

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA CAROLINA LONGONI DE CASTRO VICENTE

ESTUDO FOTOFÍSICO DA PROTOPORFIRINA IX

Porto Alegre, 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA CAROLINA LONGONI DE CASTRO VICENTE

ESTUDO FOTOFÍSICO DA PROTOPORFIRINA IX

Trabalho de conclusão apresentado junto à atividade de ensino “Trabalho de Conclusão de Curso - QUI” do Curso de Química, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Química

Prof. Dr. Paulo Fernando Bruno Gonçalves
Orientador

Porto Alegre, 2016

“Julgue seu sucesso pelas coisas que
você teve que renunciar para conseguir.”

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram ao longo da graduação, em especial agradeço:

Ao Professor Paulo Gonçalves por todo o conhecimento transmitido nos últimos três anos e meio, pela enorme paciência e “puxões de orelha” merecidos.

Aos colegas de laboratório Josene, Cristtofer e Gabriel pelas excelentes trocas de aprendizado.

Às minhas amigas Miriã e Ivana por todas risadas, lágrimas de felicidade e tristeza compartilhadas. A química é difícil, mas com vocês se tornou mais fácil.

À cadeira de espectroscopia por unir meus queridos amigos e colegas Ariadne, Eduarda, Flávia, Pedro. Com certeza o último ano teria sido muito difícil sem vocês.

À minha amada avó Ana Maria e ao meu querido irmão Henrique Gabriel pela paciência, amor e carinho dedicados a mim, sem isso não chegaria a lugar algum.

Obrigado mãe, pai, tia Manu e Tio Dago por todo apoio, incentivo e exemplos.

Ao Atos por todos os momentos vivenciados, carinho e amor.

Aos colegas de laboratório de Catálise em Polímeros, do laboratório de equipamentos especiais do ICTA, do laboratório CECOM, da biblioteca BSCSH.

Por fim agradeço à PRAE – Pró Reitoria de Assuntos Estudantis, pelos auxílios e bolsas consignadas a mim. Aos órgãos de pesquisa FAPERGS, CNPq, pelas bolsas de pesquisas que tive ao longo da graduação. Agradeço novamente ao professor Paulo.

RESUMO

A protoporfirina IX é um heterociclo composto por quatro anéis pirróis. É uma molécula que está presente em muitos sistemas biológicos como: hemoglobina, mioglobina, vitamina B12 clorofila, em fármacos utilizados na terapia fotodinâmica e em soluções para tratamento de fungos e micoses. A protoporfirina IX, seus precursores e seus complexos com metais de transição têm sido objeto de estudos, porém a protoporfirina IX em si é pouco estudada. Este trabalho tem por objetivo o estudo fotofísico da protoporfirina IX, onde foi feito o estudo da molécula no estado fundamental e nos estados excitados. Os estados excitados são de grande interesse, pois é nos estados excitados que a molécula apresenta mecanismos atrativos como medicamentos de terapia fotodinâmica. Foram estudadas as energias de transição vertical de absorção, emissão de fluorescência e fosforescência. Também foi analisada a distribuição das cargas no estado fundamental, no primeiro estado singlete e primeiro estado tripleto. Para esse estudo foi utilizado o método da Teoria do Funcional da Densidade (DFT), implementado no programa Gaussian 09, o funcional utilizado foi ω B97XD e 6-311+G(d,p) como base. Os efeitos do solvente foram incluídos utilizando o Modelo Polarizável Contínuo (PCM), com dois solventes de diferentes constantes dielétricas, o dimetilsulfóxido e o diclorometano.

Palavras Chaves: Protoporfirina IX, DFT, fluorescência, fosforescência.

ABSTRACT

The protoporphyrin IX is a heterocycle molecule consisting of four pyrrole rings. This molecule is present in many biological systems such as hemoglobin, myoglobin, vitamin B12, chlorophyll, as well as drugs used in photodynamic therapy and treatment of fungi and mycoses. The protoporphyrin IX, its precursors and complexes with transition metals has been studied, but there are few studies exclusively on protoporphyrin IX. The purpose of this work is to study the photophysical behavior of protoporphyrin IX, and therefore the ground and excited states has been studied. The excited states are of great interest because this molecule presents attractive mechanisms in photodynamic. It was computed the vertical transition energy absorption, fluorescence emission and phosphorescence emission. In addition, it was analyzed the charge distribution and electrostatic surface potential in the ground state, the first excited singlet and the triplet. For this study, we used the Density Functional Theory (DFT) as implemented in the Gaussian 09 program, and the functional used was ω B97XD and 6-311+G(d,p) basis function. The solvent effects were included by the Polarizable Continuum Model (PCM) using two different solvents: dimethyl sulfoxide and dichloromethane.

Key Words: Protoporphyrin IX, DFT, fluorescence, phosphorescence.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Estrutura da protoporfirina IX	
FIGURA 2 – Protoporfirina IX otimizada e enumerada, o estado fundamental em DMSO e DCM.....	10
FIGURA 3 – PROTOPORFIRINA IX OTIMIZADA E ENUMERADA, O ESTADO FUNDAMENTAL E DCM.....	10
FIGURA 4 – Orbitais moleculares de fronteira calculados para protoporfirina IX com ω B97XD/6-311+G(d,p).....	11
FIGURA 5 – Orbitais moleculares envolvidos na fosforescência.....	14
FIGURA 6 – Superfície de potencial eletrostático do estado fundamental e primeiro estado excitado em DMSO. Vermelho= densidade eletrônica maior e azul= densidade eletrônica menor.....	15
FIGURA 7 – Superfície de potencial eletrostático do estado primeiro estado excitado tripleto em DMSO. Vermelho= densidade eletrônica maior e azul= densidade eletrônica menor.....	18

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Os comprimentos de ondas teóricos obtidos para a Absorbância máxima e para o maior comprimento de onda.....	8
TABELA 2 – Cargas ChelpG para a protoporfirina no estado fundamental em DMSO.....	12
TABELA 3 – Cargas ChelpG para a protoporfirina no estado fundamental em DCM.....	13
TABELA 4 – Cargas ChelpG primeiro estado excitado e estado fundamental em DMSO.....	16
TABELA 5 – Cargas ChelpG primeiro estado excitado e estado fundamental em DCM.....	17

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

PPP- protoporfirina IX;

TFD- terapia fotodinâmica;

HF – Hartree–Fock;

PCM - modelo do contínuo polarizável;

DFT - Teoria do Funcional da Densidade;

DFT-MRCI - Teoria funcional de densidade combinada e interação de configuração de multirreferência DFT-MRCI (do inglês - *The combined density functional theory and multireference configuration interaction*);

LDA - aproximações de densidade local (*local-density-approximation* – LDA);

GGA - a aproximação de gradiente generalizado (*generalized gradient approximation* – GGA);

TD-DFT – Teoria do funcional da densidade dependente do tempo (do inglês *Time Dependent Density Functional Theory*);

DCM – Diclorometano;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

HOMO – Orbital molecular ocupado de maior energia;

LUMO – Orbital molecular desocupado de menor energia;

SUMÁRIO

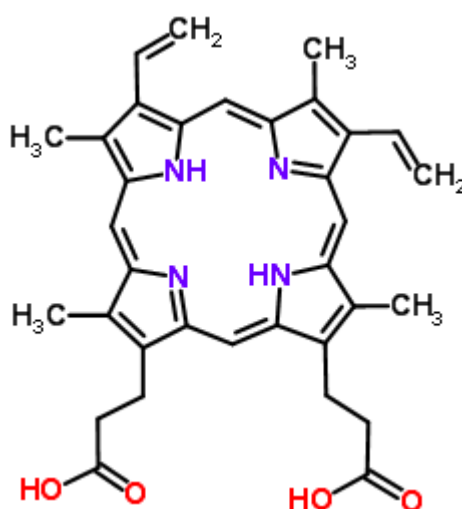
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 OBJETIVO.....	1
1.1.1 Objetivos específicos	2
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
2.1 O que é a protoporfirina e onde está presente.....	3
2.2 Estudos computacionais envolvendo a protoporfirina IX e seus derivados.....	4
2.3 Metodologia computacionais aplicadas em estudos fotofísicos.....	5
3. METODOLOGIA.....	8
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4.1 Análise conformacional.....	10
4.2 Análise das cargas atômica e superfícies de potencial eletrostático do estado fundamental.....	12
4.3 Energias de absorção e emissão.....	13
4.3.1 Análise estrutural dos estados excitados.....	15
4.3.2 Análise das cargas atômica e superfícies de potencial eletrostático dos estados excitados.....	16
5. CONCLUSÃO.....	19

