UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Física e Matemática
Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Estudo dos mecanismos da fotoatividade do
Quinifuril: um potencial composto
para a fotoquimioterapia

Nasser Ali Daghastanli

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à
Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Física e Matemática
Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Estudo dos mecanismos da fotoatividade do
Quinifuril: um potencial composto
para a fotoquimioterapia

Nasser Ali Daghastanli

Orientador: Prof. Dr. Iouri E. Borissevitch

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à
Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2005

Daghastanli, Nasser Ali

Estudo dos mecanismos da fotoatividade do quinifuril: um potencial composto para a fotoquimioterapia. Ribeirão Preto, 2005
129 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Borissevitch, Iouri E.

1. Quinifuril. 2. Fotoquimioterapia. 3. Fotocitotoxicidade. 4. Espécies reativas. 5. Interação com sistemas modelo.

Autor: Nasser Ali Daghasanli

Título: Estudo dos mecanismos da fotoatividade do quinifuril: um potencial composto para a fotoquimioterapia.

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Orientador

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em __/__/2005.

A Alláh,

*“Infinitamente bom, que vosso nome seja bendito pelos benefícios que me concedestes;
deles seria indigno se os atribuisse ao acaso ou ao meu próprio mérito.”*

Katia e Adnan,

que com seu amor e confiança incondicionais sempre me fortaleceram...

Aos meus avós, meu pai e irmãos

Espero que este trabalho seja digno de vocês.

Não nos é dada a escolha do tempo em que vivemos.

Nos é dada a escolha do que fazer com o tempo que nos é dado.

J. R. R. Tolkien

Agradecimentos

Prof. Dr. Iouri E. Borissevitch pela orientação.

Aos Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco, Gustavo Balejjo Olivera, Heloisa S. Selistre de Araújo, Igor Degterev, Marcelo Ganzarolli de Oliveira, Mauricio Baptista da Silva, Pietro Ciancaglini e suas equipes pelo inestimável auxílio na realização deste trabalho.

Aos companheiros do Grupo de Fotobiofísica, em especial Fábio e Cássia.

Dr. Divinomar Severino, Dr. Prislaine Pupolin, Amedea Seabra, Carlos Bruneto, Ana Maria, George, João Borin, Marcelo Rossa, Thomaz, Mércia, Leonardo, e tantos outros que eu estou me esquecendo....

À CAPES pelo suporte financeiro.

Resumo

Nesta Tese foram estudadas as propriedades do composto nitroheterocíclico Quinifuril na sua ação com a luz. O composto possui absorção na região espectral 350-450 nm ($\epsilon_{396}=24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e, sendo irradiado nesta região, sofre fotodecomposição. Foi observada a formação do seu estado tripleto ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$), de energia $E_T=18200 \text{ cm}^{-1}$. O tripleto sofre supressão na interação com seu estado fundamental ($2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e pelo oxigênio molecular ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

É apresentado um modelo para a fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa que supõe dois caminhos para sua fotólise: diretamente a partir do seu estado singleto e a partir da reação entre as moléculas nos estados fundamental e tripleto. São apresentados os efeitos de detergentes de diferentes cargas elétricas sobre suas propriedades, onde se observou o Quinifuril interage fracamente com o CTAB (catiônico); moderadamente como o DPS (zwitteriônico); e fortemente com o aniônico SDS, que afeta sua velocidade de fotodecomposição e seu estado tripleto. São apresentados dados da cinética de formação de agregação SDS-Quinifuril e o efeito destes agregados sobre suas características de fotodecomposição.

Estudou-se a fotocitotoxicidade do Quinifuril contra células em cultura, P388 (leucemia de camundongos), K562 (leucemia humana) e NIH3T3 (fibroblasto imortalizado de camundongos), onde se determinou um significativo aumento na sua citotoxicidade ao ser irradiado. O composto apresentou fotocitotoxicidade contra células K562 e NIT3H3 em doses tão baixas quanto $0,2 \text{ }\mu\text{g/mL}$; sua dose letal (LC_{50}) contra células P388 foi estimada em $0,45 \text{ }\mu\text{g/mL}$. O composto apresentou capacidade de inibir a proliferação destas linhagens em $\sim 100 \%$. Mostrou-se que os produtos finais de sua fotodecomposição não são os responsáveis pela sua fotocitotoxicidade.

Foi mostrado que, sob ação da luz, o Quinifuril produz as espécies reativas oxigênio singleto $^1\Delta_g$, ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico $\text{NO}^\bullet$ e sua fotocitotoxicidade pode ser explicada pela produção destas espécies intermediárias.

Abstract

In this work there were studied the properties of a nitroheterocyclic compound Quinifuryl in its interaction with light. The compound presents absorption in the 350-450 nm spectral region ($\epsilon_{396}=24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), and suffers photolysis under irradiation. The triplet state is formed ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$), characterized by the energy $E_T = 18200 \text{ cm}^{-1}$. The triplet state can be self-quenched ($2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), and quenched by oxygen ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

A model of the Quinifuryl water solution photolysis proposes two possible ways for the process: a direct photolysis through singlet state, and the other one due to its triplet/ground states reaction. We present the effects of different charged detergents upon Quinifuryl properties. It was observed that Quinifuryl interacts weakly with cationic CTAB, moderately with zwitterionic DPS, and strongly with anionic SDS. The latter affects the rate of its photolysis and the triplet state properties. The SDS-Quinifuryl aggregation and its effects over the Quinifuryl photolysis behavior are discussed.

Phototoxic effects of Quinifuryl against the P388 (mouse leukaemia), the K562 (human erythroleukaemia), and the NIH3T3 (immortalized mouse fibroblast) cell lines were studied. The compound demonstrated an elevated cytotoxicity under irradiation. The phototoxic dosage was $0.2 \text{ }\mu\text{g/mL}$ to both K562 and NIT3H3 cell lines, and $0.45 \text{ }\mu\text{g/mL}$ to the P388 ones. Under irradiation the compound showed $\sim 100 \%$ proliferation arrest against the P388 cell line. These results show that the final products of Quinifuryl photolysis are not responsible for its cytotoxicity.

Under irradiation, Quinifuryl produces reactive species, such as singlet oxygen $^1\Delta_g$, superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), and nitric oxide $\text{NO}^\bullet$, which can explain its high photocytotoxicity.

LISTA de ABREVIACES

$O_2^{\bullet-}$	Ânio superóxido
$^1\Delta g$	Oxigênio singlete
V_i	Velocidade inicial de fotólise do Quinifuril
λ	Comprimento da onda eletromagnética, em nm.
AA	cido ascórbico
BSA	Albumina de soro bovino
CCA	Concentrao crítica de agregao
CMC	Concentrao micelar crítica
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPR	<i>Electron paramagnetic resonance</i> (ressonância paramagnética de elétrons)
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FD	Fotodecomposio
FQT	Fotoquimoterapia
FS	Fotossensibilizador
HPS	N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato
IC	Interconverso
ISC	Cruzamento intersistemas (<i>intersystem crossing</i>)
MTT	Sal tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide
NAT	1-(H)-naftotriazole
NFR	Radical livre estável Nitroxil
NO $\bullet$	óxido nítrico
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PMT	Tubo fotomultiplicador
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TB	Azul de Trypan
TE	Efeito tóxico
TFD	Terapia fotodinâmica
TMOOP	1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-4-oxopiperidina
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Abreviações.....	iii

ÍNDICE

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1- Modalidades atuais para o tratamento do câncer	1
1.2 – A Terapia Fotodinâmica	3
1.2.1 - Mecanismos de ação da TFD - o efeito fotodinâmico	4
1.2.2 - O estado excitado transiente tripleto (T_1)	5
1.2.3 – Rendimento quântico de tripleto	6
1.3 – As espécies reativas oxigênio singlete ($^1\Delta_g$), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico (NO^*)	8
1.4 - Fotossensibilizadores atualmente utilizados em TFD	12
1.5 Compostos Nitroheterocíclicos	13
1.6 – O Quinifuril	14
1.7 - Aplicação de sistemas biomiméticos e de cultura de células nos estudos biofísicos	15
1.8 – Objetivos da Tese	17
1.8.1 – Objetivos Gerais	17
1.8.2 – Objetivos Específicos	17
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	18
2.1 – Princípios básicos dos Métodos experimentais	18
2.2 – Objeto de estudo	22
2.3 – Materiais e métodos	22
2.4 - Experimentos com cultura de células	26
Capítulo 3 - Estudo da fotocitotoxicidade do Quinifuril contra linhagens celulares P388, K562 e NIH3T3	30
3.1 - Mortalidade da linhagem P388	31
3.2 – Efeito fototóxico sobre as células P388	34
3.3 - Concentração de Quinifuril para a mortalidade de 50% das células (LC_{50})	35
3.4 – Inibição da proliferação celular através da irradiação do Quinifuril	37
3.5 – Ausência de toxicidade dos produtos da fotólise do Quinifuril	38
3.6 –Fotocitotoxicidade do Quinifuril contra células K562	40

3.7 – Fototoxicidade geral do Quinifuril contra linhagens celulares P388, K562 e NIH3T3	41
3.8 – Discussão	42
Capítulo 4 - Estudo das propriedades fotofísicas e fotoquímicas do Quinifuril em soluções homogêneas	44
4.1 Determinação do coeficiente de absorção molar ($\epsilon(\lambda)$) do Quinifuril em solução aquosa	44
4.2 - Estudo da Fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa	46
4.2.1 – Fotodecomposição na presença de oxigênio	46
4.2.2 – Fotodecomposição na ausência de oxigênio	46
4.2.3 - Velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril	48
4.3 - Velocidade de fotodecomposição em função da concentração do Quinifuril	49
4.4 - Estado transiente e tempo de vida do transiente do Quinifuril	51
4.4.1 - Caracterização do estado transiente do Quinifuril	51
4.4.2 – Determinação da energia do estado excitado tripleto (E_T) do Quinifuril	53
4.4.3 – Dependência do tempo de vida tripleto do Quinifuril com a sua concentração	55
4.5 - Modelo cinético da fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa	57
4.5.1 - Processos de fototransformação do Quinifuril	57
4.5.2 - Modelo cinético para os processos de fototransformação do Quinifuril	58
4.6 - Efeito do pH e da constante dielétrica (ϵ) sobre as propriedades espectrais do Quinifuril	65
4.6.1 - pK do Quinifuril	65
4.6.2 – Efeito do pH sobre a fotodecomposição do Quinifuril	67
4.7 - Efeito do solvente sobre as características espectrais e sobre a fotodecomposição do Quinifuril	69
4.8 - Efeito do etanol sobre as características espectrais e sobre a fotodecomposição do Quinifuril	71
4.9 – Discussão e Conclusões	73
Capítulo 5 - Interação do Quinifuril com detergentes e suas micelas	75
5.1 - Efeito das micelas sobre o pK do Quinifuril	75
5.2 – estudo da Cinética de agregação SDS-Quinifuril	78
5.3 - Estudos da fotodecomposição do Quinifuril na presença de SDS	86

5.4 - Efeito dos detergentes DPS e CTAB sobre a velocidade de fotodecomposição V_i do Quinifuril	88
5.5 - Estudo do efeito dos detergentes SDS, CTAB e DPS sobre o transiente do Quinifuril	90
5.6 - Discussão e conclusões	94
Capítulo 6 - Espécies Reativas resultantes da fotodecomposição do Quinifuril	98
6.1 - Formação do radical livre ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) devido à fotodecomposição do Quinifuril	98
6.2 - Formação do oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) devido à fotoexcitação do Quinifuril	103
6.3 - Formação do óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) devido à fotodecomposição do Quinifuril	108
6.4 - Fotorelaxamento do músculo anococcigeo de ratos pela fotodecomposição do Quinifuril	116
6.5 - Discussão e conclusões	119
Capítulo 7 - Conclusões e Perspectivas Futuras	121
Bibliografia	123
Anexo I	I
Anexo II	V
Anexo III	VII

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O câncer está sendo considerado uma epidemia mundial, uma vez que 6 milhões de pessoas morrem anualmente devido a esta doença e em alguns países (Austrália e Japão) já representa a maioria dos óbitos entre estas populações.

No Brasil um em cada oito óbitos é decorrente de tumores malignos [Piveta, 2004] e atualmente ultrapassa todas as causas de morte no país, somente ficando atrás de mortes por problemas cardiovasculares. Em 2002, cerca de 400 mil novos casos de câncer foram registrados e quase 130 mil brasileiros morreram em razão da doença, tendo 80% das vítimas mais de 50 anos, na sua maioria homens. Cerca de 2 milhões de brasileiros morreram de câncer entre 1979 e 2002, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde. As mortes por câncer correspondem por 13,2% dos óbitos no Brasil, sendo os cânceres de pulmão, estômago, mama, próstata, cólon e reto, esôfago, leucemias e colo do útero os que mais matam, nesta ordem. Deste modo, grandes esforços têm sido empregados para o desenvolvimento e melhora das terapias contra o câncer.

1.1- MODALIDADES ATUAIS PARA O TRATAMENTO DO CâNCER

O câncer pode ser definido como uma desordem celular que muitas vezes se caracteriza através de uma massa de células anormais (tumor), decorrente de uma série de alterações sofridas pelas células normais ao longo do tempo. De fato o câncer é um conjunto de doenças de origens distintas que tem como efeito a proliferação de suas células de maneira irregular. As células do câncer invadem os tecidos vizinhos provavelmente através de certas enzimas proteolíticas e sobrevivem a partir das células normais. Crescem no corpo do hospedeiro, ocupando o espaço e envolvendo as células normais, provocando hemorragias e infecções. Apresentam alterações dos componentes da superfície celular, tais como antígenos, enzimas e oncogenes. O câncer induz a deficiências nutricionais, perda de massa corpórea do hospedeiro e diminui as

defesas do organismo, levando o hospedeiro à morte em muitos casos [Franks e Teich, 1990].

As modalidades convencionalmente utilizadas para o tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia.

Atualmente a **cirurgia** é considerada o tratamento mais eficaz do câncer de tumores localizados, mas é ineficaz contra metástases, tumores disseminados ou inoperáveis à sua localização e evolução, e geralmente mutila o paciente. A **radioterapia** é considerada a 2ª melhor forma de tratamento do câncer, principalmente contra células que se dividem rapidamente e cânceres não amplamente disseminados, porém apresenta severos efeitos colaterais, tais como a debilitação do estado geral paciente. A **imunoterapia** utiliza-se de vacinas contra certos tipos de cânceres e sua efetividade tem aumentado quando combinada com técnicas de biologia molecular mas atualmente somente é efetiva contra um pequeno número de células tumorais. A **quimioterapia** utiliza-se de fármacos, sendo útil principalmente para cânceres disseminados e sua efetividade depende do estágio do tumor; possui pequena efetividade contra metástases ou tumores de crescimento lento, induzindo uma grande toxicidade às células normais vizinhas, e além disto o câncer pode desenvolver resistência aos medicamentos, diminuindo a efetividade do tratamento [Franks e Teich, 1990].

No **Anexo I** está apresentado um breve histórico sobre a evolução do combate ao câncer e breves informações sobre alguns tipos comuns de cânceres e suas características.

Um dos constantes desafios da ciência moderna é a busca de novos caminhos para o tratamentos de doenças. Um destes caminhos é o desenvolvimento de novos compostos com potencialidades terapêuticas, através da pesquisa de suas propriedades e o conhecimento de suas interações com os sistemas vivos para que venham a ser utilizados eficientemente como medicamentos.

A **terapia fotodinâmica** se apresenta como a mais recente técnica em uso clínico contra diversas enfermidades, inclusive o câncer. A terapia fotodinâmica utiliza-se de compostos ativados através da luz e está em desenvolvimento em diversos países, inclusive no Brasil, onde sua aplicação clínica já apresenta sucessos no tratamento e o desenvolvimento e aplicação destes novos composta está em franca expansão.

1.2 – A TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (**TFD**) é uma modalidade de tratamento local do câncer aplicada geralmente a pacientes com pequenos cânceres inoperáveis e refratários às técnicas convencionais de tratamento (radioterapia e quimioterapia). A TFD é baseada no uso de um composto que é retido preferencialmente pelas células cancerosas. Este composto fotossensibilizador, ao ser ativado pela luz, produz espécies reativas que destroem as células do câncer [Bourre et al., 2002].

A TFD envolve a combinação de luz visível e um fotossensibilizador que separadamente não apresentam danos ao organismo, mas ao serem aplicados juntos na presença do oxigênio podem produzir agentes citotóxicos letais que podem matar as células tumorais. Isto permite uma grande seletividade contra tecidos doentes uma vez que somente células expostas simultaneamente ao fotossensibilizador, ao oxigênio e à luz serão expostas aos efeitos citotóxicos. A seletividade da TFD é fruto da captura preferencial do fotossensibilizador pelo tecido tumoral e pela habilidade da técnica em confinar o dano a estes tecidos, através da limitação da irradiação a uma região específica. Deste modo, a TFD permite a destruição seletiva do tumor, permanecendo intacto o tecido sadio adjacente ao tumor [Sharman *et al.*, 1999].

O papel primário da TFD é matar as células indesejadas do hospedeiro. A TFD consiste essencialmente dos seguintes passos: (i) um fotossensibilizador, preferencialmente formado de uma única substância de síntese controlada, que possua afinidade de acumulação no tecido tumoral; (ii) a administração do fotossensibilizador deve permitir a máxima diferenciação da retenção do fotossensibilizador entre as células normais e tumorais; e (iii) o tumor deve ser irradiado com luz visível na presença de oxigênio, produzindo espécies reativas com o objetivo de destruir as células tumorais [Bonnett, 2001].

Idealmente um fotossensibilizador deverá possuir baixa ou nenhuma toxicidade no escuro e um bom comportamento farmacocinético, isto é, seletividade pelo tecido tumoral e fácil excreção do corpo do paciente [Bonnett, 2001].

1.2.1 - Mecanismos de ação da TFD - o efeito fotodinâmico

O **efeito fotodinâmico** pode ser definido como a reação que ocorre quando estão simultaneamente presentes um fotossensibilizador, luz e o oxigênio numa mesma região do corpo: o fotossensibilizador, em seu estado fundamental de energia singleto (S_0), absorve luz e é promovido para seu estado excitado transiente tripleto (T_1), de curto tempo de vida, via seu estado excitado singleto (S_1) [Henderson e Dougherty, 1992]. Uma vez em seu estado excitado tripleto, o fotossensibilizador poderá reagir por dois caminhos distintos: **(1)** reagir com o substrato ou solvente, transferindo um elétron ou um átomo de hidrogênio (reação do **Tipo I**); ou **(2)** transferir sua energia para o oxigênio molecular (3O_2), formando o seu estado excitado chamado oxigênio singleto $^1\Delta_g$ (reação do **Tipo II**) [Foote, 1991].

A ação fotodinâmica, que é a expressão do efeito fotodinâmico, se refere ao dano ou destruição dos tecidos vivos por luz visível na presença de um fotossensibilizador e do oxigênio [Bonnett, 2000]. Em princípio, luz na região do infravermelho próximo pode ser utilizada com maior eficiência, mas fotossensibilizadores absorvendo nesta região são incomuns e em muitos casos a irradiação é feita com luz visível. As fontes de luz podem ser incoerentes, tais como lâmpadas; ou coerentes, como os lasers [Bonnett, 2000]. Estes processos são representados esquematicamente através do **Diagrama de Jablonski** (**Figura 1.1**).

Figura 1.1 – Diagrama de Jablonski modificado. O fotossensibilizador no estado fundamental (S_0) ao absorver um fóton ($h\nu$) é promovido ao estado excitado singlete S_1 . No estado S_1 o fotossensibilizador poderá: (i) retornar ao S_0 por interconversão (IC);(ii) promover uma reação do Tipo I; ou (iii) transicionar por cruzamento intersistemas (ISC) para o estado excitado tripleto T_1 . No estado T_1 poderá transferir sua energia para o oxigênio, formando o oxigênio singlete $^1\Delta_g$ (reação do Tipo II). A eficiência relativa entre os processos é de (Tipo I)/(Tipo II) $\cong$ 1:9.

1.2.2 - O estado excitado transiente tripleto (T_1)

Uma molécula fotossensibilizadora, inicialmente no seu estado energético fundamental (S_0), pode ser promovida para seu estado excitado tripleto (T_1) através de um pulso de luz de alta intensidade (*flash fotolise*). Entretanto, o estado eletronicamente excitado T_1 não pode ser promovido do estado S_0 diretamente para T_1 , devendo a molécula passar pelo estado de energia singlete superior (S_1): $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$. Uma vez sendo a molécula promovida para seu estado energético S_1 , ela poderá transicionar por cruzamento intersistemas para o estado eletronicamente excitado tripleto T_1^v ($S_1 \rightarrow T_1^v$). Este estado excitado T_1 é formado por v subníveis energéticos vibracionais (T_1^v).

O cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1^v$) entre os estados excitados S_1 e T_1 da molécula ocorre isoenergeticamente, seguido da desativação não radiativa da molécula no estado superior T_1^v para o estado energético vibracional mais baixo ($v=0$) do seu estado eletrônico tripleto T_1 (regra de Kasha). As desativações vibracionais não radioativas por conversão interna dentro do

mesmo estado energético T_1 ($T_1^v \rightarrow T_1^{v=0}$) ocorrem muito mais rapidamente ($\cong 10^{12} \text{ s}^{-1}$) que o cruzamento intersistemas $T_1 \rightarrow S_0$ radiativo (fosforescência) ou de relaxamento. Assim, a molécula se encontrará no seu estado energeticamente excitado tripleto vibracional mais baixo T_1 (T_1^0) [Bonnett, 2000]. O estado T_1 é um estado transiente, pois a molécula se encontra num estado energético instável devido ao excesso de energia e, finalmente a molécula retornará ao seu estado de energia fundamental através de diversos caminhos, tais como: promovendo reações do Tipo I ou II; emitindo fosforescência ou sofrendo relaxamento não radioativo [Bonnett, 2000].

A transição energética $S_1 \rightarrow T_1$ (cruzamento intersistemas) é formalmente proibida por spin, mas em algumas moléculas o cruzamento intersistemas ocorre tão eficientemente que o rendimento quântico de tripleto pode atingir 70% [Bonnett, 2000]. Como o estado transiente tripleto possui um tempo de vida da ordem de 0,1-1.000 μs em soluções líquidas, ele tende a ser importante em muitas reações fotoquímicas. Assim, é de fundamental importância conhecer o tempo de vida do transiente tripleto (τ_T) de uma molécula fotossensibilizadora a ser utilizada em TFD, pois quanto mais tempo a molécula fotossensibilizadora permanecer no estado excitado tripleto maior a probabilidade do encontro entre esta molécula excitada com o oxigênio molecular e conseqüente formação do oxigênio singleto $^1\Delta_g$, através do mecanismo de transferência de energia (Tipo II). Uma molécula de fotossensibilizador possui uma eficiência de promoção de reações do Tipo II de 90% em relação à reação do Tipo I.

1.2.3 – Rendimento quântico de tripleto

O tempo de vida do transiente tripleto (τ_T) pode ser obtido através do ajuste da curva cinética de despopulação do estado tripleto (T_1) da molécula para seu estado fundamental (S_0).

Baseando-se no Diagrama de Jablonski, a eficiência (rendimento) do efeito fotodinâmico na TFD em relação ao alvo (por exemplo, alguns componentes das células tumorais) pode ser representado pela equação:

$$\Phi_{\text{TFD}} = \Phi_T \frac{k_{q1}[\text{O}_2]}{k_T^0 + k_{q1}[\text{O}_2]} \times \frac{k_2[\text{alvo}]}{k_{\Delta g} + k_{q2}[\text{alvo}] + k_2[\text{alvo}]}$$

onde Φ_T - rendimento quântico do estado tripleto do fotossensibilizador;

k_{q1} - é a constante de supressão do estado tripleto do fotossensibilizador pelo oxigênio;

k_T^0 - constante de decaimento do estado tripleto na ausência do oxigênio;

k_2 - constante bi-molecular da reação entre $^1\Delta_g$ e o alvo;

$k_{\Delta g}$ - constante de decaimento do $^1\Delta_g$ na ausência do alvo;

k_{q2} - constante de supressão do $^1\Delta_g$ pelo alvo, sem produzir reação.

Deste modo, pode-se inferir que a eficácia da TFD em destruir alvos celulares é limitada por diversos processos concorrentes que diminuem o rendimento quântico do estado tripleto e da reação do $^1\Delta_g$ com o alvo e essa limitação é causada pela perda da energia de excitação do fotossensibilizador sem produzir o efeito fotodinâmico eficientemente.

O rendimento quântico de tripleto típico de um fotossensibilizador está entre 0,3 a 0,7 [Bonnett, 2000]. Por outro lado, as mudanças no ambiente, como a presença de outras moléculas ou o aumento da força iônica, podem alterar as características dos processos de perda de energia do composto e deste modo reduzir seus rendimentos quânticos. Um caso típico é a diminuição do tempo de vida e do rendimento quântico de tripleto dos fotossensibilizadores devido à sua agregação.

As limitações dos mecanismos baseados em reações de espécies excitadas podem ser contornadas através de caminhos alternativos que incluam a formação de espécies reativas energeticamente estáveis (não excitadas) como, por exemplo, os radicais livres. Um radical livre pode ser definido como *qualquer espécie capaz de uma existência independente que contenha um elétron desemparelhado* [Maxwell e Lip, 1997]. Esta situação torna esta espécie altamente reativa. A estabilização do radical apenas ocorre pela oxidação ou redução das moléculas vizinhas. Entretanto, a molécula atacada possuirá um elétron desemparelhado se tornando, por sua vez, uma espécie radical. Eventos subsequentes dependem da reatividade do alvo: se moléculas adicionais forem atacadas haverá a propagação de uma reação em cadeia de formação de radicais livres. Deste modo, a existência de um único radical livre no meio poderá iniciar uma cascata de reações redox de transferência de elétrons

[Maxwell e Lip, 1997]. Estas reações ocorrendo nas vizinhanças de tecidos tumorais podem induzir à destruição destes tecidos.

Recentemente novas modalidades de terapias que se utilizam de compostos fotoativos que liberam outras espécies reativas, tais como o radical óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) ou o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), têm se apresentado como uma promissora alternativa no combate de doenças, inclusive o câncer [Kerwin et al., 1995; Kroncke et al., 1997; Wink et al., 1998; Wink e Mitchell, 1998; Korbélik et al., 2000].

1.3 - AS ESPÉCIES REATIVAS OXIGÊNIO SINGLETO ($^1\Delta_g$), ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\bullet-}$) E ÓXIDO NÍTRICO ($\text{NO}^\bullet$)

O oxigênio molecular tem sua reação com as biomoléculas restringida por spin, pois o oxigênio é uma molécula diatômica que, em seu estado fundamental, se apresenta no estado tripleto ($^3\text{O}_2$), possuindo dois elétrons no orbital antiligante π^* . Os dois elétrons possuem spins paralelos de modo que o $^3\text{O}_2$ pode oxidar outra molécula aceitando uma par de elétrons destas moléculas.

As espécies reativas de oxigênio (**ERO** 's) são importantes biologicamente devido às suas reações com as biomoléculas:

O **oxigênio singleto** ($^1\Delta_g$) é uma espécie que possui a restrição de spin aliviada através do movimento de um elétron desemparelhado, tornando-o emparelhado. Ele é uma das mais importantes moléculas do sistema biológico, não possui elétron desemparelhado e assim não é um radical, mas sim uma espécie altamente reativa. Ele possui um excesso de energia e é formado quando o oxigênio molecular $^3\text{O}_2$ absorve energia ≥ 94 kcal/mol, transicionando para o estado excitado singleto através do cruzamento intersistemas (ISC). O $^1\Delta_g$ é instável e decai para o estado fundamental tripleto $^3\text{O}_2$ emitindo o excesso de energia na região do infravermelho, em ~ 1270 nm. Esta emissão é a forma mais aceita experimentalmente de se provar a formação de $^1\Delta_g$ [Cadenas e Sies, 1984; Bonnett, 2000]. O $^1\Delta_g$ em solução aquosa possui um tempo de vida entre $2 \mu\text{s}$ [Bonnett, 2000] e $6 \mu\text{s}$ [Dolphin, 1994] e seu tempo bioquimicamente ativo é de $\cong 250$ ns no citoplasma e $\cong 100$ ns na região lipídica

das membranas; seu alcance difusional é da ordem de 45 nm no meio celular [Ochsner, 1997]. Foi postulado que o $^1\Delta_g$ é o agente citotóxico responsável pela fotoinativação ou morte das células tumorais, resultando em danos das membranas celulares, da mitocôndria, lisossomos e núcleos celulares, resultando em morte celular [Ochsner, 1997].

Como a energia de formação do $^1\Delta_g$ é baixa (7900 cm^{-1}) o fotossensibilizador poderá ter uma energia de tripleto também baixa e mesmo assim ser formado o estado excitado $^1\Delta_g$. Por isso para se excitar o sensibilizador podem ser usados os fótons de comprimento da onda $>600\text{ nm}$ onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes.

A penetração de luz no tecido biológico é dependente do comprimento de onda da luz, pois cada comprimento de onda da luz alcança diferentes profundidades. Por exemplo na pele humana a penetração é $\approx 2,5\text{ mm}$ para 400 nm ; $\approx 3,5\text{ mm}$ para $500\text{-}550\text{ nm}$ e $\approx 1\text{-}2\text{ cm}$ para $630\text{-}650\text{ nm}$ [Ochsner, 1996; Jori, 1996].

O **ânion radical superóxido** ($O_2^{\bullet-}$) é uma das espécies reativas do oxigênio, além do oxigênio singlete, que pode ser induzida através da ação da luz sobre um fotossensibilizador e que possui um importante papel bioquímico em vários processos biológicos, tais como o envelhecimento, o câncer ou a resposta inflamatória, que são considerados resultantes da ação de espécies reativas do oxigênio. O $O_2^{\bullet-}$ é considerado como uma das principais causas dos danos biológicos [Suzuki, 1993] através de reações de peroxidação de diversos compostos, produzindo os radicais destes compostos. Estes processos levam à peroxidação de lipídios, à destruição dos agregados de Fe-S dentro das enzimas, à inibição da SOD (superóxido dismutase) e alteram as correntes de íons através da membrana da mitocôndria [Kroncke et al., 1997]. Estes processos podem causar danos irreversíveis às células, destruindo-as. A produção do ânion superóxido depende da reação redox entre o fotossensibilizador e o substrato. A energia necessária para produzir esta reação depende da característica redox dos reagentes e pode ser bastante baixa.

O **Anexo II** apresenta os estados energéticos e distribuições eletrônicas de algumas formas de oxigênio.

O **óxido nítrico** ($NO^{\bullet}$) é um mediador endógeno em numerosos processos fisiológicos nas células dos mamíferos e possui efeitos distintos e,

eventualmente, contraditórios. Suas implicações fisiológicas abrangem desde (i) **proteção**, agindo como antioxidante, na agregação dos neutrófilos ou inibindo a adesão de leucócitos; (ii) **regulatória**, tais como na regulação da pressão sangüínea, na transmissão sináptica cerebral e formação da memória [Kerwin et al., 1995; Miranda et al., 2000], atuando em processos de relaxamento muscular e vascular, através do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) [Wink e Mitchell, 1998]; e (iii) **deletéria**, como na inibição da função enzimática, na indução da peroxidação lipídica, e está envolvido nos processos de morte celular, dano ao DNA ou no bloqueio da respiração celular [Wink e Mitchell, 1998]. O NO• faz parte do sistema imunológico na defesa contra parasitas intracelulares, micróbios ou células cancerosas, podendo agir diretamente, através de sua ação redutora ou através dos produtos de sua ação [Kerwin et al., 1995; Wink e Mitchell, 1998]. O NO• se apresenta em baixas concentrações nos sistemas biológicos, tipicamente entre 10-400 nM. O NO• reage com o oxigênio formando o composto dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$): $2\text{NO}^\bullet + \text{O}_2 \xrightarrow{k} \text{NO}_2^\bullet$ ($k \approx 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ em soluções aquosas), produto altamente oxidante e deste modo considera-se que a toxicidade do NO• *per se* está em concentrações em torno de 1 μM [Beckman, 1996].

As propriedades do NO• na biologia do câncer também são contraditórias, pois ele pode promover o tumor aumentando sua angiogênese, diminuindo a resposta imune ou prevenindo a infiltração de leucócitos. Por outro lado a partícula possui propriedades antitumorais através de seus efeitos citotóxicos, citostáticos e antimetastáticos [Wink e Mitchell, 1998]. Estima-se que concentrações de NO• entre 4-5 μM alteram a corrente de íons através da membrana plasmática. O NO• tem a mitocôndria como um de seus principais alvos celulares [Kroncke et al., 1997].

Uma das principais características do NO• para seu potencial sucesso terapêutico é que ele pode dar início a várias reações em cadeia com outras espécies de moléculas, gerando diversas espécies de radicais que induzirão a peroxidação dos lipídios da membrana celular, podendo inclusive destruí-la. Este efeito poderá dar uma importante contribuição na terapia de doenças, em particular o câncer [Kerwin et al., 1995; Kroncke et al., 1997; Wink e Mitchell, 1998; Korbelik et al., 2000].

O efeito tóxico do NO• sobre as células pode ser avaliado ao se considerar a sua reatividade com outras espécies [Kroncke et al, 1997]:

a) O óxido nítrico poderá reagir com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), liberando o oxigênio singlete (¹Δ_g);

b) O NO• pode reagir com o superóxido radical produzindo o ânion peroxinitrito (OONO⁻), produto altamente reativo, através da reação:

c) A reação do NO• com o oxigênio molecular pode ocorrer *in vivo*, produzindo espécies altamente reativas do nitrogênio, tais como o peroxinitrito radical (ONOO•), o •NO₂ e o dinitrogênio trióxido (N₂O₃).

A detecção direta do NO• pode ser obtida através de sua reação com o ozônio, resultando em uma reação quimioluminescente com emissão na região espectral >600 nm [Moncada et al., 1991].

Compostos que liberam NO• necessitam de luz de mais energia para a fotossensibilização (λ ≤ 400 nm), região espectral onde os tecidos biológicos não são transparentes. Esta séria limitação ao uso destes compostos pode ser vir a ser contornada através da mudança na estrutura dos atuais fotossensibilizadores, fazendo com que eles absorvam em outra faixa espectral mais adequada.

A produção das diversas espécies reativas através da ativação de um fotossensibilizador depende da estrutura do composto e do mecanismo de formação da espécie reativa. Oxidantes fortes como vários ERO's podem danificar as biomoléculas e as estruturas celulares das quais elas fazem parte. Dentre as mais importantes estruturas celulares suscetíveis às ações dos radicais livres estão as cadeias laterais dos ácidos graxos dos lipídios nas diversas membranas da célula, especialmente nas membranas das mitocôndrias (as quais estão diretamente expostas ao ânion superóxido produzido durante a respiração celular) [Halliwell e Gutteridge, 1990].

1.4 - FOTOSSENSIBILIZADORES ATUALMENTE UTILIZADOS EM TFD

Os fotossensibilizadores atualmente utilizados clinicamente em TFD são os derivados de hematoporfirina e muitos outros estão em diferentes fases de desenvolvimento laboratorial ou clínico.

O primeiro produto comercial aplicado em TFD foi o Photofrin®, composto formado por uma mistura de derivados de hematoporfirina. A primeira aprovação do Photofrin por uma agência de saúde foi obtida em 1993 no Canadá [Allison et al., 2004]. Aprovações subseqüentes foram obtidas na Holanda e França para tratamento de estágios avançados de câncer de esôfago e pulmão; na Alemanha para tratamento inicial de cânceres de pulmão; no Japão para tratamento de estágios iniciais de cânceres de pulmão, esôfago, gástrico ou cervical. Somente em 1998, a *Food and Drug Administration* –FDA dos EUA aprovou o Photofrin para uso em estágios iniciais de câncer de pulmão e câncer de esôfago em estágios avançados. O Photofrin, apesar de possuir várias propriedades benéficas, apresenta a desvantagem farmacocinética de se acumular na pele, ocasionando fotossensibilidade, principalmente sob Sol forte, podendo agir por mais de seis semanas no organismo. Além disso, a proporção mais efetiva deste fármaco incorporado ao tecido doente em relação ao saudável ocorre em aproximadamente 48 horas após a injeção da droga provocando, eventualmente, a necessidade de hospitalização do paciente dois dias antes da irradiação. Outra desvantagem é o fato de que o comprimento de onda de luz necessário à excitação do composto não ser o ideal, pois o Photofrin possui pequena absorção na região de comprimento de onda entre 600 e 800 nm, onde os tecidos são relativamente transparentes à luz. Na região abaixo de 600 nm, a efetividade com que ocorre a penetração de luz é pequena devido ao espalhamento e a presença de cromóforos endógenos, principalmente, a hemoglobina. A composição química do Photofrin é uma mistura de oligômeros o que prejudica o entendimento dos mecanismos de ação e farmacocinética [Piette et al., 2003; Allison et al., 2004]. Além disto, a droga é cara e a iluminação requer o uso de lasers de alta potência de custo elevado. Desta maneira, a aplicação de TFD tem sido restrita a grandes centros médicos, dificultando tratamentos seguidos em clínica médica comum [Tardivo et al., 2005]. O Photogen e o Photosan são marcas comerciais de produtos similares ao Photofrin. Outros fotossensibilizadores, tais como as ftalocianinas ou a protoporfirina IX, têm sido testados com resultados animadores; e o Visudyne, uma verteporfina, tem sido aplicada clinicamente na área oftalmológica contra a degeneração da mácula.

Dentro deste contexto, existem atualmente vários grupos de pesquisa atuando na síntese, caracterização ou aplicação de novos compostos fotossensíveis para uso em TFD, tanto no mundo quanto no Brasil.

1.5 COMPOSTOS NITROHETEROCÍCLICOS

Recentemente novos compostos fotoativos estão em desenvolvimento, tais como os complexos de rutênio ou os compostos nitrosilados, nitrofuranos, que induzem a formação de espécies reativas, dentre eles o ânion superóxido, o óxido nítrico ou o radical hidroxil [Suzuki, 1993; Makings e Tsien., 1994; Wood et al., 1996, Makareyeva et al., 1997; Shishido e de Oliveira, 1998]. O uso terapêutico destes novos compostos esta em franco desenvolvimento e muitos compostos estão em fase de testes laboratoriais.

Dentre os compostos citados acima são de especial interesse os compostos derivados de nitrofuranos, tais como a nitrofurantoina, a furacilina, o furagin ou o quinifuril [Suntres e Shek, 1992; Borisevitch e Degterev, 1992]. O interesse nestes compostos é motivado pela sua bio- e fotoatividade.

A aplicação dos compostos nitroheterocíclicos na medicina iniciou-se com os trabalhos de Dodd e Stillman em 1944, que descobriram as primeiras propriedades bactericidas destes compostos [*apud* Borisevitch e Degterev, 1992]. Eles apresentam ativação associada à sua redução química/biológica com a mais extensa aplicação clínica e esta redução é um pré-requisito de toda sua atividade biológica [Jager et al., 1997; Tocher, 1997]. A redução do grupo nitro na ausência de oxigênio está associada à sua toxicidade seletiva e a possíveis ações mutagênicas, pois o composto reduzido causa a desestabilização ou até mesmo a quebra da hélice do DNA [Hogg e Kalyanaraman, 1999]. Estes compostos são empregados como agentes quimioterápicos no tratamento de várias enfermidades, inclusive o câncer [Muller, 1986; Biaglow, 1986; Ramakrisna Rao et al., 1988; Verovskiy et al., 1990].

O uso farmacológico dos compostos nitroheterocíclicos (nitrofuranos) é limitado por sua toxicidade para o organismo, devido ao seu metabolismo [Degterev et al., 1993; Borisevitch e Degterev, 1992; Makareyeva et al., 1997]. Por outro lado, sua alta toxicidade pode provocar a destruição das fontes de patologias ao agir diretamente sobre os sítios de inflamação ou sobre células cancerosas.

As atividades bactericidas e antiinflamatórias dos compostos nitroheterocíclicos são bastante estudadas [Suntres e Shek, 1992; Degterev et al., 1993, 1999a,b; Jager et al., 1997; Makareyeva et al., 1997]. Foi descoberto também que a fotoativação dos nitrofuranos provoca efeitos colaterais, tais como reações alérgicas e anemias hemolíticas [Borisevitch e Degterev, 1992].

1.6 – O QUINIFURIL

O Quinifuril, que será o objeto de estudos desta Tese, é representante da família de derivados de *5-nitrofurano-etenil-quinolina* (derivados de 5-nitrofurano). O Quinifuril foi sintetizado da década de 1970 por Dr.N.M. Sukhova (Instituto de Síntese Orgânica, Academia de Ciências de Riga, Letônia) com o objetivo de desenvolver novos compostos antitumorais. Ele possui intensa absorção óptica na região visível e sua irradiação na região visível induz a sua fotodegradação, mas este processo não estava ainda bem estudado.

O Quinifuril induz a liberação de óxido nítrico (NO^*) e do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ao ser metabolizado [Degterev et al., 1989, 1990, 1993, 1997, 1999a, b; Borisevitch e Degterev, 1992]. O uso terapêutico do Quinifuril é limitado por seu rápido metabolismo nos tecidos normais, em particular nos hepáticos. Este rápido metabolismo limita sua eficácia terapêutica e provoca efeitos tóxicos.

O uso terapêutico do Quinifuril tem despertado interesse para o combate a diversas enfermidades e recentemente foi mostrado que o Quinifuril possui intensa atividade contra diversas linhagens celulares, cancerígenas inclusive [Rossa et al., 2003].

Ainda não eram bem conhecidas as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do Quinifuril em soluções homogêneas ou na presença dos sistemas modelos e vivos. Assim, as interações do Quinifuril com sistemas microorganizados serão abordadas nesta Tese, utilizando-se de vários métodos espectroscópicos para se obter informações dos seus fotoprocessos em sua interação com os sistemas microorganizados, que poderão fornecer subsídios ao seu uso terapêutico.

1.7 - APLICAÇÃO DE SISTEMAS BIOMIMÉTICOS E DE CULTURA DE CÉLULAS NOS ESTUDOS BIOFÍSICOS.

As micelas têm servido como modelos simplificados de sistemas microorganizados ou de membranas biológicas. As micelas de detergentes são convenientemente formadas de maneira reprodutível e possuem interessantes propriedades de solubilizar alguns tipos de moléculas [Lunardi et al., 2002]. Os detergentes são moléculas de superfície ativa que se auto-associam e se ligam nas superfícies hidrofóbicas de uma maneira dependente da sua concentração. O caráter anfipático dos detergentes é evidente em sua estrutura, que consiste em um grupo cabeça polar (ou carregada) e uma calda hidrofóbica. Os detergentes podem ser iônicos (catiônicos ou aniônicos), não-iônicos ou zwitteriônicos (possuem cargas positivas e negativas mas são neutros). As propriedades dos detergentes são dependentes da natureza e estereoquímica de sua cabeça polar e calda. Os monômeros dos detergentes podem se associar, formando estruturas microorganizadas (as micelas) a partir da sua concentração micelar crítica (CMC), tomando formas como esferas [Garavito e Ferguson-Miller, 2001]. Em concentrações abaixo da CMC os detergentes podem formar agregados micelares de estruturas bastante complexas, dependendo da natureza de sua cabeça polar e do ambiente onde estão imersas.

Outro exemplo bastante interessante de sistema modelo é a célula fantasma de eritrócitos (células *ghost*). As células *ghost* são vesículas naturais que mimetizam a estrutura organizacional e funcional de biomembranas, tornando estas estruturas convenientes e vantajosos modelos experimentais [Ierardi et al., 2002]. As células *ghost* são sistemas naturais formados a partir dos eritrócitos (células sanguíneas) esvaziados e re-selados, que possuem uma estrutura organizada formada por: poço aquoso interno/ membrana / ambiente aquoso externo.

Células de linhagens normais ou neoplásicas são também modelos convenientes e mais realistas utilizadas nos estudos biológicos. Elas são cultivadas *in vitro* em laboratório especializados. O cultivo celular consiste em um conjunto de procedimentos que permitem a manutenção e multiplicação das células, preservando suas características genéticas, fisiológicas e bioquímicas. Cada linhagem possui características próprias e assim cada linhagem exige um protocolo específico de manuseio e cultivo. Em linhas gerais as células se proliferam em placas de cultura contendo meio nutritivo e condições adequadas

de temperatura e estocagem. As células normais se multiplicam, no máximo, até 50 gerações e crescem em placas até que toda a superfície da placa esteja recoberta com uma única camada celular. Este processo é controlado pela enzima telomerase, que possui a função de repetir a sequência final da fita do DNA celular, permitindo sua duplicação, até sua inibição pelo contato entre as células, estagio a partir do qual o processo de divisão celular se encerra. As células tumorais por sua vez, não possuem este controle do crescimento, se proliferando indefinidamente, formando os aglomerados celulares [Fresney, 1994; ATCC, 2005].

Uma das mais completas ferramentas de estudos *in vitro* da ação fotodinâmica são os ensaios de fotocitotoxicidade sobre as células em cultura. Estes ensaios podem fornecer informações quantitativas da mortalidade das células, induzida pelas espécies reativas liberadas durante a ativação do fotossensibilizador.

Os métodos mais amplamente utilizados para quantificar a mortalidade celular são realizados através de marcadores da integridade da membrana celular (azul de Trupan) ou da atividade celular (sal tetrazolium MTT).

1.8 – OBJETIVOS DA TESE

1.8.1 – Objetivos Gerais

Tendo em vista a procura de caminhos alternativos para o tratamento através da luz visível de diversas doenças, inclusive o câncer, propôs-se estudar as propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotocitotóxicas da classe de compostos nitroheterocíclicos. Como primeiro modelo experimental, realizou-se o estudo do Quinifuril (2-(5'-nitro -2'- furanil) etenil-4-{N-[4'-(N,N-di metil amino) -1'-metil butil] carbamoil} quinolina) (Figura 1.2) sob a ação da luz visível. Estes estudos foram realizados em soluções homogêneas de diferentes solventes, na interação com sistemas modelo biológicos, tais como os detergentes e suas micelas, e em cultura de células de linhagens normais e neoplásicas.

Estes estudos visaram determinar a potencialidade do composto como agente fotossensibilizador para seu eventual uso em fotoquimioterapia.

Figura 1.2 – Estrutura do Quinifuril.

1.8.2 – Objetivos Específicos

- Estudar a cinética de fotodecomposição do Quinifuril.
- Estudar os fotoprocessos primários que regem suas propriedades transientes, tais como suas constantes de decaimento, de supressão pelo oxigênio e de auto-supressão, em solução aquosa.
- Modelar a cinética de fotodecomposição do Quinifuril.
- Estudar os efeitos da presença de sistemas microrganizados de detergentes e suas micelas sobre seu processo de fotodecomposição e nas suas propriedades espectroscópicas de estado estacionário e transiente.
- Avaliar a fotocitotoxicidade do Quinifuril contra linhagens celulares *in vitro*.

Capítulo 2

2.1 – PRINCÍPIOS BÁSICOS DOS MÉTODOS EXPERIMENTAIS

- **Espectroscopia de absorção ótica**

A absorção ótica é um dos principais testes realizados em amostras desconhecidas que absorvem luz. A absorção ótica (A) é dependente da concentração ($[C]$) da amostra, do comprimento de onda (λ) incidente e do caminho ótico (l) que a luz percorre na amostra. A Lei de Lambert – Beer relaciona estas grandezas [Calvert e Pitts, 1966]:

$$A = \log (I_0 / I_t) = \varepsilon(\lambda)l[C] \quad (2.1)$$

onde $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar ($M^{-1}cm^{-1}$). O coeficiente $\varepsilon(\lambda)$ é uma característica intrínseca do composto.

O coeficiente de absorção molar ε é medido através da variação da absorbância da amostra num comprimento de onda específico com a variação da sua concentração. Geralmente o ε é medido no máximo comprimento de onda do composto (λ_{max}).

Neste trabalho, os espectros de absorção foram registrados usando o espectrofotômetro Beckman DU 640.

- **Espectroscopia de fluorescência**

Quando a molécula absorve um fóton de luz, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Este pode ser o estado excitado de menor energia (por exemplo, S_1) ou de maior energia (S_2 , S_3). A transição mais provável ocorre entre níveis de mesmo spin. Um dos possíveis caminhos de perda de energia por uma molécula é a fluorescência, transição radiativa entre níveis de mesmo estado de spin com emissão de um fóton. Ela é uma ferramenta útil para detecção de compostos que apenas fluorescem em certas condições especiais, tais como quando ligadas a sondas ou após reações químicas que as tornam fluorescentes.

Neste trabalho utilizou-se o espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 55.

- **Espectroscopia de pulso relâmpago de laser (*flash fotólise*)**

A excitação de moléculas por um intenso pulso de luz *flash fotólise* (10^{16} - 10^{18} fótons), tipicamente por um pulso de laser, levam estas moléculas a um estado eletronicamente excitado de energia. Se estes estados excitados transientes de curto tempo de vida forem produzidos em grande quantidade, eles podem ser monitorados possibilitando a determinação dos espectros, tempos de vida, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de produtos com curtos tempos de vida induzidos pela luz, tais como estados excitados eletrônicos.

A espectroscopia de flash permite o estudo da transição $T_1 \rightarrow T_n$ do tripleto das moléculas excitadas. O diagrama mostra esquematicamente a transição $T_1 \rightarrow T_2$, onde (a) excitação da molécula do estado fundamental S_0 para 1º estado excitado singlete S_1 , através de um pulso de laser; (b) uma vez populado o estado S_1 a molécula pode transicionar para T_1 por ISC; (c) a população de moléculas no estado tripleto é monitorada através da absorção $T_1 \rightarrow T_2$ por uma luz de análise. Como o estado T_1 é transiente, tipicamente da ordem de 0,1-1000 μs , as moléculas decaem, despopulando este estado. Deste modo, o monitoramento da absorção $T_1 \rightarrow T_2$ fornece uma medida do tempo de vida do estado excitado tripleto. A figura abaixo mostra um esquema representativo de um sistema de flash fotólise.

As características mais importantes do sistema de *flash fotólise* são: a duração do pulso de excitação, sua energia e sua região espectral. Os tempos de duração dos pulsos são da ordem entre 10^{-3} a 10^{-9} s e dependem das propriedades específicas do composto a ser analisado e são limitados pelas características do sistema de análise.

A intensidade da absorção diferencial (ΔA) medida no sistema de análise é diretamente proporcional (k) à concentração do composto no estado transiente tripleto (C_T) (Anexo II):

$$\Delta A = kC_T(t) \quad (2.2)$$

O estado tripleto do Quinifuril foi produzido por curtos pulsos de luz (10 ns, 30 mJ/pulso, 5 pulsos/medida) do terceiro harmônico do laser de Nd:YAG (355 nm) do sistema LP900 da Edinburgh Analytical Instruments. O espectro de absorção do estado transiente foi monitorado na região espectral $450 \leq \lambda \leq 750$ nm e os perfis de decaimento em $\lambda=550$ nm usando um sistema de registro padrão. Os efeitos do oxigênio foram estudados em amostras deaeradas por borbulhamento de gás nitrogênio por 5 min.

- **Detecção da fosforescência do $^1\Delta_g$ com resolução temporal**

A produção de oxigênio singleto ($^1\Delta_g$) foi observada através de medidas do decaimento da sua fosforescência em 1280 nm, que surge da transição radiativa do seu estado excitado singleto ao seu estado fundamental tripleto ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$).

A transição entre os estados singleto e tripleto ($S \rightarrow T$) é proibida por spin e assim a emissão de fosforescência emitida pelo $^1\Delta_g$ é de baixa intensidade. Deste modo, utilizou-se da técnica de contagem de fóton único (*single photon*), utilizando o espectrômetro SURELETE III modificado para medir $^1\Delta_g$, e um laser Nd:YAG como sistema de excitação (355 nm), com resolução temporal ~ 5 ns. A fosforescência da solução foi monitorada na região espectral entre 1220-1310 nm. Uma vez que o tempo de vida do $^1\Delta_g$ em acetonitrila é muito mais longo que em água, iniciou-se as medidas de detecção do $^1\Delta_g$ em solução de acetonitrila para se obter um espectro de fosforescência distinto. Calculou-se o rendimento quântico ($\Phi_{\Delta_g}^Q$) da produção do $^1\Delta_g$ pela fotoexcitação do Quinifuril em soluções aquosas utilizando-se a porfirina TPPS₄ como referência.

- **Espectroscopia por Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)**

A ressonância paramagnética eletrônica (**EPR**) é uma técnica que detecta elétrons desemparelhados, tais como radicais livres ou íons com camadas eletrônicas incompletas, através da absorção da energia da radiação de microondas ($\sim 10^{10}$ Hz) incidente sobre uma amostra imersa num campo magnético intenso (0,3-1,2 T) [Campbel e Dwek, 1984].

Os elétrons possuem momento magnético intrínseco (spin) de $s=1/2$. Na

presença de um campo magnético, o momento magnético tem duas orientações possíveis que possuem energias diferentes, correspondendo aos dois estados possíveis de spin do elétron: $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$. Transições entre os dois estados energéticos de spin podem ser induzidas se radiação eletromagnética oscilante da microonda de comprimento de onda apropriada incidir perpendicularmente a um campo magnético externo de intensidade **H**. A condição de ressonância em medidas de EPR é obtida quando a diferença entre dois estados energéticos de spin (ΔE) é igual à energia da radiação eletromagnética da microonda ($h\nu$):

$$h\nu = g\beta H \quad (2.3)$$

onde g é o fator-g do elétron e $\beta = 0,92 \times 10^{-23}$ J.T (magnéton de Bohr).

O diagrama ilustra a separação dos níveis de energia de elétrons desemparelhados com $s = +\frac{1}{2}$ e $s = -\frac{1}{2}$ frente a um campo magnético de intensidade **H**.

Os radicais livres são espécies paramagnéticas que geralmente têm curto tempo de vida, mas possuem importantes papéis em muitos processos físicos, químicos ou biológicos. Devido ao seu curto tempo de vida, utiliza-se compostos (*spin trap*) que aprisionam estas espécies radicais, formando um radical estável de fácil detecção.

Neste trabalho utilizou-se o espectrômetro de EPR Varian E-4, banda-X (9,47 GHz), com 0,5 G de amplitude de modulação, potência de 10 mW e uma varredura entre 3370-3390 G.

2.2 – OBJETO DE ESTUDO

O Quinifuril é um derivado de 5-nitrofurano (*5-nitrofurano-etenil-quinolina*), sintetizado pela Dr.N.M. Sukhova (Instituto de Síntese Orgânica, Academia de Ciências de Riga, Letônia), de peso molecular 449 g/mol e grau de pureza analítico. Sua estrutura molecular (figura) foi confirmada por medidas de ressonância magnética nuclear no local de sua síntese.

2.3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes: a armadilha de spin (*trap*) TMOOP (1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-4-oxopiperidina) e seu correspondente radical livre estável Nitroxil, sintetizados por Dr. L. A. Krinitskaya (Instituto de Química- Física –Moscou, Rússia). Supressor de óxido nítrico ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) obtido da Tocris *Inc.* Sonda de nitrito DAN (2,3-diaminonaftaleno) obtido da ICN *Biomedicals Inc.* Epinefrina, acetonitrila, fenalenona obtidos da Merck. Superóxido dismutase (SOD), os detergentes SDS, CTAB e DPS obtidos da *Sigma Chemical Company*. A porfirina meso-tetrasulfonatofenil (TPPS₄) foi obtida da *Porphyrin Products Inc.* Todos os demais reagentes foram obtidos da Merck. Todos os reagentes possuem grau de pureza analítico e foram utilizados como recebidos.

Quinifuril. As soluções foram normalmente preparadas em água ultrapura, dissolvendo uma alíquota (~1-50 µL) da solução estoque (2-40 mM) do composto diretamente numa cubeta padrão de quartzo (1 cm). Testes também foram realizados em tampão fosfato (7,5 mM, pH 7,2) ou em outros solventes, quando expressamente declarados. Utilizou-se água ultrapura de qualidade milli-Q (pH 6; 18,2 MΩ) em todas as preparações aquosas. Todas as amostras foram preparadas em condições de baixa intensidade de luz (lâmpada de segurança vermelha (λ>550 nm) de 40 W), em temperatura controlada

(21°C). O coeficiente de absorção molar (ϵ). As concentrações de Quinifuril nas soluções foram confirmadas através de medidas de absorção ($A_{396} = \epsilon l [Q]$).

Detergentes. Soluções-estoque dos detergentes SDS (dodecil-sulfato de sódio), CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e DPS (N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato) foram preparadas em água e adicionados diretamente à cubeta (2 mL de Quinifuril) com uma micro-seringa ($\leq 50 \mu\text{L}$). A solução era suavemente agitada para a sua homogeneização.

Estudos de fotodecomposição. O Quinifuril foi irradiado por luz na região espectral 350-450 nm usando uma lâmpada de tungstênio (150 W) e um filtro óptico (5-57 KOPP *color glass filter*). A potência efetiva sobre a amostra foi de 22 mW/cm^2 , medida com o radiômetro *Spectra-Physics 407A*. Uma cubeta padrão de quartzo (1 cm) com água foi usada como filtro térmico, para prevenir efeitos colaterais devido ao aquecimento. A fotólise das amostras foi realizada em concentrações variando entre $0,5\text{-}100 \mu\text{M}$, e continuamente homogeneizadas através de um agitador magnético. As cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa e na presença de detergentes foram monitoradas pelo decréscimo da absorção sua banda principal de absorção em 396 nm (solução aquosa) ou em outro comprimento de onda quando expressamente declarado. As soluções em diferentes solventes foram preparadas pela adição de $10 \mu\text{L}$ da solução estoque aquosa do Quinifuril (4 mM) em 2 mL do respectivo solvente. O procedimento de fotólise foi idêntico ao descrito acima.

Cinética de formação de agregados. Estudos foram realizados adicionando-se uma alíquota de detergente na solução de Quinifuril e monitorando-se a absorção óptica em 396 nm por um tempo ≥ 50 minutos (5 segundos/ponto) com o espectrofotômetro Beckman DU 640.

Estudos do estado transiente. Os experimentos de *flash fotólise* em soluções aquosa ou de detergentes foram realizados em cubeta padrão de quartzo (1 cm). Os estados excitados foram obtidos por curtos pulsos de luz (10 ns) do laser de Nd:YAG (355 nm) do sistema LP900 da Edinburgh Analytical Instruments. As amostras deaeradas foram obtidas por borbulhamento de gás nitrogênio (5 min) diretamente na cubeta.

Produção do radical livre ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A formação do radical livre estável **nitroxil** resultou da oxidação do TMOOP devido à fotodecomposição do Quinifuril em solução aerada. Soluções de 76 μM de Quinifuril em tampão fosfato foram irradiadas por mais de 25 min na presença de 1 mM de TMOOP até a completa fotólise do Quinifuril. Imediatamente após a irradiação, 100 μL da solução foi inserida numa cubeta de EPR de quartzo *flat cell* ($l \approx 0,5$ mm) e medido o espectro de EPR. O correspondente radical livre estável foi utilizado para calibração. Os experimentos foram acompanhados dos seguintes controles: (a) a solução de TMOOP foi irradiada sem Quinifuril por 25 min; (b) a solução contendo Quinifuril e TMOOP foram incubados no escuro por 25 min; e (c) a solução contendo Quinifuril e TMOOP foram irradiadas por 25 min na presença de superóxido dismutase (16 μM). No método da *oxidação da epinefrina* a solução de Quinifuril (20 μM) em tampão fosfato (7,5 mM, pH 7,8) foi irradiada na presença de 1,1 mM de epinefrina até a completa fotodecomposição do Quinifuril. A fotodecomposição do Quinifuril foi monitorada em 396 nm e a produção da adrenocroma monitorada pelo surgimento da banda de absorção em 486 nm. Os experimentos foram realizados na presença e na ausência de ar. Quando na presença de ar, os experimentos foram realizados na ausência e na presença de concentrações variadas de superóxido dismutase.

Produção de óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$)

(a) ensaio fluorimétrico. Amostras foram preparadas com 2,0 mL de solução aquosa de Quinifuril (24 μM) onde se adicionou 0,2 mL da solução de DAN (0,32 mM) e o pH da mistura foi ajustado para pH 1 pela adição de uma alíquota de HCl. A amostra foi fotolisada com luz visível (350-450 nm). Após a completa fotodecomposição do Quinifuril, a amostra foi mantida por 10 min no escuro e adicionou-se NaOH para a estabilização da reação de formação do NAT. O NAT fluoresce intensamente em 407 nm e sua fluorescência foi monitorada utilizando-se o espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 55 na região espectral 375-550 nm, excitado em $\lambda_{\text{exc}} = 375$ nm. A calibração foi realizada pela medida da intensidade de fluorescência em 407 nm (I_{407}) da solução de NaNO_2 + DAN contendo 0,32 mM de DAN em função da concentração de NaNO_2 .

(b) ensaio quimioluminescente. As medidas foram realizadas utilizando-se o aparato NOAnalyser (SIEVERS modelo 280) equipado com um gerador eletrostático de ozônio (O_3) e uma câmara de reação quimioluminescente (CRC) acoplada a uma cuba do NOAnalyser (diagrama ao lado). A câmara CRC consiste de uma cela de reação de pequeno volume (≈ 20 mL), onde o ozônio é misturado ao NO^* e um tubo fotomultiplicador, termoeletricamente resfriado e sensível a emissões no vermelho, captura os fótons emitidos da reação. O sinal de saída da fotomultiplicadora (em mV) é conectado a uma placa de aquisição de sinal em um computador PC, e fornece uma resposta em tensão $\times$ tempo. A sensibilidade do método é maior que uma parte por bilhão v/v. A calibração do equipamento foi realizada antes dos experimentos. O sinal se apresentou na forma de "pulsos", cujas amplitudes (áreas) foram proporcionais à quantidade de NO^* produzido. A área do sinal, medida em mV $\times$ s, foi linearmente proporcional à quantidade de NO_2^- .

(c) relaxamento do músculo anococcígeo. Músculos anococcígeo de ratos Wistar (250-280 gramas) foram dissecados e mantidos em meio nutritivo de Krebs, contendo 100 μ M de nitroarginina (inibidor da NO-sintase) e montados em cubas termostatzadas (37 ± 1 °C) para órgãos isolados para registro de contrações isométricas, com o auxílio de um transdutor de força isométricas modelo 7004 acoplado a um sistema de registro modelo *Quartet 9450*, ambos da *Ugo Basile* (Itália). Este sistema possui uma resposta linear a forças mecânicas. A

Figura apresenta um esquema da montagem experimental. O tecido muscular foi mantido imerso em repouso por 1 h em líquido nutritivo de Krebs com borbulhamento contínuo da mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e submetido a uma tensão

inicial de 1 g, com trocas do líquido nutritivo a cada 15 minutos. Após 1 h de estabilização, foi adicionado fenilefrina (0,3 μ M) para induzir a contração muscular. Na vigência da contração o músculo foi irradiado com o sistema de irradiação (350-450 nm) por 10 s, na ausência e na presença de concentrações

conhecidas de Quinifuril. Todos os procedimentos experimentais foram realizados com iluminação ambiente < 5 lux.

2.4 - Experimentos com cultura de células

Células:

P388D₁: linhagem monócito de macrófago de ratos, obtida da American Type Culture Collection (ATCC N° CCL46), crescidas em cultura de semi-suspensão em meio de Fisher suplementado com 10% de soro de cavalo inativado termicamente em frascos de cultura (175 cm²) a 37°C com 5% de CO₂.

K562: linhagem de leucemia humana (proeritrócitos), originalmente derivadas de pacientes com eritroleucemia, foram fornecida pelo Dr. S. Niewiarowski (Temple University, PA, USA).

NIH3T3: células imortalizadas de fibroblasto de ratos e obtidas da American Type Culture Collection.

As linhagens K562 e NIH3T3 foram cultivadas em semi- suspensão ou em monocamadas, respectivamente, em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% l-glutamina, 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL streptomicona, 250 mg/mL Anfotericina-B a 37°C (jaqueta térmica) em uma incubadora de CO₂ (Cellstar, EUA).

Um dia antes do experimento as células (5×10^5 células/mL) foram semeadas em meio de crescimento. O número de células na suspensão foi calculado usando uma câmara de Neubauer (0,0025 mm²). A suspensão foi mantida em estado homogêneo através de agitação suave de uma pulga magnética. Todas as preparações foram feitas sob luz vermelha ($\lambda > 550\text{nm}$, 40W) de baixa intensidade à temperatura ambiente (22°C).

Uma solução estoque (41 mM) de Quinifuril foi preparada em água qualidade milli-Q (MilliPore).

Testes de sobrevivência celular

Teste1: teste de sobrevivência celular baseado no método previamente descrito [Kochevar et al., 1996] de coloração celular utilizando o azul de Trypan (**TB**) como corante para o qual as células vivas são impermeáveis [Kaltenbach et al., 1958]. As células marcadas com o TB foram consideradas como mortas. O número de células mortas foi contado pela câmara de Neubauer com 10µL de

TB adicionado a uma alíquota de 90µL de células retirados consecutivamente da amostra ou do controle após intervalos de tempo apropriados. Este teste foi aplicado para se comparar a citotoxicidade no escuro do Quinifuril e dos produtos finais de sua fotodecomposição contra as células P388.

Teste 2 e Teste 3: baseado no ensaio de **MTT** (Sal tetrazolium) descrito previamente [Rossa et al., 2003]. Neste teste o MTT é reduzido no interior das células vivas, resultando num produto colorido, cuja absorbância é proporcional ao conteúdo de células vivas e pode ser utilizada como um teste da viabilidade celular [Mosmann, 1983]. Para os ensaios de MTT as células foram semeadas em meio nutritivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contendo 5% de soro fetal bovino (**FBS**) em placas de 96 poços do tipo ELISA e expostas a diferentes concentrações de Quinifuril (0,2; 2,0 e 20µM) por 60 minutos (no escuro) ou por tempos variando entre 10 a 90 minutos quando irradiadas com luz (350-450nm). Ao final do período de exposição à droga as placas eram centrifugadas para peletar as células e o sobrenadante substituído por outro com MTT em tampão PBS (**Teste2**) ou em meio fresco (**Teste3**). Para o **Teste3** as células foram incubadas por um período adicional de 52h (período de duplicação da população de células) com trocas diárias do meio nutritivo, seguidas pelo ensaio de MTT (Teste2). As placas com MTT foram incubadas no escuro por 4 h, após o qual os cristais de MTT-formazan foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfoxido) e a absorção óptica (T) em 570nm foi medida em um leitor de ELISA Dynex MRX (Dynex Technologies Inc.). A densidade inicial de semeadura foi 2×10^4 a 6×10^4 células/poço. A viabilidade celular foi obtida pelo teste de TB no início de cada experimento e foi sempre maior que 96%.

A irradiação das células foi realizada com o sistema de irradiação previamente descrito neste trabalho. As células foram acondicionadas dentro de uma cubeta de quartzo ($1 \times 1 \text{cm}^2$) (Teste1), com o uso de um filtro térmico entre a fonte e as células. A absorção foi medida com um espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, EUA); ou diretamente nas placas de ELISA (Teste2 e Teste3).

O protocolo dos estudos da fotocitotoxicidade do Quinifuril é resumido abaixo.

Amostras (S): O Quinifuril foi adicionado à suspensão de células e a mistura foi imediatamente irradiada por um tempo superior a 60 minutos;

Controle-1 (C1): a suspensão de células foi mantida em tampão fosfato por ≥ 60 minutos no escuro (sem irradiação) e na ausência de Quinifuril;

Controle-2 (C2): a suspensão de células foi incubada no escuro por ≥ 60 minutos na presença de Quinifuril;

Controle-3 (C3): a suspensão de células foi irradiada por ≥ 40 minutos na ausência de Quinifuril.

Estes experimentos foram repetidos 6 vezes.

Teste1×Teste2: Seções de experimentos de mortalidade celular (Teste1) e toxicidade geral (**TE**) foram realizadas em paralelo: as células foram incubadas com Quinifuril em pares de placas de ELISA por 12 h (escuro) ou 1 h (irradiadas). Em cada par uma placa foi submetida à medida do efeito tóxico imediatamente após a retirada da droga (Teste1). Na segunda placa o Quinifuril foi substituído por meio nutritivo e as células foram mantidas em condições de se proliferar pelo tempo necessário a que sua população se multiplicasse por 2-3 vezes: 72 h (K562 e NIHT3T) ou 36 h (P388). Em seguida o meio foi substituído por MTT e o TE medido como a razão de células mortas em relação ao número inicial, como descrito abaixo.

Cálculos e Análise estatística. A dependência do efeito tóxico (TE) em relação à concentração e tempo de ação do Quinifuril sobre a mortalidade celular foi calculado como $TE = \frac{[DC]}{[Células]^{controle}}$, onde $[Células]^{controle}$ é a concentração das células nos poços de controle (células incubadas pelo mesmo intervalo de tempo, sem droga); e $[DC] = [Células]^{controle} - [Células]^{final}$ é a concentração de células mortas no período, onde $[Células]^{final}$ é a concentração de células vivas nos poços expostos à droga [Oertel et al., 2003].

A concentração de células foi medida usando uma curva de calibração feita para células P388 pelo método de MTT. O efeito citotóxico da concentração do Quinifuril (LC_{50}) (concentração para matar 50% das células) foi estimado como $\frac{100 \times (T^0 - T)}{T^0} = 50$, onde T^0 e T são as densidades ópticas dos poços-teste no tempo zero (quando a droga é adicionada) e após um tempo de exposição dos poços-teste à droga [Monks et al., 1991], respectivamente. Os dados foram apresentados como a Média $\pm$ DP de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas com o teste-T de Student. O teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% foi aplicado para comparar as médias. As análises estatísticas foram realizadas com os programas *InStat software program for Windows* (GraphPads software, San Diego, EUA) e *Origin 6.1* (MicroCal-EUA) .

Capítulo 3

ESTUDO DA FOTOCITOTOXICIDADE DO QUINIFURIL CONTRA LINHAGENS CELULARES P388, K562 E NIH3T3

Tendo em vista que o Quinifuril possui propriedades citotóxicas contra linhagens celulares normais e transformadas na ausência de luz [Rossa et al., 2003] e absorve luz na região visível, iniciou-se o estudo das propriedades do Quinifuril pelos ensaios de citotoxicidade do composto sob irradiação de luz visível (fotocitotoxicidade) contra células em cultura com o propósito de se verificar e quantificar eventuais alterações nestas propriedades citotóxicas.

Neste trabalho foram utilizados dois os ensaios colorimétricos para os testes de citotoxicidade: o teste de exclusão do corante azul de Trypan (**TB**), que marca as células mortas pela perda da integridade da membrana celular, onde se considerou as células marcadas como mortas; e do teste de inclusão do corante (**MTT**), formados pela atividade metabólica celular, onde a quantidade de cristais de *MTT-formazan* foi determinada espectrofotometricamente (em 570 nm), uma vez solubilizado em dimetil sulfóxido (DMSO) [Freshney, 1994], como descrito em Materiais e Métodos.

