlete

³O₂: oxigênio triplete

P: potência

Pheoa: feofitina a

Pheob: feofitina b

Pheos: feofitinas

S: estado singlete

S₀: estado fundamental singlete

S₁: primeiro estado excitado singlete

S₂: segundo estado excitado singlete

³S: sensibilizador no estado triplete

SB: sulfobetaínas

SB3-14: 3-(N,N-dimetilmiristilamônio) propanosulfonato

T: estado triplete

T₁: primeiro estado excitado triplete

TCI: transferência de carga interna

UV-B: radiação ultravioleta do tipo B

UV-C: radiação ultravioleta do tipo C

UV-vis: ultravioleta-visível

λ: comprimento de onda

Φ: rendimento quântico de um fotoprocesso

τ: tempo de vida de um fotoprocesso

Φ_Δ: rendimento quântico de oxigênio singlete

Φ_F: rendimento quântico de fluorescência

τ_F: tempo de vida de fluorescência

Φ_{FB}: rendimento quântico de fotobranqueamento

Φ_P: rendimento quântico de fluorescência do composto padrão

Φ_T: rendimento quântico de estado triplete

Δν: deslocamento de Stokes

μ_E: momento de dipolo no estado excitado

μ_G: momento de dipolo no estado fundamental

¹Δ_g: notação de simetria espectroscópica de oxigênio singlete

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
1.1 Processos fotofísicos	19
1.1.1 Efeito dos solventes nos processos fotofísicos	22
1.2 Processos fotoquímicos	26
1.2.1 Reações de fotobranqueamento	28
a) Mecanismo tipo I	30
b) Mecanismo tipo II	31
1.2.1.1 Porfirinas: propriedades e fotobranqueamento	32
1.2.1.2 Clorofilas (Chl) e feofitinas (Pheo): propriedades e fotobranqueamento	34
1.2.2 Fotoproteção	42
1.3 Surfactantes, micelas e membrana vegetal	44
2. OBJETIVOS	46
2.1 Objetivos gerais	48
2.2 Objetivos específicos e Estratégias	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1 Reagentes	49
3.2 Métodos	49
3.2.1 Extração e separação cromatográfica dos pigmentos metalados e não metalados	
49	
3.2.3 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) e cálculos de Deslocamento de Stokes	51
3.2.4 Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_F)	53
3.2.5 Determinação de rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB}).....	53
3.2.6 Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio nos mecanismos de fotodegradação através do borbulhamento de nitrogênio	54
3.2.7 Fotoproteção das clorofilas em modelos biomiméticos de membrana simples	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
4.1 Efeitos da solvatação específica dos pigmentos fotossintéticos nos espectros de absorção eletrônica e de emissão de fluorescência	55
4.2 Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)	63
4.2.1 Tempo de vida de fluorescência (τ).....	65

4.3 Rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}).....	67
4.3.1 Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio nos mecanismos de fotodegração através do borbulhamento de nitrogênio	71
4.4 Fotoproteção das clorofilas em modelos biomiméticos de membrana simples	
73	
5. CONCLUSÕES	78
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE.....	85

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Essenciais para a continuidade da vida, as clorofilas são pigmentos de cor verde intensa encontrados em folhas de plantas, e são responsáveis pela captura de aproximadamente $2,5 \times 10^{21}$ J de energia solar por ano, e sua conversão em energia química. Dentre os tipos mais abundantes de clorofilas existentes estão a clorofila *a* e a clorofila *b*, contendo um íon magnésio (Mg^{2+}) como átomo central, sendo diferenciadas apenas pelo substituinte metil no primeiro caso, e pelo substituinte -CHO no segundo (FIEDOR, 2017).

No aparato fotossintético, a conversão de energia fotossintética compete com a formação de clorofila no estado triplete, via conversão intersistema, e de espécies reativas de oxigênio que podem causar danos ao sistema. Entretanto, estes sistemas possuem mecanismos fotoprotetivos que minimizam os processos danosos. Estudos recentes têm avaliado efeitos relacionados à estrutura dos pigmentos com propriedades fotofísicas e fotoquímicas, como rendimentos quânticos de fluorescência e de fotobranqueamento, e tempo de vida no estado excitado (FIEDOR, 2017). Dentre eles, pode-se destacar o efeito do íon metálico central, que foi avaliado por Fiedor e colaboradores (FIEDOR, 2017), e relaciona a maior estabilidade das clorofilas metaladas com Mg^{2+} como uma escolha da natureza no mecanismo de fotoproteção intrínseca. Esta fotoproteção é associada a menor capacidade de gerar oxigênio singlete em relação às clorofilas metaladas com outros íons metálicos como o Zn^{2+} . Destaca-se que esta possibilidade foi suposta pelos autores e não foi avaliada experimentalmente. Ainda quando se fala da fotoestabilidade das clorofilas do tipo *b* pouquíssimas informações são disponibilizadas na literatura (COSTA, 2019).

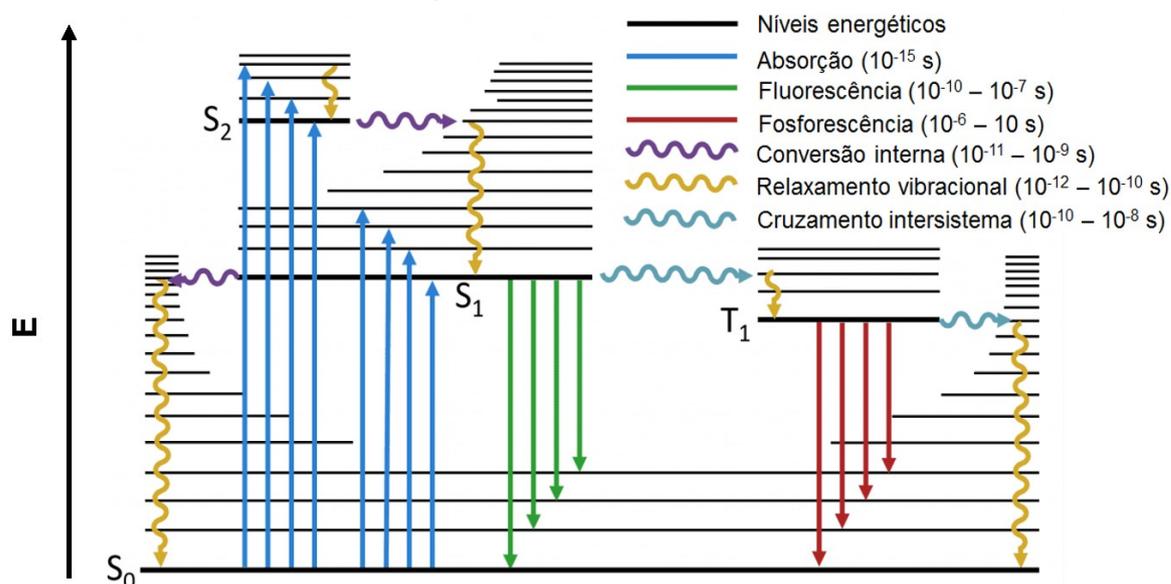
Assim, o entendimento do comportamento das clorofilas com estruturas distintas frente a reações induzidas por luz é de grande interesse, assim como avaliar o comportamento de clorofilas em diferentes meios. Tendo a natureza como fonte de inspiração, busca-se o desenvolvimento de sistemas de fotoproteção para os pigmentos fotossintéticos, baseados em micelas como modelo simples de membrana, visando a aplicação destes em ambientes aquosos. Para isso, propõe-se a investigação dos caminhos de fotobranqueamento das clorofilas com diferentes estruturas em solventes próticos e apróticos, avaliando-se a importância das interações específicas dos pigmentos com os meios, e relacionando-se com as propriedades fotofísicas das diferentes moléculas.

1.1 Processos fotofísicos

A base dos processos fotofísicos consiste da absorção de fótons por uma molécula. Esta interação provoca a promoção dos elétrons do estado fundamental para estados eletronicamente excitados da espécie absorvente. Os estados excitados formados encontram-se dotados de excesso de energia, que é perdida rapidamente através de uma variedade de processos de desativação. A molécula pode retornar ao estado fundamental via transições radiativas e não radiativas, que são processos intramoleculares. As transições radiativas são aquelas que envolvem emissão de radiação eletromagnética (fótons) como resultado do processo de desativação, e compreendem os processos de fluorescência e fosforescência. Por outro lado, as transições não radiativas não levam a emissão de fótons, e são conhecidas como conversão interna (CI) e cruzamento intersistema (CIS). É importante citar que processos intermoleculares também podem contribuir para a desativação da molécula excitada, sendo eles relaxamento vibracional, transferência de energia e transferência de elétron. (WARDLE, 2009)

O diagrama de Jablonski (**Figura 1**) é uma representação esquemática muito utilizada para os processos intramoleculares que ocorrem durante a excitação e desativação. Nele, estão representados os estados S_0 , S_1 e S_2 , que correspondem respectivamente ao estado fundamental singlete excitado, primeiro estado singlete excitado e segundo estado singlete excitado. Associados aos estados eletrônicos podem ainda haver variados níveis energéticos vibracionais, que são descritos pelos números 0,1,2, etc. Sabe-se que a promoção de um elétron do estado fundamental para um estado excitado é uma transição vertical muito rápida que leva cerca de 10^{-15} s. Levando-se em consideração o que diz a aproximação de Born-Oppenheimer, que a velocidade de movimentação de elétrons é muito maior que a velocidade do núcleo, por possuírem uma massa muito menor, tem-se o chamado princípio de Franck-Condon, que estabelece que uma transição eletrônica é mais provável de acontecer sem mudanças na posição do núcleo, ou seja, as transições são verticais.

Figura 1 - Diagrama de Jablonski, esquema ilustrativo dos possíveis caminhos de desativação do estado excitado. Os processos radiativos estão representados por linhas retas e os não radiativos por linhas curvas.



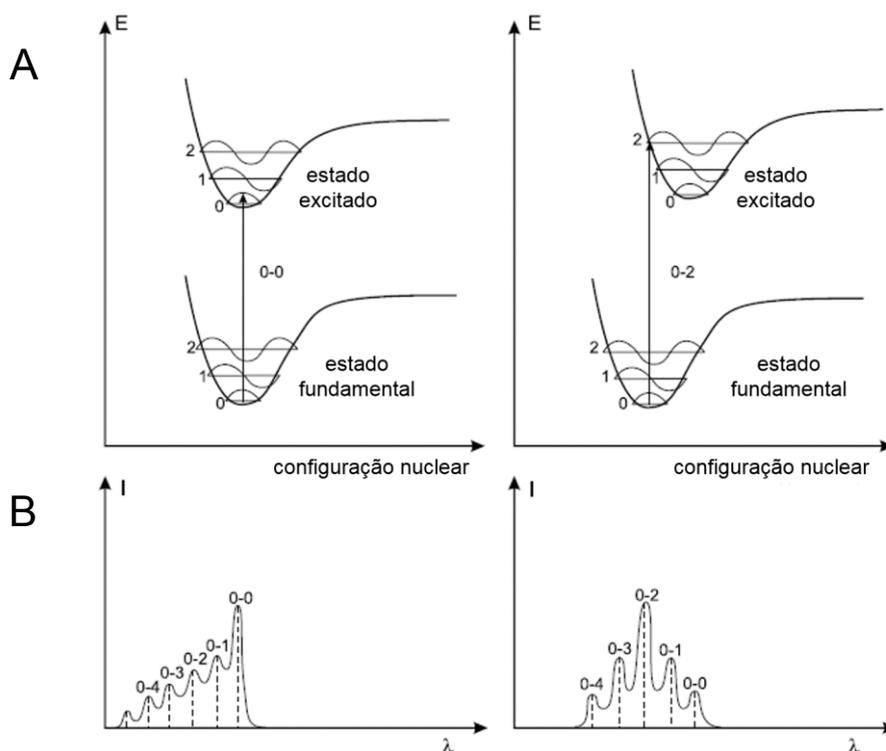
Fonte: Adaptado de Lakowicz (2006).

Ao absorver um fóton, a molécula pode ser excitada para os níveis vibracionais mais altos em energia do estado S₁ ou do estado S₂, e de forma muito rápida ela retorna ao nível vibracional de menor energia do estado S₁ através de conversão interna (CI), que é uma transição não radiativa entre dois estados que possuem a mesma multiplicidade de spin. Por ser um dos processos de desativação mais rápidos, ocorrendo em 10⁻¹¹ s ou menos, geralmente se completa antes dos demais. Agora, o caminho de desativação de S₁ para S₀ também pode se dar através da CI, mas aqui a desativação é menos eficiente, pois a diferença de energia para esta transição é muito maior que para a anterior. Desta forma, ocorre uma competição de processos de desativação de S₁ → S₀, entre CI, emissão de fluorescência e conversão intersistema, que consiste numa mudança do spin para o estado tripleto T₁. Por sua vez o estado tripleto pode ser desativado por emissão de fosforescência ou CI. (LAKOWICZ, 2006)

A **Figura 2A** mostra o diagrama de energia em que curvas de energia potencial representam os estados eletrônicos, e as transições são verticais. À temperatura ambiente, a maior parte das moléculas encontra-se no nível vibracional mais baixo do estado fundamental. Por esta razão, a transição eletrônica mais comum é a 0-0. Em adição a transição eletrônica “pura” 0-0, existem uma série de transições vibrônicas

cujas intensidades dependem da posição relativa e forma da curva de energia potencial, como é representado na **Figura 2B**. (VALEUR, 2002; BALZANI, 2014)

Figura 2 – A: diagrama de energia potencial segundo o princípio de Franck-Condon. B: forma das bandas de absorção, onde a linha pontilhada representa a absorção em fase vapor, enquanto o espectro contínuo é esperado em solução.



Fonte: Adaptado de Valeur (2002).

A emissão de fluorescência é um processo caracterizado pela emissão de um fóton por um estado singlete excitado onde os elétrons do HOMO e do LUMO possuem orientação de spins opostas, ou seja, se encontram pareados. Desta forma, o retorno ao estado fundamental é permitido por spin, e ocorre de forma rápida em uma escala de aproximadamente 10^{-8} s. Salvo exceções, a emissão de fluorescência ocorre a partir do estado S_1 , assim suas principais características não estão intimamente relacionadas ao comprimento de onda de excitação. O diagrama de Jablonski também mostra que a energia da emissão é geralmente menor que a energia da absorção. Esta perda de energia tem origem no decaimento rápido que ocorre para o menor nível vibracional de S_1 , logo após a absorção (relaxamento vibracional). A maneira utilizada para quantificar e analisar esta perda de energia é o deslocamento de Stokes (número de onda), que representa a diferença de energia

entre o comprimento de onda máximo da primeira banda de absorção e o comprimento de onda máximo de emissão. (VALEUR, 2002) O deslocamento de Stokes ainda pode ser influenciado por efeitos do solvente, formação de complexos, transferência de energia e reações no estado excitado. (LAKOWICZ, 2006)

Uma terceira alternativa de desativação do estado S_1 é o cruzamento intersistema, transição não radiativa que ocorre entre níveis energéticos que possuem mesma energia e diferente multiplicidade. Tal cruzamento é, em princípio proibido, mas pode tornar-se possível por causa do acoplamento spin-órbita (acoplamento entre o momento magnético de spin e o momento magnético orbital). Por consequência deste acoplamento, uma função de onda para um estado singlete sempre possui uma pequena fração de uma função de onda triplete, e vice-versa, tornando possível a transição mencionada. O cruzamento intersistema é favorecido pela presença de átomos pesados, pois eles aumentam a eficiência do acoplamento spin-órbita, que passa a competir com os outros processos de desativação de S_1 (conversão interna e fluorescência), pois ocorre numa escala de $10^{-10} - 10^{-8}$ s. A desativação radiativa a partir do estado triplete se trata de uma transição $T_1 \rightarrow S_0$, chamada de fosforescência, que é uma transição lenta devido a proibição por spin. (VALEUR, 2002)

1.1.1 Efeito dos solventes nos processos fotofísicos

Conforme discutido, analisar o comportamento de uma molécula através de seu espectro de emissão é fundamental para entender seu comportamento após a absorção de radiação eletromagnética, de onde podem ser obtidos dados para o cálculo de parâmetros como o deslocamento de Stokes, que é fundamental para entender perdas de energia após excitação. (VALEUR, 2002)

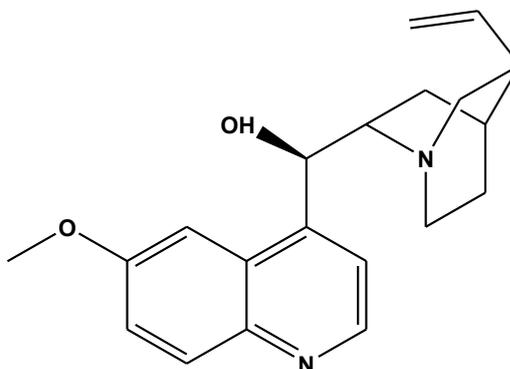
Espectros de emissão frequentemente sofrem efeitos em suas propriedades, intensidades e comprimentos de onda, com base no ambiente local em que a molécula se encontra, principalmente com relação a polaridade do solvente. Compostos são denominados solvatocrômicos quando a posição das bandas do seu espectro de emissão ou absorção dependem da polaridade do solvente. Um deslocamento para maiores comprimentos de onda (vermelho) é chamado deslocamento batocrômico, e para menores comprimentos de onda (azul) deslocamento hipsocrômico. Os efeitos causados pela polaridade são, inclusive, uma das origens do deslocamento de Stokes.

Além deste, outros efeitos podem afetar os espectros de emissão e rendimentos quânticos, dentre eles: (VALEUR, 2002)

- viscosidade do solvente;
 - taxa de relaxamento do solvente;
 - rigidez do ambiente local;
 - transferência de carga interna
 - transferência de próton e reações no estado excitado;
 - mudanças nas taxas de decaimento radiativo e não radiativo, entre outros.
- (LAKOWICZ, 2006)

Espécies químicas que emite fluorescência como um dos possíveis caminhos de desativação do estado excitado caracterizam-se como fluoróforos. Em geral, o fenômeno ocorre com frequência em compostos que possuem estrutura aromática, como por exemplo a fluoresceína, a rodamina e a quinina. Esta última, cuja estrutura se encontra na **Figura 3**, encontrada na água tônica, foi o primeiro fluoróforo a ser estudado e responsável pelo desenvolvimento dos primeiros espectrofluorímetros. (VALEUR, 2002)

Figura 3 - Estrutura da quinina, primeiro fluoróforo estudado.

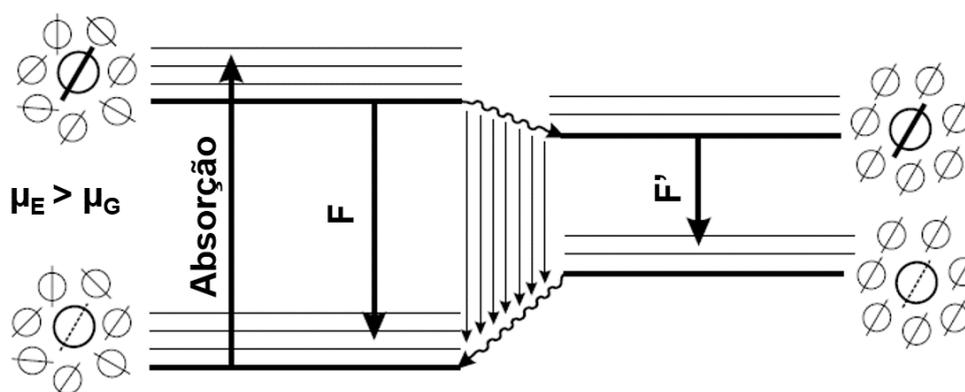


Considerando o espectro de fluorescência, sabe-se que o comprimento de onda de emissão de um fluoróforo (espécie que emite fluorescência como um dos possíveis caminhos de desativação) é em geral, maior que o de absorção. Isso ocorre pelo excesso de energia vibracional que é perdida para as moléculas de solvente, através de conversão interna. Os efeitos dos solventes deslocam a emissão para uma energia ainda menor, pois atuam na estabilização do estado excitado através de moléculas de solvente polares. (LAKOWICZ, 2006)

Um fluoróforo apresenta um momento de dipolo no estado fundamental, descrito por μ_G , e após a excitação apresenta um segundo momento de dipolo, μ_E , maior que o inicial. O dipolo do solvente pode relaxar – ou seja, reorientar-se - ao redor de μ_E , diminuindo a energia do estado excitado (**Figura 4**). Desta forma, enquanto que a polaridade do solvente aumenta, maior é a estabilização causada pelo mesmo, o que reduz a energia do estado excitado, deslocando o espectro para maiores comprimentos de onda. Como os tempos de vida de fluorescência são muito maiores que o necessário para o relaxamento do solvente (10 - 100 ps), considera-se sempre o estado relaxado dos solventes. (VALEUR, 2002)

O espectro de absorção de um fluoróforo é menos sensível a polaridade do solvente do que o de emissão, e isto é facilmente explicável analisando o tempo demandado por cada um dos processos. A absorção de um fóton é um processo muito rápido, e ocorre numa escala de 10^{-15} s, não havendo tempo suficiente para movimentação do fluoróforo ou do solvente. Assim, tanto o estado fundamental quanto o excitado experimentam o mesmo ambiente durante a absorção. Por outro lado, durante a emissão o fluoróforo é exposto a um ambiente relaxado, com moléculas de solvente orientadas ao redor do momento de dipolo de seu estado excitado. (LAKOWICZ, 2006)

Figura 4 - Demonstração de relaxamento do solvente ao redor de um fluoróforo.



Fonte: Adaptado de Valeur (2002).

As interações entre solvente e fluoróforo afetam a diferença de energia entre o estado fundamental e o excitado, e desta forma o diagrama de Jablonski para efeitos dos solventes deve retratar as possibilidades de redução da energia do estado excitado por ação dos solventes, como mostra a **Figura 5**. Duas teorias são utilizadas

polares torna-se o estado de menor energia. Em casos como este, na presença de solventes apolares, o estado de menor energia geralmente é do chamado estado excitado local (EL), sem separação de cargas. Assim, o papel da polaridade não é apenas reduzir a energia do estado excitado via efeitos gerais de solventes, mas também regular qual estado tem a mais baixa energia. (LAKOWICZ, 2006)

A análise de espectros de uma mesma molécula em diferentes solventes pode levar a descoberta de interações específicas. Isto porque existe uma diferença substancial entre os dois efeitos aqui descritos. Para uma molécula em um solvente apolar, adicionando-se pequenas alíquotas de um solvente polar, observa-se deslocamento do comprimento de onda máximo de emissão que acompanha a adição de solvente. Ou seja, conforme a adição de solvente polar muda as características do ambiente, há deslocamento espectral. Portanto, quem governa este efeito é a polaridade do meio, tratando-se de efeitos gerais de solventes. Em contraste, quando se fala de efeitos específicos de solventes, uma quantidade muito pequena de solvente polar causa um deslocamento espectral substancial, e após adição de mais polaridade não há deslocamento de valor significativo. Esta pequena alíquota de solvente polar não é capaz de alterar as características do meio como um todo, e o efeito se deve a interações específicas. (LAKOWICZ, 2006)

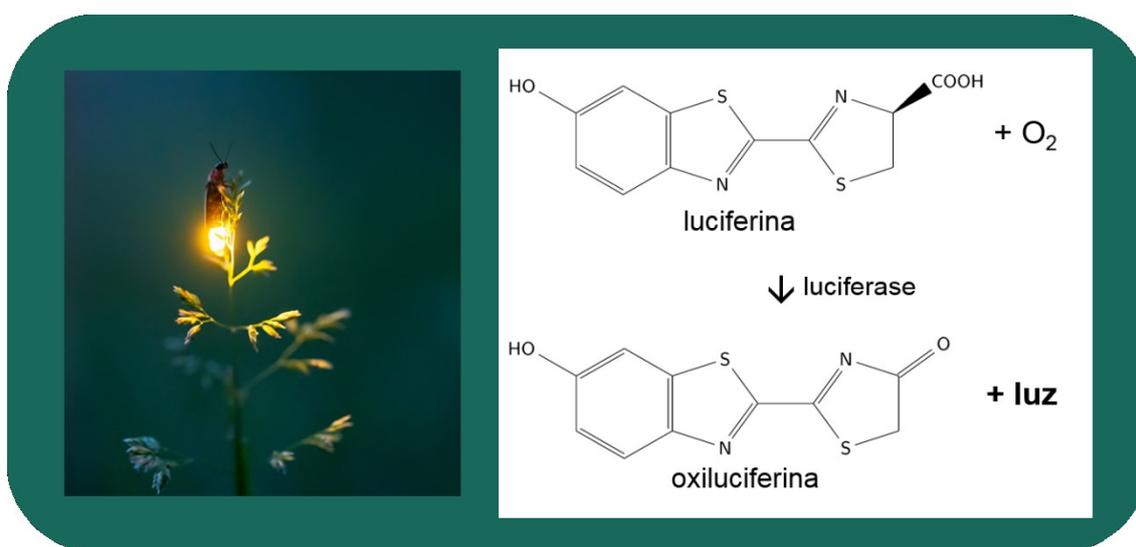
1.2 Processos fotoquímicos

Os processos fotoquímicos relacionam-se com as com reações químicas que são induzidas pela absorção da luz. Uma molécula eletronicamente excitada possui um tempo de vida finito, e suas propriedades físicas e químicas diferem daquelas no estado fundamental. (ROHATGI-MUKHERJEE, 1992; BURDZINSKI, 2006) Em distinção aos processos fotofísicos, que levam a regeneração da mesma espécie química que existia antes da excitação, provocando apenas mudanças em energia e estrutura eletrônica, os processos fotoquímicos produzem novas moléculas.