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO:

A protoporfirina IX (ppp) é um heterociclo orgânico composto por quatro anéis pirrol, dois ácidos carboxílicos, duas vinilas e quatro metilas. A ppp é um composto quelante, o qual consegue se complexar com uma grande variedade de metais de transição. A ligação entre a ppp e os metais de transição ocorre via nitrogênios. Esses quelatos possuem uma grande aplicação biológica. A ppp é uma biomolécula responsável pelo transporte de cátions bivalentes, por exemplo, o complexo de ferro, Heme, que é um grupo prostético precursor das proteínas hemoglobina e mioglobina. No heme a ppp está ligada ao ferro com número de oxidação +2. A hemoglobina e mioglobina são responsáveis pelo transporte do oxigênio na maior parte dos seres vivos. Uma das diferenças entre a mioglobina e a hemoglobina é que a hemoglobina possui quatro sítios heme e a mioglobina apresenta apenas um heme.

Figura 1 – Estrutura da protoporfirina IX



A protoporfirina pode se ligar com outros metais como Na, K, Li e metais bivalentes como: Co(II), Ni(II), Cu(II)). Há vários complexos com diferentes metais que possuem atividades biológicas, como as metaloenzimas, por exemplo, os complexos de cobalto que estão presentes na vitamina B₁₂. Há também complexos de Zinco e Níquel que estão presentes em medicamentos utilizados na terapia fotodinâmica os quais possuem atividades biológicas.

Sabe-se que a protoporfirina IX apresenta mecanismos fotofísicos que são de grande interesse, visto que a ppp e seus derivados conseguem transformar energia obtida da incidência de luz em energia química para reações. Muitas aplicações envolvem os estados excitados da protoporfirina IX e são estas aplicações e estudos de novas aplicações que surge

o interesse de se compreender os estados excitados, as energias de absorção e emissão da molécula. Um exemplo disto é a utilização da porfirina no estado triplete no tratamento de câncer, na oxidação de tumores.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é o estudo computacional da molécula protoporfirina IX usando a teoria do funcional da densidade dependente e independente do tempo, avaliação dos efeitos do solvente aplicando o modelo do contínuo polarizável (PCM) e obtenção das propriedades fotofísicas da molécula.

1.1.2 Objetivos específicos

- Análise conformacional e otimização do estado fundamental e primeiro estado excitado singlete;
- Cálculos de energia de absorção e emissão de fluorescência e fosforescência;
- Influência dos solventes nas energias de emissão e absorção;
- Comparação de resultados teóricos com resultados experimentais;
- Análise das cargas atômicas, superfícies de potencial eletroestático e orbitais moleculares envolvidos nas transições eletrônicas;

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

2.1 O que é a protoporfirina e onde está presente:

A protoporfirina IX (ppp) é um heterociclo de ocorrência natural na maior parte dos seres vivos. É um composto com grande importância biológica. Quando quelado com o Ferro forma o grupo prostético Heme, que está nas proteínas hemoglobina e mioglobina, às quais são responsáveis pelo transporte de oxigênio na maior parte dos seres vivos. A protoporfirina IX se liga ao ferro com número de coordenação 6, e este se liga a histidina e a um átomo bivalente na maior parte dos casos o oxigênio e então realiza o transporte do mesmo no corpo. [1,2]

Os nitrogênios ligados ao ferro desempenham uma função muito importante pelo fato de serem doadores de elétrons, eles estabilizam o ferro (II), prevenindo a conversão de ferro (II) para ferro (III). O ferro (II) consegue se complexar com o oxigênio diferente do ferro (III).

A protoporfirina e seus precursores estão presentes e atuam nos cloroplastos (produzindo clorofila) e mitocôndrias (produzindo heme). O quelato de magnésio e protoporfirina esta presente nas clorofilas, sistema que é um dos grandes responsáveis pela grande absorção de energia e transferência de cargas. A molécula da clorofila difere do sistema heme, pois, há a presença de um quinto anel e a presença da cadeia fitol, uma cadeia longa esterificada com substituintes carboxilas. Derivados da ppp também estão presentes no processo de fotossíntese das cianobacterias com uma estrutura similar a protoporfirina, a diferença está na abertura do ciclo tetrapirrol.

Os organismos fotossintetizadores captam a energia solar e sintetizam trifosfato de adenosina (ATP) e fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina NADPH, substâncias estas que são utilizadas como fonte de energia para sintetizar carboidratos e outros compostos orgânicos a partir de CO_2 e H_2O , além, do carboidrato produzido é liberado O_2 na atmosfera. [3,4,5]

As porfirinas e seus precursores têm sido amplamente usados como agentes fotossensibilizantes na terapia fotodinâmica (TFD), que é uma opção ao tratamento de câncer baseada na utilização de substâncias fotoquímicas que ao impregnarem seletivamente o tecido anormal agem como sensibilizadores a radiação luminosa. A denominação TFD foi utilizada pela primeira vez por von Tappeiner em 1904 para descrever a fotossensibilização do

consumo de oxigênio que ocorre em tecidos vivos. A TFD vem sendo amplamente empregada no tratamento de carcinomas, e complexos envolvendo a protoporfirina IX quelada a diferentes metais, vem sendo desenvolvido nos últimos anos com esta finalidade. Outra aplicação desses complexos é o tratamento de micoses. [5]

Os complexo com cobalto estão presentes na vitamina B₁₂/cianocobalamina, onde uma de suas funções é prevenção e combate da anemia. [6,7,8].

A protoporfirina IX também está presente no campo de geoquímica. É muito estudada para a determinação da origem dos sedimentos, bem como, para o entendimento dos processos sofridos pelos organismos que habitaram a terra. Uma das “digitais” do petróleo é a determinação da origem dos sedimentos que pode ser feita através da análise de porfirinas de níquel e vanádio.[9]

2.2 Estudos computacionais da protoporfirina:

A protoporfirina IX é um composto de grande interesse biológico e tem sido foco de inúmeros estudos, tanto na área experimental, quanto na área teórica. Porém ainda há poucos estudos computacionais envolvendo apenas a protoporfirina IX.

Alguns estudos feitos anteriormente nortearam este trabalho em termos de metodologia, os quais envolvem a protoporfirina IX ou sistemas similares utilizando química computacional. Alguns destes são:

No estudo “*Computational study of dimethyl and trimethyl-tin(IV) complexes of porphyrin derivatives*”, foi utilizado a metodologia semiempírica PM3 e Hartree–Fock (HF) com de pseudo potencial LANL2DZ para a análise dos parâmetros geométrico e cargas de Mulliken para a distribuição de cargas. [18]

Há muitos estudos utilizando a Teoria do Funcional da Densidade (DFT), pelo fato de apresentar custos computacionais baixos e bons resultados, alguns destes são: o estudo do sistema citocromo P450 de mamíferos, onde o sistema Heme, que é a protoporfirina ligada ao ferro, foi estudado utilizando o funcional B3LYP e utilizando uma base 6-31G(d) para o cálculo de otimização e cálculos das cargas utilizando potencial eletrostático. [19]

O estudo da interação do NO com quelatos de protoporfirina com diferentes centros metálicos, a metodologia selecionada para a otimização do sistema e análise vibracional foi o B3LYP utilizando uma base 6-31G(d).[23] Em outro estudo referente a espectroscopia

vibracional da protoporfirina IX também foi utilizado o funcional B3LYP e a base 3-21G(d). [20].