Nestes estudos foram utilizadas linhagens celulares de leucemia de camundongos (**P388D₁**), de eritroleucemia humana (**K-562**) e células imortalizadas de fibroblasto de camundongos (**NIH/3T3**). Nestes estudos de mortalidade celular as células foram expostas ao Quinifuril, nas condições de ausência de luz (escuro) e irradiada com luz visível por intervalos de tempos pré-estabelecidos, onde se avaliou a sua sobrevivência devido ao dano induzido pela droga. O número total de células sobreviventes foi determinado pelos testes de exclusão com corante TB, onde as células mortas foram contadas; ou o teste de inclusão do corante MTT. Também foram realizados testes de proliferação celular (inclusão do corante MTT): após a remoção da droga, o grupo de células sobreviventes ao tratamento foi mantido em condições adequadas pelo tempo necessário à sua multiplicação por duas ou três gerações. Dentro deste grupo sobrevivente desejou-se distinguir as células que mantiveram sua capacidade de proliferação (crescimento) daquelas que perderam esta capacidade, ou seja, que foram inativadas pelo tratamento.

3.1 - MORTALIDADE DA LINHAGEM P388

A **Figura 3.1** apresenta os efeitos da fotocitotoxicidade do Quinifuril contras as células P388, medidas pelos métodos da exclusão do corante TB, que quantifica o número de células mortas; e o teste de inclusão do MTT, que quantifica o número de células vivas. Observou-se que o número de células mortas aumenta com o aumento do tempo de irradiação luminosa e os experimentos, realizados por diferentes protocolos (Teste1 (TB) e Teste2 (MTT)), apresentaram resultados similares. Os tempos de irradiação luminosa da suspensão de células P388 ($\cong 1 \times 10^6/\text{mL}$) para se atingir 50 % de mortalidade (τ_{50}) foram de $\tau_{50} = 26$ min, medido pelo teste de exclusão do corante TB; e $\tau_{50} = 32,5$ min, medido pelo teste de inclusão do MTT, para suspensões celulares contendo $20 \mu\text{M}$ de Quinifuril. Um total maior que 80% das células morreram após 60 minutos de irradiação. Em contraste com estes dados, foram realizadas medidas de controle que mostraram que ~ 85 % das células sobreviveram a 60 min de irradiação da suspensão na ausência de Quinifuril (**Fig. 3.1**, curva C1), e que um número menor que 10 % morreram em suspensões incubadas com Quinifuril ($20 \mu\text{M}$) por 60 min e mantidas no escuro (**Fig. 3.1**, curva C2). Estes resultados, observados por dois métodos distintos, demonstraram uma elevação significativa do efeito tóxico do Quinifuril sob irradiação sobre as células P388.

Figura 3.1- Fototoxicidade do Quinifuril (20 μ M) contra células P388 de leucemia de camundongos medidas através de dois métodos: de exclusão de corante TB (●) ou inclusão de corante MTT (△) em função do tempo de irradiação. Os tempos para a morte de 50 % das células (τ_{50}) foram estimados em 26 min (TB) e 32,5 min (MTT). **Controles:** células incubadas com Quinifuril no escuro (curva C1, ○, células vivas) e células irradiadas na ausência de Quinifuril (curva C2, ■, células vivas). Em todos os ensaios a concentração de células foi $\sim 1 \times 10^6$ /mL em tampão fosfato, pH 7.4. Outras condições experimentais estão de acordo com o descrito em Materiais e Métodos.

O efeito fotocitotóxico do Quinifuril sob irradiação, medido pelo teste de exclusão de corante TB, foi acompanhado da fotodecomposição do composto (**Figura 3.2A**), monitorado pelo decréscimo da banda de absorção em 396 nm. Observou-se que a presença das células P388 não afetou a cinética de fotodecomposição do Quinifuril (**Figura 3.2B**).

Figura 3.2 - Fotodecomposição do Quinifuril sob irradiação com luz visível (390-500nm). **(A)**: Mudanças espectrais mostrando a fotólise do Quinifuril (20 μ M) na presença de células P388 (teste de TB). A seta mostra a direção das mudanças espectrais. Os números mostram o tempo de irradiação (min). A linha tracejada mostra o espectro de transmissão do filtro utilizado. **(B)** Perfil do decaimento em 396nm da absorbância do Quinifuril devido a sua fotodecomposição (seta, **A**) na ausência (●) e presença (△) de células P388. As condições de irradiação são as mesmas da legenda da **Fig. 3.1**.

3.2 – EFEITO FOTOTÓXICO SOBRE AS CÉLULAS P388

O efeito fototóxico do Quinifuril sob irradiação foi adicionalmente investigado numa série de experimentos em diferentes concentrações de Quinifuril (0,2; 2,0 e 20 μM) usando o método de inclusão do MTT (Teste2). Nestes ensaios as células foram incubadas na ausência e presença de Quinifuril nas mesmas condições. As amostras foram irradiadas e calculou-se o efeito tóxico.

Nos cálculos utilizou-se $TE = [DC] / [Célula]^{\text{controle}}$, onde **TE** é o efeito tóxico sobre as células; [DC] é a concentração de células mortas; e $[Célula]^{\text{controle}}$ é a concentração das células nos poços de controle (incubadas sem Quinifuril pelo mesmo período de tempo).

A **Figura 3.3** mostra a dependência temporal do efeito tóxico TE do Quinifuril contra células P388. Observou-se que a citotoxicidade (TE_{irrad}) do Quinifuril ao ser irradiado (fotocitotoxicidade) foi acentuadamente aumentada quando comparada com a citotoxicidade no escuro (TE_{esc}) na região de concentrações 0,2; 2,0 e 20 μM . Inferiu-se dos dados que as razões $TE_{\text{irrad}}/TE_{\text{esc}}$ entre os efeitos tóxicos após 60 min de incubação do Quinifuril com células P388 foram $(6,6 \pm 1,4)$, $(2,4 \pm 0,7)$, e $(9,9 \pm 2,4)$ para as concentrações iniciais de Quinifuril de 0,2; 2,0; e 20,0 μM , respectivamente. Estes ensaios indicaram que a mortalidade induzida pela irradiação (60 min) de 20 μM de Quinifuril é aproximadamente 10 vezes maior que o composto no escuro no mesmo período.

É importante observar que os valores do TE_{irrad} para 60 min são crescentes de 0,2 para 20,0 μM (9%, 29% e 82%, respectivamente, **Fig. 3.3**), indicando que quanto maior a concentração de Quinifuril irradiado, maior a mortalidade induzida nas células, apesar da razão $TE_{\text{irrad}}/TE_{\text{esc}}$ para 2,0 μM de Quinifuril ter menor valor que para 0,2 μM (2,4 e 6,6, respectivamente).

Figura 3.3- Efeitos tóxicos (TE) tempo-dependente do Quinifuril contra células P388 medidos no escuro (símbolos sólidos) e sob irradiação (símbolos vazados). Concentrações iniciais: 0,2 µM (▲ e △); 2 µM (● e ○); e 20 µM (■ e □). Os experimentos foram realizados em placas de tipo ELISA (96 poços, 2×10^4 células/poço) pelo método de exclusão do corante MTT (Teste2, Materiais e Métodos). As condições de irradiação são as mesmas da legenda da **Fig. 3.1**. Cada ponto representa a Média $\pm$ DP de seis medidas independentes.

3.3 - CONCENTRAÇÃO DE QUINIFURIL PARA A MORTALIDADE DE 50% DAS CÉLULAS (LC_{50})

A **Figura 3.4** mostra os valores da concentração letal de Quinifuril para atingir a mortalidade de 50% das células (LC_{50}), estimados a partir dos dados do efeito tóxico dose-dependente. A partir da distribuição da mortalidade das células para 60 min de incubação com Quinifuril sob irradiação, estimou-se que a mortalidade de 50% das células é alcançada para $LC_{50} \cong 10$ µM de Quinifuril sob irradiação. Realizaram-se paralelamente experimentos que mostraram que a incubação das células com até 20 µM de Quinifuril no escuro por 60 min causou a morte de, no máximo, 15% das células.

Inferese destes dados que a toxicidade do Quinifuril sob irradiação é muito maior do que no escuro. Pode-se supor o Quinifuril (20 μM) apresentou $\text{TE}_{\text{esc}} \cong 10\%$ para 60 min de incubação no escuro devido ao seu metabolismo.

Figura 3.4 –Determinação de LC_{50} : o TE dose-dependente do Quinifuril contra as células P388 medidos no escuro (linha tracejada ■) e sob irradiação (linha sólida □) com Luz para um tempo de incubação de 60 min com Quinifuril. Estimou-se $\text{LC}_{50} \cong 10\ \mu\text{M}$ para o Quinifuril sob irradiação. O Quinifuril no escuro (20 μM) matou apenas 15 % das células para o mesmo tempo de incubação. Os experimentos foram realizados e os valores de TE e LC_{50} foram calculados como descrito em Materiais e Métodos. As condições de irradiação são as mesmas da legenda da **Fig. 3.1**. Cada ponto representa a Média $\pm$ DP de seis medidas independentes.

3.4 – INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DA IRRADIAÇÃO DO QUINIFURIL

Em contraste ao ensaio de inclusão do corante MTT (Teste2), que indica somente o efeito mortífero; o Teste3, também medido através de inclusão do corante MTT, mostra a citotoxicidade completa do Quinifuril, que inclui a inibição da proliferação celular. Estes ensaios foram realizados seqüencialmente, onde se avaliou inicialmente a mortalidade imediata das células após a irradiação ou incubação no escuro por 60 min (Teste2). Posteriormente as células sobreviventes do Teste2 foram mantidas em condições adequadas para sua sobrevivência por 52 horas. Ao final deste período realizou-se a contagem das células vivas (Teste3).

A **Tabela 3.I** resume os resultados obtidos usando estes métodos. Observou-se que diferentes doses de Quinifuril causaram diferentes níveis de mortalidade das células. A mortalidade imediata das células (Teste2) foi avaliada para 0,2 μ M (1,4 % e 9 %) e para 2 μ M (12% e 29%) de morte celular no escuro e irradiada por 60 min, respectivamente. Em contraste, o Teste3 evidenciou que as células sobreviventes do Teste2 não se proliferaram em ~100 %, isto é, permaneceram vivas mas perderam sua capacidade de crescimento quando comparadas com os controles (células irradiadas por 60 min sem Quinifuril ou incubadas em Quinifuril no escuro).

Para suspensões de células contendo 2 μ M de Quinifuril no escuro a mortalidade celular atingiu 12 % (Teste2) e 91 % (Test3), indicando que nesta concentração a mortalidade celular é causada possivelmente pelo metabolismo do composto [Degterev et al., 1993; Rossa et al., 2003].

Estes resultados indicaram que a irradiação do Quinifuril não somente causa a morte imediata das células, mas induziu a inibição da proliferação das células sobreviventes. Estes resultados inéditos são relevantes, pois indicam que a eventual utilização do Quinifuril em TFD pode ser efetiva através de dois caminhos complementares: a morte tumoral e a inibição de seu crescimento.

Tabela 3.I – Efeito tóxico (Teste2) e pós-efeito tardio (Teste3) do Quinifuril contra células P388 após 60 min de incubação da droga com células no escuro e sob irradiação.

[Quinifuril] (μM)	Efeito tóxico (TE)			
	Escuro		Irradiado	
	Teste2	Teste3	Teste2	Teste3
0,2	$0,014 \pm 0,002$	$0,62 \pm 0,11$	$0,09 \pm 0,02$	$*0,99 \pm 0,005$
2	$0,12 \pm 0,02$	$*0,91 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,09$	$*0,96 \pm 0,008$

*P < 0,01 para comparações entre os dados obtidos no escuro e sob irradiação (teste Tukey).

Os efeitos tardios foram medidos 52 h após a droga ter sido retirada da cultura de células. Os valores do efeito tóxico TE foram medidos usando o ensaio de MTT (Teste2 e Teste3) e calculado como descrito em Materiais e Métodos. A concentração de células mortas foi medida imediatamente após a remoção da droga (Teste2) ou após a incubação com meio nutritivo fresco por 52 h (Teste3).

3.5 – AUSÊNCIA DE TOXICIDADE DOS PRODUTOS DA FOTÓLISE DO QUINIFURIL

Ensaio de mortalidade celular (inclusão do corante TB) foram realizados para determinar se os produtos finais da fotodecomposição do Quinifuril (fotoprodutos) podem ser os responsáveis pela elevada toxicidade da droga sob irradiação. Com este objetivo foram realizados dois testes: suspensões de células P388 ($\sim 5 \times 10^4/\text{mL}$) foram incubadas por 100 min com $20 \mu\text{M}$ de Quinifuril; ou com os fotoprodutos do Quinifuril, onde uma solução de $18 \mu\text{M}$ de Quinifuril foi previamente fotolisada até a completa extinção da banda de absorção em 396 nm (monitorada espectrofotometricamente) e posteriormente as células foram adicionadas e incubadas.

A **Figura 3.5** mostra que o Quinifuril e os fotoprodutos do Quinifuril possuem baixa toxicidade no escuro, causando a morte de 10% das células para 100 min de incubação. Observou-se que os fotoprodutos do Quinifuril também não são tóxicos para 100 min de irradiação, enquanto que $20 \mu\text{M}$ de Quinifuril sob irradiação (90 min) causou a morte de 90% das células. Infere-se destes resultados que os fotoprodutos finais da fototransformação do Quinifuril não são os responsáveis pela citotoxicidade do composto.

Figura 3.5- Citotoxicidade do Quinifuril (20 μM) e dos fotoprodutos finais do Quinifuril (18 μM) sobre as células P388 de leucemia de camundongos. As células ($5 \times 10^4/\text{mL}$) foram mantidas em tampão fosfato e Quinifuril nas condições de escuro (● e ○) e sob irradiação (▲ e △), medidos pelo método de exclusão do corante TB. Cada ponto representa a Média $\pm$ DP de 3 medidas independentes.

3.6 –FOTOCITOTOXICIDADE DO QUINIFURIL CONTRA CÉLULAS K562

A **Figura 3.6** mostra os resultados das medidas de citotoxicidade do Quinifuril contra células de eritroleucemia humana K562 como função do tempo de incubação com a droga sob irradiação (**Fig. 3.6A**) e no escuro (**Fig. 3.6B**). Os valores do efeito tóxico **TE** foram calculados como descrito previamente. Células incubadas sem Quinifuril nas mesmas condições serviram como controle em cada série de experimentos. Na ausência do Quinifuril nenhuma quantidade significativa de células mortas foi observada nos poços de controle em 24 h de incubação no escuro ou em 90 min sob irradiação. Em contraste o Quinifuril também apresentou uma maior toxicidade contra as células K562 sob irradiação do que no escuro: para 2 μ M de Quinifuril estimou-se que os tempos para matar 50% das células foram $\tau_{50} = 48$ minutos sob irradiação e $\tau_{50} = 18,5$ horas no escuro, medidos pelo teste de inclusão do corante MTT.

3.7 – FOTOTOXICIDADE GERAL DO QUINIFURIL CONTRA LINHAGENS CELULARES P388, K562 E NIH3T3

A **Tabela 3.II** apresenta os resultados das medidas da mortalidade direta e do efeito tóxico geral (Teste2×Teste3, Materiais e Métodos), realizados simultaneamente para as três linhagens. Os resultados indicaram que para 1 h de irradiação, o efeito deletério do Quinifuril (Teste2) contra todas as linhagens celulares utilizadas é somente comparável ao efeito mortífero alcançado em 12 h de incubação no escuro. Dos resultados inferiu-se que o Quinifuril inibe a proliferação celular tanto no escuro quanto sob irradiação mas a presença da luz aumenta significativamente este efeito. Também se observou que a irradiação diminui grandemente o tempo e as concentrações de Quinifuril necessários para atingir os mesmos graus de mortalidade que no escuro.

Tabela 3.II- Efeito da mortalidade direta e da mortalidade geral do Quinifuril medidas em paralelo (Teste2×Teste3, Materiais e Métodos).

Linhagem celular	[Quinifuril] (μM)	Efeito Tóxico (TE)			
		Escuro (12 h)		Irradiado (1 h)	
		Teste2	Teste3	Teste2	Teste3
P388	2,0	*0,48 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,16	*0,76 $\pm$ 0,27	0,93 $\pm$ 0,20
	0,2	*0,014 $\pm$ 0,002	n.m.	*0,13 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,24
NIH3T3	2,0	*0,59 $\pm$ 0,13	0,96 $\pm$ 0,01	*0,43 $\pm$ 0,16	0,93 $\pm$ 0,04
	0,2	*0,0 $\pm$ 0,06	0,0 $\pm$ 0,12	*0,35 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,12
K562	2,0	*0,33 $\pm$ 0,1	n. m.	*0,68 $\pm$ 0,15	n. m.

(*) diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,01$) entre os resultados do Teste2. Nenhuma diferença significativa foi observada para o Teste3 (células irradiadas e no escuro) em cada série de experimentos.

n. m.: não medido.

A **Tabela 3.III** apresenta os valores medidos dos tempos necessários para que haja 50% de mortalidade celular (τ_{50}), avaliado para três diferentes concentrações de Quinifuril, contra as três linhagens celulares nas situações irradiadas e no escuro. Inferiu-se dos dados que na presença de luz a morte celular é acelerada em relação à situação de escuro para as três linhagens e que a aceleração da mortalidade é maior para a linhagem NIH3T3, ou seja, esta linhagem é mais suscetível aos efeitos mortíferos do Quinifuril ao ser irradiado.

Tabela 3.III- Tempos para atingir 50% de mortalidade celular (τ_{50})			
Linhagem celular	[Quinifuril] (μM)	τ_{50} (min)	
		Escuro	Irradiadas
P388	20,0	231 $\pm$ 51	25 $\pm$ 7
	2,0	350 $\pm$ 118	76 $\pm$ 9
	0,2	1540 $\pm$ 90	96 $\pm$ 11
NIH3T3	2,0	408 $\pm$ 67	34 $\pm$ 18
	0,2	> 500	56 $\pm$ 17
K562	2.0	n. m.	45 $\pm$ 5
n.m. não medido			

3.8 – DISCUSSÃO

O Quinifuril é metabolizado em tecidos normais e por células cancerosas [Rossa et al., 2003; Verovski et al.; 1990]. Provavelmente os mecanismos de morte celular induzidos pelo Quinifuril na ausência de luz são devidos ao seu metabolismo, uma vez que sua biotransformação é acompanhada pela produção de espécies reativas de oxigênio, particularmente o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) [Smirnov et al., 1989; Degterev et al., 1990; Buzukov et al., 1996] e, portanto a morte provavelmente se dá por stress oxidativo.

Baseados nestes resultados de mortalidade celular pode-se inferir que o Quinifuril sob irradiação causa a morte das células e também a inibição da proliferação das células sobreviventes ao tratamento. É necessário enfatizar que ambos os efeitos (morte e inibição) são significativamente aumentados sob

irradiação luminosa do composto. Verificou-se que a morte celular foi alcançada com concentrações tão baixas quanto 0,2 μ M de Quinifuril; que a mortalidade é aumentada em até 6 vezes quando a luz esta presente e também que os produtos de sua fotólise não são responsáveis por este aumento. Uma conclusão adicional é que o efeito tóxico do Quinifuril sobre as células é devido mais à inibição celular do que à mortalidade celular [Daghastanli et al., 2004a; Daghasanli et al., 2004b]. Estes resultados estão apresentados no **Anexo III**.

A inibição da proliferação celular é um achado inédito que deve ser explorado posteriormente, pois se pode especular que o mecanismo de inibição celular não é devido à necrose celular, o que levaria à morte “imediate” das células, e eventualmente esta associado a algum processo de indução de apoptose celular ou a algum evento sinérgico que induza a apoptose celular ou alterações no DNA ou no maquinário de divisão celular [Wink et al., 1998; Maeda e Akaike, 1998].

Verificou-se que o Quinifuril sofre fotodecomposição ao ser irradiado com luz na região espectral 350-450 nm e que esta degradação é acompanhada da perda de sua banda de absorção em 396 nm. Estes resultados nos motivaram a estudar as propriedades de fototransformação dos Quinifuril para entendermos diversos aspectos desta fototransformação, tais como qual é o mecanismo da fototransformação do Quinifuril e como a fotodecomposição esta associada com a citotoxicidade aumentada do composto na presença de luz. A formação de espécies reativas poderia explicar esta elevada toxicidade do Quinifuril na presença de luz. Deste modo realizamos estudos sobre a ativação do Quinifuril com luz e sua conseqüente promoção a algum estado excitado singleto ou tripleto. Os resultados destes estudos estão apresentados nos Capítulos seguintes desta Tese.

Capítulo 4

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E FOTOQUÍMICAS DO QUINIFURIL EM SOLUÇÕES HOMOGÊNEAS

Considerações iniciais. Verificou-se experimentalmente que o Quinifuril é um composto solúvel em água que, em concentrações da ordem de 10 mM, não apresenta formação de agregados. As propriedades do Quinifuril em solução, quando estocadas ao abrigo da luz por períodos superiores há 120 dias, em temperatura ambiente ou em gelo (-4 °C), não apresentaram quaisquer alterações relevantes para este trabalho, indicando que o composto é estável (não sofre degradação) ao ser armazenado nestas condições. A presença de sal (NaCl), em concentrações até 0,1M em amostras de Quinifuril em diversas concentrações ($\leq 100 \mu\text{M}$) não apresentaram quaisquer efeitos de agregação ou mudanças nas características espectrais do Quinifuril e assim não foram objeto de estudos desta Tese.

4.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR ($\epsilon(\lambda)$) DO QUINIFURIL EM SOLUÇÃO AQUOSA

A **Figura 4.1A** mostra o espectro de absorção do Quinifuril em solução aquosa e o espectro do filtro óptico 5-57 KOPP *color glass filter* utilizado nos experimentos de irradiação com banda de transmissão na região 350-450 nm. O Quinifuril apresenta intensa absorção óptica, sendo sua banda de máxima absorção no comprimento de onda de $\lambda_{\text{max}}=396 \text{ nm}$. O coeficiente de absorção molar (ϵ) do Quinifuril foi determinado na região de concentrações $\leq 30 \mu\text{M}$, através da Lei de Lambert-Beer ($A=\epsilon\ell[Q]$), onde verificou-se que sua banda de absorção principal em 396 nm varia linearmente com a concentração de Quinifuril ($[Q]$) correspondente, medida numa cubeta padrão de quartzo de caminho óptico $\ell=1 \text{ cm}$. O coeficiente de absorção molar do Quinifuril foi avaliado em $\epsilon_{396} = 24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (**Figura 4.1B**).

Figura 4.1 - (A) Espectro de absorção (—) da solução aquosa de Quinifuril (20 μ M) em pH 7,0 mostrando que o máximo de absorção em 396 nm; o espectro de absorção (---) do filtro óptico utilizado nas situações de irradiação do Quinifuril, mostrando que a banda de transmissão do filtro (entre 350-450 nm) coincide com a banda de absorção principal do Quinifuril; (B) Determinação do coeficiente de absorção molar $\epsilon_{396} = 24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ do Quinifuril (Q) em solução aquosa (pH 7,0) a partir da regressão linear ($R=0.9992$; $P<0.001$) da Lei de Lambert-Beer ($A_{396}=\epsilon l[Q]$).

4.2 - ESTUDO DA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL EM SOLUÇÃO AQUOSA

4.2.1 – Fotodecomposição na presença de oxigênio.

A **Figura 4.2A** mostra os espectros de absorção do Quinifuril em solução aquosa em função do tempo de irradiação. A irradiação contínua da solução aquosa (pH 7,0) de Quinifuril, com luz na região espectral 350-450 nm de intensidade 20 mW/cm², produz o fotoclareamento (perda da cor) do Quinifuril indicando a fotodecomposição do seu cromóforo. A fotodecomposição é experimentalmente evidenciada pela diminuição da banda de absorbância em 396 nm em função do tempo de irradiação.

A **Figura 4.2B** mostra a cinética de decréscimo da absorbância em 396 nm em função do tempo de irradiação (seta na Fig. A). Observou-se que perfil da curva cinética de fotodecomposição possui um comportamento de primeira ordem e o decréscimo da absorbância em 396 nm em função do tempo de irradiação foi ajustado através de uma função monoexponencial.

4.2.2 – Fotodecomposição na ausência de oxigênio.

Os espectros de absorção do Quinifuril ao ser irradiado na ausência de oxigênio permanecem idênticos àqueles obtidos na presença de oxigênio (**Figura 4.2A**). Quando o oxigênio é retirado do meio (2 mL de amostra deaerada por borbulhamento de gás nitrogênio por 5 minutos) e para a mesma concentração de Quinifuril, a fotodecomposição da amostra deaerada ocorre numa velocidade maior, ou seja, o Quinifuril se degrada mais rapidamente ao ser irradiado na ausência de oxigênio do que na sua presença. Este efeito fica evidenciado pela queda mais acentuada do perfil da absorbância em 396 nm na ausência de oxigênio do que na sua presença (**Fig. 4.3**).

Figura 4.2 - (A) Espectros de absorção de uma solução aquosa de Quinifuril ($20 \mu\text{M}$, pH 7,0) na presença de ar ($1 \text{ atm } [\text{O}_2] \approx 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ a 24°C) ao ser irradiado na região 350-450nm em função do tempo de irradiação. A banda de absorção principal do Quinifuril em 396 nm decresce em função da irradiação, mostrando sua fotodecomposição. **(B)** Perfil da curva cinética de fotodecomposição da solução de Quinifuril em função do tempo de irradiação. O decréscimo do máximo em 396 nm (seta na Fig. A) devido à irradiação possui um comportamento monoexponencial (linha sólida).

4.2.3 - Velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril.

A **Figura 4.3** compara as curvas cinéticas de fotodecomposição de duas amostras idênticas de Quinifuril (20 μ M) irradiadas com luz na presença e na ausência de oxigênio (deaerada), onde se observa que o Quinifuril em solução deaerada se degrada mais rapidamente que na presença de ar.

A quantificação do processo de fotodecomposição foi realizada pelo cálculo da velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril que foi determinada da observação de que a absorção óptica (**A**) da amostra decresce a partir da absorção inicial (**A**₀) como uma função do tempo **t** de irradiação, através de uma função monoexponencial. A velocidade inicial de fotodecomposição V_i foi obtida empiricamente através do ajuste numérico monoexponencial (Origin® 6.1 - OriginLab Corp. EUA) do perfil de decaimento da absorbância em 396 nm medida em função do tempo da irradiação. Como a absorção e a concentração da amostra estão vinculadas pela Lei de Lambert-Beer ($A_{396}(t) = \epsilon l [Q](t)$), o cálculo de V_i fornece o consumo de Quinifuril, devido à sua fotodecomposição, durante o tempo de irradiação da amostra. Do ajuste monoexponencial do decréscimo da absorção, faz-se a sua primeira derivada numérica e toma-se o valor da derivada em $t=0$:

$$V_i = -\left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} \quad (1)$$

Os cálculos de V_i , através da Expressão **(1)**, forneceram os valores da velocidade de fotodecomposição de uma amostra de Quinifuril (20 μ M) na presença e na ausência do oxigênio: $0,92 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ e $3,86 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$, respectivamente. Infere-se destes dados que a velocidade de fotodecomposição V_i na ausência de oxigênio é maior que na sua presença (1 atm, $[O_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ a 24 °C), ou seja, a fotólise do Quinifuril, devido à sua irradiação, é acelerada na ausência do oxigênio na solução.

Fig. 4.3 – Curvas cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril (20 μM) em solução aquosa (pH 6) na presença de ar (■) e deaerada (O). As amostras foram irradiadas com luz na região espectral 350-450 nm, de intensidade 20 mW/cm^2 . As velocidades de fotodecomposição do Quinifuril V_i , calculadas através da Expressão (1), foram $3,86 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ e $0,92 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ na ausência e presença de ar, respectivamente. Este resultado indica que a ausência de oxigênio acelera a fotólise do Quinifuril.

4.3 - VELOCIDADE DE FOTODECOMPOSIÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO QUINIFURIL

A **Figura 4.4** apresenta os valores da velocidade de fotodecomposição (V_i), calculados através da Expressão (1), de soluções aquosas de Quinifuril (pH 6) em diferentes concentrações (entre 0,5-100 μM) na presença e ausência de oxigênio. Infere-se destes dados que velocidade de fotodecomposição V_i é dependente da concentração do Quinifuril, da presença ou não de oxigênio na amostra e também que quanto maior a concentração do Quinifuril, maior é sua velocidade de fotodecomposição. Outra bateria de experimentos indicou que a dependência de V_i com a concentração de Quinifuril na presença de ar ($[\text{O}_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$) e saturada de oxigênio ($[\text{O}_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) possuem comportamento linear similares em ambos os casos. Por outro lado, nas

amostras deaeradas, esta dependência é mais complexa, aparentando ser quadrática, uma vez que o ajuste obtido foi de 2º grau.

Figura 4.4 - Velocidades iniciais de fotodecomposição V_i em função da concentração de Quinifuril em soluções aquosas ($0,5 \leq [Q] \leq 100 \mu\text{M}$) na presença de ar (□) e deaeradas (●). A dependência de V_i (calculadas pela Expressão 1) em função da concentração de Quinifuril na presença de ar possui um comportamento linear (1º grau) e na ausência de ar o comportamento é quadrático (2º grau). As condições experimentais estão descritas na legenda da Fig. 4.3.

4.4 - ESTADO TRANSIENTE E TEMPO DE VIDA DO TRANSIENTE DO QUINIFURIL

4.4.1 - Caracterização do estado transiente do Quinifuril

A **Figura 4.5A** mostra que a excitação de uma solução aquosa de Quinifuril em 355 nm por pulso de feixe relâmpago de laser (*flash fotólise*) induz a formação de um estado transiente de curto tempo de vida, caracterizado pela absorção na região espectral de 450-700 nm centrado em 550 nm. Medidas análogas indicaram que um produto transiente com espectro similar foi também observado em solvente dioxano.

A **Fig. 4.5B** mostra os perfis típicos de decaimento da absorção em 550 nm do transiente do Quinifuril para amostras em solução aquosa na presença e na ausência de oxigênio. Observa-se que o tempo de vida do transiente aumenta na ausência do oxigênio. O decaimento deste transiente obedece a uma cinética de 1ª ordem (monoexponencial) em ambos os casos, numa escala de microssegundos em solução aquosa. Os perfis do decaimento do estado transiente do Quinifuril foram ajustados por uma função do tipo

$$\Delta D = \Delta D_0 e^{-k_1 t} \quad (2)$$

onde ΔD_0 é a intensidade inicial do transiente e k_1 é a **constante de decaimento** do transiente do Quinifuril. A constante k_1 também pode ser escrita como $k_1 = \frac{1}{\tau}$ e descreve o decaimento temporal do transiente em função da concentração de Quinifuril, onde τ é o tempo de vida do estado transiente do Quinifuril. Verificou-se que a formação do estado excitado do Quinifuril é suprimida pelo oxigênio. Os ajustes de 1ª ordem dos perfis do decaimento do estado transiente do Quinifuril resultaram nos tempos de transiente $\tau = 1,9 \mu s$ e $\tau_0 = 24 \mu s$ na presença e na ausência de oxigênio molecular, respectivamente.

A supressão pelo oxigênio molecular é um processo típico para o estado tripleto [Foley et al., 1997]. Deste modo, pode-se associar estas espécies de curto tempo de vida do Quinifuril como sendo o estado excitado **tripleto** do Quinifuril.

Figura 4.5- (A) Dados normalizados comparativos dos espectros de absorção do Quinifuril no estado fundamental (linha sólida, máximo em 396 nm) e no estado excitado tripleto em solução aquosa (■) e em solvente orgânico dioxano (△). O ajuste sigmoidal (linha tracejada) forneceu o máximo de absorção do transiente em 550 nm. **(B)** Perfis do decaimento da intensidade de absorção (ΔD) do transiente do Quinifuril (20 μ M) em solução aquosa na presença de oxigênio (○) e deaerada (■). Os ajustes monoexponenciais (1ª ordem) dos perfis do transiente (linhas sólidas), através da função $\Delta D = \Delta D_0 e^{-k_1 t}$, forneceram os tempos de vida de tripleto $\tau = 1,9 \mu s$ e $\tau_0 = 24 \mu s$ na presença e na ausência de ar, respectivamente.

O processo de excitação e desexcitação do Quinifuril pode ser assim resumido: o Quinifuril (**Q**) é excitado por um pulso de laser *flash fotólise* em 355 nm, passa pelo estado excitado singleto (**Q_S***), e daí para seu estado excitado tripleto (**Q_T***). O estado excitado do Quinifuril (**Q_T***) retorna ao estado fundamental (**Q**), com taxa de decaimento (desexcitação) **k₁**. O processo pode ser esquematicamente visualizado como:

4.4.2 – Determinação da energia do estado excitado tripleto (**E_T**) do Quinifuril

Compostos aceitadores de energia tripleto suprimem o estado transiente do doador, num processo típico de transferência de energia, com a posterior formação do estado tripleto dos aceitadores [Calvert e Pitts, 1966]. A transferência de energia tripleto-tripletto significa que um doador, em seu estado tripleto eletronicamente excitado (**Q_T***), transfere sua energia para um aceitador (**A**), inicialmente no estado fundamental, com taxa de supressão **k_q**. Este aceitador é levado para seu estado eletronicamente excitado tripleto (**A***), e o doador retorna para seu estado fundamental (**Q**) [Turro, 1978].

A **Figura 4.6** mostra os valores das constantes **k_q** de supressão do estado tripleto do Quinifuril por aceitadores com vários níveis de energia do estado tripleto. Os experimentos de transferência de energia tripleto foram realizados em solvente dioxano, pois neste meio estes compostos aceitadores são solúveis e a transferência de energia é mais eficaz. O processo de supressão do tripleto do Quinifuril (**Q_T***) pelo aceitador (**A**) de energia tripleto, formando o estado tripleto do aceitador (**A_T***), pode ser esquematicamente visualizado como:

A constante de supressão **k_q** é dependente do nível de energia do aceitador **A_T*** em relação ao Quinifuril (**Tabela 4. I**). Assim, para diferentes energias de excitação dos aceitadores, serão encontrados valores específicos para a constante de supressão **k_q**.

Verificou-se que para aceitadores possuindo energias de tripleto maiores que 18200 cm^{-1} , a transferência da energia do tripleto do Quinifuril para estes aceitadores não se efetivou e, conseqüentemente, a constante k_q é essencialmente nula. Deste modo, inferiu-se que a energia do estado tripleto do Quinifuril é $E_T = 18200 \pm 500\text{ cm}^{-1}$ ($218 \pm 6\text{ kJmol}^{-1}$).

Tabela 4.I - Constantes de supressão (k_q) do estado tripleto do Quinifuril por aceitadores de energia tripleto [Calvert e Pitts, 1966].

Aceitador	$E_T\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$k_q\text{ (}10^{-9} \times \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
Naftaceno	10250	$2,7 \pm 0,4$
Azuleno	12000	$2,5 \pm 0,4$
9,10-Dibromoantraceno	14112	$1,3 \pm 0,2$
Eosina	15000	$1,2 \pm 0,2$
Acridina Orange	17390	$2,0 \pm 0,3$
1,2-Benzpireno	18480	$(4,2 \pm 0,9) \times 10^{-2}$
Fluorenona	18860	$< 10^{-4}$
Naftaleno	21300	$< 10^{-4}$
9H-Fluoreno	23750	$< 10^{-4}$

4.4.3 – Dependência do tempo de vida tripleto do Quinifuril com a sua concentração

Experimentos realizados em soluções aquosas deaeradas para diferentes concentrações de Quinifuril ($70 \mu\text{M} \geq [\text{Quinifuril}] \geq 7 \mu\text{M}$) mostraram que os valores da constante de decaimento do tripleto do Quinifuril (k_1) possuem uma dependência linear da concentração do Quinifuril neste intervalo. A **Figura 4.7** mostra a dependência de k_1 com a concentração de Quinifuril.

Observou-se que a constante de decaimento k_1 possui uma dependência linear com a concentração de Quinifuril e pode ser escrita [Samanta et al., 1996] como:

$$k_1 = k_0 + k_{q1}[Q]_i \quad (3)$$

onde k_0 é constante de decaimento para diluição infinita ($[Q]_i \rightarrow 0$) e k_{q1} é constante de auto-supressão de segunda ordem e pode ser associada à supressão bimolecular entre uma molécula do Quinifuril no estado tripleto e outra no estado fundamental.

Os valores de k_0 e k_{q1} foram calculados através da regressão linear (**Figura 4.7**) e foram obtidos os valores $k_0 = 1,8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ e $k_{q1} = 2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Observou-se que o estado excitado tripleto do Quinifuril é suprimido pelo oxigênio molecular (**Figura 4.5B**). Esta cinética de supressão pelo oxigênio pode ser escrita como:

$$k_2 = k_1 + k_{q2}[O_2] \quad (4)$$

onde k_1 é a constante de decaimento na ausência de oxigênio; e k_{q2} é a *constante bimolecular de supressão do tripleto* do Quinifuril pelo oxigênio.

O valor da constante k_{q2} foi obtido através de medidas dos tempos de vida do tripleto do Quinifuril na presença de diferentes concentrações de oxigênio no meio: na presença de ar ($[O_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$), saturada com oxigênio ($[O_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) e na sua ausência ($[O_2] \cong 0 \text{ M}$). O valor da constante bimolecular de supressão do Quinifuril pelo oxigênio, calculada através da Expressão (4), é $k_{q2} = 2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

4.5 - MODELO CINÉTICO DA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL EM SOLUÇÃO AQUOSA

4.5.1 - Processos de fototransformação do Quinifuril

Baseados nos resultados experimentais observados e descritos acima se pode escrever os esquemas de fototransformações (FT) do Quinifuril:

1) Transição do estado fundamental singlete do Quinifuril ($Q(S_0)$) para seu primeiro estado excitado singlete ($Q^*(S_1)$) pela absorção de um fóton de luz de energia $h\nu$, com taxa β :

2) Uma vez populado o estado excitado $Q^*(S_1)$, parte destas moléculas retornam ao estado S_0 através do processo de conversão interna (IC), com taxa k_{IC} . Não é observada nenhuma emissão de fluorescência:

3) Pelo processo de conversão intersistemas (ISC), uma parte das moléculas em $Q^*(S_1)$ popula o estado excitado tripleto (T_1), com taxa k_T :

4) Uma parte das moléculas despopolam o estado T_1 , retornando ao estado S_0 , com taxa k_0 :

5) Baseando-se na dependência da velocidade de fotodecomposição V_i com a concentração de Quinifuril, pode-se concluir que a interação entre uma molécula no estado tripleto e outra no estado fundamental S_0 diminui o tempo de vida do estado T_1 , degradando o composto, produzindo Produtos1:

Acreditamos que a fototransformação **FT₅** seja parcialmente responsável pela fotodecomposição do Quinifuril.

6) Observou-se que o oxigênio molecular (O_2) suprime o estado tripleto do Quinifuril, reduzindo a velocidade de fotodecomposição do Quinifuril pela supressão da sua energia do tripleto. Como o processo de supressão do estado tripleto de fotossensibilizadores é o responsável pela geração do oxigênio singleto ($^1\Delta_g$) [Foote, 1991; Ochsner, 1997; Bonnett, 2000], pode-se supor a possível geração do $^1\Delta_g$ pela excitação do Quinifuril:

4.5.2 - Modelo cinético para os processos de fototransformação do Quinifuril

O esquema cinético de fototransformações do Quinifuril (FT₁ a FT₆), pode ser descrito pelo conjunto de equações que regem estes processos primários, onde as quantidades cinéticas de interesse são as concentrações do Quinifuril no estado fundamental ($[Q(S_0)]$) e no 1º estado excitado tripleto ($[Q(T_1)]$):

1) População e despopulação do estado fundamental $Q(S_0)$:

$$\frac{d[Q(S_0)]}{dt} = -\beta + k_{IC}[Q^*(S_1)] + (k_0 + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (5)$$

onde

$d[Q(S_0)]/dt$	Variação temporal da concentração do estado S_0 .
$-\beta$	Termo devido à irradiação do Q e representa a excitação das moléculas de $S_0 \rightarrow S_1$. O sinal (-) indica que $[Q(S_0)]$ diminui no tempo.
$+k_{IC}[Q^*(S_1)]$	Retorno das moléculas em $S_1 \rightarrow S_0$ pelo processo de IC (sem inversão de spin). Não há emissão fluorescente. O sinal (+) indica o aumento de $[Q(S_0)]$.
$+k_{q2}[O_2][Q^*(T_1)]$	Processo de supressão do estado T e retorno ao S_0 . O sinal (+) indica o aumento de $[Q(S_0)]$.
$+k_0[Q^*(T_1)]$	Retorno $T_1 \rightarrow S_0$ (ISC). O sinal (+) indica o aumento de $[Q(S_0)]$.

2) População e despopulação do estado excitado $Q^*(S_1)$:

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T)[Q^*(S_1)] \quad (6)$$

onde

$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt}$	Varição temporal da concentração do Quinifuril no estado excitado S_1 .
$+\beta$:	Taxa de aumento da população de moléculas no estado S_1 ($S_0 \rightarrow S_1$), devido à irradiação do Quinifuril. O sinal (+) indica que $[Q(S_1)]$ aumenta no tempo.
$-k_{IC}[Q^*(S_1)]$:	Taxa de retorno das moléculas $S_1 \rightarrow S_0$ por IC (sem inversão de spin). O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(S_1)]$.
$-k_T[Q^*(S_1)]$:	Taxa de retorno das moléculas $S_1 \rightarrow T_1$, por ISC. O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(S_1)]$.

3) População e despopulação do estado excitado $Q^*(T_1)$:

$$\frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = k_T[Q^*(S_1)] - (k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (7)$$

onde

$\frac{d[Q^*(T_1)]}{dt}$	Varição temporal da concentração do estado excitado tripleto $[Q^*(T_1)]$.
$+k_T[Q^*(S_1)]$	Taxa de variação da população do estado T_1 ($S_1 \rightarrow T_1$) por ISC. O sinal (+) indica o aumento de $[Q^*(T_1)]$.
$-k_{q1}[Q(S_0)][Q^*(T_1)]$	Supressão do estado T_1 por encontros entre uma molécula em T_1 e outra em S_0 , com taxa k_{q1} . O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(T_1)]$.
$-k_{q2}[O_2][Q^*(T_1)]$	Supressão do estado T_1 pelo O_2 , com taxa k_{q2} . O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(T_1)]$.

O termo $\beta = \left(\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \{1 - \exp(-2.3A_0)\} d\lambda \right)$ é um fator determinado pela

absorção de luz na região de irradiação da amostra ($\lambda_i=350 \text{ nm} \leq \lambda \leq \lambda_f=450 \text{ nm}$); $I(\lambda)$ é a intensidade de irradiação da luz sobre a amostra. O termo $A_0 = \varepsilon(\lambda)[Q(S_0)]\ell$ representa a absorção óptica inicial da amostra de Quinifuril (Lei de Lambert-Beer).

A resolução destas equações diferenciais se torna mais simplificada ao se impor as seguintes condições de contorno:

1) Se a absorção inicial da amostra for $A_0 < 1$ (experimentalmente obtido pelo controle da concentração inicial do Quinifuril), pode-se escrever em primeira aproximação:

$$\beta \cong 2,3\ell[Q(S_0)] \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda)\varepsilon(\lambda)d\lambda = \beta_1[Q(S_0)] \quad (8)$$

onde o termo $\beta_1 \equiv 2,3\ell \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda)\varepsilon(\lambda)d\lambda$ depende somente das condições de irradiação da amostra (região espectral, tipo e potência da fonte) e não depende da concentração $[Q(S_0)]$ do Quinifuril.

2) Nos experimentos foram utilizados dois tipos de fontes de irradiação: a lâmpada (região espectral 350-450 nm, 20 mW/cm²) e o laser ($\lambda_{\text{excit}} = 355$ nm, 30 mJ/pulso, 8 ns/pulso). Deste modo, tem-se que sob irradiação contínua e constante da lâmpada, a intensidade $I(\lambda)$ dos fótons oriundos da lâmpada que irão excitar o Quinifuril é muito menor que a do laser (*flash fotólise*).

Deste modo, pode-se impor as condições de contorno para as populações dos estados excitados S_1 e T_1 : $[Q^*(S_1)] \cong 0$ e $[Q^*(T_1)] \cong 0$.

3) Como as características temporais da fotodecomposição do Quinifuril sob irradiação contínua são da ordem de 10^1 - 10^2 s (Fig. 4.3) e, portanto muito mais longas que os tempos de vida dos estados excitados $Q^*(S_1)$ ($< 10^{-9}$ s) e $Q^*(T_1)$ ($\approx 10^{-6}$ s) (Fig. 4.5), pode-se escrever as condições de estado estacionário:

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = 0 \quad \text{e} \quad \frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = 0 \quad (9)$$

Aplicando as expressões (8) e (9) em (5), tem-se:

$$[Q^*(S_1)] = \beta_1[Q(S_0)] / K_3, \text{ onde } K_a \equiv k_{IC} + k_T \quad (10)$$

Aplicando (9) em (7):

$$[Q^*(T_1)] = (k_T / k_4)[Q^*(S_1)], \text{ onde } K_b \equiv k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2] \quad (11)$$

Substituindo (10) em (11):

$$[Q * (T_1)] = (k_T / k_b)(\beta_1 / k_a)[Q(S_0)] \quad (12)$$

Substituindo as expressões (8), (10) e (12) na expressão (5), teremos:

$$\begin{aligned} \frac{d[Q(S_0)]}{dt} &= -\beta + k_{IC}\beta_1[Q(S_0)]/K_a + (k_0 + K_2[O_2])(k_T\beta_1 / K_a K_b)[Q(S_0)] = \\ &= [Q(S_0)]\{-\beta_1 + k_{IC}\beta_1/K_a + (K_0 + K_2[O_2])(k_T\beta_1 / K_a K_b)\} = \\ &= \beta_1([Q(S_0)]/ K_a K_b)\{-K_a K_b + K_b k_{IC} + k_T k_0 + k_T K_2[O_2]\} \end{aligned}$$

Utilizando-se as definições de K_a e K_b no colchetes acima e desenvolvendo o mesmo, o termo restante apenas do colchetes será $-k_T k_{q1}[Q(S_0)]$ e a expressão do termo $\frac{d[Q(S_0)]}{dt}$ se torna mais simples.

A velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril foi definida como a *variação temporal da sua concentração inicial quando o tempo tende a zero* ($t \rightarrow 0$) e assim pode-se escrever, finalmente:

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -\beta_1 \frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]^2}{(k_{ic} + k_T)(k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])} \quad (13)$$

A Expressão (13) é matematicamente complexa, porém uma análise qualitativa pode ser facilmente feita, fornecendo importantes conclusões:

a) Os termos β_1 , k_T , k_0 , k_2 , k_{q1} , k_{IC} e k_{q2} da Expressão (13) são valores constantes, que dependem exclusivamente das condições de irradiação da amostra (β_1) ou dos processos primários do Quinifuril (k_T , k_0 , k_2 , k_{q1} , k_{IC} e k_{q2}); e

b) Em meio aquoso (1atm), a concentração de oxigênio é também constante ($[O_2] \cong 3 \times 10^{-4}$ M a 24°C).

Deste modo, a única grandeza “variável” na Expressão (13) é a concentração inicial de Quinifuril $[Q(S_0)]$, cujo valor pode ser facilmente controlado experimentalmente.

Ao se considerar os valores dos termos β_1 , k_T , k_0 , k_2 , k_{q1} , k_{IC} e k_{q2} poderia-se esperar que na região de concentração do Quinifuril $[Q] < 70 \mu\text{M}$ e de oxigênio $[O_2] \cong 3 \times 10^{-4}$ M (solução aerada), os valores de V_i em soluções aquosas fossem entre 12 a 30 vezes menores que aquelas encontrados em soluções

deaeradas. Entretanto, a redução encontrada em V_i foi apenas de 2 a 6 vezes menor. Por outro lado era esperado que, em soluções saturadas de oxigênio ($[O_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$), V_i fosse 5 vezes menor quando comparada às soluções de ar, porém experimentalmente foram observados valores próximos tanto em soluções aeradas quanto em soluções saturadas de oxigênio (Figura 4.13).

Figura 4.13 - Dependência de V_i com a concentração inicial de Quinifuril em soluções na presença de ar (O) e saturadas de oxigênio (▲, $[O_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Estas discrepâncias somente puderam ser resolvidas ao se supor que o Quinifuril também pode ser decomposto diretamente a partir de seu estado excitado singlete $Q^*(S_1)$, formando Produtos2, com taxa k_x :

Neste caso as Expressões (6) e (13) devem ser re-escritas como:

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T + k_x)[Q^*(S_1)] \quad (14)$$

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = - \frac{\beta_1}{(k_{ic} + k_T + k_x)} \left(\frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]}{(k_0 + k_{q1} [Q(S_0)] + k_{q2} [O_2])} + k_x \right) [Q(S_0)] \quad (15)$$

Analisando-se a Expressão (15) verifica-se que se $k_{q2}[O_2] > k_0$; e K_x e $k_{q1}[Q(S_0)] > \frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]}{k_{q2} [O_2]}$. Deste modo, conclui-se que a velocidade de fotodecomposição V_i do Quinifuril em soluções aquosas aeradas e saturada de oxigênio não dependem da concentração de oxigênio no meio.

Os dados experimentais suportam o modelo cinético, que descreve adequadamente o comportamento de V_i (Expressão (15)) em soluções saturadas de ar ou oxigênio, onde observou-se que V_i possui uma dependência linear com a concentração de Quinifuril $[Q(S_0)]$ (**Fig. 4.13**).

Por outro lado, na ausência de oxigênio o comportamento de V_i é bem descrito pela Expressão (13), pois observou-se que V_i possui uma dependência quadrática com a concentração de Quinifuril, o que foi também confirmado experimentalmente (**Fig. 4.4**).

Os processos de fototransformação do Quinifuril podem ser entendidos ao se considerar que, na ausência do oxigênio, os estados tripletos não são suprimidos. Isto auxilia a fotodecomposição do Quinifuril, através da interação entre uma molécula do composto no estado transiente T_1 e outra no estado fundamental S_0 , diminuindo o tempo de vida do estado T_1 , uma vez que se supôs que a fototransformação **FT₅** seja parcialmente responsável pela fotodecomposição do Quinifuril. Esta suposição foi baseada na verificação experimental de que, após o decaimento do transiente do Quinifuril, há o surgimento de um sinal transiente crescente de uma espécie desconhecida (**Fig. 4.14**), provavelmente um radical de nitrogênio ($Q^{\bullet-}(R-NO_2^{\bullet-})$). Esta suposição é reforçada com a verificação de que na presença de um doador de elétrons (DE), como o ácido ascórbico, a reação se torna mais efetiva na formação de $R-NO_2^{\bullet-}$. Na presença do oxigênio, o nitro ânion radical pode reduzir o oxigênio para $O_2^{\bullet-}$ [Ramakrisna Rao et al., 1988].

Estas reações podem ser representadas por:

onde a espécie $Q^{\bullet+}$ é radical cátion do Quinifuril.

Figura 4.14 - Formação de uma espécie transientes ($R-NO_2^-$) a partir da fotólise do Quinifuril.

Baseados nos resultados apresentados, os possíveis processos de fototransformação do Quinifuril podem ser resumidos através do diagrama:

Figura 4.15 - Esquema das fototransformações do Quinifuril em solução aquosa sob excitação de luz.

4.6 - EFEITO DO pH E DA CONSTANTE DIELÉTRICA (ϵ) SOBRE AS PROPRIEDADES ESPECTRAIS DO QUINIFURIL

4.6.1 - pK do Quinifuril

A **Figura 4.16A** mostra os espectros de absorção do Quinifuril em diversos pH's. Observa-se que o composto sofre grande influência do pH sobre suas características de absorção: o pH do meio muda a posição da banda do máximo de absorção ($\lambda_{\max}$) e sua amplitude. Quando o pH do meio diminui (pH 6,9 $\rightarrow$ pH 1,0) há um deslocamento batocrômico (para o vermelho) da absorção do Quinifuril (396 $\rightarrow$ 406 nm). O deslocamento batocrômico é acompanhado por um acréscimo da intensidade de absorbância maior que 40%. Por outro lado em pH alcalino (> 7) temos o desaparecimento da banda principal do Quinifuril em 396 nm e em pH 12,1 a absorção da banda cai para menos de 30% da absorção em relação ao pH 7,0. O detalhe na **Figura 4.16A** mostra a dependência do comprimento de onda da banda principal em função do pH.

A **Figura 4.16B** mostra a dependência da intensidade da absorbância do Quinifuril em $\lambda_{\max}=396$ nm em função do pH. Observa-se que na região de pH entre 4,5 e 7,5 a intensidade se mantém aproximadamente constante. Na região de pH entre 4,5 e 1,1 a intensidade da absorbância sofre uma sensível modificação. Pode-se supor que esta variação seja devido à protonação do Quinifuril (recebimento de um próton H^+ do meio). Destes dados calculou-se que o Quinifuril apresenta um **pK $\approx 3,0$** , indicando que neste valor de pH há o equilíbrio entre a forma protonada e não-protonada do Quinifuril. Pode-se supor também que no intervalo de pH entre 4,5 e 7,5 o Quinifuril se apresenta na forma não-protonada (**Figura 4.16A**).

Adicionalmente o pK $\approx 3,0$ também pôde ser obtido através de medidas da variação do máximo de absorção com o pH (Detalhe na **Figura 4.16A**), onde a distribuição dos valores de $\lambda_{\max}$ foi ajustada por uma curva sigmóide e o pK avaliado como o ponto médio entre as alturas dos platôs.

Figura 4.16- (A) Espectros de absorção do Quinifuril (37 μM) em diversos valores de pH. Em pH 6,9 sua banda principal de absorção está em $\lambda_{\text{max}} = 396$ nm (seta 1) e em pH 1,1 há um deslocamento da banda para $\lambda_{\text{max}} = 406$ nm (seta 2) com um aumento na intensidade de absorção em $\cong 40\%$ (seta 3). Em pH > 9 a banda principal desaparece. **Inserto** – Dependência do comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) em função do pH mostrando o deslocamento batocrômico (394 $\rightarrow$ 406 nm) da banda principal do Quinifuril quando o pH do meio diminui; (B) Cálculo do $\text{pK} \cong 3,0$ (○) do Quinifuril, devido à sua protonação, através do decaimento da absorção em $\lambda_{\text{max}} = 396$ nm em função do pH do meio.

No intervalo de pH's maiores que 8,5 aparentemente haveria um segundo pK de de-protonação, ou seja, a perda de próton pela molécula. Porém, acredita-se que este efeito da perda da absorção nesta região seja motivado pela precipitação do Quinifuril devido ao pH [Smirnov et al., 1989] e não à sua de-protonação. Esta precipitação não foi mensurável pelos métodos à nossa disposição, devido à pequena massa total de Quinifuril na solução, estimada como sendo da ordem de 1,0 ng.

Inferiu-se adicionalmente que no intervalo de pH entre 5,5 e 7,5 o Quinifuril se apresenta na forma não-protonada, mantendo suas propriedades espectrais constantes neste intervalo de pH, e assim não houve necessidade de um rígido controle do pH em nossos experimentos.

4.6.2 – Efeito do pH sobre a fotodecomposição do Quinifuril

Observou-se que o pH afeta significativamente a velocidade de fotodecomposição do Quinifuril. A **Figura 4.17A** mostra os espectros de absorção do Quinifuril (20 μ M) em pH 1,0 e a curva de sua cinética de fotodecomposição neste pH (**Figura 4.17B**). Observa-se que, além do deslocamento batocrômico (396 $\rightarrow$ 406 nm) e do aumento da intensidade de absorção quando o pH diminui de 7,0 para 1,1; a velocidade de fotodecomposição é significativamente aumentada, quando comparada à velocidade em pH fisiológico.

A **Figura 4.18** mostra os perfis das cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril para pH's entre 1,0 e 6,3 (dados normalizados). Inferiu-se das curvas cinéticas que em pH ácido (< 6) as velocidades de fotodecomposição aumentam significativamente. Das cinéticas de fotodecomposição e do cálculo das V_i para cada cinética observou-se que em pH 1,0 o Quinifuril se fotodecompõe $\cong 25$ vezes mais rápido do que em pH 6,3.

Adicionalmente observou-se que uma amostra de Quinifuril (22 μM), permanecendo em repouso em pH 1,0 por 30 minutos no escuro, sofre lenta degradação, perdendo menos de 10% de sua absorção óptica neste intervalo de tempo. Considerou-se que esta perda não foi significativa em nossos experimentos, pois todo o procedimento experimental de fotólise do Quinifuril em pH ácido (< 6) (**Fig. 4.17 e 4.18**) ocorreu num tempo menor que 10 minutos.

4.7 - EFEITO DO SOLVENTE SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS E SOBRE A FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

A **Figura 4.19A** mostra os espectros de absorção de amostras de Quinifuril (22 μM) em soluções homogêneas de solventes com diferentes constantes dielétricas (ϵ). Tomando-se como referência uma amostra de Quinifuril em solução aquosa ($\epsilon_{\text{água}}=81$), observa-se que a banda principal sofre um aumento em sua intensidade e um deslocamento para comprimentos de onda de absorção menores quanto menor o ϵ do solvente, ou seja, sua banda sofre um deslocamento hipsocrômico “para o azul” quanto menor a polaridade do solvente (seta na Figura).

Pode-se atribuir as características fotofísicas e fotoquímicas do Quinifuril a uma conjugação- π , baseados nas observações experimentais: **(a)** o alto valor do coeficiente de absorção molar do Quinifuril ($\epsilon_{396} = 24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, **Fig. 4.1**) e a estreita largura da banda de absorção principal ($\Delta\lambda \cong 70 \text{ nm}$) são característicos de conjugação- π [Calvert e Pitts, 1966]; **(b)** em soluções não-aquosas, observou-se o deslocamento hipsocrômico para o azul (maior energia) do máximo de absorção devido à diminuição da polaridade do solvente (**Fig. 4.19**). Este comportamento é também característico de conjugação- π [Bonnett, 2000]. Assim, pode-se atribuir a fotodecomposição do Quinifuril, observada pelo seu fotocloreamento (**Fig. 4.2**), à destruição do sistema de conjugação- π do seu cromóforo.

Observou-se que a velocidade de fotodecomposição V_i do Quinifuril é dependente da constante dielétrica do meio. A **Tabela 4.II** mostra os valores das velocidades de fotodecomposição do Quinifuril e dos comprimentos de onda máximo nos diferentes solventes. Inferiu-se destes resultados que quanto menor a polaridade do meio (menor ϵ), maior V_i . Adicionalmente observou-se que alíquotas aquosas de Quinifuril (10 μL) não foram miscíveis nos solventes dimetilformamida (aprótico) e em hexano (apolar) e impossibilitaram o estudo da fotodecomposição nestes solventes.

Tabela 4.II: Valores do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e as velocidades de fotodecomposição V_i do Quinifuril (22 μM) em diversos solventes.

Solvente (ϵ)	λ_{max} (nm)	V_i ($\times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$)
Acetona (20,7)	388	23
Etanol (24,3)	384	17
Acetonitrila (36,2)	389	16
Água (81)	396	1,0

Fig. 4.19 - Espectros de absorção do Quinifuril (22 μM) em solventes de diversas constantes dielétricas (ϵ). As soluções foram preparadas dissolvendo 10 μL da solução estoque aquosa do Quinifuril em 2 mL de cada solvente, resultando na concentração final de 22 μM de Quinifuril. Observa-se que comprimento de onda máximo de absorção sofre um deslocamento hipsocrômico (**Tab. 4.II**).

4.8 - EFEITO DO ETANOL SOBRE A AS CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS E SOBRE A FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

Observou-se que a maior alteração espectral do Quinifuril em diferentes solventes se dá para o etanol (**Figura 4.19**). Deste modo, realizou-se um estudo mais detalhado do efeito de diferentes soluções de etanol/água (volume/volume) sobre as características de absorção e fotodecomposição do Quinifuril.

A **Figura 4.20A** mostra os espectros de absorção de 2,0 mL de Quinifuril (24 μ M) em diferentes proporções da solução etanol/água. Tomando-se como referência a solução aquosa (100% água) do Quinifuril, observou-se o deslocamento hipsocrômico da banda de absorção de 396 nm para 384 nm ($\Delta\lambda=12$ nm), para amostras com proporções de etanol/água de 0:4 e 4:0, respectivamente. Além disso, para a amostra do Quinifuril em 100% de etanol, observou-se um aumento de mais de 46% na intensidade da banda de absorção do composto (seta na Fig.).

A **Figura 4.20B** mostra o perfil das curvas cinéticas do Quinifuril em diferentes soluções com etanol. A partir destes perfis de fotodecomposição calculou-se que a V_i é $\cong 73$ vezes maior em 100% de etanol do que numa solução aquosa (100% água), ou seja, o Quinifuril se fotodegrada mais rapidamente quanto maior a proporção de etanol na solução (**Figura 4.20C**).

Figura 4.20- (A) Espectros de absorção de 2 mL de Quinifuril ($24\mu\text{M}$) em soluções de etanol/água, em porcentagem de etanol na solução. (B) Perfis normalizados das cinéticas de fotodecomposição das soluções de Quinifuril em etanol/água. A legenda indica o λ_{max} para cada quantidade de etanol na solução. (C) Dependência de V_i em função do conteúdo de etanol (%) nas soluções.

4.9 – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

Neste Capítulo foram apresentados os processos de fototransformação e o modelo que descrevem os fotoprocessos primários do Quinifuril na sua interação com a luz.

O modelo descreveu adequadamente o processo de fotodecomposição do Quinifuril em função dos fotoprocessos primários, onde se verificou o papel essencial da reação entre os estados fundamental e tripleto do composto. O modelo também prevê a geração de espécies reativas, formadas a partir das fotoreações do Quinifuril. As fototransformações dos nitrocompostos RNO_2

(figura) foram descritas e propõem caminhos para a geração de espécies reativas a partir destes compostos [Kemp e Martins, 1981; Moore, 1987]. Um destes caminhos

é a fotoionização direta do composto, formando um elétron hidratado ($e_h^{\bullet-}$), o qual em consequência se liga à molécula no estado fundamental, produzindo um nitro-óxido radical ($RNO_2^{\bullet-}$):

Outro caminho alternativo é a transferência do elétron, a partir de um composto doador (D) de elétron, para o nitrocomposto no seu estado excitado tripleto ($RNO_2^*(T_1) + D \rightarrow D^{\bullet+} + RNO_2^{\bullet-}$), onde o nitro-óxido radical também é gerado. Os resultados que sugerem a eventual geração de espécies reativas a partir da fotoativação do Quinifuril serão descritos no Capítulo 6.

O processo de fotodecomposição do Quinifuril ao ser irradiado com luz visível na região 350-450nm é uma reação irreversível, indicando que há o fotocloreamento verdadeiro (*true photobleaching*) da amostra, ou seja, a perda de sua cor associada com a destruição da conjugação- π do seu cromóforo.

Observou-se que as fototransformações do Quinifuril são dependentes do oxigênio presente no meio e também do ambiente, pois sua fotodecomposição é acelerada em meios apolares. Como o Quinifuril apresentou fotocitotoxicidade para células em culturas, onde as interações com a membrana celular podem ser um fator determinante nos processos de fototransformação do composto, é importante conhecer-se as características de fotólise na presença de sistemas

organizados. Deste modo, foram estudados os processos de fototransformação do Quinifuril na presença de sistemas modelos de detergentes e suas micelas e serão descritos no próximo Capítulo.

Capítulo 5

INTERAÇÃO DO QUINIFURIL COM DETERGENTES E SUAS MICELAS

5.1 - EFEITO DAS MICELAS SOBRE O pK DO QUINIFURIL

Como mostrado no Capítulo anterior, o Quinifuril é protonado em ambiente ácido e apresenta um $pK \cong 3,0$ em solução aquosa, pois nesse pH o Quinifuril encontra-se no equilíbrio entre sua forma protonada e não-protonada.

A **Figura 5.1** apresenta as curvas da variação da absorção em 396 nm do Quinifuril em função do pH da solução na presença de micelas formadas de diferentes detergentes: 10 mM de SDS (aniônico), 4 mM de DPS (zwitteriônico) e 0,1 mM de CTAB (catiônico), na respectiva concentração micelar crítica (CMC) de cada detergente.

Mediu-se o pK do Quinifuril na presença de micelas formadas desses detergentes: $pK \cong 5,5$ na presença do SDS, $pK \cong 2,3$ para o DPS e $pK \cong 2,5$ para o CTAB. Observou-se que o ponto de pK do Quinifuril na presença desses detergentes tem seu valor deslocado para um pK aparente por um valor ΔpK_a e que este deslocamento é dependente da carga elétrica do detergentes.

O deslocamento do pK aparente do Quinifuril (ΔpK_a) foi calculado em relação à água como $\Delta pK_a = pK_{\text{detergente}} - pK_{\text{água}}$ (**Tabela 5.1**): observou-se que as presenças dos detergentes de carga positiva (CTAB) e zwitteriônico (DPS) induzem um deslocamento negativo (-0,5 e -0,7, respectivamente), enquanto que para a micela carregada negativamente (SDS) o deslocamento é positivo (2,5). Pode-se supor que o deslocamento aparente do pK do Quinifuril ΔpK_a seja devido à interação do composto com o detergente. O ΔpK_a observado é composto de dois termos [Borissevitch,1996]:

$$\Delta pK_a = \Delta pK_i + \Delta pK_e$$

onde ΔpK_i é o deslocamento intrínseco do pK, devido ao novo ambiente do Quinifuril ligado à micela que neste novo ambiente apresenta características físicas e químicas diferentes. Supõe-se que o termo ΔpK_i seja igual para todos os tipos de micelas [Borissevitch et al.,1996]. O termo ΔpK_e está associado à interação eletrostática entre a micela carregada e os prótons de H^+ presentes na solução. Uma vez que o pH é uma medida da concentração média de H^+ na solução ($pH = -\log[H^+]$), o deslocamento aparente do pH (ΔpK_a), devido às micelas pode ser assim interpretado: a concentração de prótons H^+ nas vizinhanças da micela de SDS carregada negativamente é maior que no volume aquoso, efeito devido à atração coulombiana entre a micela negativa e os prótons H^+ , induzindo uma maior concentração de prótons nas vizinhanças da micela. Na solução de Quinifuril contendo micelas de SDS em pH ácido, o Quinifuril estará no equilíbrio entre sua forma protonada e não-protonada quando se diminuir a concentração de H^+ (aumentando o pH médio da solução) nas vizinhanças da micela. Este efeito explicaria o deslocamento aparente observado do pK do Quinifuril para valores positivos ($\Delta pK_a = 2,5$) na presença das micelas do SDS.

Nos casos onde se têm micelas de CTAB catiônica ou de DPS zwitteriônico na presença do Quinifuril, o efeito é contrário ao descrito acima: a concentração de H^+ local é menor que no volume aquoso (devido à repulsão coulombiana entre o H^+ e a micela). Assim, para que se atinja o equilíbrio do Quinifuril na forma protonada e não-protonada na solução, é necessário se aumentar a concentração de H^+ local, diminuindo o pH médio no volume aquoso, tendo como consequência o deslocamento negativo observado do pK na presença destas micelas.

Tab. 5.I – Determinação do pK do Quinifuril na presença de detergentes.

Detergente	pK	(ΔpK_a)
SDS	5,5	2,5
DPS	2,3	-0,7
CTAB	2,5	-0,5

Figura 5.1 - Variação da absorção do Quinifuril (37 μM) em 396 nm em função do pH na presença micelas de 10 mM de SDS (●), 4 mM de DPS (△), 0,1 mM de CTAB (□) e em água (■). Os valores de pK's do Quinifuril obtidos foram: água (3,0); SDS (5,5); DPS (2,3); e CTAB (2,5). As variações do pK (ΔpK) foram calculados em relação à água como $\Delta pK = pK_{\text{detergente}} - pK_{\text{água}}$ (**Tab. 5.I**).

5.2 – ESTUDO DA CINÉTICA DE AGREGAÇÃO SDS-QUINIFURIL

A adição de SDS em concentrações abaixo da sua concentração micelar crítica (CMC) de 10 mM, numa solução aquosa de Quinifuril (18 μ M) induz a formação de agregados de SDS-Quinifuril, onde a CMC é a concentração a partir da qual as micelas são formadas [Neugebauer, 1994].

A **Figura 5.2A** mostra os perfis das curvas cinéticas de formação de agregados SDS-Quinifuril em concentrações pré-micelares de SDS no meio em pH 6,5. A formação dos agregados é caracterizada pela diminuição na intensidade da banda de absorção principal do Quinifuril (λ_{max} =396 nm) até um valor de equilíbrio.

Observou-se que a velocidade de formação dos agregados (V_{agreg}) é dependente da concentração de SDS na solução. Esta velocidade de formação de agregados foi avaliada através do valor máximo da 1ª derivada numérica (Origin® 6.1) da absorção temporal em 396 nm através da expressão:

$$V_{\text{agreg}} \equiv - \frac{d}{dt} (A_{396}(t))_{\text{max}} \quad (16)$$

A **Figura 5.2B** mostra os valores calculados das velocidades de formação dos agregados através da Expressão **(16)**. Observou-se que V_{agreg} possui um comportamento complexo: quando a concentração de SDS cresce entre 0 e 2 mM, V_{agreg} cresce rapidamente, até atingir o máximo valor para 2 mM de SDS. Para valores de SDS maiores que 2mM, observou-se que V_{agreg} diminui lentamente, até atingir um valor praticamente nulo quando a concentração de SDS se aproxima de sua CMC, entre 7 e 10 mM [Neugebauer, 1994]. A **Tabela 5.2** resume os dados calculados de V_{agreg} através da Expressão **(16)**.

A distribuição das velocidades de formação dos agregados da **Figura 5.2B** foi mais bem ajustada através de uma função do tipo:

$$V_{\text{agreg}} = \frac{\Psi}{K_2 - K_1} (e^{-K_1[\text{SDS}]} - e^{-K_2[\text{SDS}]}) \quad (17)$$

onde Ψ , K_1 e K_2 são parâmetros do ajuste.

O ajuste da distribuição de V_{agreg} através da Expressão **(17)** resultou nos valores $\Psi = 0,14 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $K_1 = 0,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e $K_2 = 1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

O parâmetro Ψ é uma constante de ajuste. O parâmetro K_1 pode ser interpretado como sendo o coeficiente de agregação do agregado SDS-Quinifuril e representa o recíproco da concentração crítica do processo de agregação, pois $1/K_1 \cong 2,0 \text{ mM}$ é a concentração de maior velocidade de formação dos agregados SDS-Quinifuril. O termo K_2 pode ser interpretado como sendo o coeficiente de desagregação do agregado SDS-Quinifuril, de valor $1/K_2 \cong 0,8 \text{ mM}$.

Estes resultados indicaram que a formação dos agregados SDS-Quinifuril pode ser devido a um processo de competição entre a formação dos agregados e a formação das micelas de SDS, uma vez que se observou que em concentrações pré-micelares muito menores que a CMC do SDS, a formação dos agregados é favorecida e ocorre numa cinética rápida da ordem de minutos (**Figura 5.2**). Por outro lado, em valores próximos da CMC de SDS, a formação dos agregados compete com a formação das micelas e a cinética do processo é lenta, podendo se prolongar de vários minutos a horas, como no caso de 8,7 mM de SDS. Para valores acima da CMC do SDS ($\geq 10 \text{ mM}$) não se observou qualquer cinética de formação dos agregados, pois nestes valores de concentração de SDS as micelas se encontram formadas.