Processos fotoquímicos muitas vezes são seguidos por reações químicas que ocorrem sem a presença de luz, e que são denominadas reações térmicas ou “reações escuras”. (COYLE, 1989) Reações escuras também podem produzir luminescência. Um formidável exemplo disto se encontra no campo da bioluminescência, que consiste na emissão de luz visível por organismos luminescentes, através de uma reação química que consiste na oxidação de uma luciferina, via enzima luciferase

(Figura 6). Bioluminescência pode ser encontrada em diversos organismos, como vagalumes, lulas, bactérias, fungos entre outros. (RAMESH, 2015)

Figura 6 - À esquerda: vagalume emitindo bioluminescência, emissão de luz que ocorre a partir de uma reação química em organismos vivos. À direita: caminho principal básico até então elucidado para emissão de bioluminescência.



Fonte: Adaptado de Ramesh (2015).

Durante o século XIX mudanças fotoquímicas, como a fotossíntese em plantas, começaram a ser estudadas qualitativamente. As primeiras abordagens quantitativas foram utilizadas para construir a primeira lei da fotoquímica, também conhecida como princípio da ativação fotoquímica ou lei de Grotthus-Draper, que diz que “*apenas aquela luz que é absorvida por um sistema pode causar alteração química*”. (ROHATGI-MUKHERJEE, 1992)

A lei de Lambert-Beer (Equação 1) é utilizada como forma de determinar a probabilidade de absorção, e mostra que a fração de radiação que é absorvida por um meio transparente é independente da intensidade da radiação incidente, e que cada camada do meio absorve a mesma fração desta radiação. A lei de Beer ainda estabelece que a quantidade de radiação absorvida é dependente do número de moléculas absorventes, ou seja, de sua concentração. (ROHATGI-MUKHERJEE, 1978)

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon cl \quad (1)$$

onde:

I_0 e I : intensidade de luz incidente e transmitida, respectivamente. $\log I_0/I$ é a absorvância (A);

ϵ : coeficiente de absorvidade molar, $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$;

c : concentração da espécie absorvente, $mol \cdot L^{-1}$;

l : caminho ótico da cubeta, cm .

A segunda lei, enunciada por Stark e Einstein, diz que para cada fóton de luz que é absorvido apenas uma molécula é ativada para uma reação fotoquímica. Isto é verdadeiro para a maioria dos processos, entretanto muitas exceções ocorrem quando fontes de luz intensa são utilizadas, havendo a possibilidade de ocorrer absorção subsequente de dois ou mais fótons. (COYLE, 1989)

Moléculas que absorvem fótons tornam-se fisicamente excitadas, o que não significa necessariamente tornar-se quimicamente ativas. Uma molécula excitada pode perder energia através de caminhos não químicos, ou desencadear reações térmicas. Para quantificar a eficiência de uma reação fotoquímica, pode-se calcular o rendimento quântico (Φ) da reação. Este conceito de rendimento pode ser expandido para qualquer ato, seja ele físico ou químico, que segue a absorção de um fóton.

Sendo assim, a Equação 2 representa a fórmula geral para cálculo de rendimento de processos fotofísicos e fotoquímicos. (ROHATGI-MUKHERJEE, 1992; BURDZINSKI, 2006)

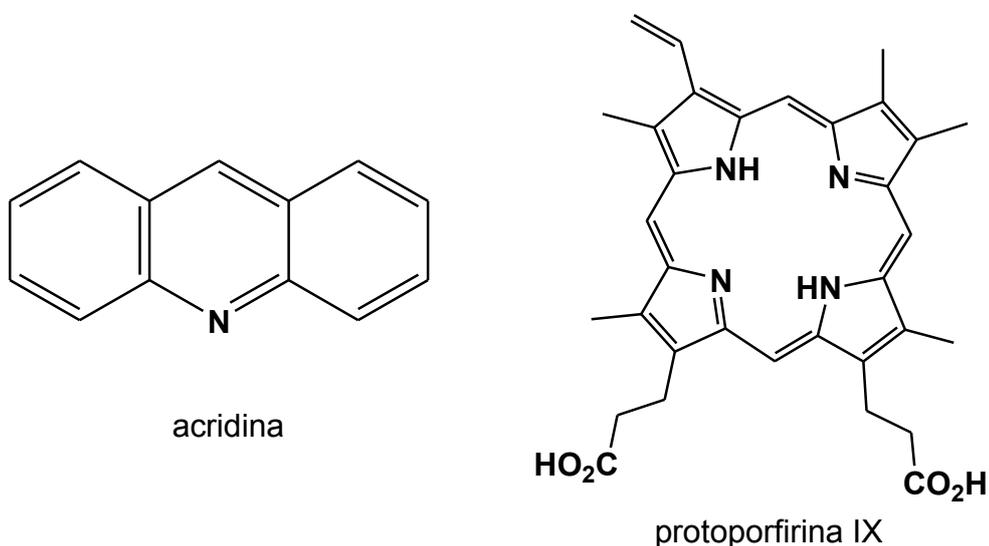
$$\Phi_{PROCESSO} = \frac{\text{número de moléculas que sofrem o processo}}{\text{número de fótons absorvidos}} \quad (2)$$

1.2.1 Reações de fotobranqueamento

Quando os compostos orgânicos absorvem radiação na região do ultravioleta e do visível, estes adquirem energia suficiente para quebrar ligações na própria molécula. Em outras palavras, os compostos orgânicos podem participar de processos fotoquímicos que levem a sua própria decomposição ou a decomposição de outra espécie presente no meio. Esta decomposição, acompanhada pela redução da intensidade de fluorescência ou pela diminuição da absorvância, também é denominada fotobranqueamento. Nas reações de fotobranqueamento, dois caminhos devem ser levados em consideração quando avalia-se o potencial de um determinado composto em sofrer fotodegradação: i) fotodegradação direta, quando a molécula que

absorve a radiação sofre as reações fotoquímicas; e ii) a decomposição fotossensibilizada, que tem início a partir de outra substância absorvedora presente no meio. No caso em que a reação é fotossensibilizada, o componente absorvente é nomeado fotossensibilizador. Um fotossensibilizador pode transferir completamente a energia absorvida e não se alterar, embora seja mais provável que sofra degradação. (MOORE, 2003) Na **Figura 7** encontram-se exemplos de fotossensibilizadores amplamente utilizados, neste caso em terapia fotodinâmica, sendo eles a acridina e a protoporfirina IX.

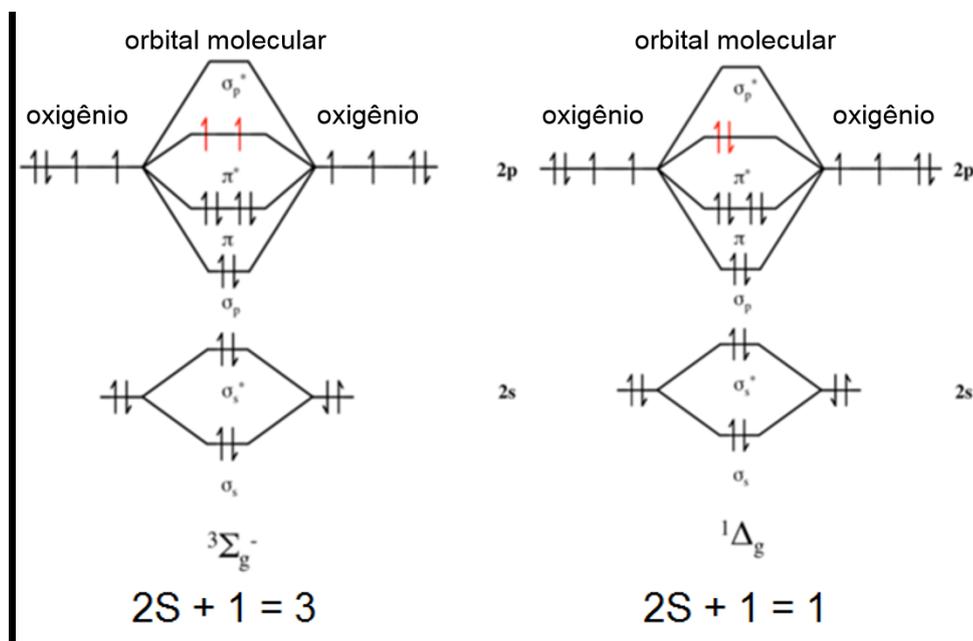
Figura 7 - Dois exemplos de fotossensibilizadores, a acridina e a protoporfirina IX, com aplicação em terapia fotodinâmica.



Em geral, as reações fotoquímicas são complexas e percorrem uma série de caminhos competitivos. É comum que reações fotossensibilizadas sejam mediadas pelo estado triplete excitado da molécula, em função do seu longo tempo de vida e de seus elétrons com spins desemparelhados. Grande parte das reações envolve o consumo de oxigênio molecular, pois ele também se encontra no estado triplete ($^3\text{O}_2$) quando no estado fundamental, assim como mostram os diagramas de orbitais moleculares para o oxigênio, na **Figura 8**, em que a multiplicidade de spin para o estado fundamental do oxigênio é igual a 3. Desta maneira, a transferência de energia do fotossensibilizador triplete para o oxigênio no estado triplete é permitida por spin. Nestes casos, pode-se nomear as reações como fotooxidações sensibilizadas. (SPIKES, 1977) Há dois mecanismos oxidativos que levam ao fotobranqueamento de

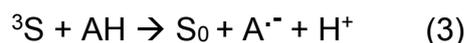
compostos, o primeiro envolvendo a formação de radicais livres (Tipo I), e o segundo a geração de oxigênio singlete, $^1\text{O}_2$, (Tipo II). (MOORE, 2003)

Figura 8 - Diagrama de orbitais moleculares para o oxigênio no estado fundamental triplete ($^3\text{O}_2$) e estado excitado singlete ($^1\text{O}_2$).



a) Mecanismo tipo I

Um sensibilizador no estado tripleto excitado, ^3S , pode reagir diretamente com algumas moléculas de substrato, AH, com transferência de elétrons ou prótons, como mostra a Equação 3. Estes processos são dependentes da polaridade do meio. O cátion ou radical neutro formado pode sofrer reações de recombinação na ausência de oxigênio, mas quando este está disponível, ocorre rápida adição de oxigênio molecular ao radical (Equação 4). (SPIKES, 1977)

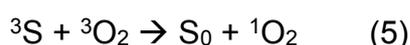


O radical peróxido formado, AO_2 , também é reativo e irá procurar estabilidade através da abstração de um próton das outras moléculas. Esta sequência pode se propagar através de uma reação em cadeia, já que os radicais livres são considerados espécies extremamente reativas. Apesar disto, é um processo que requer um

substrato altamente reativo. O mecanismo de reação em cadeia é dito autocatalítico, pois inicia-se em uma velocidade lenta, mas a velocidade se torna maior conforme a reação se procede. Ele é dividido em três etapas para a formação de radicais livres, iniciação, propagação e terminação, sendo a segunda a etapa de maior velocidade. Conforme a concentração de moléculas oxidáveis na solução diminui, a velocidade da reação também diminui. Pode-se inibir o processo de reação em cadeia através da adição de sequestradores de radicais livres, que reagem mais rapidamente do que a etapa de propagação. (MOORE, 2003)

b) Mecanismo tipo II

O mais comum dos mecanismos é o tipo II, que envolve uma transferência de energia do estado tripleto excitado do fotossensibilizador para o estado tripleto fundamental do oxigênio molecular, cujos spins tem multiplicidade compatível, gerando oxigênio molecular no estado singlete excitado, e regeneração do fotossensibilizador (Equação 5). Ambos os estados singlete e tripleto do sensibilizador foram avaliados como capazes de produzir a espécie de $^1\text{O}_2$, mas o estado excitado tripleto tem preferência por conta de se tratar de uma transição permitida. (MOORE, 2003)



Há dois tipos de oxigênios singlete com diferentes notações de simetria espectroscópica, e aquele que possui maior tempo de vida, $^1\Delta_g$, aparenta ser a espécie principal envolvida nas reações fotoquímicas. O tempo de vida de $^1\text{O}_2$ é altamente dependente do solvente, bem como da presença de espécies sequestradoras e de aceptores oxidáveis. A reatividade da espécie de oxigênio singlete é muito maior do que a reatividade do oxigênio tripleto, isto porque o oxigênio singlete tem o mesmo spin de uma vasta quantidade de moléculas no estado fundamental singlete, de maneira que os processos de foto-oxidação são permitidos por spin (Equação 6). Desta forma, o $^1\text{O}_2$ é capaz de oxidar até mesmo componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos. Deve-se enfatizar que o processo de fotooxidação pode proceder simultaneamente pelos dois caminhos, envolvendo reações complexas. (SPIKES, 1977)



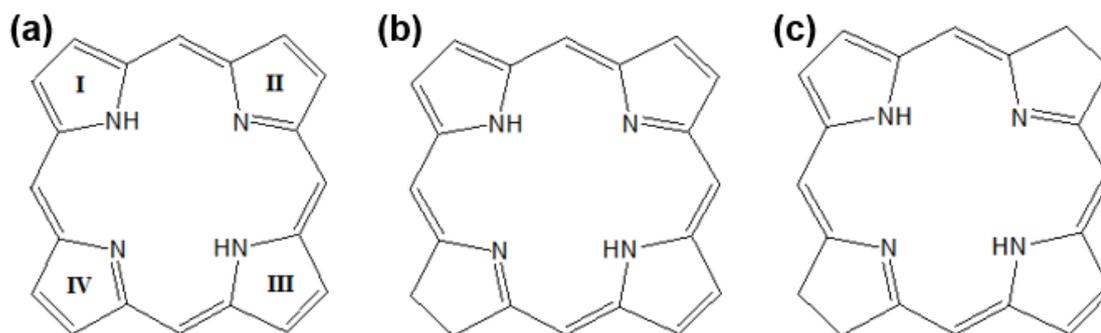
Existem dois tipos de fotobranqueamento irreversíveis no que se refere a mudanças no cromóforo: (i) fotomodificação, onde ocorre perda de absorbância, mas o cromóforo é mantido em uma forma modificada e (ii) fotobranqueamento verdadeiro, onde ocorrem modificações químicas profundas, resultando em pequenos fragmentos que já não apresentam absorção na região do visível. (BONNETT, 2001)

1.2.1.1 Porfirinas: propriedades e fotobranqueamento

As porfirinas são uma classe de compostos amplamente estudadas como fotossensibilizadores para diferentes aplicações. Esta classe inclui toda a variedade de tetrapirróis cíclicos e inteiramente conjugados, que confere forte absorção na região do visível ($\lambda_{\text{MAX}} = 400 - 425 \text{ nm}$). Todas as subclasses se referem aos estados de oxidação da porfirina, sendo que quando um ou dois anéis pirrólicos são reduzidos, tem-se a formação das clorinas e bacterioclorinas, respectivamente (**Figura 9b e 9c**).

Em geral, estudos cinéticos de fotobranqueamento de porfirinas mostram que estes compostos apresentam cinéticas de primeira ordem. Bezdetnaya e colaboradores (1996) estudaram o efeito da formação de agregados sobre as cinéticas de fotobranqueamento de compostos porfirínicos. Sabe-se que, por se tratar de estruturas hidrofóbicas, em meio aquoso existe grande tendência de que estas moléculas deixem a forma monomérica para a formação de agregados, como dímeros, trímeros ou agregados maiores. Um agregado se caracteriza como uma aglomeração de moléculas, cujo mecanismo de formação ainda não está completamente elucidado. A agregação modifica as características dos estados eletrônicos dos fotossensibilizadores, alterando suas características espectrais. O estudo mostrou que as formas monoméricas de três derivados porfirínicos são mais suscetíveis ao fotobranqueamento em relação às formas agregadas. (BONNETT, 2001; BEZDETAY, 1996)

Figura 9 - Estrutura da porfirina (a), clorina (b) e bacterioclorina (c).



O mesmo grupo de pesquisadores ainda estudou a cinética de fotobranqueamento de uma clorina, temoporfina. Antes de ser irradiado, o composto mostrou-se presente em ambas as formas agregada e monomérica, e o aparecimento de uma nova banda após irradiação sugeriu mudanças no equilíbrio monômero-agregado. A pesquisa mostrou que o rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{PB}) para a temoporfina calculado com base na espectroscopia de absorção foi cerca de quinze vezes menor do que o calculado com base na emissão de fluorescência. Sabendo que a técnica de fluorescência mede principalmente a contribuição de monômeros em uma mistura, os pesquisadores concluíram que esta diferença de rendimento quântico se deve ao fato de que monômeros e agregados tem diferentes reatividades em relação ao fotobranqueamento, os últimos sendo muito mais resistentes. (BONNETT, 2001)

Ainda relacionado à fotoestabilidade das formas monoméricas e agregadas de porfirinas, Aveline (1994) e colaboradores determinaram os rendimentos quânticos de fotobranqueamento para três derivados da benzoporfirina em um surfactante. É importante salientar que, em soluções micelares, a forma monomérica tende a prevalecer sobre a forma agregada, pois o composto hidrofóbico pode se acomodar na cavidade apolar da micela, sem precisar se manter agregado como forma de minimizar a energia do sistema. A presença de surfactantes, assim como já reportado em estudos anteriores, aumentou o fotobranqueamento em todos os compostos estudados, sugerindo novamente que os monômeros sejam menos resistentes do que os agregados. (BONNETT, 2001; AVELINE, 1994)

Estudos de Spikes (1992) evidenciam a influência das propriedades físicas do solvente no Φ_{PB} de alguns derivados de porfirinas. Segundo ele, o fotobranqueamento aumenta conforme a constante dielétrica do solvente aumenta. Sabendo que espécies

iônicas são mais estáveis em solventes com altas constantes dielétricas, e que intermediários iônicos podem estar envolvidos no processo de fotobranqueamento, esta propriedade física pode ser relacionada ao aumento da velocidade de fotodegradação. O ato de borbulhar nitrogênio, com a finalidade de reduzir a concentração de oxigênio, reduziu os rendimentos quânticos de fotobranqueamento em até 90% da maior parte dos compostos analisados. Salvo exceções, o mecanismo tipo II de degradação via $^1\text{O}_2$ mostrou-se importante neste estudo. Em alguns casos pode haver combinação de dois mecanismos de branqueamento. (SPIKES, 1992)

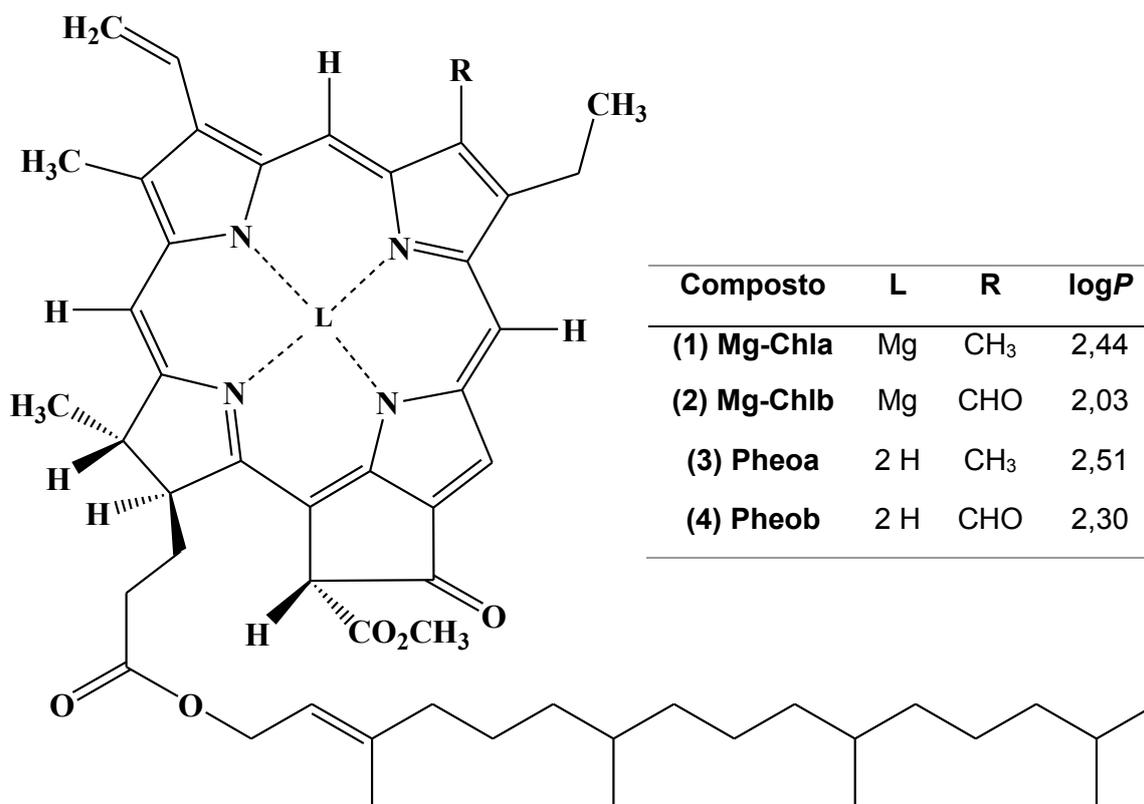
Outros estudos de Bonnett et al (2001) estudaram comparativamente a já mencionada clorina (temoporfina) e sua análoga bacterioclorina em solução metanólica. As velocidades de fotobranqueamento aumentaram para todas as substâncias com o aumento da polaridade do solvente. Para estas reações, bem como para uma infinidade de outras reportadas na literatura, o oxigênio singlete foi definido como a espécie responsável pelo branqueamento dos compostos. (BONNETT, 2001)

1.2.1.2 Clorofilas (Chl) e feofitinas (Pheo): propriedades e fotobranqueamento

São denominadas clorofilas (Chls – **Figura 10**) a classe de pigmentos com estrutura derivada de anéis porfirínicos, presentes em grande quantidade em plantas, com papel essencial no processo fotossintético, que podem ser extraídas de organismos autotróficos, isto é, produtores de oxigênio. (ARONOFF, 1966; GRIMM, 2006)

As características essenciais das clorofilas como pigmentos fotossintéticos são decorrentes das propriedades químicas e físicas do estado fundamental e do estado excitado de menor energia. A configuração do estado fundamental pode ser usada para determinar agregação e interação da clorofila com os demais componentes fotossintetizantes. O modo como as clorofilas agem com outras moléculas na conversão de luz em energia química, sem degradar a si mesma, pode ser estudado analisando as propriedades do estado excitado. (ARONOFF, 1966; SCHEER, 1991)

Figura 10 - Esquema estrutural das clorofilas (1-2) e feofitinas (3-4).