No estudo dos estados excitados da porfirina e o do porfíceno e na análise da agregação das mesmas, a metodologia utilizada foi TD-DFT e os funcionais testados foram B97-D, ω B97XD, PBE0, CAM-B3LYP, utilizando bases de qualidade TZVP. Os melhores resultados forma os utilizando a B97-D.[21].

Outro estudo de grande importância é o trabalho realizado por PERUN e colaboradores na análise dos estados excitados singlete e triplete da base livre porfirina, onde o objetivo é a comparação de resultados obtidos por TD-DFT com resultados obtidos por Teoria Funcional de Densidade combinada e interação de configuração de multirreferência DFT-MRCI (do inglês - *The combined density functional theory and multireference configuration interaction*). Onde os cálculos utilizando TD-DFT foram realizados usando o funcional B3LYP com base de nível triple zeta e os cálculos utilizando o funcional bh-lyp e base def-SV(P) nos cálculos utilizando DFT-MRCI. A conclusão é que os cálculos utilizando metodologia MRCI geram resultados que se aproximam mais dos resultados experimentais, isto é, com níveis de energia mais baixos dos que os gerados por TD-DFT. [22]

2.3 Metodologias empregadas no estudo da protoporfirina IX:

A teoria do funcional da densidade (DFT – *Density Functional Theory*) emergiu como uma alternativa aos métodos *ab-initio* e semiempíricos no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares e tornou-se um dos métodos mais populares devido a seu baixo custo computacional e também em uso de memória. Comparando o DFT com os métodos *ab-initio* (que utilizam métodos baseados nas equações de Hartree-Fock-Roothaan) há um ganho na velocidade computacional dado que considerando um número arbitrário n de funções de base o DFT tem um esforço de n^3 ao passo que os métodos *ab-initio* tem um esforço na ordem de n^4 a n^5 . Comparando o DFT com métodos semiempíricos o hamiltoniano do DFT tem função bem definida diferente dos semiempíricos que em muitas são incluídas aproximações para tornar o cálculo mais rápido. A premissa do DFT é que as propriedades de um sistemas multieletrônico, descrito por $3N$ coordenadas espaciais e 1 coordenada de spin é descrito pela densidade eletrônica do sistema.

O grande problema do DFT é a parte que trata da repulsão intereletrônica, que é o termo de troca-correlação, que não tem expressão analítica conhecida. O termo de troca-correlação é calculado por aproximações feitas pelos funcionais. Atualmente existem centenas de funcionais, e estes diferem entre si de forma geral por parâmetros que são otimizados para se obter determinadas propriedades. Portanto a questão de se encontrar melhores aproximações para a energia de troca e correlação é ponto central na DFT, dentre as aproximações, estão as aproximações de densidade local (*local-density-approximation* - LDA), a aproximação de gradiente generalizado (*generalized gradient approximation* - GGA) e há também os funcionais híbridos os quais incorporam uma parte do termo de Hartree Fock para a componente de energia de troca.

Entre os funcionais amplamente utilizados nos estudos fotofísicos estão B3LYP, PBE1PBE, CAM-B3LYP e o ω B97XD. Quando o objetivo do trabalho é o estudo fotofísico de um sistema, como no caso deste trabalho que é o estudo fotofísico da protoporfirina IX, não se pode usar o DFT, pois este é estritamente limitado para o estado fundamental, o que o exclui para aplicação fotoquímica. Para o cálculo do estado excitado usa-se a extensão do DFT, o TD-DFT (do inglês *Time Dependent Density Functional Theory*). No TD-DFT as energias de excitação não são obtidas a partir da função de onda explícita do estado excitado e sim a partir da polarização do estado fundamental em função das frequências, isto é “os cálculos dependentes do tempo, resultam na obtenção de uma função de onda que oscila entre o estado fundamental e os primeiros estados excitados. A partir desta solução, é possível extrair estes dois estados.” [26] Assim como o DFT o TD-DFT também apresenta dificuldades nas descrições de energia de troca e correlação, há também dificuldade em descrever transições verticais em sistemas solvados, por isso o ponto central é a escolha do funcional.

O efeito do solvente por muito tempo foi negligenciado e muitos trabalhos foram feitos em fase gasosa pela enorme facilidade de modelagem e simplificação computacional, porém no mundo real a maior parte das reações químicas acontecem em solução, dado que se faz necessário a adição do efeito do solvente nos cálculos. Em um primeiro ponto de vista pode parecer trivial trabalhar com um sistema condensado, apenas adicionando moléculas de solvente em torno do soluto, porém a grande questão é quantas moléculas e onde estarão espacialmente distribuídas? Uma forma de trabalhar com o efeito do solvente sem o emprego do solvente explícito é o Modelo do Continuum Polarizável - PCM (do inglês *Polarizable Continuum Model*). Nesse modelo o solvente é descrito como um dielétrico polarizável

caracterizado pela sua constante dielétrica. Uma cavidade na forma do soluto é construída e a polarização do solvente esta representada por cargas superficiais aparentes na superfície desta cavidade.

3. METODOLOGIA:

Todos os cálculos foram realizados utilizando o programa Gaussian 09 [25] e a metodologia utilizada foi DFT e TD-DFT aplicando o funcional ω B97XD e 6-311+G(d,p) como função de base. Os efeitos do solvente foram introduzidos utilizando o PCM [26], com dois solventes de diferentes constantes dielétricas os quais são o dimetilsulfóxido (DMSO) e o diclorometano (DCM). A escolha do funcional foi estabelecida com os testes de três funcionais e comparação dos resultados destes com dados experimentais. Os funcionais testados foram o PBE1PBE [27], B3LYP [28] e ω B97XD [29]. O parâmetro de escolha foi máximo de absorvância da molécula em solvente DMSO. O funcional que melhor descreveu o sistema e gerou resultados mais próximos dos experimentais foi o ω B97XD.

O primeiro passo foi a realização da análise conformacional, onde foi feita uma varredura dos ângulos diedros utilizando PM6. A estrutura que apresentou o mínimo de energia foi otimizada utilizando PBE1PBE, B3LYP, ω B97XD e o cálculo de energia utilizando TD-DFT foi efetuado para obtenção dos comprimentos de onda de absorção. De posse dos dados de comprimento de onda de absorção, comparou-se este com dados experimentais, onde as energia de absorção molecular com o máximo de absorvância da protoporfirina IX obtidas experimentalmente para o solvente dimetilsulfóxido foi de 406 nm e o valor de energia para máximo de comprimento de onda absorvido é de 631 nm. Abaixo na tabela 1 encontram-se os comprimentos de onda para a absorvância máxima e para o comprimento de onda máximo para todos os funcionais testados.

Tabela 1- Os comprimentos de ondas teóricos obtidos para a absorvância máxima e para o maior comprimento de onda.

Funcional	Máxima Absorvância	Máximo comprimento de onda
ω B97XD	372,42 nm	590,06 nm
CAM-B3LYP	373,96 nm	576,08 nm
PBE1PBE	361,11 nm	551,43 nm
CAM-B3LYP com dispersão	373,74 nm	575,54 nm

Pelos parâmetros escolhidos o funcional que melhor descreveu o sistema foi o ω B97XD. Em sequência foi otimizado o primeiro estado excitado sem as frequências vibracionais, aplicando TD-DFT e utilizando funcional ω B97XD e 6-311+G(d,p), obtendo então comprimento de onda de emissão, forças do osciladores e respectivas propriedades do primeiro estado excitado.