Tabela 5.II - Velocidade (V_{agreg}) de formação de agregados SDS- Quinifuril

[SDS] (mM)	V_{agreg} ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)
0,25	3,7
0,5	4,2
1,5	6,0
3,5	3,2
7,4	0,4
8,7	0,6
9,9	0,1
48	< 0,01

Figura 5.2: (A) Perfis das cinéticas de formação de agregados SDS-Quinifuril (obtida pela medida da absorção em 396nm) de 2 mL de solução de Quinifuril (18 μ M) na presença de SDS (mM): 0,0 ($\square$); 0,25($\triangle$); 0,5 (∇); 2 ($\blacktriangle$); 5 ($\circ$); 8,7 ($\blacksquare$); 9,9 ($\bullet$). A escala temporal para a medida de 8,7 mM foi reduzida 3 vezes para melhor visualização. **(B)** Dependência de V_{agreg} ($\bullet$) em função de [SDS], calculadas pela Expressão (16). Os dados foram ajustados (linha sólida) através da Expressão (17). A máxima velocidade de agregação V_{agreg} se encontra em $\cong 2$ mM (**Tab. 5.2**).

Observou-se (**Figura 5.2A**) que o início da formação dos agregados, obtido pela queda da absorção em 396 nm, é também dependente da concentração de SDS: para 2,0 mM de SDS a etapa lenta da agregação perdurou por $\cong 30$ s, após a adição de mais detergente na solução, o processo de agregação durou $\cong 10$ minutos. Em contraste, para 8,7 mM de SDS, a etapa lenta perdurou $\cong 30$ minutos e sua cinética ocorreu num tempo total de $\cong 160$ minutos. Na **Figura 5.2A** a escala temporal para a cinética de agregação de 8,7 mM foi reduzida 3 vezes para melhor visualização.

É importante frisar que as grandezas aqui apresentadas estão baseadas na análise das observações macroscópicas do processo de agregação SDS-Quinifuril (obtidas a partir dos espectros de absorção e dos perfis das cinéticas de agregação) e não aos processos microscópicos de interação entre as moléculas de SDS-água-Quinifuril, que possuem taxas da ordem da taxa de difusão ($\cong 10^{-10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Cox, 1994].

Observou-se que o mecanismo de agregação SDS-Quinifuril é um processo em duas etapas: o processo se inicia numa etapa lenta de indução da agregação ("*lag phase*"), seguida da etapa rápida ("*log phase*").

Para a análise deste processo de agregação utilizou-se como aproximação inicial um modelo proposto por Pasternack [Pasternack et al., 1998], que supõe o papel catalítico para os dímeros: supõe-se que na fase "*lag*" exista a geração de pequenos agregados (núcleos intermediários), tais como dímeros. Estas espécies formadas (dímeros) agem como centros catalíticos, onde um monômero adicional é cataliticamente adicionado ao centro, formando trímeros (fase "*log*"). Apesar de serem gerados em pequenas concentrações, estes núcleos amplificam a velocidade de formação dos agregados.

Aplicando o modelo proposto aos dados experimentais (**Figura 5.2**), pode-se escrever a expressão que fornece a variação temporal da absorção óptica ($A_{\text{agreg}}(t)$) do Quinifuril (em 396nm) durante a formação dos agregados [Pasternack et al., 1998]:

$$A_{\text{agreg}}(t) = \frac{A_0}{\left(1 + (m-1) \left\{ k_0 t + \frac{(k_c t)^{n+1}}{n+1} \right\}\right)^{\frac{1}{m-1}}} \quad (18)$$

onde se realizou uma adaptação na expressão do modelo proposto por Pasternack, introduzindo o termo A_0 , que corresponde a absorção inicial da amostra no tempo zero.

Segundo o modelo utilizado [Pasternack et al., 1998], os parâmetros m e n da Expressão (18) estão associados com as taxas de indução (formação) e com o tamanho dos agregados, respectivamente, e t é o tempo de formação dos agregados. O termo k_0 está associado ao período de indução não-catalítico "*lag phase*" e o termo k_c ao período catalítico "*log phase*" e são constantes de ajuste. O processo de agregação envolve a adição de um monômero em um pré-núcleo contendo $(m-1)$ unidades monoméricas. A reação pode envolver mudanças estruturais, migração e/ou reorientação do complexo, mas indiferentemente de sua natureza exata, esta etapa é requerida para limitar a velocidade do processo de agregação.

O modelo proposto foi aplicado, através de simulação computacional, aos dados das curvas cinéticas de agregação (600 pontos/curva) para dois valores de concentrações de SDS, 1,5 e 8,7 mM, obtidas em soluções de 18 μ M de Quinifuril. Os ajustes obtidos estão mostrados na **Figura 5.4**. A **Tabela 5.III** fornece os valores dos parâmetros m , n , k_0 e k_c obtidos através do ajuste dos perfis experimentais (Fig. 5.4).

A partir dos dados obtidos dos ajustes (**Tab. 5.III**), observou-se que o valor da taxa de crescimento do agregado (m) é maior para a concentração de 1,5 mM ($m=22$) de SDS do que para 8,7 mM ($m=6$), indicando que a formação dos agregados para 1,5 mM é mais rápida do que para 8,7 mM. Estes resultados obtidos da simulação são consistentes com os dados observados experimentalmente (**Fig. 5.4**), onde os tempos das cinéticas de formação dos agregados são da ordem de 800 s para 1,5 mM de SDS e 10.000 s para 8,7 mM.

Os valores do parâmetro n , associado ao tamanho dos agregados, possuem valores $n=8$ e $n=5$ para 1,5 mM e 8,7 mM, respectivamente. Este resultado indicou que o "tamanho" dos agregados SD-Quinifuril formado pela solução contendo 1,5 mM de SDS na presença de 18 μ M de Quinifuril é maior que os agregados formados por 8,7 mM de SDS.

Figura 5.4 - Simulação computacional do processo de formação de agregados SDS-Quinifuril para (A) 1,5 mM e (B) 8,7 mM de SDS, onde (●) são os dados experimentais (600 pontos) e as linhas sólidas são os ajustes obtidos através da Expressão (18). Os parâmetros do ajuste estão apresentados na Tab. 5.III. A absorção diferencial ($\Delta A = A_{396} - A_{ajuste}$) estimou um erro <10% nos resultados.

Tabela 5.III - Valores obtidos do modelo de agregação para SDS-Quinifuril				
[SDS] (mM)	m	n	k_0 (s ⁻¹)	k_c (s ⁻¹)
1,5	22	8	15×10^{-5}	$6,5 \times 10^{-3}$
8,7	6	5	1×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-4}$

Os parâmetros k_0 e k_c , associados à fase de indução não catalítica “lag” (lenta) e à fase catalítica “log” (rápida), respectivamente, possuem razões $k_c/k_0 \cong 43$ para 1,5 mM e $k_c/k_0 \cong 25$ para 8,7 mM de SDS. As razões k_c/k_0 , indicam que a fase “log” da cinética de formação dos agregados SDS-Quinifuril foi maior para 1,5 mM de SDS do que para 8,7 mM, e portanto a formação dos agregados é mais rápida para 1,5 mM do que para 8,7 mM.

Inferiu-se dos ajustes obtidos com o uso do modelo (**Figura 5.4**) que a absorção diferencial (ΔA), calculada como $\Delta A = A_{396} - A_{ajuste}$ (onde A_{396} é variação temporal da absorção em 396 nm; e A_{ajuste} é a absorção obtida na simulação através da Expressão **(18)**) é menor que 0,02, em ambos os casos, estando dentro de um erro experimental da ordem de 10%.

Deste modo, as previsões obtidas do modelo descrevem com razoável consistência os resultados experimentais.

Observou-se qualitativamente que a formação de agregados é um processo reversível. A **Figura 5.5A** mostra a cinética de formação de agregados na presença de SDS (0,1 mM). A adição de outra alíquota de SDS na mesma solução, após a estabilização da cinética para 0,1 mM, até concentração final de 7 mM, restitui o perfil normal de absorção do Quinifuril (**Fig. 5.5**, detalhe).

Observou-se no processo de formação dos agregados SDS-Quinifuril a existência do ponto isosbético (**Figura 5.5B**, seta) que sugere a presença de duas espécies absorvedoras na solução: o Quinifuril livre antes da adição de SDS, que absorve em 396 nm; e o agregado formado na etapa final (0,37 mM de SDS), que tem sua banda de absorção deslocada.

Figura 5.5 – (A) Perfil da agregação (0,1 mM $\bullet$) e desagregação (7 mM $\square$) do processo de agregação SDS-Quinifuril para a mesma solução de Quinifuril (21 μ M). No inserto estão espectros de absorção da solução (**a**) sem SDS. A adição de SDS (0,1 mM) induziu a formação dos agregados até (**b**) a completa formação dos agregados (30 min), com aparente deslocamento do máximo para 367nm ($\Delta\lambda = 19$ nm); (**c**) a adição (seta) de mais SDS na solução, até atingir 7mM, restituiu a absorbância praticamente ao valor inicial, indicando que o processo de agregação é reversível. **(B)** Espectros de absorção do Quinifuril (18 μ M) na presença de SDS (0,37 μ M). Observa-se o ponto isobéptico (seta), indicando a presença de duas formas absorvedoras na solução: o Quinifuril livre ($\blacktriangle$) e o agregado SDS-Quinifuril ($\bullet$).

Foram realizados experimentos de agregação similares aos descritos acima com os detergentes CTAB (catiônico) e DPS (zwitteriônico) e não se observou qualquer cinética de agregação para ambos os detergentes para um tempo de experimento de 1,5 h e em diversas concentrações acima e abaixo das respectivas CMC destes detergentes.

5.3 - ESTUDOS DA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL NA PRESENÇA DE SDS

A presença das micelas de SDS (≥ 10 mM) não alterou os espectros de absorção do Quinifuril.

A **Figura 5.6A** mostra os espectros de absorção da amostra de Quinifuril na presença de 30 mM de SDS, concentração onde as micelas estão formadas, em função do tempo de irradiação luminosa. A cinética de fotodecomposição é acompanhada pelo decréscimo da absorção em 396 nm (seta) em função do tempo de irradiação e a velocidade de fotodecomposição V_i foi calculada através da Expressão **(1)** e resultou em $8,4 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$.

Figura 5.6 - Espectros de absorção do Quinifuril (15 μM, pH 6) irradiado por 1200 s na presença de micelas de SDS (30 mM). O inserto mostra o perfil da curva cinética de fotodecomposição ($V_i = 8,4 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$).

A **Figura 5.7A** mostra os perfis das cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril na presença de diversas concentrações de SDS, onde se observou que os perfis são monoexponenciais. Observou-se que para uma mesma concentração de Quinifuril na solução a velocidade de fotodecomposição (V_i), calculada através da Expressão **(1)**, é fortemente dependente da concentração do SDS na solução.

Figura 5.7 – (A) Perfis da cinética de fotólise do Quinifuril (ar) na presença de SDS (mM): 0 (■), 0,2 (●), 1,0 (▲), 8,3 (△), 66,7 (○). Observa-se que a velocidade de fotodecomposição depende da concentração de SDS na solução. **(B)** Velocidades de fotodecomposição do Quinifuril para diferentes concentrações de SDS na presença de ar. O máximo valor de V_i ocorre em $[\text{SDS}] \cong 2\text{mM}$.

A **Figura 5.7B** mostra as velocidades de fotodecomposição do Quinifuril em função da concentração de SDS na presença de ar. Para amostras deaeradas as velocidades de fotodecomposição foram aumentadas em aproximadamente 2 vezes. Observa-se que a dependência de V_i com a concentração de SDS apresenta um máximo em 2 mM de SDS tanto na presença de ar quanto para a amostra deaerada. Este efeito pode ser entendido através do modelo de fotodecomposição do Quinifuril descrito no Capítulo anterior, onde se considerou que o processo de fotodecomposição do Quinifuril ocorre através da reação entre uma molécula no estado triplete (Q_T^*) e outra no estado fundamental (Q_0). Na presença dos agregados de SDS-Quinifuril podem eventualmente coexistir simultaneamente uma molécula no estado Q_T^* e outra no estado Q_0 . A proximidade entre estas moléculas no agregado pode induzir a uma interação mais efetiva entre as moléculas Q_T^* e Q_0 , aumentando a taxa de fotodecomposição do Quinifuril.

Para amostras deaeradas em concentrações onde as micelas de SDS estão formadas (≥ 10 mM), as V_i 's são $\cong 2$ vezes maiores que na presença de ar, indicando que na presença das micelas o ambiente local do Quinifuril é dominado pela presença das micelas e o ar do meio pouco afeta a fotodecomposição do Quinifuril.

5.4 - EFEITO DOS DETERGENTES DPS E CTAB SOBRE A VELOCIDADE DE FOTODECOMPOSIÇÃO V_i DO QUINIFURIL

A presença dos detergentes DPS e CTAB, em concentrações abaixo e acima de suas respectivas CMC's ($\cong 2-4$ mM e 0,1 mM, respectivamente [Neugebauer, 1994]), não afetaram os espectros de absorção do Quinifuril. Observou-se que os perfis das cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril na presença de ambos os detergentes permaneceram monoexponenciais.

A presença do detergente CTAB (catiônico) não afetou significativamente as cinéticas de fotodecomposição (**Figura 5.8A**), observando-se uma pequena diminuição na velocidade de fotodecomposição a uma média constante de $V_i \cong 0,8 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$, próxima da V_i para o Quinifuril

puro em solução aquosa. Já o efeito do DPS (zwitteriônico) na cinética de fotodecomposição foi dependente da concentração (**Figura 5.8B**) do detergente, porém menos significativo do que o observado para o SDS. Observou-se um aumento monotônico da V_i como aumento da concentração de DPS, até atingir a velocidade de fotodecomposição máximo de aproximadamente $4 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ para 6,4 mM de DPS.

Os estudos dos efeitos de detergentes de diferentes cargas, SDS, CTAB e DPS sobre as cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril, indicaram que estas cinéticas são dependentes das características da carga elétrica de cada detergente e da sua concentração no meio, tendo o SDS (aniônico) o maior efeito sobre a V_i , como discutido anteriormente; o DPS (zwitteriônico) induziu o aumento da V_i do Quinifuril, efeito similar ao SDS, porém menos significativo; e o CTAB (catiônico) praticamente não afetou a V_i , induzindo uma insignificante diminuição na V_i do Quinifuril.

5.5 – ESTUDO DO EFEITO DOS DETERGENTES SDS, CTAB E DPS SOBRE O TRANSIENTE DO QUINIFURIL

O estado excitado tripleto do Quinifuril em soluções aquosas é afetado um modo complexo na presença de diferentes concentrações do detergente aniônico SDS.

A **Figura 5.9** mostra os perfis de decaimento do Quinifuril na presença de diversas concentrações de SDS. Os perfis do decaimento do tripleto na presença de SDS acima de sua CMC (7-10mM) são monoexponenciais (análogos aos perfis obtidos em solução aquosa) e são bem descritos pela Expressão **(2)** ($\Delta D = \Delta D_0 e^{-k_1 t}$). Para concentrações de SDS abaixo da sua CMC o perfil do decaimento tripleto se torna bi-exponencial. Este comportamento foi verificado tanto para amostras na presença de ar quanto deaeradas e observou-se que a supressão do tripleto pelo oxigênio não é efetiva na presença de agregados SDS-Quinifuril. Os perfis do decaimento do tripleto do Quinifuril foram ajustados através de uma função do tipo $\Delta D = \Delta D_1 e^{-k_1 t} + \Delta D_2 e^{-k_2 t}$, onde k_1 e k_2 são as constantes “rápida” e “lenta” do decaimento do sinal do tripleto do Quinifuril, associadas ao tempo de vida do tripleto ($k = \frac{1}{\tau_T}$), e ΔD_1 e ΔD_2 são as intensidades relativas do sinal. Nas análises dos perfis do tripleto do Quinifuril na presença dos agregados SDS-Quinifuril considerou-se como valores significativos a componente “rápida” do decaimento (**Tabela 5.IV**).

Tabela 5.IV – Valores do tempo de vida (τ_T), da intensidade do sinal ($I_{\max}$) do tripleto do Quinifuril e da constante de supressão (K_{q2}) do Quinifuril na presença de SDS para amostras na presença de ar e deaerada.

[SDS] (mM)	Tempo de vida τ_T (μ s)*		$I_{\max} \times 10^{-3}$ (u.a.)		K_{q2} $\times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
	ar	deaerada	ar	deaerada	
0	1,8	19,2	70	59	1,7
1,0	0,43	0,25	24	21	5,6
2,5	0,16	0,32	51	24	10,2
3,7	1,4	16,0	56	38	2,2
5,0	1,6	19,2	54	51	2,0
7,4	1,5	34,6	61	47	2,1
15,0	1,5	36,6	81	63	2,1
24,0	1,5	11,4	74	75	1,9
47,6	1,5	27,3	78	69	2,1

* obtidos a partir da constante rápida ($k_1 = \frac{1}{\tau_T}$) do decaimento do tripleto do Quinifuril.

Figura 5.9 - Perfis de decaimento do estado tripleto do Quinifuril na presença de (A) 0,25; (B) 2,0 e (C) 9,9 mM de SDS. As medidas (A) e (B) foram realizadas após a fase “log” de formação dos agregados; e (C) na presença micelas de SDS formadas. (B) mostra o ajuste bi-exponencial para o decaimento do tripleto.

A **Figura 5.10A** mostra os valores medidos da componente rápida do decaimento do tripleto do Quinifuril na presença de SDS. Observou-se que a presença do SDS em diferentes concentrações alterou o tempo de vida do tripleto: há uma acentuada queda nos valores da componente rápida do sinal, apresentando um mínimo para 2 mM de SDS, para uma posterior estabilização em um patamar em torno de 7 mM de SDS tanto na presença quanto na ausência de ar. Em torno do mínimo em 2mM de SDS, na presença ou não de ar no meio, as diferenças entre os tempos de vida de tripleto são insignificantes. Os tempos de vida do tripleto do Quinifuril, medidos na presença de micelas formadas (≥ 8 mM), apresentaram um aumento de $\sim 50\%$ do que obtido na ausência de SDS, indicando uma interação efetiva entre o SDS e o Quinifuril.

A **Figura 5.10B** mostra os valores da intensidade do sinal do tripleto na presença do SDS. Observou-se um comportamento qualitativo similar ao tempo de vida do tripleto sendo, porém mais lenta a caracterização do patamar da intensidade do sinal do tripleto para concentrações crescentes de SDS acima de 2 mM. Este efeito sugere que a supressão do estado tripleto do Quinifuril é bastante efetiva em 2 mM de SDS e que este efeito está associado à formação dos agregados SDS-Quinifuril.

A **Figura 5.10C** mostra os valores da constante de supressão k_{q2} do tripleto do Quinifuril pelo oxigênio molecular na presença do SDS, calculadas através da Expressão **(4)** ($k_2 = k_1 + k_{q2}[O_2]$). Observou-se que k_{q2} depende da concentração de SDS no meio (**Tabela 5.IV**), onde se mediu o tempo de vida na presença e na ausência de ar no meio para as diferentes concentrações de SDS e calcularam-se os valores de k_{q2} para cada concentração. O cálculo dos valores de k_{q2} em função da concentração de SDS mostrou que seu valor apresenta um máximo para 2mM de SDS para rapidamente retornar a seu valor igual ao obtido na ausência de SDS ($[SDS]=0mM$). Infere-se deste resultado que em 2mM de SDS no meio o Quinifuril sofre supressão elevada.

A **Tabela 5.IV** resume os valores medidos e calculados do tempo de tripleto (τ_T), da intensidade máxima do sinal e constante de supressão pelo oxigênio do Quinifuril (K_{q2}).

Figura 5.10 – **(A)** Dependência do tempo de vida de triplete (τ_T) do Quinifuril (18 μ M) na presença de diferentes concentrações de SDS (ar: ●; deaerado: △). **(B)** Dependência da intensidade do sinal de triplete do Quinifuril (ar: ●; deaerado: △) e **(C)** da constante de supressão do oxigênio (k_{q2}) em função da concentração de SDS. Para [SDS]≈2 mM observa-se o valor mínimo do tempo de vida ($\tau_T \approx 0,2 \mu$ s); da intensidade do tripleto na presença e ausência de ar; e o valor máximo da constante de supressão do Quinifuril na presença de SDS.

Observou-se que na presença dos detergentes CTAB (catiônico) e DPS (zwitteriônico) o perfil de decaimento de tripleto do Quinifuril foi monoexponencial em qualquer concentração dos detergentes utilizada neste estudo: 0-10mM para DPS e 0-6mM para CTAB. As médias dos tempos de vida do tripleto do Quinifuril observadas em amostras na presença de ambos os detergentes foram $2,0 \pm 0,4 \mu\text{s}$ e $24,0 \pm 4,6 \mu\text{s}$ na presença de ar e deaeradas, respectivamente. As presenças de ambos os detergentes não apresentaram efeitos significativos sobre a constante de supressão k_{q2} do Quinifuril, pois se observou um crescimento de apenas 1,4 vez entre a ausência de detergente ($1,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e a maior concentração do detergente utilizado ($2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) em ambos os casos.

5.6 – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

A agregação é um fenômeno envolvendo a associação entre moléculas, mas que não envolve a ligação química entre elas, resultando em agregados ou unidades individuais (monômeros). O fenômeno ocorre quando interações intermoleculares entre as moléculas no soluto tornam-se mais favoráveis que a interação entre as moléculas do soluto e do solvente. Estas moléculas são mantidas unidas por fracas forças intermoleculares, as quais podem envolver ligações de pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações π - π , forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas, e dependem dos detalhes estruturais das moléculas envolvidas [Bonnett, 2000]. A agregação pode ser detectada através dos espectros de absorção das amostras por desvios da lei de Lambert-Beer com o aumento da concentração do composto e alargamento dos picos de absorção e diminuição do coeficiente de absorção molar (ϵ) com o aumento da concentração. Este comportamento é característico de agregados do tipo **H**, onde a formação destes agregados é acompanhada por uma nova absorção com deslocamento hipsocrômico para comprimentos de onda menores (*blue-shift*) [Bonnett, 2000].

Observou-se que os espectros de absorção do Quinifuril na presença de SDS em concentrações abaixo de sua CMC, em torno de 2 mM, apresentam significativa diminuição da absorbância e um deslocamento da

sua banda principal para o azul, de 396 nm para 367 nm (**Figura 5.5**) após a fase “log”. Estas observações dão subsidio para supor-se que os agregados SDS-Quinifuril são do tipo **H** (“face-a-face”) [Maiti et al., 1998].

A taxa de fotoclareamento (*photobleaching*) do fotossensibilizador é sensível ao seu “grau” de agregação e a aditivos, tais como detergentes [Bonnett, 2000]. Este efeito foi observado para os agregados SDS-Quinifuril, onde verificou-se que a velocidade de fotodecomposição do Quinifuril V_i é dependente da concentração de SDS no meio e possui sua maior V_i para 2 mM de SDS (**Figura 5.7**).

Os resultados indicaram que o Quinifuril interage fortemente com o SDS (aniônico), moderadamente com o DPS (*zwitteriônico*) e fracamente com o CTAB (catiônico), uma vez que se verificou a intensa dependência dos tempos de vida de triplete e da cinética de formação dos agregados em função da concentração de SDS na amostra. Por outro lado, na presença de DPS, estas alterações foram apenas moderadas e para o CTAB foram virtualmente inexistentes. Os deslocamentos aparentes do ponto de pK (ΔpK_a) na presença das micelas destes detergentes também refletem as interações entre eles e o Quinifuril. Destas observações pode-se inferir que as interações entre as moléculas de Quinifuril e dos detergentes utilizados possuem uma natureza eletrostática e que esta interação é mais intensa para o SDS.

Através dos espectros de absorção (**Fig. 5.5**) verificou-se a presença de um ponto isobéstico durante a formação dos agregados, indicando a presença de duas formas do Quinifuril na solução: uma forma livre no volume aquoso e outra no agregado. Quando se levam em consideração a natureza aniônica do detergente SDS e os dados experimentais obtidos, podemos fazer a seguinte análise: em concentrações baixas de SDS, muito abaixo da sua concentração micelar crítica (CMC), existe a formação de um cátion de Quinifuril (Q^+) que vão se aderindo eletrostaticamente com o SDS (S^-) numa cinética muito lenta quando comparada com a taxa de difusão ($\cong 10^{10} s^{-1}$ [Cox, 1994]) em solução aquosa.

O processo de agregação tem início com a formação dos núcleos intermediários, o par iônico Q^+S^- (dímero), continuando com a adição catalítica entre o Quinifuril e o detergente, formando os agregados $(Q^+S^-)_m$.

As moléculas de Quinifuril nos agregados diminuem sua absorção. Próximo e imediatamente abaixo da CMC do SDS, entre 7-10mM, o progresso da reorganização dos agregados $(Q^+S^-)_m$ em estruturas *quasi*-micelares, induz a liberação do Quinifuril do agregado para a sua forma monomérica catiônica Q^+ , resultando na rápida restauração da intensidade da absorção. Para aumentos adicionais da concentração de SDS, a intensidade de absorção atinge o valor limite inicial e todas as moléculas de Quinifuril na forma monomérica Q^+ estão compartilhadas por micelas 'normais' [Smirnov et al., 1989b; Pal et al., 1996].

Esta análise reforça a discussão anterior sobre o aumento da velocidade de fotodecomposição do Quinifuril na presença dos agregados SDS-Quinifuril: a proximidade entre as moléculas de Quinifuril, uma no estado tripleto Q_T^* e outra no estado fundamental Q_0 , induz a uma interação mais efetiva entre estas moléculas, aumentando a taxa de fotodecomposição do Quinifuril na presença dos agregados ($Q_T^* + Q_0 \xrightarrow{k_{q1}} \text{Produtos1}$). A região onde o efeito da concentração de SDS se torna mais crítico é em torno de 2 mM. Com aumentos progressivos da concentração de SDS, abaixo e próximo da sua CMC, as moléculas de Quinifuril vão se dividindo homogeneamente entre as moléculas de SDS, diminuindo o seu número por molécula de SDS. Deste modo, tem-se a diminuição de V_i , chegando à condição em que aumentos adicionais da concentração de SDS não afetam a razão Quinifuril/SDS, pois para aumentos adicionais de SDS passa-se a ter a formação das micelas de SDS e a razão passa a ser Quinifuril/micelas de SDS; onde o número de moléculas de Quinifuril por micela pode ser considerado essencialmente constante. Esta última etapa do processo faz com que a V_i se estabilize num valor constante (**Fig. 5.7**).

Pode-se considerar que nos agregados SDS-Quinifuril, onde se encontra o Quinifuril, é mais apolar em relação ao volume aquoso. Como se observou que o Quinifuril sofre uma fotodecomposição mais intensa em ambientes apolares, isto poderia também explicar a aumentada velocidade de fotodecomposição do Quinifuril na presença dos agregados, unido ao efeito que ocorre pela interação entre o estado excitado e o fundamental do Quinifuril.

Dos resultados obtidos pode-se inferir que o processo dinâmico de formação dos agregados apresenta uma *concentração crítica de agregação (CCA)* de SDS-Quinifuril [Pasternack et al., 1998], de valor CCA $\cong 2$ mM obtido a partir dos valores de V_{agreg} , do tempo de vida de tripleto e da velocidade de fotodecomposição do Quinifuril na presença do SDS.

Nesta Tese desenvolveu-se o modelo cinético de fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa [Borissevitch et al., 2003], onde foi mostrado que a V_i é dependente da concentração de Quinifuril. Observou-se que quando o detergente SDS esta presente na solução, esta dependência se torna mais complexa, uma vez que se deve levar em consideração a formação dos agregados SDS-Quinifuril, a sua interação de natureza eletrostática, a mudança para um ambiente micro-heterogêneo e eventuais mudanças nas propriedades de micro-viscosidades e na constante dielétrica do meio devido a presença dos agregados. Porém os resultados aqui apresentados dão algumas indicações qualitativas do(s) processo(s) que ocorre(m) entre estas moléculas.

Estudos adicionais para a verificação da formação dos agregados podem ser realizadas através de experimentos de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) ou de espalhamento ressonante de luz (RLS, *resonant light scattering*) e poderão eventualmente elucidar qual a estrutura do agregado, como se dá a sua formação e qual a natureza deste processo.

CAPÍTULO 6

ESPÉCIES REATIVAS RESULTANTES DA FOTODECOMPOSIÇÃO

DO QUINIFURIL

Nos Capítulos anteriores mostrou-se o Quinifuril sofre fotodecomposição ao ser irradiado e que o composto, sob ação da luz, é fotoexcitado ao seu tripleto e este estado é suprimido pelo oxigênio. Isto pode induzir a formação do $^1\Delta_g$ num processo típico de ação fotodinâmica (mecanismo do Tipo II) o qual, no entanto, ainda não foi detectado no caso do Quinifuril. Mostrou-se também que o composto possui ação fotocitotóxica contra as linhagens celulares, que esta propriedade está associada à sua fotólise e que os produtos finais da sua fotodecomposição não são os responsáveis pela sua toxicidade. Por outro lado, estudos prévios mostraram a liberação das espécies reativas $\text{NO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ devido ao metabolismo do Quinifuril [Degterev et al., 1989, 1990, 1993; Borisevitch e Degterev, 1992], e também que compostos da mesma família química do Quinifuril (nitrofuranos) liberam espécies reativas de nitrogênio sob ação da luz [Makareyeva et al., 1997]. Estes resultados motivaram a busca por espécies reativas eventualmente produzidas exclusivamente durante a fotoativação do Quinifuril, para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fotocitotoxicidade do composto, e indicaram as eventuais espécies produzidas.

6.1 - FORMAÇÃO DO RADICAL LIVRE ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\bullet-}$) DEVIDO À FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

Utilizou-se a epinefrina como sonda colorimétrica para a detecção da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante a fotodecomposição do Quinifuril. A oxidação da epinefrina para adrenocroma ocorre em duas etapas: inicialmente a epinefrina perde um elétron, formando a epinefrina oxidada, uma molécula altamente reativa. A epinefrina oxidada, ao perder outro elétron para o substrato, é convertida em adrenocroma [Foster e Hoffer, 2004], produto colorido que absorve em torno de 480 nm [Ferreira et al., 2004], numa reação irreversível [Hoffer, 1998].

A **Fig. 6.1A** mostra os espectros de absorção de uma amostra irradiada contendo 20 μM de Quinifuril na presença de 1,1 mM de epinefrina. A irradiação do Quinifuril na presença da epinefrina resultou na oxidação da sonda. Observou-se a fotodecomposição do Quinifuril (decréscimo do pico em 396 nm) seguido da formação da adrenocroma (aumento do pico em 486 nm) devido à oxidação da epinefrina. A presença do ponto isobéstico indicou a presença de duas espécies absorvedoras na solução: o Quinifuril e a adrenocroma. As curvas cinéticas de ambos os processos estão apresentadas no inserto, onde as concentrações dos compostos foram calculadas através de seus respectivos coeficientes de absorção molar (ϵ): $\epsilon_{396} = 24,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Quinifuril) e $\epsilon_{486} = 4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Adrenocroma, [Merck, 2001]).

A **Fig. 6.1B** mostra dados quantitativos, onde se observa que a taxa de fotodecomposição do Quinifuril aumenta nas soluções deaeradas quando comparadas com a aerada ($2,5 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ e $1,05 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente). Entretanto, a formação da adrenocroma não foi observada em soluções deaeradas. Observou-se adicionalmente que a taxa de formação da adrenocroma é significativamente reduzida pela presença da superóxido dismutase de $6,4 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ (ausência de SOD) para $3,0 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ ($15,5 \text{ } \mu\text{M}$ de SOD).

Observou-se que não há produção de adrenocroma quando uma solução aerada de epinefrina foi irradiada na ausência de Quinifuril (dados não mostrados). Isto evidencia que a espécie reativa detectada é formada durante a fotólise do Quinifuril e que os produtos de sua fotodecomposição não são os responsáveis pela oxidação da epinefrina. A taxa de fotólise do Quinifuril não foi significativamente alterada na presença de concentrações adicionais de epinefrina ou superóxido dismutase (dados não mostrados).

A formação de adrenocroma não foi observada na ausência de oxigênio na solução, indicando que a presença do oxigênio é essencial para a formação da adrenocroma. Também se observou que a formação da adrenocroma foi gradualmente diminuída na presença de concentrações crescentes de superóxido dismutase. Destes resultados pode-se inferir que o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é uma das espécies produzidas pela fotodecomposição do Quinifuril.

Figura 6.1- (A) Mudanças espectrais da solução de Quinifuril ($20\ \mu\text{M}$) na presença de epinefrina ($1,1\ \text{mM}$) sob irradiação. Observa-se que a fotodecomposição do Quinifuril, monitorada pelo decréscimo em $396\ \text{nm}$ (seta) induz a oxidação da epinefrina, formando a adrenocroma, monitorada pelo aumento em $486\ \text{nm}$ (seta). A linha tracejada mostra o espectro da epinefrina e serviu de linha de base nos experimentos. **Inserto** - Curvas cinéticas da fotólise do Quinifuril ($\square$, $396\ \text{nm}$) e formação da adrenocroma ($\bullet$, $486\ \text{nm}$). **(B)** Efeito do oxigênio e da concentração da SOD sobre as taxas de fotodecomposição do Quinifuril (V_{Quin}) e formação da adrenocroma (V_{Adren}). A SOD foi adicionada somente nas soluções aeradas (valores na legenda). Soluções tamponadas (fosfato, pH 7,8) de Quinifuril e epinefrina foram fotolizadas com luz visível ($390\text{--}450\ \text{nm}$) à temperatura ambiente. As soluções foram previamente borbulhadas (10 min) com ar (aeradas) ou nitrogênio (deaeradas, sem SOD).

A confirmação adicional de que a fotodecomposição do Quinifuril na presença de oxigênio no meio induz a formação de $O_2^{\bullet-}$ foi obtida através de medidas da taxa de formação do radical livre estável nitroxil (**NFR**) durante a fotodecomposição do Quinifuril. Nestes experimentos utilizou-se de medidas de ressonância paramagnética de spin eletrônico (EPR), onde uma solução de Quinifuril foi fotolisada na presença da armadilha de spin TMOOP. O $O_2^{\bullet-}$ se liga à sonda TMOOP, formado o nitroxil, fornecendo um sinal de EPR proporcional à quantidade de $O_2^{\bullet-}$ formado:

A **Figura 6.2A** mostra os perfis representativos dos espectros de EPR de uma amostra irradiada de Quinifuril na presença do TMOOP. A irradiação das amostras induziu a fotólise do Quinifuril e medidas simultâneas dos sinais de EPR das amostras indicaram o acúmulo do nitroxil, medido pelo aumento da amplitude do sinal de EPR. Os sinais do nitroxil formado nestes experimentos são idênticos aos medidos a partir de amostras do radical nitroxil utilizados para calibração (dados não mostrados).

A **Figura 6.2B** mostra um exemplo da concomitante das cinéticas de formação do nitroxil e consumo do Quinifuril. As cinéticas de acumulação do nitroxil foram realizadas em soluções aeradas e deaeradas contendo ambos os compostos e mostraram um grande decréscimo na taxa inicial da acumulação do radical nitroxil na ausência de oxigênio: $0,9 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$ e $0,09 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente.

Observa-se na **Figura 6.2C** que a taxa de formação do radical nitroxil foi reduzida em três vezes quando a fotodecomposição do Quinifuril foi realizada em soluções na presença de superóxido dismutase, de $0,9 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$ (ausência de SOD) para $0,3 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$ (presença de SOD).

6.2 - FORMAÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETE ($^1\Delta_g$) DEVIDO À FOTOEXCITAÇÃO DO QUINIFURIL

A **Figura 6.3A** mostra os perfis representativos da emissão transiente de fosforescência de uma amostra de Quinifuril em acetonitrila excitada por pulso de laser de Nd:YAG em 385 nm. Para detectar a formação do oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) a emissão de fosforescência da amostra foi monitorada através de experimentos semelhantes em diversos comprimentos de onda de excitação, entre 1220 e 1310 nm. Como o tempo de vida do $^1\Delta_g$ em água esta entre 2-6 μ s [Dolphin, 1994; Bonnett, 2000] e em acetonitrila seu tempo de vida é muito mais longo, em torno de 58-77 μ s [Frimer, 1985], realizou-se estes experimentos preliminares em acetonitrila para se obter uma distribuição mais distinta da intensidade de fosforescência da amostra.

Observou-se que a distribuição da intensidade da emissão fosforescente possui um perfil gaussiano e indicou um máximo em torno de 1280 nm (**Figura 6.3B**). A emissão de fosforescência em 1280 nm é específica do $^1\Delta_g$ monomol, sendo considerada a evidência experimental mais aceita para a liberação do $^1\Delta_g$ [Cadenas e Sies, 1984; Ocshner, 1997; Bonnett, 2000]. Deste modo pode-se atribuir esta emissão de fosforescência ao oxigênio singlete ($^1\Delta_g$), produzido a partir da fotoexcitação do Quinifuril.

A **Figura 6.3C** mostra um perfil representativo da emissão da fosforescência da solução aquosa do Quinifuril excitado em 355 nm por pulso de laser de duração 8 ns. Observa-se que inicialmente há o acúmulo do $^1\Delta_g$, representado pelo crescimento do sinal de fosforescência, para em seguida decair numa cinética aparentemente exponencial. Pode-se racionalizar este comportamento a partir da seguinte análise:

A taxa de formação do $^1\Delta_g$ pela transferência da energia do tripleto do Quinifuril para o oxigênio molecular pode ser expressa através da expressão:

$$\frac{d[^1\Delta_g]}{dt} = k_q [T] [O_2] - k_{^1\Delta_g} [^1\Delta_g] \quad (19)$$

onde k_q é a constante de supressão do tripleto do Quinifuril pelo oxigênio; $k_{^1\Delta_g}$ é a constante de decaimento monomolecular do $^1\Delta_g$; e $[O_2]$ é a concentração de oxigênio na solução.

A concentração do estado tripleto $[T]$ do Quinifuril em função do tempo t é:

$$[T] = [T]_0 \exp[-(k_0 + k_q[O_2])t] \quad (20)$$

Como a concentração de oxigênio ($[O_2]$) na solução aquosa ($\cong 10^{-4}$ M) é aproximadamente 10 vezes maior que a concentração utilizada de Quinifuril nas soluções ($\cong 10^{-5}$ M), sua concentração é muito maior que a concentração do estado excitado tripleto $[T]$ do Quinifuril. Deste modo pode-se supor que $[O_2]$ é aproximadamente constante na Expressão (19).

A partir desta aproximação, a concentração de oxigênio singlete ($[^1\Delta_g]$), formado pela excitação do Quinifuril, pode ser escrita em primeira aproximação como:

$$[^1\Delta_g] = \frac{k_q[O_2][T_0]}{k_{^1\Delta_g}[-(k_0 + k_q[O_2])]} \left\{ \exp[-(k_0 + k_q[O_2])t] - \exp(-k_{^1\Delta_g}t) \right\} \quad (21)$$

onde o primeiro termo exponencial ($\exp[-(k_0 + k_q[O_2])t]$) está associado à formação do $^1\Delta_g$, devido à transferencia de energia do tripleto do Quinifuril para o oxigênio; e o segundo termo exponencial ($\exp(-k_{^1\Delta_g}t)$) está associado ao decaimento do $^1\Delta_g$. A Expressão (21) reflete o comportamento dos dados experimentais observados (Fig. 6.3C).

Os tempos de vida do $^1\Delta_g$ ($\tau_{\Delta_g} = \frac{1}{k_{^1\Delta_g}}$) em ambos solventes foram calculados pelos ajustes dos perfis da fosforescência através da Expressão (21) e aplicadas aos dados das Figuras 6.3A e 6.3C. Os dados obtidos para os tempos de vida do $^1\Delta_g$ foram 74,7 μ s em acetonitrila e 3,5 μ s em água e estão em torno dos valores descritos na literatura [Frimer, 1985; Dolphin, 1994; Bonnett, 2000].

Figura 6.3 – (A) Perfis da emissão de fosforescência do $^1\Delta_g$ induzida pela excitação por pulso de laser (385 nm) da solução de Quinifuril (20 μM) em acetonitrila monitorados em comprimentos de onda variados. **(B)** Distribuição das intensidades de emissão de fosforescência (Fig. A, seta). O ajuste gaussiano (linha sólida) mostra o máximo em 1280 nm. **(C)** Perfil representativo da emissão de fosforescência (1280 nm) do $^1\Delta_g$, induzida pela excitação (385 nm) do Quinifuril (20 μM) em solução aquosa e o ajuste através da Expressão (21) (linha tracejada). Condições- 10 μL de solução de Quinifuril dissolvidos em 2 mL de acetonitrila (Fig.A e B) ou água milli-Q (Fig.C). A fosforescência foi monitorada à temperatura ambiente (22°C) utilizando um espectrofotômetro Edinburgh F900.

O rendimento quântico de produção de $^1\Delta_g$ ($\Phi_{^1\Delta_g}^Q$), devido à excitação do Quinifuril em solução aquosa, foi obtido se utilizando a porfirina *meso-tetrakis p-sulfonatofenil* (TPPS₄) como um padrão. O rendimento quântico do Quinifuril foi calculado como:

$$\Phi_{^1\Delta_g}^Q = \Phi_{^1\Delta_g}^P \frac{I_Q}{I_P} \frac{A_{396}^P}{A_{396}^Q} \quad (22)$$

onde $\Phi_{^1\Delta_g}^Q$ e $\Phi_{^1\Delta_g}^P$ são os rendimentos quânticos de $^1\Delta_g$ resultando da excitação do Quinifuril e do padrão ($\Phi_{^1\Delta_g}^P = 0,62$ [Mosinger e Micka, 1997]). I_P e A_{396}^P , e I_Q e A_{396}^Q são as intensidades de fosforescência em 1280 nm e da absorção óptica da porfirina e do Quinifuril em 396 nm, respectivamente. O rendimento quântico obtido foi $\Phi_{^1\Delta_g}^Q = 0,29 \pm 0,03$ ($P < 0,001$).

Observou-se anteriormente que a presença dos agregados de SDS-Quinifuril diminui o tempo de vida do tripleto do Quinifuril. Para se verificar qualitativamente a influência da presença dos agregados sobre a produção de $^1\Delta_g$, realizou-se medidas da emissão de fosforescência para amostras idênticas de Quinifuril (20 μ M) nas seguintes condições: (a) apenas em solução aquosa; (b) na presença dos agregados de SDS-Quinifuril após a fase "log"; e (c) na presença de micelas de SDS (20 mM). A **Figura 6.4** mostra os perfis representativos da emissão da fosforescência da amostra em solução aquosa apenas e na presença dos agregados (2 mM de SDS). Observou-se que a intensidade de emissão de fosforescência na presença dos agregados decai mais de 5 vezes quando comparada com a intensidade do sinal em solução aquosa, indicando que a produção de $^1\Delta_g$ é diminuída em mais de 80% na presença dos agregados. Na presença de micelas formadas de SDS (20 mM) não se observou diferenças apreciáveis na intensidade de emissão da fosforescência em relação a solução aquosa, indicando que na presença das micelas a produção de $^1\Delta_g$ não é alterada (dado não mostrado).

Figura 6.4 - Perfis normalizados da emissão da fosforescência do $^1\Delta_g$ do Quinifuril (20 μM) em solução aquosa (**a**) e na presença de agregados de SDS-Quinifuril (**b**) formados por 2mM de SDS. A excitação foi realizada por pulso de laser (385 nm) e a fosforescência foi monitorada em 1280 nm à temperatura ambiente (22°C) utilizando um espectrofotômetro Edinburgh F900.

6.3 - FORMAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO•) DEVIDO À FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

A liberação do radical livre estável óxido nítrico (NO•) induzido pela fotólise do Quinifuril baseou-se no ensaio fluorimétrico da reação da sonda não fluorescente *2,3-diaminonaftaleno* (DAN) com o nitrito (NaNO₂) resultando no produto fluorescente *1-(H)-naftotriazole* (NAT) [Misko et al., 1993], devido à reação de fechamento do anel do DAN. A reação ocorre em meio ácido (pH 1):

Os experimentos iniciaram-se pela curvas de calibração de uma amostra de DAN (0,32 mM) onde se titulou nitrito em diversas concentrações. A intensidade de emissão de fluorescência (máximo em 407nm (I_{407})) do NAT ligado ao nitrito (NAT/NaNO₂) é proporcional à concentração de NaNO₂ na solução. A **Figura 6.4A** mostra os espectros de fluorescência do NAT na presença de NaNO₂. A proporcionalidade entre a concentração de nitrito formado ($[\text{NaNO}_2]$) e a intensidade de fluorescência em 407 nm (I_{407}) é evidenciada pela regressão linear entre estas quantidades (**Figura 6.4B**), de onde se obteve a relação:

$$[\text{NaNO}_2] = (I_{407} / (5,52 \pm 0,13) \times 10^{+8}) \text{ M} \quad (23)$$

A **Figura 6.5A** mostra um exemplo representativo da irradiação do Quinifuril na presença do DAN para a detecção de nitrito na solução, formado pela fotodecomposição do composto. Observou-se que a absorção da solução aquosa de Quinifuril (24,3 μM) sofreu um deslocamento batocrômico (396→406 nm) após a adição do DAN (concentração final 0,03 mM), devido a queda do pH da amostra de 6 para 1. O deslocamento da posição do pico de absorção do Quinifuril foi acompanhada por um discreto aumento na absorbância (de 0,6 para 0,7), devido à protonação do composto. A irradiação da amostra com luz (350-450 nm) resultou na fotólise do Quinifuril, monitorada em 406 nm. Após a total fotólise do Quinifuril, a mistura foi

incubada por 10 minutos no escuro e em seguida adicionou-se NaOH para a estabilização do NAT em pH 11. Mediu-se a fluorescência da amostra (**Fig. 6.5B**), monitorada na região espectral 375-550 nm, com excitação em 375 nm. Experimentos similares foram realizados em soluções deaeradas de Quinifuril contendo DAN. O perfil da fluorescência e o rendimento de produção do $\text{NO}^{\bullet}$ foram similares ao obtidos na presença de ar.

Figura 6.4 - (A) Espectros de fluorescência do NAT/NaNO₂ ($\lambda_{\text{exc}} = 375\text{nm}$) para diferentes concentrações de nitrito; **(B)** Curva de calibração de I_{407} versus [NaNO₂]. O fator de calibração $(5,52 \pm 0,13) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ foi calculado através do ajuste linear.

Observou-se que os espectros de fluorescência mostrado na **Fig. 6.5** são similares ao da **Fig. 6.4**, indicando que a reação que ocorre é de fato devido à presença do nitrito na solução, liberado durante a fotodecomposição do Quinifuril. Observou-se adicionalmente que amostras de DAN irradiadas por 10 min não fluorescem e também que amostras de Quinifuril contendo DAN e mantidas no escuro pelo mesmo tempo também não fluorescem (dados não mostrados). Estes resultados indicam que a fotodecomposição do Quinifuril é a única fonte de nitrito (NO_2^-), onde a formação do NO_2^- pode resultar da oxidação do $\text{NO}^\bullet$ pelo oxigênio molecular em solução aquosa [Francis et al., 1996]. Como o nitrito em solução ácida ($\text{pH} < 2$) se transforma em $\text{NO}^\bullet$ [Beckman, 1996] e, deste modo, considerou-se que estas medidas são representativas da produção de $\text{NO}^\bullet$ devido a fotodecomposição do Quinifuril.

A reação total de fotólise do Quinifuril (RNO_2) com a formação de nitrito, sendo o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) um produto intermediário, pode ser resumida através de:

A concentração de nitrito liberado pela fotólise de $24,3 \mu\text{M}$ de Quinifuril na presença de DAN (**Figura 6.5**) foi estimada em $11,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$ em solução aerada e em $10,4 \pm 1,8 \mu\text{M}$ em solução deaerada. Nestas estimativas utilizou-se a Expressão **(23)** e as intensidades da fluorescência em 407 nm. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

Destes dados, calculou-se o rendimento de produção do nitrito (Φ_{NO}^Q):

$$\Phi_{\text{NO}}^Q = \frac{M_{\text{NO}}}{M_Q} \quad (26)$$

onde M_{NO} e M_Q são as massas de nitrito formado e Quinifuril consumido, respectivamente. Obteve-se que o rendimento de formação de nitrito devido à fotodecomposição do Quinifuril foi de **(0,45 ± 0,05) mol NO_2^- /mol Quinifuril** e não depende da presença do oxigênio.

Figura 6.5 - (A) Espectros de absorção de 24,3 μM de Quinifuril em solução aquosa pH 6 (●). A adição de 0,03 mM DAN causou a queda do pH de 6 para 1, com conseqüente deslocamento batocrômico da absorção do Quinifuril (396 $\rightarrow$ 406 nm). A irradiação da amostra por 480 s causou a fotólise do Quinifuril até sua completa extinção. **(B)** Espectros representativos da emissão fluorescente do NAT ($\text{DAN} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NAT}$), com máximo em 407 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 375$ nm). Os espectros foram obtidos após a completa fotólise da solução de Quinifuril na presença de DAN para a amostra aerada (linha sólida) e deaerada (linha tracejada).

Para se verificar qual espécie química é realmente liberada durante a fotólise do Quinifuril, utilizou-se o método baseado na reação quimioluminescente entre o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e o ozônio (O_3) resultando na formação do radical transiente dióxido de nitrogênio (NO_2^*). Deste modo, o óxido nítrico pode ser medido diretamente através da reação entre o $\text{NO}^\bullet$ e o ozônio [Sievers, 1997]:

O radical NO_2^* , formado na reação (27), se encontra num estado eletrônico excitado e sua desexcitação é acompanhada da emissão de quimioluminescência (reação 28) na região do vermelho ($>600 \text{ nm}$). As medidas foram realizadas utilizando o aparato NO-Analyzer (SIEVERS mod. 280), onde a reação quimioluminescente ocorre num sistema fechado, composto por uma cuba de reação, onde o $\text{NO}^\bullet$ eventualmente formado é transportado por arraste de um fluxo de gás nitrogênio para a câmara de reação quimioluminescente ($\cong 20 \text{ mL}$), onde se encontra o ozônio. Esta câmara possui uma janela óptica ligada a um tubo fotomultiplicador, que captura e amplifica proporcionalmente os fótons eventualmente emitidos em um sinal elétrico (da ordem de milivolts) [Sievers, 1997].

Os experimentos iniciaram-se com a calibração prévia do NO-Analyzer, onde se titulou nitrito em quantidades conhecidas (entre 0-300 pmols) na cuba de reação contendo 1,0 mL de iodeto de sódio (0,3 M) e 6,0 mL de ácido acético glacial. O gás $\text{NO}^\bullet$ é formado da reação $\text{NaI} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}^\bullet (\text{gás}) + \text{I}^-$ e arrastado para a câmara quimioluminescente e quantificado. A **Figura 6.6A** mostra um experimento representativo de calibração, onde se observa que cada adição de nitrito (em triplicata) provocou pulsos de quimioluminescência, onde a área do pulso é proporcional à quantidade de nitrito adicionado. A área sob a curva dos pulsos (em $\text{mV} \times \text{s}$) é proporcional à quantidade de nitrito adicionada. Observou-se que a área dos pulsos é linearmente proporcional à quantidade de nitrito, com constante de proporcionalidade de $(1,38 \pm 0,2) \times 10^{11} \text{ mV} \times \text{s/mol}$ ($P < 0,0001$) (**Figura 6.6B**).

Figura 6.6 – (A) Pulsos de quimioluminescência do NO_2^* formado da seqüência de reações: $\text{NO}_2^- + \text{NaI} \rightarrow \text{NO}^*$; $\text{NO}^* + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* + \text{O}_2$; e $\text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$. A injeção de nitrito produziu os pulsos na câmara de reação quimioluminescente, de área medida em $\text{mV} \times \text{s}$, em função de $[\text{nitrito}]$. **(B)** Dependência da área dos pulsos com a quantidade de nitrito injetado - curva de calibração. O ajuste (linha sólida) forneceu a constante de proporcionalidade $(1,38 \pm 0,2) \times 10^{11} \text{ mV} \times \text{s/mol}$ de nitrito.

A **Figura 6.7A** mostra a liberação do NO[•], medida através da emissão de sua quimioluminescência, durante irradiação por 1800 s de diferentes amostras do Quinifuril. Observou-se que a intensidade do sinal inicial de quimioluminescência é linearmente proporcional à concentração inicial do composto e que a irradiação contínua do composto induz a liberação contínua de NO[•]. Esta medida da liberação de NO[•] através deste sistema é realizada em tempo real.

A **Figura 6.7B** mostra um experimento análogo ao anterior onde a irradiação do Quinifuril (138 nmol) foi realizada até o consumo completo do composto por fotodecomposição. A produção do NO₂^{*} medido por estes experimentos foi considerada como sendo equivalente à produção do óxido nítrico NO[•]. O rendimento de produção de NO[•] foi avaliado pela área sob a curva (**Fig. 6.7B**) e obtido o valor de 240000 mV×sec. Através da constante de proporcionalidade ($1,38 \times 10^{11}$ mV×s/mol), obtida da curva de calibração (**Figura 6.6B**), pode-se avaliar que a produção de NO[•] foi de $61,8 \pm 10$ nmol.

Como a quantidade de Quinifuril consumida nesta reação foi de 138 nmol, pode-se concluir que o rendimento específico de NO[•] durante a fotólise de Quinifuril foi de (0.45 ± 0.07) mol NO[•]/mol Quinifuril, calculado através da Expressão (26). Este valor coincide com o valor obtido anteriormente nos experimentos de fluorescência com a sonda DAN/NAT. Deste modo pode-se inferir que somente o NO[•] foi produzido durante a fotodecomposição do Quinifuril e não o nitrito (NO₂⁻).

Figura 6.7 – A quimioluminescência do NO_2^* , formado pela reação com o NO^* liberado da fotodecomposição do Quinifuril, com o ozônio (reações **27** e **28**), medida pelo aparato NOAnalyzer. **(A)** Perfis das curvas cinéticas de liberação de NO^* para diversas concentrações de Quinifuril (a-2,7; b-5,5; c-11; d-21 μM) irradiadas por 1800 s. Observa-se que a amplitude do sinal (em $\text{mV}\times\text{s}$) quando se inicia a irradiação (seta) é proporcionalmente linear à [Quinifuril]. **(B)** Irradiação de uma amostra de Quinifuril (138 nmol) até a completa extinção do composto. O cálculo da área sob a curva (hachurada) indicou a produção de $61,8\pm 10$ nmol de NO^* , com rendimento de 45 ± 7 %.

6.4 – FOTORELAXAMENTO DO MÚSCULO ANOCOCCÍGEO DE RATOS PELA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

Também foi utilizado um teste biológico para se determinar a liberação do NO• induzido pela fotólise do Quinifuril.

Este teste consistiu na medida do relaxamento do músculo liso de rato anococcígeo isolado, pré-contraído com fenilefrina. Escolheu-se esta preparação biológica pois o músculo é extremamente delgado ($\cong 0,2$ mm), apresenta respostas de fotorelaxamento mínimas na presença de inibidores da NO-sintase e apresenta muita sensibilidade ao NO• [Gillespie et al., 1990]. Além disso, as respostas de relaxamento apresentadas pelo músculo anococcígeo são rápidas, reversíveis e de fácil quantificação.

Os músculos foram extraídos de ratos e posicionados do aparato de medidas de tensões isométricas imersos em líquido nutritivo de Krebs. Após o período de estabilização do músculo ($\cong 1$ h), início-se o período de aquisição dos dados de relaxamento. Para isto, adicionou-se $0,3 \mu\text{M}$ de fenilefrina para induzir a contração dos músculos, atingindo o platô de contração em 4-6 min. Uma vez estabilizada a contração, os músculos foram iluminados na região espectral 350-450 nm por pulsos de luz de 10 s de duração. O procedimento foi repetido três vezes. A seguir o Quinifuril foi adicionado à cuba em concentrações pré-determinadas. Os músculos foram incubados com Quinifuril por 5 min no escuro e nenhum relaxamento foi observado neste período (dados não mostrados). Após este período, iniciou-se a irradiação dos músculos na presença de diversas concentrações de Quinifuril em três seções de 10 s cada, intercaladas por 60 s de descanso entre as irradiações.

A **Figura 6.8A** mostra registros representativos do relaxamento do músculo anococcígeo induzido por 10 s de irradiação de diferentes concentrações de Quinifuril (10-1000 nM). Observou-se que as respostas dos músculos aos estímulos luminosos (setas) foram imediatas e que a amplitude do relaxamento foi proporcional à concentração do Quinifuril presente no banho.

Figura 6.8 – (A) Pulsos de relaxamento (em grama-força) do músculo liso anococcígeo pré-contraído por 0,3 μ M de feniliefrina, devido à irradiação da solução contendo diferentes concentrações de Quinifuril. As setas indicam o início da irradiação (10 s). O sistema foi calibrado com massas de 1 g e 2 g. **(B)** Dependência da amplitude do relaxamento muscular induzido pela irradiação de diferentes concentrações de Quinifuril. Observa-se que 10 nM de Quinifuril induziu um relaxamento de 15 % e a saturação do relaxamento (82 %) foi obtida com 1 μ M.

A **Figura 6.8B** mostra a relação entre a concentração de Quinifuril na solução e a magnitude do relaxamento muscular induzido pela irradiação. Observou-se que para 10 nM de Quinifuril a irradiação luminosa foi capaz de induzir 15% de fotorelaxamento do músculo anococcígeo e a máxima amplitude de fotorelaxamento (82 %) foi obtida com 1 μ M de Quinifuril.

Observou-se que na presença de 10 μ M de ODQ (*1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*), um inibidor da ação do NO $\cdot$, o fotorelaxamento foi abolido, indicando que este fotorelaxamento exibe propriedades farmacológicas idênticas aos produzidos pelo NO $\cdot$ (dados não mostrados).

Conseqüentemente, inferiu-se que a irradiação luminosa do Quinifuril esta associada à produção do NO $\cdot$ e que o Quinifuril apresenta a propriedade farmacológica de induzir o fotorelaxamento sob irradiação.

6.5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O Quinifuril é um composto que se degrada ao ser irradiado por luz visível [Borissevitch et al., 2003]. Neste Capítulo mostrou-se que as espécies reativas ânion superóxido, oxigênio singlete e óxido nítrico são produzidas durante a fotoativação do Quinifuril com luz visível. A formação destas espécies reativas é crucial para o uso do fotossensibilizador em TFD.

A formação das espécies reativas $O_2^{\bullet-}$ e $^1\Delta_g$ foram previstas pelo modelo de fotodecomposição do Quinifuril como sendo produtos da sua fotólise [Borissevitch et al., 2003]. O modelo previu que o $O_2^{\bullet-}$ seja formado através da interação do estado fundamental do composto com seu estado excitado tripleto na presença do oxigênio molecular (fototransformação **FT₅**):

O modelo também previu que o $^1\Delta_g$ seja formado pela transição da energia do estado tripleto do Quinifuril para o oxigênio molecular (**FT₆**):

O fato de que os produtos finais da fotólise do Quinifuril não possuírem toxicidade contra linhagens celulares evidencia que espécies intermediárias devem as responsáveis pela toxicidade do composto. As espécies $NO^{\bullet}$, $^1\Delta_g$ e $O_2^{\bullet-}$, cuja formação foram demonstradas neste Capítulo, podem ser responsáveis pela fotocitotoxicidade do composto uma vez que sua citotoxicidade contra algumas linhagens celulares na presença de luz é aumentada em aproximadamente 10 vezes [Daghastanli et al., 2004a; Daghastanli et al., 2004b] quando comparada com a mesma propriedade no escuro [Rossa et al., 2003].

A fotocitotoxicidade do Quinifuril, induzida por sua fotodecomposição, pode ser entendida ao se considerar que estas espécies reativas podem induzir o *stress* oxidativo nas células, resultando em altos níveis de danos celulares, no qual a integridade da membrana celular é perdida, ou mesmo

induzindo a lise das células. Todos estes eventos têm como resultado a morte ou inativação celular. A presença destas espécies reativas *per se* já poderiam explicar os efeitos tóxicos do composto, mas deve-se também observar que na presença simultânea de $\text{NO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ há a produção de peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$), um potente oxidante, o que poderia aumentar este efeito tóxico [Murphy, 1999; Miranda et al., 2000]. Estes efeitos sinérgicos entre as espécies reativas poderiam explicar os efeitos de morte ou inibição celular induzido pelo Quinifuril ao ser irradiado.

Capítulo 7

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta Tese teve por objetivo o estudo de algumas propriedades físicas e químicas do Quinifuril mediadas pela luz visível que podem estar associadas à sua ação biológica e lançar novas bases de conhecimento para a sua eventual utilização em terapias, em particular a fotoquimioterapia.

O Quinifuril é um composto nitroheterocíclico que apresenta propriedades bactericidas, fungicidas e anti-cancerígenas e que absorve luz na região visível. Supõe-se que certas propriedades biológicas do composto são mediadas por sua interação com a luz, tais como sua ação deletéria de indução de anemias hemolíticas e benéficas como sua bem entendida ação citotóxica no escuro.

O processo de fotodecomposição do Quinifuril é acelerado na ausência de oxigênio. Este efeito pode vir a ser importante no tratamento de células hipóxias ou mesmo anóxias, uma vez que se mostrou que mesmo nesta condição anaeróbica existe a produção de óxido nítrico NO[•], uma espécie reativa que pode produzir danos nas células tumorais [Tocher, 1997; Wink e Mitchell, 1998; Wink et al., 1998], uma vez que a presença do oxigênio no meio tumoral é essencial para a eficiência terapêutica dos tratamentos em TFD com o uso dos atuais fotossensibilizadores [Jori, 1996; Ochsner, 1997; Bonnett, 2001; Allison et al., 2004]. A ação em meios anaeróbicos dos nitrocompostos tem sido descrita [Biaglow et al., 1986], mas esta ação estava conectada com a redução metabólica do nitro-grupo [Muller, 1986].

Neste trabalho mostrou-se que a ação citotóxica do Quinifuril é aumentada na presença da luz, inclusive sendo favorecida em meios anaeróbicos, devido à sua mais rápida fotodecomposição nestes meios. Os dados obtidos são os primeiros a indicar a fotocitotoxicidade de um composto nitroheterocíclico e demonstraram a possibilidade de sua aplicação como droga fotossensibilizadora em fotoquimioterapia.

Determinou-se que o tripleto do Quinifuril possui tempo de vida da ordem de 2 μ s na presença de ar e energia de 18200 cm⁻¹ (218 kJmol⁻¹) e mostrou-se que a fotoativação do Quinifuril produz o ¹ Δ_g . Isto pode ser

entendido uma vez que esta energia de tripleto ultrapassa em mais de duas vezes a energia necessária para a produção do $^1\Delta_g$ (94 kJmol⁻¹) pelo mecanismo do Tipo II. Estes dados indicam que o composto possui características adequadas para ser considerado um eficiente fotossensibilizador [Ochsner, 1997; Bonnett, 2000].

A utilização do Quinifuril como fotossensibilizador em fotoquimioterapia em princípio poderia ser limitada pela sua absorção em 396 nm, fora da janela terapêutica (600-800 nm). Esta séria limitação poderia ser contornada através do seu uso contra cânceres de pele, dermatites, fungos, micoses ou através da eventual mudança de sua estrutura química, com o aumento de sua cadeia de π -conjugação, com conseqüente deslocamento de sua banda de absorção para maiores comprimentos de onda. O uso de sistemas carregadores de drogas ("*drug delivery*"), tais como os lipossomos, microesferas ou hidrogéis, poderia ser uma alternativa de grande valia na utilização terapêutica do Quinifuril e que merece uma atenção futura.

Por outro lado, a limitação de sua absorção em 396 nm poderia ser minimizada ao se considerar que a fotoativação do composto libera não somente o $^1\Delta_g$ mas também outras duas espécies reativas: $O_2^{\bullet-}$ e $NO^{\bullet}$, três espécies que induzem a morte celular. O $NO^{\bullet}$ é uma espécie reativa que exige, aparentemente, uma grande energia para ser liberada, uma vez que os compostos doadores de $NO^{\bullet}$ pesquisados atualmente, como os complexos de rutênio, devem absorver na região do ultravioleta (≤ 350 nm) para a liberação do $NO^{\bullet}$.

Outro achado experimental que merecerá atenção futura será a indução do relaxamento muscular que poderá ser adequadamente explorado para eventuais usos em terapias de distúrbios vasculares, cerebrais ou cardíacas, através do uso do composto em medicamentos de liberação controlada.

BIBLIOGRAFIA

- Allison**, R.R.; Downie, G.H.; Cuenca, R.; Hu, X-H.; Childs, C.J.H.; Sibata, C.H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**:27-42.
- ATCC** (2005): <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/> (acesso em março/2005).
- Beckman**, J.S. (1996). The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: Lancaster, J. (ed.). *Nitric oxide. Principles and actions*. Academic Press.
- Biaglow**, J.E.; Varnes ME; Roizentowle L, Clark, E.P.; Epp, E.R.; Astor, M.B.; Hall, E.J. (1986). Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. *Biochem. Pharmacol* **35** (1): 77-90.
- Bonnett**, R. (2000). *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Advanced chemistry text. Gordon & Breach Sci. Publisher.
- Bonnett**, R. (2001). Photobleaching of sensitizers used in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron* **57**:9513-9547.
- Borisevitch**, Ye.E.; Degterev, I.A. (1992). Biological and phototransformation of nitrofurylvynil quinoline derivatives, interconnection with biological activity, the problem and probability of therapeutic effectiveness improvement. *J. Chem. Biochem. Kinetics*, **2**:(4) 259-265.
- Borissevitch**, I.E.; Borges, C.P.F.; Borissevitch, G.P.; Yushmanov, V.E.; Louro, S.R.W. (1996). Binding and location of dipyrindamole derivatives in micelles: the role of drug molecular structure and charge. *Zeitschrift Fur Naturforschung C - Journal of Biosciences*, **51**(c):578-590.
- Borissevitch**, I.E., Daghashtanli, N.A.; Degterev, I.A. (2003). Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furyl)ethenyl-4-[N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline - Effect of oxygen and compound concentration. *J. Photochem. Photobiol. A-Chemistry* **159** (3): 213-217.
- Bourre**, L.; Thibaut S.; Briffaud, A.; Rousset, N.; Eleouet, S.; Lajat, Y.; Patrice, T. (2002). Indirect detection of photosensitizer ex vivo. *J. Photochem. Photobiol B*: **67**:23-31.
- Buzukov**, A.A.; Il'asova, V.B.; Tabak, M.; Meirelles, N.C.; Degterev, I.A. (1996). An ESR and spectrophotometric study of the denitration of nitroheterocyclic drugs by liver homogenates and their metabolic consumption by liver microsomes from cytochrome P-450-induced mice. *Chem.-Biol. Interact.*, **100**:113-124.
- Cadenas**, E.; Sies, H. (1984). Low-level chemiluminescence as a indicator of singlet oxygen in biological systems. *Methods in Enzimology*, **105**:221-231.

- Calvert**, J.G.; Pitts, J.N. (1966). Photochemistry (1st ed.). John Willey&Sons Pub. EUA.
- Campbell**, I.D.; Dwek, R.A. (1984). Biological Spectroscopy (1st ed.). The Benjamin/Cummings Pub. Co. Menlo Park, NY.
- Cox**, B.G. (1994). Modern liquid phase kinetics (1st ed.). 93 pp.Oxford Univ. Press.
- Daghastanli** N.A., Rossa M.M., Selistre-de-Araujo H.S., Tedesco, A.C., Borissevitch, I.A.; Degterev, I. A. (2004a). Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light. J. Photochem. Photobiol B-Biology, **75**:27-32.
- Daghastanli**, N.A.; Degterev, I.A.; Tedesco, A.C.; Borissevitch, I.E. (2004b). Photocytotoxicity of a 5-nitrofuranethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells. Brazilian Journal of Medical & Biological Research **37**(12):1873-1879.
- Degterev**, I.A.; Tatarskaya, N.K.; Zaikov, G.E. (1989). Mechanism of Biological Nitrofurans Transformation in Microsomes with Special Reference to Quinifur - Kinetic-Study. Khim Farm ZH+ **23** (5):530-537.
- Degterev**, I.A.; Buzukov, A.A.; Tatarskaya, N.K.; Leonova, Y.Y.; Sukhova, N.M. (1990). Metabolism of Heterocyclic-compounds in mice Liver-microsomes. (Russian) Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal **24**(9): 9-16.
- Degterev**, I.A.; Tatarskaya, N.K.; Zaikov, G.E. (1993). Kinetics and mechanism of microsomal metabolism of nitroheterocyclic compounds - 5-nitrofur and 1-nitroacridine derivatives - and relationship with biological activity of these compounds. In: Todorov IN, Degterev IA, Zaikov GE (eds.) Bioactive Compounds: Biotransformation and Biological Action. New York: NOVA Science Pub., pp155-200.
- Degterev**, I.A.; Grijalba, M.T.; Vercesi, A.E. (1997). Nitroheterocyclic antibiotics (NHCA) produce peroxynitrite during metabolism in liver microsomes. FASEB J, **11**(9): A1310-A1310 Suppl. S.
- Degterev**, I.A.; Nogueira, P.C.L.; Marsaioli, A.J.; Vercesi, A.E. (1999a). Microsomal metabolism of quinifuryl - a nitrofuryl-ethenyl-quinolone antiseptic possessing antitumor activity in vitro. Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokin. **24**(1):15-22.
- Degterev**, I.A.; Wajnberg, E.; Louro, S.R.W.; Vercesi, A.E. (1999b). Simultaneous formation of nitric oxide, superoxide anion and peroxynitrite during microsomal metabolism of nitroheterocyclic antibiotics. FASEB J. **13**(7):A1457-A1457, Suppl. S.
- Dolphin**, D. (1994). Photomedicine and photodynamic therapy. Can. J. Chem. **72**:1005-1013.

- Ferreira**, S.M.; Lerner, S.F.; Brunzini, R.; Evelson, P.A.; Llesuy, S.F. (2004). Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am. J. Ophthalmol.* **137**(1):62-9.
- Foley**, M.S.C.; Beeby, A.; Parker, A.W.; Bishop, S.M.; Phillips, D. (1997). Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthalocyanines bound to human serum albumin. *J. Photochem Photobiol B-Biology* **38**(1):10-17, 1997.
- Foot**, C.S. (1991). Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* **54**(5):659.
- Foster**, H.D.; Hoffer, A. (2004). Schizophrenia and cancer: the adrenochrome balanced morphism -Review. *Med Hypotheses*. **62**(3): 415-419.
- Francis**, T. Bonner; Geoffrey Stedman (1996). The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In: Feelisch, M.; Stamler, J.S. (eds). *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley&Sons. Chichester, England.
- Franks**, L.M.; Teich, N. *Introdução a biologia celular e molecular do câncer* (1ª ed., 1990). Ed. Rocca (Brasil).
- Freshney**, R.I. (1994). Measurement of viability and cytotoxicity. In: *Culture of animal cells* (3rd ed.). Wiley-Liss Inc.
- Frimer**, A.A. (1985). Singlet Oxygen. *Physical-Chemical Aspects*, vol. I, p.183.
- Garavito**, R.M.; Ferguson-Miller, S. (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. *Journal Of Biological Chemistry* **276**(35):32403-32406.
- Gillespie**, J.S.; Liu, X.; Martin, W. (1990). The neurotransmitter of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of genital system. In: Moncada, S. Higgs, E.A. (eds.). *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory systems*. Elsevier Sci. Publ.
- Halliwell**, B.; Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals in catalytic ions in human diseases: an overview. *Methods in Enzymology*, **186**:1-9.
- Henderson**, B.W.; Dougerthy, T.R. (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*, **55**: 145-157.
- Hoffer**, A. (1998). *Vitamin B₃ and Schizophrenia: discovery, recovery, controversy*. Quarry Press, Kingston, Ont.
- Hogg**, N.; Kalyanaraman, B. (1999). Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* **1411**: 378-384.
- Ierardi**, D.F.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. (2002). Erythrocyte ghost cell-alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies. *Biochim. Biophys Acta-Biomembranes* **1567**:183-192.
- Jager**, L.P.; de Graaf, G.J.; Widjaja-Greefkes, A.H.C. (1997). Differential effects of nitrofurans on the production/release of steroid hormones by porcine adrenocortical cells in vitro. *Eur. J. Pharm.* **331**(2-3): 325-331.