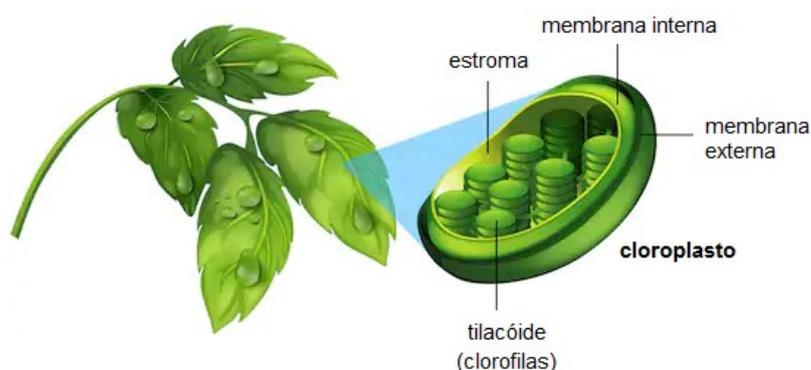
Tratando-se de uma classe de moléculas tão importante, cabe ressaltar as principais propriedades das clorofilas, sendo elas, grau de solubilidade muito baixo em solução aquosa e maior solubilidade em solventes apolares; podem isomerizar-se em solução, principalmente quando expostas a temperaturas mais elevadas; podem sofrer decomposição frente a bases, ácidos, adsorventes fortes e luz intensa; mesmo em solventes relativamente inertes. Elas podem oxidar rapidamente na presença do ar, mas, quando em estado sólido, apresentam estabilidade por longo período de tempo ao serem seladas e devidamente armazenadas. (ARONOFF, 1966, GRIMM, 2006, SCHEER, 1991)

A partir da clorina, precursor não fotossintético, cuja estrutura foi apresentada na seção anterior (**Figura 9b**), é que a clorofila e seus derivados são gerados. A característica estrutural que difere as clorofilas é a presença de um anel de ciclopentanona ligado ao anel III, com um íon Mg^{2+} coordenado aos nitrogênios. Além disso, as clorofilas possuem um residual de ácido propiônico no anel IV, que se encontra esterificado com um álcool de cadeia longa, geralmente fitol. Esta cauda fitílica confere maior hidrofobicidade ao composto e pode levar a agregação de moléculas em água. Ela se fixa de forma a orientar os complexos de clorofila-proteínas

durante o processo de produção de oxigênio. A cauda também proporciona a interação das clorofilas com ambientes hidrofóbicos.

Nas células vegetais, a clorofila é encontrada no interior dos cloroplastos, nas chamadas membranas tilacóides, vide **Figura 11**. Dentro destas membranas, os pigmentos fotossintéticos estão associados com proteínas para formar complexos pigmento-proteína. (CARPENTIER, 1985)

Figura 11 - Representação de um cloroplasto, evidenciando a localização das membranas tilacóides, onde ficam as clorofilas.



Fonte: *Adaptado de Shutterstock.*

As clorofilas naturais estudadas neste trabalho são as clorofilas *a* e *b*. A clorofila *a* ($C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$) é a primeira em proporções de abundância natural, encontrada em todas as plantas que produzem oxigênio, podendo estar presente como pigmento único em algumas espécies de algas. Na sequência tem-se a clorofila *b* ($C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$), que aparece como pigmento minoritário em algumas algas e em plantas superiores. (GOEDHEER, 1966) A diferença estrutural entre elas aparece no grupo R (**Figura 10**), onde para a clorofila *a* tem-se o substituinte $-CH_3$ e para clorofila *b* tem-se um aldeído nesta posição, $-CHO$. Esta pequena diferença estrutural tem consequências, como por exemplo, a maior hidrofobicidade da clorofila *a* em relação à clorofila *b*, já que o grupo aldeído é mais polar do que o hidrocarboneto. Esta informação pode ser validada consultando valores de medidas do logaritmo de coeficiente de partição ($\log P$) 1-octanol/água, encontrados na literatura. A escala de medida indica que, para valores de $\log P$ menores que 0, a molécula é hidrofílica, entre 0 e 1,5 anfílica, e maior que 1,5, hidrofóbica.

Para a Chlb, o valor de $\log P$ citado na literatura é de 2,03 (COSTA, 2019), enquanto que para a Chla o $\log P$ é 2,44 (GEROLA, 2011), confirmando o maior caráter hidrofóbico da Chla.

Quando colocadas em meio ácido as clorofilas a e b rapidamente liberam o íon magnésio coordenado, que será substituído por hidrogênios, gerando as espécies chamadas feofitina a e feofitina b (**Figura 10**).

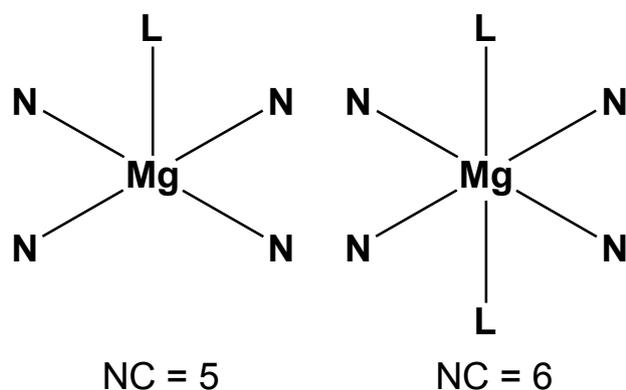
O magnésio é de fácil remoção e difícil reintrodução no anel. Aqui, a perda do metal também acarreta variação da hidrofobicidade dos compostos, onde tem-se para Pheo a $\log P = 2,51$ (GEROLA, 2011) e para Pheo b $\log P = 2,30$ (COSTA, 2019). Estes dados nos mostram que, com a perda do metal, ambos derivados tornam-se mais hidrofóbicos que seus respectivos precursores. Isto se explica pela presença do átomo de Mg^{2+} coordenado nos anéis de clorofilas, que cria uma densidade de carga positiva nestes compostos, que não está presente nas feofitinas. (COSTA, 2019)

Tanto na feofitina a quanto na feofitina b, a eliminação do metal coordenado resulta em um leve deslocamento da banda vermelha para maiores comprimentos de onda. Por outro lado, a banda Soret sofre um deslocamento hipsocrômico (para menores comprimentos de onda), e está menos claramente separada em dois componentes espectrais no caso da feofitina a (se comparada à clorofila a). (GOEDHEER, 1966; DRZEWIECKA-MATUSZEK, 2005)

A hidrofobicidade das clorofilas produz auto-agregação em água, alterando propriedades como tempo de vida de estados excitados e rendimentos quânticos, o que diminui a eficiência dos processos fotoquímicos e fotofísicos. (COSTA, 2019).

Para as clorofilas contendo o Mg^{2+} como centro metálico, este coordena-se à quatro átomos de nitrogênio do anel pirrol, havendo ainda uma ou duas posições axiais disponíveis para serem ocupadas por uma molécula que possua um par de elétrons isolado capaz de atuar como doadora de elétrons, assim como mostra a **Figura 12**. Sendo assim, a clorofila pode atuar como um acceptor de elétrons via o átomo de magnésio central. Quando a clorofila se encontra em um solvente polar nucleofílico, como a acetona, o solvente pode agir como a espécie doadora de elétrons e a clorofila fica na forma monomérica, com número de coordenação cinco ou seis. Devido à presença de grupos carbonílicos periféricos, as clorofilas podem atuar também como doadores de elétrons. Sendo assim, em solventes apolares elas podem estar presentes na forma de agregados em altas concentrações, e na forma de monômeros em baixas concentrações. (ZVEZDANOVIĆ, 2008)

Figura 12 - Coordenação axial para o centro metálico da clorofila, podendo resultar em número de coordenação igual a 5 para um ligante, e 6 para dois ligantes.



No que se refere à espectroscopia, pigmentos derivados da estrutura porfirínica apresentam espectros de absorção com número relativamente grande de bandas características, na região do amarelo, vermelho ou infravermelho próximo, e no violeta ou ultravioleta próximo. Das porfirinas, as clorinas apresentam a banda de Soret no espectro de absorção, que se caracteriza por um pico intenso na região de comprimento de onda azul do espectro visível. Por outro lado, as clorinas possuem uma alta absorção de luz na região de 600 nm, que se origina da perda de simetria das porfirinas durante formação destes compostos. Esta banda, nomeada Q, é proibida por simetria nas porfirinas. (GOEDHEER, 1966; SOARES, 2006) A **Tabela 1** mostra as principais bandas de identificação das clorofilas a e b e das feofitinas a e b.

Tabela 1 - Comprimentos de onda máximos de absorção e coeficientes de absorção molar em etanol, para as clorofilas (Chl) a e b, e para as Feofitinas (Pheo) a e b.

	Banda Soret		Banda Q	
	λ , nm	ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$	λ , nm	ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$
Chl a	425	124000	662	93300
Pheo a	402	169000	667	69300
Chl b	461	104000	648	36000
Pheo b	436	130000	655	30000

(GEROLA, 2013; COSTA, 2019)

Em moléculas grandes, planas e conjugadas, como é o caso das porfirinas, o momento de dipolo relacionado às transições π -eletrônicas coincide com o seu plano.

Se há um eixo de simetria maior, as transições são duplamente degeneradas e

as interações são influenciadas pela configuração de interação. Nas clorofilas, as bandas de absorção estão atreladas a uma direção definitiva de transição na molécula, isto porque elas não possuem elevada simetria. Por consequência, a energia e intensidade dessas bandas são menos afetadas por interações e pela presença de ligantes conjugados. (GOEDHEER, 1966)

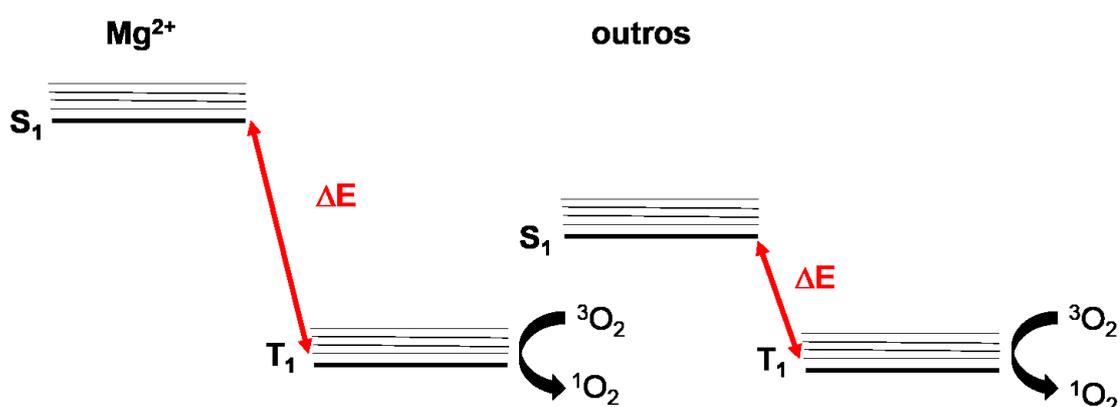
Em decorrência de interações com moléculas do solvente, as bandas de absorção podem sofrer alterações em sua forma e posição. Nestes casos, o resultado é um deslocamento para região de maior comprimento de onda (vermelho), e o grau de interação é determinado por propriedades do solvente como índice de refração e constante dielétrica. (GOEDHEER, 1966) A interação é mais forte conforme maior a polaridade do solvente, e as contribuições experimentais afirmam que cada transição é afetada de uma forma distinta. Com base nos estudos de Fiedor (2017), as espécies Chl *a* e Pheo *a* mostram um fraco efeito de solvente representado por um pequeno deslocamento de Stokes, típico para clorofilas e feofitinas. (FIEDOR, 2017)

Essas alterações também estão sujeitas a acontecer quando ocorre a interação entre as moléculas de pigmentos, levando a formação de agregados. Neste caso, a banda de absorção pode ser alargada e deslocamentos dos máximos de absorção podem ser observados, além do deslocamento resultante do efeito do solvente. Tais deslocamentos parecem ser controlados pelas interações dipolo-dipolo do sistema de elétrons π dos pigmentos. Adicionalmente, a formação de agregados pode afetar de forma muito significativa o espectro de fluorescência. (GOEDHEER, 1966)

Diversos estudos apontam para as correlações entre os deslocamentos espectrais e propriedades físico-químicas dos solventes, e tem indicado uma dominância do efeito da ligação de hidrogênio no máximo de absorção das Chls. A investigação experimental conduzida por Krawczyk (1989) salienta que, em solução, as moléculas de clorofila aparecem com frequência na forma monossolvatada, com número de coordenação (NC) igual a cinco, e são subjetivas à polaridade do meio. Em alguns solventes, este estado pode ser modificado pela formação de Chls dissolvatadas, através da coordenação de um segundo ligante (NC = 6). Estas interações podem modificar os efeitos solvatocrômicos por causarem mudança permanente do momento de dipolo. Além da estrutura molecular do solvente e sua basicidade, o fator estereo também detêm importância, podendo alterar o número de coordenação dos pigmentos (KRAWCZYK, 1989)

A compreensão dos processos fotofísicos das clorofilas é importante para o entendimento do mecanismo fotossintético, que envolve os estados S_1 , que por sua vez compete com o CIS para o estado T_1 e formação de 1O_2 . Em geral, as clorofilas apresentam altos rendimentos quânticos de estado triplete (Φ_T), pois o CIS é um caminho de relaxamento privilegiado de S_1 já que estas moléculas apresentam um forte acoplamento spin-órbita, que torna a conversão permitida. Ainda tem-se estudado até que ponto a extensão da conversão para o estado triplete é controlada pelo centro metálico e suas interações com o ambiente. (FIEDOR, 2017)

Figura 13 - Separação energética entre os orbitais S_1 e T_1 com a coordenação do íon Mg^{2+} e para os demais íons.



Segundo Fiedor (2017), os níveis eletrônicos dos pigmentos são muito sensíveis ao tipo de íon metálico central e ao solvente. No trabalho em questão foi avaliada a presença de diferentes íons metálicos: Mg^{2+} (Chl *a*), Zn^{2+} (Zn-Pheo *a*), Pd^{2+} (Pd-Pheo *a*) e Pt^{2+} (Pt-Pheo *a*) coordenados aos anéis clorínicos. Observou-se que o rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) foi dependente do metal, e os valores mais altos foram encontrados para a Chl *a*. A pesquisa aponta para um aumento da separação energética entre os estados S_1 e T_1 com a coordenação do Mg^{2+} (**Figura 13**), reduzindo a probabilidade de CIS, que é inversamente proporcional à diferença de energia entre os estados S-T, o que por consequência diminui a formação de oxigênio singlete. (FIEDOR, 2017)

Em relação à capacidade de atuar como fotossensibilizador, ou seja, transferir energia para o oxigênio molecular convertendo-o em 1O_2 , a Chl *a* é menos eficiente que a Pheo *a*, apresentando rendimentos quânticos de formação de oxigênio singlete (Φ_Δ) de 0,5 e 0,7, respectivamente. Citando Fiedor (2017), os menores valores de Φ_T

e Φ_{Δ} são encontrados também para a Chl *a* com relação às clorofilas metaladas com Zn^{2+} , Pd^{2+} e Pt^{2+} . Adicionalmente, os valores de Φ_{Δ} para a Chl *a* são muito mais dependentes do solvente, de maneira que os menores valores são alcançados em solventes de coordenação como metanol e dimetilformamida. Aparentemente, as interações com solventes coordenados levam à caminhos adicionais de desativação para a Chl *a*. Outros fatores relativos aos solventes podem afetar a eficiência de geração de oxigênio singlete, como viscosidade e solubilização de O_2 . Efeitos de solvatação não afetam a interação com o O_2 , que age como um acceptor de energia muito eficiente do estado T_1 dos pigmentos. (FIEDOR, 2017)

O elevado rendimento quântico de oxigênio singlete é um fator importante quando se avalia às clorofilas como possíveis sensibilizadores para aplicações fotodinâmicas, contudo pode ser um problema devido à foto-oxidação causada pelo 1O_2 . Por isso, as reações de foto-oxidação de complexos metálicos e bases livres de clorinas têm sido muito estudadas ao longo dos anos. O processo é frequentemente avaliado em solução para clorofilas e feofitinas. O mecanismo mais citado na literatura como responsável pela fotodegradação destas espécies é o tipo II, via oxigênio singlete, onde ocorre transferência de energia do fluoróforo (Chl ou Pheo) no estado triplete excitado, para o oxigênio do estado fundamental triplete, levando a formação de oxigênio singlete (Equação 7). Na sequência, o 1O_2 formado pode reagir com uma molécula de Chl (ou Pheo) e provocar sua degradação (Equação 8). Desta forma, a clorofila produz a espécie responsável por sua própria degradação, e o mecanismo pode ser chamado de auto-destruição da Chl. Ainda assim, deve-se destacar que o mecanismo tipo II não é encontrado como total responsável pela fotodegradação dos pigmentos, o que indica a existência de outros mecanismos contribuintes, como formação de radicais livres. (ZVEZDANOVIĆ, 2007)



Estudos de fotobranqueamento realizados por Marsh (1966) com bacterioclorofila *a* em soluções orgânicas saturadas com oxigênio, avaliaram a relação entre o número de coordenação do metal no complexo e sua fotoestabilidade, e concluíram que complexos hexacoordenados geralmente são mais estáveis do que complexos pentacoordenados. (BONNETT, 2001)

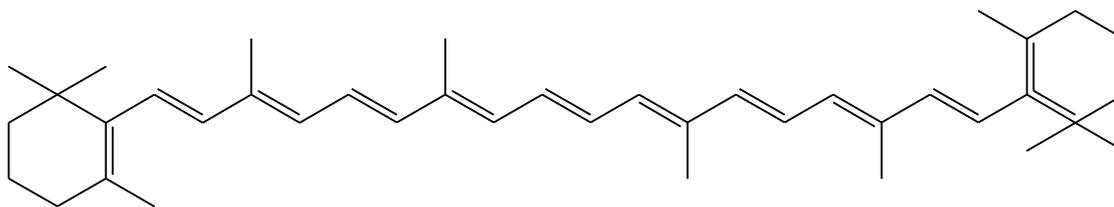
Zvezdanović e Marković (2007) avaliaram o efeito de solventes, acetona e n-hexano, nas cinéticas *in vitro* de branqueamento de extratos contendo uma mistura de Chl *a* e Chl *b*. Os pesquisadores concluíram que as constantes de velocidade eram dependentes tanto da energia dos fótons da fonte utilizada, como da concentração das soluções e da polaridade dos solventes. A partir deste estudo também se pode perceber que as formas agregadas das clorofilas são mais estáveis contra a radiação UV-B e UV-C, (ZVEZDANOVIĆ, 2007)

1.2.2 Fotoproteção

A luz solar é fundamental para a manutenção da vida no planeta, atuando como força motriz da fotossíntese. Entretanto, ela também é fonte de estresse para os organismos fotossintéticos, podendo causar prejuízo em suas funções fotossintéticas. Os pigmentos responsáveis pela fotossíntese, como as clorofilas e os carotenoides, absorvem na região do visível, mas seu comportamento é alterado quando expostos à radiação ultravioleta. (ZVEZDANOVIĆ, 2007; NAJAFPOUR, 2017) Após absorção de luz através das folhas, os pigmentos são parcialmente protegidos do fotobranqueamento (foto-oxidação) por um mecanismo de dissipação de energia através de transporte de elétrons, e as moléculas oxidadas logo são substituídas por outras recém-sintetizadas. Acontece que nem toda energia absorvida é consumida neste processo, e um mecanismo adicional de fotoproteção é necessário para evitar um branqueamento exagerado de clorofila. (CARPENTIER, 1985)

Os carotenoides, como por exemplo o β -caroteno (**Figura 14**), são compostos que exercem papel fundamental no mecanismo de fotoproteção, atuando como anti-radicais, o que demonstra que a reação de degradação envolve radicais de oxigênio. Eles são componentes vitais da membrana tilacóide, com papel importante na transferência de energia bem como na fotoproteção, através da dissipação do excesso de energia. (SANDELIUS, 2009) O branqueamento de clorofilas é acelerado na presença de inibidores fotossintéticos, como herbicidas, porque eles impedem a biossíntese dos carotenoides. (YAMASHITA, 1969; MILLER, 1991) Carpentier (1985) mostrou em seu estudo que membranas tilacóide de folhas tratadas com herbicidas foram muito mais sensíveis à luz do que as não tratadas, porque elas contêm apenas uma pequena quantidade de carotenoides. (CARPENTIER, 1985)

Figura 14 - Estrutura do β -caroteno.



Nos sistemas *in vivo*, o excesso de dano às membranas pode ser evitado por meio de uma migração especial de energia por caminhos de dissipação. Nestas rotas se encontram holocromos, que são agregados de clorofilas e carotenoides. Os holocromos que se encontram no final da rota devem sofrer um fotobranqueamento muito mais rápido, porque recebem uma porção maior de energia. Acredita-se que os carotenoides estejam no final da via de dissipação de energia, onde exercem função protetora para com a clorofila. (MILLER, 1991) Nos estudos com clorofilas *in vitro*, não há a contribuição destas espécies para procedência de mecanismos fotoprotetores como estes, sendo este um indício de justificativa para o fato de as clorofilas serem muito menos estáveis *in vitro* que *in vivo*.

Segundo estudos de Fiedor (2017), a ligação axial no Mg^{+2} parece ativar uma série de mecanismos fotoprotetores intramoleculares. Um deles opera em nível de mistura de estados de spin, diminuindo as taxas de cruzamento intersistema e diminuindo os rendimentos quânticos do estado T_1 . Ao aceitar um segundo ligante, é necessário que a configuração de valência do Mg^{+2} seja modificada, levando a hibridização dos orbitais 3s e 3p para a formação de um orbital híbrido sp, capaz de aceitar dois pares de elétrons. Por causa disso, o íon Mg^{2+} é forçado para dentro do plano do macrociclo, resultando na alteração da simetria do complexo de C_4 para D_{4h} . A maior simetria do último impõe mais restrições vibracionais e resulta no enfraquecimento da mistura de estados, reduzindo, portanto, o CIS. É relevante salientar que, todavia, clorofilas hexacoordenadas raramente são encontradas em sistemas naturais. (FIEDOR, 2017; FREDJ, 2009)

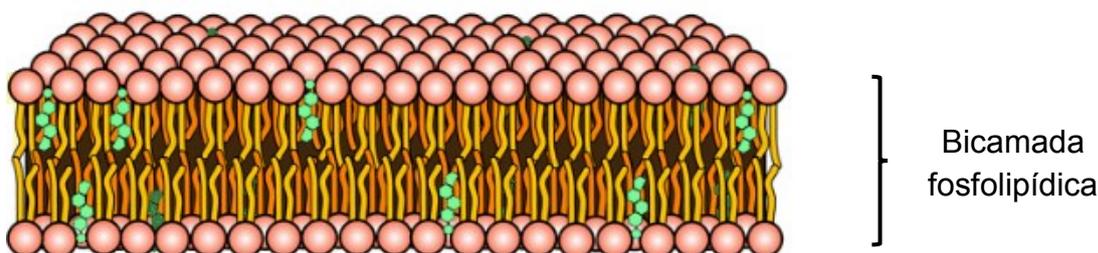
Estudos anteriores envolvendo sistemas micelares levantaram indícios de que as membranas possam inibir a fotodegradação, atuando como fotoprotetores. Estes mecanismos fotoprotetivos ainda serão discutidos. (COSTA, 2019)

1.3 Surfactantes, micelas e membrana vegetal

Como já enfatizado anteriormente, nos sistemas *in vivo* as clorofilas são encontradas no interior da membrana tilacóide, localizadas nos cloroplastos. A membrana tilacóide interna constitui a cadeia de transporte de elétrons fotossintética, representando uma área superficial extremamente grande nos tecidos das plantas. (SANDELIUS, 2009) É conhecido que a base estrutural das membranas tem natureza anfifílica (lipídica), ou seja, é composta por moléculas que possuem em sua estrutura ambas as sessões hidrofóbica e hidrofílica. Moléculas anfifílicas se autoagregam em uma variedade de microestruturas, que são fisicamente associadas, formando micelas, vesículas, bicamadas, entre outros. (LESHEM, 1992)

Na **Figura 15** se expõe o modelo de bicamada fosfolipídica da membrana vegetal. (LESHEM, 1992)

Figura 15 - Modelo de estrutura da membrana celular vegetal, composto por uma bicamada fosfolipídica.