Nos cálculos do estado triplete para obtenção da energia de emissão de fosforescência adotou-se um protocolo diferente de cálculo do que para o primeiro estado excitado singlete. No estado triplete utilizou-se em um primeiro cálculo de otimização geométrica Hartree-Fock não restrito (*Unrestricted Hartree-Fock* - UHF) com base 6-31G(d). Um segundo cálculo de otimização geométrica com frequências vibracionais DFT não restrito com U ω B97XD e base 6-31G(d), e por fim, para calcular a transição, foi feito o cálculo utilizando TD-DFT utilizando U ω B97XD e função de base 6-31G(d). Neste cálculo 50% das transições eram calculadas para singlete e 50% para o triplete.

A superfícies de potencial eletrostático e momentos dipolares foram obtidas utilizando as cargas derivadas de potenciais ChelpG (do inglês *Charges from electrostatic Potential using a Grid based Method* = cargas derivadas de potencial eletrostático usando método de malhas) esquema desenvolvido por Breneman e Wiberg [30] onde as cargas atômicas reproduzem o potencial eletrostático molecular (*Molecular Electrostatic Potential* - MEP) em um número de pontos em torno da molécula. Todas as geometrias dos orbitais moleculares foram renderizadas utilizando o programa Chemcraft. [31]

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1 Análise conformacional

A protoporfirina IX, apresentada nas figuras 2 e 3, encontra-se enumerada e otimizada por ω B97XD/6-311+G(d,p) nos solventes DMSO e DCM.

A estrutura que apresentou o mínimo de energia em ambos solventes é a que há uma interação entre os dois ácidos carboxílicos, devido à ligação de hidrogênio intramolecular. A ligação de hidrogênio é evidenciada pela distância entre o hidrogênio 69 e o oxigênio 51, que é 1,73 Å em ambos solventes. A estrutura apresenta uma proximidade entre as vinilas e as metilas, e esta proximidade faz com que haja uma distorção na planaridade da vinila fazendo com que esta esteja para fora do plano dos pirróis condensados.

Figura 2 - Estrutura otimizada e enumerada no estado fundamental em DMSO.

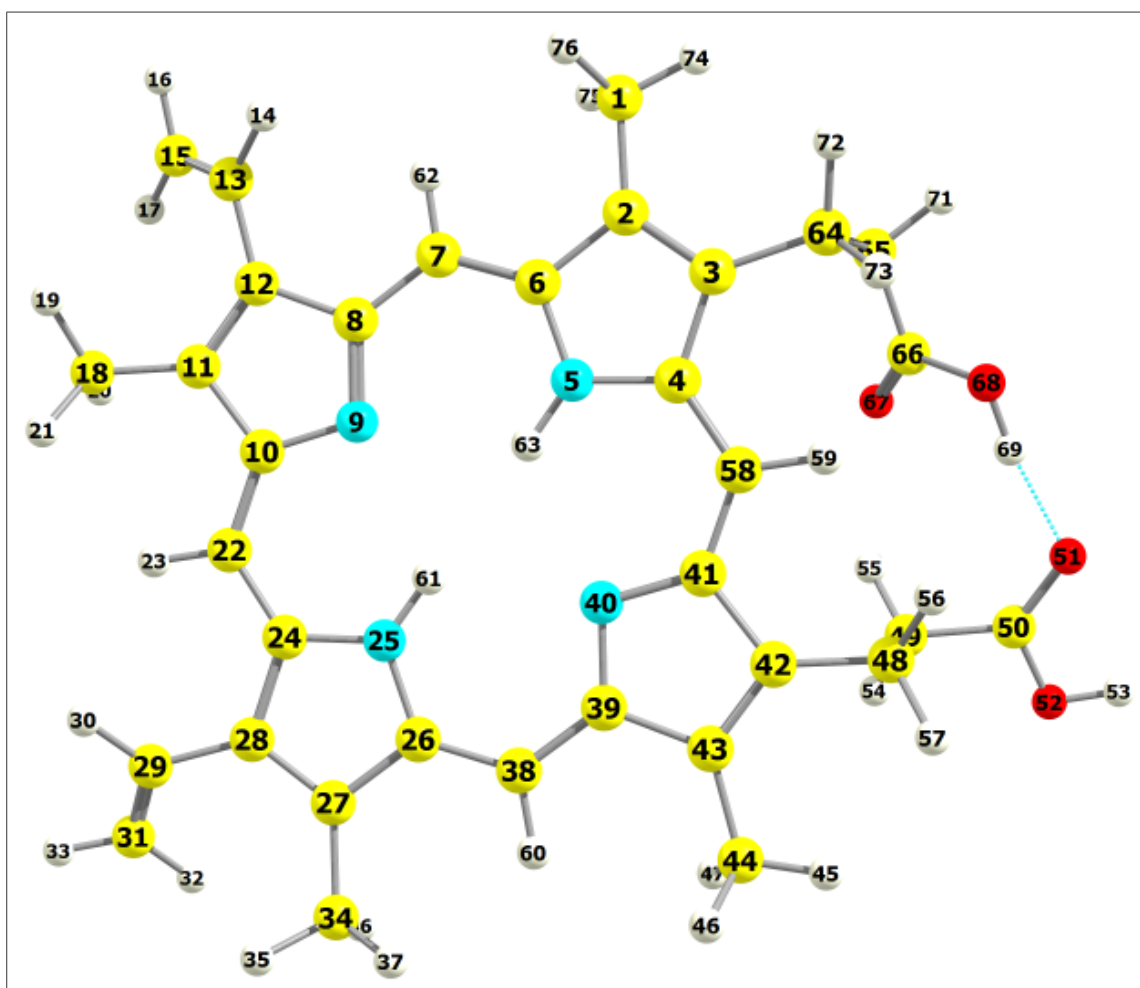
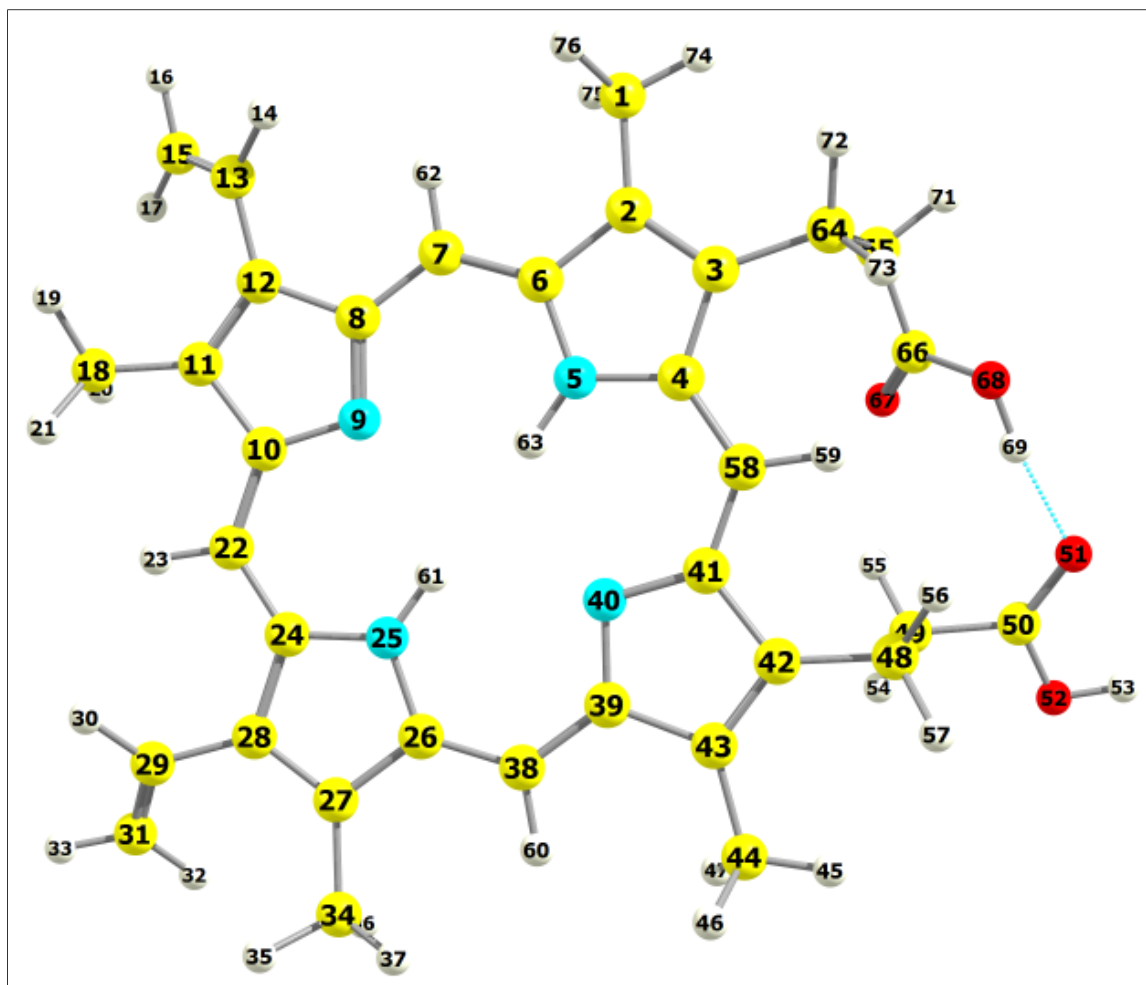