- Jori, G.** (1996). Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of PDT. *J Photochem Photobiol B* **36**:87-93.
- Kaltenbach, J.P.; Kaltenbach, M.H.; Lyons, W.B.** (1958). Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Experimental Cell Research*, **15**: 112-117.
- Kemp, T.J.; Martins, J.A.** (1981). Triplet-state of 5-nitro-2-furoic acid by laser flash-photolysis—spectrum, lifetime and reactivity. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **77**:1425–1435.
- Kerwin, J.F.; Lancaster, J.R.; Feldman, P.L.** (1995). Nitric-Oxide - A New Paradigm for 2nd-Messengers. *J. Med. Chem.* **38**(22): 4343-4362.
- Kochevar, I.E.; Lambert, .CR. Lynch, M.C.; Tedesco, A.C.** (1996). Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1280: **223**-230.
- Korbelik, M.; Parkins, C.S.; Shibuya, H.; Cecic, I.; Stratford, M.R.L.; Chaplin, D.J.** (2000). Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Brit. J. Cancer* **82**:(11) 835-1843.
- Kroncke, K.D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V.** (1997). Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection-How, Why, When, and Where? *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1**(2):107-112.
- Lunardi, C.N.; Bonilha, J.B.S.; Tedesco, A.C.** (2002). Stern-Volmer quenching and binding constants of 10-alkyl-9(10H)-acridone probes in SDS and BSA. *Journal Of Luminescence* **99** (1):61-71.
- Maeda, H; Akaike, T** (1998). Review: nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)*, **63**:854-865.
- Maiti, N.C.; Mazumdar, S., Periasamy, N.** (1998). J- and H- aggregates of porphyrin-surfactant complexes: time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies. *J. Phys. Chem. B* **102**(9):1528–1538.
- Makareyeva, I.N.; Lozovskaya, Ye.L.; Tatikolov, A.S.; Sapezhinskii, I.I.** (1997). Photosensitizing properties and anti-oxidant activity of furagin, an antimicrobial medicinal, a nitrofur derivative. *Biophysics* **42**(2):461-467.
- Makings, L. R.; Tsien, R.Y.** (1994). Caged Nitric Oxide-Stable Organic Molecules from which Nitric Oxide can be Photoreleased. *J. Biol. Chem.* **269**:6282-6285.
- Maxwell, S.R.J.; Lip, G.Y.H.** (1997). Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Br. J. Clin. Pharmacology*, **44**:307-317.
- Merck, ed.** (2001). *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.* 13th Ed., Merck & CO., Inc., Whitehouse Station, NJ, p. 33.
- Miranda, K.M.; Espey, M.G.; Wink, D.A.** (2000). A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* **79**:237-240.

- Misko**, T.P.; Schilling, R.J.; Salvemini, D.; Moore, W.M.; Currie, M.G. (1993). A fluorimetric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem.*, **214**(1): 11-16.
- Moncada**, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. (1991). Nitric-Oxide - Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**:109-142.
- Monks**, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**: 757-766.
- Moore**, D.E. (1987). Flash-photolysis of misonidazole and metronidazole, *Int. J. Radiat. Biol.* **51**:45-51.
- Mosinger**, J.; Micka, Z. (1997). Quantum yields of singlet oxygen of metal complexes of meso-tetrakis (sulfonatophenyl) porphine, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **107**:77-82.
- Mosmann** T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- Muller**, M. (1986). Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem. Pharmacol* 35 (1): 37-41.
- Murphy**, M.P. (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1411**:401-414.
- Neugebauer**, J. (1994). A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry (5thed.). Calbiochem-Novabiochem Int. EUA.
- Ochsner**, M. (1996). Light scattering of human skin: a comparison between zinc(II)-phthalocyanine and Photofrin II. *J Photochem Photobiol B* **32**:3-9.
- Ochsner**, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem Photobiol.B* **39**:1-18.
- Oertel** M, Schastak SI, Tannapfel A, Hermann R, Sack U, Mossner J & Berr F (2003). Novel bacteriochlorine for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in mouse tumour model. *Journal of Photochemistry and Photobiology.B, Biology*, **71**: 1-10.
- Pal**, P.; Zeng, H.; Durocher, G.; Girard, D.; Giasson, R.; Blanchard, L.; Gaboury L.; Villeneuve, L. (1996). Spectroscopic and photophysical properties of some new rhodamine derivatives in cationic, anionic and neutral micelles. *J. Photochem. Photobiol A: Chemistry*, **98**:65-72.
- Pasternack**, R.F.; Gibbs, E.J.; Collings, P.J.; dePaula, J.C., Turzo, L.C.; Terracina, A. (1998). A nonconventional approach to supramolecular formation dynamics. *The*

- kinetics of assembly of DNA-bound porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **120**:5873-5878.
- Piette**, J.; Volanti C.; Vantieghem, A.; Matroule, J.; Habraken, Y.; Agostinis, P. (2003). Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem. Pharmacol.* **66**:651-1659.
- Piveta**, M. (2004). Câncer, esperanças divididas. *Revista Pesquisa – Fapesp* **99**:46-53.
- Ramakrisna Rao**, D.N., Jordan, S., Mason, R.P. (1988). Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, and 2- and 5-nitroimidazoles by rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **37**(15): 2907-2913.
- Rossa**, M.M.; Rocha-e-Silva, T.A.A.; Terruggi, C.H.B.; Tedesco, A.C.; Araujo, H.S.S.; Borissevich, I.E.; Degterev, I.A. (2003). Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. *Pharmac. Res.*, **48**: 369-375.
- Samanta**, A.; Ramachandram, B.; Saroja, G. (1996). An investigation of the triplet state properties of 1,8-naphthalimide: A laser flash photolysis study. *J. Photochem Photobiol A-Chemistry* **101**(1):29-32.
- Sharman**, W.M.; Allen, C.M.; van Lier, J.E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, **11**:507-517.
- Shishido**, S.; de Oliveira, M.G. (1998). Nitric Oxide Release From S-Nitrosothiols and Deamination Reactions. *Proceedings of the IX Biennial Meeting of the International Society For Free Radical Research*, **34**:127.
- Sievers**, ed. (1997). Nitric Oxide Analyser (NOA 280). Operation and Service Manual. Software version 2.05, USA.
- Smirnov**, S.M.; Jurav, M.A.; Tatarskaja, N.K.; Borisevich, Y.E.; Degterev, I.A. (1989). Quinifur photoreduction and nitroanion radical formation. *Chemical Physics*, **8**:1723-1725.
- Smirnov**, S.M.; Tatarskaja, N.K.; Jurav, M.A.; Degterev, I.A.; Borisevich, Yu.E. (1989b). Influence of protonation on spectral properties and rate of primary processes of quinifur phototransformation, *Khimicheskaja Fisika*, **8**:1056-1059 (Russian).
- Suntres**, Z.E.; Shek, P.N. (1992). Nitrofurantoin-Induced Pulmonary Toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **43**(5):1127-1135.
- Suzuki**, N. (1993). Antioxidative Activity of Some Biologically Active Compounds with Active Oxygen Species. *The Spectrum* **6**(4):21-28.
- Tardivo**, P.; Del Giglio, A.; Paschoal, L.H.C.; Ito, A.S.; Baptista, M.S. (2005). Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodyagnostics and Photodynamic Therapy - no prelo.*

- Tocher**, J.H. (1997). Reductive Activation of Nitroheterocyclic Compounds. *Gen. Pharm.* **28**(4): 485-487.
- Turro**, N.J. (1978). *Modern Molecular Photochemistry* (1st ed.). Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA, 628 pp.
- Verovskiy**, V.N.; Degterev, I.A.; Sukhova, N.M.; Buzukov, A.A.; Leonova, E.Yu. (1990). Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic- and nitroheterocyclic compounds. In vitro and in vivo study. *Pharmac. Chem. J.*, **24**:20-24.
- Wink**, D.A.; Mitchell, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.* **25**:(4-5) 434-456.
- Wink**, D.A.; Vodovotz, Y.; Cook, J.A.; Krisna, M.C.; Kim, S.; Coffin, D.; DeGraff, W.; Deluca, A.M.; Liebmann, J. Mitchell, J.B. (1998). The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. *Biochemistry (Moscow)*, **63**(7):802-809.
- Wood**, P.D.; Mutus, B.; Redmond, R.W. (1996). The Mechanism of Photochemical Release of Nitric Oxide from S-Nitrosoglutathione. *Photochem. Photobiol.* **64**:518-524.

Anexo I

1. Breve Histórico do combate ao Câncer

Modernamente pode-se traçar uma linha dos principais avanços no tratamento do câncer:

1850: o biólogo alemão Johanes Mueller mostrou que o câncer era composto de células;

1882: são descobertos o núcleo e a divisão celulares pelo biólogo alemão Walther Flemming.

1890: O inglês Willian Halsted realizou a primeira mastectomia radical contra o câncer de mama.

1903: a inibição do crescimento tumoral através do uso dos Raios-X é descoberto pelo médico alemão George Perthes, que propõe o uso dos R-X para o tratamento do câncer.

1904: primeira cirurgia radical de próstata;

1910: a quimioterapia é iniciada pelo bioquímico alemão Paul Ehrlich, que propôs o uso de drogas anti-sífilis no tratamento de tumores.

1913: a mamografia é criada pelo cirurgião alemão A. Salomen. O rato é usado pelo bioquímico Grib Fibiger como modelo animal de crescimento de tumores.

1919: a dissolução do tecido linfóide e malformação da medula são observadas em soldados expostos ao gás mortarda na I Guerra mundial. Destas observações criaram-se novas drogas quimioterápicas a partir de 1942.

1927: operações bem-sucedidas de nódulos pulmonares.

1928: criado o teste para o diagnostico do câncer de colo de útero pelo médico grego George Papanicolau.

1933: primeira cirurgia de retirada total de um dos pulmões.

1935: inicio da radioterapia, onde são feitos tratamentos de tumores em estágios avançados, sem indicação cirúrgica.

1936: primeira evidência de que alguns tumores são causados por vírus, pelo biólogo americano John Bittner, que mostra que o leite de ratas pode transmitir câncer.

1953: o modelo da estrutura do DNA é descoberto por James Watson e Francis Crick.

1961: anúncio de que todas as formas de câncer resultam de mudanças no DNA das células, por Franck Horsfall. É sugerido que o tumor produz uma substância que promove o crescimento de vasos sanguíneos que alimentam o tumor, por Judah Folkman.

1976: Weishaupt et al. [*apud* Ochsner, 1997] postulou que o oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) é o agente citotóxico responsável pela foto-inativação de células tumorais.

1980-atualmente: início dos estudos com fatores antiangiogênicos, que impedem que o tumor crie a rede de vasos necessários a sua alimentação.

1996: aprovação do uso clínico do Photofrin primeira droga para terapia fotodinâmica.

2. O câncer

Apesar de não ser possível definir o câncer em termos absolutos, ele pode ser razoavelmente definido como uma desordem celular, que muitas vezes se caracteriza através de uma massa de células anormais -o tumor, decorrente de uma série de alterações sofridas pelas células normais ao longo do tempo. Os tumores são reconhecidos pelo fato de que suas células crescem anormalmente. Deste modo, pode-se dizer que as células tumorais diferem das normais por não responderem aos mecanismos de controle, tais como o de crescimento ou de atividade bioquímica. De fato o câncer é um grupo de doenças de origens distintas que têm como efeito a proliferação de suas células de maneira irregular [Franks e Teich, 1990].

As células do câncer invadem os tecidos vizinhos provavelmente através de certas enzimas proteolíticas e sobrevivem a partir das células normais. Crescem no corpo, ocupando o espaço e envolvendo as células normais, provocando hemorragias e infecções. Apresentam alterações dos componentes da superfície celular, tais como antígenos, enzimas e oncogenes. Ele induz a deficiências nutricionais, perda de massa corpórea do hospedeiro e diminui as defesas do organismo.

Os casos mais críticos do câncer ocorrem quando as células cancerosas abandonam seu sítio primário de contaminação -a metástase. A Metástase é contaminação secundária de tecidos normais distantes do foco inicial de câncer. A figura 1 esquematiza um possível processo tumoral, mostrando o surgimento

do câncer (Ca), muitas vezes não detectado visualmente; o crescimento e surgimento do tumor e a formação do tumor clínico, com a proliferação de metástase.

Fig. 1: Esquema de um processo de surgimento, crescimento e proliferação tumoral, através da metástase [Franks e Teich, 1990].

3. Cânceres de maior incidência

É fundamental ter em mente que as células do câncer são células do nosso organismo e a maioria de suas estruturas e funções são similares às nossas. O câncer é classificado segundo a função/localização das células de onde se originam [Cancerquest, 2003]:

a) **Carcinoma e melanoma**: tumor derivado de células epiteliais (delineiam a superfície da pele e órgãos). Representam entre 80 a 90% dos casos de câncer.

b) **Sarcoma**: tumor derivado de músculos, ossos, cartilagens, gorduras ou tecidos conectivos.

c) **Leucemia**: derivado das células brancas do sangue ou suas precursoras. As células que formam as células sanguíneas estão localizadas na medula óssea.

d) **Linfoma**: câncer da medula óssea que afeta o sistema linfático.

e) **Mieloma**: câncer envolvendo as células brancas responsáveis pela produção de anticorpos (linfócitos B).

O sistema linfático é uma grande estrutura de vasos que transporta fluidos e células do sistema imune em todo o corpo. Os linfonodos são centros de coleta do sistema linfático. Células do tumor podem sair do tumor primário e atingir os nodos vizinhos. O sistema linfático é um mecanismo primário para a movimentação do tumor (as metástases) para outras partes do corpo.

O tumor apresenta um conjunto de características que o distinguem das células normais e que permitem a uma única célula formar uma massa tumoral e, eventualmente, metástases. Diversas mudanças ocorrem durante a transformação da célula normal para uma célula capaz de formar o câncer. Todo o câncer tem a capacidade de crescer e se dividir mesmo na ausência de sinais apropriados e/ou na presença de sinais inibidores de crescimento.

Existem mudanças nas propriedades físicas da célula cancerosa em relação à normal, tais como:

- a) Mudanças no citoesqueleto (que alteram a forma como as células do câncer interagem com a vizinhança e alteram sua aparência).
- b) As mudanças no citoesqueleto também afetam a adesão e mobilidade celular. A redução na adesão/mobilidade celular permite a formação de grandes massas tumorais. As células cancerosas não exibem inibição de contato celular e são capazes de crescer "indefinidamente" umas sobre as outras. A pequena adesão das células do câncer permite o espalhamento do tumor.
- c) Mudanças no núcleo: são grandes as alterações na forma e organização do núcleo celular do tumor em relação à célula normal de mesma origem.
- d) Produção enzimática: as células cancerosas secretam enzimas que as permitem invadir tecidos vizinhos.

Bibliografia

1. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. J. Photochem Photobiol.B 39:1-18, 1997.
2. Franks LM e Teich N. Introdução a biologia celular e molecular do câncer (1ª ed., 1990). Ed Rocca.
3. Cancerquest (2003)- <http://www.cancerquest.org/> (acesso em 2003).

Anexo II

Estados energéticos e distribuições eletrônicas de algumas espécies de oxigênio [Halliwell e Gutteridge, 1990].

	$^3\text{O}_2$ estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$)	Estado singlete $^1\Delta_g$	Ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$	Estado singlete $^1\Sigma^+_g$
$\sigma^* 2p$
$\pi^* 2p$
$\pi 2p$
$\sigma 2p$
$\sigma^* 2s$
$\sigma 2s$
$\sigma^* 1s$
$\sigma 1s$

Medidas da absorção do transiente tripleto

Uma vez que o espectro de absorção do estado tripleto é estabelecido, a cinética de decaimento de T_1 pode ser medida através das medidas de absorção. A determinação da variação da absorção no comprimento de onda de análise pode ser obtida da seguinte forma:

$$\begin{array}{ccc}
 I_0 \longrightarrow \boxed{} \longrightarrow I_1 & I_1 = I_0 e^{-A_1} & \\
 I_0 \longrightarrow \boxed{} \longrightarrow I_2 & I_2 = I_0 e^{-A_2} & (1) \\
 \uparrow & & \\
 h\nu_{\text{exc}} & &
 \end{array}$$

em que I_0 é a intensidade do feixe luz atingindo a amostra; I_1 é a intensidade da luz transmitida pela amostra antes do pulso fotolisante, quando a absorção

da amostra é A_1 ; e I_2 é a intensidade da luz transmitida pela amostra após o pulso fotolisante, quando a absorção da amostra é A_2 .

Deste modo, pode-se escrever

$$\frac{I_2}{I_1} = e^{-(A_2-A_1)} = e^{-\Delta A} \quad (2)$$

Escrevendo I_2 como $I_1 - \Delta I$, então:

$$\frac{I_1}{I_1 - \Delta I} = e^{\Delta A} \quad (3)$$

$$\Delta A = \log \frac{I_1}{I_1 - \Delta I} \quad (4)$$

A absorção diferencial ΔA pode ser relacionada com a concentração do fotossensibilizador da seguinte forma, onde ϵ_{SS} é o coeficiente de absorção molar no estado singleto; e ϵ_{TT} é o coeficiente de absorção molar no estado tripleto:

$$A_1 = \epsilon_{SS} C_0 \quad (5)$$

$$A_2 = \epsilon_{SS} (C_0 - C_T) + \epsilon_{TT} C_T = \epsilon_{SS} C_0 + (\epsilon_{TT} - \epsilon_{SS}) C_T \quad (6)$$

$$\Delta A = A_2 - A_1 = (\epsilon_{TT} - \epsilon_{SS}) C_T = k C_T \quad (7)$$

Como a concentração do fotossensibilizador no estado tripleto é transiente:

$$C_T = C_T(t) \quad (8)$$

Finalmente tem-se:

$$\Delta A = k C_T(t) \quad (9)$$

Anexo III

Trabalhos científicos publicados em revistas especializadas durante o período:

- Borissevitch**, I.E., Daghasanli, N.A.; Degterev, I.A. (2003). Primary processes of photodecomposition of 2-(5 '-nitro-2 '-furanyl)ethenyl-4-[N-[4 '-(N,N-diethylamino)-1 '-methylbutyl] carbamoyl} quinoline - Effect of oxygen and compound concentration. J. Photochem. Photobiol. A-Chemistry **159** (3): 213-217.
- Daghasanli** N.A., Rossa M.M., Selistre-de-Araujo H.S., Tedesco, A.C., Borissevitch, I.A.; Degterev, I. A. (2004). Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light. J. Photochem. Photobiol B-Biology, **75**:27-32.
- Daghasanli**, N.A.; Degterev, I.A.; Tedesco, A.C.; Borissevitch, I.E. (2004). Photocytotoxicity of a 5-nitrofuraneethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells. Braz. J. Med. Biol. Res. **37**(12):1873-1879.
- Daghasanli**, n. A.; Ballejo, G.; Borissevitch, I.E. (2003). Photodecomposition of the new photocytotoxic drug quinifuryl produces reactive oxygen and nitrogen species. Braz. J. Pharm. Sci. **39**(2):261 (resumo).

Trabalhos em eventos (Resumo Expandido)

- Daghasanli**, N. A.; Degterev, I.A.; Borissevitch, I.E. (2001). Photodecomposition of an Antiseptic and Radioprotector Drug Quinifuryl: Effect of Oxygen and Surfactant Presence. In: VI International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology- PHARMATECH, 2001, Recife (PE)-Brasil. Proceedings of VI International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology PHARMATECH, **1**:219-220.
- Rocha-e-Silva**, T. A. A. ; Daghasanli, N. A. ; Araujo, H. S. S. ; Tedesco, A.C.; Borissevitch, I.E. ; Degterev, I.A. (2002). Drogas nitroheterocíclicas são agentes que apresentam alta perspectiva para uso em terapia e fototerapia do câncer.. In: Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações, 2002, São Pedro-SP-Brasil. Anais da PDT2002, **1**:131-132.
- Daghasanli**, N. A. ; Borissevitch, Iouri E. (2002). Características de fotoreações de droga derivada de NitrofurilQuinolina na sua interação com sistemas microorganizados. In: Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações, 2002, São Pedro-SP-Brasil. Anais da PDT2002, **1**:39-40.

Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)- 1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline Effect of oxygen and compound concentration

I.E. Borissevitch^{a,*}, N.A. Daghasanli^a, I.A. Degterev^b

^a Departamento de Física e Matemática, Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo,
Av. Bandeirantes 3900, Vila Monte Alegre, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Chemical and Biological Kinetics, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygin Str. 4, 117333 Moscow, Russia

Received 19 November 2002; received in revised form 1 March 2003; accepted 6 March 2003

Abstract

The study of the kinetics of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline (Quinifuryl, Q) was studied using steady-state and time resolved absorption spectroscopy. We detected the formation of the Q triplet state, which is characterized by the absorption maximum at 550 nm, triplet state energy $E_T = 18,200 \pm 500 \text{ cm}^{-1}$ and a decay constant $k_0 = 1.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. This triplet state is quenched by Q molecules in its ground state with the constant $k_{q1} = 2.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and by molecular oxygen with the constant $k_{q2} = 2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The initial rate of Q photodecomposition under continuous irradiation by visible light (V_i) increases when the Q concentration is increased. In air and oxygen saturated solutions V_i is linearly proportional to Q concentration and does not depend on the O_2 concentration. Our kinetic model of the process supposed two ways of Q photodecomposition: the reaction between Q molecules in triplet and ground states and the photodecomposition directly from the Q singlet excited state.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Phototherapy; Nitrofurane derivatives; Photobleaching; Quinifuryl; Triplet state; Quenching by oxygen

1. Introduction

Quinifuryl (Q), 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline, is one of a family of 5-nitrofurane-ethenyl-quinoline drugs (NFEQ) that was synthesized in the early 1970s by Dr. N.M. Sukhova (Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sciences, Riga, Latvia) in a search for antitumor agents. Indeed, these compounds have shown significant toxicity toward various lines of cancer cells [1]. Q possessed the highest cytotoxic activity among these compounds [1,2] and showed radiosensitizing activity in vitro [2]. The compound is in clinical use as antiseptic for the treatment of wounds and burns [3].

Due to the presence of the developed system of conjugated π -electrons in its structure, Q possesses an intense optical absorption in the spectral region $350 < \lambda < 450 \text{ nm}$ ($\epsilon_{396 \text{ nm}} = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at pH 7.0 [1,2]). After

photoirradiation, Q becomes colorless, demonstrating photodecomposition of its chromophore. Recently, we observed significant increase in toxicity of Q toward various lines of cancer cells under illumination with light in the above spectral region (manuscript in preparation) [4]. We believe that this effect is due to the formation of some reactive species in the course of the Q photodecomposition. However, the detailed mechanism of the compound photodecomposition is not clear yet. In the present work we report on the study of the Q photodecomposition in aqueous solutions as a function of Q and oxygen concentrations.

2. Materials and methods

This Quinifuryl was obtained from Dr. N.M. Sukhova.

* Corresponding author. Tel.: +55-16-602-3862; fax: +55-16-633-9949.

E-mail addresses: iouri@dfm.ffclrp.usp.br, iourib@ffclrp.usp.br

(I.E. Borissevitch).

The compound was dissolved in phosphate buffer (5 mM NaH_2PO_4 + 2.5 mM Na_2HPO_4), pH 6.8, using Mili-Q quality water and irradiated in the spectral range from 350 to 450 nm using a tungsten lamp (150 W) and a glass filter (5–57 KOPP color glass filter). A standard quartz 1 cm cuvette with water was used as a thermal filter to prevent collateral heat effects. The intensity of irradiation of the sample was 22 mW cm^{-2} , as measured by a Spectra-Physics 407A radiometer. The concentration of Q in solutions under irradiation was from 7 to 70 μM . The photolysis was performed in standard quartz cuvettes with optical lengths 2 and 10 mm, so that the initial absorbance at the $\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}$ was below 0.35. The optical absorption spectra were monitored with the DU 650 Beckman spectrophotometer.

The flash-photolysis experiments were performed in a standard quartz 1 cm cuvette. The Q excited states were produced by short light pulses (10 ns) of the third harmonic (355 nm) of Nd:YAG laser SL400 spectron laser system. The excited state absorption spectra and decay profiles were monitored in the spectral region $450 \leq \lambda \leq 750 \text{ nm}$ using a standard registration system.

To study the oxygen effect, the samples were deoxygenated by bubbling nitrogen through the solution and for comparison some samples were deoxygenated with a vacuum pump.

All experiments were run at room temperature (24°C).

3. Results and discussion

The Q absorption spectra at pH 7.0 are presented on Fig. 1a. Under continuous irradiation in the range 350–450 nm, occurred the photobleaching of Q showing photodecomposition of its chromophore (Fig. 1a). The

removal of air increased the rate of photodecomposition (Fig. 1b).

The excitation of deaired Q aqueous solutions by a laser pulse at 355 nm induces the formation of short-lived Q species characterized by absorption in the region from 450 to 700 nm with the maximum centered at 550 nm (Fig. 2a). A short-lived product with a similar spectrum was also observed in dioxane (Fig. 2a). The profile of the decay of this absorption is mono-exponential (Fig. 2b).

$$\Delta D = \Delta D_0 \exp(-k_1 t) \quad (1)$$

The decay constant k_1 increases with increase of the initial Q concentration ($[Q]_i$), demonstrating the quenching of this excited state by Q in the ground state. Two constants were determined (Fig. 3) using the following equation:

$$k_1 = k_0 + k_{q1}[Q]_i \quad (2)$$

where $k_0 = 1.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ determined as a limit value at infinite dilution $[Q]_i \rightarrow 0$; and the self-quenching constant $k_{q1} = 2.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The observed short-lived species is quenched by molecular oxygen

$$k_2 = k_1 + k_{q2}[\text{O}_2] \quad (3)$$

with $k_{q2} = 2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The formation of the triplet excited states from the photoexcitation of nitrofuranyl derivatives

has been described [5]. The self-quenching and the quenching by molecular oxygen are typical processes for the triplet states. Thus, we should associate the observed short-lived

Fig. 1. (a) The absorption spectra of Q aqueous solution as a function of the irradiation time. The concentration $[Q] = 1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$. (b) Normalized Quinifuryl absorbance at 396 nm as a function of the irradiation time in air saturated (●) and deaired (○) solutions.

Fig. 2. (a) Normalized Quiniferyl triplet-triplet absorption spectra in water (●) and in dioxane (○) solutions. (b) Decay profiles of the Q triplet state in the aqueous deaerated solution.

species with excited triplet states of Q. Indeed, the experiments done in dioxane have shown that acceptors of the triplet energy quench these species; the quenching constant is dependent on the level of the triplet state energy of acceptor (Table 1). The formation of acceptor triplet states due to the energy transfer from Q triplet state was also observed. The energy of the Q triplet state determined from these experiments is $E_T = 18200 \pm 500 \text{ cm}^{-1}$.

Based on our results, one may consider the scheme of the Q phototransformations as follows:

- (0) $Q(S_0) + h\nu \rightarrow Q^*(S_1)$.
- (1) $Q^*(S_1) \xrightarrow{k_{IC}} Q(S_0)$.
- (2) $Q^*(S_1) \xrightarrow{k_T} Q^*(T_1)$.
- (3) $Q^*(T_1) \xrightarrow{k_0} Q(S_0)$.

Fig. 3. The constant of decay of Quiniferyl triplet state (k_1) as a function of the Q concentration.

Table 1

The quenching constants of Quinifuryl triplet state by the triplet energy acceptors

Compound	E_T (cm ⁻¹)	$k_q \times 10^{-9}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
Naphthacene	10250	2.7 ± 0.4
Azulene	12000	2.5 ± 0.4
9,10-Dibromoanthracene	14112	1.3 ± 0.2
Eosine	15000	1.2 ± 0.2
Acridine orange	17390	2.0 ± 0.3
1,2-Benzpyrene	18480	$(4.2 \pm 0.9) \times 10^{-2}$
Fluorenone	18860	$<10^{-4}$
Naphtalene	21300	$<10^{-4}$
9H-fluorene	23750	$<10^{-4}$

(4) $Q^*(T_1) + Q(S_0) \xrightarrow{k_{q1}} \text{Products 1}$ (we suppose that this reaction is partly responsible for Q photodecomposition).

(5) $Q^*(T_1) + O_2 \xrightarrow{k_{q2}} Q(S_0) + O_2^*(^1\Delta_g)$ (probably this quenching is accompanied by the formation of O_2 excited state (“singlet oxygen”).

The kinetic scheme of the process is described by the following equations:

$$\frac{d[Q(S_0)]}{dt} = -\beta + k_{IC}[Q^*(S_1)] + (k_0 + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (4)$$

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T)[Q^*(S_1)] \quad (5)$$

$$\frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = k_T[Q^*(S_1)] - (k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (6)$$

where

$$\beta = \left(\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \{1 - \exp(-2.3A_0)\} d\lambda \right)$$

is a factor which is determined by initial light absorption in the region $\lambda_i = 350 \text{ nm} \leq \lambda \leq \lambda_f = 450 \text{ nm}$, $I(\lambda)$ is the intensity of the light, $A_0 = \varepsilon(\lambda)[Q(S_0)]l$ is the initial absorbance of the sample.

If A_0 is <1 we can write in the first approximation

$$\beta = 2.3I[Q(S_0)] \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \varepsilon(\lambda) d\lambda = \beta_1[Q(S_0)] \quad (7)$$

where

$$\beta_1 = 2.3I \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \varepsilon(\lambda) d\lambda$$

depends just on the irradiation conditions.

Since the characteristic times of Q photodecomposition under continuous irradiation are much longer than the lifetimes of the excited states $Q^*(S_1)$ and $Q^*(T_1)$ we should write

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = 0 \quad \text{and} \quad \frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = 0 \quad (8)$$

Combining (4)–(8) we can write the initial rate of the photodecomposition as

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -\beta_1 \frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]^2}{(k_{IC} + k_T)(k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])} \quad (9)$$

Taking into consideration that in air saturated aqueous media the oxygen concentration is $[O_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ at 24 °C, we should expect that, at the Q concentration range $7.0 < [Q] < 70.0 \text{ } \mu\text{M}$, the V_i value in the air saturated solutions should be 12–30 times less than the value in deaired solutions. However, the observed reduction appeared only two to six times less. Moreover, in oxygen saturated solutions ($[O_2] \cong 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$) we should expect a five-fold reduction of V_i compared with that in the air saturated solutions, while we actually observed the same value of V_i in the air and oxygen saturated solutions (Fig. 4).

This discrepancy would be resolved if one supposed that Q may also be decomposed directly from its singlet excited state $Q^*(S_1)$.

In this case Eqs. (5) and (9) should be rewritten as

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T + k_X)[Q^*(S_1)] \quad (5a)$$

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -\frac{\beta_1}{k_{IC} + k_T + k_X} \times \left(\frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]}{(k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])} + k_X \right) [Q(S_0)] \quad (9a)$$

If $k_{q2}[O_2] > k_0$, $k_{q1}[Q(S_0)]$ and $k_X > (k_T k_{q1}[Q(S_0)]/k_{q2}[O_2])$, V_i is independent of $[O_2]$. This situation occurs both in air and in oxygen saturated solutions. Moreover, in these solutions V_i should possess a linear dependence on $[Q(S_0)]$. The experiment confirms this assumption (Fig. 4).

Two ways of phototransformation of nitrocompounds has been described [6]. The first is direct photoionization with formation of a hydrated electron, which is, in the consequence, bound to the molecule in the ground state, producing a nitrogen oxide radical

The second way is electron transfer from an electron donor to the nitrocompound in its triplet excited state

Finally, the nitrogen oxide radical is also produced.

Fig. 4. The initial rate of Quinifuryl photodecomposition (V_i) as a function of Q initial concentration ($[Q]_i$) in air saturated (Δ) and oxygen saturated ($\blacktriangledown$) solutions.

We suppose that both ways occur also for the photodecomposition of Q, producing a nitrogen oxide radical. In this case the Q molecule in the ground state should play the role of the electron donor in the reaction with the $Q^*(T_1)$ state. To confirm this hypothesis we have performed a series of experiments with electron donors (ascorbic acid, hydroquinone, 1,7-dioxynaphthalene, aniline) and with epinephrine. The results are to be published soon.

Acknowledgements

The authors are indebted to FAPESP and CAPES Brazilian agencies for the financial support of this work.

References

- [1] V.N. Verovskiy, I.A. Degterev, N.M. Sukhova, A.A. Buzukov, E.Yu. Leonova, N.K. Tatarskaya, Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic and nitroheterocyclic compounds. In vitro and in vivo study, *Pharm. Chem. J. (Moscow)* 24 (1990) 20–24.
- [2] S.S. Voronina, N.K. Tatarskaya, I.A. Degterev, A.M. Serebrianiy, I.I. Pelevina, N.M. Sukhova, Radiosensitizing activity and metabolism of some nitrofurans derivatives. 1. M-106, *Radiobiology (Moscow)* 25 (1985) 748–751.
- [3] L.A. Blatun, A.M. Svetukhin, A.A. Pal'tsyn, N.A. Liapunov, V.A. Agafonov, Clinico-laboratory effectiveness of modern ointments with a polyethylene glycol base in the treatment of purulent wounds, *Antibiot. Khimioter* 44 (7) (1999) 25–31.
- [4] N.A. Daghashtanli, I.A. Degterev, A.C. Tedesco, I.E. Borissevitch, Quinifuryl, a 5-nitrofurans-ethenyl-quinoline antiseptic as a potential agent for anticancer photochemotherapy: photocytotoxicity toward P388 mouse leukemia cells, *J. Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, in press.
- [5] T.J. Kemp, J.A. Martins, Triplet-state of 5-nitro-2-furoic acid by laser flash-photolysis—spectrum, lifetime and reactivity, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 77* (1981) 1425–1435.
- [6] D.E. Moore, Flash-photolysis of misonidazole and metronidazole, *Int. J. Radiat. Biol.* 51 (1987) 45–51.

Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light

Nasser A. Daghanastanli ^a, Marcelo M. Rossa ^b, Heloisa S. Selistre-de-Araujo ^b, Antonio C. Tedesco ^c, Iouri E. Borissevitch ^a, Igor A. Degterev ^{a,d,*}

^a Departamento de Física e Matemática, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

^c Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Chemical and Biological Kinetics, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygin Str. 4, 117333 Moscow, Russian Federation

Received 8 April 2004; accepted 27 April 2004

Available online 7 June 2004

Abstract

The cytotoxicity of two nitroheterocyclic compounds (NHCD), Nitracrine, 1-nitro-9(3-3-dimethylaminopropylamino) acridine and Quinifuryl, 2-(5'-nitro-2'-furanyl) ethenyl-4-{N-[4-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline, towards two lines of leukaemic cells and a line of non-transformed cells, was measured in comparison, on the dark and under illumination with visible light (350–450 nm). Both drugs showed highly elevated cytotoxicity when illuminated with LC₅₀ values 7–35 times lower after 1 h illumination compared to 1 h incubation of cells incubation with drug on the dark. Cytotoxicity of Nitracrine toward all cell lines studied exceeded that of Quinifuryl, both on the dark and under illumination, so that ≈ 10 times lower concentration of former drug was needed to reach the same toxicity as the latter. General toxic effect was calculated as a direct cell kill and a cell proliferation arrest. The effect >80% for both drugs was achieved after 1 h cell illumination with as low drug concentrations as 0.2 μM for Quinifuryl and 0.02 μM for Nitracrine.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Photochemotherapy; Photocytotoxicity; Nitroheterocyclic compounds; Quinifuryl; Nitracrine; Lympholeukaemia P388; Human erythroleukaemia K562; Fibroblast NIH3T3

1. Introduction

Photochemotherapy (PCT) is a mode of cancer treatment based on a supply a target (cancer) tissue with a photoactive agent (photosensitizer) followed by illumination of tumor with light to produce species that are highly toxic to a target [1–3]. The extensive search of new agents for PCT is continued [3–7] and studies on the mechanism of their phototoxicity are developing [8,9].

Quinifuryl is an antiseptic in surgery for the treatment of wounds and burns [10]. Our previous analysis of cytotoxicity has demonstrated that Quinifuryl displayed the high cytotoxicity ($\text{LC}_{50} \leq 2 \mu\text{M}$) towards melanoma B16 [11], murine lympholeukaemia P388 cells [11,12], and human erythroleukaemia K562 cells [12]. At the same time, this compound was shown to be photolabile absorbing intensively visible light ($\lambda^{\text{max}} = 396 \text{ nm}$, $\epsilon_{396} = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [12] and producing reactive species during photoexcitation [13–15]. This fact led us to an assumption that the illumination of tumor cells with the visible light may result in the drug cytotoxicity potentiation.

* Corresponding author. Tel.: +55-016-602-3862; fax: +55-016-633-9949.

E-mail address: igor@dfm.ffclrp.usp.br (I.A. Degterev).

The aim of the present work was to extend number of cellular targets for Quinifuryl in order to confirm intensified photocytotoxicity of this compound and to compare the photocytotoxic potency of Quinifuryl with that of Nitracrine, a 1-nitroacridine derivative, known as a potent hypoxia-selective agent *in vitro* [16,17] and used clinically as antitumor drug [18]. Our previous analysis of cytotoxicity has demonstrated that, as well as Quinifuryl, Nitracrine also displayed the high cytotoxicity ($LC_{50} \leq 2 \mu\text{M}$) towards melanoma B16 [11], murine lympholeukaemia P388 cells [11,12], and human erythroleukaemia K562 cells and always displayed higher cytotoxicity than Quinifuryl.

Quinifuryl possesses the optical absorption more intense than this of Nitracrine (Nitracrine – $\epsilon_{400} = 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Quinifuryl – $\epsilon_{396} = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively, [12]). No study of Nitracrine photocytotoxicity was ever made.

In this work cellular toxicity of drugs towards murine leukemia P388, fibroblast NIH3T3, and human erythroleukaemia K562 cells was measured on the dark and under illumination with visible light.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Quinifuryl (M-106), 2-(5'-nitro-2'-furyl) ethenyl-4-{N-[4-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline, a representative of a family of 5-nitrofuran-ethenyl-quinoline drugs, was synthesized and purified by Dr. N.M. Sukhova. Nitracrine (Ladakrine, C-283), 1-nitro-9 (3',3'-dimethylaminopropylamino) acridine was purchased from Polfa. Structural authenticity of both drugs was verified by NMR analysis. Structural formulas of both drugs are present in Fig. 1.

2.2. Cells

The human K562 leukemia cell line (proerythrocytes), which was originally derived from the patient with erythroleukaemia [19], was kindly provided by Dr. S. Niewiarowski (Temple University, PA, USA). P388D₁ cells, a mouse macrophage monocyte line that grows in semi-suspension, and immortalized mouse fibroblast NIH3T3 cells were obtained from the American Type Culture Collection. P388 cells were cultured in Fisher's media supplemented with 10% heat inactivated horse serum in 175 cm² culture flasks at 37 °C with 5% CO₂. K562 and NIH3T3 cells were cultured as a suspension or a monolayer, respectively, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 250 mg/ml Anfotericin-B at 37 °C in a

Fig. 1. Structures of Quinifuryl and Nitracrine.

water-jacketed CO₂ incubator (Cellstar, USA). The day before an experiment, cells were seeded at 5×10^5 cells/ml. The number of cells in suspension was calculated using a Neubauer chamber (0.0025 mm²). A slow magnetic stirring was used to maintain the suspension in homogeneous state. All preparations were made under subdued red light ($\lambda > 550 \text{ nm}$) at room temperature (22 °C).

The toxicity test was based on the MTT assay and performed in two ways measuring either direct killer effect of a drug (Test 1) or general toxic effect that included a cell proliferation arrest (Test 2) [12]. The tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) is reduced into leaving cells to yield a colored product that may be interpreted as a measure of viability [20]. For MTT assays, cells were seeded in DMEM containing 5% FBS into wells of 96-well ELISA-type plates and exposed to a range of either drug concentrations from 0.02 to 2 μM for time intervals either from 1 to 24 h (experiments on the dark) or from 10 to 90 min (experiments under illumination). At the end of the drug exposure period, plates were centrifuged to pellet cells and drug-contained supernatants were displaced with either MTT dissolved in PBS (Test 1) or with fresh medium (Test 2). In the latter case, the cells were incubated for the 2–3 cell population-doubling times (36–72 h) with daily media change, followed by MTT assay. In both tests, plates with MTT were incubated in the dark for 4 h, after which the water-insoluble MTT-formazan crystals were dissolved in DMSO, and absorbance was recorded in an ELISA plate reader Dynex MRX (Dynex Technologies Inc.) at 570 nm. The initial seeding densities ranged from 2×10^4 to 6×10^4

cells/well. Cell viability was assessed by TB dye exclusion at the beginning of each experiment and was always higher than 96%.

2.3. Irradiation

Samples, containing cells and drug, and controls, containing cells in the absence of drug, were irradiated directly in ELISA-type plates, in the spectral range from 350 to 450 nm using standard light source with tungsten lamp (150 W) and the glass filter (5–57 KOPP color glass filter). The intensity of irradiation was 22 mW/cm², as measured by a Spectra-Physics 407A radiometer.

2.4. Calculation of the results

Drug concentration dependence and time dependence of cell death were calculated as a toxic effect (TE): $TE = [DC]/[Cell]^{control}$, where $[Cell]^{control}$ is cell concentration, in control wells (cells incubated for the same time length with no compound) and $[DC]$ is the dead cell concentration. $[DC]$ was calculated as $[Cell]^{control} - [Cell]^{final}$, where $[Cell]^{final}$ is the live cell concentration in wells exposed to drug [12]. Cell concentration was measured using a calibration curve made for all cell lines tested using MTT-staining method. The LC_{50} of the tested compounds was estimated as $100 \times (T - T_0) / T_0 = 50$, where T_0 and T are optical densities of the test well at time zero (when the compound is added) and after exposure to test compound, respectively [21]. The LC_{50} was measured after 1 h cell incubation with either drug on the dark or under illumination.

2.5. Statistic analysis

The data are presented as the mean $\pm$ SD of two to five independent series of experiments with five to six repetitions in each. Statistic analysis was performed on the Student's *t*-test. The Turkey's test with 95% confidence was applied to compare the means. Statistic analyses were done using the InStat software program for Windows (GraphPads software, San Diego, USA).

3. Results

One example of a drug cytotoxicity measurements are present in Fig. 2 that shows a development of toxic effect (TE) toward human K562 erythroleukaemia cells as a function of cell incubation time with drug either under illumination with visible light (Panel A) or on the dark (Panel B). The TE values were calculated as was described in Section 2. Cells incubated without drug served as a control in each series of experiments. Normally, no significant amounts of dead cells were observed in

Fig. 2. Photocytotoxicity (a) and cytotoxicity on the dark (b) of Quinifuril (●) and Nitracrine (■) towards human erythroleukemia K562 cells as measured by method dye inclusion (MTT). Vertical dashed lines show time needed to reach kill of 50% of cells. Drug concentrations were as follows: Quinifuril – 2.0 μ M; Nitracrine – 0.2 μ M. Conditions: cell concentration was $\sim 1 \times 10^6$ in Na-phosphate buffer, pH 7.4; mixtures were illuminated at room temperature with filtered (350–450 nm) light of tungsten lamp (200 W) at 22 °C with the irradiation intensity of 22 mW/cm². Toxic effect was measured as $[DC]/[Cell]^{control}$, where $[Cell]^{control}$ is cell concentration, in control wells (cells incubated for the same time length with no compound) and $[DC]$ is the dead cell concentration. Each point represents $M \pm SD$ of six measurements.

control wells up to 24 h incubation on the dark and up to 1.5 h illumination.

Both drugs were much more cytotoxic under illumination than on the dark. Death of 50% of cells were achieved under illumination for 45 and 48 min for 2 μ M of Quinifuril and for 0.2 μ M of Nitracrine, respectively (Fig. 2(a)), while on the dark it took 8.5 h for Nitracrine and 18.4 h for Quinifuril (Fig. 2(b)). Nitracrine possesses higher cytotoxicity than Quinifuril on the dark and under illumination. So that 10-times lower concentration of Nitracrine produced the same (illumination, Fig. 2(a)) or higher (on the dark, Fig. 2(b)) toxic effects towards K562 cells than Quinifuril.

Table 1

The LC₅₀ for Quinifuryl and Nitracrine measured after 1 h of cells incubation with drug either on the dark or under illumination with visible light

Drug	LC ₅₀ (μM)	
	Dark	Illumination
<i>P388 cells</i>		
Quinifuryl	79.7 ± 18.1	11.8 ± 3.8
Nitracrine	7.7 ± 1.3	0.23 ± 0.15
<i>NIH3T3 cells</i>		
Quinifuryl	18.6 ± 6.0	1.6 ± 0.7
Nitracrine	16.2 ± 2.8	0.6 ± 0.6
<i>K562 cells</i>		
Quinifuryl	^a 15.4 ± 2.4	1.48 ± 0.33
Nitracrine	^a 8.9 ± 0.8	0.16 ± 0.04

^aNo significant cytotoxicity was observed after 1 h of K562 cells incubation with either drug, thus cytotoxicity on the dark was measured after 12 h of cell incubation with drugs.

The majority of the experimental data was obtained following Test 1 (Section 2), according to which MTT-dye incubation was performed immediately following drug treatment. This approach limits the observed results only to the direct killer effect of the drug. Table 1 shows that the LC₅₀ values observed after 1 h illumination were lower, compared to the dark experiments, by at least order of magnitude. All cells were more sensitive to Nitracrine, compared to Quinifuryl, both on the dark and under illumination.

The cell kill (Test 1) and general toxicity (Test 2) experiments were performed in parallel. Briefly, cells were incubated with drugs in a pair of ELISA-type plates for

Table 3

Time for which death of 50% of cells achieved (τ₅₀)

Drug	[Drug] (μM)	τ ₅₀ (min)	
		Dark	Illumination
<i>P388 cells</i>			
Quinifuryl	20.0	231 ± 51	25 ± 7
	2.0	350 ± 118	76 ± 9
	0.2	1540 ± 90	96 ± 11
Nitracrine	0.2	390 ± 179	76 ± 9
	0.02	431 ± 43	97 ± 13
<i>NIH3T3 cells</i>			
Quinifuryl	2.0	408 ± 67	34 ± 18
	0.2	>500	56 ± 17
Nitracrine	0.2	191 ± 13	31 ± 15
	0.02	622 ± 115	58 ± 28
<i>K562 cells</i>			
Quinifuryl	2.0	n.m.	45 ± 5
Nitracrine	0.2	n.m.	48 ± 7

either 12 h on the dark or 1 h under illumination with filtered visible light (350–450 nm). In each pair, one plate was subjected to the measurement of toxic effect immediately after a drug withdrawal (Test 1). In the second plate, drugs were replaced with complete medium and cells were allowed to proliferate for the 2–3 population-doubling time that were either 72 h (K562 and NIH3T3) or 36 h (P388). Subsequently, the medium was replaced with MTT-dye and the TE was measured as a ratio of dead cells to initial cell amount (see Section 2). The direct killer effect (Test 1) and general toxic effect (Test 2) of both drugs towards three cell lines measured in parallel are present in Table 2.

Table 2

Direct killer effect (Test 1) and general toxicity (Test 2) of Quinifuryl and Nitracrine toward P388 cells either on the dark or under illumination with visible light

Drug	[Drug] (μM)	Toxic effect			
		Dark (12 h)		Illumination (1 h)	
		Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
<i>P388 cells</i>					
Quinifuryl	2.0	*0.480.1	0.97 ± 0.16	*0.76 ± 0.27	0.93 ± 0.20
	0.2	*0.014 ± 0.002	n.m.	*0.13 ± 0.04	0.84 ± 0.24
Nitracrine	0.2	0.59 ± 0.2	0.97 ± 0.15	*0.64 ± 0.17	0.99 ± 0.26
	0.02	*0.14 ± 0.05	n.m.	*0.49 ± 0.13	0.97 ± 0.26
<i>NIH3T3 cells</i>					
Quinifuryl	2.0	*0.59 ± 0.13	0.96 ± 0.01	*0.43 ± 0.16	0.93 ± 0.04
	0.2	*0.0 ± 0.06	0.0 ± 0.12	*0.35 ± 0.12	0.87 ± 0.12
Nitracrine	2.0	0.56 ± 0.1	0.96 ± 0.15	n.m.	0.89 ± 0.20
	0.2	*0.38 ± 0.1	0.94 ± 0.01	*0.65 ± 0.14	0.89 ± 0.12
	0.02	*0.25 ± 0.03	0.89 ± 0.2	*0.41 ± 0.11	n.m.
<i>K562 cells</i>					
Quinifuryl	2.0	*0.33 ± 0.1	n.m.	*0.68 ± 0.15	n.m.
Nitracrine	0.2	0.63 ± 0.03	n.m.	0.68 ± 0.17	n.m.

In each row, symbol (*) marks statistically significant difference ($P < 0.01$) between the results of Test 1. No significant differences were observed between Tests 2 on the dark and under illumination in each series of experiments.

Being applied at the same concentration, both drugs kill cells much rapidly when illuminated with visible light. Table 3 shows the incubation times required to reach death of 50% of cells at different drug concentrations either on the dark or under illumination with visible light.

4. Discussion

The results presented in this work show that the illumination with visible light sharply decreased lethal concentrations of both Quinifuryl and Nitracrine (Table 1) and shortened time of the lethal effect run up (Table 3).

Table 2 shows that the killer effects (Test 1) of both drugs, when illuminated with visible light for 1 h, were similar to those observed after 12 h drug incubation with either cells on the dark. These results show that drugs not only caused death, but also attenuated proliferation of the surviving cells. In contrast to direct killer effect, general toxicity (Test 2) of both drugs toward P388 and NIH3T3 cells after 1 h illumination and 12 h of the dark incubation was similar. The effect of Nitracrine was higher, compared to Quinifuryl, both on the dark and under illumination. Significant toxicity toward P388 and NIH3T3 cells was observed for low concentration (0.2 μM) of Quinifuryl under illumination, while negligible (P388) or no (NIH3T3) toxicity was observed for Quinifuryl in the same concentration for 12 h of drug incubation with these cells on the dark.

Mechanisms of dark-cytotoxicity of Quinifuryl and Nitracrine are, probably, due to their metabolism. Both drugs were metabolized in normal tissues [22–24] and cancer cells [11,12]. Nitracrine is believed to produce reactive intermediate(s) during metabolism that causes DNA modification [17]. Both drugs accelerate the production of reactive oxygen [23] and nitrogen [25–27] species during metabolism. Thus, their toxicity may also be due to oxidative stress.

The fact that the photoactivation significantly accelerates cell killing should be interpreted as either formation more toxic intermediates during photolysis, compared to the dark metabolism, or acceleration of the same toxins formation under illumination, or both. Evidence of reactive species formation during photolysis of Quinifuryl by visible light was reported in our previous works [13–15]. The formation of the triplet excited state [14], which is capable to produce singlet oxygen [1–3], the reaction of the triplet state with the drug in the ground state and with electron donors [13–15], forming of superoxide anion radical in the course of drug photolysis [13] could result in the Quinifuryl phototoxicity.

In contrast to Quinifuryl, there is no data available on the Nitracrine photolysis. This fact creates no room

for speculations on the mechanism of photocytotoxicity of this drug that, undoubtedly, deserves special study.

The above data show that nitroheterocyclic compounds deserve study as possible candidates for photochemistry therapy. Differently from cited work, we had shown here that elevated cytotoxicity under illumination with visible light is not specific property of Quinifuryl, but also resides to nitroheterocyclic compound of quite different structure. Photosensitizing effect was observed with cancer cells as different as mouse limpholeukaemia and human erythroleukemia.

References

- [1] B.W. Henderson, T.R. Dougerthy, How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55 (1992) 145–157.
- [2] M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 39 (1997) 1–18.
- [3] A.S. Sobolev, D.A. Jans, A.A. Rosenkranz, Targeted intracellular delivery of photosensitizers, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 73 (2000) 51–90.
- [4] B. Franck, A. Nonn, Novel porphyrinoids for chemistry and medicine by biomimetic syntheses, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 1795–1811.
- [5] M. Oertel, S.I. Schastak, A. Tannapfel, R. Hermann, U. Sack, J. Mossner, F. Berr, Novel bacteriochlorine for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in mouse tumour model, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 71 (2003) 1–10.
- [6] L. Bourre, G. Simonneaux, Y. Ferrand, S. Thibaut, Y. Lajat, T. Patrice, Synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 69 (2003) 179–192.
- [7] K. Kassab, Photophysical and photosensitizing properties of selected cyanines, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 68 (2002) 15–22.
- [8] J.W. Dobrucki, Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes Ru (phen)₃²⁺ and Ru (bipy)₃²⁺ with animal and plant cells in vitro: Mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 65 (2001) 136–144.
- [9] F. Bohm, R. Edge, S. Foley, L. Lange, T.G. Truscott, Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 65 (2002) 177–183.
- [10] L.A. Blatun, A.M. Svetukhin, A.A. Pal'tsyn, N.A. Liapunov, V.A. Agafonov, Clinic-laboratory effectiveness of modern ointments with a polyethylene glycol base in the treatment of purulent wounds, *Antibiot. Khimioterapiya* 44 (1999) 25–31.
- [11] V.N. Verovskiy, I.A. Degterev, N.M. Sukhova, A.A. Buzukov, E. Yu. Leonova, N.K. Tatarskaya, Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic- and nitroheterocyclic compounds. In vitro and in vivo study, *Pharmacol. Chem. J.* 24 (1990) 20–24.
- [12] M.M. Rossa, T.A.A. Rocha-e-Silava, C.H.B. Terruggi, A.C. Tedesco, H.S. Selistre-de-Araujo, I.E. Borisevich, I.A. Degterev, Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells, *Pharmacol. Res.* 48 (2003) 369–375.
- [13] S.M. Smirnov, M.A. Jurav, N.K. Tatarskaja, E. Yu. Borisevich, I.A. Degterev, Quinifur photoreduction Nitroanionradical formation, *Chem. Phys. (Moscow)* 8 (1989) 1723–1725.

- [14] I.E. Borisevich, N.A. Daghashtanli, I.A. Degterev, Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl) ethenyl-4- {N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbamoyl} quinoline. Effect of oxygen and compound concentration, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 159 (2003) 213–217.
- [15] V.A. Kuzmin, P.P. Levin, E. Yu. Borisevich, I.A. Degterev, S.M. Smirnov, Triplet exciplex of nitrofuranyl derivative with aromatic amines, *Proc. Acad. Sci. USSR, Chemistry*, N 7 (1988) 1510–1514.
- [16] M. Gniazdowski, L. Szmigiero, Nitracrine and its congeners – an overview, *Gen. Pharmacol.* 26 (1995) 473–481.
- [17] K. Gorlewska, Z. Mazerska, P. Sowin'ski, J. Konopa, Products of metabolic activation of the antitumor drug Ledakrin (Nitracrine) in Vitro, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1–10.
- [18] WHO Chronicle, vol. 30, Suppl. 3, World Health Organization, Geneva 1976, p. 11.
- [19] E. Klein, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliac, F. Vanky, Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia, *Int. J. Cancer* 18 (1976) 421–431.
- [20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [21] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *JNCI* 83 (1991) 757–766.
- [22] I.A. Degterev, A.A. Buzukov, V.G. Sharf, K.N. Popov, A.M. Serebrianiy, G.E. Zaikov, Comparative study of in vitro ledakrine metabolism in microsomes of EAC-cells and mouse liver, *Pharmacol. Chem. J.* 20 (1986) 412–417.
- [23] I.A. Degterev, A.A. Buzukov, N.K. Tatarskaya, E. Yu. Leonova, N.M. Sukhova, Metabolism of heterocyclic compounds in mouse liver microsomes, *Pharmacol. Chem. J.* 24 (1990) 9–16.
- [24] I.A. Degterev, P.C.L. Nogueira, A.J. Marsaioli, A.E. Vercesi, Microsomal metabolism of Quinifuryl – a nitrofuryl-ethenyl-quinoline antiseptic possessing antitumor activity in vitro, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacol.* 24 (1999) 15–22.
- [25] V.B. Iliasova, A.A. Buzukov, M. Tabak, I.A. Degterev, On the mechanism of metabolic denitration of nitroheterocyclic compounds, *Biofizika (Moscow)* 39 (1994) 219–225.
- [26] A.A. Buzukov, V.B. Iliasova, M. Tabak, N.K. Tatarskaya, I.A. Degterev, Metabolic denitration of Quinifuryl and Nitracrine in mouse liver homogenate, *Pharmacol. Chem. J. (Moscow)* 29 (1995) 3–8.
- [27] A.A. Buzukov, V.B. Il'asova, M. Tabak, N.C. Meirelles, I.A. Degterev, An ESR and spectrophotometric study of the denitration of nitroheterocyclic drugs by liver homogenates and their metabolic consumption by liver microsomes from cytochrome P-450-induced mice, *Chem. -Biol. Interact.* 100 (1996) 113–124.

Photocytotoxicity of a 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells

N.A. Daghashtanli¹,
I.A. Degterev^{1,3},
A.C. Tedesco² and
I.E. Borissevitch¹

Departamentos de ¹Física e Matemática, and ²Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil
³Department of Chemical and Biological Kinetics, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract

Correspondence

I.E. Borissevitch
Departamento de Física e Matemática
FFCLRP, USP
Av. Bandeirantes, 3900
14040-901 Ribeirão Preto, SP
Brasil
Fax: +55-16-633-9949
E-mail: iouribor@usp.br or
iourib@ffclrp.usp.br

Research supported by FAPESP
and CAPES.

Received April 22, 2004
Accepted August 12, 2004

Quinifuryl (MW 449.52), 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbonyl} quinoline, is a water soluble representative of a family of 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinoline drugs which has been shown to be highly toxic to various lines of transformed cells in the dark. In the present study, the toxicity of Quinifuryl to P388 mouse leukemia cells was compared in the dark and under illumination with visible light (390-500 nm). Illumination of water solutions of Quinifuryl (at concentrations ranging from 0.09 to 9.0 µg/ml) in the presence of P388 cells resulted in its photodecomposition and was accompanied by elevated cytotoxicity. A significant capacity to kill P388 cells was detected at a drug concentration as low as 0.09 µg/ml. The toxic effect detected at this drug concentration under illumination exceeded the effect observed in the dark by more than three times. Moreover, the general toxic effect of Quinifuryl, which included cell proliferation arrest, was nearly 100%. Both dose- and time-dependent toxic effects were measured under illumination. The LC₅₀ value of Quinifuryl during incubation with P388 cells was ~0.45 µg/ml under illumination for 60 min and >12 µg/ml in the dark. We have demonstrated that the final products of the Quinifuryl photolysis are not toxic, which means that the short-lived intermediates of Quinifuryl photodecomposition are responsible for the phototoxicity of this compound. The data obtained in the present study are the first to indicate photocytotoxicity of a nitroheterocyclic compound and demonstrate the possibility of its application as a photosensitizer drug for photochemotherapy.

Key words

- Phototoxicity
- Nitrofurane derivatives
- Quinifuryl
- Oxygen and nitrogen active species

Introduction

Photochemotherapy, and photodynamic therapy in particular (1,2), are relatively new approaches to the treatment of various diseases, including cancer. An extensive search for new photochemotherapy agents contin-

ues (3-7) and studies on the mechanism of their phototoxicity are being developed (8,9).

Quinifuryl (Figure 1) is a representative of the family of 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinolines, which were synthesized in the early 70's by Dr. N.M. Sukhova at the Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sci-

ences, Riga, Latvia, with the aim of developing new antitumor agents. These compounds have shown significant toxicity to various lines of cancer cells (10,11), with Quinifuryl possessing the highest cytotoxic activity (10) and showing radiosensitizing activity *in vitro* (12).

Quinifuryl absorbs light in the visible spectral region owing to the presence of a developed system of π -conjugation that makes it photolabile under irradiation in this spectral region. The excited singlet state is the first product of photoexcitation and may either decompose or form the excited triplet state (13). The latter reacts with either an electron donor, including another molecule of Quinifuryl in the ground state, or transfers its excitation energy to molecular oxygen (13). Illumination of a system containing the drug should therefore result in a decrease of Quinifuryl concentration and the formation of new compounds resulting from its phototransformation. Thus, the effect of illumination on Quinifuryl cytotoxicity is unpredictable because the products of phototransformation may be more or less toxic to transformed cells than Quinifuryl itself.

In the present study, the cytotoxicity of Quinifuryl to mouse leukemia P388 cells was compared in the dark and under continuous illumination with light in the spectral region from 390 to 500 nm.

Material and Methods

Cells

A mouse macrophage monocyte line, P388D₁, that grows in semi-suspension cul-

ture was obtained from the American Type Culture Collection (No. CCL46). Cells were grown in Fisher's medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum in 175-cm³ culture flasks at 37°C with 5% CO₂. On the day before the experiment, cells were seeded at 5 x 10⁵ cells/ml. The number of cells in suspension was calculated using a Neubauer chamber (0.0025 mm²). Slow magnetic stirring was used to maintain the suspension in a homogeneous state. All manipulations were carried out under low intensity red light (λ >550 nm) at room temperature (22°C).

Drug

A stock solution of 43.0 mM Quinifuryl, 2-(5'-nitro-2'-furyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbamoyl} quinoline (Figure 1), was prepared in Milli-Q quality water (Millipore).

Tests

The cell survival test (test 1) was based on the method of intravital staining (14) using Trypan blue (TB) as a dye to which the living cell is impermeable (15). The number of dead P388 cells was counted using a Neubauer chamber (0.0025 mm²) with 10 μ l of TB added to 90- μ l aliquots of a cell suspension withdrawn consecutively from the sample or control mixtures after appropriate time intervals. This test was employed for the comparative examination of the cytotoxicity of Quinifuryl in the dark and of the final products of its photodecomposition to P388 cells.

The toxicity test was based on the tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and was performed in two ways as described previously (11) and designated here as tests 2 and 3. MTT is reduced only by live cells to yield a colored product that may be interpreted as a measure of viability (16). For the

Figure 1. Structure of Quinifuryl, 2-(5'-nitro-2'-furyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbamoyl} quinoline.

MTT assay, cells were seeded in DMEM containing 5% FBS into 96-well ELISA-type plates and exposed to Quinifuryl concentrations ranging from 0.2 to 20 μ M for time intervals of 60 min in the dark or of 10 to 90 min in the presence of illumination. At the end of the drug exposure periods, plates were centrifuged to pellet the cells and the supernatants were displaced with either MTT dissolved in PBS (test 2) or with fresh medium (test 3). In the latter case, the cells were incubated for an additional 52 h (2 cell population-doubling times) with daily medium changes, followed by the MTT assay. Plates with MTT were incubated in the dark for 4 h, after which the water-insoluble MTT-formazan crystals were dissolved in DMSO, and the absorbance was determined with an ELISA plate reader Dynex MRX spectrophotometer (Dynex Technologies Inc., Chantilly, VA, USA) at 570 nm. The initial seeding densities ranged from 2×10^4 to 6×10^4 cells/well. Cell viability was assessed by TB dye exclusion at the beginning of each experiment and was always greater than 96%.

Irradiation

Samples and controls were irradiated in the spectral range from 390 to 500 nm using a standard tungsten lamp (150 W) through a colored glass filter 5-57 KOPP (Dieburg, Germany). Irradiation was performed either in a standard quartz 1-cm cuvette (test 1) or directly in ELISA-type plates (tests 2 and 3). The illumination intensity was 22 mW/cm², as measured with a Spectra-Physics 407A radiometer. A standard 1-cm quartz cuvette with water was used as a thermal filter to prevent collateral heating effects. Absorbance was monitored using a DU 650 Beckman spectrophotometer (Fullerton, CA, USA).

The protocol for the Quinifuryl photocytotoxicity studies is summarized in Table 1 and is described as follows: a) sample (S): Quinifuryl was added to a cell suspension

and the mixture was immediately irradiated for time intervals up to 60 min; b) control 1 (C1) - the cell suspension was maintained in phosphate buffer for ≥ 60 min in the dark and in the absence of Quinifuryl; c) control 2 (C2) - the cell suspension was incubated for ≥ 60 min in the presence of Quinifuryl in the dark; d) control 3 (C3) - the cell suspension was irradiated for ≥ 40 min in the absence of Quinifuryl. This series of experiments was repeated six times.

Calculation and statistical analysis

The toxic effect (TE) of Quinifuryl was calculated as $TE = [DC]/[Cell]^{control}$, where $[Cell]^{control}$ is the cell concentration in control wells (cells incubated for the same period of time without the drug) and [DC] is the dead cell concentration. [DC] is calculated as $[Cell]^{control} - [Cell]^{final}$, where $[Cell]^{final}$ is the live cell concentration in wells exposed to the drug (5). The cell concentration was measured using a calibration curve constructed for P388 cells by the MTT-staining method.

The LC₅₀ of Quinifuryl was estimated as $100 \times (T^0 - T)/T^0 = 50$, where T⁰ and T are the absorbances of the test well at time zero (when the drug is added) and after exposure to the test compound (17), respectively. The data are presented as the mean $\pm$ SD of 6 measurements, and statistical analyses were

Table 1. Protocol for the study of Quinifuryl photocytotoxicity.

Group	Irradiation time (min)	Incubation time (min)*	Post-incubation time (h)	Quinifuryl (μ M)
S1 Sample, test 1	0 to 60	0 to 60	No	20
S2 Sample, test 2	0 to 90	0 to 90	No	0.2; 2; 20
S3 Sample, test 3	60	60	52	0.2; 2; 20
S4 Sample, test 3	0	60	52	0.2; 2; 20
C1 Control	0	0 to 60	No	No
C2 Control	0 to 60	0	No	0.2; 2; 20
C3 Control	0 to 40	0	No	No

For details of S1-S4 samples and C1-C3 controls, see Material and Methods.

*Time of cell incubation with Quinifuryl.

Figure 2. Photocytotoxicity of Quinifuril (20 μ M) to mouse leukemia P388 cells measured by methods of dye exclusion (Trypan blue (TB), dead cells; open circles) or dye inclusion (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), living cells, triangles). Controls: C1 - cells incubated with Quinifuril in the dark (closed circles) and C2 - cells illuminated for the time intervals indicated in the absence of Quinifuril (squares). Cell concentration was $\sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ in sodium phosphate buffer, pH 7.4. TLC_{50} is the irradiation time that was necessary to kill 50% of cells at 20 μ M Quinifuril. For the other experimental conditions, see Material and Methods.

Figure 3. Photodecomposition of Quinifuril under illumination with filtered light in the visible region. A, Spectral changes showing photobleaching of Quinifuril (20 μ M) in the presence of P388 cells. The arrow shows the direction of spectral changes. Numbers show the time of illumination in min. The dashed line shows the spectrum of glass filter absorption. B, Dynamics of Quinifuril photobleaching at $\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}$ (arrow, A) in the absence (circles) and presence (triangles) of P388 cells. Conditions of illumination and measurements of spectra were the same as described in the legend to Figure 2.

performed by the Student *t*-test. The Tukey test with a 95% confidence interval was applied to compare the means. The statistical analyses were done using the InStat software program for Windows (GraphPads software, San Diego, CA, USA).

Results and Discussion

The results presented in Figure 2 show the effect of illumination on Quinifuril toxicity to P388 cells which was measured by both dye (TB) exclusion and dye (MTT) inclusion methods. A significantly elevated toxic effect of Quinifuril on P388 cells was observed under illumination of the incubation mixture with visible light (390-500 nm). A 20 μ M Quinifuril concentration caused death of 50% of cells after 26 min (dye inclusion method) or 32.5 min (dye exclusion method) of illumination, and >80% of cells died after 60 min of illumination. The toxicity observed for 60-min illumination in the absence of Quinifuril (Figure 2, curve C1) or in the presence of Quinifuril in the dark (Figure 2, curve C2) was <10% of that observed under illumination in the presence of Quinifuril.

The photocytotoxic effect of Quinifuril under irradiation was accompanied by photodecomposition of Quinifuril (Figure 3A) that was monitored by a decrease of the specific absorption of the compound at 396 nm ($\epsilon_{396} = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Ref. 18). The presence of P388 cells did not alter the dynamics of Quinifuril photobleaching (Figure 3B).

The photocytotoxic effect of Quinifuril was further investigated in a series of experiments with different Quinifuril concentrations performed using the MTT inclusion method (test 2). The time dependence of the toxic effect of Quinifuril on P388 cells shows that the drug cytotoxicity in the dark was significantly reduced compared to the photocytotoxicity over the range of drug concentrations from 0.2 to 20 μ M (Figure 4). According to these data, the TE_L/TE_D ratios

(toxic effects under illumination and in the dark, respectively) after 60 min of drug incubation with cells were 6.6 ± 1.4 , 2.4 ± 0.7 , and 9.9 ± 2.4 at initial Quinifuryl concentrations of 0.2, 2.0, and 20.0 μM , respectively.

The LC_{50} values estimated from the drug concentration dependence of the toxic effect

(Figure 5) confirmed the above conclusion that the Quinifuryl toxicity was much higher under illumination than in the dark. Indeed, for 60 min of cell incubation with Quinifuryl under illumination, the death of 50% of the cells was observed with the drug concentration of 10 μM , while cell incubation with up

Figure 4. Time dependence of the toxic effect of Quinifuryl [Q] on P388 cells measured in the dark (filled symbols) and under illumination with visible light (390-500 nm) (open symbols). Initial drug concentrations were: 0.2 μM (inverted triangles), 2 μM (triangles), and 20 μM (squares). Experiments were performed in 96-well ELISA-type plates (2×10^4 cells/well) by dye (MTT) inclusion methods (for further details, see test 2 in Material and Methods). $\text{TE} = [\text{DC}]/[\text{Cell}]^{\text{control}}$, where TE is toxic effect, $[\text{Cell}]^{\text{control}}$ is cell concentration in control wells (cells incubated for the same period of time with no compound) and [DC] is the dead cell concentration. Each point indicates the mean $\pm$ SD of 6 measurements.

Figure 5. LC_{50} estimation: the concentration dependence of the toxic effect of Quinifuryl on P388 cells measured in the dark (dashed line, filled squares) and under illumination with visible light (390-500 nm; solid line, open squares). The time of drug incubation with cells was 60 min. Experiments were performed and toxic effect values calculated as described in the legend to Figure 4. The LC_{50} was estimated as $100 \times (T^0 - T)/T^0 = 50$, where T^0 and T are the absorbances of the test well at time zero (when the compound is added) and after exposure to Quinifuryl. Conditions of illumination were the same as described in the legend to Figure 2. Each point represents the mean $\pm$ SD of 6 measurements.