Fonte: *Adaptado de Shutterstock*

A função primária da membrana lipídica é fornecer um ambiente estrutural para os complexos de proteína da membrana fotossintética e uma barreira gradiente de solutos. Muitos estudos indicam que espécies de moléculas como os carotenoides contribuem para a estabilização das membranas de bicamada lipídica. (SANDELIUS, 2009; GRUSZECKI e SIELEWIESIUK, 1991; MUNNÉ-BOSCH e ALEGRE, 2002) Entretanto, a concentração de carotenoides dissolvidos na membrana tilacóide é ainda desconhecida, e seu papel como contribuinte estabilizador permanece como uma questão aberta. (SZILÁGYI et al., 2008) Supostamente, a membrana ainda poderia atuar como um mecanismo fotoprotetivo dos pigmentos inseridos no aparato fotossintético, mas estudos ainda precisam ser conduzidos neste sentido. Uma forma

de avaliar o papel da membrana vegetal *in vivo*, simulando seu comportamento através de experimentos *in vitro*, consiste na utilização de modelos biomiméticos. O termo, criado em 1969, deriva de *bios*, que significa vida, e *mimesis*, imitar. (BAR-COHEN, 2006; SCHMITT, 1969)

A natureza e os sistemas biológicos fornecem ao homem um bom modelo de imitação, aprendido, e, sobretudo inspiração para o desenvolvimento de novas tecnologias. Assim, os modelos biomiméticos são utilizados para reproduzir uma condição encontrada na natureza em laboratório. (BAR-COHEN, 2006; BENYUS, 1998; GRAETZEL, 2010) Do ponto de vista da constituição da membrana vegetal, o sistema micelar pode ser usado como modelo biomimético simples da membrana.

Micelas são agregados constituídos por moléculas anfifílicas, provindas de surfactantes, que apresentam uma região apolar (hidrofóbica), formada por uma longa cadeia carbônica, e outra região polar (hidrofílica), que pode ou não apresentar cargas. (ARAUJO, 2009; FENDLER, 1975; MANIASSO, 2001) Ao dissolver o surfactante em meio aquoso, a região hidrofóbica da molécula faz com que as moléculas de água do solvente sofram uma reorganização ao seu redor, causando um aumento da energia livre do sistema. Afim de reduzir a energia livre do mesmo, as moléculas de surfactante adsorvem-se à interface, substituindo as moléculas de água por monômeros de surfactante. (MOROI, 1992; MYERS, 1999) À medida que a concentração aumenta e a interface encontra-se preenchida de moléculas de surfactante, os monômeros buscam uma nova forma de organização que permita reduzir a energia do sistema, associando-se para formação de dímeros, trímeros ou agregados maiores, até atingir a chamada concentração micelar crítica – CMC, onde há formação de agregados denominados micelas. (MANIASSO, 2001; TANFORD, 1974)

Micelas originadas da classe de sulfobetaínas (SB) tem origem de surfactantes zwitteriônicos, ou seja, que apresentam duas cargas opostas em sua região polar. São de grande importância devido as suas propriedades únicas, como solubilidade em água, biodegradabilidade e estabilidade térmica. (DOUSSIN, 2006; ZAJAC, 1997; MAFI, 2016) Micelas de sulfobetaína zwitteriônicas, como SB3-14 (**Figura 16**), não apresentam uma carga efetiva, com os grupos de amônio quaternários ligados covalentemente a grupos sulfonato (SO_3^-). (NOME, 2011; BUNTON, 1987)

Figura 16 - Estrutura do surfactante SB3-14, que dá origem à micelas de sulfobetaina zwitteriônicas, e leva este nome por conter 14 carbonos em sua cauda apolar.

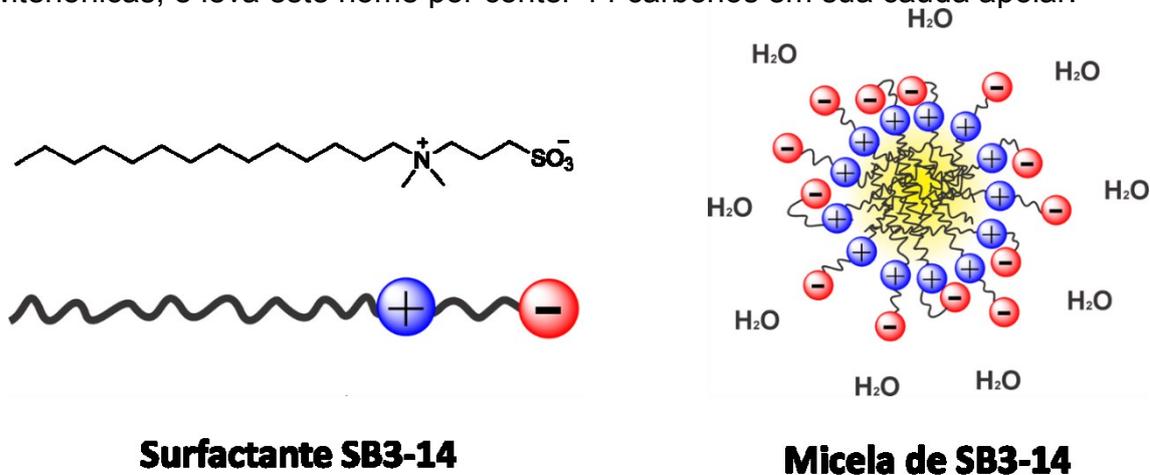
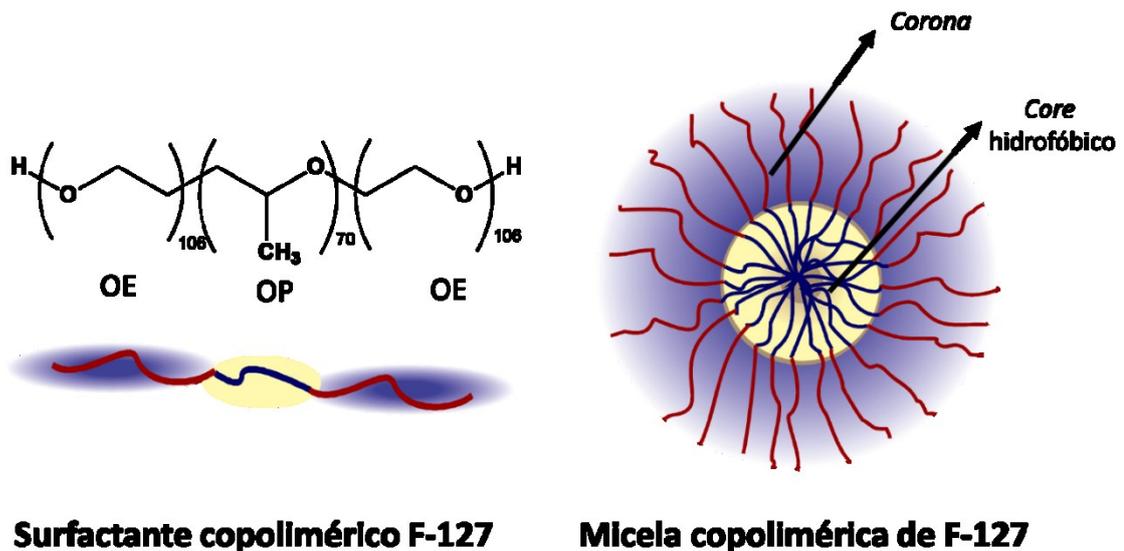


Figura 17 - Estrutura do surfactante F-127 ($OE_{106}OP_{70}OE_{106}$), que forma as micelas poliméricas.



Outra classe de micelas que pode ser utilizada como modelo mimético de uma membrana vegetal são as poliméricas. A utilização de copolímeros de bloco plurônico, como F-127 (**Figura 17**), apresenta diversas vantagens, por serem polímeros sintéticos anfífilos contendo blocos anfífilos de poli(óxido de etileno) (OE) e blocos hidrofóbicos de poli(óxido de propileno) (OP), organizados em uma estrutura tribloco OE-OP-OE. O segmento hidrofóbico OP constitui na micela um núcleo hidrofóbico, que funciona como um microambiente para a incorporação de moléculas lipofílicas,

como as clorofilas. A coroa hidrofóbica de OE, por sua vez, evita agregação. (ZHANG, 2011; HUANG, 2009; LI, 2017)

Com base em tudo o que foi abordado, torna-se importante, do ponto de vista científico e tecnológico, a busca por um maior entendimento do comportamento dos pigmentos fotossintéticos em reações promovidas por luz. Este estudo pode direcionar a um esclarecimento de questões que ainda não estão elucidadas, como a alta fotoestabilidade dos pigmentos nas plantas, e sugerir possíveis mecanismos que contribuem para sua fotoproteção, podendo servir como inspiração no desenvolvimento de sistemas produtores de energia inspirados na natureza.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Investigar a fotodegradação de diferentes pigmentos fotossintéticos naturais em relação às suas propriedades fotoquímicas em diferentes ambientes, visando o desenvolvimento de aparatos fotossintéticos artificiais.

2.2 Objetivos específicos e Estratégias

- Avaliar as reações de fotobranqueamento dos pigmentos fotossintéticos em diferentes solventes (polares próticos, polares apróticos e apolares).
- Determinar o rendimento quântico de fluorescência e o tempo de vida das clorofilas nos diferentes meios.
- Investigar a participação de espécies reativas de oxigênio nos mecanismos de fotodegradação através de sequestrantes de oxigênio.
- Avaliar a fotoproteção das clorofilas em modelos biomiméticos simples de membrana, baseados em micelas de sulfobetaina (SB3-14) e plurônico (F-127).
- Relacionar as propriedades fotofísicas dos diferentes pigmentos nos diversos meios com a fotoestabilidade das clorofilas, visando estratégias para o planejamento de aparatos fotossintéticos bioinspirados de grande fotoestabilidade.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Todos os solventes utilizados neste trabalho, incluindo acetona (ACE, Dinâmica), acetonitrila (ACN, Vetec), água destilada, 1-butanol (Vetec), dimetilformamida (DMF, Vetec), dimetilsulfóxido (DMSO, Vetec) etanol (Dinâmica), F-127 (Aldrich), metanol (Vetec), SB3-14 [3-(N,N-dimetilmiristilamônio) propanosulfonato] (Aldrich) e tolueno (F. Maia), foram de padrão analítico. Os pigmentos fotossintéticos clorofila *a* e *b*, bem como feofitina *a*, foram obtidos através de um processo de extração, de acordo com a metodologia citada por Strain e Svec (STRAIN, 1966). A feofitina *b* foi obtida a partir da clorofila *b*, por uma reação de desmetalção em meio ácido.

3.2 Métodos

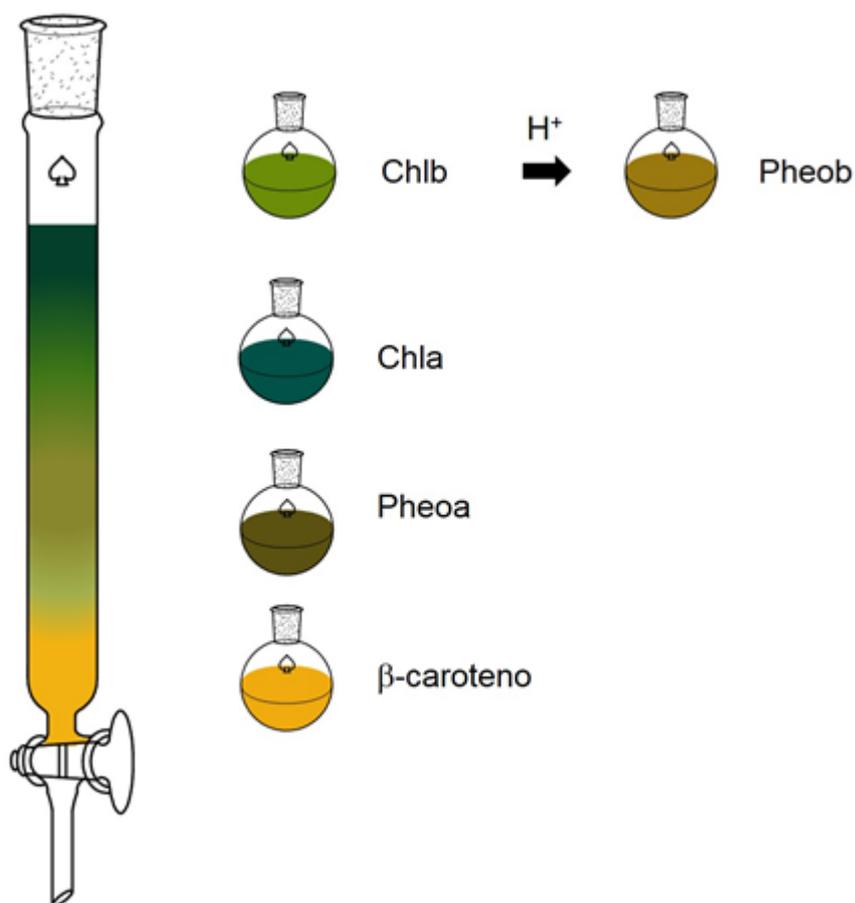
3.2.1 Extração e separação cromatográfica dos pigmentos metalados e não metalados

Para a extração dos pigmentos, pesou-se aproximadamente 100 g de folhas de agrião *in natura*, imergiu-se em uma mistura de metanol/éter de petróleo (2:1 v/v), o álcool tendo a função de romper a membrana vegetal que contém os pigmentos e transferi-los para a fase orgânica. Procedeu-se a extração com adição de volumes de mistura de éter etílico/éter de petróleo (1:1 v/v). Lavou-se a fase orgânica com uma solução saturada de cloreto de sódio, afim de romper as emulsões e remover o metanol adicionado. O extrato obtido, de cor verde escura, foi rotaevaporado e misturado à sílica para a preparação de uma pastilha. Da pastilha foram extraídos os pigmentos clorofila *a*, clorofila *b* e feofitina *a*, através de uma coluna cromatográfica de sílica, cuja ordem de eluição encontra-se na **Figura 18**.

A proporção do eluente etanol/éter de petróleo foi de 5:95 v/v. Da clorofila *b* obteve-se a feofitina *b*, através de uma reação de desmetalção em etanol, acidificando-se o meio com HCl 2 mol L⁻¹, e extração para a fase orgânica com uma mistura de éter de petróleo/água (1:3 v/v). Confirmou-se a obtenção de todos os

compostos citados através de espectroscopia de UV-Vis. A seguir, prepararam-se soluções estoque para cada um deles.

Figura 18 - Ordem de eluição da coluna cromatográfica com coloração dos compostos, de onde foram obtidos β -caroteno, Pheoa, Chla e Chlb, nesta sequência. A Pheob foi obtida por via reacional.



3.2.2 Determinação da concentração das soluções estoque de pigmentos

Os pigmentos isolados foram diluídos em pequeno volume de dimetilsulfóxido padrão analítico (Vetec), em quantidade suficiente para proporcionar total solubilização dos mesmos. Determinou-se a concentração de cada uma das soluções estoque através de espectrofotometria de absorção na região do UV-visível, com aplicação da lei de Lambert-Beer. Os espectros de absorção foram feitos em etanol, cujos coeficientes de absorvidade molar (ϵ) para a banda Q de cada composto são conhecidos: $\epsilon_{Chla}(662 \text{ nm}) = 93300 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{Chlb}(648 \text{ nm}) = 36000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; $\epsilon_{Pheoa}(667 \text{ nm}) = 69300 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; e $\epsilon_{Pheob}(655 \text{ nm}) = 30000 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. As

química da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis/SC, Brasil). Utilizou-se concentração de $5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, em cubetas de quartzo de quatro faces transparentes. Para todos os quatro pigmentos, empregou-se comprimento de onda de excitação em 411 nm, com leitura na faixa de 600 a 800 nm. O rendimento quântico de fluorescência (Φ_F) foi calculado perante a Equação 9, utilizando-se um substrato padrão de comparação, feoforbídeo (**Figura 19**) em etanol ($\Phi_P = 0,30$), para todos os compostos.

$$\Phi_F = \frac{Abs_P F_C n_P^2}{Abs_C F_P n_C^2} \Phi_P \quad (9)$$

onde o subíndice p representa o composto padrão e o subíndice c representa a clorofila e seus derivados; Abs a absorvância em 411 nm, F a área espectro de emissão, e n o índice de refração do solvente. Os índices de refração foram retirados do HandBook de física e química (LIDE, 2005).

Avaliaram-se os rendimentos quânticos de fluorescência em diferentes solventes: próticos (água, metanol, etanol e butanol), e apróticos (acetona, acetonitrila, dimetilformamida, dimetilsulfóxido e tolueno). Através de uma simples sobreposição dos espectros de emissão e absorção obtidos nesta etapa do procedimento, ainda é possível avaliar a estabilidade do estado excitado conferida por cada solvente, fato observado por um deslocamento batocrômico na banda de emissão. É possível quantificar esta estabilização com o parâmetro de deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$), através da Equação 10, sendo que conforme maior seu valor, maior a estabilização conferida pelo meio (VALEUR, 2002):

$$\Delta\nu(\text{cm}^{-1}) = 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{abs,max}} - \frac{1}{\lambda_{emi,max}} \right) \quad (10)$$

onde $\lambda_{abs,max}$ e $\lambda_{emi,max}$ são os comprimentos de onda de máxima absorção e emissão, respectivamente.

3.2.4 Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ_F)

Avaliou-se o tempo de permanência no estado excitado durante a emissão de fluorescência, através de medidas de tempo de vida de fluorescência (τ_F) no equipamento EasyLife localizado no laboratório 313 do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis/SC, Brasil). Manteve-se a concentração de cada cubeta do experimento anterior, $5 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹. Para cada clorofila e feofitina analisadas, utilizou-se um LED de comprimento de onda correspondente com a região de absorção de sua banda de Soret, em 370 nm. Selecionou-se também um filtro, de comprimento de onda 10 nm maior que o LED, a fim de filtrar as demais contribuições e gerar informação apenas da região de interesse. Trabalhou-se com fenda de 5,5 mm, sendo necessária a leitura de um padrão de comparação IRF de mesma intensidade, cuja variação de intensidade é alcançada através da variação da fenda. O IRF utilizado foi o LUDOX® suspensão aquosa 30% em massa. Os dados foram tratados matematicamente no software Origin®.

3.2.5 Determinação de rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB})

Para estudar o processo de desativação do estado excitado de clorofilas e feofitinas a partir de reação química que leva à sua degradação, procedeu-se cinéticas de fotodegradação (fotobranqueamento) dos pigmentos em todos os nove solventes estudados. Empregou-se, como fonte de radiação contínua, um laser vermelho de comprimento de onda 648 nm ($P = 100$ mW). A degradação dos pigmentos foi acompanhada através do decaimento de absorbância do reagente, no espectrofotômetro UV-vis Varian Cary® 50, com leituras de 400 a 800 nm. A concentração nas cubetas na ordem de 10^{-6} M. As constantes de velocidade para as reações, que são de primeira ordem, foram obtidas e através delas pode-se calcular o Φ_{FB} , como a Equação 11 descreve,

$$\Phi_{FB} = \frac{(A_0 - A)V_s N_a h c}{\epsilon l \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) I_0 (1 - 10^{-bc\epsilon}) \cdot e^{-k_{FB} t} d\lambda dt} \quad (11)$$

onde A_0 e A são as absorvâncias inicial e final, respectivamente, V_s é o volume de solução na cubeta, N_A é a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-1}$), c é a velocidade da luz ($3 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$), ϵ é o coeficiente de absorção molar de um determinado pigmento em um solvente ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l é o caminho ótico da cubeta (cm), λ_2 e λ_1 são os comprimentos de onda final e inicial (m), respectivamente, P é a potência (W, ou $\text{m}^2 \cdot \text{kg} \cdot \text{s}^{-3}$), k_{FB} é a constante de velocidade da fotodegradação (min^{-1})

3.2.6 Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio nos mecanismos de fotodegradação através do borbulhamento de nitrogênio

Com a finalidade de avaliar-se o comportamento da reação de fotodegradação em um ambiente com disponibilidade de oxigênio molecular muito reduzida, promoveu-se cinética para ambos os pigmentos Chla e Chlb em acetonitrila e borbulhamento de N_2 . O procedimento experimental é o mesmo descrito no item anterior (3.2.5), entretanto, antes de iniciar a irradiação com laser, o sistema foi desaerado. Após o borbulhamento, a solução na cubeta foi irradiada, registrando-se os espectros de absorção com o tempo de iluminação. As constantes de velocidade para uma reação de primeira ordem foram obtidas e calculou-se o Φ_{FB} perante Equação 11.

3.2.7 Fotoproteção das clorofilas em modelos biomiméticos de membrana simples

Avaliaram-se sistemas micelares de sulfobetaina (SB3-14) e plurônico (F-127) como possíveis sistemas fotoprotetores. As cinéticas de fotobranqueamento foram realizadas como descrito no item 3.2.5, mantendo as concentrações de surfactante muito acima da concentração micelar crítica. $[\text{SB3-14}] = 2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $[\text{F-127}] = 5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Os valores de rendimento quântico de fotobranqueamento foram calculados seguindo a equação 11 (pg. 53).

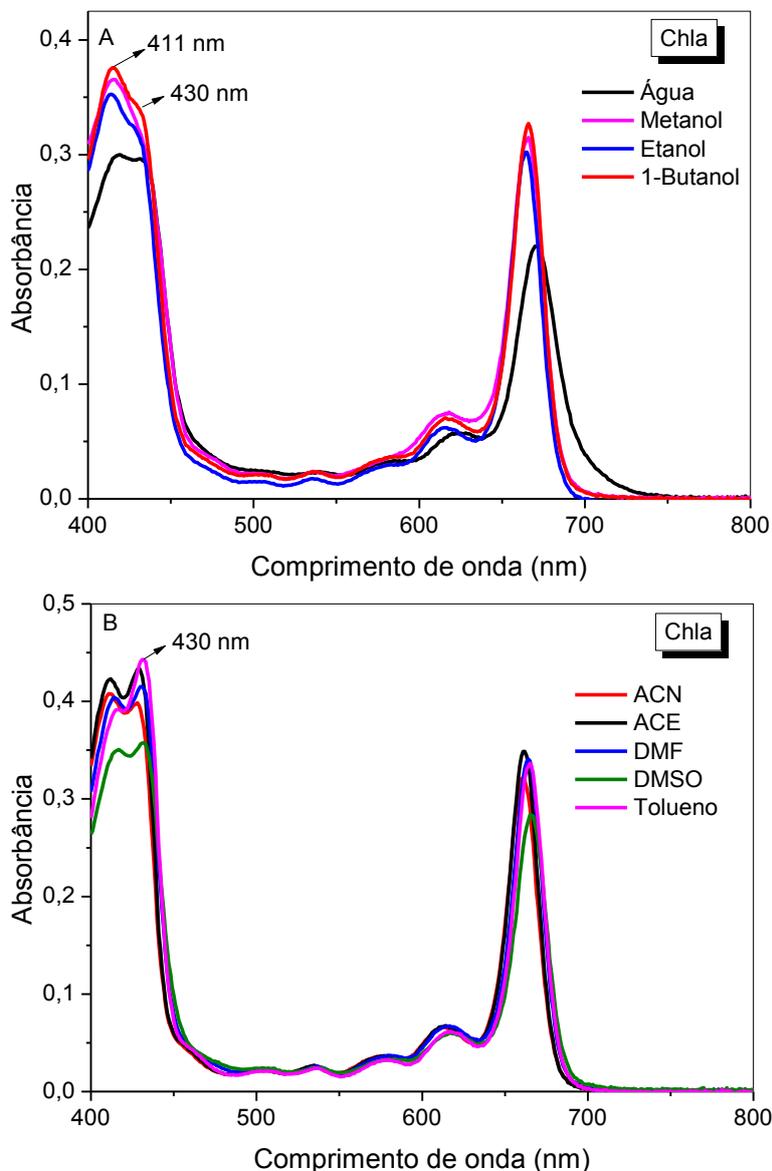
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos da solvatação específica dos pigmentos fotossintéticos nos espectros de absorção eletrônica e de emissão de fluorescência

Os espectros de absorção eletrônica das clorofilas apresentam os perfis característicos das clorinas, com duas bandas principais de alto coeficiente de absorvidade molar: i) a banda Q na região do vermelho, e ii) a banda Soret na região do azul. Os espectros de absorção da Chla em diferentes solventes (**Figura 20**) mostram que as intensidades das bandas, principalmente a Soret, são dependentes dos parâmetros do meio, além da constante dielétrica e do índice de refração, nos efeitos de solvatação não específicos. Além disso, têm-se vários locais de ligação específica para as clorofilas, tanto eletrofílicos como nucleofílicos. Como centro nucleofílico para a Chla cita-se o oxigênio carbonílico do anel de ciclopentenona, que atua como aceptor de ligação de hidrogênio, e como centro eletrofílico tem-se átomo de metal central que pode se coordenar axialmente com solventes nucleofílicos.