Figura 3 - Estrutura otimizada e enumerada no estado fundamental em DCM.



O ângulo de diedro entre a vinila com o hidrogênio 17 e o carbono do anel pirrol 12 é $-2,35^\circ$ e o diedro entre a vinila de hidrogênio 32 e o carbono 28 é $-2,07^\circ$ isto em DCM. Em DMSO os ângulos são respectivamente $-2,28$ e $-2,00^\circ$. As variações nos ângulos de diedro dos ácidos carboxílicos de um solvente para o outro também são muito pequenas, o diedro do ácido carboxílico com o carbono 66 e o carbono 3 do anel pirrol é de $-81,40^\circ$ e o diedro entre o carbono 50 e o carbono 42 é $177,61^\circ$ em DMSO, em DCM são respectivamente $-81,94$ e $177,65^\circ$. Os comprimentos de ligação entre os nitrogênios e hidrogênios não varia mudando o solvente. Apesar da diferença entre os ângulos de diedros e comprimentos da ligação de hidrogênio, as estruturas são muito semelhantes em ambos solventes.

4.2 Análises das cargas atômicas e superfícies de potencial eletrostático do estado fundamental.

Ao se fazer a análise das cargas ChelpG do estado fundamental observa-se uma carga negativa elevada em magnitude nos nitrogênios 9 e 40 quando comparados com os nitrogênios 5 e 25, o que já era esperado, pois ambos não estão ligados a átomos de hidrogênio. O átomo de nitrogênio 25 tem carga parcial positiva, esta carga positiva pode ser explicada pela ligação com o hidrogênio 61 e pelo sistema π conjugado entre o anel pirrol do átomo de nitrogênio 25 e a vinila de carbonos 29 e 31. A distribuição de cargas para os átomos de nitrogênio dos anéis pirróis e de seus carbonos vizinhos em DMSO encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Cargas ChelpG para a protoporfirina IX no estado fundamental em DMSO

Número do átomo	Tipo do átomo	Cargas ChelpG S0
4	C	0,238
5	N	-0,060
6	C	0,187
8	C	0,244
9	N	-0,502
10	C	0,223
24	C	0,117
25	N	0,010
26	C	0,129
39	C	0,286
40	N	-0,559
41	C	0,379

O mesmo padrão se repete na distribuição das cargas ChelpG para a molécula em diclorometano: cargas negativas e elevadas em módulo nos nitrogênios 9 e 40 quando comparando-os com os nitrogênios 5 e 25. Todos os nitrogênios estão carregados negativamente, e diferente das cargas em DMSO, em que o átomo de nitrogênio 25 estava carregado positivamente, ainda sim pode se ver o mesmo padrão onde o átomo de nitrogênio 25 tem carga maior que os demais átomos de nitrogênio. Esta diferença das cargas dos nitrogênios nos solventes pode ser atribuída ao fato do solvente DMSO ter constante dielétrica maior que o solvente DCM, dado que o aumento da polaridade reflete-se no aumento da

constante dielétrica. Na Tabela 3 encontram-se as cargas dos nitrogênios e dos carbonos vizinhos a estes em DCM.

Tabela 3 – Cargas ChelpG para a protoporfirina no estado fundamental em DCM

Número do átomo	Tipo do átomo	Cargas ChelpG S0
4	C	0,248
5	N	-0,063
6	C	0,189
8	C	0,246
9	N	-0,484
10	C	0,273
24	C	0,148
25	N	-0,013
26	C	0,152
39	C	0,338
40	N	-0,543
41	C	0,383

Comparando as cargas ChelpG do sistema em diclorometano com as cargas em dimetilsulfóxido, houve um aumento nas cargas dos carbonos e uma redução das cargas dos nitrogênios 5 e 25 em DCM. Além disso, ao analisar o momento de dipolo da molécula verifica-se que este é menor em diclorometano sendo 2,57 debye e 2,69 debye em DMSO.

Apesar da diferença entre as cargas, as superfícies de potencial eletrostático são essencialmente as mesmas. A superfície de potencial eletrotático do estado fundamental em DMSO pode ser vista na Figura 5.

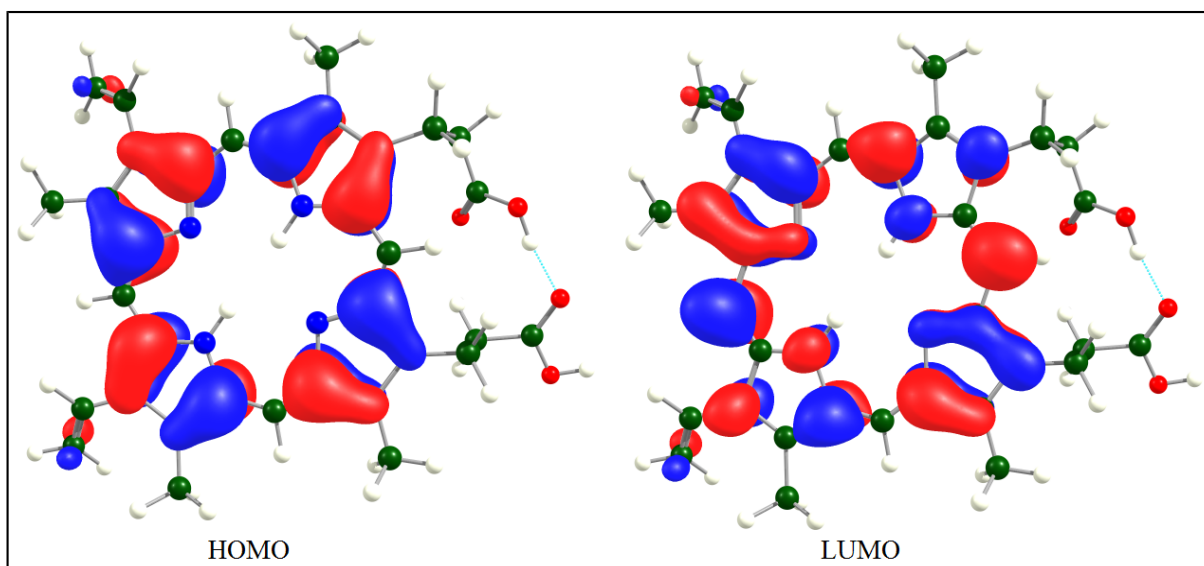
4.3 Energias de absorção e emissão.