Figure 6. Cytotoxicity of Quinifuryl (filled symbols) and final products of its photodecomposition (open symbols) to mouse leukemia P388 cells in the dark (open circles, filled triangles) and under illumination (filled squares, open triangles) as measured by the dye exclusion method (Trypan blue; test 1, Material and Methods). Cell concentration was $\sim 5 \times 10^4$ in sodium phosphate buffer, and Quinifuryl concentration was 2 μM , pH 7.4. Each point represents the mean $\pm$ SD of 3 measurements.

to 20 μM Quinifuryl for the same period of time in the dark caused the death of no more than 15% of cells.

In contrast to test 2 that indicated only the killing effect of the drug, test 3 revealed the complete cytotoxicity that included cell proliferation arrest. The results obtained using this method are presented in Table 2, along with the data obtained using test 2 (the killing effect of Quinifuryl). These data show that Quinifuryl not only caused death, but also attenuated the proliferation of the surviving P388 cells. Both effects were significantly enhanced under illumination. A further conclusion from these data is that the toxic effect of Quinifuryl on P388 cells is due to cell proliferation arrest rather than to cell death.

The cell survival test (test 1, Material and Methods) was employed to determine whether the final products of Quinifuryl photodecomposition might be responsible for the elevated toxicity of this drug under illumination. For this reason, P388 cells (5×10^4 cells/ml) were incubated for up to 100 min with either Quinifuryl (at a final concentration of 2 μM) or final products of photodecomposition of the drug. In the latter case, the 18 μM Quinifuryl solution was illuminated until the major

Quinifuryl peak at 396 nm disappeared (see Figure 3A). Then, cells were added to a post-photolysis mixture and incubated in the dark. The results presented in Figure 6 show that the final products of Quinifuryl photodecomposition as well as Quinifuryl itself had low toxicity in the dark, causing death of less than 10% cells at 100 min of incubation. The final products of Quinifuryl were also non-toxic under 60-min illumination, while Quinifuryl itself caused death of nearly 90% of the cells. These results clearly show that the final products of Quinifuryl photodecomposition are not responsible for the cytotoxicity of this drug.

Based on the data presented above, it seems that the detailed mechanisms of photocytotoxicity of Quinifuryl deserve special investigation. The observation that the photoactivation of Quinifuryl significantly accelerates cell killing, along with the observation that the final products of Quinifuryl photolysis are not responsible for this acceleration, should be interpreted as evidence that more toxic short-lived intermediates are formed during photolysis. Evidence of the formation of reactive species during Quinifuryl photolysis by visible light was reported in our previous studies (13,18). The formation of the triplet excited state of the drug molecule was observed (13), which is capable of producing singlet oxygen (19,20). We had also detected the reactions of the triplet state with the drug in the ground state and with electron donors (13,21), with the formation of superoxide anion radical (18). The formation of reactive oxygen species in the course of Quinifuryl photolysis may be responsible for the photocytotoxicity of the drug. However, the possible toxicity of short-lived intermediates of Quinifuryl decomposition should be further investigated.

To the best of our knowledge, the data presented here are the first to indicate photocytotoxicity of a nitroheterocyclic compound and demonstrate the possibility of its application as a photosensitizer drug for photochemotherapy.

Table 2. Toxic effects (test 2) and post-effects (test 3) of Quinifuryl on P388 cells after 60 min of incubation with cells either in the dark or under illumination with visible light (390-500 nm).

Quinifuryl (μM)	Toxic effect			
	Dark		Illumination	
	Test 2	Test 3	Test 2	Test 3
0.2	0.014 ± 0.002	0.62 ± 0.11	0.09 ± 0.02	0.99 ± 0.005
2	0.12 ± 0.02	$0.91 \pm 0.08^*$	0.29 ± 0.09	$0.96 \pm 0.008^*$

Post-effects were measured 52 h after drug removal from the cell culture. Toxic effects (TE) were measured using the MTT assay and calculated as: $\text{TE} = [\text{DC}] / [\text{Cell}]^{\text{control}}$, where $[\text{Cell}]^{\text{control}}$ is the cell concentration in control wells (cells incubated for the same period of time without the drug) and $[\text{DC}]$ is the dead cell concentration. $[\text{DC}]$ is calculated as $[\text{Cell}]^{\text{control}} - [\text{Cell}]^{\text{final}}$, where $[\text{Cell}]^{\text{final}}$ is the live cell concentration in wells exposed to drug. $[\text{DC}]$ was measured either immediately after drug removal (test 2) or after cell incubation with fresh medium for 52 h (test 3). For further details, see Material and Methods.

* $P < 0.01$ for comparison between the appropriate data obtained in the dark and under illumination (Tukey test).

References

1. Dougherty TJ (1993). Photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 58: 895-900.
2. Ochsner M (1997). Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 39: 1-18.
3. Sobolev AS, Jans DA & Rosenkranz AA (2000). Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 73: 51-90.
4. Franck B & Nonn A (1995). Novel porphyrinoids for chemistry and medicine by biomimetic syntheses. *Angewandte Chemie (International Edition, English)*, 34: 1795-1811.
5. Oertel M, Schastak SI, Tannappel A, Hermann R, Sack U, Mossner J & Berr F (2003). Novel bacteriochlorine for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells *in vitro* and in mouse tumour model. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 71: 1-10.
6. Bourre L, Simonneaux G, Ferrand Y, Thibaut S, Lajat Y & Patrice T (2003). Synthesis, and *in vitro* and *in vivo* evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 69: 179-192.
7. Kassab K (2002). Photophysical and photosensitizing properties of selected cyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 68: 15-22.
8. Dobrucki JW (2001). Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes Ru(phen)₃²⁺ and Ru(bipy)₃²⁺ with animal and plant cells *in vitro*: Mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 65: 136-144.
9. Bohm F, Edge R, Foley S, Lange L & Truscott TG (2002). Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 65: 177-183.
10. Verovskiy VN, Degterev IA, Sukhova NM, Buzukov AA, Leonova EYu & Tatarskaya NK (1990). Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic and nitroheterocyclic compounds. *In vitro and in vivo study. Pharmaceutical Chemistry Journal*, 24: 20-24.
11. Rossa MM, Rocha-e-Silva TAA, Terruggi CHB, Tedesco AC, Selistrede-Araujo HS, Borissevich IE & Degterev IA (2003). Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. *Pharmaceutical Research*, 48: 369-375.
12. Voronina SS, Tatarskaya NK, Degterev IA, Serebrianiy AM, Pelevina II & Sukhova NM (1985). Radiosensitizing activity and metabolism of some nitrofur derivatives. *Radiobiology*, 25: 748-751.
13. Borissevich YE, Daghasanli NA & Degterev IA (2003). Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-[N-(4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl)carbonyl] quinoline. Effect of oxygen and compound concentration. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A, Chemistry*, 159: 213-217.
14. Kochevar IE, Lambert CR, Lynch MC & Tedesco AC (1996). Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1280: 223-230.
15. Kaltenbach JP, Kaltenbach MH & Lyons WB (1958). Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Experimental Cell Research*, 15: 112-117.
16. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
17. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P & Vaigro-Wolff A (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766.
18. Smirnov SM, Jurav MA, Tatarskaja NK, Borisevich YE & Degterev IA (1989). Quinifur photoreduction and nitroanion radical formation. *Chemical Physics*, 8: 1723-1725.
19. Moan J & Berg K (1992). Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochemistry and Photobiology*, 55: 931-948.
20. Henderson BW & Dougherty TR (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*, 55: 145-157.
21. Kuzmin VA, Levin PP, Borisevich YE, Degterev IA & Smirnov SM (1988). Triplet exciplex of nitrofur derivative with aromatic amines. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Chemistry*, 7: 1510-1514.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Física e Matemática
Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Estudo dos mecanismos da fotoatividade do
Quinifuril: um potencial composto
para a fotoquimioterapia

Nasser Ali Daghastanli

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à
Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2005

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Física e Matemática
Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada à
Medicina e Biologia

Estudo dos mecanismos da fotoatividade do
Quinifuril: um potencial composto
para a fotoquimioterapia

Nasser Ali Daghastanli

Orientador: Prof. Dr. Iouri E. Borissevitch

Tese apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Doutor em Ciências, Área: Física Aplicada à
Medicina e Biologia.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2005

Daghastanli, Nasser Ali

Estudo dos mecanismos da fotoatividade do quinifuril: um potencial composto para a fotoquimioterapia. Ribeirão Preto, 2005
129 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado apresentado à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Borissevitch, Iouri E.

1. Quinifuril. 2. Fotoquimioterapia. 3. Fotocitotoxicidade. 4. Espécies reativas. 5. Interação com sistemas modelo.

Autor: Nasser Ali Daghasanli

Título: Estudo dos mecanismos da fotoatividade do quinifuril: um potencial composto para a fotoquimioterapia.

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Prof. Dr(a)

Orientador

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em __/__/2005.

A Alláh,

*“Infinitamente bom, que vosso nome seja bendito pelos benefícios que me concedestes;
deles seria indigno se os atribuisse ao acaso ou ao meu próprio mérito.”*

Katia e Adnan,

que com seu amor e confiança incondicionais sempre me fortaleceram...

Aos meus avós, meu pai e irmãos

Espero que este trabalho seja digno de vocês.

Não nos é dada a escolha do tempo em que vivemos.

Nos é dada a escolha do que fazer com o tempo que nos é dado.

J. R. R. Tolkien

Agradecimentos

Prof. Dr. Iouri E. Borissevitch pela orientação.

Aos Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco, Gustavo Balejjo Olivera, Heloisa S. Selistre de Araújo, Igor Degterev, Marcelo Ganzarolli de Oliveira, Mauricio Baptista da Silva, Pietro Ciancaglini e suas equipes pelo inestimável auxílio na realização deste trabalho.

Aos companheiros do Grupo de Fotobiofísica, em especial Fábio e Cássia.

Dr. Divinomar Severino, Dr. Prislaine Pupolin, Amedea Seabra, Carlos Bruneto, Ana Maria, George, João Borin, Marcelo Rossa, Thomaz, Mércia, Leonardo, e tantos outros que eu estou me esquecendo....

À CAPES pelo suporte financeiro.

Resumo

Nesta Tese foram estudadas as propriedades do composto nitroheterocíclico Quinifuril na sua ação com a luz. O composto possui absorção na região espectral 350-450 nm ($\epsilon_{396}=24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e, sendo irradiado nesta região, sofre fotodecomposição. Foi observada a formação do seu estado tripleto ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$), de energia $E_T=18200 \text{ cm}^{-1}$. O tripleto sofre supressão na interação com seu estado fundamental ($2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) e pelo oxigênio molecular ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

É apresentado um modelo para a fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa que supõe dois caminhos para sua fotólise: diretamente a partir do seu estado singleto e a partir da reação entre as moléculas nos estados fundamental e tripleto. São apresentados os efeitos de detergentes de diferentes cargas elétricas sobre suas propriedades, onde se observou o Quinifuril interage fracamente com o CTAB (catiônico); moderadamente como o DPS (zwitteriônico); e fortemente com o aniônico SDS, que afeta sua velocidade de fotodecomposição e seu estado tripleto. São apresentados dados da cinética de formação de agregação SDS-Quinifuril e o efeito destes agregados sobre suas características de fotodecomposição.

Estudou-se a fotocitotoxicidade do Quinifuril contra células em cultura, P388 (leucemia de camundongos), K562 (leucemia humana) e NIH3T3 (fibroblasto imortalizado de camundongos), onde se determinou um significativo aumento na sua citotoxicidade ao ser irradiado. O composto apresentou fotocitotoxicidade contra células K562 e NIT3H3 em doses tão baixas quanto $0,2 \text{ }\mu\text{g/mL}$; sua dose letal (LC_{50}) contra células P388 foi estimada em $0,45 \text{ }\mu\text{g/mL}$. O composto apresentou capacidade de inibir a proliferação destas linhagens em $\sim 100 \%$. Mostrou-se que os produtos finais de sua fotodecomposição não são os responsáveis pela sua fotocitotoxicidade.

Foi mostrado que, sob ação da luz, o Quinifuril produz as espécies reativas oxigênio singleto $^1\Delta_g$, ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico $\text{NO}^\bullet$ e sua fotocitotoxicidade pode ser explicada pela produção destas espécies intermediárias.

Abstract

In this work there were studied the properties of a nitroheterocyclic compound Quinifuryl in its interaction with light. The compound presents absorption in the 350-450 nm spectral region ($\epsilon_{396}=24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), and suffers photolysis under irradiation. The triplet state is formed ($\lambda_{\text{max}} = 550 \text{ nm}$), characterized by the energy $E_T = 18200 \text{ cm}^{-1}$. The triplet state can be self-quenched ($2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), and quenched by oxygen ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

A model of the Quinifuryl water solution photolysis proposes two possible ways for the process: a direct photolysis through singlet state, and the other one due to its triplet/ground states reaction. We present the effects of different charged detergents upon Quinifuryl properties. It was observed that Quinifuryl interacts weakly with cationic CTAB, moderately with zwitterionic DPS, and strongly with anionic SDS. The latter affects the rate of its photolysis and the triplet state properties. The SDS-Quinifuryl aggregation and its effects over the Quinifuryl photolysis behavior are discussed.

Phototoxic effects of Quinifuryl against the P388 (mouse leukaemia), the K562 (human erythroleukaemia), and the NIH3T3 (immortalized mouse fibroblast) cell lines were studied. The compound demonstrated an elevated cytotoxicity under irradiation. The phototoxic dosage was $0.2 \text{ }\mu\text{g/mL}$ to both K562 and NIT3H3 cell lines, and $0.45 \text{ }\mu\text{g/mL}$ to the P388 ones. Under irradiation the compound showed $\sim 100 \%$ proliferation arrest against the P388 cell line. These results show that the final products of Quinifuryl photolysis are not responsible for its cytotoxicity.

Under irradiation, Quinifuryl produces reactive species, such as singlet oxygen $^1\Delta_g$, superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), and nitric oxide $\text{NO}^\bullet$, which can explain its high photocytotoxicity.

LISTA de ABREVIACES

$O_2^{\bullet-}$	Ânio superóxido
$^1\Delta g$	Oxigênio singlete
V_i	Velocidade inicial de fotólise do Quinifuril
λ	Comprimento da onda eletromagnética, em nm.
AA	cido ascórbico
BSA	Albumina de soro bovino
CCA	Concentrao crítica de agregao
CMC	Concentrao micelar crítica
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
DAN	2,3-diaminonaftaleno
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPR	<i>Electron paramagnetic resonance</i> (ressonância paramagnética de elétrons)
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FD	Fotodecomposio
FQT	Fotoquimoterapia
FS	Fotossensibilizador
HPS	N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato
IC	Interconverso
ISC	Cruzamento intersistemas (<i>intersystem crossing</i>)
MTT	Sal tetrazolium 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide
NAT	1-(H)-naftotriazole
NFR	Radical livre estável Nitroxil
NO $\bullet$	óxido nítrico
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PMT	Tubo fotomultiplicador
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TB	Azul de Trypan
TE	Efeito tóxico
TFD	Terapia fotodinâmica
TMOOP	1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-4-oxopiperidina
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Abreviações.....	iii

ÍNDICE

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1- Modalidades atuais para o tratamento do câncer	1
1.2 – A Terapia Fotodinâmica	3
1.2.1 - Mecanismos de ação da TFD - o efeito fotodinâmico	4
1.2.2 - O estado excitado transiente tripleto (T_1)	5
1.2.3 – Rendimento quântico de tripleto	6
1.3 – As espécies reativas oxigênio singlete ($^1\Delta_g$), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e óxido nítrico (NO^*)	8
1.4 - Fotossensibilizadores atualmente utilizados em TFD	12
1.5 Compostos Nitroheterocíclicos	13
1.6 – O Quinifuril	14
1.7 - Aplicação de sistemas biomiméticos e de cultura de células nos estudos biofísicos	15
1.8 – Objetivos da Tese	17
1.8.1 – Objetivos Gerais	17
1.8.2 – Objetivos Específicos	17
Capítulo 2 - Materiais e Métodos	18
2.1 – Princípios básicos dos Métodos experimentais	18
2.2 – Objeto de estudo	22
2.3 – Materiais e métodos	22
2.4 - Experimentos com cultura de células	26
Capítulo 3 - Estudo da fotocitotoxicidade do Quinifuril contra linhagens celulares P388, K562 e NIH3T3	30
3.1 - Mortalidade da linhagem P388	31
3.2 – Efeito fototóxico sobre as células P388	34
3.3 - Concentração de Quinifuril para a mortalidade de 50% das células (LC_{50})	35
3.4 – Inibição da proliferação celular através da irradiação do Quinifuril	37
3.5 – Ausência de toxicidade dos produtos da fotólise do Quinifuril	38
3.6 –Fotocitotoxicidade do Quinifuril contra células K562	40

3.7 – Fototoxicidade geral do Quinifuril contra linhagens celulares P388, K562 e NIH3T3	41
3.8 – Discussão	42
Capítulo 4 - Estudo das propriedades fotofísicas e fotoquímicas do Quinifuril em soluções homogêneas	44
4.1 Determinação do coeficiente de absorção molar ($\epsilon(\lambda)$) do Quinifuril em solução aquosa	44
4.2 - Estudo da Fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa	46
4.2.1 – Fotodecomposição na presença de oxigênio	46
4.2.2 – Fotodecomposição na ausência de oxigênio	46
4.2.3 - Velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril	48
4.3 - Velocidade de fotodecomposição em função da concentração do Quinifuril	49
4.4 - Estado transiente e tempo de vida do transiente do Quinifuril	51
4.4.1 - Caracterização do estado transiente do Quinifuril	51
4.4.2 – Determinação da energia do estado excitado tripleto (E_T) do Quinifuril	53
4.4.3 – Dependência do tempo de vida tripleto do Quinifuril com a sua concentração	55
4.5 - Modelo cinético da fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa	57
4.5.1 - Processos de fototransformação do Quinifuril	57
4.5.2 - Modelo cinético para os processos de fototransformação do Quinifuril	58
4.6 - Efeito do pH e da constante dielétrica (ϵ) sobre as propriedades espectrais do Quinifuril	65
4.6.1 - pK do Quinifuril	65
4.6.2 – Efeito do pH sobre a fotodecomposição do Quinifuril	67
4.7 - Efeito do solvente sobre as características espectrais e sobre a fotodecomposição do Quinifuril	69
4.8 - Efeito do etanol sobre a as características espectrais e sobre a fotodecomposição do Quinifuril	71
4.9 – Discussão e Conclusões	73
Capítulo 5 - Interação do Quinifuril com detergentes e suas micelas	75
5.1 - Efeito das micelas sobre o pK do Quinifuril	75
5.2 – estudo da Cinética de agregação SDS-Quinifuril	78
5.3 - Estudos da fotodecomposição do Quinifuril na presença de SDS	86

5.4 - Efeito dos detergentes DPS e CTAB sobre a velocidade de fotodecomposição V_i do Quinifuril	88
5.5 - Estudo do efeito dos detergentes SDS, CTAB e DPS sobre o transiente do Quinifuril	90
5.6 - Discussão e conclusões	94
Capítulo 6 - Espécies Reativas resultantes da fotodecomposição do Quinifuril	98
6.1 - Formação do radical livre ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) devido à fotodecomposição do Quinifuril	98
6.2 - Formação do oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) devido à fotoexcitação do Quinifuril	103
6.3 - Formação do óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) devido à fotodecomposição do Quinifuril	108
6.4 - Fotorelaxamento do músculo anococcigeo de ratos pela fotodecomposição do Quinifuril	116
6.5 - Discussão e conclusões	119
Capítulo 7 - Conclusões e Perspectivas Futuras	121
Bibliografia	123
Anexo I	I
Anexo II	V
Anexo III	VII

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O câncer está sendo considerado uma epidemia mundial, uma vez que 6 milhões de pessoas morrem anualmente devido a esta doença e em alguns países (Austrália e Japão) já representa a maioria dos óbitos entre estas populações.

No Brasil um em cada oito óbitos é decorrente de tumores malignos [Piveta, 2004] e atualmente ultrapassa todas as causas de morte no país, somente ficando atrás de mortes por problemas cardiovasculares. Em 2002, cerca de 400 mil novos casos de câncer foram registrados e quase 130 mil brasileiros morreram em razão da doença, tendo 80% das vítimas mais de 50 anos, na sua maioria homens. Cerca de 2 milhões de brasileiros morreram de câncer entre 1979 e 2002, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde. As mortes por câncer correspondem por 13,2% dos óbitos no Brasil, sendo os cânceres de pulmão, estômago, mama, próstata, cólon e reto, esôfago, leucemias e colo do útero os que mais matam, nesta ordem. Deste modo, grandes esforços têm sido empregados para o desenvolvimento e melhora das terapias contra o câncer.

1.1- MODALIDADES ATUAIS PARA O TRATAMENTO DO CâNCER

O câncer pode ser definido como uma desordem celular que muitas vezes se caracteriza através de uma massa de células anormais (tumor), decorrente de uma série de alterações sofridas pelas células normais ao longo do tempo. De fato o câncer é um conjunto de doenças de origens distintas que tem como efeito a proliferação de suas células de maneira irregular. As células do câncer invadem os tecidos vizinhos provavelmente através de certas enzimas proteolíticas e sobrevivem a partir das células normais. Crescem no corpo do hospedeiro, ocupando o espaço e envolvendo as células normais, provocando hemorragias e infecções. Apresentam alterações dos componentes da superfície celular, tais como antígenos, enzimas e oncogenes. O câncer induz a deficiências nutricionais, perda de massa corpórea do hospedeiro e diminui as

defesas do organismo, levando o hospedeiro à morte em muitos casos [Franks e Teich, 1990].

As modalidades convencionalmente utilizadas para o tratamento do câncer são a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia.

Atualmente a **cirurgia** é considerada o tratamento mais eficaz do câncer de tumores localizados, mas é ineficaz contra metástases, tumores disseminados ou inoperáveis à sua localização e evolução, e geralmente mutila o paciente. A **radioterapia** é considerada a 2ª melhor forma de tratamento do câncer, principalmente contra células que se dividem rapidamente e cânceres não amplamente disseminados, porém apresenta severos efeitos colaterais, tais como a debilitação do estado geral paciente. A **imunoterapia** utiliza-se de vacinas contra certos tipos de cânceres e sua efetividade tem aumentado quando combinada com técnicas de biologia molecular mas atualmente somente é efetiva contra um pequeno número de células tumorais. A **quimioterapia** utiliza-se de fármacos, sendo útil principalmente para cânceres disseminados e sua efetividade depende do estágio do tumor; possui pequena efetividade contra metástases ou tumores de crescimento lento, induzindo uma grande toxicidade às células normais vizinhas, e além disto o câncer pode desenvolver resistência aos medicamentos, diminuindo a efetividade do tratamento [Franks e Teich, 1990].

No **Anexo I** está apresentado um breve histórico sobre a evolução do combate ao câncer e breves informações sobre alguns tipos comuns de cânceres e suas características.

Um dos constantes desafios da ciência moderna é a busca de novos caminhos para o tratamentos de doenças. Um destes caminhos é o desenvolvimento de novos compostos com potencialidades terapêuticas, através da pesquisa de suas propriedades e o conhecimento de suas interações com os sistemas vivos para que venham a ser utilizados eficientemente como medicamentos.

A **terapia fotodinâmica** se apresenta como a mais recente técnica em uso clínico contra diversas enfermidades, inclusive o câncer. A terapia fotodinâmica utiliza-se de compostos ativados através da luz e está em desenvolvimento em diversos países, inclusive no Brasil, onde sua aplicação clínica já apresenta sucessos no tratamento e o desenvolvimento e aplicação destes novos composta está em franca expansão.

1.2 – A TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (**TFD**) é uma modalidade de tratamento local do câncer aplicada geralmente a pacientes com pequenos cânceres inoperáveis e refratários às técnicas convencionais de tratamento (radioterapia e quimioterapia). A TFD é baseada no uso de um composto que é retido preferencialmente pelas células cancerosas. Este composto fotossensibilizador, ao ser ativado pela luz, produz espécies reativas que destroem as células do câncer [Bourre et al., 2002].

A TFD envolve a combinação de luz visível e um fotossensibilizador que separadamente não apresentam danos ao organismo, mas ao serem aplicados juntos na presença do oxigênio podem produzir agentes citotóxicos letais que podem matar as células tumorais. Isto permite uma grande seletividade contra tecidos doentes uma vez que somente células expostas simultaneamente ao fotossensibilizador, ao oxigênio e à luz serão expostas aos efeitos citotóxicos. A seletividade da TFD é fruto da captura preferencial do fotossensibilizador pelo tecido tumoral e pela habilidade da técnica em confinar o dano a estes tecidos, através da limitação da irradiação a uma região específica. Deste modo, a TFD permite a destruição seletiva do tumor, permanecendo intacto o tecido sadio adjacente ao tumor [Sharman *et al.*, 1999].

O papel primário da TFD é matar as células indesejadas do hospedeiro. A TFD consiste essencialmente dos seguintes passos: (i) um fotossensibilizador, preferencialmente formado de uma única substância de síntese controlada, que possua afinidade de acumulação no tecido tumoral; (ii) a administração do fotossensibilizador deve permitir a máxima diferenciação da retenção do fotossensibilizador entre as células normais e tumorais; e (iii) o tumor deve ser irradiado com luz visível na presença de oxigênio, produzindo espécies reativas com o objetivo de destruir as células tumorais [Bonnett, 2001].

Idealmente um fotossensibilizador deverá possuir baixa ou nenhuma toxicidade no escuro e um bom comportamento farmacocinético, isto é, seletividade pelo tecido tumoral e fácil excreção do corpo do paciente [Bonnett, 2001].

1.2.1 - Mecanismos de ação da TFD - o efeito fotodinâmico

O **efeito fotodinâmico** pode ser definido como a reação que ocorre quando estão simultaneamente presentes um fotossensibilizador, luz e o oxigênio numa mesma região do corpo: o fotossensibilizador, em seu estado fundamental de energia singleto (S_0), absorve luz e é promovido para seu estado excitado transiente tripleto (T_1), de curto tempo de vida, via seu estado excitado singleto (S_1) [Henderson e Dougherty, 1992]. Uma vez em seu estado excitado tripleto, o fotossensibilizador poderá reagir por dois caminhos distintos: **(1)** reagir com o substrato ou solvente, transferindo um elétron ou um átomo de hidrogênio (reação do **Tipo I**); ou **(2)** transferir sua energia para o oxigênio molecular (3O_2), formando o seu estado excitado chamado oxigênio singleto $^1\Delta_g$ (reação do **Tipo II**) [Foote, 1991].

A ação fotodinâmica, que é a expressão do efeito fotodinâmico, se refere ao dano ou destruição dos tecidos vivos por luz visível na presença de um fotossensibilizador e do oxigênio [Bonnett, 2000]. Em princípio, luz na região do infravermelho próximo pode ser utilizada com maior eficiência, mas fotossensibilizadores absorvendo nesta região são incomuns e em muitos casos a irradiação é feita com luz visível. As fontes de luz podem ser incoerentes, tais como lâmpadas; ou coerentes, como os lasers [Bonnett, 2000]. Estes processos são representados esquematicamente através do **Diagrama de Jablonski** (**Figura 1.1**).

Figura 1.1 – Diagrama de Jablonski modificado. O fotossensibilizador no estado fundamental (S_0) ao absorver um fóton ($h\nu$) é promovido ao estado excitado singlete S_1 . No estado S_1 o fotossensibilizador poderá: (i) retornar ao S_0 por interconversão (IC);(ii) promover uma reação do Tipo I; ou (iii) transicionar por cruzamento intersistemas (ISC) para o estado excitado tripleto T_1 . No estado T_1 poderá transferir sua energia para o oxigênio, formando o oxigênio singlete $^1\Delta_g$ (reação do Tipo II). A eficiência relativa entre os processos é de (Tipo I)/(Tipo II) $\cong$ 1:9.

1.2.2 - O estado excitado transiente tripleto (T_1)

Uma molécula fotossensibilizadora, inicialmente no seu estado energético fundamental (S_0), pode ser promovida para seu estado excitado tripleto (T_1) através de um pulso de luz de alta intensidade (*flash fotolise*). Entretanto, o estado eletronicamente excitado T_1 não pode ser promovido do estado S_0 diretamente para T_1 , devendo a molécula passar pelo estado de energia singlete superior (S_1): $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$. Uma vez sendo a molécula promovida para seu estado energético S_1 , ela poderá transicionar por cruzamento intersistemas para o estado eletronicamente excitado tripleto T_1^v ($S_1 \rightarrow T_1^v$). Este estado excitado T_1 é formado por v subníveis energéticos vibracionais (T_1^v).

O cruzamento intersistemas ($S_1 \rightarrow T_1^v$) entre os estados excitados S_1 e T_1 da molécula ocorre isoenergeticamente, seguido da desativação não radiativa da molécula no estado superior T_1^v para o estado energético vibracional mais baixo ($v=0$) do seu estado eletrônico tripleto T_1 (regra de Kasha). As desativações vibracionais não radioativas por conversão interna dentro do

mesmo estado energético T_1 ($T_1^v \rightarrow T_1^{v=0}$) ocorrem muito mais rapidamente ($\cong 10^{12} \text{ s}^{-1}$) que o cruzamento intersistemas $T_1 \rightarrow S_0$ radiativo (fosforescência) ou de relaxamento. Assim, a molécula se encontrará no seu estado energeticamente excitado tripleto vibracional mais baixo T_1 (T_1^0) [Bonnett, 2000]. O estado T_1 é um estado transiente, pois a molécula se encontra num estado energético instável devido ao excesso de energia e, finalmente a molécula retornará ao seu estado de energia fundamental através de diversos caminhos, tais como: promovendo reações do Tipo I ou II; emitindo fosforescência ou sofrendo relaxamento não radioativo [Bonnett, 2000].

A transição energética $S_1 \rightarrow T_1$ (cruzamento intersistemas) é formalmente proibida por spin, mas em algumas moléculas o cruzamento intersistemas ocorre tão eficientemente que o rendimento quântico de tripleto pode atingir 70% [Bonnett, 2000]. Como o estado transiente tripleto possui um tempo de vida da ordem de 0,1-1.000 μs em soluções líquidas, ele tende a ser importante em muitas reações fotoquímicas. Assim, é de fundamental importância conhecer o tempo de vida do transiente tripleto (τ_T) de uma molécula fotossensibilizadora a ser utilizada em TFD, pois quanto mais tempo a molécula fotossensibilizadora permanecer no estado excitado tripleto maior a probabilidade do encontro entre esta molécula excitada com o oxigênio molecular e conseqüente formação do oxigênio singlete $^1\Delta_g$, através do mecanismo de transferência de energia (Tipo II). Uma molécula de fotossensibilizador possui uma eficiência de promoção de reações do Tipo II de 90% em relação à reação do Tipo I.

1.2.3 – Rendimento quântico de tripleto

O tempo de vida do transiente tripleto (τ_T) pode ser obtido através do ajuste da curva cinética de despopulação do estado tripleto (T_1) da molécula para seu estado fundamental (S_0).

Baseando-se no Diagrama de Jablonski, a eficiência (rendimento) do efeito fotodinâmico na TFD em relação ao alvo (por exemplo, alguns componentes das células tumorais) pode ser representado pela equação:

$$\Phi_{\text{TFD}} = \Phi_T \frac{k_{q1}[\text{O}_2]}{k_T^0 + k_{q1}[\text{O}_2]} \times \frac{k_2[\text{alvo}]}{k_{\Delta g} + k_{q2}[\text{alvo}] + k_2[\text{alvo}]}$$

onde Φ_T - rendimento quântico do estado tripleto do fotossensibilizador;

k_{q1} - é a constante de supressão do estado tripleto do fotossensibilizador pelo oxigênio;

k_T^0 - constante de decaimento do estado tripleto na ausência do oxigênio;

k_2 - constante bi-molecular da reação entre $^1\Delta_g$ e o alvo;

$k_{\Delta g}$ - constante de decaimento do $^1\Delta_g$ na ausência do alvo;

k_{q2} - constante de supressão do $^1\Delta_g$ pelo alvo, sem produzir reação.

Deste modo, pode-se inferir que a eficácia da TFD em destruir alvos celulares é limitada por diversos processos concorrentes que diminuem o rendimento quântico do estado tripleto e da reação do $^1\Delta_g$ com o alvo e essa limitação é causada pela perda da energia de excitação do fotossensibilizador sem produzir o efeito fotodinâmico eficientemente.

O rendimento quântico de tripleto típico de um fotossensibilizador está entre 0,3 a 0,7 [Bonnett, 2000]. Por outro lado, as mudanças no ambiente, como a presença de outras moléculas ou o aumento da força iônica, podem alterar as características dos processos de perda de energia do composto e deste modo reduzir seus rendimentos quânticos. Um caso típico é a diminuição do tempo de vida e do rendimento quântico de tripleto dos fotossensibilizadores devido à sua agregação.

As limitações dos mecanismos baseados em reações de espécies excitadas podem ser contornadas através de caminhos alternativos que incluam a formação de espécies reativas energeticamente estáveis (não excitadas) como, por exemplo, os radicais livres. Um radical livre pode ser definido como *qualquer espécie capaz de uma existência independente que contenha um elétron desemparelhado* [Maxwell e Lip, 1997]. Esta situação torna esta espécie altamente reativa. A estabilização do radical apenas ocorre pela oxidação ou redução das moléculas vizinhas. Entretanto, a molécula atacada possuirá um elétron desemparelhado se tornando, por sua vez, uma espécie radical. Eventos subsequentes dependem da reatividade do alvo: se moléculas adicionais forem atacadas haverá a propagação de uma reação em cadeia de formação de radicais livres. Deste modo, a existência de um único radical livre no meio poderá iniciar uma cascata de reações redox de transferência de elétrons

[Maxwell e Lip, 1997]. Estas reações ocorrendo nas vizinhanças de tecidos tumorais podem induzir à destruição destes tecidos.

Recentemente novas modalidades de terapias que se utilizam de compostos fotoativos que liberam outras espécies reativas, tais como o radical óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) ou o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), têm se apresentado como uma promissora alternativa no combate de doenças, inclusive o câncer [Kerwin et al., 1995; Kroncke et al., 1997; Wink et al., 1998; Wink e Mitchell, 1998; Korbélik et al., 2000].

1.3 - AS ESPÉCIES REATIVAS OXIGÊNIO SINGLETO ($^1\Delta_g$), ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\bullet-}$) E ÓXIDO NÍTRICO ($\text{NO}^\bullet$)

O oxigênio molecular tem sua reação com as biomoléculas restringida por spin, pois o oxigênio é uma molécula diatômica que, em seu estado fundamental, se apresenta no estado tripleto ($^3\text{O}_2$), possuindo dois elétrons no orbital antiligante π^* . Os dois elétrons possuem spins paralelos de modo que o $^3\text{O}_2$ pode oxidar outra molécula aceitando uma par de elétrons destas moléculas.

As espécies reativas de oxigênio (**ERO** 's) são importantes biologicamente devido às suas reações com as biomoléculas:

O **oxigênio singleto** ($^1\Delta_g$) é uma espécie que possui a restrição de spin aliviada através do movimento de um elétron desemparelhado, tornando-o emparelhado. Ele é uma das mais importantes moléculas do sistema biológico, não possui elétron desemparelhado e assim não é um radical, mas sim uma espécie altamente reativa. Ele possui um excesso de energia e é formado quando o oxigênio molecular $^3\text{O}_2$ absorve energia ≥ 94 kcal/mol, transicionando para o estado excitado singleto através do cruzamento intersistemas (ISC). O $^1\Delta_g$ é instável e decai para o estado fundamental tripleto $^3\text{O}_2$ emitindo o excesso de energia na região do infravermelho, em ~ 1270 nm. Esta emissão é a forma mais aceita experimentalmente de se provar a formação de $^1\Delta_g$ [Cadenas e Sies, 1984; Bonnett, 2000]. O $^1\Delta_g$ em solução aquosa possui um tempo de vida entre $2 \mu\text{s}$ [Bonnett, 2000] e $6 \mu\text{s}$ [Dolphin, 1994] e seu tempo bioquimicamente ativo é de $\cong 250$ ns no citoplasma e $\cong 100$ ns na região lipídica

das membranas; seu alcance difusional é da ordem de 45 nm no meio celular [Ochsner, 1997]. Foi postulado que o $^1\Delta_g$ é o agente citotóxico responsável pela fotoinativação ou morte das células tumorais, resultando em danos das membranas celulares, da mitocôndria, lisossomos e núcleos celulares, resultando em morte celular [Ochsner, 1997].

Como a energia de formação do $^1\Delta_g$ é baixa (7900 cm^{-1}) o fotossensibilizador poderá ter uma energia de tripleto também baixa e mesmo assim ser formado o estado excitado $^1\Delta_g$. Por isso para se excitar o sensibilizador podem ser usados os fótons de comprimento da onda $>600 \text{ nm}$ onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes.

A penetração de luz no tecido biológico é dependente do comprimento de onda da luz, pois cada comprimento de onda da luz alcança diferentes profundidades. Por exemplo na pele humana a penetração é $\approx 2,5 \text{ mm}$ para 400 nm ; $\approx 3,5 \text{ mm}$ para $500\text{-}550 \text{ nm}$ e $\approx 1\text{-}2 \text{ cm}$ para $630\text{-}650 \text{ nm}$ [Ochsner, 1996; Jori, 1996].

O **ânion radical superóxido** ($O_2^{\bullet-}$) é uma das espécies reativas do oxigênio, além do oxigênio singlete, que pode ser induzida através da ação da luz sobre um fotossensibilizador e que possui um importante papel bioquímico em vários processos biológicos, tais como o envelhecimento, o câncer ou a resposta inflamatória, que são considerados resultantes da ação de espécies reativas do oxigênio. O $O_2^{\bullet-}$ é considerado como uma das principais causas dos danos biológicos [Suzuki, 1993] através de reações de peroxidação de diversos compostos, produzindo os radicais destes compostos. Estes processos levam à peroxidação de lipídios, à destruição dos agregados de Fe-S dentro das enzimas, à inibição da SOD (superóxido dismutase) e alteram as correntes de íons através da membrana da mitocôndria [Kroncke et al., 1997]. Estes processos podem causar danos irreversíveis às células, destruindo-as. A produção do ânion superóxido depende da reação redox entre o fotossensibilizador e o substrato. A energia necessária para produzir esta reação depende da característica redox dos reagentes e pode ser bastante baixa.

O **Anexo II** apresenta os estados energéticos e distribuições eletrônicas de algumas formas de oxigênio.

O **óxido nítrico** ($NO^{\bullet}$) é um mediador endógeno em numerosos processos fisiológicos nas células dos mamíferos e possui efeitos distintos e,

eventualmente, contraditórios. Suas implicações fisiológicas abrangem desde (i) **proteção**, agindo como antioxidante, na agregação dos neutrófilos ou inibindo a adesão de leucócitos; (ii) **regulatória**, tais como na regulação da pressão sangüínea, na transmissão sináptica cerebral e formação da memória [Kerwin et al., 1995; Miranda et al., 2000], atuando em processos de relaxamento muscular e vascular, através do fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF) [Wink e Mitchell, 1998]; e (iii) **deletéria**, como na inibição da função enzimática, na indução da peroxidação lipídica, e está envolvido nos processos de morte celular, dano ao DNA ou no bloqueio da respiração celular [Wink e Mitchell, 1998]. O NO• faz parte do sistema imunológico na defesa contra parasitas intracelulares, micróbios ou células cancerosas, podendo agir diretamente, através de sua ação redutora ou através dos produtos de sua ação [Kerwin et al., 1995; Wink e Mitchell, 1998]. O NO• se apresenta em baixas concentrações nos sistemas biológicos, tipicamente entre 10-400 nM. O NO• reage com o oxigênio formando o composto dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^\bullet$):

$$2\text{NO}^\bullet + \text{O}_2 \xrightarrow{k} \text{NO}_2^\bullet \quad (k \approx 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ em soluções aquosas}),$$

produto altamente oxidante e deste modo considera-se que a toxicidade do NO• *per se* está em concentrações em torno de 1 μM [Beckman, 1996].

As propriedades do NO• na biologia do câncer também são contraditórias, pois ele pode promover o tumor aumentando sua angiogênese, diminuindo a resposta imune ou prevenindo a infiltração de leucócitos. Por outro lado a partícula possui propriedades antitumorais através de seus efeitos citotóxicos, citostáticos e antimetastáticos [Wink e Mitchell, 1998]. Estima-se que concentrações de NO• entre 4-5 μM alteram a corrente de íons através da membrana plasmática. O NO• tem a mitocôndria como um de seus principais alvos celulares [Kroncke et al., 1997].

Uma das principais características do NO• para seu potencial sucesso terapêutico é que ele pode dar início a várias reações em cadeia com outras espécies de moléculas, gerando diversas espécies de radicais que induzirão a peroxidação dos lipídios da membrana celular, podendo inclusive destruí-la. Este efeito poderá dar uma importante contribuição na terapia de doenças, em particular o câncer [Kerwin et al., 1995; Kroncke et al., 1997; Wink e Mitchell, 1998; Korbelik et al., 2000].

O efeito tóxico do NO• sobre as células pode ser avaliado ao se considerar a sua reatividade com outras espécies [Kroncke et al, 1997]:

a) O óxido nítrico poderá reagir com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), liberando o oxigênio singlete (¹Δ_g);

b) O NO• pode reagir com o superóxido radical produzindo o ânion peroxinitrito (OONO⁻), produto altamente reativo, através da reação:

c) A reação do NO• com o oxigênio molecular pode ocorrer *in vivo*, produzindo espécies altamente reativas do nitrogênio, tais como o peroxinitrito radical (ONOO•), o •NO₂ e o dinitrogênio trióxido (N₂O₃).

A detecção direta do NO• pode ser obtida através de sua reação com o ozônio, resultando em uma reação quimioluminescente com emissão na região espectral >600 nm [Moncada et al., 1991].

Compostos que liberam NO• necessitam de luz de mais energia para a fotossensibilização (λ ≤ 400 nm), região espectral onde os tecidos biológicos não são transparentes. Esta séria limitação ao uso destes compostos pode ser vir a ser contornada através da mudança na estrutura dos atuais fotossensibilizadores, fazendo com que eles absorvam em outra faixa espectral mais adequada.

A produção das diversas espécies reativas através da ativação de um fotossensibilizador depende da estrutura do composto e do mecanismo de formação da espécie reativa. Oxidantes fortes como vários ERO's podem danificar as biomoléculas e as estruturas celulares das quais elas fazem parte. Dentre as mais importantes estruturas celulares suscetíveis às ações dos radicais livres estão as cadeias laterais dos ácidos graxos dos lipídios nas diversas membranas da célula, especialmente nas membranas das mitocôndrias (as quais estão diretamente expostas ao ânion superóxido produzido durante a respiração celular) [Halliwell e Gutteridge, 1990].

1.4 - FOTOSSENSIBILIZADORES ATUALMENTE UTILIZADOS EM TFD

Os fotossensibilizadores atualmente utilizados clinicamente em TFD são os derivados de hematoporfirina e muitos outros estão em diferentes fases de desenvolvimento laboratorial ou clínico.

O primeiro produto comercial aplicado em TFD foi o Photofrin®, composto formado por uma mistura de derivados de hematoporfirina. A primeira aprovação do Photofrin por uma agência de saúde foi obtida em 1993 no Canadá [Allison et al., 2004]. Aprovações subseqüentes foram obtidas na Holanda e França para tratamento de estágios avançados de câncer de esôfago e pulmão; na Alemanha para tratamento inicial de cânceres de pulmão; no Japão para tratamento de estágios iniciais de cânceres de pulmão, esôfago, gástrico ou cervical. Somente em 1998, a *Food and Drug Administration* –FDA dos EUA aprovou o Photofrin para uso em estágios iniciais de câncer de pulmão e câncer de esôfago em estágios avançados. O Photofrin, apesar de possuir várias propriedades benéficas, apresenta a desvantagem farmacocinética de se acumular na pele, ocasionando fotossensibilidade, principalmente sob Sol forte, podendo agir por mais de seis semanas no organismo. Além disso, a proporção mais efetiva deste fármaco incorporado ao tecido doente em relação ao saudável ocorre em aproximadamente 48 horas após a injeção da droga provocando, eventualmente, a necessidade de hospitalização do paciente dois dias antes da irradiação. Outra desvantagem é o fato de que o comprimento de onda de luz necessário à excitação do composto não ser o ideal, pois o Photofrin possui pequena absorção na região de comprimento de onda entre 600 e 800 nm, onde os tecidos são relativamente transparentes à luz. Na região abaixo de 600 nm, a efetividade com que ocorre a penetração de luz é pequena devido ao espalhamento e a presença de cromóforos endógenos, principalmente, a hemoglobina. A composição química do Photofrin é uma mistura de oligômeros o que prejudica o entendimento dos mecanismos de ação e farmacocinética [Piette et al., 2003; Allison et al., 2004]. Além disto, a droga é cara e a iluminação requer o uso de lasers de alta potência de custo elevado. Desta maneira, a aplicação de TFD tem sido restrita a grandes centros médicos, dificultando tratamentos seguidos em clínica médica comum [Tardivo et al., 2005]. O Photogen e o Photosan são marcas comerciais de produtos similares ao Photofrin. Outros fotossensibilizadores, tais como as ftalocianinas ou a protoporfirina IX, têm sido testados com resultados animadores; e o Visudyne, uma verteporfina, tem sido aplicada clinicamente na área oftalmológica contra a degeneração da mácula.

Dentro deste contexto, existem atualmente vários grupos de pesquisa atuando na síntese, caracterização ou aplicação de novos compostos fotossensíveis para uso em TFD, tanto no mundo quanto no Brasil.

1.5 COMPOSTOS NITROHETEROCÍCLICOS

Recentemente novos compostos fotoativos estão em desenvolvimento, tais como os complexos de rutênio ou os compostos nitrosilados, nitrofuranos, que induzem a formação de espécies reativas, dentre eles o ânion superóxido, o óxido nítrico ou o radical hidroxil [Suzuki, 1993; Makings e Tsien., 1994; Wood et al., 1996, Makareyeva et al., 1997; Shishido e de Oliveira, 1998]. O uso terapêutico destes novos compostos esta em franco desenvolvimento e muitos compostos estão em fase de testes laboratoriais.

Dentre os compostos citados acima são de especial interesse os compostos derivados de nitrofuranos, tais como a nitrofurantoina, a furacilina, o furagin ou o quinifuril [Suntres e Shek, 1992; Borisevitch e Degterev, 1992]. O interesse nestes compostos é motivado pela sua bio- e fotoatividade.

A aplicação dos compostos nitroheterocíclicos na medicina iniciou-se com os trabalhos de Dodd e Stillman em 1944, que descobriram as primeiras propriedades bactericidas destes compostos [*apud* Borisevitch e Degterev, 1992]. Eles apresentam ativação associada à sua redução química/biológica com a mais extensa aplicação clínica e esta redução é um pré-requisito de toda sua atividade biológica [Jager et al., 1997; Tocher, 1997]. A redução do grupo nitro na ausência de oxigênio está associada à sua toxicidade seletiva e a possíveis ações mutagênicas, pois o composto reduzido causa a desestabilização ou até mesmo a quebra da hélice do DNA [Hogg e Kalyanaraman, 1999]. Estes compostos são empregados como agentes quimioterápicos no tratamento de várias enfermidades, inclusive o câncer [Muller, 1986; Biaglow, 1986; Ramakrisna Rao et al., 1988; Verovskiy et al., 1990].

O uso farmacológico dos compostos nitroheterocíclicos (nitrofuranos) é limitado por sua toxicidade para o organismo, devido ao seu metabolismo [Degterev et al., 1993; Borisevitch e Degterev, 1992; Makareyeva et al., 1997]. Por outro lado, sua alta toxicidade pode provocar a destruição das fontes de patologias ao agir diretamente sobre os sítios de inflamação ou sobre células cancerosas.

As atividades bactericidas e antiinflamatórias dos compostos nitroheterocíclicos são bastante estudadas [Suntres e Shek, 1992; Degterev et al., 1993, 1999a,b; Jager et al., 1997; Makareyeva et al., 1997]. Foi descoberto também que a fotoativação dos nitrofuranos provoca efeitos colaterais, tais como reações alérgicas e anemias hemolíticas [Borisevitch e Degterev, 1992].

1.6 – O QUINIFURIL

O Quinifuril, que será o objeto de estudos desta Tese, é representante da família de derivados de *5-nitrofurano-etenil-quinolina* (derivados de 5-nitrofurano). O Quinifuril foi sintetizado da década de 1970 por Dr.N.M. Sukhova (Instituto de Síntese Orgânica, Academia de Ciências de Riga, Letônia) com o objetivo de desenvolver novos compostos antitumorais. Ele possui intensa absorção óptica na região visível e sua irradiação na região visível induz a sua fotodegradação, mas este processo não estava ainda bem estudado.

O Quinifuril induz a liberação de óxido nítrico (NO^*) e do ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ao ser metabolizado [Degterev et al., 1989, 1990, 1993, 1997, 1999a, b; Borisevitch e Degterev, 1992]. O uso terapêutico do Quinifuril é limitado por seu rápido metabolismo nos tecidos normais, em particular nos hepáticos. Este rápido metabolismo limita sua eficácia terapêutica e provoca efeitos tóxicos.

O uso terapêutico do Quinifuril tem despertado interesse para o combate a diversas enfermidades e recentemente foi mostrado que o Quinifuril possui intensa atividade contra diversas linhagens celulares, cancerígenas inclusive [Rossa et al., 2003].

Ainda não eram bem conhecidas as propriedades fotoquímicas e fotofísicas do Quinifuril em soluções homogêneas ou na presença dos sistemas modelos e vivos. Assim, as interações do Quinifuril com sistemas microorganizados serão abordadas nesta Tese, utilizando-se de vários métodos espectroscópicos para se obter informações dos seus fotoprocessos em sua interação com os sistemas microorganizados, que poderão fornecer subsídios ao seu uso terapêutico.

1.7 - APLICAÇÃO DE SISTEMAS BIOMIMÉTICOS E DE CULTURA DE CÉLULAS NOS ESTUDOS BIOFÍSICOS.

As micelas têm servido como modelos simplificados de sistemas microorganizados ou de membranas biológicas. As micelas de detergentes são convenientemente formadas de maneira reprodutível e possuem interessantes propriedades de solubilizar alguns tipos de moléculas [Lunardi et al., 2002]. Os detergentes são moléculas de superfície ativa que se auto-associam e se ligam nas superfícies hidrofóbicas de uma maneira dependente da sua concentração. O caráter anfipático dos detergentes é evidente em sua estrutura, que consiste em um grupo cabeça polar (ou carregada) e uma calda hidrofóbica. Os detergentes podem ser iônicos (catiônicos ou aniônicos), não-iônicos ou zwitteriônicos (possuem cargas positivas e negativas mas são neutros). As propriedades dos detergentes são dependentes da natureza e estereoquímica de sua cabeça polar e calda. Os monômeros dos detergentes podem se associar, formando estruturas microorganizadas (as micelas) a partir da sua concentração micelar crítica (CMC), tomando formas como esferas [Garavito e Ferguson-Miller, 2001]. Em concentrações abaixo da CMC os detergentes podem formar agregados micelares de estruturas bastante complexas, dependendo da natureza de sua cabeça polar e do ambiente onde estão imersas.

Outro exemplo bastante interessante de sistema modelo é a célula fantasma de eritrócitos (células *ghost*). As células *ghost* são vesículas naturais que mimetizam a estrutura organizacional e funcional de biomembranas, tornando estas estruturas convenientes e vantajosos modelos experimentais [Ierardi et al., 2002]. As células *ghost* são sistemas naturais formados a partir dos eritrócitos (células sanguíneas) esvaziados e re-selados, que possuem uma estrutura organizada formada por: poço aquoso interno/ membrana / ambiente aquoso externo.

Células de linhagens normais ou neoplásicas são também modelos convenientes e mais realistas utilizadas nos estudos biológicos. Elas são cultivadas *in vitro* em laboratório especializados. O cultivo celular consiste em um conjunto de procedimentos que permitem a manutenção e multiplicação das células, preservando suas características genéticas, fisiológicas e bioquímicas. Cada linhagem possui características próprias e assim cada linhagem exige um protocolo específico de manuseio e cultivo. Em linhas gerais as células se proliferam em placas de cultura contendo meio nutritivo e condições adequadas

de temperatura e estocagem. As células normais se multiplicam, no máximo, até 50 gerações e crescem em placas até que toda a superfície da placa esteja recoberta com uma única camada celular. Este processo é controlado pela enzima telomerase, que possui a função de repetir a sequência final da fita do DNA celular, permitindo sua duplicação, até sua inibição pelo contato entre as células, estagio a partir do qual o processo de divisão celular se encerra. As células tumorais por sua vez, não possuem este controle do crescimento, se proliferando indefinidamente, formando os aglomerados celulares [Fresney, 1994; ATCC, 2005].

Uma das mais completas ferramentas de estudos *in vitro* da ação fotodinâmica são os ensaios de fotocitotoxicidade sobre as células em cultura. Estes ensaios podem fornecer informações quantitativas da mortalidade das células, induzida pelas espécies reativas liberadas durante a ativação do fotossensibilizador.

Os métodos mais amplamente utilizados para quantificar a mortalidade celular são realizados através de marcadores da integridade da membrana celular (azul de Trupan) ou da atividade celular (sal tetrazolium MTT).

1.8 – OBJETIVOS DA TESE

1.8.1 – Objetivos Gerais

Tendo em vista a procura de caminhos alternativos para o tratamento através da luz visível de diversas doenças, inclusive o câncer, propôs-se estudar as propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotocitotóxicas da classe de compostos nitroheterocíclicos. Como primeiro modelo experimental, realizou-se o estudo do Quinifuril (2-(5'-nitro -2'- furanil) etenil-4-{N-[4'-(N,N-di metil amino) -1'-metil butil] carbamoil} quinolina) (Figura 1.2) sob a ação da luz visível. Estes estudos foram realizados em soluções homogêneas de diferentes solventes, na interação com sistemas modelo biológicos, tais como os detergentes e suas micelas, e em cultura de células de linhagens normais e neoplásicas.

Estes estudos visaram determinar a potencialidade do composto como agente fotossensibilizador para seu eventual uso em fotoquimioterapia.

Figura 1.2 – Estrutura do Quinifuril.

1.8.2 – Objetivos Específicos

- Estudar a cinética de fotodecomposição do Quinifuril.
- Estudar os fotoprocessos primários que regem suas propriedades transientes, tais como suas constantes de decaimento, de supressão pelo oxigênio e de auto-supressão, em solução aquosa.
- Modelar a cinética de fotodecomposição do Quinifuril.
- Estudar os efeitos da presença de sistemas microrganizados de detergentes e suas micelas sobre seu processo de fotodecomposição e nas suas propriedades espectroscópicas de estado estacionário e transiente.
- Avaliar a fotocitotoxicidade do Quinifuril contra linhagens celulares *in vitro*.

Capítulo 2

2.1 – PRINCÍPIOS BÁSICOS DOS MÉTODOS EXPERIMENTAIS

- **Espectroscopia de absorção ótica**

A absorção ótica é um dos principais testes realizados em amostras desconhecidas que absorvem luz. A absorção ótica (A) é dependente da concentração ($[C]$) da amostra, do comprimento de onda (λ) incidente e do caminho ótico (l) que a luz percorre na amostra. A Lei de Lambert – Beer relaciona estas grandezas [Calvert e Pitts, 1966]:

$$A = \log (I_0 / I_t) = \varepsilon(\lambda)l[C] \quad (2.1)$$

onde $\varepsilon(\lambda)$ é o coeficiente de absorção molar ($M^{-1}cm^{-1}$). O coeficiente $\varepsilon(\lambda)$ é uma característica intrínseca do composto.

O coeficiente de absorção molar ε é medido através da variação da absorbância da amostra num comprimento de onda específico com a variação da sua concentração. Geralmente o ε é medido no máximo comprimento de onda do composto (λ_{max}).

Neste trabalho, os espectros de absorção foram registrados usando o espectrofotômetro Beckman DU 640.

- **Espectroscopia de fluorescência**

Quando a molécula absorve um fóton de luz, um elétron é promovido do estado fundamental para um estado excitado. Este pode ser o estado excitado de menor energia (por exemplo, S_1) ou de maior energia (S_2 , S_3). A transição mais provável ocorre entre níveis de mesmo spin. Um dos possíveis caminhos de perda de energia por uma molécula é a fluorescência, transição radiativa entre níveis de mesmo estado de spin com emissão de um fóton. Ela é uma ferramenta útil para detecção de compostos que apenas fluorescem em certas condições especiais, tais como quando ligadas a sondas ou após reações químicas que as tornam fluorescentes.

Neste trabalho utilizou-se o espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 55.

- **Espectroscopia de pulso relâmpago de laser (*flash fotólise*)**

A excitação de moléculas por um intenso pulso de luz *flash fotólise* (10^{16} - 10^{18} fótons), tipicamente por um pulso de laser, levam estas moléculas a um estado eletronicamente excitado de energia. Se estes estados excitados transientes de curto tempo de vida forem produzidos em grande quantidade, eles podem ser monitorados possibilitando a determinação dos espectros, tempos de vida, rendimentos quânticos, níveis de energia e outras características de produtos com curtos tempos de vida induzidos pela luz, tais como estados excitados eletrônicos.

A espectroscopia de flash permite o estudo da transição $T_1 \rightarrow T_n$ do tripleto das moléculas excitadas. O diagrama mostra esquematicamente a transição $T_1 \rightarrow T_2$, onde (a) excitação da molécula do estado fundamental S_0 para 1º estado excitado singlete S_1 , através de um pulso de laser; (b) uma vez populado o estado S_1 a molécula pode transicionar para T_1 por ISC; (c) a população de moléculas no estado tripleto é monitorada através da absorção $T_1 \rightarrow T_2$ por uma luz de análise. Como o estado T_1 é transiente, tipicamente da ordem de 0,1-1000 μs , as moléculas decaem, despopulando este estado. Deste modo, o monitoramento da absorção $T_1 \rightarrow T_2$ fornece uma medida do tempo de vida do estado excitado tripleto. A figura abaixo mostra um esquema representativo de um sistema de flash fotólise.

As características mais importantes do sistema de *flash fotólise* são: a duração do pulso de excitação, sua energia e sua região espectral. Os tempos de duração dos pulsos são da ordem entre 10^{-3} a 10^{-9} s e dependem das propriedades específicas do composto a ser analisado e são limitados pelas características do sistema de análise.

A intensidade da absorção diferencial (ΔA) medida no sistema de análise é diretamente proporcional (k) à concentração do composto no estado transiente tripleto (C_T) (Anexo II):

$$\Delta A = kC_T(t) \quad (2.2)$$

O estado tripleto do Quinifuril foi produzido por curtos pulsos de luz (10 ns, 30 mJ/pulso, 5 pulsos/medida) do terceiro harmônico do laser de Nd:YAG (355 nm) do sistema LP900 da Edinburgh Analytical Instruments. O espectro de absorção do estado transiente foi monitorado na região espectral $450 \leq \lambda \leq 750$ nm e os perfis de decaimento em $\lambda=550$ nm usando um sistema de registro padrão. Os efeitos do oxigênio foram estudados em amostras deaeradas por borbulhamento de gás nitrogênio por 5 min.

- **Detecção da fosforescência do $^1\Delta_g$ com resolução temporal**

A produção de oxigênio singleto ($^1\Delta_g$) foi observada através de medidas do decaimento da sua fosforescência em 1280 nm, que surge da transição radiativa do seu estado excitado singleto ao seu estado fundamental tripleto ($^1\Delta_g \rightarrow ^3\Sigma_g^-$).

A transição entre os estados singleto e tripleto ($S \rightarrow T$) é proibida por spin e assim a emissão de fosforescência emitida pelo $^1\Delta_g$ é de baixa intensidade. Deste modo, utilizou-se da técnica de contagem de fóton único (*single photon*), utilizando o espectrômetro SURELETE III modificado para medir $^1\Delta_g$, e um laser Nd:YAG como sistema de excitação (355 nm), com resolução temporal ~ 5 ns. A fosforescência da solução foi monitorada na região espectral entre 1220-1310 nm. Uma vez que o tempo de vida do $^1\Delta_g$ em acetonitrila é muito mais longo que em água, iniciou-se as medidas de detecção do $^1\Delta_g$ em solução de acetonitrila para se obter um espectro de fosforescência distinto. Calculou-se o rendimento quântico ($\Phi_{\Delta_g}^Q$) da produção do $^1\Delta_g$ pela fotoexcitação do Quinifuril em soluções aquosas utilizando-se a porfirina TPPS₄ como referência.

- **Espectroscopia por Ressonância paramagnética eletrônica (EPR)**

A ressonância paramagnética eletrônica (**EPR**) é uma técnica que detecta elétrons desemparelhados, tais como radicais livres ou íons com camadas eletrônicas incompletas, através da absorção da energia da radiação de microondas ($\sim 10^{10}$ Hz) incidente sobre uma amostra imersa num campo magnético intenso (0,3-1,2 T) [Campbel e Dwek, 1984].

Os elétrons possuem momento magnético intrínseco (spin) de $s=1/2$. Na

presença de um campo magnético, o momento magnético tem duas orientações possíveis que possuem energias diferentes, correspondendo aos dois estados possíveis de spin do elétron: $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$. Transições entre os dois estados energéticos de spin podem ser induzidas se radiação eletromagnética oscilante da microonda de comprimento de onda apropriada incidir perpendicularmente a um campo magnético externo de intensidade **H**. A condição de ressonância em medidas de EPR é obtida quando a diferença entre dois estados energéticos de spin (ΔE) é igual à energia da radiação eletromagnética da microonda ($h\nu$):

$$h\nu = g\beta H \quad (2.3)$$

onde g é o fator-g do elétron e $\beta = 0,92 \times 10^{-23}$ J.T (magnéton de Bohr).

O diagrama ilustra a separação dos níveis de energia de elétrons desemparelhados com $s = +\frac{1}{2}$ e $s = -\frac{1}{2}$ frente a um campo magnético de intensidade **H**.

Os radicais livres são espécies paramagnéticas que geralmente têm curto tempo de vida, mas possuem importantes papéis em muitos processos físicos, químicos ou biológicos. Devido ao seu curto tempo de vida, utiliza-se compostos (*spin trap*) que aprisionam estas espécies radicais, formando um radical estável de fácil detecção.

Neste trabalho utilizou-se o espectrômetro de EPR Varian E-4, banda-X (9,47 GHz), com 0,5 G de amplitude de modulação, potência de 10 mW e uma varredura entre 3370-3390 G.

2.2 – OBJETO DE ESTUDO

O Quinifuril é um derivado de 5-nitrofurano (*5-nitrofurano-etenil-quinolina*), sintetizado pela Dr.N.M. Sukhova (Instituto de Síntese Orgânica, Academia de Ciências de Riga, Letônia), de peso molecular 449 g/mol e grau de pureza analítico. Sua estrutura molecular (figura) foi confirmada por medidas de ressonância magnética nuclear no local de sua síntese.

2.3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes: a armadilha de spin (*trap*) TMOOP (1-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-4-oxopiperidina) e seu correspondente radical livre estável Nitroxil, sintetizados por Dr. L. A. Krinitskaya (Instituto de Química- Física –Moscou, Rússia). Supressor de óxido nítrico ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) obtido da Tocris *Inc.* Sonda de nitrito DAN (2,3-diaminonaftaleno) obtido da ICN *Biomedicals Inc.* Epinefrina, acetonitrila, fenalenona obtidos da Merck. Superóxido dismutase (SOD), os detergentes SDS, CTAB e DPS obtidos da *Sigma Chemical Company*. A porfirina meso-tetrasulfonatofenil (TPPS₄) foi obtida da *Porphyrin Products Inc.* Todos os demais reagentes foram obtidos da Merck. Todos os reagentes possuem grau de pureza analítico e foram utilizados como recebidos.

Quinifuril. As soluções foram normalmente preparadas em água ultrapura, dissolvendo uma alíquota (~1-50 µL) da solução estoque (2-40 mM) do composto diretamente numa cubeta padrão de quartzo (1 cm). Testes também foram realizados em tampão fosfato (7,5 mM, pH 7,2) ou em outros solventes, quando expressamente declarados. Utilizou-se água ultrapura de qualidade milli-Q (pH 6; 18,2 MΩ) em todas as preparações aquosas. Todas as amostras foram preparadas em condições de baixa intensidade de luz (lâmpada de segurança vermelha (λ>550 nm) de 40 W), em temperatura controlada

(21°C). O coeficiente de absorção molar (ϵ). As concentrações de Quinifuril nas soluções foram confirmadas através de medidas de absorção ($A_{396} = \epsilon l [Q]$).

Detergentes. Soluções-estoque dos detergentes SDS (dodecil-sulfato de sódio), CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e DPS (N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propanosulfonato) foram preparadas em água e adicionados diretamente à cubeta (2 mL de Quinifuril) com uma micro-seringa ($\leq 50 \mu\text{L}$). A solução era suavemente agitada para a sua homogeneização.

Estudos de fotodecomposição. O Quinifuril foi irradiado por luz na região espectral 350-450 nm usando uma lâmpada de tungstênio (150 W) e um filtro óptico (5-57 KOPP *color glass filter*). A potência efetiva sobre a amostra foi de 22 mW/cm^2 , medida com o radiômetro *Spectra-Physics 407A*. Uma cubeta padrão de quartzo (1 cm) com água foi usada como filtro térmico, para prevenir efeitos colaterais devido ao aquecimento. A fotólise das amostras foi realizada em concentrações variando entre $0,5\text{-}100 \mu\text{M}$, e continuamente homogeneizadas através de um agitador magnético. As cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa e na presença de detergentes foram monitoradas pelo decréscimo da absorção sua banda principal de absorção em 396 nm (solução aquosa) ou em outro comprimento de onda quando expressamente declarado. As soluções em diferentes solventes foram preparadas pela adição de $10 \mu\text{L}$ da solução estoque aquosa do Quinifuril (4 mM) em 2 mL do respectivo solvente. O procedimento de fotólise foi idêntico ao descrito acima.

Cinética de formação de agregados. Estudos foram realizados adicionando-se uma alíquota de detergente na solução de Quinifuril e monitorando-se a absorção óptica em 396 nm por um tempo ≥ 50 minutos (5 segundos/ponto) com o espectrofotômetro Beckman DU 640.

Estudos do estado transiente. Os experimentos de *flash fotólise* em soluções aquosa ou de detergentes foram realizados em cubeta padrão de quartzo (1 cm). Os estados excitados foram obtidos por curtos pulsos de luz (10 ns) do laser de Nd:YAG (355 nm) do sistema LP900 da Edinburgh Analytical Instruments. As amostras deaeradas foram obtidas por borbulhamento de gás nitrogênio (5 min) diretamente na cubeta.

Produção do radical livre ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A formação do radical livre estável **nitroxil** resultou da oxidação do TMOOP devido à fotodecomposição do Quinifuril em solução aerada. Soluções de 76 μM de Quinifuril em tampão fosfato foram irradiadas por mais de 25 min na presença de 1 mM de TMOOP até a completa fotólise do Quinifuril. Imediatamente após a irradiação, 100 μL da solução foi inserida numa cubeta de EPR de quartzo *flat cell* ($l \approx 0,5$ mm) e medido o espectro de EPR. O correspondente radical livre estável foi utilizado para calibração. Os experimentos foram acompanhados dos seguintes controles: (a) a solução de TMOOP foi irradiada sem Quinifuril por 25 min; (b) a solução contendo Quinifuril e TMOOP foram incubados no escuro por 25 min; e (c) a solução contendo Quinifuril e TMOOP foram irradiadas por 25 min na presença de superóxido dismutase (16 μM). No método da *oxidação da epinefrina* a solução de Quinifuril (20 μM) em tampão fosfato (7,5 mM, pH 7,8) foi irradiada na presença de 1,1 mM de epinefrina até a completa fotodecomposição do Quinifuril. A fotodecomposição do Quinifuril foi monitorada em 396 nm e a produção da adrenocroma monitorada pelo surgimento da banda de absorção em 486 nm. Os experimentos foram realizados na presença e na ausência de ar. Quando na presença de ar, os experimentos foram realizados na ausência e na presença de concentrações variadas de superóxido dismutase.

Produção de óxido nítrico ($\text{NO}^{\bullet}$)

(a) ensaio fluorimétrico. Amostras foram preparadas com 2,0 mL de solução aquosa de Quinifuril (24 μM) onde se adicionou 0,2 mL da solução de DAN (0,32 mM) e o pH da mistura foi ajustado para pH 1 pela adição de uma alíquota de HCl. A amostra foi fotolisada com luz visível (350-450 nm). Após a completa fotodecomposição do Quinifuril, a amostra foi mantida por 10 min no escuro e adicionou-se NaOH para a estabilização da reação de formação do NAT. O NAT fluoresce intensamente em 407 nm e sua fluorescência foi monitorada utilizando-se o espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 55 na região espectral 375-550 nm, excitado em $\lambda_{\text{exc}} = 375$ nm. A calibração foi realizada pela medida da intensidade de fluorescência em 407 nm (I_{407}) da solução de NaNO_2 + DAN contendo 0,32 mM de DAN em função da concentração de NaNO_2 .

(b) ensaio quimioluminescente. As medidas foram realizadas utilizando-se o aparato NOAnalyser (SIEVERS modelo 280) equipado com um gerador eletrostático de ozônio (O_3) e uma câmara de reação quimioluminescente (CRC) acoplada a uma cuba do NOAnalyser (diagrama ao lado). A câmara CRC consiste de uma cela de reação de pequeno volume (≈ 20 mL), onde o ozônio é misturado ao NO^* e um tubo fotomultiplicador, termoeletricamente resfriado e sensível a emissões no vermelho, captura os fótons emitidos da reação. O sinal de saída da fotomultiplicadora (em mV) é conectado a uma placa de aquisição de sinal em um computador PC, e fornece uma resposta em tensão×tempo. A sensibilidade do método é maior que uma parte por bilhão v/v. A calibração do equipamento foi realizada antes dos experimentos. O sinal se apresentou na forma de “pulsos”, cujas amplitudes (áreas) foram proporcionais à quantidade de NO^* produzido. A área do sinal, medida em mV×s, foi linearmente proporcional à quantidade de NO_2^- .

(c) relaxamento do músculo anococcígeo. Músculos anococcígeo de ratos Wistar (250-280 gramas) foram dissecados e mantidos em meio nutritivo de Krebs, contendo $100 \mu M$ de nitroarginina (inibidor da NO-sintase) e montados em cubas termostatzadas ($37 \pm 1^\circ C$) para órgãos isolados para registro de contrações isométricas, com o auxílio de um transdutor de força isométricas modelo 7004 acoplado a um sistema de registro modelo *Quartet 9450*, ambos da *Ugo Basile* (Itália). Este sistema possui uma resposta linear a forças mecânicas. A Figura apresenta um esquema da montagem experimental. O tecido muscular foi mantido imerso em repouso por 1 h em líquido nutritivo de Krebs com borbulhamento contínuo da mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e submetido a uma tensão inicial de 1 g, com trocas do líquido nutritivo a cada 15 minutos. Após 1 h de estabilização, foi adicionado fenilefrina ($0,3 \mu M$) para induzir a contração muscular. Na vigência da contração o músculo foi irradiado com o sistema de irradiação (350-450 nm) por 10 s, na ausência e na presença de concentrações

conhecidas de Quinifuril. Todos os procedimentos experimentais foram realizados com iluminação ambiente < 5 lux.