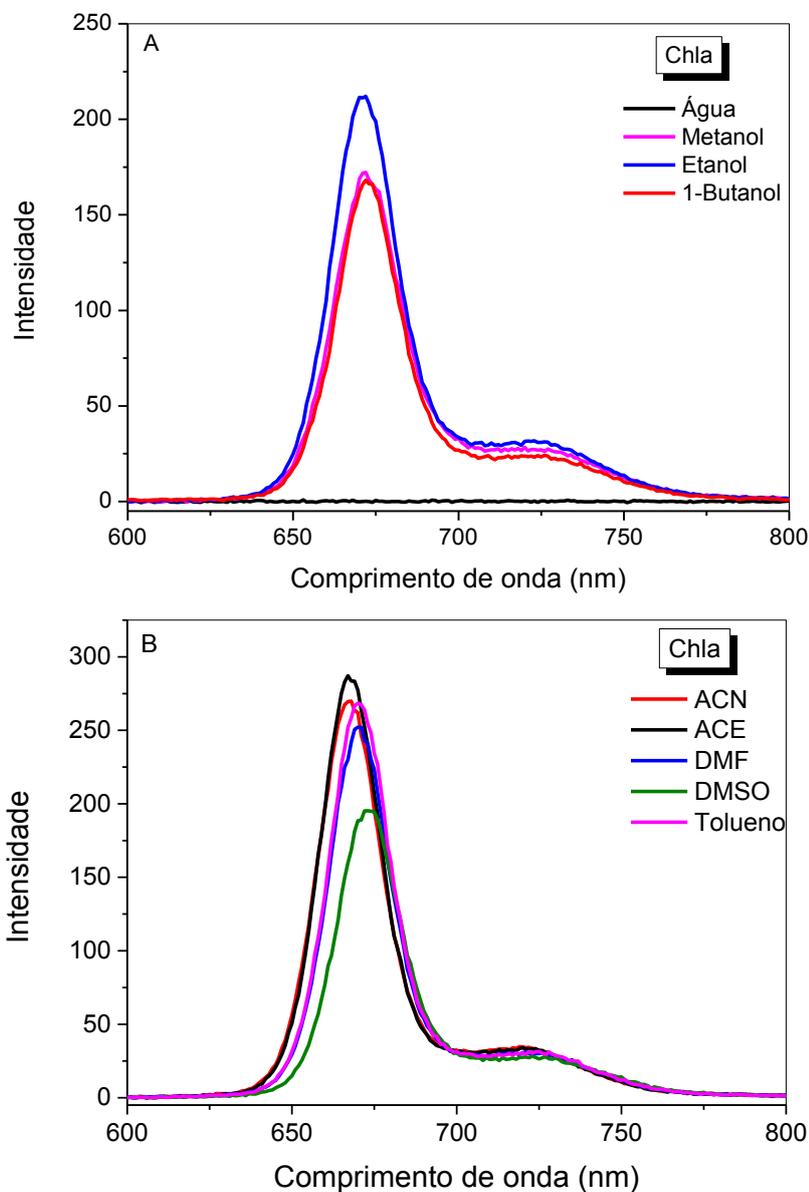
As características espectrais da Chla apresentaram maiores alterações em solventes próticos (**Figura 20A**) com relação aos solventes apróticos (**Figura 20B**), devido à capacidade de formação de ligação hidrogênio nos primeiros. Em solvente aprótico a banda de Soret apresenta um máximo em 430 nm e um ombro em 411 nm, enquanto na presença dos solventes próticos a banda de maior intensidade é observada em 411 nm e o ombro em 430 nm. Os valores de coeficiente de absorvidade molar são apresentados nas **Tabelas A1 e A2**, no **Apêndice I**. Em solventes hidrocarbônicos como o tolueno, tem-se para a Chla uma solvatação não específica, enquanto nos demais solventes interações específicas são observadas. Em geral, para os solventes nucleofílicos como acetona, acetonitrila, DMF e DMSO o solvato é do tipo L1, indicando uma molécula de solvente coordenada axialmente ao metal central, ou seja, para estes solventes o número de coordenação é 5. Adicionalmente, para etanol e butanol o solvato é do tipo L1H, o que significa a presença de um solvente coordenado axialmente ao metal e uma ligação de hidrogênio adicional à carbonila da Chl. Em metanol o solvato é do tipo L2H, mostrando que duas moléculas de solvente são coordenadas ao metal e o NC é 6. (VLADKOVA, 1999; REICHARDT, 2003).

Figura 20 - Espectro de absorção da clorofila a em solventes próticos (A) e apróticos (B). [Chla] = $3,7 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.



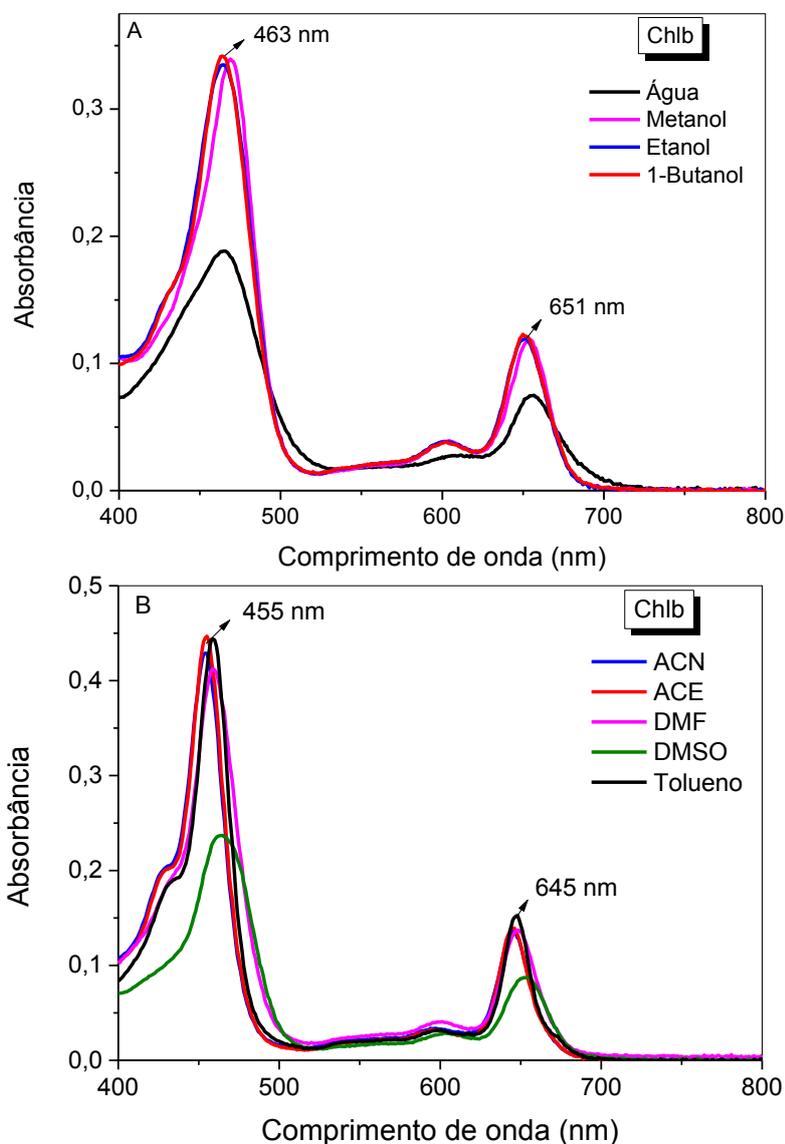
O espectro de absorção da Chla em água mostra um alargamento da banda Q, o que não acontece nos demais solventes. Este alargamento é um indicativo de formação de espécies de clorofila agregadas em solução aquosa, como dímeros ou agregados maiores. O efeito de formação de agregados em água já foi muito discutido na literatura, e sabe-se que a formação destes leva a supressão dos processos fotosínticos e fotoquímicos de desativação. Isto ocorre porque, ao excitar um dímero, uma espécie suprime a emissão de fluorescência da outra. Esta situação se confirma ao observar-se o espectro de emissão da **Figura 21A**, que mostra que a Chla não apresenta fluorescência em água.

Figura 21 - Espectro de emissão de fluorescência da clorofila *a* nos solventes polares próticos (A) e apróticos (B), $\lambda_{exc} = 411$ nm, a 25 °C, $[Chla] = 5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.



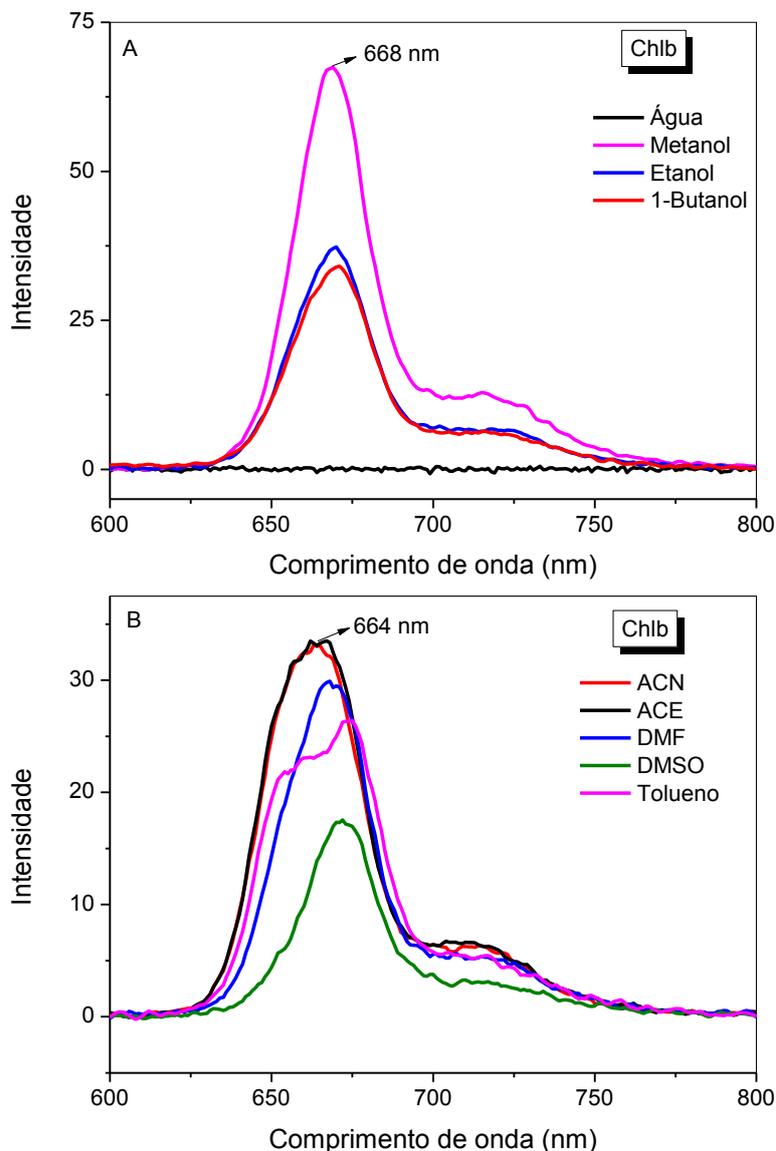
Assim como para a Chla, o comportamento espectral obtido para a clorofila *b* (Chlb) mostrou-se dependente do solvente e das interações específicas com estes (**Figura 22**). Apesar de existirem muitas informações para os tipos de solvato para a Chla, pouco se sabe sobre a Chlb. Contudo, no que se refere à coordenação ao metal central, espera-se o mesmo comportamento observado para a Chla.

Figura 22 - Espectro de absorção da clorofila b em solventes próticos (A) e apróticos (B). [Chlb] = $3,6 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.



Salienta-se que a Chlb possui um grupo $-\text{CHO}$ adicional, ligado à parte cromofórica da molécula, capaz de fazer ligação hidrogênio com os solventes próticos. Assim, para a Chlb observou-se para os solventes próticos uma menor resolução das bandas na região de Soret com relação aos solventes apróticos, e, um deslocamento batocrômico resultante das ligações de específicas com o grupo cromofórico. Em geral, o espectro de absorção da clorofila b apresentou também um alargamento da banda Q em água (**Figura 22A**). Da mesma forma, o processo de fluorescência é suprimido em água, como mostra a **Figura 23A**. (REICHARDT, 2003).

Figura 23 - Espectro de emissão de fluorescência da clorofila *b* em solventes próticos (A) e apróticos (B), $\lambda_{exc} = 411 \text{ nm}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $[\text{Chlb}] = 5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.



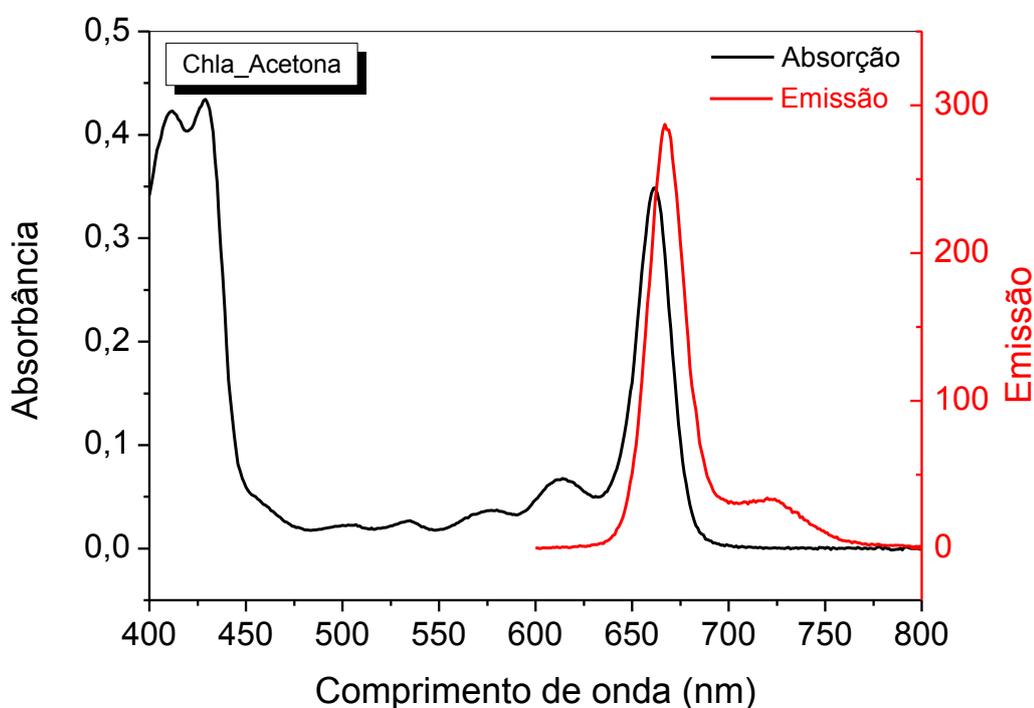
No que diz respeito ao processo de desativação do estado excitado por emissão de fluorescência para a Chlb (**Figura 23**), observou-se um deslocamento do máximo de emissão para maiores comprimentos de onda nos solventes próticos (de 668 nm para 664 nm, em geral). Além disso, em solventes apróticos houve um alargamento da banda de emissão, com exceção do DMSO, e adicional resolução vibracional em tolueno.

Para a feofitina *a* (Pheoa) e a feofitina *b* (Pheob) que não possuem um metal coordenado ao anel tetrapirrólico, os efeitos de solvatação possíveis são os efeitos não específicos e de ligação de hidrogênio. Os espectros de absorção e de emissão

da Pheoa (Figuras A1 e A2, respectivamente) e da Pheo b (Figuras A3 e A4, respectivamente), são apresentados no Apêndice II.

Para avaliar de maneira mais efetiva o efeito dos solventes sobre os espectros de absorção e emissão dos pigmentos, determinou-se o deslocamento de Stokes, através dos máximos dos espectros de emissão e absorção, como mostra um exemplo de clorofila *a* em acetona, na **Figura 24**. Os cálculos, realizados usando a Equação 10, tem os resultados apresentados na **Tabela 2**.

Figura 24 - Sobreposição dos espectros de absorção e emissão de fluorescência de Chla em acetona. $[Chla_{\text{ABSORÇÃO}}] = 3,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $[Chla_{\text{EMIÇÃO}}] = 5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.



Para muitos sistemas os valores de deslocamentos de Stokes podem ser relacionados aos efeitos gerais de solvatação relacionados à polaridade do solvente, sendo esta descrita pelas propriedades físicas como constante dielétrica (ϵ), índice de refração (n) e momento de dipolo (μ). Para os valores de deslocamento de Stokes determinados para as clorofilas essa relação não foi observada (**Tabela 2**). Este fato já era esperado devido às diferentes interações específicas das Chls com os solventes, como a coordenação axial ao metal e a formação de ligação hidrogênio. (REICHARDT, 2003).

Tabela 2 – Valores de constante dielétrica e índice de refração dos solventes da literatura (Fonte: Sigma-Aldrich), associados aos valores dos deslocamentos de Stokes calculados para os pigmentos.

Solvente	ϵ	N	$\Delta\nu, \text{cm}^{-1}$			
			Chla	Chlb	Pheoa	Pheob
Tolueno	2,4	1,50	115	590	131	105
1-Butanol	17,8	1,40	136	463	112	119
ACN	20,7	1,36	151	435	130	103
Etanol	24,6	1,36	163	410	55	95
Metanol	32,6	1,33	138	288	30	163
DMF	36,7	1,43	138	417	130	109
ACE	37,5	1,34	120	507	114	79
DMSO	46,7	1,48	183	427	163	103
Água	78,5	1,33	-	-	-	-

Para avaliar os efeitos específicos dos solventes têm-se algumas escalas empíricas, como a de Kamlet-Taft, que considera as interações soluto/solvente (REICHARDT, 2003). Os valores dos parâmetros de Kamlet-Taft α (doador de ligação hidrogênio - acidez), β (aceptor de ligação hidrogênio - basicidade) e π^* (polaridade/polarizabilidade), estão relacionados na **Tabela 3**.

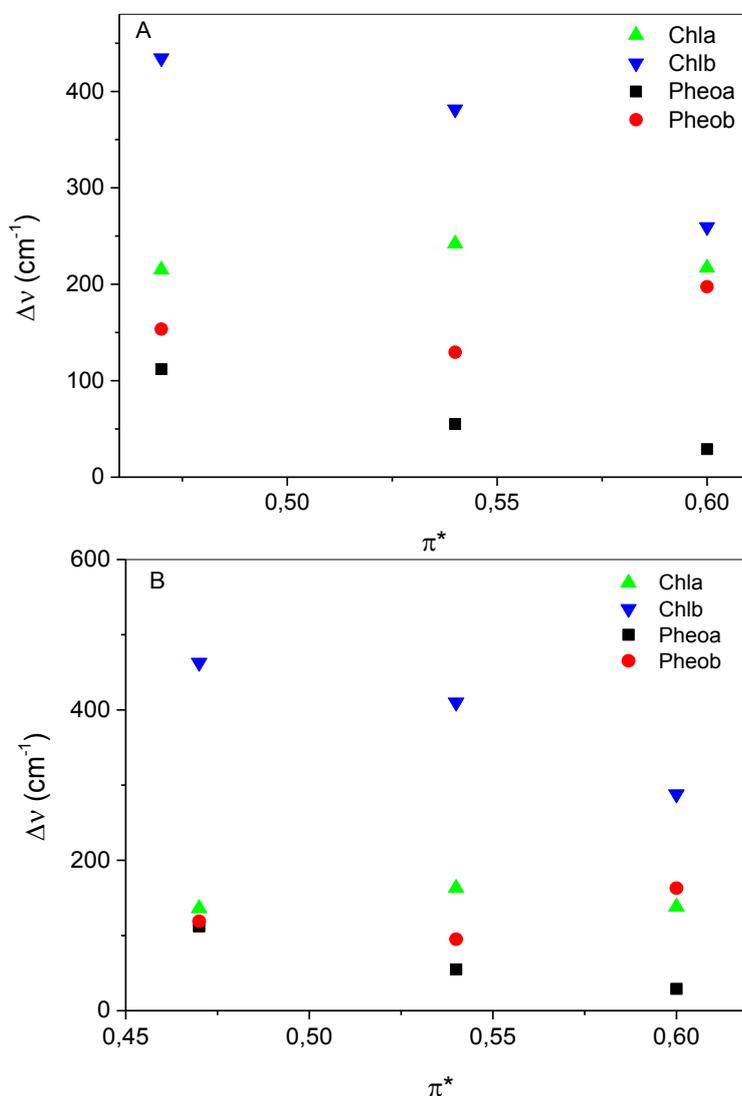
Tabela 3 - Parâmetros de Kamlet-Taft para os diferentes solventes (REICHARDT, 2003).

Solvente	α	β	π^*
Água	1,17	0,47	1,09
Metanol	0,98	0,66	0,60
Etanol	0,86	0,75	0,54
1-Butanol	0,84	0,84	0,47
ACN	0,19	0,40	0,66
ACE	0,08	0,48	0,62
DMF	0	0,69	0,88
DMSO	0	0,76	1,00
Tolueno	0	0,11	0,49

Devido as diferentes interações específicas entre as clorofilas com os solventes próticos e apróticos, as relações de $\Delta\nu$ com a escala π^* foram feitas separadamente (**Figura 25**). Como pode ser observado na **Figura 25**, o deslocamento de Stokes da Chlb e da Pheoa apresentaram uma diminuição com o aumento de π^* , enquanto a Chla e a Pheob mostraram um aumento. Por exemplo, para a Chla os valores de $\Delta\nu$ em tolueno e etanol foram de 115 e 163 cm^{-1} , respectivamente. O aumento do deslocamento de Stokes com o aumento da polaridade do solvente observado para a Chla e Pheob é uma tendência esperada. Isso porque os solventes polares levam a uma maior estabilização do dipolo do estado excitado, que é maior do que o dipolo do estado fundamental. O resultado contrário observado para a Chlb e a Pheoa pode ser devido a maior rigidez destes pigmentos em ambientes polares. Com relação à organização da molécula, quanto maior o número de modos de relaxação da molécula do estado excitado tem-se uma maior capacidade da molécula de distribuir o excesso de energia, aumentando o deslocamento de Stokes. No que se refere à Pheoa, molécula mais hidrofóbica dentre as estudadas, deve haver uma organização das moléculas em ambientes polares diminuindo os modos de relaxação e o deslocamento de Stokes nesses solventes. Além disso, este mesmo comportamento foi observado para a Chlb, pigmento mais hidrofílico dentre os estudados. Sugere-se para este caso a formação de agregados dirigidos pela interação do grupo $-\text{CHO}$ com o metal central, resultando na diminuição do deslocamento de Stokes com o aumento da polaridade.