Pela aproximação de Born Oppenheimer, pode se desprezar o movimento dos núcleos em relação aos elétrons, sendo assim, a distribuição eletrônica espacial instantaneamente se ajusta às correspondentes posições nucleares de modo a manter sempre mínima a energia molecular. E de acordo com o princípio de Franck-Condon, uma transição eletrônica é representada por uma linha vertical. Considerando o princípio de Franck-Condon e a aproximação de Born Oppenheimer, e energia de transição entre dois estados eletrônicos é proporcional à força do oscilador harmônico. [32,33]

Sendo assim, analisando as forças dos osciladores para as excitações dos dez primeiros estados excitado, verificou-se que a ppp absorve em frequências de 372,42 nm em DMSO, e em DCM absorve em 373,38 nm, considerando o uso do funcional ω B97XD e função de base 6-311+G(d,p).

Analisando os orbitais HOMO, orbital molecular ocupado de mais alta energia (do inglês *Highest Occupied Molecular Orbital*), e LUMO, orbital molecular desocupado de menor energia (do inglês *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*), do estado fundamental, os quais são os orbitais com maior contribuição para a transição, observa-se que a excitação é local e não há transferência de carga e é uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$, pois os orbitais estão centrados no sistema π dos anéis pirróis. Estes orbitais estão apresentados na figura 4.

Figura 4 – Orbitais moleculares de fronteira calculados para protoporfirina IX com ω B97XD/6-311+G(d,p).



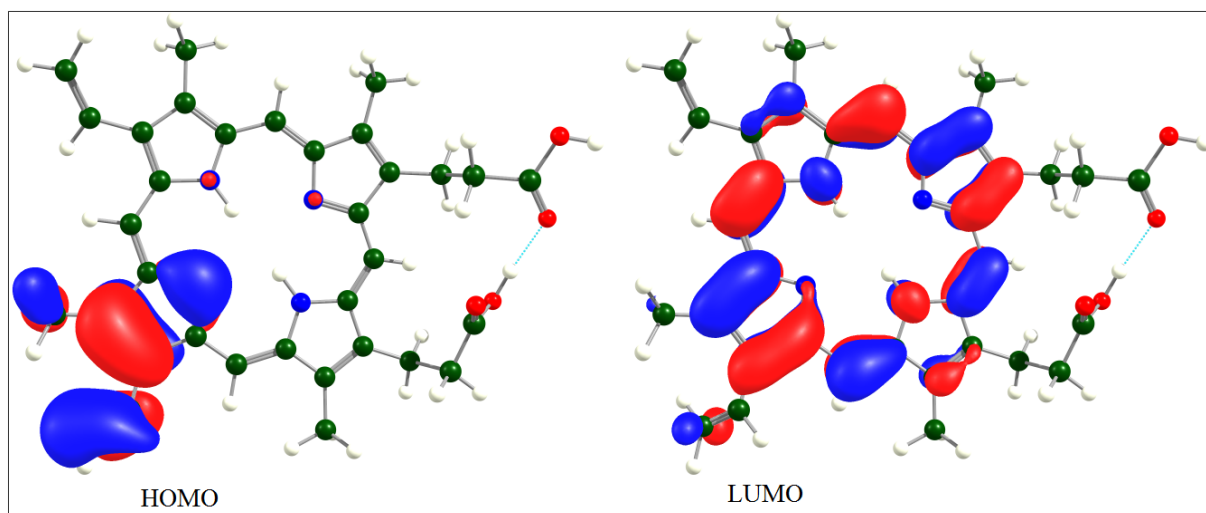
Analisando as forças dos osciladores no estado excitado observou-se que a ppp emite em comprimentos de onda de 414,75 nm em DMSO, e 404,74 nm em DCM, dados obtidos utilizando ω B97XD/6-311+G(d,p). Estes valores ficam próximos dos experimentais. Os cálculos do estado excitado foram feitos desconsiderando as energias vibracionais, o que acarreta no desconhecimento da energia de ponto zero.

Ao analisar os dados do estado fundamental e do estado excitado é possível observar que há o fenômeno de fluorescência, visto que a protoporfirina absorve em frequências de

372,42 nm e emite em 414,75 nm em DMSO, já em DCM a mesma absorve em 373,38 nm e emite em 404,74 nm. Além disso, há o fenômeno de auto absorção, visto que há duas grandes intensidades de força de oscilador harmônico, uma em 404,74 nm e outra em 413,68 nm.

A fosforescência ocorre em 442,62 nm em DMSO, em 441,36 nm em DCM. A transição de maior contribuição é a que envolve os orbitais antissimétricos, e apresenta transferência de carga, pois analisando os orbitais envolvidos vemos que os orbitais se deslocam. Visto que o orbital molecular ocupado envolvido na transição está localizado no sistema π do anel pirrol que contém o nitrogênio 5 e na vinila que contém os carbonos 13 e 15, já o orbital molecular desocupado envolvido na transição eletrônica está distribuído em todos os anéis pirróis e na vinila que contém os carbonos 13 e 15. A figura 5 apresenta os orbitais envolvidos no fenômeno de fosforescência.

Figura 5 – Orbitais moleculares envolvidos na fosforescência.



4.3.1 Análise estrutural dos estados excitados

As estruturas no estado excitado singleto e estado excitado tripleto apresentam distribuição espacial que pouco diferem da estrutura do estado fundamental, não havendo uma mudança significativa nos ângulos de diedros dos ácidos carboxílicos e vinilas e os comprimentos de ligações permanecem os mesmos. As variações estruturais entre o estado fundamental e os estados excitados são mínimas.

4.3.2 Análise das cargas atômica e superfícies de potencial eletrostático dos primeiros estados excitados.

As cargas no estado excitado em ambos os solventes pouco diferem das cargas no estado fundamental. Em DMSO verifica-se uma redução nas cargas dos nitrogênios 5 e 25 os quais estão ligados aos hidrogênios 63 e 61 respectivamente, os hidrogênios não apresentaram variação significativa nas cargas. Os nitrogênios 9 e 40 e os carbonos vizinhos de todos os nitrogênios tiveram um aumento de carga no estado excitado.

Não houve uma variação significativa do momento de dipolo: a variação foi de 0,24, o que se pode considerar pequena tendo em vista que o sistema é grande. Na tabela 4 encontram-se as cargas ChelpG da protoporfirina IX do primeiro estado excitado e estado fundamental para o solvente DMSO.

Tabela 4 – Cargas ChelpG do primeiro estado excitado e estado fundamental em DMSO

Número do átomo	Tipo do átomo	Cargas chelpG S0	Cargas chelpG S1	Variação cargas chelpG
4	C	0,238	0,280	0,042
5	N	-0,060	-0,082	-0,022
6	C	0,187	0,198	0,011
8	C	0,244	0,266	0,023
9	N	-0,502	-0,477	0,025
10	C	0,223	0,235	0,012
24	C	0,117	0,130	0,013
25	N	0,010	-0,004	-0,014
26	C	0,129	0,136	0,006
39	C	0,286	0,302	0,015
40	N	-0,559	-0,548	0,010
41	C	0,379	0,406	0,027

O estado excitado segue o mesmo comportamento que o fundamental em DCM: todos os átomos de nitrogênios estão negativos. Comparando as cargas do estado excitado com as cargas do estado fundamental em DCM, verifica-se uma redução na carga do nitrogênio 5 o qual está ligado ao hidrogênio 63, os nitrogênios 9, 25 e 40 tiveram um aumento de carga no estado excitado. Este aumento nas cargas foi atenuado pela redução nas cargas dos carbonos vizinhos. Na Tabela 5 estão as cargas ChelpG da protoporfirina IX no estado excitado e fundamental em DCM.