2.4 - Experimentos com cultura de células

Células:

P388D₁: linhagem monócito de macrófago de ratos, obtida da American Type Culture Collection (ATCC N° CCL46), crescidas em cultura de semi-suspensão em meio de Fisher suplementado com 10% de soro de cavalo inativado termicamente em frascos de cultura (175 cm²) a 37°C com 5% de CO₂.

K562: linhagem de leucemia humana (proeritrócitos), originalmente derivadas de pacientes com eritroleucemia, foram fornecida pelo Dr. S. Niewiarowski (Temple University, PA, USA).

NIH3T3: células imortalizadas de fibroblasto de ratos e obtidas da American Type Culture Collection.

As linhagens K562 e NIH3T3 foram cultivadas em semi- suspensão ou em monocamadas, respectivamente, em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 1% l-glutamina, 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL streptomicona, 250 mg/mL Anfotericina-B a 37°C (jaqueta térmica) em uma incubadora de CO₂ (Cellstar, EUA).

Um dia antes do experimento as células (5×10^5 células/mL) foram semeadas em meio de crescimento. O número de células na suspensão foi calculado usando uma câmara de Neubauer (0,0025 mm²). A suspensão foi mantida em estado homogêneo através de agitação suave de uma pulga magnética. Todas as preparações foram feitas sob luz vermelha ($\lambda > 550\text{nm}$, 40W) de baixa intensidade à temperatura ambiente (22°C).

Uma solução estoque (41 mM) de Quinifuril foi preparada em água qualidade milli-Q (MilliPore).

Testes de sobrevivência celular

Teste1: teste de sobrevivência celular baseado no método previamente descrito [Kochevar et al., 1996] de coloração celular utilizando o azul de Trypan (**TB**) como corante para o qual as células vivas são impermeáveis [Kaltenbach et al., 1958]. As células marcadas com o TB foram consideradas como mortas. O número de células mortas foi contado pela câmara de Neubauer com 10µL de

TB adicionado a uma alíquota de 90µL de células retirados consecutivamente da amostra ou do controle após intervalos de tempo apropriados. Este teste foi aplicado para se comparar a citotoxicidade no escuro do Quinifuril e dos produtos finais de sua fotodecomposição contra as células P388.

Teste 2 e Teste 3: baseado no ensaio de **MTT** (Sal tetrazolium) descrito previamente [Rossa et al., 2003]. Neste teste o MTT é reduzido no interior das células vivas, resultando num produto colorido, cuja absorbância é proporcional ao conteúdo de células vivas e pode ser utilizada como um teste da viabilidade celular [Mosmann, 1983]. Para os ensaios de MTT as células foram semeadas em meio nutritivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) contendo 5% de soro fetal bovino (**FBS**) em placas de 96 poços do tipo ELISA e expostas a diferentes concentrações de Quinifuril (0,2; 2,0 e 20µM) por 60 minutos (no escuro) ou por tempos variando entre 10 a 90 minutos quando irradiadas com luz (350-450nm). Ao final do período de exposição à droga as placas eram centrifugadas para peletar as células e o sobrenadante substituído por outro com MTT em tampão PBS (**Teste2**) ou em meio fresco (**Teste3**). Para o **Teste3** as células foram incubadas por um período adicional de 52h (período de duplicação da população de células) com trocas diárias do meio nutritivo, seguidas pelo ensaio de MTT (Teste2). As placas com MTT foram incubadas no escuro por 4 h, após o qual os cristais de MTT-formazan foram dissolvidos em DMSO (dimetil sulfoxido) e a absorção óptica (T) em 570nm foi medida em um leitor de ELISA Dynex MRX (Dynex Technologies Inc.). A densidade inicial de semeadura foi 2×10^4 a 6×10^4 células/poço. A viabilidade celular foi obtida pelo teste de TB no início de cada experimento e foi sempre maior que 96%.

A irradiação das células foi realizada com o sistema de irradiação previamente descrito neste trabalho. As células foram acondicionadas dentro de uma cubeta de quartzo ($1 \times 1 \text{cm}^2$) (Teste1), com o uso de um filtro térmico entre a fonte e as células. A absorção foi medida com um espectrofotômetro Beckman DU 640 (Fullerton, EUA); ou diretamente nas placas de ELISA (Teste2 e Teste3).

O protocolo dos estudos da fotocitotoxicidade do Quinifuril é resumido abaixo.

Amostras (S): O Quinifuril foi adicionado à suspensão de células e a mistura foi imediatamente irradiada por um tempo superior a 60 minutos;

Controle-1 (C1): a suspensão de células foi mantida em tampão fosfato por ≥ 60 minutos no escuro (sem irradiação) e na ausência de Quinifuril;

Controle-2 (C2): a suspensão de células foi incubada no escuro por ≥ 60 minutos na presença de Quinifuril;

Controle-3 (C3): a suspensão de células foi irradiada por ≥ 40 minutos na ausência de Quinifuril.

Estes experimentos foram repetidos 6 vezes.

Teste1×Teste2: Seções de experimentos de mortalidade celular (Teste1) e toxicidade geral (**TE**) foram realizadas em paralelo: as células foram incubadas com Quinifuril em pares de placas de ELISA por 12 h (escuro) ou 1 h (irradiadas). Em cada par uma placa foi submetida à medida do efeito tóxico imediatamente após a retirada da droga (Teste1). Na segunda placa o Quinifuril foi substituído por meio nutritivo e as células foram mantidas em condições de se proliferar pelo tempo necessário a que sua população se multiplicasse por 2-3 vezes: 72 h (K562 e NIHT3T) ou 36 h (P388). Em seguida o meio foi substituído por MTT e o TE medido como a razão de células mortas em relação ao número inicial, como descrito abaixo.

Cálculos e Análise estatística. A dependência do efeito tóxico (TE) em relação à concentração e tempo de ação do Quinifuril sobre a mortalidade celular foi calculado como $TE = \frac{[DC]}{[Células]^{controle}}$, onde $[Células]^{controle}$ é a concentração das células nos poços de controle (células incubadas pelo mesmo intervalo de tempo, sem droga); e $[DC] = [Células]^{controle} - [Células]^{final}$ é a concentração de células mortas no período, onde $[Células]^{final}$ é a concentração de células vivas nos poços expostos à droga [Oertel et al., 2003].

A concentração de células foi medida usando uma curva de calibração feita para células P388 pelo método de MTT. O efeito citotóxico da concentração do Quinifuril (LC_{50}) (concentração para matar 50% das células) foi estimado como $\frac{100 \times (T^0 - T)}{T^0} = 50$, onde T^0 e T são as densidades ópticas dos poços-teste no tempo zero (quando a droga é adicionada) e após um tempo de exposição dos poços-teste à droga [Monks et al., 1991], respectivamente. Os dados foram apresentados como a Média $\pm$ DP de 6 experimentos independentes. As análises estatísticas foram realizadas com o teste-T de Student. O teste de Tukey com intervalo de confiança de 95% foi aplicado para comparar as médias. As análises estatísticas foram realizadas com os programas *InStat software program for Windows* (GraphPads software, San Diego, EUA) e *Origin 6.1* (MicroCal-EUA) .

Capítulo 3

ESTUDO DA FOTOCITOTOXICIDADE DO QUINIFURIL CONTRA LINHAGENS CELULARES P388, K562 E NIH3T3

Tendo em vista que o Quinifuril possui propriedades citotóxicas contra linhagens celulares normais e transformadas na ausência de luz [Rossa et al., 2003] e absorve luz na região visível, iniciou-se o estudo das propriedades do Quinifuril pelos ensaios de citotoxicidade do composto sob irradiação de luz visível (fotocitotoxicidade) contra células em cultura com o propósito de se verificar e quantificar eventuais alterações nestas propriedades citotóxicas.

Neste trabalho foram utilizados dois os ensaios colorimétricos para os testes de citotoxicidade: o teste de exclusão do corante azul de Trypan (**TB**), que marca as células mortas pela perda da integridade da membrana celular, onde se considerou as células marcadas como mortas; e do teste de inclusão do corante (**MTT**), formados pela atividade metabólica celular, onde a quantidade de cristais de *MTT-formazan* foi determinada espectrofotometricamente (em 570 nm), uma vez solubilizado em dimetil sulfóxido (DMSO) [Freshney, 1994], como descrito em Materiais e Métodos.

Nestes estudos foram utilizadas linhagens celulares de leucemia de camundongos (**P388D₁**), de eritroleucemia humana (**K-562**) e células imortalizadas de fibroblasto de camundongos (**NIH/3T3**). Nestes estudos de mortalidade celular as células foram expostas ao Quinifuril, nas condições de ausência de luz (escuro) e irradiada com luz visível por intervalos de tempos pré-estabelecidos, onde se avaliou a sua sobrevivência devido ao dano induzido pela droga. O número total de células sobreviventes foi determinado pelos testes de exclusão com corante TB, onde as células mortas foram contadas; ou o teste de inclusão do corante MTT. Também foram realizados testes de proliferação celular (inclusão do corante MTT): após a remoção da droga, o grupo de células sobreviventes ao tratamento foi mantido em condições adequadas pelo tempo necessário à sua multiplicação por duas ou três gerações. Dentro deste grupo sobrevivente desejou-se distinguir as células que mantiveram sua capacidade de proliferação (crescimento) daquelas que perderam esta capacidade, ou seja, que foram inativadas pelo tratamento.

3.1 - MORTALIDADE DA LINHAGEM P388

A **Figura 3.1** apresenta os efeitos da fotocitotoxicidade do Quinifuril contras as células P388, medidas pelos métodos da exclusão do corante TB, que quantifica o número de células mortas; e o teste de inclusão do MTT, que quantifica o número de células vivas. Observou-se que o número de células mortas aumenta com o aumento do tempo de irradiação luminosa e os experimentos, realizados por diferentes protocolos (Teste1 (TB) e Teste2 (MTT)), apresentaram resultados similares. Os tempos de irradiação luminosa da suspensão de células P388 ($\cong 1 \times 10^6/\text{mL}$) para se atingir 50 % de mortalidade (τ_{50}) foram de $\tau_{50} = 26$ min, medido pelo teste de exclusão do corante TB; e $\tau_{50} = 32,5$ min, medido pelo teste de inclusão do MTT, para suspensões celulares contendo $20 \mu\text{M}$ de Quinifuril. Um total maior que 80% das células morreram após 60 minutos de irradiação. Em contraste com estes dados, foram realizadas medidas de controle que mostraram que ~ 85 % das células sobreviveram a 60 min de irradiação da suspensão na ausência de Quinifuril (**Fig. 3.1**, curva C1), e que um número menor que 10 % morreram em suspensões incubadas com Quinifuril ($20 \mu\text{M}$) por 60 min e mantidas no escuro (**Fig. 3.1**, curva C2). Estes resultados, observados por dois métodos distintos, demonstraram uma elevação significativa do efeito tóxico do Quinifuril sob irradiação sobre as células P388.

Figura 3.1- Fototoxicidade do Quinifuril (20 μ M) contra células P388 de leucemia de camundongos medidas através de dois métodos: de exclusão de corante TB (●) ou inclusão de corante MTT (△) em função do tempo de irradiação. Os tempos para a morte de 50 % das células (τ_{50}) foram estimados em 26 min (TB) e 32,5 min (MTT). **Controles:** células incubadas com Quinifuril no escuro (curva C1, ○, células vivas) e células irradiadas na ausência de Quinifuril (curva C2, ■, células vivas). Em todos os ensaios a concentração de células foi $\sim 1 \times 10^6$ /mL em tampão fosfato, pH 7.4. Outras condições experimentais estão de acordo com o descrito em Materiais e Métodos.

O efeito fotocitotóxico do Quinifuril sob irradiação, medido pelo teste de exclusão de corante TB, foi acompanhado da fotodecomposição do composto (**Figura 3.2A**), monitorado pelo decréscimo da banda de absorção em 396 nm. Observou-se que a presença das células P388 não afetou a cinética de fotodecomposição do Quinifuril (**Figura 3.2B**).

Figura 3.2 - Fotodecomposição do Quinifuril sob irradiação com luz visível (390-500nm). **(A)**: Mudanças espectrais mostrando a fotólise do Quinifuril (20 μ M) na presença de células P388 (teste de TB). A seta mostra a direção das mudanças espectrais. Os números mostram o tempo de irradiação (min). A linha tracejada mostra o espectro de transmissão do filtro utilizado. **(B)** Perfil do decaimento em 396nm da absorbância do Quinifuril devido a sua fotodecomposição (seta, **A**) na ausência (●) e presença (△) de células P388. As condições de irradiação são as mesmas da legenda da **Fig. 3.1**.

3.2 – EFEITO FOTOTÓXICO SOBRE AS CÉLULAS P388

O efeito fototóxico do Quinifuril sob irradiação foi adicionalmente investigado numa série de experimentos em diferentes concentrações de Quinifuril (0,2; 2,0 e 20 μM) usando o método de inclusão do MTT (Teste2). Nestes ensaios as células foram incubadas na ausência e presença de Quinifuril nas mesmas condições. As amostras foram irradiadas e calculou-se o efeito tóxico.

Nos cálculos utilizou-se $TE = [DC] / [Célula]^{\text{controle}}$, onde **TE** é o efeito tóxico sobre as células; [DC] é a concentração de células mortas; e $[Célula]^{\text{controle}}$ é a concentração das células nos poços de controle (incubadas sem Quinifuril pelo mesmo período de tempo).

A **Figura 3.3** mostra a dependência temporal do efeito tóxico TE do Quinifuril contra células P388. Observou-se que a citotoxicidade (TE_{irrad}) do Quinifuril ao ser irradiado (fotocitotoxicidade) foi acentuadamente aumentada quando comparada com a citotoxicidade no escuro (TE_{esc}) na região de concentrações 0,2; 2,0 e 20 μM . Inferiu-se dos dados que as razões $TE_{\text{irrad}}/TE_{\text{esc}}$ entre os efeitos tóxicos após 60 min de incubação do Quinifuril com células P388 foram $(6,6 \pm 1,4)$, $(2,4 \pm 0,7)$, e $(9,9 \pm 2,4)$ para as concentrações iniciais de Quinifuril de 0,2; 2,0; e 20,0 μM , respectivamente. Estes ensaios indicaram que a mortalidade induzida pela irradiação (60 min) de 20 μM de Quinifuril é aproximadamente 10 vezes maior que o composto no escuro no mesmo período.

É importante observar que os valores do TE_{irrad} para 60 min são crescentes de 0,2 para 20,0 μM (9%, 29% e 82%, respectivamente, **Fig. 3.3**), indicando que quanto maior a concentração de Quinifuril irradiado, maior a mortalidade induzida nas células, apesar da razão $TE_{\text{irrad}}/TE_{\text{esc}}$ para 2,0 μM de Quinifuril ter menor valor que para 0,2 μM (2,4 e 6,6, respectivamente).

Figura 3.3- Efeitos tóxicos (TE) tempo-dependente do Quinifuril contra células P388 medidos no escuro (símbolos sólidos) e sob irradiação (símbolos vazados). Concentrações iniciais: 0,2 µM (▲ e △); 2 µM (● e ○); e 20 µM (■ e □). Os experimentos foram realizados em placas de tipo ELISA (96 poços, 2×10^4 células/poço) pelo método de exclusão do corante MTT (Teste2, Materiais e Métodos). As condições de irradiação são as mesmas da legenda da **Fig. 3.1**. Cada ponto representa a Média $\pm$ DP de seis medidas independentes.

3.3 - CONCENTRAÇÃO DE QUINIFURIL PARA A MORTALIDADE DE 50% DAS CÉLULAS (LC_{50})

A **Figura 3.4** mostra os valores da concentração letal de Quinifuril para atingir a mortalidade de 50% das células (LC_{50}), estimados a partir dos dados do efeito tóxico dose-dependente. A partir da distribuição da mortalidade das células para 60 min de incubação com Quinifuril sob irradiação, estimou-se que a mortalidade de 50% das células é alcançada para $LC_{50} \cong 10$ µM de Quinifuril sob irradiação. Realizaram-se paralelamente experimentos que mostraram que a incubação das células com até 20 µM de Quinifuril no escuro por 60 min causou a morte de, no máximo, 15% das células.

Inferese destes dados que a toxicidade do Quinifuril sob irradiação é muito maior do que no escuro. Pode-se supor o Quinifuril (20 μM) apresentou $\text{TE}_{\text{esc}} \cong 10\%$ para 60 min de incubação no escuro devido ao seu metabolismo.

Figura 3.4 –Determinação de LC_{50} : o TE dose-dependente do Quinifuril contra as células P388 medidos no escuro (linha tracejada ■) e sob irradiação (linha sólida □) com Luz para um tempo de incubação de 60 min com Quinifuril. Estimou-se $\text{LC}_{50} \cong 10\ \mu\text{M}$ para o Quinifuril sob irradiação. O Quinifuril no escuro (20 μM) matou apenas 15 % das células para o mesmo tempo de incubação. Os experimentos foram realizados e os valores de TE e LC_{50} foram calculados como descrito em Materiais e Métodos. As condições de irradiação são as mesmas da legenda da **Fig. 3.1**. Cada ponto representa a Média $\pm$ DP de seis medidas independentes.

3.4 – INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DA IRRADIAÇÃO DO QUINIFURIL

Em contraste ao ensaio de inclusão do corante MTT (Teste2), que indica somente o efeito mortífero; o Teste3, também medido através de inclusão do corante MTT, mostra a citotoxicidade completa do Quinifuril, que inclui a inibição da proliferação celular. Estes ensaios foram realizados seqüencialmente, onde se avaliou inicialmente a mortalidade imediata das células após a irradiação ou incubação no escuro por 60 min (Teste2). Posteriormente as células sobreviventes do Teste2 foram mantidas em condições adequadas para sua sobrevivência por 52 horas. Ao final deste período realizou-se a contagem das células vivas (Teste3).

A **Tabela 3.I** resume os resultados obtidos usando estes métodos. Observou-se que diferentes doses de Quinifuril causaram diferentes níveis de mortalidade das células. A mortalidade imediata das células (Teste2) foi avaliada para 0,2 μ M (1,4 % e 9 %) e para 2 μ M (12% e 29%) de morte celular no escuro e irradiada por 60 min, respectivamente. Em contraste, o Teste3 evidenciou que as células sobreviventes do Teste2 não se proliferaram em ~100 %, isto é, permaneceram vivas mas perderam sua capacidade de crescimento quando comparadas com os controles (células irradiadas por 60 min sem Quinifuril ou incubadas em Quinifuril no escuro).

Para suspensões de células contendo 2 μ M de Quinifuril no escuro a mortalidade celular atingiu 12 % (Teste2) e 91 % (Test3), indicando que nesta concentração a mortalidade celular é causada possivelmente pelo metabolismo do composto [Degterev et al., 1993; Rossa et al., 2003].

Estes resultados indicaram que a irradiação do Quinifuril não somente causa a morte imediata das células, mas induziu a inibição da proliferação das células sobreviventes. Estes resultados inéditos são relevantes, pois indicam que a eventual utilização do Quinifuril em TFD pode ser efetiva através de dois caminhos complementares: a morte tumoral e a inibição de seu crescimento.

Tabela 3.I – Efeito tóxico (Teste2) e pós-efeito tardio (Teste3) do Quinifuril contra células P388 após 60 min de incubação da droga com células no escuro e sob irradiação.

[Quinifuril] (μM)	Efeito tóxico (TE)			
	Escuro		Irradiado	
	Teste2	Teste3	Teste2	Teste3
0,2	$0,014 \pm 0,002$	$0,62 \pm 0,11$	$0,09 \pm 0,02$	$*0,99 \pm 0,005$
2	$0,12 \pm 0,02$	$*0,91 \pm 0,08$	$0,29 \pm 0,09$	$*0,96 \pm 0,008$

*P < 0,01 para comparações entre os dados obtidos no escuro e sob irradiação (teste Tukey).

Os efeitos tardios foram medidos 52 h após a droga ter sido retirada da cultura de células. Os valores do efeito tóxico TE foram medidos usando o ensaio de MTT (Teste2 e Teste3) e calculado como descrito em Materiais e Métodos. A concentração de células mortas foi medida imediatamente após a remoção da droga (Teste2) ou após a incubação com meio nutritivo fresco por 52 h (Teste3).

3.5 – AUSÊNCIA DE TOXICIDADE DOS PRODUTOS DA FOTÓLISE DO QUINIFURIL

Ensaio de mortalidade celular (inclusão do corante TB) foram realizados para determinar se os produtos finais da fotodecomposição do Quinifuril (fotoprodutos) podem ser os responsáveis pela elevada toxicidade da droga sob irradiação. Com este objetivo foram realizados dois testes: suspensões de células P388 ($\sim 5 \times 10^4/\text{mL}$) foram incubadas por 100 min com 20 μM de Quinifuril; ou com os fotoprodutos do Quinifuril, onde uma solução de 18 μM de Quinifuril foi previamente fotolisada até a completa extinção da banda de absorção em 396 nm (monitorada espectrofotometricamente) e posteriormente as células foram adicionadas e incubadas.

A **Figura 3.5** mostra que o Quinifuril e os fotoprodutos do Quinifuril possuem baixa toxicidade no escuro, causando a morte de 10% das células para 100 min de incubação. Observou-se que os fotoprodutos do Quinifuril também não são tóxicos para 100 min de irradiação, enquanto que 20 μM de Quinifuril sob irradiação (90 min) causou a morte de 90% das células. Infere-se destes resultados que os fotoprodutos finais da fototransformação do Quinifuril não são os responsáveis pela citotoxicidade do composto.

Figura 3.5- Citotoxicidade do Quinifuril (20 μM) e dos fotoprodutos finais do Quinifuril (18 μM) sobre as células P388 de leucemia de camundongos. As células ($5 \times 10^4/\text{mL}$) foram mantidas em tampão fosfato e Quinifuril nas condições de escuro (● e ○) e sob irradiação (▲ e △), medidos pelo método de exclusão do corante TB. Cada ponto representa a Média $\pm$ DP de 3 medidas independentes.

3.6 –FOTOCITOTOXICIDADE DO QUINIFURIL CONTRA CÉLULAS K562

A **Figura 3.6** mostra os resultados das medidas de citotoxicidade do Quinifuril contra células de eritroleucemia humana K562 como função do tempo de incubação com a droga sob irradiação (**Fig. 3.6A**) e no escuro (**Fig. 3.6B**). Os valores do efeito tóxico **TE** foram calculados como descrito previamente. Células incubadas sem Quinifuril nas mesmas condições serviram como controle em cada série de experimentos. Na ausência do Quinifuril nenhuma quantidade significativa de células mortas foi observada nos poços de controle em 24 h de incubação no escuro ou em 90 min sob irradiação. Em contraste o Quinifuril também apresentou uma maior toxicidade contra as células K562 sob irradiação do que no escuro: para 2 μ M de Quinifuril estimou-se que os tempos para matar 50% das células foram $\tau_{50} = 48$ minutos sob irradiação e $\tau_{50} = 18,5$ horas no escuro, medidos pelo teste de inclusão do corante MTT.

3.7 – FOTOTOXICIDADE GERAL DO QUINIFURIL CONTRA LINHAGENS CELULARES P388, K562 E NIH3T3

A **Tabela 3.II** apresenta os resultados das medidas da mortalidade direta e do efeito tóxico geral (Teste2×Teste3, Materiais e Métodos), realizados simultaneamente para as três linhagens. Os resultados indicaram que para 1 h de irradiação, o efeito deletério do Quinifuril (Teste2) contra todas as linhagens celulares utilizadas é somente comparável ao efeito mortífero alcançado em 12 h de incubação no escuro. Dos resultados inferiu-se que o Quinifuril inibe a proliferação celular tanto no escuro quanto sob irradiação mas a presença da luz aumenta significativamente este efeito. Também se observou que a irradiação diminui grandemente o tempo e as concentrações de Quinifuril necessários para atingir os mesmos graus de mortalidade que no escuro.

Tabela 3.II- Efeito da mortalidade direta e da mortalidade geral do Quinifuril medidas em paralelo (Teste2×Teste3, Materiais e Métodos).

Linhagem celular	[Quinifuril] (μM)	Efeito Tóxico (TE)			
		Escuro (12 h)		Irradiado (1 h)	
		Teste2	Teste3	Teste2	Teste3
P388	2,0	*0,48 $\pm$ 0,1	0,97 $\pm$ 0,16	*0,76 $\pm$ 0,27	0,93 $\pm$ 0,20
	0,2	*0,014 $\pm$ 0,002	n.m.	*0,13 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,24
NIH3T3	2,0	*0,59 $\pm$ 0,13	0,96 $\pm$ 0,01	*0,43 $\pm$ 0,16	0,93 $\pm$ 0,04
	0,2	*0,0 $\pm$ 0,06	0,0 $\pm$ 0,12	*0,35 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,12
K562	2,0	*0,33 $\pm$ 0,1	n. m.	*0,68 $\pm$ 0,15	n. m.

(*) diferenças estatisticamente significantes ($P < 0,01$) entre os resultados do Teste2. Nenhuma diferença significativa foi observada para o Teste3 (células irradiadas e no escuro) em cada série de experimentos.

n. m.: não medido.

A **Tabela 3.III** apresenta os valores medidos dos tempos necessários para que haja 50% de mortalidade celular (τ_{50}), avaliado para três diferentes concentrações de Quinifuril, contra as três linhagens celulares nas situações irradiadas e no escuro. Inferiu-se dos dados que na presença de luz a morte celular é acelerada em relação à situação de escuro para as três linhagens e que a aceleração da mortalidade é maior para a linhagem NIH3T3, ou seja, esta linhagem é mais suscetível aos efeitos mortíferos do Quinifuril ao ser irradiado.

Tabela 3.III- Tempos para atingir 50% de mortalidade celular (τ_{50})			
Linhagem celular	[Quinifuril] (μM)	τ_{50} (min)	
		Escuro	Irradiadas
P388	20,0	231 $\pm$ 51	25 $\pm$ 7
	2,0	350 $\pm$ 118	76 $\pm$ 9
	0,2	1540 $\pm$ 90	96 $\pm$ 11
NIH3T3	2,0	408 $\pm$ 67	34 $\pm$ 18
	0,2	> 500	56 $\pm$ 17
K562	2.0	n. m.	45 $\pm$ 5
n.m. não medido			

3.8 – DISCUSSÃO

O Quinifuril é metabolizado em tecidos normais e por células cancerosas [Rossa et al., 2003; Verovski et al.; 1990]. Provavelmente os mecanismos de morte celular induzidos pelo Quinifuril na ausência de luz são devidos ao seu metabolismo, uma vez que sua biotransformação é acompanhada pela produção de espécies reativas de oxigênio, particularmente o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) [Smirnov et al., 1989; Degterev et al., 1990; Buzukov et al., 1996] e, portanto a morte provavelmente se dá por stress oxidativo.

Baseados nestes resultados de mortalidade celular pode-se inferir que o Quinifuril sob irradiação causa a morte das células e também a inibição da proliferação das células sobreviventes ao tratamento. É necessário enfatizar que ambos os efeitos (morte e inibição) são significativamente aumentados sob

irradiação luminosa do composto. Verificou-se que a morte celular foi alcançada com concentrações tão baixas quanto 0,2 μ M de Quinifuril; que a mortalidade é aumentada em até 6 vezes quando a luz esta presente e também que os produtos de sua fotólise não são responsáveis por este aumento. Uma conclusão adicional é que o efeito tóxico do Quinifuril sobre as células é devido mais à inibição celular do que à mortalidade celular [Daghastanli et al., 2004a; Daghasanli et al., 2004b]. Estes resultados estão apresentados no **Anexo III**.

A inibição da proliferação celular é um achado inédito que deve ser explorado posteriormente, pois se pode especular que o mecanismo de inibição celular não é devido à necrose celular, o que levaria à morte “imediata” das células, e eventualmente esta associado a algum processo de indução de apoptose celular ou a algum evento sinérgico que induza a apoptose celular ou alterações no DNA ou no maquinário de divisão celular [Wink et al., 1998; Maeda e Akaike, 1998].

Verificou-se que o Quinifuril sofre fotodecomposição ao ser irradiado com luz na região espectral 350-450 nm e que esta degradação é acompanhada da perda de sua banda de absorção em 396 nm. Estes resultados nos motivaram a estudar as propriedades de fototransformação dos Quinifuril para entendermos diversos aspectos desta fototransformação, tais como qual é o mecanismo da fototransformação do Quinifuril e como a fotodecomposição esta associada com a citotoxicidade aumentada do composto na presença de luz. A formação de espécies reativas poderia explicar esta elevada toxicidade do Quinifuril na presença de luz. Deste modo realizamos estudos sobre a ativação do Quinifuril com luz e sua conseqüente promoção a algum estado excitado singleto ou tripleto. Os resultados destes estudos estão apresentados nos Capítulos seguintes desta Tese.

Capítulo 4

ESTUDO DAS PROPRIEDADES FOTOFÍSICAS E FOTOQUÍMICAS DO QUINIFURIL EM SOLUÇÕES HOMOGÊNEAS

Considerações iniciais. Verificou-se experimentalmente que o Quinifuril é um composto solúvel em água que, em concentrações da ordem de 10 mM, não apresenta formação de agregados. As propriedades do Quinifuril em solução, quando estocadas ao abrigo da luz por períodos superiores há 120 dias, em temperatura ambiente ou em gelo (-4 °C), não apresentaram quaisquer alterações relevantes para este trabalho, indicando que o composto é estável (não sofre degradação) ao ser armazenado nestas condições. A presença de sal (NaCl), em concentrações até 0,1M em amostras de Quinifuril em diversas concentrações ($\leq 100 \mu\text{M}$) não apresentaram quaisquer efeitos de agregação ou mudanças nas características espectrais do Quinifuril e assim não foram objeto de estudos desta Tese.

4.1 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR ($\epsilon(\lambda)$) DO QUINIFURIL EM SOLUÇÃO AQUOSA

A **Figura 4.1A** mostra o espectro de absorção do Quinifuril em solução aquosa e o espectro do filtro óptico 5-57 KOPP *color glass filter* utilizado nos experimentos de irradiação com banda de transmissão na região 350-450 nm. O Quinifuril apresenta intensa absorção óptica, sendo sua banda de máxima absorção no comprimento de onda de $\lambda_{\text{max}}=396 \text{ nm}$. O coeficiente de absorção molar (ϵ) do Quinifuril foi determinado na região de concentrações $\leq 30 \mu\text{M}$, através da Lei de Lambert-Beer ($A=\epsilon\ell[Q]$), onde verificou-se que sua banda de absorção principal em 396 nm varia linearmente com a concentração de Quinifuril ($[Q]$) correspondente, medida numa cubeta padrão de quartzo de caminho óptico $\ell=1 \text{ cm}$. O coeficiente de absorção molar do Quinifuril foi avaliado em $\epsilon_{396} = 24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (**Figura 4.1B**).

Figura 4.1 - (A) Espectro de absorção (—) da solução aquosa de Quinifuril (20 μ M) em pH 7,0 mostrando que o máximo de absorção em 396 nm; o espectro de absorção (---) do filtro óptico utilizado nas situações de irradiação do Quinifuril, mostrando que a banda de transmissão do filtro (entre 350-450 nm) coincide com a banda de absorção principal do Quinifuril; (B) Determinação do coeficiente de absorção molar $\epsilon_{396} = 24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ do Quinifuril (Q) em solução aquosa (pH 7,0) a partir da regressão linear ($R=0.9992$; $P<0.001$) da Lei de Lambert-Beer ($A_{396}=\epsilon l[Q]$).

4.2 - ESTUDO DA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL EM SOLUÇÃO AQUOSA

4.2.1 – Fotodecomposição na presença de oxigênio.

A **Figura 4.2A** mostra os espectros de absorção do Quinifuril em solução aquosa em função do tempo de irradiação. A irradiação contínua da solução aquosa (pH 7,0) de Quinifuril, com luz na região espectral 350-450 nm de intensidade 20 mW/cm², produz o fotoclareamento (perda da cor) do Quinifuril indicando a fotodecomposição do seu cromóforo. A fotodecomposição é experimentalmente evidenciada pela diminuição da banda de absorbância em 396 nm em função do tempo de irradiação.

A **Figura 4.2B** mostra a cinética de decréscimo da absorbância em 396 nm em função do tempo de irradiação (seta na Fig. A). Observou-se que perfil da curva cinética de fotodecomposição possui um comportamento de primeira ordem e o decréscimo da absorbância em 396 nm em função do tempo de irradiação foi ajustado através de uma função monoexponencial.

4.2.2 – Fotodecomposição na ausência de oxigênio.

Os espectros de absorção do Quinifuril ao ser irradiado na ausência de oxigênio permanecem idênticos àqueles obtidos na presença de oxigênio (**Figura 4.2A**). Quando o oxigênio é retirado do meio (2 mL de amostra deaerada por borbulhamento de gás nitrogênio por 5 minutos) e para a mesma concentração de Quinifuril, a fotodecomposição da amostra deaerada ocorre numa velocidade maior, ou seja, o Quinifuril se degrada mais rapidamente ao ser irradiado na ausência de oxigênio do que na sua presença. Este efeito fica evidenciado pela queda mais acentuada do perfil da absorbância em 396 nm na ausência de oxigênio do que na sua presença (**Fig. 4.3**).

Figura 4.2 - (A) Espectros de absorção de uma solução aquosa de Quinifuril (20 μM, pH 7,0) na presença de ar (1 atm $[O_2] \approx 3 \times 10^{-4}$ M a 24 °C) ao ser irradiado na região 350-450nm em função do tempo de irradiação. A banda de absorção principal do Quinifuril em 396 nm decresce em função da irradiação, mostrando sua fotodecomposição. **(B)** Perfil da curva cinética de fotodecomposição da solução de Quinifuril em função do tempo de irradiação. O decréscimo do máximo em 396 nm (seta na Fig. A) devido à irradiação possui um comportamento monoexponencial (linha sólida).

4.2.3 - Velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril.

A **Figura 4.3** compara as curvas cinéticas de fotodecomposição de duas amostras idênticas de Quinifuril (20 μ M) irradiadas com luz na presença e na ausência de oxigênio (deaerada), onde se observa que o Quinifuril em solução deaerada se degrada mais rapidamente que na presença de ar.

A quantificação do processo de fotodecomposição foi realizada pelo cálculo da velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril que foi determinada da observação de que a absorção óptica (**A**) da amostra decresce a partir da absorção inicial (**A**₀) como uma função do tempo **t** de irradiação, através de uma função monoexponencial. A velocidade inicial de fotodecomposição V_i foi obtida empiricamente através do ajuste numérico monoexponencial (Origin® 6.1 - OriginLab Corp. EUA) do perfil de decaimento da absorbância em 396 nm medida em função do tempo da irradiação. Como a absorção e a concentração da amostra estão vinculadas pela Lei de Lambert-Beer ($A_{396}(t) = \epsilon l [Q](t)$), o cálculo de V_i fornece o consumo de Quinifuril, devido à sua fotodecomposição, durante o tempo de irradiação da amostra. Do ajuste monoexponencial do decréscimo da absorção, faz-se a sua primeira derivada numérica e toma-se o valor da derivada em $t=0$:

$$V_i = - \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} \quad (1)$$

Os cálculos de V_i , através da Expressão **(1)**, forneceram os valores da velocidade de fotodecomposição de uma amostra de Quinifuril (20 μ M) na presença e na ausência do oxigênio: $0,92 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ e $3,86 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$, respectivamente. Infere-se destes dados que a velocidade de fotodecomposição V_i na ausência de oxigênio é maior que na sua presença (1 atm, $[O_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ a 24 °C), ou seja, a fotólise do Quinifuril, devido à sua irradiação, é acelerada na ausência do oxigênio na solução.

Fig. 4.3 – Curvas cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril (20 μM) em solução aquosa (pH 6) na presença de ar (■) e deaerada (O). As amostras foram irradiadas com luz na região espectral 350-450 nm, de intensidade 20 mW/cm^2 . As velocidades de fotodecomposição do Quinifuril V_i , calculadas através da Expressão (1), foram $3,86 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ e $0,92 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ na ausência e presença de ar, respectivamente. Este resultado indica que a ausência de oxigênio acelera a fotólise do Quinifuril.

4.3 - VELOCIDADE DE FOTODECOMPOSIÇÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO QUINIFURIL

A **Figura 4.4** apresenta os valores da velocidade de fotodecomposição (V_i), calculados através da Expressão (1), de soluções aquosas de Quinifuril (pH 6) em diferentes concentrações (entre 0,5-100 μM) na presença e ausência de oxigênio. Infere-se destes dados que velocidade de fotodecomposição V_i é dependente da concentração do Quinifuril, da presença ou não de oxigênio na amostra e também que quanto maior a concentração do Quinifuril, maior é sua velocidade de fotodecomposição. Outra bateria de experimentos indicou que a dependência de V_i com a concentração de Quinifuril na presença de ar ($[\text{O}_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$) e saturada de oxigênio ($[\text{O}_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) possuem comportamento linear similares em ambos os casos. Por outro lado, nas

amostras deaeradas, esta dependência é mais complexa, aparentando ser quadrática, uma vez que o ajuste obtido foi de 2º grau.

Figura 4.4 - Velocidades iniciais de fotodecomposição V_i em função da concentração de Quinifuril em soluções aquosas ($0,5 \leq [Q] \leq 100 \mu\text{M}$) na presença de ar (□) e deaeradas (●). A dependência de V_i (calculadas pela Expressão 1) em função da concentração de Quinifuril na presença de ar possui um comportamento linear (1º grau) e na ausência de ar o comportamento é quadrático (2º grau). As condições experimentais estão descritas na legenda da Fig. 4.3.

4.4 - ESTADO TRANSIENTE E TEMPO DE VIDA DO TRANSIENTE DO QUINIFURIL

4.4.1 - Caracterização do estado transiente do Quinifuril

A **Figura 4.5A** mostra que a excitação de uma solução aquosa de Quinifuril em 355 nm por pulso de feixe relâmpago de laser (*flash fotólise*) induz a formação de um estado transiente de curto tempo de vida, caracterizado pela absorção na região espectral de 450-700 nm centrado em 550 nm. Medidas análogas indicaram que um produto transiente com espectro similar foi também observado em solvente dioxano.

A **Fig. 4.5B** mostra os perfis típicos de decaimento da absorção em 550 nm do transiente do Quinifuril para amostras em solução aquosa na presença e na ausência de oxigênio. Observa-se que o tempo de vida do transiente aumenta na ausência do oxigênio. O decaimento deste transiente obedece a uma cinética de 1ª ordem (monoexponencial) em ambos os casos, numa escala de microssegundos em solução aquosa. Os perfis do decaimento do estado transiente do Quinifuril foram ajustados por uma função do tipo

$$\Delta D = \Delta D_0 e^{-k_1 t} \quad (2)$$

onde ΔD_0 é a intensidade inicial do transiente e k_1 é a **constante de decaimento** do transiente do Quinifuril. A constante k_1 também pode ser escrita como $k_1 = \frac{1}{\tau}$ e descreve o decaimento temporal do transiente em função da concentração de Quinifuril, onde τ é o tempo de vida do estado transiente do Quinifuril. Verificou-se que a formação do estado excitado do Quinifuril é suprimida pelo oxigênio. Os ajustes de 1ª ordem dos perfis do decaimento do estado transiente do Quinifuril resultaram nos tempos de transiente $\tau = 1,9 \mu s$ e $\tau_0 = 24 \mu s$ na presença e na ausência de oxigênio molecular, respectivamente.

A supressão pelo oxigênio molecular é um processo típico para o estado tripleto [Foley et al., 1997]. Deste modo, pode-se associar estas espécies de curto tempo de vida do Quinifuril como sendo o estado excitado **tripleto** do Quinifuril.

Figura 4.5- **(A)** Dados normalizados comparativos dos espectros de absorção do Quinifuril no estado fundamental (linha sólida, máximo em 396 nm) e no estado excitado tripleto em solução aquosa ($\blacksquare$) e em solvente orgânico dioxano (Δ). O ajuste sigmoidal (linha tracejada) forneceu o máximo de absorção do transiente em 550 nm. **(B)** Perfis do decaimento da intensidade de absorção (ΔD) do transiente do Quinifuril (20 μ M) em solução aquosa na presença de oxigênio (O) e deaerada ($\blacksquare$). Os ajustes monoexponenciais (1ª ordem) dos perfis do transiente (linhas sólidas), através da função $\Delta D = \Delta D_0 e^{-k_1 t}$, forneceram os tempos de vida de tripleto $\tau = 1,9 \mu$ s e $\tau_0 = 24 \mu$ s na presença e na ausência de ar, respectivamente.

O processo de excitação e desexcitação do Quinifuril pode ser assim resumido: o Quinifuril (**Q**) é excitado por um pulso de laser *flash fotólise* em 355 nm, passa pelo estado excitado singleto (**Q_S***), e daí para seu estado excitado tripleto (**Q_T***). O estado excitado do Quinifuril (**Q_T***) retorna ao estado fundamental (**Q**), com taxa de decaimento (desexcitação) **k₁**. O processo pode ser esquematicamente visualizado como:

4.4.2 – Determinação da energia do estado excitado tripleto (**E_T**) do Quinifuril

Compostos aceitadores de energia tripleto suprimem o estado transiente do doador, num processo típico de transferência de energia, com a posterior formação do estado tripleto dos aceitadores [Calvert e Pitts, 1966]. A transferência de energia tripleto-tripletto significa que um doador, em seu estado tripleto eletronicamente excitado (**Q_T***), transfere sua energia para um aceitador (**A**), inicialmente no estado fundamental, com taxa de supressão **k_q**. Este aceitador é levado para seu estado eletronicamente excitado tripleto (**A***), e o doador retorna para seu estado fundamental (**Q**) [Turro, 1978].

A **Figura 4.6** mostra os valores das constantes **k_q** de supressão do estado tripleto do Quinifuril por aceitadores com vários níveis de energia do estado tripleto. Os experimentos de transferência de energia tripleto foram realizados em solvente dioxano, pois neste meio estes compostos aceitadores são solúveis e a transferência de energia é mais eficaz. O processo de supressão do tripleto do Quinifuril (**Q_T***) pelo aceitador (**A**) de energia tripleto, formando o estado tripleto do aceitador (**A_T***), pode ser esquematicamente visualizado como:

A constante de supressão **k_q** é dependente do nível de energia do aceitador **A_T*** em relação ao Quinifuril (**Tabela 4. I**). Assim, para diferentes energias de excitação dos aceitadores, serão encontrados valores específicos para a constante de supressão **k_q**.

Verificou-se que para aceitadores possuindo energias de tripleto maiores que 18200 cm^{-1} , a transferência da energia do tripleto do Quinifuril para estes aceitadores não se efetivou e, conseqüentemente, a constante k_q é essencialmente nula. Deste modo, inferiu-se que a energia do estado tripleto do Quinifuril é $E_T = 18200 \pm 500\text{ cm}^{-1}$ ($218 \pm 6\text{ kJmol}^{-1}$).

Tabela 4.I - Constantes de supressão (k_q) do estado tripleto do Quinifuril por aceitadores de energia tripleto [Calvert e Pitts, 1966].

Aceitador	$E_T\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$k_q\text{ (}10^{-9} \times \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$
Naftaceno	10250	$2,7 \pm 0,4$
Azuleno	12000	$2,5 \pm 0,4$
9,10-Dibromoantraceno	14112	$1,3 \pm 0,2$
Eosina	15000	$1,2 \pm 0,2$
Acridina Orange	17390	$2,0 \pm 0,3$
1,2-Benzpireno	18480	$(4,2 \pm 0,9) \times 10^{-2}$
Fluorenona	18860	$< 10^{-4}$
Naftaleno	21300	$< 10^{-4}$
9H-Fluoreno	23750	$< 10^{-4}$

4.4.3 – Dependência do tempo de vida tripleto do Quinifuril com a sua concentração

Experimentos realizados em soluções aquosas deaeradas para diferentes concentrações de Quinifuril ($70 \mu\text{M} \geq [\text{Quinifuril}] \geq 7 \mu\text{M}$) mostraram que os valores da constante de decaimento do tripleto do Quinifuril (k_1) possuem uma dependência linear da concentração do Quinifuril neste intervalo. A **Figura 4.7** mostra a dependência de k_1 com a concentração de Quinifuril.

Observou-se que a constante de decaimento k_1 possui uma dependência linear com a concentração de Quinifuril e pode ser escrita [Samanta et al., 1996] como:

$$k_1 = k_0 + k_{q1}[Q]_i \quad (3)$$

onde k_0 é constante de decaimento para diluição infinita ($[Q]_i \rightarrow 0$) e k_{q1} é constante de auto-supressão de segunda ordem e pode ser associada à supressão bimolecular entre uma molécula do Quinifuril no estado tripleto e outra no estado fundamental.

Os valores de k_0 e k_{q1} foram calculados através da regressão linear (**Figura 4.7**) e foram obtidos os valores $k_0 = 1,8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ e $k_{q1} = 2,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

Observou-se que o estado excitado tripleto do Quinifuril é suprimido pelo oxigênio molecular (**Figura 4.5B**). Esta cinética de supressão pelo oxigênio pode ser escrita como:

$$k_2 = k_1 + k_{q2}[O_2] \quad (4)$$

onde k_1 é a constante de decaimento na ausência de oxigênio; e k_{q2} é a *constante bimolecular de supressão do tripleto* do Quinifuril pelo oxigênio.

O valor da constante k_{q2} foi obtido através de medidas dos tempos de vida do tripleto do Quinifuril na presença de diferentes concentrações de oxigênio no meio: na presença de ar ($[O_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$), saturada com oxigênio ($[O_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$) e na sua ausência ($[O_2] \cong 0 \text{ M}$). O valor da constante bimolecular de supressão do Quinifuril pelo oxigênio, calculada através da Expressão (4), é $k_{q2} = 2,0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

4.5 - MODELO CINÉTICO DA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL EM SOLUÇÃO AQUOSA

4.5.1 - Processos de fototransformação do Quinifuril

Baseados nos resultados experimentais observados e descritos acima se pode escrever os esquemas de fototransformações (FT) do Quinifuril:

1) Transição do estado fundamental singlete do Quinifuril ($Q(S_0)$) para seu primeiro estado excitado singlete ($Q^*(S_1)$) pela absorção de um fóton de luz de energia $h\nu$, com taxa β :

2) Uma vez populado o estado excitado $Q^*(S_1)$, parte destas moléculas retornam ao estado S_0 através do processo de conversão interna (IC), com taxa k_{IC} . Não é observada nenhuma emissão de fluorescência:

3) Pelo processo de conversão intersistemas (ISC), uma parte das moléculas em $Q^*(S_1)$ popula o estado excitado tripleto (T_1), com taxa k_T :

4) Uma parte das moléculas despopolam o estado T_1 , retornando ao estado S_0 , com taxa k_0 :

5) Baseando-se na dependência da velocidade de fotodecomposição V_i com a concentração de Quinifuril, pode-se concluir que a interação entre uma molécula no estado tripleto e outra no estado fundamental S_0 diminui o tempo de vida do estado T_1 , degradando o composto, produzindo Produtos1:

Acreditamos que a fototransformação **FT₅** seja parcialmente responsável pela fotodecomposição do Quinifuril.

6) Observou-se que o oxigênio molecular (O_2) suprime o estado tripleto do Quinifuril, reduzindo a velocidade de fotodecomposição do Quinifuril pela supressão da sua energia do tripleto. Como o processo de supressão do estado tripleto de fotossensibilizadores é o responsável pela geração do oxigênio singleto ($^1\Delta_g$) [Foote, 1991; Ochsner, 1997; Bonnett, 2000], pode-se supor a possível geração do $^1\Delta_g$ pela excitação do Quinifuril:

4.5.2 - Modelo cinético para os processos de fototransformação do Quinifuril

O esquema cinético de fototransformações do Quinifuril (FT₁ a FT₆), pode ser descrito pelo conjunto de equações que regem estes processos primários, onde as quantidades cinéticas de interesse são as concentrações do Quinifuril no estado fundamental ($[Q(S_0)]$) e no 1º estado excitado tripleto ($[Q(T_1)]$):

1) População e despopulação do estado fundamental $Q(S_0)$:

$$\frac{d[Q(S_0)]}{dt} = -\beta + k_{IC}[Q^*(S_1)] + (k_0 + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (5)$$

onde

$d[Q(S_0)]/dt$	Variação temporal da concentração do estado S_0 .
$-\beta$	Termo devido à irradiação do Q e representa a excitação das moléculas de $S_0 \rightarrow S_1$. O sinal (-) indica que $[Q(S_0)]$ diminui no tempo.
$+k_{IC}[Q^*(S_1)]$	Retorno das moléculas em $S_1 \rightarrow S_0$ pelo processo de IC (sem inversão de spin). Não há emissão fluorescente. O sinal (+) indica o aumento de $[Q(S_0)]$.
$+k_{q2}[O_2][Q^*(T_1)]$	Processo de supressão do estado T e retorno ao S_0 . O sinal (+) indica o aumento de $[Q(S_0)]$.
$+k_0[Q^*(T_1)]$	Retorno $T_1 \rightarrow S_0$ (ISC). O sinal (+) indica o aumento de $[Q(S_0)]$.

2) População e despopulação do estado excitado $Q^*(S_1)$:

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T)[Q^*(S_1)] \quad (6)$$

onde

$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt}$	Varição temporal da concentração do Quinifuril no estado excitado S_1 .
$+\beta$:	Taxa de aumento da população de moléculas no estado S_1 ($S_0 \rightarrow S_1$), devido à irradiação do Quinifuril. O sinal (+) indica que $[Q(S_1)]$ aumenta no tempo.
$-k_{IC}[Q^*(S_1)]$:	Taxa de retorno das moléculas $S_1 \rightarrow S_0$ por IC (sem inversão de spin). O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(S_1)]$.
$-k_T[Q^*(S_1)]$:	Taxa de retorno das moléculas $S_1 \rightarrow T_1$, por ISC. O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(S_1)]$.

3) População e despopulação do estado excitado $Q^*(T_1)$:

$$\frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = k_T[Q^*(S_1)] - (k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (7)$$

onde

$\frac{d[Q^*(T_1)]}{dt}$	Varição temporal da concentração do estado excitado tripleto $[Q^*(T_1)]$.
$+k_T[Q^*(S_1)]$	Taxa de variação da população do estado T_1 ($S_1 \rightarrow T_1$) por ISC. O sinal (+) indica o aumento de $[Q^*(T_1)]$.
$-k_{q1}[Q(S_0)][Q^*(T_1)]$	Supressão do estado T_1 por encontros entre uma molécula em T_1 e outra em S_0 , com taxa k_{q1} . O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(T_1)]$.
$-k_{q2}[O_2][Q^*(T_1)]$	Supressão do estado T_1 pelo O_2 , com taxa k_{q2} . O sinal (-) indica a diminuição de $[Q^*(T_1)]$.

O termo $\beta = \left(\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \{1 - \exp(-2.3A_0)\} d\lambda \right)$ é um fator determinado pela

absorção de luz na região de irradiação da amostra ($\lambda_i=350 \text{ nm} \leq \lambda \leq \lambda_f=450 \text{ nm}$); $I(\lambda)$ é a intensidade de irradiação da luz sobre a amostra. O termo $A_0 = \varepsilon(\lambda)[Q(S_0)]\ell$ representa a absorção óptica inicial da amostra de Quinifuril (Lei de Lambert-Beer).

A resolução destas equações diferenciais se torna mais simplificada ao se impor as seguintes condições de contorno:

1) Se a absorção inicial da amostra for $A_0 < 1$ (experimentalmente obtido pelo controle da concentração inicial do Quinifuril), pode-se escrever em primeira aproximação:

$$\beta \cong 2,3\ell[Q(S_0)] \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda)\varepsilon(\lambda)d\lambda = \beta_1[Q(S_0)] \quad (8)$$

onde o termo $\beta_1 \equiv 2,3\ell \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda)\varepsilon(\lambda)d\lambda$ depende somente das condições de irradiação da amostra (região espectral, tipo e potência da fonte) e não depende da concentração $[Q(S_0)]$ do Quinifuril.

2) Nos experimentos foram utilizados dois tipos de fontes de irradiação: a lâmpada (região espectral 350-450 nm, 20 mW/cm²) e o laser ($\lambda_{excit} = 355$ nm, 30 mJ/pulso, 8 ns/pulso). Deste modo, tem-se que sob irradiação contínua e constante da lâmpada, a intensidade $I(\lambda)$ dos fótons oriundos da lâmpada que irão excitar o Quinifuril é muito menor que a do laser (*flash fotólise*).

Deste modo, pode-se impor as condições de contorno para as populações dos estados excitados S_1 e T_1 : $[Q^*(S_1)] \cong 0$ e $[Q^*(T_1)] \cong 0$.

3) Como as características temporais da fotodecomposição do Quinifuril sob irradiação contínua são da ordem de 10^{-1} - 10^{-2} s (Fig. 4.3) e, portanto muito mais longas que os tempos de vida dos estados excitados $Q^*(S_1)$ ($< 10^{-9}$ s) e $Q^*(T_1)$ ($\approx 10^{-6}$ s) (Fig. 4.5), pode-se escrever as condições de estado estacionário:

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = 0 \quad \text{e} \quad \frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = 0 \quad (9)$$

Aplicando as expressões (8) e (9) em (5), tem-se:

$$[Q^*(S_1)] = \beta_1[Q(S_0)] / K_3, \text{ onde } K_a \equiv k_{IC} + k_T \quad (10)$$

Aplicando (9) em (7):

$$[Q^*(T_1)] = (k_T / k_4)[Q^*(S_1)], \text{ onde } K_b \equiv k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2] \quad (11)$$

Substituindo (10) em (11):

$$[Q * (T_1)] = (k_T / k_b)(\beta_1 / k_a)[Q(S_0)] \quad (12)$$

Substituindo as expressões (8), (10) e (12) na expressão (5), teremos:

$$\begin{aligned} \frac{d[Q(S_0)]}{dt} &= -\beta + k_{IC}\beta_1[Q(S_0)]/K_a + (k_0 + K_2[O_2])(k_T\beta_1 / K_aK_b)[Q(S_0)] = \\ &= [Q(S_0)]\{-\beta_1 + k_{IC}\beta_1/K_a + (K_0 + K_2[O_2])(k_T\beta_1 / K_aK_b)\} = \\ &= \beta_1([Q(S_0)]/ K_aK_b)\{-K_aK_b + K_bk_{IC} + k_Tk_0 + k_TK_2[O_2]\} \end{aligned}$$

Utilizando-se as definições de K_a e K_b no colchetes acima e desenvolvendo o mesmo, o termo restante apenas do colchetes será $-k_Tk_{q1}[Q(S_0)]$ e a expressão do termo $\frac{d[Q(S_0)]}{dt}$ se torna mais simples.

A velocidade inicial de fotodecomposição (V_i) do Quinifuril foi definida como a *variação temporal da sua concentração inicial quando o tempo tende a zero* ($t \rightarrow 0$) e assim pode-se escrever, finalmente:

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -\beta_1 \frac{k_Tk_{q1}[Q(S_0)]^2}{(k_{ic} + k_T)(k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])} \quad (13)$$

A Expressão (13) é matematicamente complexa, porém uma análise qualitativa pode ser facilmente feita, fornecendo importantes conclusões:

a) Os termos β_1 , k_T , k_0 , k_2 , k_{q1} , k_{IC} e k_{q2} da Expressão (13) são valores constantes, que dependem exclusivamente das condições de irradiação da amostra (β_1) ou dos processos primários do Quinifuril (k_T , k_0 , k_2 , k_{q1} , k_{IC} e k_{q2}); e

b) Em meio aquoso (1atm), a concentração de oxigênio é também constante ($[O_2] \cong 3 \times 10^{-4}$ M a 24°C).

Deste modo, a única grandeza “variável” na Expressão (13) é a concentração inicial de Quinifuril $[Q(S_0)]$, cujo valor pode ser facilmente controlado experimentalmente.

Ao se considerar os valores dos termos β_1 , k_T , k_0 , k_2 , k_{q1} , k_{IC} e k_{q2} poderia-se esperar que na região de concentração do Quinifuril $[Q] < 70 \mu\text{M}$ e de oxigênio $[O_2] \cong 3 \times 10^{-4}$ M (solução aerada), os valores de V_i em soluções aquosas fossem entre 12 a 30 vezes menores que aquelas encontrados em soluções

deaeradas. Entretanto, a redução encontrada em V_i foi apenas de 2 a 6 vezes menor. Por outro lado era esperado que, em soluções saturadas de oxigênio ($[O_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$), V_i fosse 5 vezes menor quando comparada às soluções de ar, porém experimentalmente foram observados valores próximos tanto em soluções aeradas quanto em soluções saturadas de oxigênio (Figura 4.13).

Figura 4.13 - Dependência de V_i com a concentração inicial de Quinifuril em soluções na presença de ar (O) e saturadas de oxigênio (▲, $[O_2] \cong 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$).

Estas discrepâncias somente puderam ser resolvidas ao se supor que o Quinifuril também pode ser decomposto diretamente a partir de seu estado excitado singlete $Q^*(S_1)$, formando Produtos2, com taxa k_x :

Neste caso as Expressões (6) e (13) devem ser re-escritas como:

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T + k_x)[Q^*(S_1)] \quad (14)$$

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = - \frac{\beta_1}{(k_{ic} + k_T + k_x)} \left(\frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]}{(k_0 + k_{q1} [Q(S_0)] + k_{q2} [O_2])} + k_x \right) [Q(S_0)] \quad (15)$$

Analisando-se a Expressão (15) verifica-se que se $k_{q2}[O_2] > k_0$; e K_x e $k_{q1}[Q(S_0)] > \frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]}{k_{q2} [O_2]}$. Deste modo, conclui-se que a velocidade de fotodecomposição V_i do Quinifuril em soluções aquosas aeradas e saturada de oxigênio não dependem da concentração de oxigênio no meio.

Os dados experimentais suportam o modelo cinético, que descreve adequadamente o comportamento de V_i (Expressão (15)) em soluções saturadas de ar ou oxigênio, onde observou-se que V_i possui uma dependência linear com a concentração de Quinifuril $[Q(S_0)]$ (**Fig. 4.13**).

Por outro lado, na ausência de oxigênio o comportamento de V_i é bem descrito pela Expressão (13), pois observou-se que V_i possui uma dependência quadrática com a concentração de Quinifuril, o que foi também confirmado experimentalmente (**Fig. 4.4**).

Os processos de fototransformação do Quinifuril podem ser entendidos ao se considerar que, na ausência do oxigênio, os estados tripletos não são suprimidos. Isto auxilia a fotodecomposição do Quinifuril, através da interação entre uma molécula do composto no estado transiente T_1 e outra no estado fundamental S_0 , diminuindo o tempo de vida do estado T_1 , uma vez que se supôs que a fototransformação **FT₅** seja parcialmente responsável pela fotodecomposição do Quinifuril. Esta suposição foi baseada na verificação experimental de que, após o decaimento do transiente do Quinifuril, há o surgimento de um sinal transiente crescente de uma espécie desconhecida (**Fig. 4.14**), provavelmente um radical de nitrogênio ($Q^{\bullet-}(R-NO_2^{\bullet-})$). Esta suposição é reforçada com a verificação de que na presença de um doador de elétrons (DE), como o ácido ascórbico, a reação se torna mais efetiva na formação de $R-NO_2^{\bullet-}$. Na presença do oxigênio, o nitro ânion radical pode reduzir o oxigênio para $O_2^{\bullet-}$ [Ramakrisna Rao et al., 1988].

Estas reações podem ser representadas por:

onde a espécie $Q^{\bullet+}$ é radical cátion do Quinifuril.

Figura 4.14 - Formação de uma espécie transientes ($R-NO_2^-$) a partir da fotólise do Quinifuril.

Baseados nos resultados apresentados, os possíveis processos de fototransformação do Quinifuril podem ser resumidos através do diagrama:

Figura 4.15 - Esquema das fototransformações do Quinifuril em solução aquosa sob excitação de luz.

4.6 - EFEITO DO pH E DA CONSTANTE DIELÉTRICA (ϵ) SOBRE AS PROPRIEDADES ESPECTRAIS DO QUINIFURIL

4.6.1 - pK do Quinifuril

A **Figura 4.16A** mostra os espectros de absorção do Quinifuril em diversos pH's. Observa-se que o composto sofre grande influência do pH sobre suas características de absorção: o pH do meio muda a posição da banda do máximo de absorção ($\lambda_{\max}$) e sua amplitude. Quando o pH do meio diminui (pH 6,9 $\rightarrow$ pH 1,0) há um deslocamento batocrômico (para o vermelho) da absorção do Quinifuril (396 $\rightarrow$ 406 nm). O deslocamento batocrômico é acompanhado por um acréscimo da intensidade de absorbância maior que 40%. Por outro lado em pH alcalino (> 7) temos o desaparecimento da banda principal do Quinifuril em 396 nm e em pH 12,1 a absorção da banda cai para menos de 30% da absorção em relação ao pH 7,0. O detalhe na **Figura 4.16A** mostra a dependência do comprimento de onda da banda principal em função do pH.

A **Figura 4.16B** mostra a dependência da intensidade da absorbância do Quinifuril em $\lambda_{\max}=396$ nm em função do pH. Observa-se que na região de pH entre 4,5 e 7,5 a intensidade se mantém aproximadamente constante. Na região de pH entre 4,5 e 1,1 a intensidade da absorbância sofre uma sensível modificação. Pode-se supor que esta variação seja devido à protonação do Quinifuril (recebimento de um próton H^+ do meio). Destes dados calculou-se que o Quinifuril apresenta um **pK $\approx 3,0$** , indicando que neste valor de pH há o equilíbrio entre a forma protonada e não-protonada do Quinifuril. Pode-se supor também que no intervalo de pH entre 4,5 e 7,5 o Quinifuril se apresenta na forma não-protonada (**Figura 4.16A**).

Adicionalmente o pK $\approx 3,0$ também pôde ser obtido através de medidas da variação do máximo de absorção com o pH (Detalhe na **Figura 4.16A**), onde a distribuição dos valores de $\lambda_{\max}$ foi ajustada por uma curva sigmóide e o pK avaliado como o ponto médio entre as alturas dos platôs.

Figura 4.16- (A) Espectros de absorção do Quinifuril (37 μM) em diversos valores de pH. Em pH 6,9 sua banda principal de absorção está em $\lambda_{\text{max}}=396 \text{ nm}$ (seta 1) e em pH 1,1 há um deslocamento da banda para $\lambda_{\text{max}}=406 \text{ nm}$ (seta 2) com um aumento na intensidade de absorção em $\cong 40 \%$ (seta 3). Em pH > 9 a banda principal desaparece. **Inserto** – Dependência do comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) em função do pH mostrando o deslocamento batocrômico (394 $\rightarrow$ 406 nm) da banda principal do Quinifuril quando o pH do meio diminui; (B) Cálculo do $\text{pK} \cong 3,0$ (○) do Quinifuril, devido à sua protonação, através do decaimento da absorção em $\lambda_{\text{max}}=396 \text{ nm}$ em função do pH do meio.

No intervalo de pH's maiores que 8,5 aparentemente haveria um segundo pK de de-protonação, ou seja, a perda de próton pela molécula. Porém, acredita-se que este efeito da perda da absorção nesta região seja motivado pela precipitação do Quinifuril devido ao pH [Smirnov et al., 1989] e não à sua de-protonação. Esta precipitação não foi mensurável pelos métodos à nossa disposição, devido à pequena massa total de Quinifuril na solução, estimada como sendo da ordem de 1,0 ng.

Inferiu-se adicionalmente que no intervalo de pH entre 5,5 e 7,5 o Quinifuril se apresenta na forma não-protonada, mantendo suas propriedades espectrais constantes neste intervalo de pH, e assim não houve necessidade de um rígido controle do pH em nossos experimentos.

4.6.2 – Efeito do pH sobre a fotodecomposição do Quinifuril

Observou-se que o pH afeta significativamente a velocidade de fotodecomposição do Quinifuril. A **Figura 4.17A** mostra os espectros de absorção do Quinifuril (20 μ M) em pH 1,0 e a curva de sua cinética de fotodecomposição neste pH (**Figura 4.17B**). Observa-se que, além do deslocamento batocrômico (396 $\rightarrow$ 406 nm) e do aumento da intensidade de absorção quando o pH diminui de 7,0 para 1,1; a velocidade de fotodecomposição é significativamente aumentada, quando comparada à velocidade em pH fisiológico.

A **Figura 4.18** mostra os perfis das cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril para pH's entre 1,0 e 6,3 (dados normalizados). Inferiu-se das curvas cinéticas que em pH ácido (< 6) as velocidades de fotodecomposição aumentam significativamente. Das cinéticas de fotodecomposição e do cálculo das V_i para cada cinética observou-se que em pH 1,0 o Quinifuril se fotodecompõe $\cong 25$ vezes mais rápido do que em pH 6,3.

Adicionalmente observou-se que uma amostra de Quinifuril (22 μM), permanecendo em repouso em pH 1,0 por 30 minutos no escuro, sofre lenta degradação, perdendo menos de 10% de sua absorção óptica neste intervalo de tempo. Considerou-se que esta perda não foi significativa em nossos experimentos, pois todo o procedimento experimental de fotólise do Quinifuril em pH ácido (< 6) (**Fig. 4.17 e 4.18**) ocorreu num tempo menor que 10 minutos.

4.7 - EFEITO DO SOLVENTE SOBRE AS CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS E SOBRE A FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

A **Figura 4.19A** mostra os espectros de absorção de amostras de Quinifuril (22 μM) em soluções homogêneas de solventes com diferentes constantes dielétricas (ϵ). Tomando-se como referência uma amostra de Quinifuril em solução aquosa ($\epsilon_{\text{água}}=81$), observa-se que a banda principal sofre um aumento em sua intensidade e um deslocamento para comprimentos de onda de absorção menores quanto menor o ϵ do solvente, ou seja, sua banda sofre um deslocamento hipsocrômico “para o azul” quanto menor a polaridade do solvente (seta na Figura).

Pode-se atribuir as características fotofísicas e fotoquímicas do Quinifuril a uma conjugação- π , baseados nas observações experimentais: **(a)** o alto valor do coeficiente de absorção molar do Quinifuril ($\epsilon_{396} = 24700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, **Fig. 4.1**) e a estreita largura da banda de absorção principal ($\Delta\lambda \cong 70 \text{ nm}$) são característicos de conjugação- π [Calvert e Pitts, 1966]; **(b)** em soluções não-aquosas, observou-se o deslocamento hipsocrômico para o azul (maior energia) do máximo de absorção devido à diminuição da polaridade do solvente (**Fig. 4.19**). Este comportamento é também característico de conjugação- π [Bonnett, 2000]. Assim, pode-se atribuir a fotodecomposição do Quinifuril, observada pelo seu fotocloreamento (**Fig. 4.2**), à destruição do sistema de conjugação- π do seu cromóforo.

Observou-se que a velocidade de fotodecomposição V_i do Quinifuril é dependente da constante dielétrica do meio. A **Tabela 4.II** mostra os valores das velocidades de fotodecomposição do Quinifuril e dos comprimentos de onda máximo nos diferentes solventes. Inferiu-se destes resultados que quanto menor a polaridade do meio (menor ϵ), maior V_i . Adicionalmente observou-se que alíquotas aquosas de Quinifuril (10 μL) não foram miscíveis nos solventes dimetilformamida (aprótico) e em hexano (apolar) e impossibilitaram o estudo da fotodecomposição nestes solventes.

Tabela 4.II: Valores do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e as velocidades de fotodecomposição V_i do Quinifuril (22 μM) em diversos solventes.

Solvente (ϵ)	λ_{max} (nm)	V_i ($\times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$)
Acetona (20,7)	388	23
Etanol (24,3)	384	17
Acetonitrila (36,2)	389	16
Água (81)	396	1,0

Fig. 4.19 - Espectros de absorção do Quinifuril (22 μM) em solventes de diversas constantes dielétricas (ϵ). As soluções foram preparadas dissolvendo 10 μL da solução estoque aquosa do Quinifuril em 2 mL de cada solvente, resultando na concentração final de 22 μM de Quinifuril. Observa-se que comprimento de onda máximo de absorção sofre um deslocamento hipsocrômico (**Tab. 4.II**).

4.8 - EFEITO DO ETANOL SOBRE A AS CARACTERÍSTICAS ESPECTRAIS E SOBRE A FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

Observou-se que a maior alteração espectral do Quinifuril em diferentes solventes se dá para o etanol (**Figura 4.19**). Deste modo, realizou-se um estudo mais detalhado do efeito de diferentes soluções de etanol/água (volume/volume) sobre as características de absorção e fotodecomposição do Quinifuril.

A **Figura 4.20A** mostra os espectros de absorção de 2,0 mL de Quinifuril (24 μ M) em diferentes proporções da solução etanol/água. Tomando-se como referência a solução aquosa (100% água) do Quinifuril, observou-se o deslocamento hipsocrômico da banda de absorção de 396 nm para 384 nm ($\Delta\lambda=12$ nm), para amostras com proporções de etanol/água de 0:4 e 4:0, respectivamente. Além disso, para a amostra do Quinifuril em 100% de etanol, observou-se um aumento de mais de 46% na intensidade da banda de absorção do composto (seta na Fig.).

A **Figura 4.20B** mostra o perfil das curvas cinéticas do Quinifuril em diferentes soluções com etanol. A partir destes perfis de fotodecomposição calculou-se que a V_i é $\cong 73$ vezes maior em 100% de etanol do que numa solução aquosa (100% água), ou seja, o Quinifuril se fotodegrada mais rapidamente quanto maior a proporção de etanol na solução (**Figura 4.20C**).

Figura 4.20- (A) Espectros de absorção de 2 mL de Quinifuril ($24\mu\text{M}$) em soluções de etanol/água, em porcentagem de etanol na solução. (B) Perfis normalizados das cinéticas de fotodecomposição das soluções de Quinifuril em etanol/água. A legenda indica o λ_{max} para cada quantidade de etanol na solução. (C) Dependência de V_i em função do conteúdo de etanol (%) nas soluções.

4.9 – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

Neste Capítulo foram apresentados os processos de fototransformação e o modelo que descrevem os fotoprocessos primários do Quinifuril na sua interação com a luz.

O modelo descreveu adequadamente o processo de fotodecomposição do Quinifuril em função dos fotoprocessos primários, onde se verificou o papel essencial da reação entre os estados fundamental e tripleto do composto. O modelo também prevê a geração de espécies reativas, formadas a partir das fotoreações do Quinifuril. As fototransformações dos nitrocompostos RNO_2

(figura) foram descritas e propõem caminhos para a geração de espécies reativas a partir destes compostos [Kemp e Martins, 1981; Moore, 1987]. Um destes caminhos

é a fotoionização direta do composto, formando um elétron hidratado ($e_h^{\bullet-}$), o qual em consequência se liga à molécula no estado fundamental, produzindo um nitro-óxido radical ($RNO_2^{\bullet-}$):

Outro caminho alternativo é a transferência do elétron, a partir de um composto doador (D) de elétron, para o nitrocomposto no seu estado excitado tripleto ($RNO_2^*(T_1) + D \rightarrow D^{\bullet+} + RNO_2^{\bullet-}$), onde o nitro-óxido radical também é gerado. Os resultados que sugerem a eventual geração de espécies reativas a partir da fotoativação do Quinifuril serão descritos no Capítulo 6.

O processo de fotodecomposição do Quinifuril ao ser irradiado com luz visível na região 350-450nm é uma reação irreversível, indicando que há o fotocloreamento verdadeiro (*true photobleaching*) da amostra, ou seja, a perda de sua cor associada com a destruição da conjugação- π do seu cromóforo.