Adicionalmente, destaca-se que o deslocamento de Stokes para a Chlb foi muito maior do que para as demais moléculas, enquanto os deslocamentos menos pronunciados foram observados para a feofitina *b*. Esses resultados, associados aos espectros de absorção e emissão, claramente evidenciam que as pequenas alterações estruturais das moléculas resultam em grandes alterações espectroscópicas das moléculas, além das interações específicas com os solventes.

Figura 25 – Variação nos deslocamento de Stokes dos pigmentos em função do parâmetro π^* de Kamlet-Taft para solventes polares próticos (A) e apróticos (B).



4.2 Rendimento quântico de fluorescência (Φ_F)

Através dos espectros de absorção e emissão de fluorescência também foi possível determinar o rendimento quântico de fluorescência das clorofilas e feofitinas, através da Equação 9 (**Tabela 4**). De modo geral, percebe-se que os pigmentos com grupo metila (a, $-\text{CH}_3$) apresentaram maiores valores de Φ_F em relação aos pigmentos com grupo aldeído (b, $-\text{CHO}$). Uma vez que os processos fotofísicos de desativação do estado excitado são competitivos, os menores valores de Φ_F para as clorofilas b podem ser relacionados ao favorecimento de outro processo, como a conversão interna, conversão intersistema para o estado tripleto, e/ou fotodegradação,

resultantes da presença do grupo $-CHO$ em relação ao $-CH_3$. Adicionalmente, as clorofilas metaladas mostraram rendimentos quânticos de fluorescência maiores do que as feofitinas desmetaladas. Os diferentes valores de Φ_F para as clorofilas metaladas devem-se às interações específicas ao metal, que pode coordenar-se a uma ou duas moléculas de solvente em suas posições axiais, alterando o número de coordenação do complexo. Como consequência da coordenação axial, a posição do metal em relação ao anel é alterada, modificando a geometria da molécula e suas propriedades fotofísicas, dentre as quais cita-se o Φ_F .

Tabela 4 - Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F) para os quatro pigmentos em diferentes solventes, a 25 °C e $\lambda_{exc} = 411$ nm.

Solvente	Φ_F			
	Chla	Chlb	Pheoa	Pheob
Água	0,00	0,00	0,02	0,00
Metanol	0,44	0,16	0,39	0,14
Etanol	0,48	0,16	0,33	0,13
1-Butanol	0,37	0,18	0,38	0,12
ACN	0,49	0,20	0,42	0,13
ACE	0,47	0,22	0,41	0,15
DMF	0,41	0,19	0,38	0,12
DMSO	0,51	0,13	0,38	0,16
Tolueno	0,35	0,17	0,32	0,13

Para melhor compreender o efeito de cada solvente em relação à emissão de fluorescência, os rendimentos foram relacionados ao parâmetro π^* do solvente (**Tabela 5**). Em geral, os valores de Φ_F para a Chla mostraram um incremento com o aumento de π^* , com exceção do DMF. Isto pode ser observado comparando tolueno, que possui o menor valor de π^* e resultou no menor rendimento quântico de fluorescência encontrado, e DMSO que possui maior π^* e resultou no maior rendimento de fluorescência. Um perfil similar ao observado para a Chla foi verificado para a Pheob. Como discutido na seção anterior a Chla e Pheob mostraram uma relação de solvatação similar com o aumento da polaridade do meio. Da mesma maneira, a relação de Φ_F com o parâmetro π^* mostrou o mesmo perfil difuso para a Chlb e Pheoa (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Correlação entre Φ_F e o parâmetro π^* para os pigmentos Chla, Chlb, Pheoa e Pheob.

Solvente	π^*	Φ_F			
		Chla	Chlb	Pheoa	Pheob
Tolueno	0,49	0,35	0,17	0,32	0,13
1-Butanol	0,47	0,37	0,18	0,38	0,12
Etanol	0,54	0,48	0,16	0,33	0,13
Metanol	0,60	0,44	0,16	0,39	0,14
ACE	0,62	0,47	0,22	0,41	0,15
ACN	0,66	0,49	0,20	0,42	0,13
DMF	0,88	0,41	0,19	0,38	0,12
DMSO	1,00	0,51	0,13	0,38	0,16
Água	1,09	0,00	0,00	0,02	0,00

Em água, os valores de Φ_F foram praticamente zero para todos os pigmentos, o que é esperado devido ao processo de autoagregação das moléculas, que levam ao processo de autossupressão de energia do estado excitado.

4.2.1 Tempo de vida de fluorescência (τ)

Perfis de decaimento de fluorescência em função do tempo foram obtidos para os pigmentos nos diferentes solventes, como exemplificado para a Pheoa em ACN na **Figura 26**, que também apresentam o IRF e o resíduo do ajuste de primeira ordem utilizado para determinar o tempo de vida. Os resultados obtidos para tempo de vida de fluorescência dos pigmentos metalados, Chla e Chlb, encontram-se na **Tabela 6**, e dos não-metalados, Pheoa e Pheob na **Tabela 7**.

De forma geral, observa-se que os tempos de vida dos pigmentos do tipo *b* são significativamente inferiores aos tempos de vida dos pigmentos do tipo *a*, o que está em concordância com os valores de tempo de vida de fluorescência citados na literatura (PFARRHERR, 1991; CONNOLLY, 1982) Em água não foi possível determinar o τ_F , já que ocorre auto-agregação e conseqüente supressão da fluorescência.

Figura 26 – Perfil de decaimento de fluorescência para a Pheoa em ACN e resíduo do ajuste cinético de 1ª ordem.

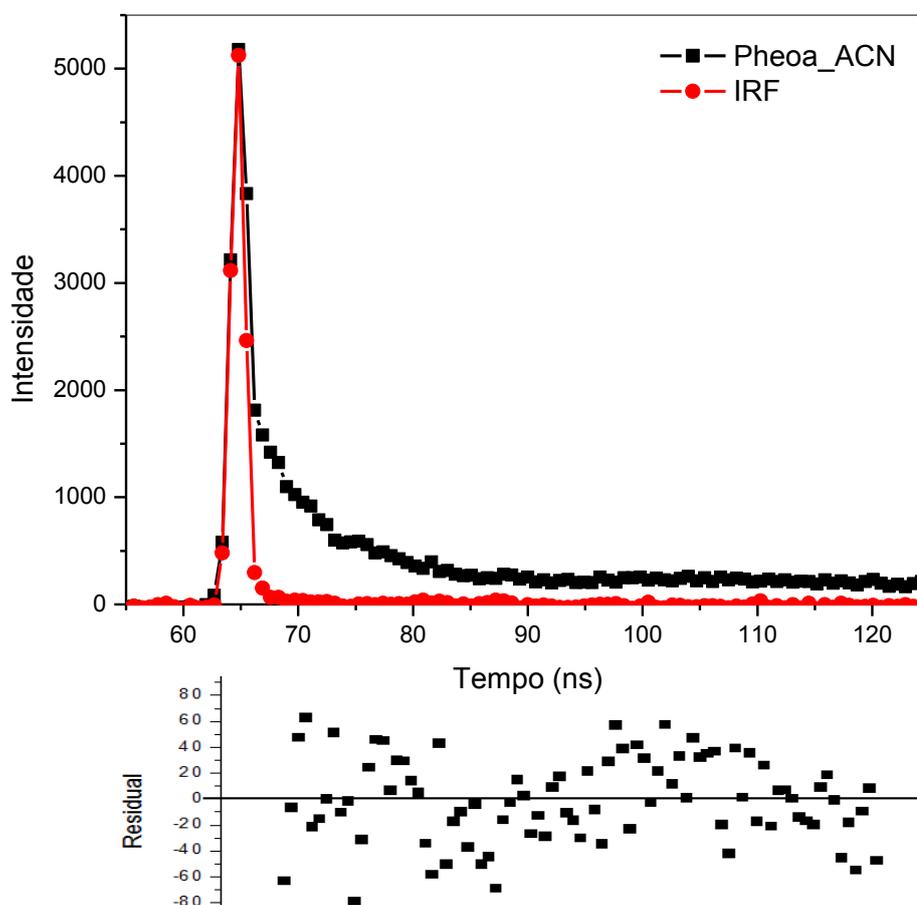


Tabela 6 - Tempos de vida de fluorescência (τ_F) para Chla e Chlb.

Solvente	Chla			Chlb		
	τ_F (ns)	Erro	R ²	τ_F (ns)	Erro	R ²
Água	-	-	-	-	-	-
Metanol	5,99	0,16	0,99	2,11	0,09	0,99
Etanol	6,88	0,39	0,99	3,34	0,29	0,98
1-Butanol	6,48	0,32	0,99	3,64	0,15	0,99
ACN	6,79	0,35	0,99	2,94	0,16	0,99
ACE	6,51	0,35	0,99	3,14	0,15	0,99
DMSO	6,14	0,55	0,97	3,43	1,15	0,78
Tolueno	6,57	0,19	0,99	2,97	0,19	0,99

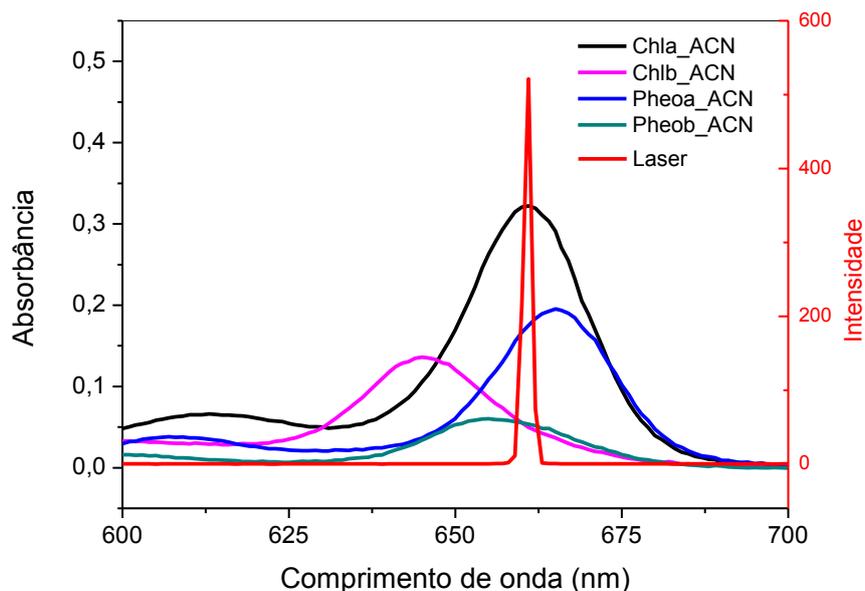
Tabela 7 - Tempos de vida de fluorescência (τ_F) para Pheoa e Pheob.

Solvente	Pheoa			Pheob		
	τ_F (ns)	Erro	R ²	τ_F (ns)	Erro	R ²
Água	-	-	-	-	-	-
Metanol	6,31	0,26	0,99	2,13	0,16	0,99
Etanol	6,93	0,27	0,99	3,41	0,33	0,97
1-Butanol	6,17	0,15	0,99	3,58	0,29	0,99
ACN	6,93	0,19	0,99	2,42	0,10	0,99
ACE	7,46	0,45	0,98	3,66	0,38	0,98
DMF	7,61	0,34	0,99	2,99	0,29	0,99
DMSO	7,85	0,65	0,97	4,87	0,64	0,96
Tolueno	6,58	0,15	0,99	3,85	0,26	0,99

4.3 Rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB})

Os processos de fotodegradação dos pigmentos foram acompanhados com o tempo de exposição à luz vermelha ($\lambda_{max} = 660$ nm, P= 100 mW).

Figura 27 – Sobreposição dos espectros de absorção dos pigmentos em acetonitrila com o espectro de emissão do LASER ($\lambda_{max} = 660$ nm, P = 100 mW).



Como pode ser observado na **Figura 27**, os espectros de absorção de todos os pigmentos mostraram sobreposição com o espectro de emissão da fonte de

iluminação. Em uma análise qualitativa, tem-se uma maior capacidade da Chla absorver a radiação incidida e o contrário é observado para a Chlb. Estes fatos são decorrentes de duas características espectroscópicas dos pigmentos: i) coeficiente de absorvidade molar, e ii) comprimento de onda de absorção máximo. Os valores de potência absorvida (P_{abs} , mW) para as clorofilas são mostradas na **Tabela A3** (apêndice).

Tabela 8 - Constantes de velocidade (k_{FB}) da banda Q para Chla e Chlb.

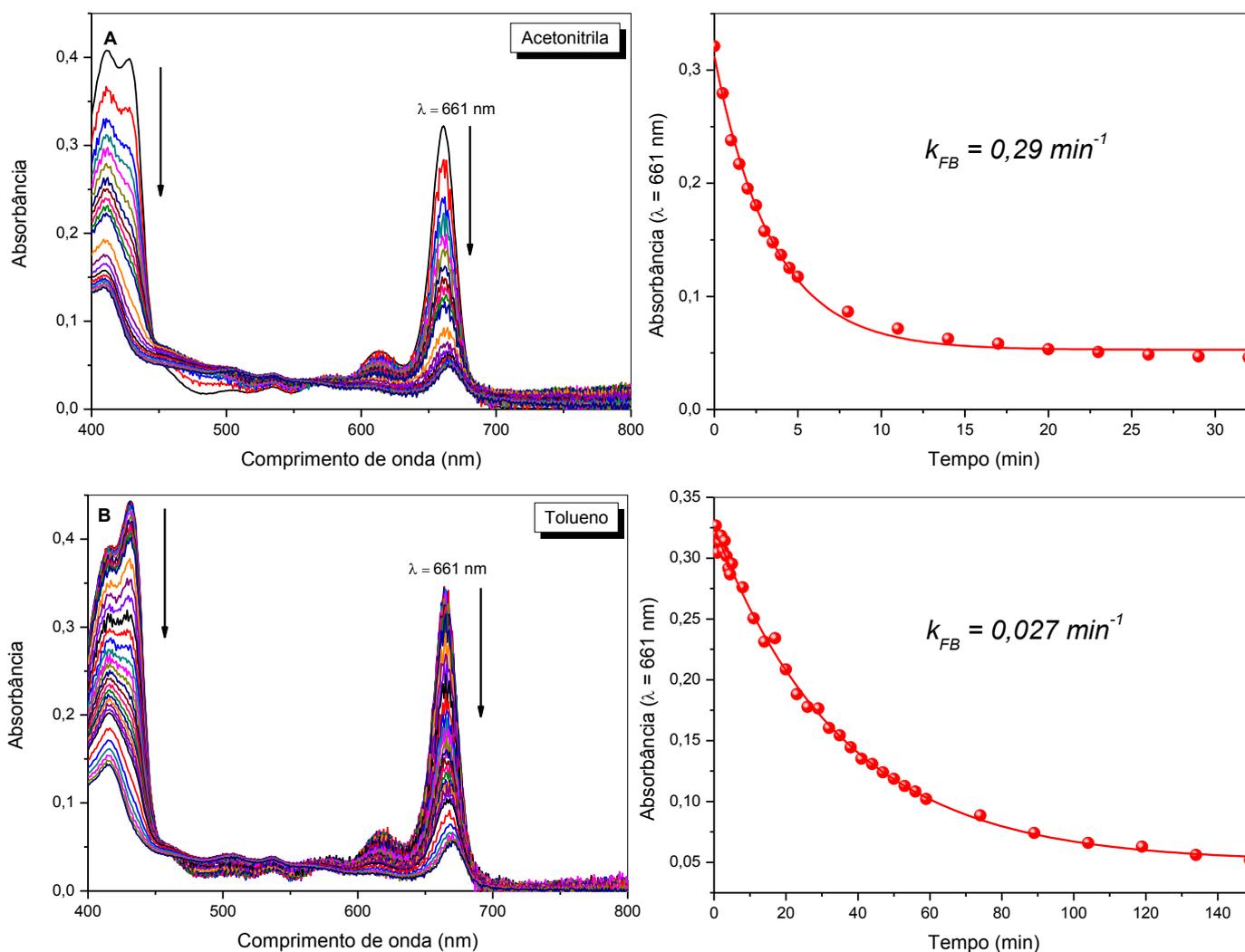
Solvente	k_{FB} (10^{-2} min^{-1})		Φ_{FB}	
	Chla	Chlb	Chla	Chlb
Tolueno	2,73	0,89	0,007	0,008
1-Butanol	13,23	6,47	0,034	0,043
ACN	29,12	7,41	0,069	0,069
Etanol	12,70	3,15	0,032	0,019
Metanol	15,12	3,12	0,034	0,020
DMF	25,01	8,44	0,063	0,066
ACE	6,41	2,11	0,015	0,022
DMSO	1,34	1,85	0,003	0,010
Água	3,01	0,85	0,015	0,011

As clorofilas metaladas mostraram fotobranqueamento intenso frente à luz, enquanto as feofitinas mostraram-se muito estáveis quando submetidas à iluminação (**Figura A5**). As constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) para Chla e Chlb foram obtidas pelo ajuste cinético de primeira ordem analisando a diminuição da absorção na banda Q (**Tabela 8**). Os valores de k_{FB} foram utilizados para o cálculo de Φ_{FB} perante a Equação 11 (**Tabela 8**). Os valores de k_{FB} mostram uma velocidade de degradação mais rápida para a Chla em relação à Chlb. Contudo este fato é consequência da maior quantidade de fótons absorvidos para a Chla (Tabela A3). Analisando os rendimentos quânticos de fotobranqueamento nota-se uma tendência geral de que, em praticamente todos os meios, o Φ_{FB} é maior para a Chlb em relação à Chla. Levando-se em conta que os processos de desativação são competitivos, este resultado está de acordo com aqueles obtidos para Φ_F , pois a Chla apresenta maior contribuição de desativação via emissão de fluorescência. Adicionalmente, ao se

comparar os valores de Φ_F e de Φ_{FB} tem-se que os primeiros são muito mais importantes para a desativação do estado excitado das clorofilas, com valores de rendimentos quânticos até 50x maiores.

Pode-se observar uma grande dependência da velocidade das fotorreações com o solvente avaliado (**Tabela 8**). Por exemplo, ao se comparar os processos de fotobranqueamento para a Chla em acetonitrila e tolueno (**Figura 28**) tem-se que a reação se completou em um menor tempo no solvente mais polar – acetonitrila –, sendo muito mais lenta em tolueno. Isso se reflete nas constantes de velocidade encontradas, de maior valor para acetonitrila ($k_{CHLA,ACN} = 0,29 \text{ min}^{-1}$ e $k_{CHLA,TOL} = 0,027 \text{ min}^{-1}$). O mesmo comportamento foi observado para a clorofila *b* (**Tabela 8**).

Figura 28 - Espectros de absorção eletrônica da Chla e cinética de fotobranqueamento, em acetonitrila (A) e tolueno (B), na faixa de comprimento de onda de 400-800 nm. $[Chla] = 3,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



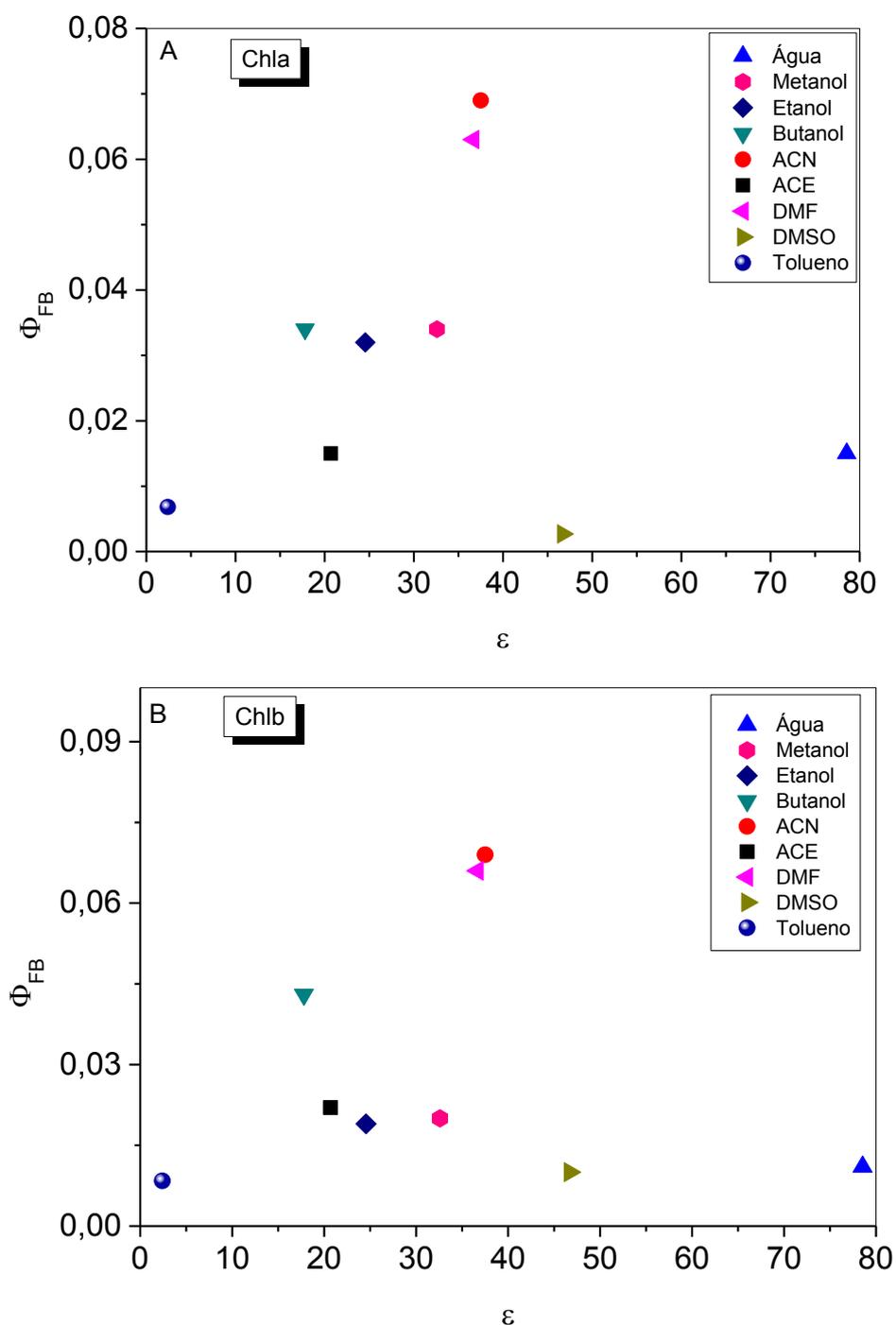
Para melhor compreender a influência de cada meio, associaram-se os valores de Φ_{FB} obtidos com as constantes dielétricas de cada solvente. Observa-se para a Chla na **Figura 29** uma tendência em aumentar o rendimento quântico de fotobranqueamento com o aumento da constante dielétrica do solvente. Isso porque, os solventes com menor momento de dipolo são menos eficientes na estabilização das espécies intermediárias, aumentando a estabilidade do pigmento. Por outro lado, os solventes mais polares favoreceram a fotodegradação. Pode-se justificar este comportamento a partir do que se conhece atualmente sobre mecanismos destas reações, que indicam a formação de intermediários iônicos no processo de fotobranqueamento. Levando-se em conta esta informação, pode-se afirmar que solventes de maior constante dielétrica são capazes de estabilizar tais intermediários com maior eficiência, aumentando seu tempo de vida, se comparados aos solventes menos polares, onde nota-se um menor rendimento de reação. (Spikes, 1992)

Em meio aquoso o rendimento quântico de fotobranqueamento da Chla foi muito pequeno e não seguiu a tendência observada para a maioria dos solventes. Esse fato pode ser relacionado ao processo de autoagregação que levou à supressão dos processos fotofísicos e fotoquímicos. Isso também foi observado para a Chlb na **Figura 29**.