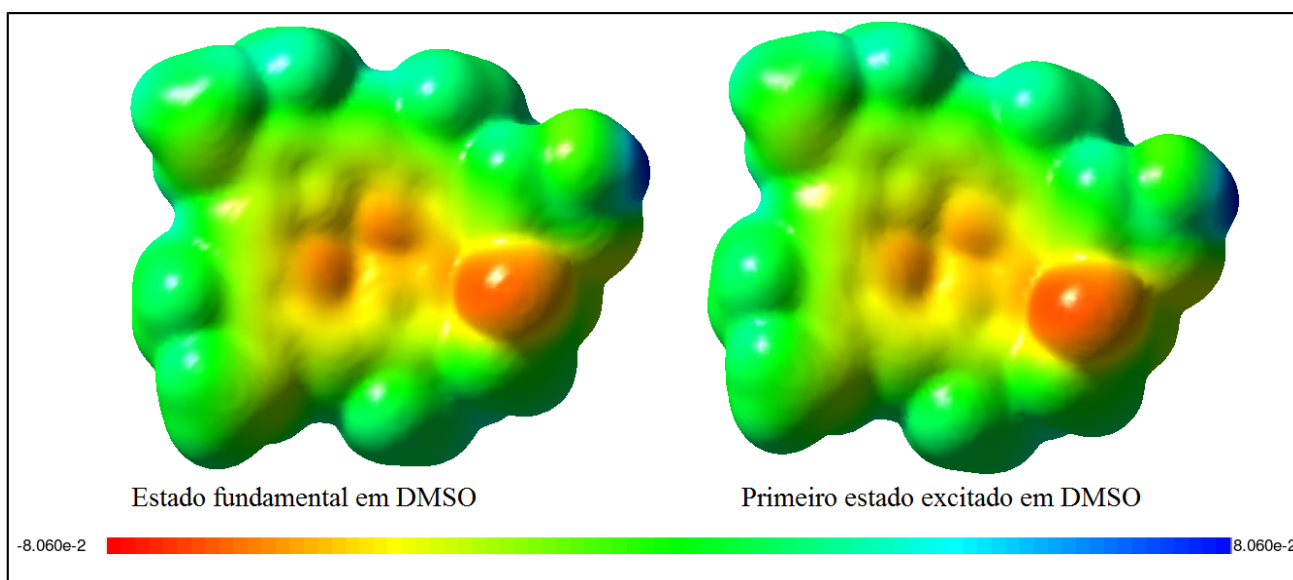
Apesar da variação das cargas entre o estado excitado e o fundamental o momento de dipolo variou muito pouco, 0,28, e as superfícies de potencial eletrotático destes são similares.

Tabela 5 – Cargas ChelpG do primeiro estado excitado e estado fundamental em DCM

Número do átomo	Tipo do átomo	Cargas ChelpG S0	Cargas ChelpG S1	Variação cargas ChelpG
4	C	0,248	0,254	0,006
5	N	-0,063	-0,069	-0,006
6	C	0,189	0,197	0,008
8	C	0,246	0,267	0,021
9	N	-0,484	-0,474	0,010
10	C	0,273	0,242	-0,031
24	C	0,148	0,123	-0,025
25	N	-0,013	-0,002	0,011
26	C	0,152	0,129	-0,023
39	C	0,338	0,290	-0,048
40	N	-0,543	-0,516	0,027
41	C	0,383	0,363	-0,020

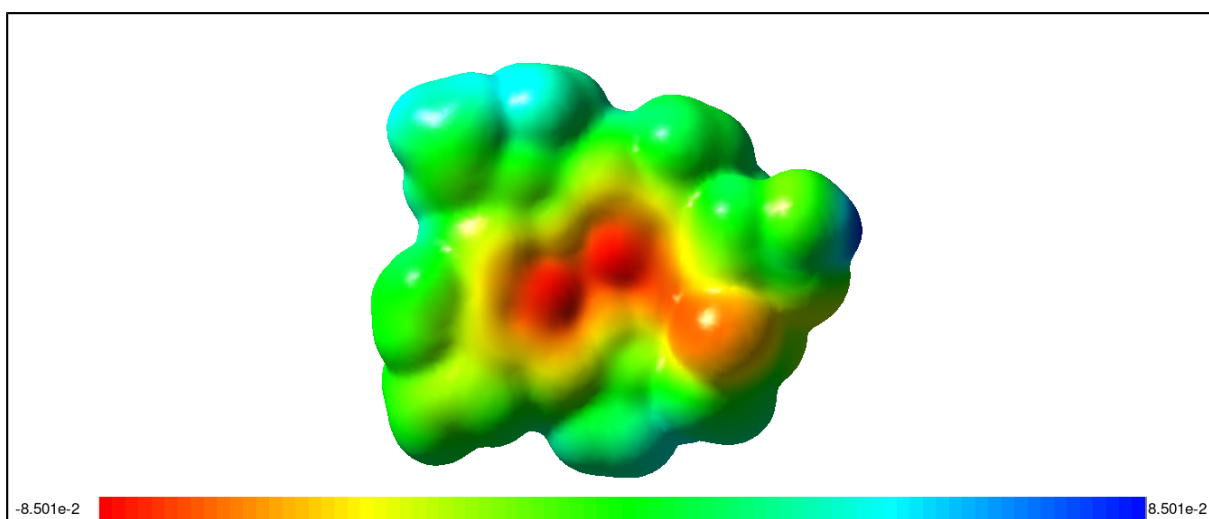
Apesar da pequena variação das cargas ChelpG não se verifica uma mudança significativa nas densidades eletrônicas da molécula. Analisando as superfícies de potencial eletrostático do estado fundamental e do primeiro estado excitado, apresentadas na figura 6, em solvente DMSO observa-se que as superfícies são semelhantes confirmando que há apenas excitação local. As superfícies de potencial eletrostático em DCM apresentam essencialmente o mesmo perfil.

Figura 6 – Superfície de potencial eletrostático do estado fundamental e primeiro estado excitado em DMSO. Vermelho= densidade eletrônica maior e azul= densidade eletrônica menor.



A superfície de potencial eletrostático do tripleto difere das superfícies do estado fundamental e primeiro estado excitado singlete para ambos os solventes. A superfície do estado tripleto está na figura 7. Pode se ver que há um aumento nas cargas dos nitrogênios dos anéis pirróis e uma diminuição nas cargas da vinila com os carbonos 29 e 31. O momento de dipolo diminui 0,39 debyes.

Figura 7 – Superfície de potencial eletrostático do estado primeiro estado excitado tripleto em DMSO. Vermelho = densidade eletrônica maior e azul = densidade eletrônica menor.



5. CONCLUSÕES

A protoporfirina IX tem como conformação mais estável a estrutura em que há interação entre os ácidos carboxílicos devido a ligação de hidrogênio intramolecular, a qual tem comprimento de ligação de 1,73 Å. A estrutura e menor energia tem interação entre as vinilas e metilas, esta proximidade faz com que as vinilas tenham uma leve distorção do plano dos anéis pirróis formando um ângulo em torno de 2,20°. Esta conformação não é alterada com a mudança de solvente.

O funcional que melhor descreveu as energias de absorção e emissão da molécula, tendo resultados mais próximos de dados experimentais, foi ω B97XD. A ppp absorve em comprimentos de onda em torno de 370 nm e emite em 410 nm, o fenômeno de fosforescência ocorre em torno de 440 nm. A excitação da molécula para o primeiro estado excitado singlete é apenas uma excitação local, não havendo transferência de carga, observa-se uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$. A transição para estado triplete apresenta transferência de carga.

Analisando as cargas parciais dos átomos da protoporfirina verifica-se que não há variação significativa de cargas entre os estado fundamental e excitado para ambos os solventes. As superfícies de potencial eletrostático da ppp no estado fundamental são iguais em ambos os solventes. O mesmo perfil de superfície apresentado no estado fundamental é visto no primeiro estado excitado singlete. Porém, ao comparar o estado excitado triplete com o estado fundamental observa-se um aumento na densidade eletrônica dos nitrogênios 9 e 40 e uma diminuição de densidade eletrônica na vinila de carbonos 29 e 31.