Observou-se que as fototransformações do Quinifuril são dependentes do oxigênio presente no meio e também do ambiente, pois sua fotodecomposição é acelerada em meios apolares. Como o Quinifuril apresentou fotocitotoxicidade para células em culturas, onde as interações com a membrana celular podem ser um fator determinante nos processos de fototransformação do composto, é importante conhecer-se as características de fotólise na presença de sistemas

organizados. Deste modo, foram estudados os processos de fototransformação do Quinifuril na presença de sistemas modelos de detergentes e suas micelas e serão descritos no próximo Capítulo.

Capítulo 5

INTERAÇÃO DO QUINIFURIL COM DETERGENTES E SUAS MICELAS

5.1 - EFEITO DAS MICELAS SOBRE O pK DO QUINIFURIL

Como mostrado no Capítulo anterior, o Quinifuril é protonado em ambiente ácido e apresenta um $pK \cong 3,0$ em solução aquosa, pois nesse pH o Quinifuril encontra-se no equilíbrio entre sua forma protonada e não-protonada.

A **Figura 5.1** apresenta as curvas da variação da absorção em 396 nm do Quinifuril em função do pH da solução na presença de micelas formadas de diferentes detergentes: 10 mM de SDS (aniônico), 4 mM de DPS (zwitteriônico) e 0,1 mM de CTAB (catiônico), na respectiva concentração micelar crítica (CMC) de cada detergente.

Mediu-se o pK do Quinifuril na presença de micelas formadas desses detergentes: $pK \cong 5,5$ na presença do SDS, $pK \cong 2,3$ para o DPS e $pK \cong 2,5$ para o CTAB. Observou-se que o ponto de pK do Quinifuril na presença desses detergentes tem seu valor deslocado para um pK aparente por um valor ΔpK_a e que este deslocamento é dependente da carga elétrica do detergentes.

O deslocamento do pK aparente do Quinifuril (ΔpK_a) foi calculado em relação à água como $\Delta pK_a = pK_{\text{detergente}} - pK_{\text{água}}$ (**Tabela 5.1**): observou-se que as presenças dos detergentes de carga positiva (CTAB) e zwitteriônico (DPS) induzem um deslocamento negativo (-0,5 e -0,7, respectivamente), enquanto que para a micela carregada negativamente (SDS) o deslocamento é positivo (2,5). Pode-se supor que o deslocamento aparente do pK do Quinifuril ΔpK_a seja devido à interação do composto com o detergente. O ΔpK_a observado é composto de dois termos [Borissevitch,1996]:

$$\Delta pK_a = \Delta pK_i + \Delta pK_e$$

onde ΔpK_i é o deslocamento intrínseco do pK, devido ao novo ambiente do Quinifuril ligado à micela que neste novo ambiente apresenta características físicas e químicas diferentes. Supõe-se que o termo ΔpK_i seja igual para todos os tipos de micelas [Borissevitch et al.,1996]. O termo ΔpK_e está associado à interação eletrostática entre a micela carregada e os prótons de H^+ presentes na solução. Uma vez que o pH é uma medida da concentração média de H^+ na solução ($pH = -\log[H^+]$), o deslocamento aparente do pH (ΔpK_a), devido às micelas pode ser assim interpretado: a concentração de prótons H^+ nas vizinhanças da micela de SDS carregada negativamente é maior que no volume aquoso, efeito devido à atração coulombiana entre a micela negativa e os prótons H^+ , induzindo uma maior concentração de prótons nas vizinhanças da micela. Na solução de Quinifuril contendo micelas de SDS em pH ácido, o Quinifuril estará no equilíbrio entre sua forma protonada e não-protonada quando se diminuir a concentração de H^+ (aumentando o pH médio da solução) nas vizinhanças da micela. Este efeito explicaria o deslocamento aparente observado do pK do Quinifuril para valores positivos ($\Delta pK_a = 2,5$) na presença das micelas do SDS.

Nos casos onde se têm micelas de CTAB catiônica ou de DPS zwitteriônico na presença do Quinifuril, o efeito é contrário ao descrito acima: a concentração de H^+ local é menor que no volume aquoso (devido à repulsão coulombiana entre o H^+ e a micela). Assim, para que se atinja o equilíbrio do Quinifuril na forma protonada e não-protonada na solução, é necessário se aumentar a concentração de H^+ local, diminuindo o pH médio no volume aquoso, tendo como consequência o deslocamento negativo observado do pK na presença destas micelas.

Tab. 5.I – Determinação do pK do Quinifuril na presença de detergentes.

Detergente	pK	(ΔpK_a)
SDS	5,5	2,5
DPS	2,3	-0,7
CTAB	2,5	-0,5

Figura 5.1 - Variação da absorção do Quinifuril (37 μ M) em 396 nm em função do pH na presença micelas de 10 mM de SDS (●), 4 mM de DPS (△), 0,1 mM de CTAB (□) e em água (■). Os valores de pK's do Quinifuril obtidos foram: água (3,0); SDS (5,5); DPS (2,3); e CTAB (2,5). As variações do pK (ΔpK) foram calculados em relação à água como $\Delta pK = pK_{\text{detergente}} - pK_{\text{água}}$ (**Tab. 5.I**).

5.2 – ESTUDO DA CINÉTICA DE AGREGAÇÃO SDS-QUINIFURIL

A adição de SDS em concentrações abaixo da sua concentração micelar crítica (CMC) de 10 mM, numa solução aquosa de Quinifuril (18 μ M) induz a formação de agregados de SDS-Quinifuril, onde a CMC é a concentração a partir da qual as micelas são formadas [Neugebauer, 1994].

A **Figura 5.2A** mostra os perfis das curvas cinéticas de formação de agregados SDS-Quinifuril em concentrações pré-micelares de SDS no meio em pH 6,5. A formação dos agregados é caracterizada pela diminuição na intensidade da banda de absorção principal do Quinifuril (λ_{max} =396 nm) até um valor de equilíbrio.

Observou-se que a velocidade de formação dos agregados (V_{agreg}) é dependente da concentração de SDS na solução. Esta velocidade de formação de agregados foi avaliada através do valor máximo da 1ª derivada numérica (Origin® 6.1) da absorção temporal em 396 nm através da expressão:

$$V_{\text{agreg}} \equiv -\frac{d}{dt}(A_{396}(t))_{\text{max}} \quad (16)$$

A **Figura 5.2B** mostra os valores calculados das velocidades de formação dos agregados através da Expressão (16). Observou-se que V_{agreg} possui um comportamento complexo: quando a concentração de SDS cresce entre 0 e 2 mM, V_{agreg} cresce rapidamente, até atingir o máximo valor para 2 mM de SDS. Para valores de SDS maiores que 2mM, observou-se que V_{agreg} diminui lentamente, até atingir um valor praticamente nulo quando a concentração de SDS se aproxima de sua CMC, entre 7 e 10 mM [Neugebauer, 1994]. A **Tabela 5.2** resume os dados calculados de V_{agreg} através da Expressão (16).

A distribuição das velocidades de formação dos agregados da **Figura 5.2B** foi mais bem ajustada através de uma função do tipo:

$$V_{\text{agreg}} = \frac{\Psi}{K_2 - K_1} (e^{-K_1[\text{SDS}]} - e^{-K_2[\text{SDS}]}) \quad (17)$$

onde Ψ , K_1 e K_2 são parâmetros do ajuste.

O ajuste da distribuição de V_{agreg} através da Expressão **(17)** resultou nos valores $\Psi = 0,14 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$; $K_1 = 0,5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e $K_2 = 1,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

O parâmetro Ψ é uma constante de ajuste. O parâmetro K_1 pode ser interpretado como sendo o coeficiente de agregação do agregado SDS-Quinifuril e representa o recíproco da concentração crítica do processo de agregação, pois $1/K_1 \cong 2,0 \text{ mM}$ é a concentração de maior velocidade de formação dos agregados SDS-Quinifuril. O termo K_2 pode ser interpretado como sendo o coeficiente de desagregação do agregado SDS-Quinifuril, de valor $1/K_2 \cong 0,8 \text{ mM}$.

Estes resultados indicaram que a formação dos agregados SDS-Quinifuril pode ser devido a um processo de competição entre a formação dos agregados e a formação das micelas de SDS, uma vez que se observou que em concentrações pré-micelares muito menores que a CMC do SDS, a formação dos agregados é favorecida e ocorre numa cinética rápida da ordem de minutos (**Figura 5.2**). Por outro lado, em valores próximos da CMC de SDS, a formação dos agregados compete com a formação das micelas e a cinética do processo é lenta, podendo se prolongar de vários minutos a horas, como no caso de 8,7 mM de SDS. Para valores acima da CMC do SDS ($\geq 10 \text{ mM}$) não se observou qualquer cinética de formação dos agregados, pois nestes valores de concentração de SDS as micelas se encontram formadas.

Tabela 5.II - Velocidade (V_{agreg}) de formação de agregados SDS- Quinifuril

[SDS] (mM)	V_{agreg} ($\times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$)
0,25	3,7
0,5	4,2
1,5	6,0
3,5	3,2
7,4	0,4
8,7	0,6
9,9	0,1
48	< 0,01

Figura 5.2: (A) Perfis das cinéticas de formação de agregados SDS-Quinifuril (obtida pela medida da absorção em 396nm) de 2 mL de solução de Quinifuril (18 μ M) na presença de SDS (mM): 0,0 ($\square$); 0,25($\triangle$); 0,5 (∇); 2 ($\blacktriangle$); 5 ($\circ$); 8,7 ($\blacksquare$); 9,9 ($\bullet$). A escala temporal para a medida de 8,7 mM foi reduzida 3 vezes para melhor visualização. **(B)** Dependência de V_{agreg} ($\bullet$) em função de [SDS], calculadas pela Expressão (16). Os dados foram ajustados (linha sólida) através da Expressão (17). A máxima velocidade de agregação V_{agreg} se encontra em ≈ 2 mM (Tab. 5.2).

Observou-se (**Figura 5.2A**) que o início da formação dos agregados, obtido pela queda da absorção em 396 nm, é também dependente da concentração de SDS: para 2,0 mM de SDS a etapa lenta da agregação perdurou por $\cong 30$ s, após a adição de mais detergente na solução, o processo de agregação durou $\cong 10$ minutos. Em contraste, para 8,7 mM de SDS, a etapa lenta perdurou $\cong 30$ minutos e sua cinética ocorreu num tempo total de $\cong 160$ minutos. Na **Figura 5.2A** a escala temporal para a cinética de agregação de 8,7 mM foi reduzida 3 vezes para melhor visualização.

É importante frisar que as grandezas aqui apresentadas estão baseadas na análise das observações macroscópicas do processo de agregação SDS-Quinifuril (obtidas a partir dos espectros de absorção e dos perfis das cinéticas de agregação) e não aos processos microscópicos de interação entre as moléculas de SDS-água-Quinifuril, que possuem taxas da ordem da taxa de difusão ($\cong 10^{-10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [Cox, 1994].

Observou-se que o mecanismo de agregação SDS-Quinifuril é um processo em duas etapas: o processo se inicia numa etapa lenta de indução da agregação ("*lag phase*"), seguida da etapa rápida ("*log phase*").

Para a análise deste processo de agregação utilizou-se como aproximação inicial um modelo proposto por Pasternack [Pasternack et al., 1998], que supõe o papel catalítico para os dímeros: supõe-se que na fase "*lag*" exista a geração de pequenos agregados (núcleos intermediários), tais como dímeros. Estas espécies formadas (dímeros) agem como centros catalíticos, onde um monômero adicional é cataliticamente adicionado ao centro, formando trímeros (fase "*log*"). Apesar de serem gerados em pequenas concentrações, estes núcleos amplificam a velocidade de formação dos agregados.

Aplicando o modelo proposto aos dados experimentais (**Figura 5.2**), pode-se escrever a expressão que fornece a variação temporal da absorção óptica ($A_{\text{agreg}}(t)$) do Quinifuril (em 396nm) durante a formação dos agregados [Pasternack et al., 1998]:

$$A_{\text{agreg}}(t) = \frac{A_0}{\left(1 + (m-1) \left\{ k_0 t + \frac{(k_c t)^{n+1}}{n+1} \right\}\right)^{\frac{1}{m-1}}} \quad (18)$$

onde se realizou uma adaptação na expressão do modelo proposto por Pasternack, introduzindo o termo A_0 , que corresponde a absorção inicial da amostra no tempo zero.

Segundo o modelo utilizado [Pasternack et al., 1998], os parâmetros m e n da Expressão (18) estão associados com as taxas de indução (formação) e com o tamanho dos agregados, respectivamente, e t é o tempo de formação dos agregados. O termo k_0 está associado ao período de indução não-catalítico "*lag phase*" e o termo k_c ao período catalítico "*log phase*" e são constantes de ajuste. O processo de agregação envolve a adição de um monômero em um pré-núcleo contendo $(m-1)$ unidades monoméricas. A reação pode envolver mudanças estruturais, migração e/ou reorientação do complexo, mas indiferentemente de sua natureza exata, esta etapa é requerida para limitar a velocidade do processo de agregação.

O modelo proposto foi aplicado, através de simulação computacional, aos dados das curvas cinéticas de agregação (600 pontos/curva) para dois valores de concentrações de SDS, 1,5 e 8,7 mM, obtidas em soluções de 18 μ M de Quinifuril. Os ajustes obtidos estão mostrados na **Figura 5.4**. A **Tabela 5.III** fornece os valores dos parâmetros m , n , k_0 e k_c obtidos através do ajuste dos perfis experimentais (Fig. 5.4).

A partir dos dados obtidos dos ajustes (**Tab. 5.III**), observou-se que o valor da taxa de crescimento do agregado (m) é maior para a concentração de 1,5 mM ($m=22$) de SDS do que para 8,7 mM ($m=6$), indicando que a formação dos agregados para 1,5 mM é mais rápida do que para 8,7 mM. Estes resultados obtidos da simulação são consistentes com os dados observados experimentalmente (**Fig. 5.4**), onde os tempos das cinéticas de formação dos agregados são da ordem de 800 s para 1,5 mM de SDS e 10.000 s para 8,7 mM.

Os valores do parâmetro n , associado ao tamanho dos agregados, possuem valores $n=8$ e $n=5$ para 1,5 mM e 8,7 mM, respectivamente. Este resultado indicou que o "tamanho" dos agregados SD-Quinifuril formado pela solução contendo 1,5 mM de SDS na presença de 18 μ M de Quinifuril é maior que os agregados formados por 8,7 mM de SDS.

Figura 5.4 - Simulação computacional do processo de formação de agregados SDS-Quinifuril para (A) 1,5 mM e (B) 8,7 mM de SDS, onde (●) são os dados experimentais (600 pontos) e as linhas sólidas são os ajustes obtidos através da Expressão (18). Os parâmetros do ajuste estão apresentados na Tab. 5.III. A absorção diferencial ($\Delta A = A_{396} - A_{ajuste}$) estimou um erro $<10\%$ nos resultados.

Tabela 5.III - Valores obtidos do modelo de agregação para SDS-Quinifuril				
[SDS] (mM)	m	n	k_0 (s^{-1})	k_c (s^{-1})
1,5	22	8	15×10^{-5}	$6,5 \times 10^{-3}$
8,7	6	5	1×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-4}$

Os parâmetros k_0 e k_c , associados à fase de indução não catalítica “lag” (lenta) e à fase catalítica “log” (rápida), respectivamente, possuem razões $k_c/k_0 \cong 43$ para 1,5 mM e $k_c/k_0 \cong 25$ para 8,7 mM de SDS. As razões k_c/k_0 , indicam que a fase “log” da cinética de formação dos agregados SDS-Quinifuril foi maior para 1,5 mM de SDS do que para 8,7 mM, e portanto a formação dos agregados é mais rápida para 1,5 mM do que para 8,7 mM.

Inferiu-se dos ajustes obtidos com o uso do modelo (**Figura 5.4**) que a absorção diferencial (ΔA), calculada como $\Delta A = A_{396} - A_{ajuste}$ (onde A_{396} é variação temporal da absorção em 396 nm; e A_{ajuste} é a absorção obtida na simulação através da Expressão **(18)**) é menor que 0,02, em ambos os casos, estando dentro de um erro experimental da ordem de 10%.

Deste modo, as previsões obtidas do modelo descrevem com razoável consistência os resultados experimentais.

Observou-se qualitativamente que a formação de agregados é um processo reversível. A **Figura 5.5A** mostra a cinética de formação de agregados na presença de SDS (0,1 mM). A adição de outra alíquota de SDS na mesma solução, após a estabilização da cinética para 0,1 mM, até concentração final de 7 mM, restitui o perfil normal de absorção do Quinifuril (**Fig. 5.5**, detalhe).

Observou-se no processo de formação dos agregados SDS-Quinifuril a existência do ponto isosbético (**Figura 5.5B**, seta) que sugere a presença de duas espécies absorvedoras na solução: o Quinifuril livre antes da adição de SDS, que absorve em 396 nm; e o agregado formado na etapa final (0,37 mM de SDS), que tem sua banda de absorção deslocada.

Figura 5.5 – (A) Perfil da agregação (0,1 mM $\bullet$) e desagregação (7 mM $\square$) do processo de agregação SDS-Quinifuril para a mesma solução de Quinifuril (21 μ M). No inserto estão espectros de absorção da solução (**a**) sem SDS. A adição de SDS (0,1 mM) induziu a formação dos agregados até (**b**) a completa formação dos agregados (30 min), com aparente deslocamento do máximo para 367nm ($\Delta\lambda = 19$ nm); (**c**) a adição (seta) de mais SDS na solução, até atingir 7mM, restituiu a absorbância praticamente ao valor inicial, indicando que o processo de agregação é reversível. **(B)** Espectros de absorção do Quinifuril (18 μ M) na presença de SDS (0,37 μ M). Observa-se o ponto isobéptico (seta), indicando a presença de duas formas absorvedoras na solução: o Quinifuril livre ($\blacktriangle$) e o agregado SDS-Quinifuril ($\bullet$).

Foram realizados experimentos de agregação similares aos descritos acima com os detergentes CTAB (catiônico) e DPS (zwitteriônico) e não se observou qualquer cinética de agregação para ambos os detergentes para um tempo de experimento de 1,5 h e em diversas concentrações acima e abaixo das respectivas CMC destes detergentes.

5.3 - ESTUDOS DA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL NA PRESENÇA DE SDS

A presença das micelas de SDS (≥ 10 mM) não alterou os espectros de absorção do Quinifuril.

A **Figura 5.6A** mostra os espectros de absorção da amostra de Quinifuril na presença de 30 mM de SDS, concentração onde as micelas estão formadas, em função do tempo de irradiação luminosa. A cinética de fotodecomposição é acompanhada pelo decréscimo da absorção em 396 nm (seta) em função do tempo de irradiação e a velocidade de fotodecomposição V_i foi calculada através da Expressão **(1)** e resultou em $8,4 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$.

Figura 5.6 - Espectros de absorção do Quinifuril (15 μM, pH 6) irradiado por 1200 s na presença de micelas de SDS (30 mM). O inserto mostra o perfil da curva cinética de fotodecomposição ($V_i = 8,4 \times 10^{-4} \text{ Ms}^{-1}$).

A **Figura 5.7A** mostra os perfis das cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril na presença de diversas concentrações de SDS, onde se observou que os perfis são monoexponenciais. Observou-se que para uma mesma concentração de Quinifuril na solução a velocidade de fotodecomposição (V_i), calculada através da Expressão **(1)**, é fortemente dependente da concentração do SDS na solução.

Figura 5.7 – (A) Perfis da cinética de fotólise do Quinifuril (ar) na presença de SDS (mM): 0 (■), 0,2 (●), 1,0 (▲), 8,3 (△), 66,7 (○). Observa-se que a velocidade de fotodecomposição depende da concentração de SDS na solução. **(B)** Velocidades de fotodecomposição do Quinifuril para diferentes concentrações de SDS na presença de ar. O máximo valor de V_i ocorre em $[\text{SDS}] \cong 2\text{mM}$.

A **Figura 5.7B** mostra as velocidades de fotodecomposição do Quinifuril em função da concentração de SDS na presença de ar. Para amostras deaeradas as velocidades de fotodecomposição foram aumentadas em aproximadamente 2 vezes. Observa-se que a dependência de V_i com a concentração de SDS apresenta um máximo em 2 mM de SDS tanto na presença de ar quanto para a amostra deaerada. Este efeito pode ser entendido através do modelo de fotodecomposição do Quinifuril descrito no Capítulo anterior, onde se considerou que o processo de fotodecomposição do Quinifuril ocorre através da reação entre uma molécula no estado tripleto (Q_T^*) e outra no estado fundamental (Q_0). Na presença dos agregados de SDS-Quinifuril podem eventualmente coexistir simultaneamente uma molécula no estado Q_T^* e outra no estado Q_0 . A proximidade entre estas moléculas no agregado pode induzir a uma interação mais efetiva entre as moléculas Q_T^* e Q_0 , aumentando a taxa de fotodecomposição do Quinifuril.

Para amostras deaeradas em concentrações onde as micelas de SDS estão formadas (≥ 10 mM), as V_i 's são $\cong 2$ vezes maiores que na presença de ar, indicando que na presença das micelas o ambiente local do Quinifuril é dominado pela presença das micelas e o ar do meio pouco afeta a fotodecomposição do Quinifuril.

5.4 - EFEITO DOS DETERGENTES DPS E CTAB SOBRE A VELOCIDADE DE FOTODECOMPOSIÇÃO V_i DO QUINIFURIL

A presença dos detergentes DPS e CTAB, em concentrações abaixo e acima de suas respectivas CMC's ($\cong 2-4$ mM e 0,1 mM, respectivamente [Neugebauer, 1994]), não afetaram os espectros de absorção do Quinifuril. Observou-se que os perfis das cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril na presença de ambos os detergentes permaneceram monoexponenciais.

A presença do detergente CTAB (catiônico) não afetou significativamente as cinéticas de fotodecomposição (**Figura 5.8A**), observando-se uma pequena diminuição na velocidade de fotodecomposição a uma média constante de $V_i \cong 0,8 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$, próxima da V_i para o Quinifuril

puro em solução aquosa. Já o efeito do DPS (zwitteriônico) na cinética de fotodecomposição foi dependente da concentração (**Figura 5.8B**) do detergente, porém menos significativo do que o observado para o SDS. Observou-se um aumento monotônico da V_i como aumento da concentração de DPS, até atingir a velocidade de fotodecomposição máximo de aproximadamente $4 \times 10^{-3} \text{ Ms}^{-1}$ para 6,4 mM de DPS.

Os estudos dos efeitos de detergentes de diferentes cargas, SDS, CTAB e DPS sobre as cinéticas de fotodecomposição do Quinifuril, indicaram que estas cinéticas são dependentes das características da carga elétrica de cada detergente e da sua concentração no meio, tendo o SDS (aniônico) o maior efeito sobre a V_i , como discutido anteriormente; o DPS (zwitteriônico) induziu o aumento da V_i do Quinifuril, efeito similar ao SDS, porém menos significativo; e o CTAB (catiônico) praticamente não afetou a V_i , induzindo uma insignificante diminuição na V_i do Quinifuril.

5.5 – ESTUDO DO EFEITO DOS DETERGENTES SDS, CTAB E DPS SOBRE O TRANSIENTE DO QUINIFURIL

O estado excitado tripleto do Quinifuril em soluções aquosas é afetado um modo complexo na presença de diferentes concentrações do detergente aniônico SDS.

A **Figura 5.9** mostra os perfis de decaimento do Quinifuril na presença de diversas concentrações de SDS. Os perfis do decaimento do tripleto na presença de SDS acima de sua CMC (7-10mM) são monoexponenciais (análogos aos perfis obtidos em solução aquosa) e são bem descritos pela Expressão **(2)** ($\Delta D = \Delta D_0 e^{-k_1 t}$). Para concentrações de SDS abaixo da sua CMC o perfil do decaimento tripleto se torna bi-exponencial. Este comportamento foi verificado tanto para amostras na presença de ar quanto deaeradas e observou-se que a supressão do tripleto pelo oxigênio não é efetiva na presença de agregados SDS-Quinifuril. Os perfis do decaimento do tripleto do Quinifuril foram ajustados através de uma função do tipo $\Delta D = \Delta D_1 e^{-k_1 t} + \Delta D_2 e^{-k_2 t}$, onde k_1 e k_2 são as constantes “rápida” e “lenta” do decaimento do sinal do tripleto do Quinifuril, associadas ao tempo de vida do tripleto ($k = \frac{1}{\tau_T}$), e ΔD_1 e ΔD_2 são as intensidades relativas do sinal. Nas análises dos perfis do tripleto do Quinifuril na presença dos agregados SDS-Quinifuril considerou-se como valores significativos a componente “rápida” do decaimento (**Tabela 5.IV**).

Tabela 5.IV – Valores do tempo de vida (τ_T), da intensidade do sinal ($I_{\max}$) do tripleto do Quinifuril e da constante de supressão (K_{q2}) do Quinifuril na presença de SDS para amostras na presença de ar e deaerada.

[SDS] (mM)	Tempo de vida τ_T (μ s)*		$I_{\max} \times 10^{-3}$ (u.a.)		K_{q2} $\times 10^9 M^{-1} s^{-1}$
	ar	deaerada	ar	deaerada	
0	1,8	19,2	70	59	1,7
1,0	0,43	0,25	24	21	5,6
2,5	0,16	0,32	51	24	10,2
3,7	1,4	16,0	56	38	2,2
5,0	1,6	19,2	54	51	2,0
7,4	1,5	34,6	61	47	2,1
15,0	1,5	36,6	81	63	2,1
24,0	1,5	11,4	74	75	1,9
47,6	1,5	27,3	78	69	2,1

* obtidos a partir da constante rápida ($k_1 = \frac{1}{\tau_T}$) do decaimento do tripleto do Quinifuril.

Figura 5.9 - Perfis de decaimento do estado tripleto do Quinifuril na presença de (A) 0,25; (B) 2,0 e (C) 9,9 mM de SDS. As medidas (A) e (B) foram realizadas após a fase “log” de formação dos agregados; e (C) na presença micelas de SDS formadas. (B) mostra o ajuste bi-exponencial para o decaimento do tripleto.

A **Figura 5.10A** mostra os valores medidos da componente rápida do decaimento do tripleto do Quinifuril na presença de SDS. Observou-se que a presença do SDS em diferentes concentrações alterou o tempo de vida do tripleto: há uma acentuada queda nos valores da componente rápida do sinal, apresentando um mínimo para 2 mM de SDS, para uma posterior estabilização em um patamar em torno de 7 mM de SDS tanto na presença quanto na ausência de ar. Em torno do mínimo em 2mM de SDS, na presença ou não de ar no meio, as diferenças entre os tempos de vida de tripleto são insignificantes. Os tempos de vida do tripleto do Quinifuril, medidos na presença de micelas formadas (≥ 8 mM), apresentaram um aumento de $\sim 50\%$ do que obtido na ausência de SDS, indicando uma interação efetiva entre o SDS e o Quinifuril.

A **Figura 5.10B** mostra os valores da intensidade do sinal do tripleto na presença do SDS. Observou-se um comportamento qualitativo similar ao tempo de vida do tripleto sendo, porém mais lenta a caracterização do patamar da intensidade do sinal do tripleto para concentrações crescentes de SDS acima de 2 mM. Este efeito sugere que a supressão do estado tripleto do Quinifuril é bastante efetiva em 2 mM de SDS e que este efeito está associado à formação dos agregados SDS-Quinifuril.

A **Figura 5.10C** mostra os valores da constante de supressão k_{q2} do tripleto do Quinifuril pelo oxigênio molecular na presença do SDS, calculadas através da Expressão **(4)** ($k_2 = k_1 + k_{q2}[O_2]$). Observou-se que k_{q2} depende da concentração de SDS no meio (**Tabela 5.IV**), onde se mediu o tempo de vida na presença e na ausência de ar no meio para as diferentes concentrações de SDS e calcularam-se os valores de k_{q2} para cada concentração. O cálculo dos valores de k_{q2} em função da concentração de SDS mostrou que seu valor apresenta um máximo para 2mM de SDS para rapidamente retornar a seu valor igual ao obtido na ausência de SDS ($[SDS]=0mM$). Infere-se deste resultado que em 2mM de SDS no meio o Quinifuril sofre supressão elevada.

A **Tabela 5.IV** resume os valores medidos e calculados do tempo de tripleto (τ_T), da intensidade máxima do sinal e constante de supressão pelo oxigênio do Quinifuril (K_{q2}).

Figura 5.10 – **(A)** Dependência do tempo de vida de triplete (τ_T) do Quinifuril (18 μ M) na presença de diferentes concentrações de SDS (ar: ●; deaerado: △). **(B)** Dependência da intensidade do sinal de triplete do Quinifuril (ar: ●; deaerado: △) e **(C)** da constante de supressão do oxigênio (k_{q2}) em função da concentração de SDS. Para [SDS]≈2 mM observa-se o valor mínimo do tempo de vida ($\tau_T \approx 0,2 \mu$ s); da intensidade do tripleto na presença e ausência de ar; e o valor máximo da constante de supressão do Quinifuril na presença de SDS.

Observou-se que na presença dos detergentes CTAB (catiônico) e DPS (zwitteriônico) o perfil de decaimento de tripleto do Quinifuril foi monoexponencial em qualquer concentração dos detergentes utilizada neste estudo: 0-10mM para DPS e 0-6mM para CTAB. As médias dos tempos de vida do tripleto do Quinifuril observadas em amostras na presença de ambos os detergentes foram $2,0 \pm 0,4 \mu\text{s}$ e $24,0 \pm 4,6 \mu\text{s}$ na presença de ar e deaeradas, respectivamente. As presenças de ambos os detergentes não apresentaram efeitos significativos sobre a constante de supressão k_{q2} do Quinifuril, pois se observou um crescimento de apenas 1,4 vez entre a ausência de detergente ($1,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) e a maior concentração do detergente utilizado ($2,3 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) em ambos os casos.

5.6 – DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

A agregação é um fenômeno envolvendo a associação entre moléculas, mas que não envolve a ligação química entre elas, resultando em agregados ou unidades individuais (monômeros). O fenômeno ocorre quando interações intermoleculares entre as moléculas no soluto tornam-se mais favoráveis que a interação entre as moléculas do soluto e do solvente. Estas moléculas são mantidas unidas por fracas forças intermoleculares, as quais podem envolver ligações de pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações π - π , forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas, e dependem dos detalhes estruturais das moléculas envolvidas [Bonnett, 2000]. A agregação pode ser detectada através dos espectros de absorção das amostras por desvios da lei de Lambert-Beer com o aumento da concentração do composto e alargamento dos picos de absorção e diminuição do coeficiente de absorção molar (ϵ) com o aumento da concentração. Este comportamento é característico de agregados do tipo **H**, onde a formação destes agregados é acompanhada por uma nova absorção com deslocamento hipsocrômico para comprimentos de onda menores (*blue-shift*) [Bonnett, 2000].

Observou-se que os espectros de absorção do Quinifuril na presença de SDS em concentrações abaixo de sua CMC, em torno de 2 mM, apresentam significativa diminuição da absorbância e um deslocamento da

sua banda principal para o azul, de 396 nm para 367 nm (**Figura 5.5**) após a fase “log”. Estas observações dão subsidio para supor-se que os agregados SDS-Quinifuril são do tipo **H** (“face-a-face”) [Maiti et al., 1998].

A taxa de fotoclareamento (*photobleaching*) do fotossensibilizador é sensível ao seu “grau” de agregação e a aditivos, tais como detergentes [Bonnett, 2000]. Este efeito foi observado para os agregados SDS-Quinifuril, onde verificou-se que a velocidade de fotodecomposição do Quinifuril V_i é dependente da concentração de SDS no meio e possui sua maior V_i para 2 mM de SDS (**Figura 5.7**).

Os resultados indicaram que o Quinifuril interage fortemente com o SDS (aniônico), moderadamente com o DPS (*zwitteriônico*) e fracamente com o CTAB (catiônico), uma vez que se verificou a intensa dependência dos tempos de vida de triplete e da cinética de formação dos agregados em função da concentração de SDS na amostra. Por outro lado, na presença de DPS, estas alterações foram apenas moderadas e para o CTAB foram virtualmente inexistentes. Os deslocamentos aparentes do ponto de pK (ΔpK_a) na presença das micelas destes detergentes também refletem as interações entre eles e o Quinifuril. Destas observações pode-se inferir que as interações entre as moléculas de Quinifuril e dos detergentes utilizados possuem uma natureza eletrostática e que esta interação é mais intensa para o SDS.

Através dos espectros de absorção (**Fig. 5.5**) verificou-se a presença de um ponto isobéstico durante a formação dos agregados, indicando a presença de duas formas do Quinifuril na solução: uma forma livre no volume aquoso e outra no agregado. Quando se levam em consideração a natureza aniônica do detergente SDS e os dados experimentais obtidos, podemos fazer a seguinte análise: em concentrações baixas de SDS, muito abaixo da sua concentração micelar crítica (CMC), existe a formação de um cátion de Quinifuril (Q^+) que vão se aderindo eletrostaticamente com o SDS (S^-) numa cinética muito lenta quando comparada com a taxa de difusão ($\cong 10^{10} s^{-1}$ [Cox, 1994]) em solução aquosa.

O processo de agregação tem início com a formação dos núcleos intermediários, o par iônico Q^+S^- (dímero), continuando com a adição catalítica entre o Quinifuril e o detergente, formando os agregados $(Q^+S^-)_m$.

As moléculas de Quinifuril nos agregados diminuem sua absorção. Próximo e imediatamente abaixo da CMC do SDS, entre 7-10mM, o progresso da reorganização dos agregados $(Q^+S^-)_m$ em estruturas *quasi*-micelares, induz a liberação do Quinifuril do agregado para a sua forma monomérica catiônica Q^+ , resultando na rápida restauração da intensidade da absorção. Para aumentos adicionais da concentração de SDS, a intensidade de absorção atinge o valor limite inicial e todas as moléculas de Quinifuril na forma monomérica Q^+ estão compartilhadas por micelas 'normais' [Smirnov et al., 1989b; Pal et al., 1996].

Esta análise reforça a discussão anterior sobre o aumento da velocidade de fotodecomposição do Quinifuril na presença dos agregados SDS-Quinifuril: a proximidade entre as moléculas de Quinifuril, uma no estado tripleto Q_T^* e outra no estado fundamental Q_0 , induz a uma interação mais efetiva entre estas moléculas, aumentando a taxa de fotodecomposição do Quinifuril na presença dos agregados ($Q_T^* + Q_0 \xrightarrow{k_{q1}} \text{Produtos1}$). A região onde o efeito da concentração de SDS se torna mais crítico é em torno de 2 mM. Com aumentos progressivos da concentração de SDS, abaixo e próximo da sua CMC, as moléculas de Quinifuril vão se dividindo homogeneamente entre as moléculas de SDS, diminuindo o seu número por molécula de SDS. Deste modo, tem-se a diminuição de V_i , chegando à condição em que aumentos adicionais da concentração de SDS não afetam a razão Quinifuril/SDS, pois para aumentos adicionais de SDS passa-se a ter a formação das micelas de SDS e a razão passa a ser Quinifuril/micelas de SDS; onde o número de moléculas de Quinifuril por micela pode ser considerado essencialmente constante. Esta última etapa do processo faz com que a V_i se estabilize num valor constante (**Fig. 5.7**).

Pode-se considerar que nos agregados SDS-Quinifuril, onde se encontra o Quinifuril, é mais apolar em relação ao volume aquoso. Como se observou que o Quinifuril sofre uma fotodecomposição mais intensa em ambientes apolares, isto poderia também explicar a aumentada velocidade de fotodecomposição do Quinifuril na presença dos agregados, unido ao efeito que ocorre pela interação entre o estado excitado e o fundamental do Quinifuril.

Dos resultados obtidos pode-se inferir que o processo dinâmico de formação dos agregados apresenta uma *concentração crítica de agregação (CCA)* de SDS-Quinifuril [Pasternack et al., 1998], de valor CCA $\cong 2$ mM obtido a partir dos valores de V_{agreg} , do tempo de vida de tripleto e da velocidade de fotodecomposição do Quinifuril na presença do SDS.

Nesta Tese desenvolveu-se o modelo cinético de fotodecomposição do Quinifuril em solução aquosa [Borissevitch et al., 2003], onde foi mostrado que a V_i é dependente da concentração de Quinifuril. Observou-se que quando o detergente SDS esta presente na solução, esta dependência se torna mais complexa, uma vez que se deve levar em consideração a formação dos agregados SDS-Quinifuril, a sua interação de natureza eletrostática, a mudança para um ambiente micro-heterogêneo e eventuais mudanças nas propriedades de micro-viscosidades e na constante dielétrica do meio devido a presença dos agregados. Porém os resultados aqui apresentados dão algumas indicações qualitativas do(s) processo(s) que ocorre(m) entre estas moléculas.

Estudos adicionais para a verificação da formação dos agregados podem ser realizadas através de experimentos de SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*) ou de espalhamento ressonante de luz (RLS, *resonant light scattering*) e poderão eventualmente elucidar qual a estrutura do agregado, como se dá a sua formação e qual a natureza deste processo.

CAPÍTULO 6

ESPÉCIES REATIVAS RESULTANTES DA FOTODECOMPOSIÇÃO

DO QUINIFURIL

Nos Capítulos anteriores mostrou-se o Quinifuril sofre fotodecomposição ao ser irradiado e que o composto, sob ação da luz, é fotoexcitado ao seu tripleto e este estado é suprimido pelo oxigênio. Isto pode induzir a formação do $^1\Delta_g$ num processo típico de ação fotodinâmica (mecanismo do Tipo II) o qual, no entanto, ainda não foi detectado no caso do Quinifuril. Mostrou-se também que o composto possui ação fotocitotóxica contra as linhagens celulares, que esta propriedade está associada à sua fotólise e que os produtos finais da sua fotodecomposição não são os responsáveis pela sua toxicidade. Por outro lado, estudos prévios mostraram a liberação das espécies reativas $\text{NO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ devido ao metabolismo do Quinifuril [Degterev et al., 1989, 1990, 1993; Borisevitch e Degterev, 1992], e também que compostos da mesma família química do Quinifuril (nitrofuranos) liberam espécies reativas de nitrogênio sob ação da luz [Makareyeva et al., 1997]. Estes resultados motivaram a busca por espécies reativas eventualmente produzidas exclusivamente durante a fotoativação do Quinifuril, para a compreensão dos mecanismos envolvidos na fotocitotoxicidade do composto, e indicaram as eventuais espécies produzidas.

6.1 - FORMAÇÃO DO RADICAL LIVRE ÂNION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\bullet-}$) DEVIDO À FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

Utilizou-se a epinefrina como sonda colorimétrica para a detecção da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ durante a fotodecomposição do Quinifuril. A oxidação da epinefrina para adrenocroma ocorre em duas etapas: inicialmente a epinefrina perde um elétron, formando a epinefrina oxidada, uma molécula altamente reativa. A epinefrina oxidada, ao perder outro elétron para o substrato, é convertida em adrenocroma [Foster e Hoffer, 2004], produto colorido que absorve em torno de 480 nm [Ferreira et al., 2004], numa reação irreversível [Hoffer, 1998].

A **Fig. 6.1A** mostra os espectros de absorção de uma amostra irradiada contendo 20 μM de Quinifuril na presença de 1,1 mM de epinefrina. A irradiação do Quinifuril na presença da epinefrina resultou na oxidação da sonda. Observou-se a fotodecomposição do Quinifuril (decréscimo do pico em 396 nm) seguido da formação da adrenocroma (aumento do pico em 486 nm) devido à oxidação da epinefrina. A presença do ponto isobéstico indicou a presença de duas espécies absorvedoras na solução: o Quinifuril e a adrenocroma. As curvas cinéticas de ambos os processos estão apresentadas no inserto, onde as concentrações dos compostos foram calculadas através de seus respectivos coeficientes de absorção molar (ϵ): $\epsilon_{396} = 24,7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Quinifuril) e $\epsilon_{486} = 4,4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Adrenocroma, [Merck, 2001]).

A **Fig. 6.1B** mostra dados quantitativos, onde se observa que a taxa de fotodecomposição do Quinifuril aumenta nas soluções deaeradas quando comparadas com a aerada ($2,5 \pm 0,8 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ e $1,05 \pm 0,2 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente). Entretanto, a formação da adrenocroma não foi observada em soluções deaeradas. Observou-se adicionalmente que a taxa de formação da adrenocroma é significativamente reduzida pela presença da superóxido dismutase de $6,4 \pm 0,7 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ (ausência de SOD) para $3,0 \pm 0,3 \text{ } \mu\text{M}/\text{min}$ ($15,5 \text{ } \mu\text{M}$ de SOD).

Observou-se que não há produção de adrenocroma quando uma solução aerada de epinefrina foi irradiada na ausência de Quinifuril (dados não mostrados). Isto evidencia que a espécie reativa detectada é formada durante a fotólise do Quinifuril e que os produtos de sua fotodecomposição não são os responsáveis pela oxidação da epinefrina. A taxa de fotólise do Quinifuril não foi significativamente alterada na presença de concentrações adicionais de epinefrina ou superóxido dismutase (dados não mostrados).

A formação de adrenocroma não foi observada na ausência de oxigênio na solução, indicando que a presença do oxigênio é essencial para a formação da adrenocroma. Também se observou que a formação da adrenocroma foi gradualmente diminuída na presença de concentrações crescentes de superóxido dismutase. Destes resultados pode-se inferir que o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é uma das espécies produzidas pela fotodecomposição do Quinifuril.

Figura 6.1- (A) Mudanças espectrais da solução de Quinifuril ($20 \mu\text{M}$) na presença de epinefrina ($1,1 \text{ mM}$) sob irradiação. Observa-se que a fotodecomposição do Quinifuril, monitorada pelo decréscimo em 396 nm (seta) induz a oxidação da epinefrina, formando a adrenocroma, monitorada pelo aumento em 486 nm (seta). A linha tracejada mostra o espectro da epinefrina e serviu de linha de base nos experimentos. **Inserto** - Curvas cinéticas da fotólise do Quinifuril ($\square$, 396 nm) e formação da adrenocroma ($\bullet$, 486 nm). **(B)** Efeito do oxigênio e da concentração da SOD sobre as taxas de fotodecomposição do Quinifuril (V_{Quin}) e formação da adrenocroma (V_{Adren}). A SOD foi adicionada somente nas soluções aeradas (valores na legenda). Soluções tamponadas (fosfato, pH 7,8) de Quinifuril e epinefrina foram fotolizadas com luz visível ($390\text{-}450 \text{ nm}$) à temperatura ambiente. As soluções foram previamente borbulhadas (10 min) com ar (aeradas) ou nitrogênio (deaeradas, sem SOD).

A confirmação adicional de que a fotodecomposição do Quinifuril na presença de oxigênio no meio induz a formação de $O_2^{\bullet-}$ foi obtida através de medidas da taxa de formação do radical livre estável nitroxil (**NFR**) durante a fotodecomposição do Quinifuril. Nestes experimentos utilizou-se de medidas de ressonância paramagnética de spin eletrônico (EPR), onde uma solução de Quinifuril foi fotolisada na presença da armadilha de spin TMOOP. O $O_2^{\bullet-}$ se liga à sonda TMOOP, formado o nitroxil, fornecendo um sinal de EPR proporcional à quantidade de $O_2^{\bullet-}$ formado:

A **Figura 6.2A** mostra os perfis representativos dos espectros de EPR de uma amostra irradiada de Quinifuril na presença do TMOOP. A irradiação das amostras induziu a fotólise do Quinifuril e medidas simultâneas dos sinais de EPR das amostras indicaram o acúmulo do nitroxil, medido pelo aumento da amplitude do sinal de EPR. Os sinais do nitroxil formado nestes experimentos são idênticos aos medidos a partir de amostras do radical nitroxil utilizados para calibração (dados não mostrados).

A **Figura 6.2B** mostra um exemplo da concomitante das cinéticas de formação do nitroxil e consumo do Quinifuril. As cinéticas de acumulação do nitroxil foram realizadas em soluções aeradas e deaeradas contendo ambos os compostos e mostraram um grande decréscimo na taxa inicial da acumulação do radical nitroxil na ausência de oxigênio: $0,9 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$ e $0,09 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$, respectivamente.

Observa-se na **Figura 6.2C** que a taxa de formação do radical nitroxil foi reduzida em três vezes quando a fotodecomposição do Quinifuril foi realizada em soluções na presença de superóxido dismutase, de $0,9 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$ (ausência de SOD) para $0,3 \pm 0,08 \mu\text{M}/\text{min}$ (presença de SOD).

6.2 - FORMAÇÃO DO OXIGÊNIO SINGLETE ($^1\Delta_g$) DEVIDO À FOTOEXCITAÇÃO DO QUINIFURIL

A **Figura 6.3A** mostra os perfis representativos da emissão transiente de fosforescência de uma amostra de Quinifuril em acetonitrila excitada por pulso de laser de Nd:YAG em 385 nm. Para detectar a formação do oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) a emissão de fosforescência da amostra foi monitorada através de experimentos semelhantes em diversos comprimentos de onda de excitação, entre 1220 e 1310 nm. Como o tempo de vida do $^1\Delta_g$ em água esta entre 2-6 μ s [Dolphin, 1994; Bonnett, 2000] e em acetonitrila seu tempo de vida é muito mais longo, em torno de 58-77 μ s [Frimer, 1985], realizou-se estes experimentos preliminares em acetonitrila para se obter uma distribuição mais distinta da intensidade de fosforescência da amostra.

Observou-se que a distribuição da intensidade da emissão fosforescente possui um perfil gaussiano e indicou um máximo em torno de 1280 nm (**Figura 6.3B**). A emissão de fosforescência em 1280 nm é específica do $^1\Delta_g$ monomol, sendo considerada a evidência experimental mais aceita para a liberação do $^1\Delta_g$ [Cadenas e Sies, 1984; Ocshner, 1997; Bonnett, 2000]. Deste modo pode-se atribuir esta emissão de fosforescência ao oxigênio singlete ($^1\Delta_g$), produzido a partir da fotoexcitação do Quinifuril.

A **Figura 6.3C** mostra um perfil representativo da emissão da fosforescência da solução aquosa do Quinifuril excitado em 355 nm por pulso de laser de duração 8 ns. Observa-se que inicialmente há o acúmulo do $^1\Delta_g$, representado pelo crescimento do sinal de fosforescência, para em seguida decair numa cinética aparentemente exponencial. Pode-se racionalizar este comportamento a partir da seguinte análise:

A taxa de formação do $^1\Delta_g$ pela transferência da energia do tripleto do Quinifuril para o oxigênio molecular pode ser expressa através da expressão:

$$\frac{d[{}^1\Delta_g]}{dt} = k_q [T][O_2] - k_{{}^1\Delta_g} [{}^1\Delta_g] \quad (19)$$

onde k_q é a constante de supressão do tripleto do Quinifuril pelo oxigênio; $k_{^1\Delta_g}$ é a constante de decaimento monomolecular do $^1\Delta_g$; e $[O_2]$ é a concentração de oxigênio na solução.

A concentração do estado tripleto $[T]$ do Quinifuril em função do tempo t é:

$$[T] = [T]_0 \exp[-(k_0 + k_q[O_2])t] \quad (20)$$

Como a concentração de oxigênio ($[O_2]$) na solução aquosa ($\cong 10^{-4}$ M) é aproximadamente 10 vezes maior que a concentração utilizada de Quinifuril nas soluções ($\cong 10^{-5}$ M), sua concentração é muito maior que a concentração do estado excitado tripleto $[T]$ do Quinifuril. Deste modo pode-se supor que $[O_2]$ é aproximadamente constante na Expressão (19).

A partir desta aproximação, a concentração de oxigênio singlete ($[^1\Delta_g]$), formado pela excitação do Quinifuril, pode ser escrita em primeira aproximação como:

$$[^1\Delta_g] = \frac{k_q[O_2][T_0]}{k_{^1\Delta_g}[-(k_0 + k_q[O_2])]} \left\{ \exp[-(k_0 + k_q[O_2])t] - \exp(-k_{^1\Delta_g}t) \right\} \quad (21)$$

onde o primeiro termo exponencial ($\exp[-(k_0 + k_q[O_2])t]$) está associado à formação do $^1\Delta_g$, devido à transferencia de energia do tripleto do Quinifuril para o oxigênio; e o segundo termo exponencial ($\exp(-k_{^1\Delta_g}t)$) está associado ao decaimento do $^1\Delta_g$. A Expressão (21) reflete o comportamento dos dados experimentais observados (Fig. 6.3C).

Os tempos de vida do $^1\Delta_g$ ($\tau_{\Delta_g} = \frac{1}{k_{^1\Delta_g}}$) em ambos solventes foram calculados pelos ajustes dos perfis da fosforescência através da Expressão (21) e aplicadas aos dados das Figuras 6.3A e 6.3C. Os dados obtidos para os tempos de vida do $^1\Delta_g$ foram 74,7 μ s em acetonitrila e 3,5 μ s em água e estão em torno dos valores descritos na literatura [Frimer, 1985; Dolphin, 1994; Bonnett, 2000].

Figura 6.3 – (A) Perfis da emissão de fosforescência do $^1\Delta_g$ induzida pela excitação por pulso de laser (385 nm) da solução de Quinifuril (20 μ M) em acetonitrila monitorados em comprimentos de onda variados. **(B)** Distribuição das intensidades de emissão de fosforescência (Fig. A, seta). O ajuste gaussiano (linha sólida) mostra o máximo em 1280 nm. **(C)** Perfil representativo da emissão de fosforescência (1280 nm) do $^1\Delta_g$, induzida pela excitação (385 nm) do Quinifuril (20 μ M) em solução aquosa e o ajuste através da Expressão (21) (linha tracejada). Condições- 10 μ L de solução de Quinifuril dissolvidos em 2 mL de acetonitrila (Fig.A e B) ou água milli-Q (Fig.C). A fosforescência foi monitorada à temperatura ambiente (22°C) utilizando um espectrofotômetro Edinburgh F900.

O rendimento quântico de produção de $^1\Delta_g$ ($\Phi_{^1\Delta_g}^Q$), devido à excitação do Quinifuril em solução aquosa, foi obtido se utilizando a porfirina *meso-tetrakis p-sulfonatofenil* (TPPS₄) como um padrão. O rendimento quântico do Quinifuril foi calculado como:

$$\Phi_{^1\Delta_g}^Q = \Phi_{^1\Delta_g}^P \frac{I_Q}{I_P} \frac{A_{396}^P}{A_{396}^Q} \quad (22)$$

onde $\Phi_{^1\Delta_g}^Q$ e $\Phi_{^1\Delta_g}^P$ são os rendimentos quânticos de $^1\Delta_g$ resultando da excitação do Quinifuril e do padrão ($\Phi_{^1\Delta_g}^P = 0,62$ [Mosinger e Micka, 1997]). I_P e A_{396}^P , e I_Q e A_{396}^Q são as intensidades de fosforescência em 1280 nm e da absorção óptica da porfirina e do Quinifuril em 396 nm, respectivamente. O rendimento quântico obtido foi $\Phi_{^1\Delta_g}^Q = 0,29 \pm 0,03$ ($P < 0,001$).

Observou-se anteriormente que a presença dos agregados de SDS-Quinifuril diminui o tempo de vida do tripleto do Quinifuril. Para se verificar qualitativamente a influência da presença dos agregados sobre a produção de $^1\Delta_g$, realizou-se medidas da emissão de fosforescência para amostras idênticas de Quinifuril (20 μ M) nas seguintes condições: (a) apenas em solução aquosa; (b) na presença dos agregados de SDS-Quinifuril após a fase "log"; e (c) na presença de micelas de SDS (20 mM). A **Figura 6.4** mostra os perfis representativos da emissão da fosforescência da amostra em solução aquosa apenas e na presença dos agregados (2 mM de SDS). Observou-se que a intensidade de emissão de fosforescência na presença dos agregados decai mais de 5 vezes quando comparada com a intensidade do sinal em solução aquosa, indicando que a produção de $^1\Delta_g$ é diminuída em mais de 80% na presença dos agregados. Na presença de micelas formadas de SDS (20 mM) não se observou diferenças apreciáveis na intensidade de emissão da fosforescência em relação a solução aquosa, indicando que na presença das micelas a produção de $^1\Delta_g$ não é alterada (dado não mostrado).

Figura 6.4 - Perfis normalizados da emissão da fosforescência do $^1\Delta_g$ do Quinifuril (20 μM) em solução aquosa (**a**) e na presença de agregados de SDS-Quinifuril (**b**) formados por 2mM de SDS. A excitação foi realizada por pulso de laser (385 nm) e a fosforescência foi monitorada em 1280 nm à temperatura ambiente (22°C) utilizando um espectrofotômetro Edinburgh F900.

6.3 - FORMAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO•) DEVIDO À FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

A liberação do radical livre estável óxido nítrico (NO•) induzido pela fotólise do Quinifuril baseou-se no ensaio fluorimétrico da reação da sonda não fluorescente *2,3-diaminonaftaleno* (DAN) com o nitrito (NaNO₂) resultando no produto fluorescente *1-(H)-naftotriazole* (NAT) [Misko et al., 1993], devido à reação de fechamento do anel do DAN. A reação ocorre em meio ácido (pH 1):

Os experimentos iniciaram-se pela curvas de calibração de uma amostra de DAN (0,32 mM) onde se titulou nitrito em diversas concentrações. A intensidade de emissão de fluorescência (máximo em 407nm (I_{407})) do NAT ligado ao nitrito (NAT/NaNO₂) é proporcional à concentração de NaNO₂ na solução. A **Figura 6.4A** mostra os espectros de fluorescência do NAT na presença de NaNO₂. A proporcionalidade entre a concentração de nitrito formado ($[\text{NaNO}_2]$) e a intensidade de fluorescência em 407 nm (I_{407}) é evidenciada pela regressão linear entre estas quantidades (**Figura 6.4B**), de onde se obteve a relação:

$$[\text{NaNO}_2] = (I_{407} / (5,52 \pm 0,13) \times 10^{+8}) \text{ M} \quad (23)$$

A **Figura 6.5A** mostra um exemplo representativo da irradiação do Quinifuril na presença do DAN para a detecção de nitrito na solução, formado pela fotodecomposição do composto. Observou-se que a absorção da solução aquosa de Quinifuril (24,3 μM) sofreu um deslocamento batocrômico (396→406 nm) após a adição do DAN (concentração final 0,03 mM), devido a queda do pH da amostra de 6 para 1. O deslocamento da posição do pico de absorção do Quinifuril foi acompanhada por um discreto aumento na absorbância (de 0,6 para 0,7), devido à protonação do composto. A irradiação da amostra com luz (350-450 nm) resultou na fotólise do Quinifuril, monitorada em 406 nm. Após a total fotólise do Quinifuril, a mistura foi

incubada por 10 minutos no escuro e em seguida adicionou-se NaOH para a estabilização do NAT em pH 11. Mediu-se a fluorescência da amostra (**Fig. 6.5B**), monitorada na região espectral 375-550 nm, com excitação em 375 nm. Experimentos similares foram realizados em soluções deaeradas de Quinifuril contendo DAN. O perfil da fluorescência e o rendimento de produção do $\text{NO}^{\bullet}$ foram similares ao obtidos na presença de ar.

Figura 6.4 - (A) Espectros de fluorescência do NAT/NaNO₂ ($\lambda_{\text{exc}} = 375\text{nm}$) para diferentes concentrações de nitrito; **(B)** Curva de calibração de I_{407} versus [NaNO₂]. O fator de calibração $(5,52 \pm 0,13) \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ foi calculado através do ajuste linear.

Observou-se que os espectros de fluorescência mostrado na **Fig. 6.5** são similares ao da **Fig. 6.4**, indicando que a reação que ocorre é de fato devido à presença do nitrito na solução, liberado durante a fotodecomposição do Quinifuril. Observou-se adicionalmente que amostras de DAN irradiadas por 10 min não fluorescem e também que amostras de Quinifuril contendo DAN e mantidas no escuro pelo mesmo tempo também não fluorescem (dados não mostrados). Estes resultados indicam que a fotodecomposição do Quinifuril é a única fonte de nitrito (NO_2^-), onde a formação do NO_2^- pode resultar da oxidação do $\text{NO}^\bullet$ pelo oxigênio molecular em solução aquosa [Francis et al., 1996]. Como o nitrito em solução ácida ($\text{pH} < 2$) se transforma em $\text{NO}^\bullet$ [Beckman, 1996] e, deste modo, considerou-se que estas medidas são representativas da produção de $\text{NO}^\bullet$ devido a fotodecomposição do Quinifuril.

A reação total de fotólise do Quinifuril (RNO_2) com a formação de nitrito, sendo o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) um produto intermediário, pode ser resumida através de:

A concentração de nitrito liberado pela fotólise de $24,3 \mu\text{M}$ de Quinifuril na presença de DAN (**Figura 6.5**) foi estimada em $11,0 \pm 2,0 \mu\text{M}$ em solução aerada e em $10,4 \pm 1,8 \mu\text{M}$ em solução deaerada. Nestas estimativas utilizou-se a Expressão **(23)** e as intensidades da fluorescência em 407 nm. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

Destes dados, calculou-se o rendimento de produção do nitrito (Φ_{NO}^Q):

$$\Phi_{\text{NO}}^Q = \frac{M_{\text{NO}}}{M_Q} \quad (26)$$

onde M_{NO} e M_Q são as massas de nitrito formado e Quinifuril consumido, respectivamente. Obteve-se que o rendimento de formação de nitrito devido à fotodecomposição do Quinifuril foi de **(0,45 ± 0,05) mol NO_2^- /mol Quinifuril** e não depende da presença do oxigênio.

Figura 6.5 - (A) Espectros de absorção de 24,3 μM de Quinifuril em solução aquosa pH 6 (●). A adição de 0,03 mM DAN causou a queda do pH de 6 para 1, com conseqüente deslocamento batocrômico da absorção do Quinifuril (396 $\rightarrow$ 406 nm). A irradiação da amostra por 480 s causou a fotólise do Quinifuril até sua completa extinção. **(B)** Espectros representativos da emissão fluorescente do NAT ($\text{DAN} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NAT}$), com máximo em 407 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 375$ nm). Os espectros foram obtidos após a completa fotólise da solução de Quinifuril na presença de DAN para a amostra aerada (linha sólida) e deaerada (linha tracejada).

Para se verificar qual espécie química é realmente liberada durante a fotólise do Quinifuril, utilizou-se o método baseado na reação quimioluminescente entre o óxido nítrico ($\text{NO}^\bullet$) e o ozônio (O_3) resultando na formação do radical transiente dióxido de nitrogênio (NO_2^*). Deste modo, o óxido nítrico pode ser medido diretamente através da reação entre o $\text{NO}^\bullet$ e o ozônio [Sievers, 1997]:

O radical NO_2^* , formado na reação (27), se encontra num estado eletrônico excitado e sua desexcitação é acompanhada da emissão de quimioluminescência (reação 28) na região do vermelho ($>600 \text{ nm}$). As medidas foram realizadas utilizando o aparato NO-Analyzer (SIEVERS mod. 280), onde a reação quimioluminescente ocorre num sistema fechado, composto por uma cuba de reação, onde o $\text{NO}^\bullet$ eventualmente formado é transportado por arraste de um fluxo de gás nitrogênio para a câmara de reação quimioluminescente ($\cong 20 \text{ mL}$), onde se encontra o ozônio. Esta câmara possui uma janela óptica ligada a um tubo fotomultiplicador, que captura e amplifica proporcionalmente os fótons eventualmente emitidos em um sinal elétrico (da ordem de milivolts) [Sievers, 1997].

Os experimentos iniciaram-se com a calibração prévia do NO-Analyzer, onde se titulou nitrito em quantidades conhecidas (entre 0-300 pmols) na cuba de reação contendo 1,0 mL de iodeto de sódio (0,3 M) e 6,0 mL de ácido acético glacial. O gás $\text{NO}^\bullet$ é formado da reação $\text{NaI} + \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}^\bullet (\text{gás}) + \text{I}^-$ e arrastado para a câmara quimioluminescente e quantificado. A **Figura 6.6A** mostra um experimento representativo de calibração, onde se observa que cada adição de nitrito (em triplicata) provocou pulsos de quimioluminescência, onde a área do pulso é proporcional à quantidade de nitrito adicionado. A área sob a curva dos pulsos (em $\text{mV}\times\text{s}$) é proporcional à quantidade de nitrito adicionada. Observou-se que a área dos pulsos é linearmente proporcional à quantidade de nitrito, com constante de proporcionalidade de $(1,38\pm 0,2)\times 10^{11} \text{ mV}\times\text{s/mol}$ ($P<0,0001$) (**Figura 6.6B**).

Figura 6.6 – (A) Pulsos de quimioluminescência do NO_2^* formado da seqüência de reações: $\text{NO}_2^- + \text{NaI} \rightarrow \text{NO}^*$; $\text{NO}^* + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* + \text{O}_2$; e $\text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$. A injeção de nitrito produziu os pulsos na câmara de reação quimioluminescente, de área medida em $\text{mV} \times \text{s}$, em função de $[\text{nitrito}]$. **(B)** Dependência da área dos pulsos com a quantidade de nitrito injetado - curva de calibração. O ajuste (linha sólida) forneceu a constante de proporcionalidade $(1,38 \pm 0,2) \times 10^{11} \text{ mV} \times \text{s/mol}$ de nitrito.

A **Figura 6.7A** mostra a liberação do NO[•], medida através da emissão de sua quimioluminescência, durante irradiação por 1800 s de diferentes amostras do Quinifuril. Observou-se que a intensidade do sinal inicial de quimioluminescência é linearmente proporcional à concentração inicial do composto e que a irradiação contínua do composto induz a liberação contínua de NO[•]. Esta medida da liberação de NO[•] através deste sistema é realizada em tempo real.

A **Figura 6.7B** mostra um experimento análogo ao anterior onde a irradiação do Quinifuril (138 nmol) foi realizada até o consumo completo do composto por fotodecomposição. A produção do NO₂^{*} medido por estes experimentos foi considerada como sendo equivalente à produção do óxido nítrico NO[•]. O rendimento de produção de NO[•] foi avaliado pela área sob a curva (**Fig. 6.7B**) e obtido o valor de 240000 mV×sec. Através da constante de proporcionalidade ($1,38 \times 10^{11}$ mV×s/mol), obtida da curva de calibração (**Figura 6.6B**), pode-se avaliar que a produção de NO[•] foi de $61,8 \pm 10$ nmol.

Como a quantidade de Quinifuril consumida nesta reação foi de 138 nmol, pode-se concluir que o rendimento específico de NO[•] durante a fotólise de Quinifuril foi de (0.45 ± 0.07) mol NO[•]/mol Quinifuril, calculado através da Expressão (26). Este valor coincide com o valor obtido anteriormente nos experimentos de fluorescência com a sonda DAN/NAT. Deste modo pode-se inferir que somente o NO[•] foi produzido durante a fotodecomposição do Quinifuril e não o nitrito (NO₂⁻).

Figura 6.7 – A quimioluminescência do NO_2^* , formado pela reação com o NO^* liberado da fotodecomposição do Quinifuril, com o ozônio (reações **27** e **28**), medida pelo aparato NOAnalyzer. **(A)** Perfis das curvas cinéticas de liberação de NO^* para diversas concentrações de Quinifuril (a-2,7; b-5,5; c-11; d-21 μM) irradiadas por 1800 s. Observa-se que a amplitude do sinal (em $\text{mV}\times\text{s}$) quando se inicia a irradiação (seta) é proporcionalmente linear à [Quinifuril]. **(B)** Irradiação de uma amostra de Quinifuril (138 nmol) até a completa extinção do composto. O cálculo da área sob a curva (hachurada) indicou a produção de $61,8\pm 10$ nmol de NO^* , com rendimento de 45 ± 7 %.

6.4 – FOTORELAXAMENTO DO MÚSCULO ANOCOCCÍGEO DE RATOS PELA FOTODECOMPOSIÇÃO DO QUINIFURIL

Também foi utilizado um teste biológico para se determinar a liberação do NO• induzido pela fotólise do Quinifuril.

Este teste consistiu na medida do relaxamento do músculo liso de rato anococcígeo isolado, pré-contraído com fenilefrina. Escolheu-se esta preparação biológica pois o músculo é extremamente delgado ($\cong 0,2$ mm), apresenta respostas de fotorelaxamento mínimas na presença de inibidores da NO-sintase e apresenta muita sensibilidade ao NO• [Gillespie et al., 1990]. Além disso, as respostas de relaxamento apresentadas pelo músculo anococcígeo são rápidas, reversíveis e de fácil quantificação.

Os músculos foram extraídos de ratos e posicionados do aparato de medidas de tensões isométricas imersos em líquido nutritivo de Krebs. Após o período de estabilização do músculo ($\cong 1$ h), início-se o período de aquisição dos dados de relaxamento. Para isto, adicionou-se $0,3 \mu\text{M}$ de fenilefrina para induzir a contração dos músculos, atingindo o platô de contração em 4-6 min. Uma vez estabilizada a contração, os músculos foram iluminados na região espectral 350-450 nm por pulsos de luz de 10 s de duração. O procedimento foi repetido três vezes. A seguir o Quinifuril foi adicionado à cuba em concentrações pré-determinadas. Os músculos foram incubados com Quinifuril por 5 min no escuro e nenhum relaxamento foi observado neste período (dados não mostrados). Após este período, iniciou-se a irradiação dos músculos na presença de diversas concentrações de Quinifuril em três seções de 10 s cada, intercaladas por 60 s de descanso entre as irradiações.

A **Figura 6.8A** mostra registros representativos do relaxamento do músculo anococcígeo induzido por 10 s de irradiação de diferentes concentrações de Quinifuril (10-1000 nM). Observou-se que as respostas dos músculos aos estímulos luminosos (setas) foram imediatas e que a amplitude do relaxamento foi proporcional à concentração do Quinifuril presente no banho.

Figura 6.8 – (A) Pulsos de relaxamento (em grama-força) do músculo liso anococcígeo pré-contraído por 0,3 μ M de feniliefrina, devido à irradiação da solução contendo diferentes concentrações de Quinifuril. As setas indicam o início da irradiação (10 s). O sistema foi calibrado com massas de 1 g e 2 g. **(B)** Dependência da amplitude do relaxamento muscular induzido pela irradiação de diferentes concentrações de Quinifuril. Observa-se que 10 nM de Quinifuril induziu um relaxamento de 15 % e a saturação do relaxamento (82 %) foi obtida com 1 μ M.

A **Figura 6.8B** mostra a relação entre a concentração de Quinifuril na solução e a magnitude do relaxamento muscular induzido pela irradiação. Observou-se que para 10 nM de Quinifuril a irradiação luminosa foi capaz de induzir 15% de fotorelaxamento do músculo anococcígeo e a máxima amplitude de fotorelaxamento (82 %) foi obtida com 1 μ M de Quinifuril.

Observou-se que na presença de 10 μ M de ODQ (*1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one*), um inibidor da ação do NO $\cdot$, o fotorelaxamento foi abolido, indicando que este fotorelaxamento exibe propriedades farmacológicas idênticas aos produzidos pelo NO $\cdot$ (dados não mostrados).

Conseqüentemente, inferiu-se que a irradiação luminosa do Quinifuril esta associada à produção do NO $\cdot$ e que o Quinifuril apresenta a propriedade farmacológica de induzir o fotorelaxamento sob irradiação.

6.5 – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O Quinifuril é um composto que se degrada ao ser irradiado por luz visível [Borissevitch et al., 2003]. Neste Capítulo mostrou-se que as espécies reativas ânion superóxido, oxigênio singlete e óxido nítrico são produzidas durante a fotoativação do Quinifuril com luz visível. A formação destas espécies reativas é crucial para o uso do fotossensibilizador em TFD.

A formação das espécies reativas $O_2^{\bullet-}$ e $^1\Delta_g$ foram previstas pelo modelo de fotodecomposição do Quinifuril como sendo produtos da sua fotólise [Borissevitch et al., 2003]. O modelo previu que o $O_2^{\bullet-}$ seja formado através da interação do estado fundamental do composto com seu estado excitado tripleto na presença do oxigênio molecular (fototransformação **FT₅**):

O modelo também previu que o $^1\Delta_g$ seja formado pela transição da energia do estado tripleto do Quinifuril para o oxigênio molecular (**FT₆**):

O fato de que os produtos finais da fotólise do Quinifuril não possuírem toxicidade contra linhagens celulares evidencia que espécies intermediárias devem as responsáveis pela toxicidade do composto. As espécies $NO^{\bullet}$, $^1\Delta_g$ e $O_2^{\bullet-}$, cuja formação foram demonstradas neste Capítulo, podem ser responsáveis pela fotocitotoxicidade do composto uma vez que sua citotoxicidade contra algumas linhagens celulares na presença de luz é aumentada em aproximadamente 10 vezes [Daghastanli et al., 2004a; Daghastanli et al., 2004b] quando comparada com a mesma propriedade no escuro [Rossa et al., 2003].

A fotocitotoxicidade do Quinifuril, induzida por sua fotodecomposição, pode ser entendida ao se considerar que estas espécies reativas podem induzir o *stress* oxidativo nas células, resultando em altos níveis de danos celulares, no qual a integridade da membrana celular é perdida, ou mesmo

induzindo a lise das células. Todos estes eventos têm como resultado a morte ou inativação celular. A presença destas espécies reativas *per se* já poderiam explicar os efeitos tóxicos do composto, mas deve-se também observar que na presença simultânea de $\text{NO}^\bullet$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ há a produção de peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$), um potente oxidante, o que poderia aumentar este efeito tóxico [Murphy, 1999; Miranda et al., 2000]. Estes efeitos sinérgicos entre as espécies reativas poderiam explicar os efeitos de morte ou inibição celular induzido pelo Quinifuril ao ser irradiado.

Capítulo 7

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta Tese teve por objetivo o estudo de algumas propriedades físicas e químicas do Quinifuril mediadas pela luz visível que podem estar associadas à sua ação biológica e lançar novas bases de conhecimento para a sua eventual utilização em terapias, em particular a fotoquimioterapia.

O Quinifuril é um composto nitroheterocíclico que apresenta propriedades bactericidas, fungicidas e anti-cancerígenas e que absorve luz na região visível. Supõe-se que certas propriedades biológicas do composto são mediadas por sua interação com a luz, tais como sua ação deletéria de indução de anemias hemolíticas e benéficas como sua bem entendida ação citotóxica no escuro.

O processo de fotodecomposição do Quinifuril é acelerado na ausência de oxigênio. Este efeito pode vir a ser importante no tratamento de células hipóxias ou mesmo anóxias, uma vez que se mostrou que mesmo nesta condição anaeróbica existe a produção de óxido nítrico NO•, uma espécie reativa que pode produzir danos nas células tumorais [Tocher, 1997; Wink e Mitchell, 1998; Wink et al., 1998], uma vez que a presença do oxigênio no meio tumoral é essencial para a eficiência terapêutica dos tratamentos em TFD com o uso dos atuais fotossensibilizadores [Jori, 1996; Ochsner, 1997; Bonnett, 2001; Allison et al., 2004]. A ação em meios anaeróbicos dos nitrocompostos tem sido descrita [Biaglow et al., 1986], mas esta ação estava conectada com a redução metabólica do nitro-grupo [Muller, 1986].