A relação da constante dielétrica dos solventes com os rendimentos quânticos de fotobranqueamento da Chlb (**Figura 29**) mostrou um comportamento distinto ao observado para a Chla, de maneira que alguns solventes mostraram a mesma tendência, enquanto metanol e etanol parecem estabilizar esta clorofila. Estes efeitos ainda não estão claros, mas podem estar relacionados com as interações específicas dos solventes com o grupo $-CHO$.

Cabe aqui destacar o efeito, aparentemente contrário do dimetilsulfóxido, que apesar de ser um dos solventes mais polares apresentou rendimentos quânticos de fotobranqueamentos muito baixos, contrariando a tendência proposta. Para justificar este comportamento, ressalta-se o fato que o DMSO é um excelente captor de radicais $\bullet OH$, indicando a importância desta espécie no mecanismo de fotodegradação das clorofilas.

Figura 29 - Correlação entre as constantes dielétricas dos solventes e os valores de Φ_{FB} da Chla (A) e Chlb (B).

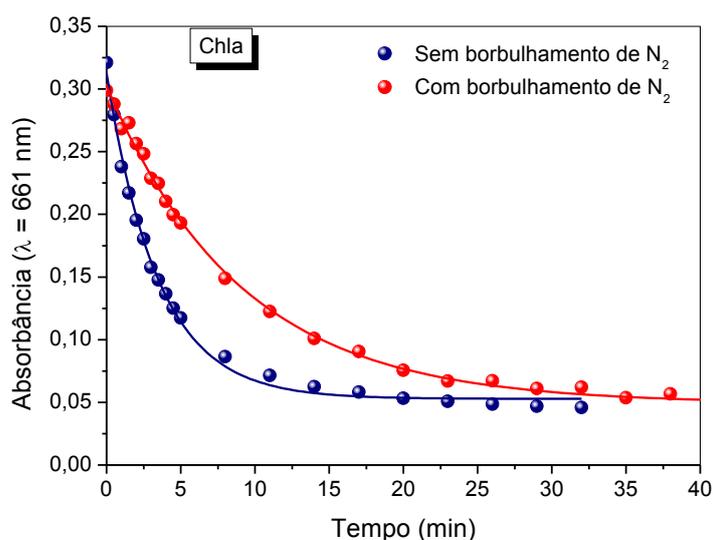


4.3.1 Avaliação da participação de espécies reativas de oxigênio nos mecanismos de fotodegradação através do borbulhamento de nitrogênio

Um dos possíveis mecanismos que comandam o processo de fotobranqueamento, muito citado na literatura, é o do Tipo II, também chamado

mecanismo de auto-destruição das Chls, onde a degradação do pigmento ocorre a partir de sua reação com o oxigênio singlete, gerado pelo próprio substrato. Além disso, pode-se ter o mecanismo do Tipo I que leva a formação de espécies radicalares de oxigênio (EROS). Para que o pigmento possa gerar estas espécies reativas de oxigênio, é necessário que haja uma quantidade de oxigênio no estado fundamental triplete dissolvido na solução. Desta forma, ao borbulhar nitrogênio a concentração de $O_{2(g)}$ é reduzida na solução, podendo assim avaliar este efeito no rendimento quântico de fotobranqueamento. É importante destacar que o solvente escolhido para esta análise foi a acetonitrila, pois é onde foram obtidos os maiores rendimentos quânticos de fotobranqueamento. As cinéticas de fotobranqueamento para a Chla em acetonitrila com e sem o borbulhamento de N_2 são apresentadas na **Figura 30**.

Figura 30 - Cinéticas de fotodegradação da Chla com e sem o borbulhamento de $N_{2(g)}$. $[Chla] = 3,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



Percebe-se que a velocidade de fotobranqueamento diminui consideravelmente na presença de N_2 . Para melhor avaliar estes resultados calcularam-se as constantes de velocidade de fotobranqueamento e os valores de rendimento quântico de fotobranqueamento (**Tabela 9**).

Como se pode ser observado na **Tabela 9**, nas cinéticas em ambiente com baixa disponibilidade de O_2 houve uma redução significativa tanto das constantes de velocidade de fotobranqueamento, quanto do valor absoluto dos rendimentos quânticos, para ambos os pigmentos. O resultado é interessante, pois as constantes

de velocidade no ambiente saturado de nitrogênio (com baixa disponibilidade de O₂) sofrem uma redução de 2,6 vezes em ambas as cinéticas em Chla e Chlb – $k_{\text{CHLA,ACN}} = 0,2906$ e $k_{\text{CHLB,ACN}} = 0,0741$. Ao mesmo passo ocorre a redução dos valores de Φ_{FB} , que sofre uma redução de 2,5 vezes para a Chla ($\Phi_{\text{FBCHLA,ACN}} = 0,069$, anterior) e de 1,6 vezes para a Chlb ($\Phi_{\text{FBCHLB,ACN}} = 0,069$). Estes resultados indicam que as espécies reativas de oxigênio participam do processo de degradação.

Vários trabalhos da literatura relacionam a fotodegradação ou fotoproteção das clorofilas com a formação de oxigênio singlete. (BONNETT, 2001; FIEDOR, 2017)

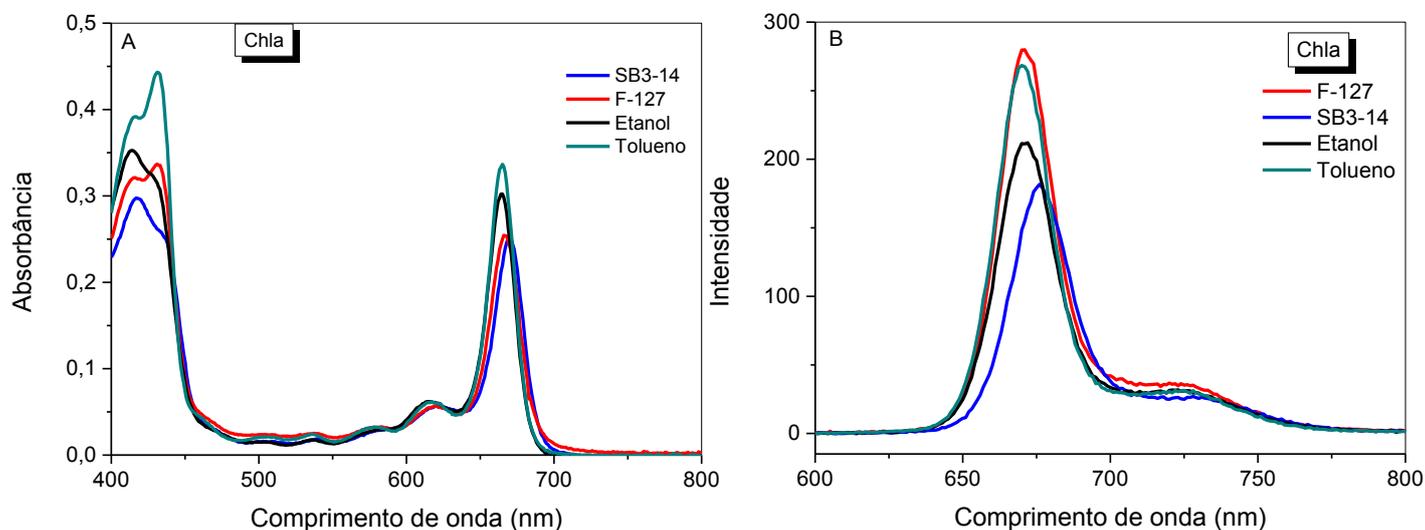
Tabela 9 - Constantes de velocidade (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (Φ_{FB}) para os pigmentos metalados Chla e Chlb em acetonitrila, sob borbulhamento de N_{2(g)}.

Pigmento	k_{FB} (min ⁻¹)	Φ_{FB}
	Acetonitrila (N ₂)	
Chla	0,1119	0,028
Chlb	0,0252	0,042

4.4 Fotoproteção das clorofilas em modelos biomiméticos de membrana simples

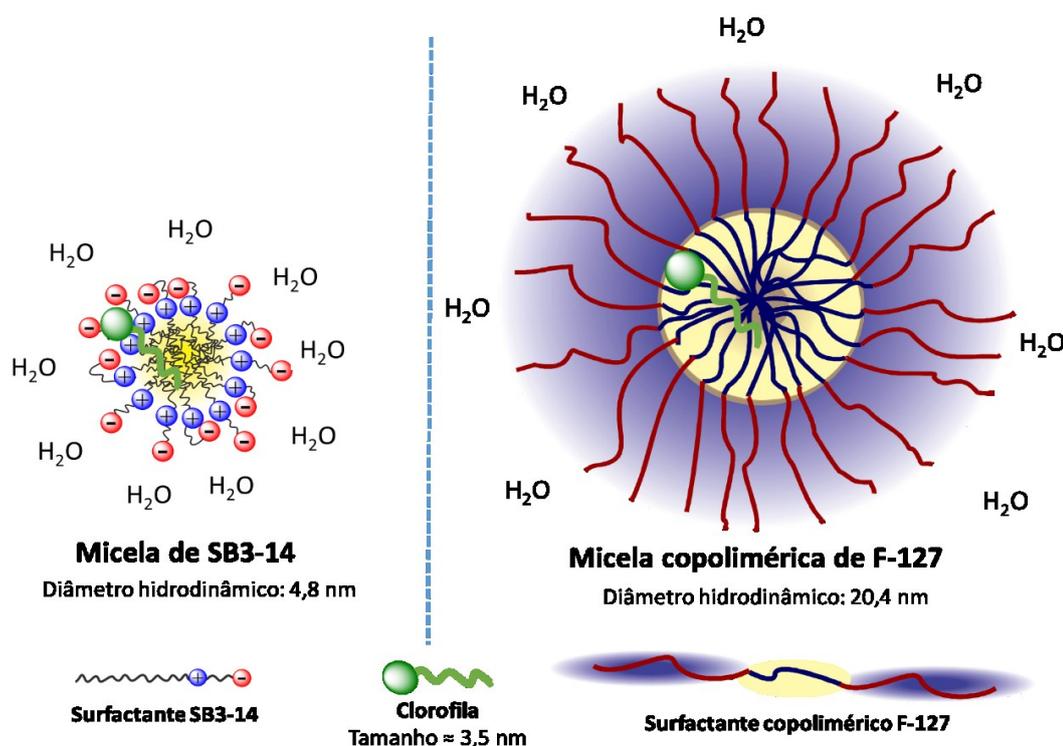
Utilizou-se de sistemas micelares como modelos de membrana simples para avaliação da fotoestabilidade das clorofilas em meio aquoso. Os espectros de absorção e de emissão das clorofilas foram dependentes do sistema micelar (**Figura 31**), mostrando uma relação com os tipos de solvatação específicos observados nos solventes. Por exemplo, para a Chla em F-127 o perfil da banda de Soret é equivalente aos solventes apróticos como o tolueno, indicando um solvato do tipo L1, enquanto para a Chla em SB3-14 o perfil da banda de Soret é similar aos solventes próticos como o etanol, indicando um tipo solvato do tipo L1H. As características espectrais distintas indicam uma localização das clorofilas em ambientes com diferentes polaridades e diferentes acessibilidades às moléculas de água.

Figura 31 - Espectros de absorção eletrônica (A) e de emissão de fluorescência (B) da Chla nos meios micelares SB3-14 e F-127, e em dois solventes de comparação, etanol e tolueno.



O tipo de solvato em F-127 indica a incorporação da Chla em um ambiente mais hidrofóbico, no caso na parte interna da micela constituída de grupos de óxido de propileno (**Figura 32**) capaz de se coordenar axialmente ao metal, na qual as moléculas são inacessíveis e evita-se a formação de ligação hidrogênio. Por outro lado, as características espectrais da Chla em SB3-14 são condizentes com uma localização da parte cromofórica da molécula na parte externa da micela acessível ao ambiente aquoso, resultando no solvato L1H, onde se tem ligações hidrogênio com moléculas de água. Esta diferença na posição em que a clorofila se encontra no interior das micelas pode ser explicada pelo tamanho relativo das mesmas. Devido ao fato de as micelas de SB3-14 possuírem diâmetro relativamente pequeno, em torno de 4,8 nm (NOME, 2011), tamanho aproximado do diâmetro das moléculas de clorofila (em torno de 3,5 nm), a inserção completa dos pigmentos no interior daquelas é dificultado, havendo a possibilidade de parte da molécula de clorofila estar ainda exposta ao ambiente aquoso. Por outro lado, as micelas poliméricas constituídas de moléculas de F-127 possuem diâmetro de aproximadamente 20 nm (COSTA, 2019), tamanho quatro vezes maior em relação às micelas de SB3-14, o que significa que comportam as moléculas de pigmento de forma mais eficiente.

Figura 32 - Representação da molécula de clorofila na micela zwitteriônica de SB3-14 (à esquerda) e no interior da micela polimérica de F-127 (à direita). (COSTA, 2019; NOME, 2011)



As propriedades espectroscópicas, fotofísicas e fotoquímicas das clorofilas *a* e *b* em sistemas micelares de SB3-14 e F-127 são apresentadas na **Tabela 10**, enquanto os valores para Pheo *a* e Pheo *b* são mostrados na **Tabela A5** (apêndice). Em ambientes micelares aquosos observou-se um alto rendimento quântico de fluorescência, indicando a solubilização das clorofilas na forma monomérica. Para os pigmentos metalados observou-se os menores rendimentos de fluorescência em F-127 ($\Phi_{\text{FCHLA},\text{F-127}} = 0,26$ e $\Phi_{\text{FCHLB},\text{F-127}} = 0,10$), se comparado à SB3-14, onde $\Phi_{\text{FCHLA},\text{SB3-14}} = 0,42$ e $\Phi_{\text{FCHLB},\text{SB3-14}} = 0,19$. Estes valores tem uma relação direta com a polaridade do microambiente no qual as clorofilas são incorporadas, e as interações específicas com os meios. Neste sentido, os pigmentos em SB3-14 experimentam o ambiente mais polar de todos, a água, quando dissolvidos nesta micela. Como já relacionado anteriormente para a seção de solventes, a constante dielétrica é um parâmetro que está diretamente relacionado ao rendimento quântico de fluorescência, onde os ambientes mais polares favorecem seu aumento. Sendo assim, justificam-se os valores altos encontrados para os pigmentos na micela de SB3-14, que experimentam o ambiente mais polar, em sua forma monomérica. Para os pigmentos desmetalados,

os rendimentos quânticos de fluorescência também foram maiores para os compostos em ambiente de SB3-14.

Tabela 10 – Propriedades fotofísicas e fotoquímicas obtidas experimentalmente para Chla e Chlb nos sistemas micelares de SB3-14 e F-127.

	Chla		Chlb	
	SB3-14	F-127	SB3-14	F-127
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	138	136	496	594
Φ_F	0,42	0,26	0,19	0,10
τ_F (ns)	5,2	5,0	2,5	1,4
k_{FB} (min ⁻¹)	0,36	0,038	0,25	0,052
Φ_{FB}	0,11	0,012	0,16	0,047

Em relação a estabilidade frente à luz, os pigmentos metalados foram avaliados nos meios micelares como modelos miméticos de representação simples da membrana vegetal. Os resultados apresentados na **Tabela 10** mostram que para o meio com micelas de SB3-14 foram encontrados os maiores valores de Φ_{FB} (0,11 e 0,16 para Chla e Chlb, respectivamente), indicando que as clorofilas solubilizadas na parte externa das micelas apresentam maior susceptibilidade à fotodegradação. Como foi explicado anteriormente, as micelas de SB3-14 possuem um tamanho pequeno. Portanto o pigmento se encontra em uma posição que permite o contato com o ambiente externo, a água. Isto pode causar alteração nas propriedades fotofísicas, em medidas de Φ_{FB} e tempo de vida, já que, apesar de estar em sua forma monomérica e não mais agregada, o pigmento ainda sofre influência da água, sendo responsável pelos altos valores de Φ_{FB} encontrados. Salienta-se que em água pura os valores de Φ_{FB} foram extremamente baixos, o que é justificado pelo fato que os processos fotoquímicos são muito desfavorecidos para os pigmentos agregados. Por outro lado, em micelas poliméricas do surfactante F-127 os pigmentos apresentaram rendimentos quânticos de fotobranqueamento muito pequenos com relação ao SB3-14. Estes resultados são consequência da localização das Chls na parte interna hidrofóbica da micela e inacessíveis às moléculas de água. Logo, pode-se dizer que as micelas de F-127 atuaram como um modelo mimético de fotoproteção de clorofilas, enquanto as micelas de SB3-14 favorecem os processos de fotodegradação. Essas

diferenças observadas para os diferentes modelos de membrana são consequência das localizações relativas nas micelas e das solvatações específicas com o meio.

5. CONCLUSÕES

As propriedades espectroscópicas dos pigmentos fotossintéticos derivados das clorofilas metaladas (Chla e Chlb) e desmetaladas (Pheoa e Pheob) foram dependentes das interações específicas com o meio em que se encontram solvatadas, apresentando alterações quando em solventes próticos, devido à formação de ligações de hidrogênio com a parte cromofórica da molécula, que não ocorre em solventes apróticos. Além disso, solventes nucleofílicos podem coordenar-se de forma axial ao metal central. É importante destacar a presença do grupo aldeído na Chlb, que possibilita a formação de ligação de hidrogênio adicional quando em solvente prótico. Para as feofitinas desmetaladas os efeitos de solvatação são os não específicos e de ligação de hidrogênio.

Os efeitos de solvatação específica também influenciaram as propriedades fotofísicas das clorofilas, como rendimentos quânticos e tempo de vida de fluorescência. De forma geral, as clorofilas metaladas apresentaram Φ_F superiores às não metaladas, já que a presença do metal permite a coordenação com moléculas de solventes, alterando o número de coordenação do composto, e conseqüentemente algumas de suas propriedades fotofísicas. Por sua vez, as clorofilas do tipo *b* apresentaram rendimentos quânticos de fluorescência menores em relação às do tipo *a*, o que pode estar relacionado ao favorecimento de outros processos de desativação do estado excitado competitivos.

Em relação à estabilidade dos pigmentos frente à luz, as feofitinas mostraram-se fotoestáveis enquanto as clorofilas sofreram processo de fotobranqueamento. Na maior parte dos meios avaliados, o rendimento quântico de fotobranqueamento (Φ_{FB}) foi maior para as clorofilas do tipo *b*. Destaca-se também a importância da polaridade do meio neste processo, já que para meios mais polares o pigmento mostrou os maiores rendimentos quântico de fotobranqueamento, enquanto os menores valores de Φ_{FB} foram observados em meio apolar. O mecanismo de fotodegradação foi avaliado através da utilização de agentes sequestrantes de espécies reativas de oxigênio e de oxigênio singlete. As evidências indicaram que a fotodegradação é conseqüência das espécies radicalares de oxigênio, não sendo verificada a participação efetiva de oxigênio singlete (1O_2) no mecanismo de foto-oxidação.

No que se refere aos sistemas micelares avaliados como modelos miméticos de membranas para fotoproteção das clorofilas, verifica-se que as micelas plurorônicas de F-127 atuaram como fotoprotetor, enquanto micelas zwitteriônicas de SB3-14 levaram a maior fotodegradação dos pigmentos. Este resultado foi relacionado tanto ao tipo quanto ao tamanho das micelas, já que surfactantes poliméricos como F-127 proporcionam um tamanho micelar quatro vezes maior do que os zwitteriônicos SB3-14, conferindo uma melhor acomodação do pigmento, o que evita contato do anel clorínico com o ambiente aquoso externo. As interações específicas das clorofilas com os ambientes micelares possibilitam entender e controlar a fotoestabilidade destas moléculas em meio aquoso, possibilitando o planejamento de aparatos fotossintéticos artificiais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, E. S. Caracterização elétrica e óptica de transições de fase em colóides e microemulsões. **Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, BA**, 2009.

ARONOFF, S. **The Chlorophylls: An Introductory Survey**. New York: Academic Press, 1966. 679 p.

AVELINE, B.; HASAN, T.; REDMOND, R. W. Photophysical and Photosensitizing Properties of Benzoporphyrin Derivative Monoacid Ring A (BPD-MA). **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p.328-335, mar. 1994. Wiley.

BALZANI, V.; CERONI, P.; JURIS, A. **Photochemistry and Photophysics: Concepts, Research, Applications**. Weinheim: Wiley-vch, 2014. 472 p.

BAR-COHEN, Y. **BIOMIMETICS: Biologically Inspired Technologies: Introduction to Biomimetics: The Wealth of Inventions in Nature as an Inspiration for Human Innovation**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006. 560 p.

BENYUS, J. M. **Biomimicry: Innovation Inspired by Nature**. New York: Harpercollins, 1998. 302 p.

BEZDETNAYA, L. et al. Spectroscopic and Biological Testing of Photobleaching of Porphyrins in Solutions. **Photochemistry and Photobiology**, Moscow, v. 64, n. 2, p.382-386, ago. 1996. Wiley.

BONNETT, R.; MARTÍNEZ, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, London, v. 57, n. 47, p.9513-9547, nov. 2001. Elsevier BV.

BUNTON, C.A; MOFFATT, J.R. Dephosphorylation in zwitterionic micelles of amine oxide betainesulfonate surfactants. **Journal of Organic Chemistry**. 1987, 52, p. 3832 – 3835.

BURDZINSKI, G. et al. **Organic Photochemistry and Photophysics**. Boca Raton: Taylor & Francis Group, Llc, 2006. 287 p.

CARPENTIER, R.; LEBLANC, R. M. Chlorophyll Photobleaching in Pigment-Protein Complexes. n. 41, p.284-290, out. 1985.

CONNOLLY, J. S.; JANZEN, A. F.; SAMUEL, E. B.. Fluorescence Lifetimes of Chlorophyll a: Solvent, Concentration and Oxygen Dependence. **Photochemistry And Photobiology**, v. 36, n. 5, p.559-563, nov. 1982

COSTA, P. F.A. et al. Chlorophylls B formulated in nanostructured colloidal solutions: Interaction, spectroscopic, and photophysical studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 274, p.393-401, jan. 2019. Elsevier BV.

COYLE, J. D. **Introduction to Organic Photochemistry**. Grã-bretanha: Wiley, 1989. 176 p.

DOUSSIN, S. et al. Novel Zwitterionic Reverse Micelles for Encapsulation of Proteins in Low-Viscosity Media. **Chemistry - A European Journal**, v. 12, n. 15, p.4170-4175, 2006. Wiley.

DRZEWIECKA-MATUSZEK, A. et al. Effects of heavy central metal on the ground and excited states of chlorophyll. **Jbic Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 5, p.453-462, 2005. Springer Science and Business Media LLC.

FIEDOR, L.; KOTKOWIAK, M.; DUDKOWIAK, A. Intrinsic Photoprotective Mechanisms in Chlorophylls. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 56, n. 35, p.10457-10461, 25 jul. 2017. Wiley.

FREDJ, A. B.; LAKHDAR, Z. B.; RUIZ-LÓPEZ, M.f. Six-coordination in Chlorophylls: The fundamental role of dispersion energy. **Chemical Physics Letters**, v. 472, n. 4-6, p.243-247, abr. 2009. Elsevier BV.

GRAETZEL, M; KALYANASUNDARAM, K. Artificial photosynthesis: biomimetic approaches to solar energy conversion and storage. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 3, p.298-310, jun. 2010. Elsevier BV.

GRIMM, B. et al. **Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications**. Arizona: Springer, 2006. 605 p.

GEROLA, A. **Estudos Fotofísicos e Fotodinâmicos da clorofila a e derivados formulados em micelas poliméricas e lipossomos**. 2013. 168 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

GEROLA, A. et al. Properties of Chlorophyll and Derivatives in Homogeneous and Microheterogeneous Systems. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 115, n. 22, p.7364-7373, 9 jun. 2011. American Chemical Society (ACS).