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a protoporfirina IX apresenta fluorescência, pois há um deslocamento de Stokes, o que foi visto também em dados experimentais, além disso, também foi confirmado o fenômeno de auto absorção, dado que a ppp apresenta duas grandes intensidades de oscilador harmônico. Como relatado em dados experimentais a ppp também apresenta fosforescência.

REFERÊNCIAS:

- BIESAGA M.; PYRZYŃSKA, K.; E TROJANOWICZ; M. Porphyrins in analytical chemistry. A review. **Talanta**, v.51, p. 209 – 224, 2000.
- Reedy, C. J.; Elvekrog M. M.; e Gibneyand B.R. Development of a heme protein structure-electrochemical function database. **Nucleic Acids Research**, Vol. 36, p. D307–D313, 2008.
1. BARBERIS, L. R. M.; TRINDADE, M. L. B.; VELINI, E. D. Seleção de genótipos de cana-de-açúcar para acúmulo de protoporfirina IX com uso de herbicidas inibidores da protox. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 27, p. 809-814, 2009.
 2. GALVÃO, L. E. G.; GONÇALVES, H. S.; SOUSA, A. R. D.; SILVA, L. A. C. T.; ALMEIDA, I. S. Photodynamic therapy with methyl aminolevulinate hydrochloride for actinic keratosis and non-melanocytic cutaneous neoplasia. **Surg Cosmet Dermatol**, v. 4, p.285-90, 2010.
 3. LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.
 4. WATANABE, N.; CHE, F-S.; IWANO, M.; TAKAYAMA, S.; YOSHIDA, S. E ISOGAI, A. Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons. **J. Biol. Chem**, v. 23, p. 20474 –20481, 2001;
 5. WARREN, M. J.; RAUX, R. HEIDI L. SCHUBERT H. L.; E ESCALANTE-SEMERENA J.C. The biosynthesis of adenosylcobalamin (vitamin B12). **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 390–412, 2002.
 6. Paniz C, Grotto D, Schmitt GC, Valentini J, Schott KL, Pomblum VJ, Garcia SC. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. **J Bras Patol Med Lab**. v. 41, p. 323-34. 2005.
 7. AJIOKA RS, PHILLIPS JD, E KUSHNER JP. Biosynthesis of heme in mammals. **Biochim Biophys Acta**. v. 1763, p.723–736. 2006
 8. BAART DE LA FAILLE H, BIJLMER-IEST JC, VAN HATTUM J, KONINGSBERGER J, RADEMAKERSLH, VAN WEELDEN H. Erythropoietic protoporphyria:

- clinical aspects with emphasis on the skin. **Curr Probl Dermatol** v. 20, p. 123–134, 1991.
9. FRYDMAN, R.B., FEINSTEIN, G. Studies on porphobilinogen deaminase and uroporphyrinogen III cosynthase from human erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 350, p. 358–373, 1974.
 10. SACHAR, M. ANDERSON, K. E. E MA, X. J. Chronic Treatment with Isoniazid Causes Protoporphyrin IX Accumulation in Mouse Liver. **Pharmacol Exp Ther**, v. 356, p. 267–275, 2016.
 11. CAVALEIRO J. A. S. E SMITH K. M. Porphyrin Synthesis. **Rev. Port. Quím.**,v. 31, p. 29, 1989
 12. P. ROTHMUND. Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. **J. Am., Chem. Soc.**, v. 58, p. 625, 1936;
 13. P. ROTHEMUND, A. R. MENNOTTI, Porphyrin Studies. IV. 1 The Synthesis of α , β , γ , ζ -Tetraphenylporphine. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 63, p. 267, 1941.
 14. ADLER, A. D. ; LONGO, F. R.; FINARELLI, J. D.; GOLDMACHER, J. ; ASSOUR, J.; KORSAKOFF, L., J., Condensation of Pyrrole with Benzaldehyde Under Adler Conditions; Tetraphenylporphyrins. **Org. Chem**, v. 32, p. 476, 1967.
 15. BARNETT, G. H.; HUDSON, M. F.; SMITH, K. M. J., Synthesis of heterocycles via enamines-XIII - Steric control on the mode of reactions of β -isothiocyanatoketones with amino-acids. **Chem. Soc.**, v. 43, p. 2177 -2180, 1987.
 16. DUCA, D.; BARONE, G.; MANNA, G. L.; FIORE, T.; PELLERITO, C.; STEFANO, R. D.; SCOPELLITI, M. E PELLERITO, L. Computational study of dimethyl and trimethyl-tin(IV) complexes of porphyrin derivatives, **Appl. Organometal. Chem**. v. 15, p 581–592, 2001.
 17. S.T. E HOFER, T. S. Hydration of porphyrin and Mg-porphyrin: ab initio quantum mechanical charge Field molecular dynamics simulations, **Mol. BioSyst**. v. 10, p. 117–127, 2014.
 18. FAVIA, A. D.; CAVALLI, A.; MASETTI, M.; CAROTTI, A.; RECANATINI, M. Three-Dimensional Model of the Human Aromatase Enzyme and Density Functional Parameterization of the Iron-Containing Protoporphyrin IX for a Molecular dynamics Study of Heme-Cysteinato Cytochromes. **Protein: Structure, Function, and Bioinformatics** v. 62, p. 1074 –1087, 2006.

19. AGUILAR, M. C. E ROCHA, W.R. The nature of the M–NO bond in [M(Imidazole) (PPIX)(L)]_q complexes (M = Fe²⁺, Ru²⁺; L =NO⁺, NO⁻ and NO⁻; PPIX = Protoporphyrin IX). **Inorganica Chimica Acta**. v. 408, p. 18–26, 2013.
20. BILLES, F E VÁRADY, B. A DFT study on the vibrational spectroscopy of protoporphyrin IX. **Spectrochimica Acta Part A**. v. 70, p. 729–734, 2008.
21. PERUN S1, TATCHEN J, MARIAN CM. Singlet and triplet excited states and intersystem crossing in free-base porphyrin: TDDFT and DFT/MRCI study. **ChemPhysChem**, v. 9, p. 282 – 292, 2008.
22. LEE, C.; YANG, W.; PARR, R.G. Development of the Colle-Salvetti Correlation-Energy formula into a functional of the electron density. **Physical Review B**, v. 98, p. 785-789, 1988.
23. Gaussian 09, Revision D.01, Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, J. A., Jr.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, J. M.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
24. PERDEW, J. P.; BURKE, K.; ERNZERHOF, M. Generalized gradient approximation made simple. **Physical Review Letters**, v.77, p.3865-3868, 1996.
25. YANAI, T.; TEW, D. P.; HANDY, N. C. A new hybrid exchange-correlation functional using the Coulomb-attenuating method (CAM-B3LYP). **Chemical Physics Letters**, v. 393, p. 51-57, 2004.
26. CHAI, J.-D.; HEAD-GORDON, M. Long-range corrected hybrid density functional with damped atom-atom dispersion correction. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 10, p. 6615-6620, 2008.

27. FURCHE, F.; RAPPORT, D. Density functional methods for excited states: equilibrium structure and electronic spectra. In: OLIVUCCI, M. **Computational Photochemistry**. Amsterdam: Elsevier, v. 15, p. 93-128, 2005.
28. Bergendahl, L. T.; Paterson, J. M. Computational and Theoretical Chemistry 1040-1041 2014.
29. Chemcraft. Disponível em : <<http://www.chemcraftprog.com/>>.
30. McQuarrie, D. A. Quantum Chemistry. 2ª Ed., University Science Books: Sausalito, 2008.
31. ADALBERTO B. M. S. BASSI; Conceitos Fundamentais em Espectroscopia. **Chemkeys-Liberdade para aprender**. v.1, p. 1-14, 2001