GOEDHEER, J. C. **The Chlorophylls: Visible Absorption and Fluorescence of Chlorophyll and Its Aggregates in Solution**. New York: Academic Press, 1966. 679 p.

GRUSZECKI, W. I.; SIELEWIESIUK, J. Galactolipid multibilayers modified with xanthophylls: orientational and diffractometric studies. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1069, n. 1, p.21-26, out. 1991. Elsevier BV.

HUANG, S. et al. Folate-mediated chondroitin sulfate-Pluronic® 127 nanogels as a drug carrier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, p.64-73, ago. 2009. Elsevier BV.

KRAWCZYK, S. The effects of hydrogen bonding and coordination interaction in visible absorption and vibrational spectra of chlorophyll a. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, [s.l.], v. 976, n. 2-3, p.140-149, set. 1989. Elsevier BV.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006. 954 p.

LESHEM, Y. Y.; SHEWFELT, R. L.; PANTOJA, O. **Plant Membranes: A biophysical approach to structure, development and senescence.** Springer-science+business Media, B.v., 1992. 266 p.

MAFI, A.; HU, D.; CHOU, K. C.. Interactions of Sulfobetaine Zwitterionic Surfactants with Water on Water Surface. **Langmuir**, v. 32, n. 42, p.10905-10911, 12 out. 2016. American Chemical Society (ACS).

LI, Y. et al. Pluronic micelle-encapsulated red-photoluminescent chlorophyll derivative for biocompatible cancer cell imaging. **Dyes And Pigments**, v. 136, p.17-23, jan. 2017.

MANIASSO, N. Ambientes Micelares em Química Analítica, **Química Nova**, 24, 87-93, 2001.

MILLER, N.; CARPENTIER, R. Energy Dissipation and Photoprotection Mechanisms During Chlorophyll Photobleaching in Thylakoid Membranes. **Photochemistry And Photobiology**, v. 54, n. 3, p.465-472, set. 1991.

MOORE, D. E. **The Photostability of Drugs and Drug Formulations: Photophysical photochemical and aspects of drug stability.** London: Taylor & Francis Ltd, 2003.

MOROI, Y. **Micelles: Theoretical and Applied Aspects.** 1. Ed. Springer, 1992.

MUNNÉ-BOSCH, S.; ALEGRE, L. The Function of Tocopherols and Tocotrienols in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, n. 1, p.31-57, jan. 2002. Informa UK Limited.

MYERS, D. Surfaces, Interfaces and Colloids: Principles and Applications, 2nd Edition. 2.ed. **Wiley-VCH**, 1999.

NAJAFPOUR, M. M. et al. **Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications.** Cham: Springer International Publishing, 2017. 417 p.

NOME, F. et al. The Chameleon-Like Nature of Zwitterionic Micelles: Effect of Cation Binding. **Langmuir**, v. 28, n. 3, p.1758-1764, 11 jan. 2012. American Chemical Society (ACS).

PFARRHERR, A. et al. Chlorophyll b in solution: fluorescence lifetimes, absorption and emission spectra as criteria of purity. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.35-41, abr. 1991. Elsevier BV.

RAMESH, C.; MOHANRAJU, R.. A Review on Bioluminescence and its Applications. **International Journal Of Luminescence And Applications**, Kalapet, v. 5, n. 1, p.45-46, fev. 2015.

REDMOND, R. W.; GAMLIN, J. N. A Compilation of Singlet Oxygen Yields from Biologically Relevant Molecules. **Photochemistry And Photobiology**, v. 70, n. 4, p.391-475, out. 1999. Wiley.

REICHARDT, C. **Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry**. 3. ed. Weinheim: Wiley-vch, 2003. 239 p.

ROHATGI-MUKHERJEE, K. K. **Fundamentals of Photochemistry**. Michigan: John Wiley & Sons, 1978.

SANDELIUS, A. S.; ARONSSON, H. **The Chloroplast: Interactions with the Environment**. 13. ed. Heidelberg: Springer, 2009. 299 p.

SCHEER, H. **Chlorophylls**. Michigan: Crc-press, 1991. 1257 p.

SCHMITT, O.H. **Some Interesting Useful Biomimetic Transforms**. Proceedings of the Third International Biophysics Congress, Boston, MA, USA, 29 August–3 September 1969; p. 297

SOARES, R. **Estudo de propriedades da Clorofila a e da Feofitina a visando a Terapia Fotodinâmica**. 2006. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Química, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006.

SPIKES, J. D. **The Science of Photobiology: Photosensitization**. New York: Plenum Publishing Corporation, 1977. 430 p.

SPIKES, J. D. Quantum Yields and Kinetics of the Photobleaching of Hematoporphyrin, Photofrin II, Tetra(4-Sulfonatophenyl)-Porphine and Uroporphyrin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 39, n. 6, p.797-808, jun. 1992. Wiley.

STRAIN, H. H. WALTER, A.S. **The Chlorophylls: Extraction, Separation, Estimation and Isolation of the Chlorophylls**. New York: Academic Press, 1966. 679 p.

SUPPAN, P. **Chemistry and Light**. Cambridge: The Royal Society Of Chemistry, 1994. 295 p.

SZILÁGYI, A.; SELSTAM, E.; ÅKERLUND, H. Laurdan fluorescence spectroscopy in the thylakoid bilayer: The effect of violaxanthin to zeaxanthin conversion on the galactolipid dominated lipid environment. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, v. 1778, n. 1, p.348-355, jan. 2008. Elsevier BV.

TANFORD, C. Theory of Micelle Formation in Aqueous-Solutions, **Journal of Physical Chemistry**, 78, 2469-2479, 1974.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence Principles and Applications**. Weinheim: Wiley-vch, 2002. 380 p.

VLADKOVA, R. Chlorophyll a Self-assembly in Polar Solvent–Water Mixtures†. **American Society For Photobiology**, Bulgaria, v. 1, n. 71, p.71-83, 2000

ZAJAC, J. et al. Thermodynamics of Micellization and Adsorption of Zwitterionic Surfactants in Aqueous Media. **Langmuir**, v. 13, n. 6, p.1486-1495, mar. 1997. American Chemical Society (ACS).

ZHANG, W. et al. Multifunctional Pluronic P123/F127 mixed polymeric micelles loaded with paclitaxel for the treatment of multidrug resistant tumors. **Biomaterials**, v. 32, n. 11, p.2894-2906, abr. 2011. Elsevier BV.

ZVEZDANOVIC, J.; MARKOVIC, D. Bleaching of chlorophylls by UV irradiation in vitro: The effects on chlorophyll organization in acetone and n-hexane. **Journal Of The Serbian Chemical Society**, v. 73, n. 3, p.271-282, 2008. National Library of Serbia.

YAMASHITA, K. Ji et al. Photo-bleaching of carotenoids related to the electron transport in chloroplasts. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Bioenergetics**, v. 172, n. 3, p.511-524, abr. 1969. Elsevier BV.

WARDLE, B. **Principles and Applications of Photochemistry**. Manchester: Wiley, 2009. 250 p.

APÊNDICE

Apêndice I

Tabela A1. Valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para a Chla e Chlb nos diferentes solventes.

Solvente	ϵ (10^3) L mol ⁻¹ cm ⁻¹					
	Chla			Chlb		
	411 nm	430 nm	663 nm	428 nm	458 nm	648 nm
Água	7,6	7,9	4,8	3,1	4,9	1,8
Metanol	9,6	8,7	8,2	3,6	7,5	3,1
Etanol	9,3	8,5	7,9	4,1	8,7	2,8
1-Butanol	9,8	9,1	8,3	4,0	8,8	3,3
ACN	10,9	10,4	8,3	5,5	10,9	3,5
ACE	11,3	11,5	9,2	5,4	11,5	3,6
DMF	10,6	11,1	9,0	4,8	11,2	3,7
DMSO	9,0	9,5	7,3	2,7	6,1	2,2
Tolueno	10,1	11,8	8,8	4,8	12,1	4,1

Tabela A2. Valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para a Pheoa e Pheob nos diferentes solventes.

Solvente	ϵ (10^3) L mol ⁻¹ cm ⁻¹					
	Pheoa			Pheob		
	411 nm	505 nm	668 nm	420 nm	440 nm	660 nm
Água	4,3	0,8	1,9	2,8	2,6	1,0
Metanol	11,9	1,2	5,2	4,9	8,0	1,6
Etanol	11,8	1,3	5,6	4,7	8,6	1,6
1-Butanol	12,1	1,3	5,9	4,5	9,1	1,7
ACN	13,2	1,4	5,3	4,8	7,8	1,4
ACE	14,1	1,5	6,1	5,2	8,1	1,6
DMF	27,8	2,8	11,4	4,8	9,3	1,7
DMSO	9,5	1,0	4,2	6,8	13,4	2,4
Tolueno	14,5	1,5	7,0	8,8	13,6	5,0

Tabela A3. Valores de Potência absorvida (P_{abs}) para os pigmentos fotossintéticos em diferentes solventes.

Solvente	P_{abs} (mW)			
	Chla	Chlb	Pheoa	Pheob
Água	29,58	13,97	8,56	8,96
Metanol	47,49	18,98	31,03	12,83
Etanol	46,93	18,72	29,89	13,04
Butanol	46,35	17,60	26,79	13,68
ACN	51,80	11,15	30,94	11,58
ACE	54,54	10,80	32,14	12,82
DMF	51,41	15,71	50,72	12,69
DMSO	43,01	15,57	21,80	18,54
Tolueno	49,72	11,22	24,42	35,15

Tabela A4 - Rendimentos quânticos de oxigênio singlete para clorofilas e feofitinas obtidos da literatura. (GEROLA, 2013; COSTA, 2019; REDMOND, 1999)

Solventes	Φ_{Δ}			
	Chla	Chlb	Pheoa	Pheob
Água	-	-	-	-
Metanol	0,49	-	0,79	-
Etanol	0,44	0,8	0,6	0,4
1-Butanol	-	-	-	-
ACN	0,6	-	0,82	-
ACE	0,63	-	0,9	-
DMF	0,49	-	0,74	-
DMSO	-	-	-	-
Tolueno	0,68	-	-	-

Tabela A5 - Propriedades fotofísicas e fotoquímicas para Pheoa e Pheob em ambientes micelares de SB3-14 e F-127.

	Pheoa		Pheob	
	SB3-14	F-127	SB3-14	F-127
$\Delta\nu$ (cm ⁻¹)	112,12	127,35	65,82	190,98
Φ_F	0,35	0,17	0,12	0,11
σ_F (ns)	6,16	6,19	2,44	2,18
k_{FB} (min ⁻¹)	-	-	-	-
Φ_{FB}	-	-	-	-

Apêndice II

Figura A1. Espectros de absorção da Pheoa em solventes polares próticos (A) e apróticos (B), a 25 °C, [Pheoa] = 3,5X10⁻⁶ mol L⁻¹.

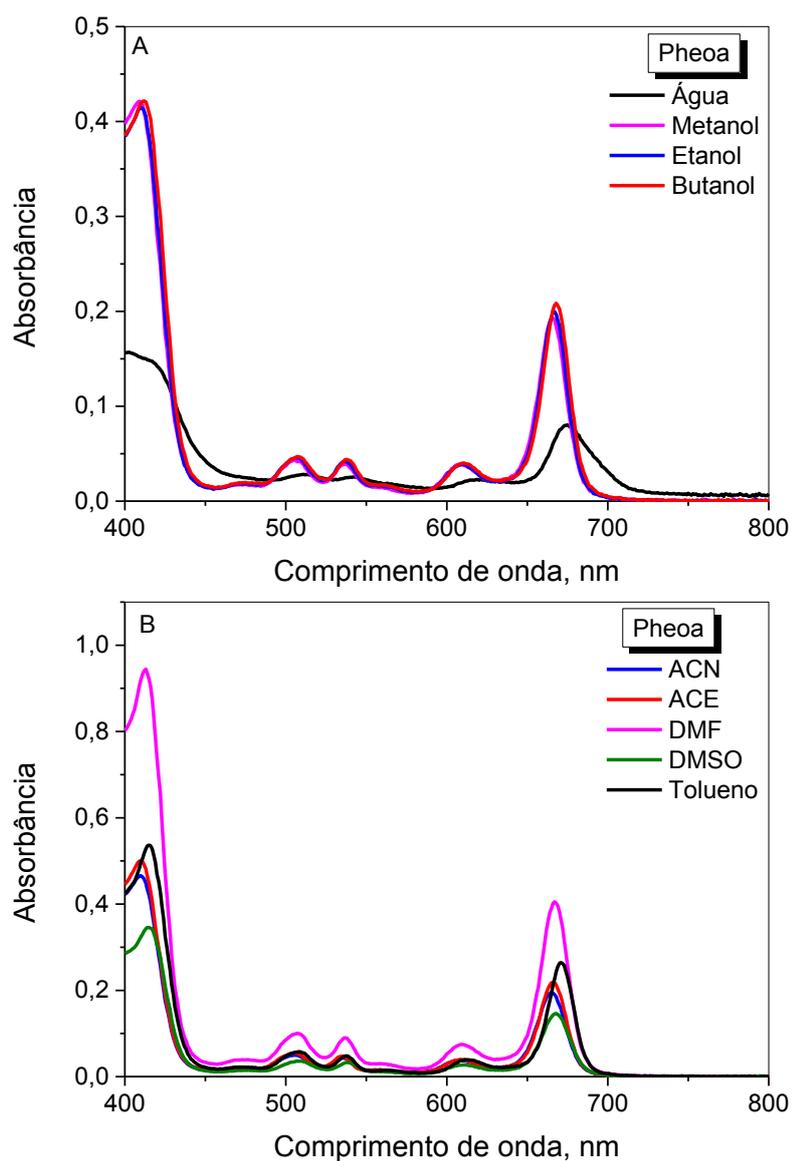


Figura A2. Espectros de emissão de fluorescência da Pheoa em solventes polares próticos (A) e apróticos (B), $\lambda_{exc}= 411$ nm, a 25 °C, $[Pheoa] = 5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

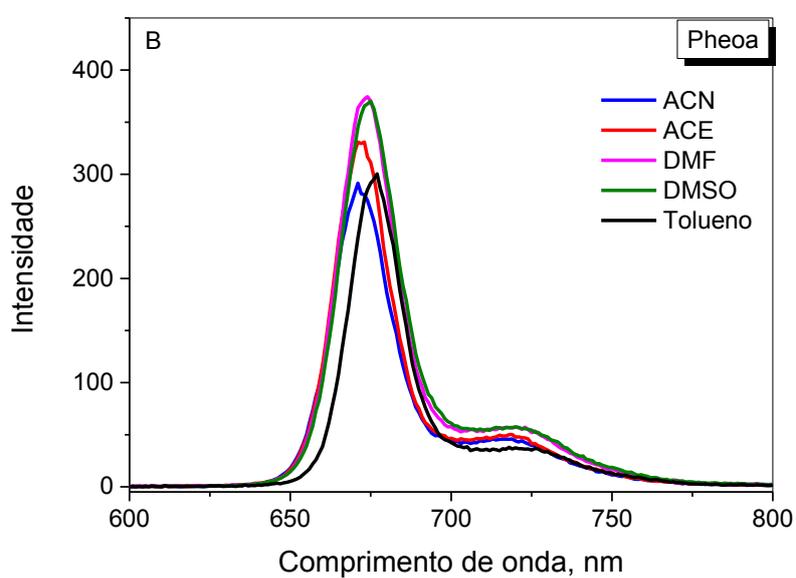
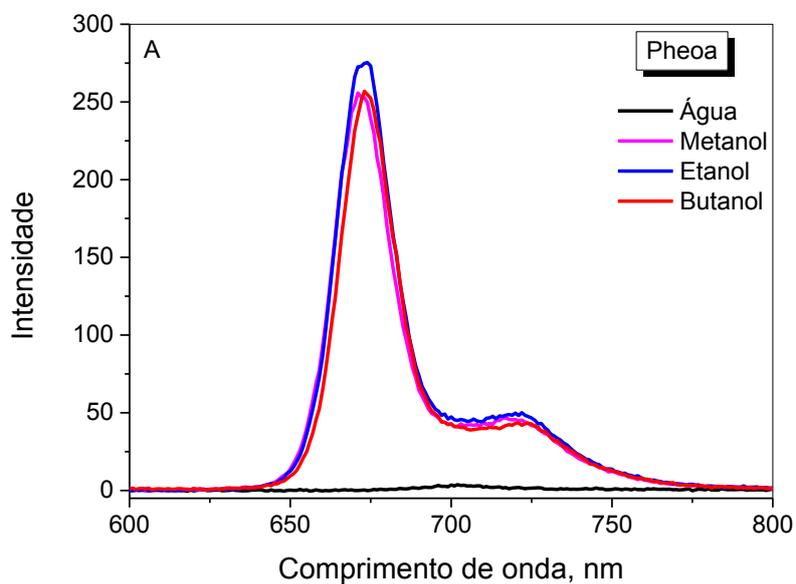


Figura A3. Espectros de absorção da Pheob em solventes polares próticos (A) e apróticos (B), a 25 °C, $[Pheob] = 3,8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

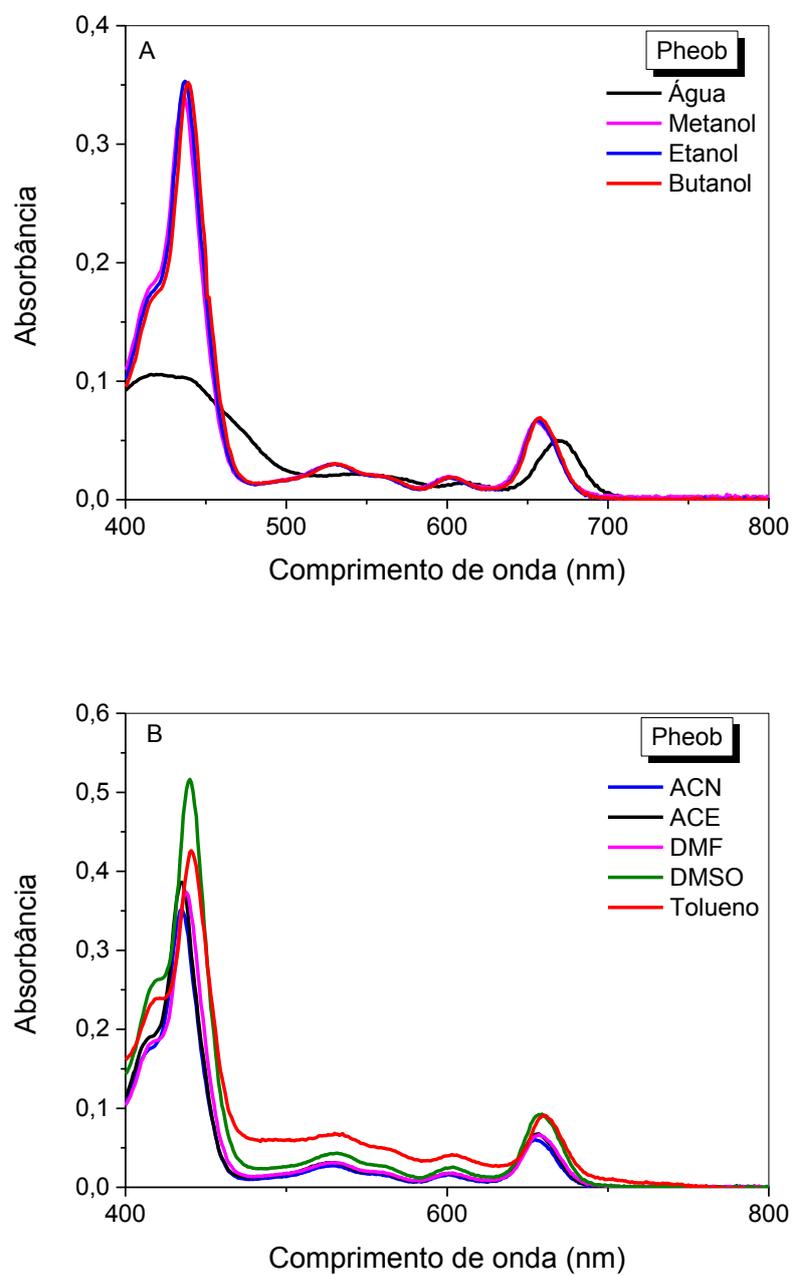


Figura A4. Espectros de emissão de fluorescência da Pheob em solventes polares próticos (A) e apróticos (B), $\lambda_{exc} = 411$ nm, a 25 °C, $[Pheob] = 5 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

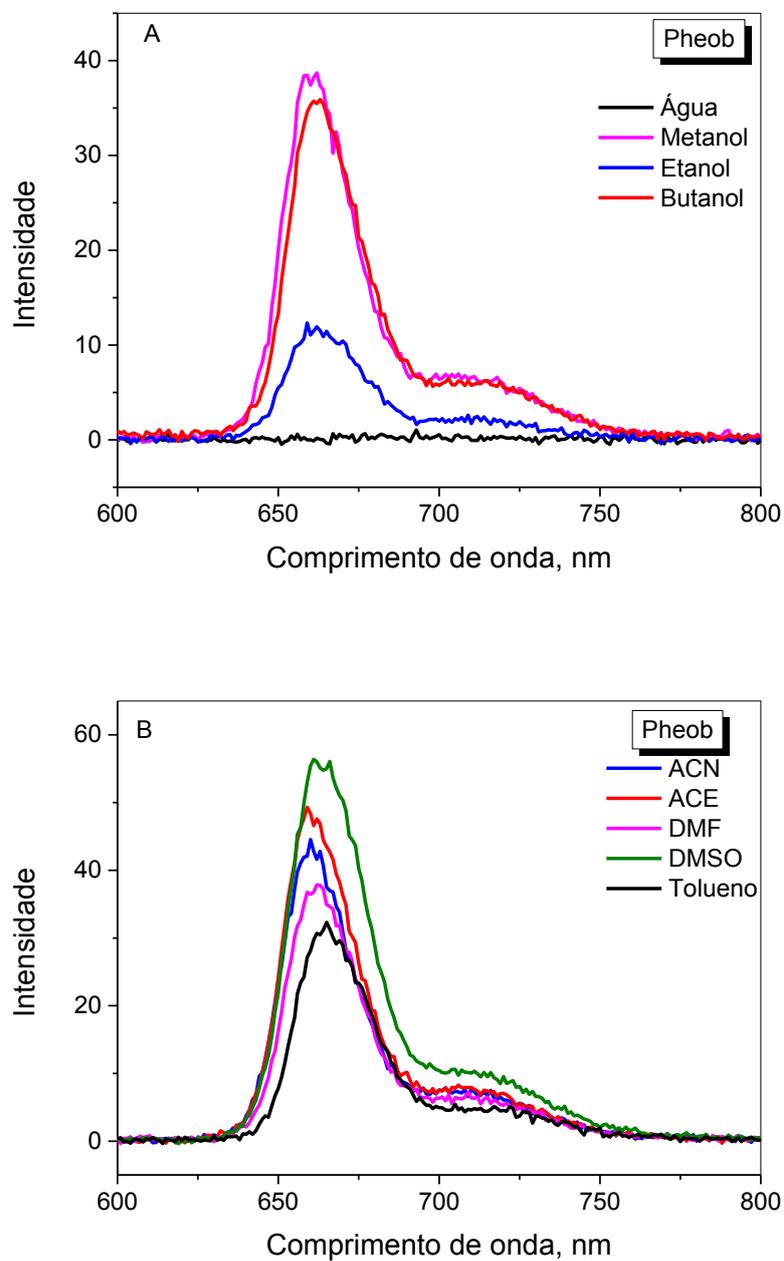


Figura A5. Sobreposição espectral em tolueno da Chla (A) e Pheoa (B) durante a exposição à luz com LASER ($\lambda_{\text{max}}= 660 \text{ nm}$).