Neste trabalho mostrou-se que a ação citotóxica do Quinifuril é aumentada na presença da luz, inclusive sendo favorecida em meios anaeróbicos, devido à sua mais rápida fotodecomposição nestes meios. Os dados obtidos são os primeiros a indicar a fotocitotoxicidade de um composto nitroheterocíclico e demonstraram a possibilidade de sua aplicação como droga fotossensibilizadora em fotoquimioterapia.

Determinou-se que o tripleto do Quinifuril possui tempo de vida da ordem de 2 μ s na presença de ar e energia de 18200 cm⁻¹ (218 kJmol⁻¹) e mostrou-se que a fotoativação do Quinifuril produz o ¹ Δ_g . Isto pode ser

entendido uma vez que esta energia de tripleto ultrapassa em mais de duas vezes a energia necessária para a produção do $^1\Delta_g$ (94 kJmol⁻¹) pelo mecanismo do Tipo II. Estes dados indicam que o composto possui características adequadas para ser considerado um eficiente fotossensibilizador [Ochsner, 1997; Bonnett, 2000].

A utilização do Quinifuril como fotossensibilizador em fotoquimioterapia em princípio poderia ser limitada pela sua absorção em 396 nm, fora da janela terapêutica (600-800 nm). Esta séria limitação poderia ser contornada através do seu uso contra cânceres de pele, dermatites, fungos, micoses ou através da eventual mudança de sua estrutura química, com o aumento de sua cadeia de π -conjugação, com conseqüente deslocamento de sua banda de absorção para maiores comprimentos de onda. O uso de sistemas carregadores de drogas ("*drug delivery*"), tais como os lipossomos, microesferas ou hidrogéis, poderia ser uma alternativa de grande valia na utilização terapêutica do Quinifuril e que merece uma atenção futura.

Por outro lado, a limitação de sua absorção em 396 nm poderia ser minimizada ao se considerar que a fotoativação do composto libera não somente o $^1\Delta_g$ mas também outras duas espécies reativas: $O_2^{\bullet-}$ e $NO^{\bullet}$, três espécies que induzem a morte celular. O $NO^{\bullet}$ é uma espécie reativa que exige, aparentemente, uma grande energia para ser liberada, uma vez que os compostos doadores de $NO^{\bullet}$ pesquisados atualmente, como os complexos de rutênio, devem absorver na região do ultravioleta (≤ 350 nm) para a liberação do $NO^{\bullet}$.

Outro achado experimental que merecerá atenção futura será a indução do relaxamento muscular que poderá ser adequadamente explorado para eventuais usos em terapias de distúrbios vasculares, cerebrais ou cardíacas, através do uso do composto em medicamentos de liberação controlada.

BIBLIOGRAFIA

- Allison**, R.R.; Downie, G.H.; Cuenca, R.; Hu, X-H.; Childs, C.J.H.; Sibata, C.H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **1**:27-42.
- ATCC** (2005): <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/> (acesso em março/2005).
- Beckman**, J.S. (1996). The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: Lancaster, J. (ed.). *Nitric oxide. Principles and actions*. Academic Press.
- Biaglow**, J.E.; Varnes ME; Roizentowle L, Clark, E.P.; Epp, E.R.; Astor, M.B.; Hall, E.J. (1986). Biochemistry of reduction of nitro heterocycles. *Biochem. Pharmacol* **35** (1): 77-90.
- Bonnett**, R. (2000). *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Advanced chemistry text. Gordon & Breach Sci. Publisher.
- Bonnett**, R. (2001). Photobleaching of sensitizers used in Photodynamic Therapy. *Tetrahedron* **57**:9513-9547.
- Borisevitch**, Ye.E.; Degterev, I.A. (1992). Biological and phototransformation of nitrofurylvynil quinoline derivatives, interconnection with biological activity, the problem and probability of therapeutic effectiveness improvement. *J. Chem. Biochem. Kinetics*, **2**:(4) 259-265.
- Borissevitch**, I.E.; Borges, C.P.F.; Borissevitch, G.P.; Yushmanov, V.E.; Louro, S.R.W. (1996). Binding and location of dipyrindamole derivatives in micelles: the role of drug molecular structure and charge. *Zeitschrift Fur Naturforschung C - Journal of Biosciences*, **51**(c):578-590.
- Borissevitch**, I.E., Daghasanli, N.A.; Degterev, I.A. (2003). Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furyl)ethenyl-4-[N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline - Effect of oxygen and compound concentration. *J. Photochem. Photobiol. A-Chemistry* **159** (3): 213-217.
- Bourre**, L.; Thibaut S.; Briffaud, A.; Rousset, N.; Eleouet, S.; Lajat, Y.; Patrice, T. (2002). Indirect detection of photosensitizer ex vivo. *J. Photochem. Photobiol B*: **67**:23-31.
- Buzukov**, A.A.; Il'asova, V.B.; Tabak, M.; Meirelles, N.C.; Degterev, I.A. (1996). An ESR and spectrophotometric study of the denitration of nitroheterocyclic drugs by liver homogenates and their metabolic consumption by liver microsomes from cytochrome P-450-induced mice. *Chem.-Biol. Interact.*, **100**:113-124.
- Cadenas**, E.; Sies, H. (1984). Low-level chemiluminescence as a indicator of singlet oxygen in biological systems. *Methods in Enzimology*, **105**:221-231.

- Calvert**, J.G.; Pitts, J.N. (1966). Photochemistry (1st ed.). John Wiley&Sons Pub. EUA.
- Campbell**, I.D.; Dwek, R.A. (1984). Biological Spectroscopy (1st ed.). The Benjamin/Cummings Pub. Co. Menlo Park, NY.
- Cox**, B.G. (1994). Modern liquid phase kinetics (1st ed.). 93 pp.Oxford Univ. Press.
- Daghastanli** N.A., Rossa M.M., Selistre-de-Araujo H.S., Tedesco, A.C., Borissevitch, I.A.; Degterev, I. A. (2004a). Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light. J. Photochem. Photobiol B-Biology, **75**:27-32.
- Daghastanli**, N.A.; Degterev, I.A.; Tedesco, A.C.; Borissevitch, I.E. (2004b). Photocytotoxicity of a 5-nitrofuranethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells. Brazilian Journal of Medical & Biological Research **37**(12):1873-1879.
- Degterev**, I.A.; Tatarskaya, N.K.; Zaikov, G.E. (1989). Mechanism of Biological Nitrofurans Transformation in Microsomes with Special Reference to Quinifur - Kinetic-Study. Khim Farm ZH+ **23** (5):530-537.
- Degterev**, I.A.; Buzukov, A.A.; Tatarskaya, N.K.; Leonova, Y.Y.; Sukhova, N.M. (1990). Metabolism of Heterocyclic-compounds in mice Liver-microsomes. (Russian) Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal **24**(9): 9-16.
- Degterev**, I.A.; Tatarskaya, N.K.; Zaikov, G.E. (1993). Kinetics and mechanism of microsomal metabolism of nitroheterocyclic compounds - 5-nitrofur and 1-nitroacridine derivatives - and relationship with biological activity of these compounds. In: Todorov IN, Degterev IA, Zaikov GE (eds.) Bioactive Compounds: Biotransformation and Biological Action. New York: NOVA Science Pub., pp155-200.
- Degterev**, I.A.; Grijalba, M.T.; Vercesi, A.E. (1997). Nitroheterocyclic antibiotics (NHCA) produce peroxynitrite during metabolism in liver microsomes. FASEB J, **11**(9): A1310-A1310 Suppl. S.
- Degterev**, I.A.; Nogueira, P.C.L.; Marsaioli, A.J.; Vercesi, A.E. (1999a). Microsomal metabolism of quinifuryl - a nitrofur-ethenyl-quinolone antiseptic possessing antitumor activity in vitro. Eur. J. Drug Metabol. Pharmacokin. **24**(1):15-22.
- Degterev**, I.A.; Wajenberg, E.; Louro, S.R.W.; Vercesi, A.E. (1999b). Simultaneous formation of nitric oxide, superoxide anion and peroxynitrite during microsomal metabolism of nitroheterocyclic antibiotics. FASEB J. **13**(7):A1457-A1457, Suppl. S.
- Dolphin**, D. (1994). Photomedicine and photodynamic therapy. Can. J. Chem. **72**:1005-1013.

- Ferreira**, S.M.; Lerner, S.F.; Brunzini, R.; Evelson, P.A.; Llesuy, S.F. (2004). Oxidative stress markers in aqueous humor of glaucoma patients. *Am. J. Ophthalmol.* **137**(1):62-9.
- Foley**, M.S.C.; Beeby, A.; Parker, A.W.; Bishop, S.M.; Phillips, D. (1997). Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthalocyanines bound to human serum albumin. *J. Photochem Photobiol B-Biology* **38**(1):10-17, 1997.
- Foot**, C.S. (1991). Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology* **54**(5):659.
- Foster**, H.D.; Hoffer, A. (2004). Schizophrenia and cancer: the adrenochrome balanced morphism -Review. *Med Hypotheses*. **62**(3): 415-419.
- Francis**, T. Bonner; Geoffrey Stedman (1996). The chemistry of nitric oxide and redox-related species. In: Feelisch, M.; Stamler, J.S. (eds). *Methods in Nitric Oxide Research*. John Wiley&Sons. Chichester, England.
- Franks**, L.M.; Teich, N. *Introdução a biologia celular e molecular do câncer* (1ª ed., 1990). Ed. Rocca (Brasil).
- Freshney**, R.I. (1994). Measurement of viability and cytotoxicity. In: *Culture of animal cells* (3rd ed.). Wiley-Liss Inc.
- Frimer**, A.A. (1985). Singlet Oxygen. *Physical-Chemical Aspects*, vol. I, p.183.
- Garavito**, R.M.; Ferguson-Miller, S. (2001) Detergents as tools in membrane biochemistry. *Journal Of Biological Chemistry* **276**(35):32403-32406.
- Gillespie**, J.S.; Liu, X.; Martin, W. (1990). The neurotransmitter of non-adrenergic non-cholinergic inhibitory nerves to smooth muscle of genital system. In: Moncada, S. Higgs, E.A. (eds.). *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory systems*. Elsevier Sci. Publ.
- Halliwell**, B.; Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals in catalytic ions in human diseases: an overview. *Methods in Enzymology*, **186**:1-9.
- Henderson**, B.W.; Dougerthy, T.R. (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*, **55**: 145-157.
- Hoffer**, A. (1998). *Vitamin B₃ and Schizophrenia: discovery, recovery, controversy*. Quarry Press, Kingston, Ont.
- Hogg**, N.; Kalyanaraman, B. (1999). Nitric oxide and lipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics* **1411**: 378-384.
- Ierardi**, D.F.; Pizauro, J.M.; Ciancaglini, P. (2002). Erythrocyte ghost cell-alkaline phosphatase: construction and characterization of a vesicular system for use in biomineralization studies. *Biochim. Biophys Acta-Biomembranes* **1567**:183-192.
- Jager**, L.P.; de Graaf, G.J.; Widjaja-Greefkes, A.H.C. (1997). Differential effects of nitrofurans on the production/release of steroid hormones by porcine adrenocortical cells in vitro. *Eur. J. Pharm.* **331**(2-3): 325-331.

- Jori, G.** (1996). Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of PDT. *J Photochem Photobiol B* **36**:87-93.
- Kaltenbach, J.P.; Kaltenbach, M.H.; Lyons, W.B.** (1958). Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Experimental Cell Research*, **15**: 112-117.
- Kemp, T.J.; Martins, J.A.** (1981). Triplet-state of 5-nitro-2-furoic acid by laser flash-photolysis—spectrum, lifetime and reactivity. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **77**:1425–1435.
- Kerwin, J.F.; Lancaster, J.R.; Feldman, P.L.** (1995). Nitric-Oxide - A New Paradigm for 2nd-Messengers. *J. Med. Chem.* **38**(22): 4343-4362.
- Kochevar, I.E.; Lambert, .CR. Lynch, M.C.; Tedesco, A.C.** (1996). Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1280: **223**-230.
- Korbelik, M.; Parkins, C.S.; Shibuya, H.; Cecic, I.; Stratford, M.R.L.; Chaplin, D.J.** (2000). Nitric oxide production by tumour tissue: impact on the response to photodynamic therapy. *Brit. J. Cancer* **82**:(11) 835-1843.
- Kroncke, K.D.; Fehsel, K.; Kolb-Bachofen, V.** (1997). Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection-How, Why, When, and Where? *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* **1**(2):107-112.
- Lunardi, C.N.; Bonilha, J.B.S.; Tedesco, A.C.** (2002). Stern-Volmer quenching and binding constants of 10-alkyl-9(10H)-acridone probes in SDS and BSA. *Journal Of Luminescence* **99** (1):61-71.
- Maeda, H; Akaike, T** (1998). Review: nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)*, **63**:854-865.
- Maiti, N.C.; Mazumdar, S., Periasamy, N.** (1998). J- and H- aggregates of porphyrin-surfactant complexes: time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies. *J. Phys. Chem. B* **102**(9):1528–1538.
- Makareyeva, I.N.; Lozovskaya, Ye.L.; Tatikolov, A.S.; Sapezhinskii, I.I.** (1997). Photosensitizing properties and anti-oxidant activity of furagin, an antimicrobial medicinal, a nitrofurantoin derivative. *Biophysics* **42**(2):461-467.
- Makings, L. R.; Tsien, R.Y.** (1994). Caged Nitric Oxide-Stable Organic Molecules from which Nitric Oxide can be Photoreleased. *J. Biol. Chem.* **269**:6282-6285.
- Maxwell, S.R.J.; Lip, G.Y.H.** (1997). Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Br. J. Clin. Pharmacology*, **44**:307-317.
- Merck, ed.** (2001). *The Merck Index. An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.* 13th Ed., Merck & CO., Inc., Whitehouse Station, NJ, p. 33.
- Miranda, K.M.; Espey, M.G.; Wink, D.A.** (2000). A discussion of the chemistry of oxidative and nitrosative stress in cytotoxicity. *J. Inorg. Biochem.* **79**:237-240.

- Misko**, T.P.; Schilling, R.J.; Salvemini, D.; Moore, W.M.; Currie, M.G. (1993). A fluorimetric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Anal. Biochem.*, **214**(1): 11-16.
- Moncada**, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. (1991). Nitric-Oxide - Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**:109-142.
- Monks**, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A. (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, **83**: 757-766.
- Moore**, D.E. (1987). Flash-photolysis of misonidazole and metronidazole, *Int. J. Radiat. Biol.* **51**:45-51.
- Mosinger**, J.; Micka, Z. (1997). Quantum yields of singlet oxygen of metal complexes of meso-tetrakis (sulfonatophenyl) porphine, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **107**:77-82.
- Mosmann** T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- Muller**, M. (1986). Reductive activation of nitroimidazoles in anaerobic microorganisms. *Biochem. Pharmacol* 35 (1): 37-41.
- Murphy**, M.P. (1999). Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1411**:401-414.
- Neugebauer**, J. (1994). A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry (5thed.). Calbiochem-Novabiochem Int. EUA.
- Ochsner**, M. (1996). Light scattering of human skin: a comparison between zinc(II)-phthalocyanine and Photofrin II. *J Photochem Photobiol B* **32**:3-9.
- Ochsner**, M. (1997). Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem Photobiol.B* **39**:1-18.
- Oertel** M, Schastak SI, Tannapfel A, Hermann R, Sack U, Mossner J & Berr F (2003). Novel bacteriochlorine for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in mouse tumour model. *Journal of Photochemistry and Photobiology.B, Biology*, **71**: 1-10.
- Pal**, P.; Zeng, H.; Durocher, G.; Girard, D.; Giasson, R.; Blanchard, L.; Gaboury L.; Villeneuve, L. (1996). Spectroscopic and photophysical properties of some new rhodamine derivatives in cationic, anionic and neutral micelles. *J. Photochem. Photobiol A: Chemistry*, **98**:65-72.
- Pasternack**, R.F.; Gibbs, E.J.; Collings, P.J.; dePaula, J.C., Turzo, L.C.; Terracina, A. (1998). A nonconventional approach to supramolecular formation dynamics. *The*

- kinetics of assembly of DNA-bound porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **120**:5873-5878.
- Piette**, J.; Volanti C.; Vantieghem, A.; Matroule, J.; Habraken, Y.; Agostinis, P. (2003). Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem. Pharmacol.* **66**:651-1659.
- Piveta**, M. (2004). Câncer, esperanças divididas. *Revista Pesquisa – Fapesp* **99**:46-53.
- Ramakrisna Rao**, D.N., Jordan, S., Mason, R.P. (1988). Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, and 2- and 5-nitroimidazoles by rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **37**(15): 2907-2913.
- Rossa**, M.M.; Rocha-e-Silva, T.A.A.; Terruggi, C.H.B.; Tedesco, A.C.; Araujo, H.S.S.; Borissevich, I.E.; Degterev, I.A. (2003). Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. *Pharmac. Res.*, **48**: 369-375.
- Samanta**, A.; Ramachandram, B.; Saroja, G. (1996). An investigation of the triplet state properties of 1,8-naphthalimide: A laser flash photolysis study. *J. Photochem Photobiol A-Chemistry* **101**(1):29-32.
- Sharman**, W.M.; Allen, C.M.; van Lier, J.E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, **11**:507-517.
- Shishido**, S.; de Oliveira, M.G. (1998). Nitric Oxide Release From S-Nitrosothiols and Deamination Reactions. *Proceedings of the IX Biennial Meeting of the International Society For Free Radical Research*, **34**:127.
- Sievers**, ed. (1997). Nitric Oxide Analyser (NOA 280). Operation and Service Manual. Software version 2.05, USA.
- Smirnov**, S.M.; Jurav, M.A.; Tatarskaja, N.K.; Borisevich, Y.E.; Degterev, I.A. (1989). Quinifur photoreduction and nitroanion radical formation. *Chemical Physics*, **8**:1723-1725.
- Smirnov**, S.M.; Tatarskaja, N.K.; Jurav, M.A.; Degterev, I.A.; Borisevich, Yu.E. (1989b). Influence of protonation on spectral properties and rate of primary processes of quinifur phototransformation, *Khimicheskaja Fisika*, **8**:1056-1059 (Russian).
- Suntres**, Z.E.; Shek, P.N. (1992). Nitrofurantoin-Induced Pulmonary Toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **43**(5):1127-1135.
- Suzuki**, N. (1993). Antioxidative Activity of Some Biologically Active Compounds with Active Oxygen Species. *The Spectrum* **6**(4):21-28.
- Tardivo**, P.; Del Giglio, A.; Paschoal, L.H.C.; Ito, A.S.; Baptista, M.S. (2005). Treatment of melanoma lesions using methylene blue and RL50 light source. *Photodyagnostics and Photodynamic Therapy - no prelo.*

- Tocher**, J.H. (1997). Reductive Activation of Nitroheterocyclic Compounds. *Gen. Pharm.* **28**(4): 485-487.
- Turro**, N.J. (1978). *Modern Molecular Photochemistry* (1st ed.). Benjamin-Cummings, Menlo Park, CA, 628 pp.
- Verovskiy**, V.N.; Degterev, I.A.; Sukhova, N.M.; Buzukov, A.A.; Leonova, E.Yu. (1990). Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic- and nitroheterocyclic compounds. In vitro and in vivo study. *Pharmac. Chem. J.*, **24**:20-24.
- Wink**, D.A.; Mitchell, J.B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Rad. Biol. Med.* **25**:(4-5) 434-456.
- Wink**, D.A.; Vodovotz, Y.; Cook, J.A.; Krisna, M.C.; Kim, S.; Coffin, D.; DeGraff, W.; Deluca, A.M.; Liebmann, J. Mitchell, J.B. (1998). The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment. *Biochemistry (Moscow)*, **63**(7):802-809.
- Wood**, P.D.; Mutus, B.; Redmond, R.W. (1996). The Mechanism of Photochemical Release of Nitric Oxide from S-Nitrosoglutathione. *Photochem. Photobiol.* **64**:518-524.

Anexo I

1. Breve Histórico do combate ao Câncer

Modernamente pode-se traçar uma linha dos principais avanços no tratamento do câncer:

1850: o biólogo alemão Johanes Mueller mostrou que o câncer era composto de células;

1882: são descobertos o núcleo e a divisão celulares pelo biólogo alemão Walther Flemming.

1890: O inglês Willian Halsted realizou a primeira mastectomia radical contra o câncer de mama.

1903: a inibição do crescimento tumoral através do uso dos Raios-X é descoberto pelo médico alemão George Perthes, que propõe o uso dos R-X para o tratamento do câncer.

1904: primeira cirurgia radical de próstata;

1910: a quimioterapia é iniciada pelo bioquímico alemão Paul Ehrlich, que propôs o uso de drogas anti-sífilis no tratamento de tumores.

1913: a mamografia é criada pelo cirurgião alemão A. Salomen. O rato é usado pelo bioquímico Grib Fibiger como modelo animal de crescimento de tumores.

1919: a dissolução do tecido linfóide e malformação da medula são observadas em soldados expostos ao gás mortarda na I Guerra mundial. Destas observações criaram-se novas drogas quimioterápicas a partir de 1942.

1927: operações bem-sucedidas de nódulos pulmonares.

1928: criado o teste para o diagnostico do câncer de colo de útero pelo médico grego George Papanicolau.

1933: primeira cirurgia de retirada total de um dos pulmões.

1935: inicio da radioterapia, onde são feitos tratamentos de tumores em estágios avançados, sem indicação cirúrgica.

1936: primeira evidência de que alguns tumores são causados por vírus, pelo biólogo americano John Bittner, que mostra que o leite de ratas pode transmitir câncer.

1953: o modelo da estrutura do DNA é descoberto por James Watson e Francis Crick.

1961: anúncio de que todas as formas de câncer resultam de mudanças no DNA das células, por Franck Horsfall. É sugerido que o tumor produz uma substância que promove o crescimento de vasos sanguíneos que alimentam o tumor, por Judah Folkman.

1976: Weishaupt et al. [*apud* Ochsner, 1997] postulou que o oxigênio singlete ($^1\Delta_g$) é o agente citotóxico responsável pela foto-inativação de células tumorais.

1980-atualmente: início dos estudos com fatores antiangiogênicos, que impedem que o tumor crie a rede de vasos necessários a sua alimentação.

1996: aprovação do uso clínico do Photofrin primeira droga para terapia fotodinâmica.

2. O câncer

Apesar de não ser possível definir o câncer em termos absolutos, ele pode ser razoavelmente definido como uma desordem celular, que muitas vezes se caracteriza através de uma massa de células anormais -o tumor, decorrente de uma série de alterações sofridas pelas células normais ao longo do tempo. Os tumores são reconhecidos pelo fato de que suas células crescem anormalmente. Deste modo, pode-se dizer que as células tumorais diferem das normais por não responderem aos mecanismos de controle, tais como o de crescimento ou de atividade bioquímica. De fato o câncer é um grupo de doenças de origens distintas que têm como efeito a proliferação de suas células de maneira irregular [Franks e Teich, 1990].

As células do câncer invadem os tecidos vizinhos provavelmente através de certas enzimas proteolíticas e sobrevivem a partir das células normais. Crescem no corpo, ocupando o espaço e envolvendo as células normais, provocando hemorragias e infecções. Apresentam alterações dos componentes da superfície celular, tais como antígenos, enzimas e oncogenes. Ele induz a deficiências nutricionais, perda de massa corpórea do hospedeiro e diminui as defesas do organismo.

Os casos mais críticos do câncer ocorrem quando as células cancerosas abandonam seu sítio primário de contaminação -a metástase. A Metástase é contaminação secundária de tecidos normais distantes do foco inicial de câncer. A figura 1 esquematiza um possível processo tumoral, mostrando o surgimento

do câncer (Ca), muitas vezes não detectado visualmente; o crescimento e surgimento do tumor e a formação do tumor clínico, com a proliferação de metástase.

Fig. 1: Esquema de um processo de surgimento, crescimento e proliferação tumoral, através da metástase [Franks e Teich, 1990].

3. Cânceres de maior incidência

É fundamental ter em mente que as células do câncer são células do nosso organismo e a maioria de suas estruturas e funções são similares às nossas. O câncer é classificado segundo a função/localização das células de onde se originam [Cancerquest, 2003]:

a) **Carcinoma e melanoma**: tumor derivado de células epiteliais (delineiam a superfície da pele e órgãos). Representam entre 80 a 90% dos casos de câncer.

b) **Sarcoma**: tumor derivado de músculos, ossos, cartilagens, gorduras ou tecidos conectivos.

c) **Leucemia**: derivado das células brancas do sangue ou suas precursoras. As células que formam as células sanguíneas estão localizadas na medula óssea.

d) **Linfoma**: câncer da medula óssea que afeta o sistema linfático.

e) **Mieloma**: câncer envolvendo as células brancas responsáveis pela produção de anticorpos (linfócitos B).

O sistema linfático é uma grande estrutura de vasos que transporta fluidos e células do sistema imune em todo o corpo. Os linfonodos são centros de coleta do sistema linfático. Células do tumor podem sair do tumor primário e atingir os nodos vizinhos. O sistema linfático é um mecanismo primário para a movimentação do tumor (as metástases) para outras partes do corpo.

O tumor apresenta um conjunto de características que o distinguem das células normais e que permitem a uma única célula formar uma massa tumoral e, eventualmente, metástases. Diversas mudanças ocorrem durante a transformação da célula normal para uma célula capaz de formar o câncer. Todo o câncer tem a capacidade de crescer e se dividir mesmo na ausência de sinais apropriados e/ou na presença de sinais inibidores de crescimento.

Existem mudanças nas propriedades físicas da célula cancerosa em relação à normal, tais como:

- a) Mudanças no citoesqueleto (que alteram a forma como as células do câncer interagem com a vizinhança e alteram sua aparência).
- b) As mudanças no citoesqueleto também afetam a adesão e mobilidade celular. A redução na adesão/mobilidade celular permite a formação de grandes massas tumorais. As células cancerosas não exibem inibição de contato celular e são capazes de crescer "indefinidamente" umas sobre as outras. A pequena adesão das células do câncer permite o espalhamento do tumor.
- c) Mudanças no núcleo: são grandes as alterações na forma e organização do núcleo celular do tumor em relação à célula normal de mesma origem.
- d) Produção enzimática: as células cancerosas secretam enzimas que as permitem invadir tecidos vizinhos.

Bibliografia

1. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in photodynamic therapy of tumours. J. Photochem Photobiol.B 39:1-18, 1997.
2. Franks LM e Teich N. Introdução a biologia celular e molecular do câncer (1ª ed., 1990). Ed Rocca.
3. Cancerquest (2003)- <http://www.cancerquest.org/> (acesso em 2003).

Anexo II

Estados energéticos e distribuições eletrônicas de algumas espécies de oxigênio [Halliwell e Gutteridge, 1990].

	$^3\text{O}_2$ estado fundamental ($^3\Sigma_g^-$)	Estado singlete $^1\Delta_g$	Ânion superóxido $\text{O}_2^{\bullet-}$	Estado singlete $^1\Sigma^+_g$
$\sigma^* 2p$
$\pi^* 2p$
$\pi 2p$
$\sigma 2p$
$\sigma^* 2s$
$\sigma 2s$
$\sigma^* 1s$
$\sigma 1s$

Medidas da absorção do transiente tripleto

Uma vez que o espectro de absorção do estado tripleto é estabelecido, a cinética de decaimento de T_1 pode ser medida através das medidas de absorção. A determinação da variação da absorção no comprimento de onda de análise pode ser obtida da seguinte forma:

$$\begin{array}{ccc}
 I_0 \longrightarrow \boxed{} \longrightarrow I_1 & I_1 = I_0 e^{-A_1} & \\
 I_0 \longrightarrow \boxed{} \longrightarrow I_2 & I_2 = I_0 e^{-A_2} & (1) \\
 \uparrow & & \\
 h\nu_{\text{exc}} & &
 \end{array}$$

em que I_0 é a intensidade do feixe luz atingindo a amostra; I_1 é a intensidade da luz transmitida pela amostra antes do pulso fotolisante, quando a absorção

da amostra é A_1 ; e I_2 é a intensidade da luz transmitida pela amostra após o pulso fotolisante, quando a absorção da amostra é A_2 .

Deste modo, pode-se escrever

$$\frac{I_2}{I_1} = e^{-(A_2-A_1)} = e^{-\Delta A} \quad (2)$$

Escrevendo I_2 como $I_1 - \Delta I$, então:

$$\frac{I_1}{I_1 - \Delta I} = e^{\Delta A} \quad (3)$$

$$\Delta A = \log \frac{I_1}{I_1 - \Delta I} \quad (4)$$

A absorção diferencial ΔA pode ser relacionada com a concentração do fotossensibilizador da seguinte forma, onde ϵ_{SS} é o coeficiente de absorção molar no estado singleto; e ϵ_{TT} é o coeficiente de absorção molar no estado tripleto:

$$A_1 = \epsilon_{SS} C_0 \quad (5)$$

$$A_2 = \epsilon_{SS} (C_0 - C_T) + \epsilon_{TT} C_T = \epsilon_{SS} C_0 + (\epsilon_{TT} - \epsilon_{SS}) C_T \quad (6)$$

$$\Delta A = A_2 - A_1 = (\epsilon_{TT} - \epsilon_{SS}) C_T = k C_T \quad (7)$$

Como a concentração do fotossensibilizador no estado tripleto é transiente:

$$C_T = C_T(t) \quad (8)$$

Finalmente tem-se:

$$\Delta A = k C_T(t) \quad (9)$$

Anexo III

Trabalhos científicos publicados em revistas especializadas durante o período:

- Borissevitch**, I.E., Daghasanli, N.A.; Degterev, I.A. (2003). Primary processes of photodecomposition of 2-(5 '-nitro-2 '-furanyl)ethenyl-4-[N-[4 '-(N,N-diethylamino)-1 '-methylbutyl] carbamoyl} quinoline - Effect of oxygen and compound concentration. J. Photochem. Photobiol. A-Chemistry **159** (3): 213-217.
- Daghasanli** N.A., Rossa M.M., Selistre-de-Araujo H.S., Tedesco, A.C., Borissevitch, I.A.; Degterev, I. A. (2004). Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light. J. Photochem. Photobiol B-Biology, **75**:27-32.
- Daghasanli**, N.A.; Degterev, I.A.; Tedesco, A.C.; Borissevitch, I.E. (2004). Photocytotoxicity of a 5-nitrofuranethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells. Braz. J. Med. Biol. Res. **37**(12):1873-1879.
- Daghasanli**, n. A.; Ballejo, G.; Borissevitch, I.E. (2003). Photodecomposition of the new photocytotoxic drug quinifuryl produces reactive oxygen and nitrogen species. Braz. J. Pharm. Sci. **39**(2):261 (resumo).

Trabalhos em eventos (Resumo Expandido)

- Daghasanli**, N. A.; Degterev, I.A.; Borissevitch, I.E. (2001). Photodecomposition of an Antiseptic and Radioprotector Drug Quinifuryl: Effect of Oxygen and Surfactant Presence. In: VI International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology- PHARMATECH, 2001, Recife (PE)-Brasil. Proceedings of VI International Conference on Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology PHARMATECH, **1**:219-220.
- Rocha-e-Silva**, T. A. A. ; Daghasanli, N. A. ; Araujo, H. S. S. ; Tedesco, A.C.; Borissevitch, I.E. ; Degterev, I.A. (2002). Drogas nitroheterocíclicas são agentes que apresentam alta perspectiva para uso em terapia e fototerapia do câncer.. In: Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações, 2002, São Pedro-SP-Brasil. Anais da PDT2002, **1**:131-132.
- Daghasanli**, N. A. ; Borissevitch, Iouri E. (2002). Características de fotoreações de droga derivada de NitrofurilQuinolina na sua interação com sistemas microorganizados. In: Terapia Fotodinâmica: Complexos de Moléculas Fotoativas e suas Aplicações, 2002, São Pedro-SP-Brasil. Anais da PDT2002, **1**:39-40.

Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)- 1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline Effect of oxygen and compound concentration

I.E. Borissevitch^{a,*}, N.A. Daghasanli^a, I.A. Degterev^b

^a Departamento de Física e Matemática, Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Vila Monte Alegre, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department of Chemical and Biological Kinetics, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygin Str. 4, 117333 Moscow, Russia

Received 19 November 2002; received in revised form 1 March 2003; accepted 6 March 2003

Abstract

The study of the kinetics of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline (Quinifuryl, Q) was studied using steady-state and time resolved absorption spectroscopy. We detected the formation of the Q triplet state, which is characterized by the absorption maximum at 550 nm, triplet state energy $E_T = 18,200 \pm 500 \text{ cm}^{-1}$ and a decay constant $k_0 = 1.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$. This triplet state is quenched by Q molecules in its ground state with the constant $k_{q1} = 2.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ and by molecular oxygen with the constant $k_{q2} = 2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The initial rate of Q photodecomposition under continuous irradiation by visible light (V_i) increases when the Q concentration is increased. In air and oxygen saturated solutions V_i is linearly proportional to Q concentration and does not depend on the O_2 concentration. Our kinetic model of the process supposed two ways of Q photodecomposition: the reaction between Q molecules in triplet and ground states and the photodecomposition directly from the Q singlet excited state. © 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Phototherapy; Nitrofurane derivatives; Photobleaching; Quinifuryl; Triplet state; Quenching by oxygen

1. Introduction

Quinifuryl (Q), 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline, is one of a family of 5-nitrofurane-ethenyl-quinoline drugs (NFEQ) that was synthesized in the early 1970s by Dr. N.M. Sukhova (Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sciences, Riga, Latvia) in a search for antitumor agents. Indeed, these compounds have shown significant toxicity toward various lines of cancer cells [1]. Q possessed the highest cytotoxic activity among these compounds [1,2] and showed radiosensitizing activity in vitro [2]. The compound is in clinical use as antiseptic for the treatment of wounds and burns [3].

Due to the presence of the developed system of conjugated π -electrons in its structure, Q possesses an intense optical absorption in the spectral region $350 < \lambda < 450 \text{ nm}$ ($\epsilon_{396 \text{ nm}} = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at pH 7.0 [1,2]). After

photoirradiation, Q becomes colorless, demonstrating photodecomposition of its chromophore. Recently, we observed significant increase in toxicity of Q toward various lines of cancer cells under illumination with light in the above spectral region (manuscript in preparation) [4]. We believe that this effect is due to the formation of some reactive species in the course of the Q photodecomposition. However, the detailed mechanism of the compound photodecomposition is not clear yet. In the present work we report on the study of the Q photodecomposition in aqueous solutions as a function of Q and oxygen concentrations.

2. Materials and methods

This Quinifuryl was obtained from Dr. N.M. Sukhova.

* Corresponding author. Tel.: +55-16-602-3862; fax: +55-16-633-9949.

E-mail addresses: iouri@dfm.ffclrp.usp.br, iourib@ffclrp.usp.br

(I.E. Borissevitch).

The compound was dissolved in phosphate buffer (5 mM NaH_2PO_4 + 2.5 mM Na_2HPO_4), pH 6.8, using Mili-Q quality water and irradiated in the spectral range from 350 to 450 nm using a tungsten lamp (150 W) and a glass filter (5–57 KOPP color glass filter). A standard quartz 1 cm cuvette with water was used as a thermal filter to prevent collateral heat effects. The intensity of irradiation of the sample was 22 mW cm^{-2} , as measured by a Spectra-Physics 407A radiometer. The concentration of Q in solutions under irradiation was from 7 to 70 μM . The photolysis was performed in standard quartz cuvettes with optical lengths 2 and 10 mm, so that the initial absorbance at the $\lambda_{\text{max}} = 396 \text{ nm}$ was below 0.35. The optical absorption spectra were monitored with the DU 650 Beckman spectrophotometer.

The flash-photolysis experiments were performed in a standard quartz 1 cm cuvette. The Q excited states were produced by short light pulses (10 ns) of the third harmonic (355 nm) of Nd:YAG laser SL400 spectron laser system. The excited state absorption spectra and decay profiles were monitored in the spectral region $450 \leq \lambda \leq 750 \text{ nm}$ using a standard registration system.

To study the oxygen effect, the samples were deoxygenated by bubbling nitrogen through the solution and for comparison some samples were deoxygenated with a vacuum pump.

All experiments were run at room temperature (24°C).

3. Results and discussion

The Q absorption spectra at pH 7.0 are presented on Fig. 1a. Under continuous irradiation in the range 350–450 nm, occurred the photobleaching of Q showing photodecomposition of its chromophore (Fig. 1a). The

removal of air increased the rate of photodecomposition (Fig. 1b).

The excitation of deaired Q aqueous solutions by a laser pulse at 355 nm induces the formation of short-lived Q species characterized by absorption in the region from 450 to 700 nm with the maximum centered at 550 nm (Fig. 2a). A short-lived product with a similar spectrum was also observed in dioxane (Fig. 2a). The profile of the decay of this absorption is mono-exponential (Fig. 2b).

$$\Delta D = \Delta D_0 \exp(-k_1 t) \quad (1)$$

The decay constant k_1 increases with increase of the initial Q concentration ($[Q]_i$), demonstrating the quenching of this excited state by Q in the ground state. Two constants were determined (Fig. 3) using the following equation:

$$k_1 = k_0 + k_{q1}[Q]_i \quad (2)$$

where $k_0 = 1.8 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ determined as a limit value at infinite dilution $[Q]_i \rightarrow 0$; and the self-quenching constant $k_{q1} = 2.6 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The observed short-lived species is quenched by molecular oxygen

$$k_2 = k_1 + k_{q2}[\text{O}_2] \quad (3)$$

with $k_{q2} = 2.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

The formation of the triplet excited states from the photoexcitation of nitrofuranyl derivatives

has been described [5]. The self-quenching and the quenching by molecular oxygen are typical processes for the triplet states. Thus, we should associate the observed short-lived

Fig. 1. (a) The absorption spectra of Q aqueous solution as a function of the irradiation time. The concentration $[Q] = 1.4 \times 10^{-5} \text{ M}$. (b) Normalized Quinifuranyl absorbance at 396 nm as a function of the irradiation time in air saturated (●) and deaired (○) solutions.

Fig. 2. (a) Normalized Quiniferyl triplet-triplet absorption spectra in water (●) and in dioxane (○) solutions. (b) Decay profiles of the Q triplet state in the aqueous deaerated solution.

species with excited triplet states of Q. Indeed, the experiments done in dioxane have shown that acceptors of the triplet energy quench these species; the quenching constant is dependent on the level of the triplet state energy of acceptor (Table 1). The formation of acceptor triplet states due to the energy transfer from Q triplet state was also observed. The energy of the Q triplet state determined from these experiments is $E_T = 18200 \pm 500 \text{ cm}^{-1}$.

Based on our results, one may consider the scheme of the Q phototransformations as follows:

- (0) $Q(S_0) + h\nu \rightarrow Q^*(S_1)$.
- (1) $Q^*(S_1) \xrightarrow{k_{IC}} Q(S_0)$.
- (2) $Q^*(S_1) \xrightarrow{k_T} Q^*(T_1)$.
- (3) $Q^*(T_1) \xrightarrow{k_0} Q(S_0)$.

Fig. 3. The constant of decay of Quiniferyl triplet state (k_1) as a function of the Q concentration.

Table 1

The quenching constants of Quinifuryl triplet state by the triplet energy acceptors

Compound	E_T (cm ⁻¹)	$k_q \times 10^{-9}$ (M ⁻¹ s ⁻¹)
Naphthacene	10250	2.7 ± 0.4
Azulene	12000	2.5 ± 0.4
9,10-Dibromoanthracene	14112	1.3 ± 0.2
Eosine	15000	1.2 ± 0.2
Acridine orange	17390	2.0 ± 0.3
1,2-Benzpyrene	18480	$(4.2 \pm 0.9) \times 10^{-2}$
Fluorenone	18860	$<10^{-4}$
Naphtalene	21300	$<10^{-4}$
9H-fluorene	23750	$<10^{-4}$

(4) $Q^*(T_1) + Q(S_0) \xrightarrow{k_{q1}} \text{Products 1}$ (we suppose that this reaction is partly responsible for Q photodecomposition).

(5) $Q^*(T_1) + O_2 \xrightarrow{k_{q2}} Q(S_0) + O_2^*(^1\Delta_g)$ (probably this quenching is accompanied by the formation of O_2 excited state (“singlet oxygen”).

The kinetic scheme of the process is described by the following equations:

$$\frac{d[Q(S_0)]}{dt} = -\beta + k_{IC}[Q^*(S_1)] + (k_0 + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (4)$$

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T)[Q^*(S_1)] \quad (5)$$

$$\frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = k_T[Q^*(S_1)] - (k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])[Q^*(T_1)] \quad (6)$$

where

$$\beta = \left(\int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \{1 - \exp(-2.3A_0)\} d\lambda \right)$$

is a factor which is determined by initial light absorption in the region $\lambda_i = 350 \text{ nm} \leq \lambda \leq \lambda_f = 450 \text{ nm}$, $I(\lambda)$ is the intensity of the light, $A_0 = \varepsilon(\lambda)[Q(S_0)]l$ is the initial absorbance of the sample.

If A_0 is <1 we can write in the first approximation

$$\beta = 2.3I[Q(S_0)] \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \varepsilon(\lambda) d\lambda = \beta_1[Q(S_0)] \quad (7)$$

where

$$\beta_1 = 2.3I \int_{\lambda_i}^{\lambda_f} I(\lambda) \varepsilon(\lambda) d\lambda$$

depends just on the irradiation conditions.

Since the characteristic times of Q photodecomposition under continuous irradiation are much longer than the lifetimes of the excited states $Q^*(S_1)$ and $Q^*(T_1)$ we should write

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = 0 \quad \text{and} \quad \frac{d[Q^*(T_1)]}{dt} = 0 \quad (8)$$

Combining (4)–(8) we can write the initial rate of the photodecomposition as

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -\beta_1 \frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]^2}{(k_{IC} + k_T)(k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])} \quad (9)$$

Taking into consideration that in air saturated aqueous media the oxygen concentration is $[O_2] \cong 3 \times 10^{-4} \text{ M}$ at 24°C , we should expect that, at the Q concentration range $7.0 < [Q] < 70.0 \mu\text{M}$, the V_i value in the air saturated solutions should be 12–30 times less than the value in deaired solutions. However, the observed reduction appeared only two to six times less. Moreover, in oxygen saturated solutions ($[O_2] \cong 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$) we should expect a five-fold reduction of V_i compared with that in the air saturated solutions, while we actually observed the same value of V_i in the air and oxygen saturated solutions (Fig. 4).

This discrepancy would be resolved if one supposed that Q may also be decomposed directly from its singlet excited state $Q^*(S_1)$.

In this case Eqs. (5) and (9) should be rewritten as

$$\frac{d[Q^*(S_1)]}{dt} = \beta - (k_{IC} + k_T + k_X)[Q^*(S_1)] \quad (5a)$$

$$V_i = \left(\frac{d[Q(S_0)]}{dt} \right)_{t \rightarrow 0} = -\frac{\beta_1}{k_{IC} + k_T + k_X} \times \left(\frac{k_T k_{q1} [Q(S_0)]}{(k_0 + k_{q1}[Q(S_0)] + k_{q2}[O_2])} + k_X \right) [Q(S_0)] \quad (9a)$$

If $k_{q2}[O_2] > k_0$, $k_{q1}[Q(S_0)]$ and $k_X > (k_T k_{q1}[Q(S_0)]/k_{q2}[O_2])$, V_i is independent of $[O_2]$. This situation occurs both in air and in oxygen saturated solutions. Moreover, in these solutions V_i should possess a linear dependence on $[Q(S_0)]$. The experiment confirms this assumption (Fig. 4).

Two ways of phototransformation of nitrocompounds has been described [6]. The first is direct photoionization with formation of a hydrated electron, which is, in the consequence, bound to the molecule in the ground state, producing a nitrogen oxide radical

The second way is electron transfer from an electron donor to the nitrocompound in its triplet excited state

Finally, the nitrogen oxide radical is also produced.

Fig. 4. The initial rate of Quinifuryl photodecomposition (V_i) as a function of Q initial concentration ($[Q]_i$) in air saturated (Δ) and oxygen saturated ($\blacktriangledown$) solutions.

We suppose that both ways occur also for the photodecomposition of Q, producing a nitrogen oxide radical. In this case the Q molecule in the ground state should play the role of the electron donor in the reaction with the $Q^*(T_1)$ state. To confirm this hypothesis we have performed a series of experiments with electron donors (ascorbic acid, hydroquinone, 1,7-dioxynaphthalene, aniline) and with epinephrine. The results are to be published soon.

Acknowledgements

The authors are indebted to FAPESP and CAPES Brazilian agencies for the financial support of this work.

References

- [1] V.N. Verovskiy, I.A. Degterev, N.M. Sukhova, A.A. Buzukov, E.Yu. Leonova, N.K. Tatarskaya, Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic and nitroheterocyclic compounds. In vitro and in vivo study, *Pharm. Chem. J. (Moscow)* 24 (1990) 20–24.
- [2] S.S. Voronina, N.K. Tatarskaya, I.A. Degterev, A.M. Serebrianiy, I.I. Pelevina, N.M. Sukhova, Radiosensitizing activity and metabolism of some nitrofurans derivatives. 1. M-106, *Radiobiology (Moscow)* 25 (1985) 748–751.
- [3] L.A. Blatun, A.M. Svetukhin, A.A. Pal'tsyn, N.A. Liapunov, V.A. Agafonov, Clinico-laboratory effectiveness of modern ointments with a polyethylene glycol base in the treatment of purulent wounds, *Antibiot. Khimioter* 44 (7) (1999) 25–31.
- [4] N.A. Daghasanli, I.A. Degterev, A.C. Tedesco, I.E. Borissevitch, Quinifuryl, a 5-nitrofurans-ethenyl-quinoline antiseptic as a potential agent for anticancer photochemotherapy: photocytotoxicity toward P388 mouse leukemia cells, *J. Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, in press.
- [5] T.J. Kemp, J.A. Martins, Triplet-state of 5-nitro-2-furoic acid by laser flash-photolysis—spectrum, lifetime and reactivity, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 77* (1981) 1425–1435.
- [6] D.E. Moore, Flash-photolysis of misonidazole and metronidazole, *Int. J. Radiat. Biol.* 51 (1987) 45–51.

Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, Quinifuryl and Nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light

Nasser A. Daghashtanli ^a, Marcelo M. Rossa ^b, Heloisa S. Selistre-de-Araujo ^b, Antonio C. Tedesco ^c, Iouri E. Borissevitch ^a, Igor A. Degterev ^{a,d,*}

^a Departamento de Física e Matemática, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b Department de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil

^c Departamento de Química, Faculdade de Filosofia Ciência e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, CEP 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d Department of Chemical and Biological Kinetics, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Kosygin Str. 4, 117333 Moscow, Russian Federation

Received 8 April 2004; accepted 27 April 2004

Available online 7 June 2004

Abstract

The cytotoxicity of two nitroheterocyclic compounds (NHCD), Nitracrine, 1-nitro-9(3-3-dimethylaminopropylamino) acridine and Quinifuryl, 2-(5'-nitro-2'-furanyl) ethenyl-4-{N-[4-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline, towards two lines of leukaemic cells and a line of non-transformed cells, was measured in comparison, on the dark and under illumination with visible light (350–450 nm). Both drugs showed highly elevated cytotoxicity when illuminated with LC₅₀ values 7–35 times lower after 1 h illumination compared to 1 h incubation of cells incubation with drug on the dark. Cytotoxicity of Nitracrine toward all cell lines studied exceeded that of Quinifuryl, both on the dark and under illumination, so that ≈ 10 times lower concentration of former drug was needed to reach the same toxicity as the latter. General toxic effect was calculated as a direct cell kill and a cell proliferation arrest. The effect >80% for both drugs was achieved after 1 h cell illumination with as low drug concentrations as 0.2 μM for Quinifuryl and 0.02 μM for Nitracrine.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Photochemotherapy; Photocytotoxicity; Nitroheterocyclic compounds; Quinifuryl; Nitracrine; Lympholeukaemia P388; Human erythroleukaemia K562; Fibroblast NIH3T3

1. Introduction

Photochemotherapy (PCT) is a mode of cancer treatment based on a supply a target (cancer) tissue with a photoactive agent (photosensitizer) followed by illumination of tumor with light to produce species that are highly toxic to a target [1–3]. The extensive search of new agents for PCT is continued [3–7] and studies on the mechanism of their phototoxicity are developing [8,9].

Quinifuryl is an antiseptic in surgery for the treatment of wounds and burns [10]. Our previous analysis of cytotoxicity has demonstrated that Quinifuryl displayed the high cytotoxicity ($\text{LC}_{50} \leq 2 \mu\text{M}$) towards melanoma B16 [11], murine lympholeukaemia P388 cells [11,12], and human erythroleukaemia K562 cells [12]. At the same time, this compound was shown to be photolabile absorbing intensively visible light ($\lambda^{\text{max}} = 396 \text{ nm}$, $\epsilon_{396} = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [12] and producing reactive species during photoexcitation [13–15]. This fact led us to an assumption that the illumination of tumor cells with the visible light may result in the drug cytotoxicity potentiation.

* Corresponding author. Tel.: +55-016-602-3862; fax: +55-016-633-9949.

E-mail address: igor@dfm.ffclrp.usp.br (I.A. Degterev).

The aim of the present work was to extend number of cellular targets for Quinifuryl in order to confirm intensified photocytotoxicity of this compound and to compare the photocytotoxic potency of Quinifuryl with that of Nitracrine, a 1-nitroacridine derivative, known as a potent hypoxia-selective agent *in vitro* [16,17] and used clinically as antitumor drug [18]. Our previous analysis of cytotoxicity has demonstrated that, as well as Quinifuryl, Nitracrine also displayed the high cytotoxicity ($LC_{50} \leq 2 \mu\text{M}$) towards melanoma B16 [11], murine lympholeukaemia P388 cells [11,12], and human erythroleukaemia K562 cells and always displayed higher cytotoxicity than Quinifuryl.

Quinifuryl possesses the optical absorption more intense than this of Nitracrine (Nitracrine – $\epsilon_{400} = 4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Quinifuryl – $\epsilon_{396} = 2.47 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively, [12]). No study of Nitracrine photocytotoxicity was ever made.

In this work cellular toxicity of drugs towards murine leukemia P388, fibroblast NIH3T3, and human erythroleukaemia K562 cells was measured on the dark and under illumination with visible light.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Quinifuryl (M-106), 2-(5'-nitro-2'-furyl) ethenyl-4-{N-[4-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl] carbamoyl} quinoline, a representative of a family of 5-nitrofuran-ethenyl-quinoline drugs, was synthesized and purified by Dr. N.M. Sukhova. Nitracrine (Ledakrine, C-283), 1-nitro-9 (3',3'-dimethylaminopropylamino) acridine was purchased from Polfa. Structural authenticity of both drugs was verified by NMR analysis. Structural formulas of both drugs are present in Fig. 1.

2.2. Cells

The human K562 leukemia cell line (proerythrocytes), which was originally derived from the patient with erythroleukaemia [19], was kindly provided by Dr. S. Niewiarowski (Temple University, PA, USA). P388D₁ cells, a mouse macrophage monocyte line that grows in semi-suspension, and immortalized mouse fibroblast NIH3T3 cells were obtained from the American Type Culture Collection. P388 cells were cultured in Fisher's media supplemented with 10% heat inactivated horse serum in 175 cm² culture flasks at 37 °C with 5% CO₂. K562 and NIH3T3 cells were cultured as a suspension or a monolayer, respectively, in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with heat-inactivated 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine, 50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 250 mg/ml Anfotericin-B at 37 °C in a

Fig. 1. Structures of Quinifuryl and Nitracrine.

water-jacketed CO₂ incubator (Cellstar, USA). The day before an experiment, cells were seeded at 5×10^5 cells/ml. The number of cells in suspension was calculated using a Neubauer chamber (0.0025 mm²). A slow magnetic stirring was used to maintain the suspension in homogeneous state. All preparations were made under subdued red light ($\lambda > 550 \text{ nm}$) at room temperature (22 °C).

The toxicity test was based on the MTT assay and performed in two ways measuring either direct killer effect of a drug (Test 1) or general toxic effect that included a cell proliferation arrest (Test 2) [12]. The tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) is reduced into leaving cells to yield a colored product that may be interpreted as a measure of viability [20]. For MTT assays, cells were seeded in DMEM containing 5% FBS into wells of 96-well ELISA-type plates and exposed to a range of either drug concentrations from 0.02 to 2 μM for time intervals either from 1 to 24 h (experiments on the dark) or from 10 to 90 min (experiments under illumination). At the end of the drug exposure period, plates were centrifuged to pellet cells and drug-contained supernatants were displaced with either MTT dissolved in PBS (Test 1) or with fresh medium (Test 2). In the latter case, the cells were incubated for the 2–3 cell population-doubling times (36–72 h) with daily media change, followed by MTT assay. In both tests, plates with MTT were incubated in the dark for 4 h, after which the water-insoluble MTT-formazan crystals were dissolved in DMSO, and absorbance was recorded in an ELISA plate reader Dynex MRX (Dynex Technologies Inc.) at 570 nm. The initial seeding densities ranged from 2×10^4 to 6×10^4

cells/well. Cell viability was assessed by TB dye exclusion at the beginning of each experiment and was always higher than 96%.

2.3. Irradiation

Samples, containing cells and drug, and controls, containing cells in the absence of drug, were irradiated directly in ELISA-type plates, in the spectral range from 350 to 450 nm using standard light source with tungsten lamp (150 W) and the glass filter (5–57 KOPP color glass filter). The intensity of irradiation was 22 mW/cm², as measured by a Spectra-Physics 407A radiometer.

2.4. Calculation of the results

Drug concentration dependence and time dependence of cell death were calculated as a toxic effect (TE): $TE = [DC]/[Cell]^{control}$, where $[Cell]^{control}$ is cell concentration, in control wells (cells incubated for the same time length with no compound) and $[DC]$ is the dead cell concentration. $[DC]$ was calculated as $[Cell]^{control} - [Cell]^{final}$, where $[Cell]^{final}$ is the live cell concentration in wells exposed to drug [12]. Cell concentration was measured using a calibration curve made for all cell lines tested using MTT-staining method. The LC_{50} of the tested compounds was estimated as $100 \times (T - T_0) / T_0 = 50$, where T_0 and T are optical densities of the test well at time zero (when the compound is added) and after exposure to test compound, respectively [21]. The LC_{50} was measured after 1 h cell incubation with either drug on the dark or under illumination.

2.5. Statistic analysis

The data are presented as the mean $\pm$ SD of two to five independent series of experiments with five to six repetitions in each. Statistic analysis was performed on the Student's *t*-test. The Turkey's test with 95% confidence was applied to compare the means. Statistic analyses were done using the InStat software program for Windows (GraphPads software, San Diego, USA).

3. Results

One example of a drug cytotoxicity measurements are present in Fig. 2 that shows a development of toxic effect (TE) toward human K562 erythroleukaemia cells as a function of cell incubation time with drug either under illumination with visible light (Panel A) or on the dark (Panel B). The TE values were calculated as was described in Section 2. Cells incubated without drug served as a control in each series of experiments. Normally, no significant amounts of dead cells were observed in

Fig. 2. Photocytotoxicity (a) and cytotoxicity on the dark (b) of Quinifuril (●) and Nitracrine (■) towards human erythroleukemia K562 cells as measured by method dye inclusion (MTT). Vertical dashed lines show time needed to reach kill of 50% of cells. Drug concentrations were as follows: Quinifuril – 2.0 μ M; Nitracrine – 0.2 μ M. Conditions: cell concentration was $\sim 1 \times 10^6$ in Na-phosphate buffer, pH 7.4; mixtures were illuminated at room temperature with filtered (350–450 nm) light of tungsten lamp (200 W) at 22 °C with the irradiation intensity of 22 mW/cm². Toxic effect was measured as $[DC]/[Cell]^{control}$, where $[Cell]^{control}$ is cell concentration, in control wells (cells incubated for the same time length with no compound) and $[DC]$ is the dead cell concentration. Each point represents $M \pm SD$ of six measurements.

control wells up to 24 h incubation on the dark and up to 1.5 h illumination.

Both drugs were much more cytotoxic under illumination than on the dark. Death of 50% of cells were achieved under illumination for 45 and 48 min for 2 μ M of Quinifuril and for 0.2 μ M of Nitracrine, respectively (Fig. 2(a)), while on the dark it took 8.5 h for Nitracrine and 18.4 h for Quinifuril (Fig. 2(b)). Nitracrine possesses higher cytotoxicity than Quinifuril on the dark and under illumination. So that 10-times lower concentration of Nitracrine produced the same (illumination, Fig. 2(a)) or higher (on the dark, Fig. 2(b)) toxic effects towards K562 cells than Quinifuril.

Table 1

The LC₅₀ for Quinifuryl and Nitracrine measured after 1 h of cells incubation with drug either on the dark or under illumination with visible light

Drug	LC ₅₀ (μM)	
	Dark	Illumination
<i>P388 cells</i>		
Quinifuryl	79.7 ± 18.1	11.8 ± 3.8
Nitracrine	7.7 ± 1.3	0.23 ± 0.15
<i>NIH3T3 cells</i>		
Quinifuryl	18.6 ± 6.0	1.6 ± 0.7
Nitracrine	16.2 ± 2.8	0.6 ± 0.6
<i>K562 cells</i>		
Quinifuryl	^a 15.4 ± 2.4	1.48 ± 0.33
Nitracrine	^a 8.9 ± 0.8	0.16 ± 0.04

^aNo significant cytotoxicity was observed after 1 h of K562 cells incubation with either drug, thus cytotoxicity on the dark was measured after 12 h of cell incubation with drugs.

The majority of the experimental data was obtained following Test 1 (Section 2), according to which MTT-dye incubation was performed immediately following drug treatment. This approach limits the observed results only to the direct killer effect of the drug. Table 1 shows that the LC₅₀ values observed after 1 h illumination were lower, compared to the dark experiments, by at least order of magnitude. All cells were more sensitive to Nitracrine, compared to Quinifuryl, both on the dark and under illumination.

The cell kill (Test 1) and general toxicity (Test 2) experiments were performed in parallel. Briefly, cells were incubated with drugs in a pair of ELISA-type plates for

Table 3

Time for which death of 50% of cells achieved (τ₅₀)

Drug	[Drug] (μM)	τ ₅₀ (min)	
		Dark	Illumination
<i>P388 cells</i>			
Quinifuryl	20.0	231 ± 51	25 ± 7
	2.0	350 ± 118	76 ± 9
	0.2	1540 ± 90	96 ± 11
Nitracrine	0.2	390 ± 179	76 ± 9
	0.02	431 ± 43	97 ± 13
<i>NIH3T3 cells</i>			
Quinifuryl	2.0	408 ± 67	34 ± 18
	0.2	>500	56 ± 17
Nitracrine	0.2	191 ± 13	31 ± 15
	0.02	622 ± 115	58 ± 28
<i>K562 cells</i>			
Quinifuryl	2.0	n.m.	45 ± 5
Nitracrine	0.2	n.m.	48 ± 7

either 12 h on the dark or 1 h under illumination with filtered visible light (350–450 nm). In each pair, one plate was subjected to the measurement of toxic effect immediately after a drug withdrawal (Test 1). In the second plate, drugs were replaced with complete medium and cells were allowed to proliferate for the 2–3 population-doubling time that were either 72 h (K562 and NIH3T3) or 36 h (P388). Subsequently, the medium was replaced with MTT-dye and the TE was measured as a ratio of dead cells to initial cell amount (see Section 2). The direct killer effect (Test 1) and general toxic effect (Test 2) of both drugs towards three cell lines measured in parallel are present in Table 2.

Table 2

Direct killer effect (Test 1) and general toxicity (Test 2) of Quinifuryl and Nitracrine toward P388 cells either on the dark or under illumination with visible light

Drug	[Drug] (μM)	Toxic effect			
		Dark (12 h)		Illumination (1 h)	
		Test 1	Test 2	Test 1	Test 2
<i>P388 cells</i>					
Quinifuryl	2.0	*0.480.1	0.97 ± 0.16	*0.76 ± 0.27	0.93 ± 0.20
	0.2	*0.014 ± 0.002	n.m.	*0.13 ± 0.04	0.84 ± 0.24
Nitracrine	0.2	0.59 ± 0.2	0.97 ± 0.15	*0.64 ± 0.17	0.99 ± 0.26
	0.02	*0.14 ± 0.05	n.m.	*0.49 ± 0.13	0.97 ± 0.26
<i>NIH3T3 cells</i>					
Quinifuryl	2.0	*0.59 ± 0.13	0.96 ± 0.01	*0.43 ± 0.16	0.93 ± 0.04
	0.2	*0.0 ± 0.06	0.0 ± 0.12	*0.35 ± 0.12	0.87 ± 0.12
Nitracrine	2.0	0.56 ± 0.1	0.96 ± 0.15	n.m.	0.89 ± 0.20
	0.2	*0.38 ± 0.1	0.94 ± 0.01	*0.65 ± 0.14	0.89 ± 0.12
	0.02	*0.25 ± 0.03	0.89 ± 0.2	*0.41 ± 0.11	n.m.
<i>K562 cells</i>					
Quinifuryl	2.0	*0.33 ± 0.1	n.m.	*0.68 ± 0.15	n.m.
Nitracrine	0.2	0.63 ± 0.03	n.m.	0.68 ± 0.17	n.m.

In each row, symbol (*) marks statistically significant difference ($P < 0.01$) between the results of Test 1. No significant differences were observed between Tests 2 on the dark and under illumination in each series of experiments.

Being applied at the same concentration, both drugs kill cells much rapidly when illuminated with visible light. Table 3 shows the incubation times required to reach death of 50% of cells at different drug concentrations either on the dark or under illumination with visible light.

4. Discussion

The results presented in this work show that the illumination with visible light sharply decreased lethal concentrations of both Quinifuryl and Nitracrine (Table 1) and shortened time of the lethal effect run up (Table 3).

Table 2 shows that the killer effects (Test 1) of both drugs, when illuminated with visible light for 1 h, were similar to those observed after 12 h drug incubation with either cells on the dark. These results show that drugs not only caused death, but also attenuated proliferation of the surviving cells. In contrast to direct killer effect, general toxicity (Test 2) of both drugs toward P388 and NIH3T3 cells after 1 h illumination and 12 h of the dark incubation was similar. The effect of Nitracrine was higher, compared to Quinifuryl, both on the dark and under illumination. Significant toxicity toward P388 and NIH3T3 cells was observed for low concentration (0.2 μM) of Quinifuryl under illumination, while negligible (P388) or no (NIH3T3) toxicity was observed for Quinifuryl in the same concentration for 12 h of drug incubation with these cells on the dark.

Mechanisms of dark-cytotoxicity of Quinifuryl and Nitracrine are, probably, due to their metabolism. Both drugs were metabolized in normal tissues [22–24] and cancer cells [11,12]. Nitracrine is believed to produce reactive intermediate(s) during metabolism that causes DNA modification [17]. Both drugs accelerate the production of reactive oxygen [23] and nitrogen [25–27] species during metabolism. Thus, their toxicity may also be due to oxidative stress.

The fact that the photoactivation significantly accelerates cell killing should be interpreted as either formation more toxic intermediates during photolysis, compared to the dark metabolism, or acceleration of the same toxins formation under illumination, or both. Evidence of reactive species formation during photolysis of Quinifuryl by visible light was reported in our previous works [13–15]. The formation of the triplet excited state [14], which is capable to produce singlet oxygen [1–3], the reaction of the triplet state with the drug in the ground state and with electron donors [13–15], forming of superoxide anion radical in the course of drug photolysis [13] could result in the Quinifuryl phototoxicity.

In contrast to Quinifuryl, there is no data available on the Nitracrine photolysis. This fact creates no room

for speculations on the mechanism of photocytotoxicity of this drug that, undoubtedly, deserves special study.

The above data show that nitroheterocyclic compounds deserve study as possible candidates for photochemistry therapy. Differently from cited work, we had shown here that elevated cytotoxicity under illumination with visible light is not specific property of Quinifuryl, but also resides to nitroheterocyclic compound of quite different structure. Photosensitizing effect was observed with cancer cells as different as mouse lympholeukaemia and human erythroleukemia.

References

- [1] B.W. Henderson, T.R. Dougherty, How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.* 55 (1992) 145–157.
- [2] M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 39 (1997) 1–18.
- [3] A.S. Sobolev, D.A. Jans, A.A. Rosenkranz, Targeted intracellular delivery of photosensitizers, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 73 (2000) 51–90.
- [4] B. Franck, A. Nonn, Novel porphyrinoids for chemistry and medicine by biomimetic syntheses, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34 (1995) 1795–1811.
- [5] M. Oertel, S.I. Schastak, A. Tannapfel, R. Hermann, U. Sack, J. Mossner, F. Berr, Novel bacteriochlorine for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells in vitro and in mouse tumour model, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 71 (2003) 1–10.
- [6] L. Bourre, G. Simonneaux, Y. Ferrand, S. Thibaut, Y. Lajat, T. Patrice, Synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 69 (2003) 179–192.
- [7] K. Kassab, Photophysical and photosensitizing properties of selected cyanines, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 68 (2002) 15–22.
- [8] J.W. Dobrucki, Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes Ru (phen)₃²⁺ and Ru (bipy)₃²⁺ with animal and plant cells in vitro: Mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 65 (2001) 136–144.
- [9] F. Bohm, R. Edge, S. Foley, L. Lange, T.G. Truscott, Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 65 (2002) 177–183.
- [10] L.A. Blatun, A.M. Svetukhin, A.A. Pal'tsyn, N.A. Liapunov, V.A. Agafonov, Clinic-laboratory effectiveness of modern ointments with a polyethylene glycol base in the treatment of purulent wounds, *Antibiot. Khimioterapiya* 44 (1999) 25–31.
- [11] V.N. Verovskiy, I.A. Degterev, N.M. Sukhova, A.A. Buzukov, E. Yu. Leonova, N.K. Tatarskaya, Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic- and nitroheterocyclic compounds. In vitro and in vivo study, *Pharmacol. Chem. J.* 24 (1990) 20–24.
- [12] M.M. Rossa, T.A.A. Rocha-e-Silava, C.H.B. Terruggi, A.C. Tedesco, H.S. Selistre-de-Araujo, I.E. Borisevich, I.A. Degterev, Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells, *Pharmacol. Res.* 48 (2003) 369–375.
- [13] S.M. Smirnov, M.A. Jurav, N.K. Tatarskaja, E. Yu. Borisevich, I.A. Degterev, Quinifur photoreduction Nitroanionradical formation, *Chem. Phys. (Moscow)* 8 (1989) 1723–1725.

- [14] I.E. Borisevich, N.A. Daghashtanli, I.A. Degterev, Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl) ethenyl-4- {N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbamoyl} quinoline. Effect of oxygen and compound concentration, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 159 (2003) 213–217.
- [15] V.A. Kuzmin, P.P. Levin, E. Yu. Borisevich, I.A. Degterev, S.M. Smirnov, Triplet exciplex of nitrofuranyl derivative with aromatic amines, *Proc. Acad. Sci. USSR, Chemistry*, N 7 (1988) 1510–1514.
- [16] M. Gniazdowski, L. Szmigiero, Nitracrine and its congeners – an overview, *Gen. Pharmacol.* 26 (1995) 473–481.
- [17] K. Gorlewska, Z. Mazerska, P. Sowin'ski, J. Konopa, Products of metabolic activation of the antitumor drug Ledakrin (Nitracrine) in Vitro, *Chem. Res. Toxicol.* 14 (2001) 1–10.
- [18] WHO Chronicle, vol. 30, Suppl. 3, World Health Organization, Geneva 1976, p. 11.
- [19] E. Klein, H. Ben-Bassat, H. Neumann, P. Ralph, J. Zeuthen, A. Polliac, F. Vanky, Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia, *Int. J. Cancer* 18 (1976) 421–431.
- [20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55–63.
- [21] A. Monks, D. Scudiero, P. Skehan, R. Shoemaker, K. Paull, D. Vistica, C. Hose, J. Langley, P. Cronise, A. Vaigro-Wolff, Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines, *JNCI* 83 (1991) 757–766.
- [22] I.A. Degterev, A.A. Buzukov, V.G. Sharf, K.N. Popov, A.M. Serebrianiy, G.E. Zaikov, Comparative study of in vitro ledakrine metabolism in microsomes of EAC-cells and mouse liver, *Pharmacol. Chem. J.* 20 (1986) 412–417.
- [23] I.A. Degterev, A.A. Buzukov, N.K. Tatarskaya, E. Yu. Leonova, N.M. Sukhova, Metabolism of heterocyclic compounds in mouse liver microsomes, *Pharmacol. Chem. J.* 24 (1990) 9–16.
- [24] I.A. Degterev, P.C.L. Nogueira, A.J. Marsaioli, A.E. Vercesi, Microsomal metabolism of Quinifuryl – a nitrofuryl-ethenyl-quinoline antiseptic possessing antitumor activity in vitro, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacol.* 24 (1999) 15–22.
- [25] V.B. Iliasova, A.A. Buzukov, M. Tabak, I.A. Degterev, On the mechanism of metabolic denitration of nitroheterocyclic compounds, *Biofizika (Moscow)* 39 (1994) 219–225.
- [26] A.A. Buzukov, V.B. Iliasova, M. Tabak, N.K. Tatarskaya, I.A. Degterev, Metabolic denitration of Quinifuryl and Nitracrine in mouse liver homogenate, *Pharmacol. Chem. J. (Moscow)* 29 (1995) 3–8.
- [27] A.A. Buzukov, V.B. Il'asova, M. Tabak, N.C. Meirelles, I.A. Degterev, An ESR and spectrophotometric study of the denitration of nitroheterocyclic drugs by liver homogenates and their metabolic consumption by liver microsomes from cytochrome P-450-induced mice, *Chem. -Biol. Interact.* 100 (1996) 113–124.

Photocytotoxicity of a 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells

N.A. Daghashtanli¹,
I.A. Degterev^{1,3},
A.C. Tedesco² and
I.E. Borissevitch¹

Departamentos de ¹Física e Matemática, and ²Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil
³Department of Chemical and Biological Kinetics, Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract

Correspondence

I.E. Borissevitch
Departamento de Física e Matemática
FFCLRP, USP
Av. Bandeirantes, 3900
14040-901 Ribeirão Preto, SP
Brasil
Fax: +55-16-633-9949
E-mail: iouribor@usp.br or
iourib@ffclrp.usp.br

Research supported by FAPESP
and CAPES.

Received April 22, 2004
Accepted August 12, 2004

Quinifuryl (MW 449.52), 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbonyl} quinoline, is a water soluble representative of a family of 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinoline drugs which has been shown to be highly toxic to various lines of transformed cells in the dark. In the present study, the toxicity of Quinifuryl to P388 mouse leukemia cells was compared in the dark and under illumination with visible light (390-500 nm). Illumination of water solutions of Quinifuryl (at concentrations ranging from 0.09 to 9.0 µg/ml) in the presence of P388 cells resulted in its photodecomposition and was accompanied by elevated cytotoxicity. A significant capacity to kill P388 cells was detected at a drug concentration as low as 0.09 µg/ml. The toxic effect detected at this drug concentration under illumination exceeded the effect observed in the dark by more than three times. Moreover, the general toxic effect of Quinifuryl, which included cell proliferation arrest, was nearly 100%. Both dose- and time-dependent toxic effects were measured under illumination. The LC₅₀ value of Quinifuryl during incubation with P388 cells was ~0.45 µg/ml under illumination for 60 min and >12 µg/ml in the dark. We have demonstrated that the final products of the Quinifuryl photolysis are not toxic, which means that the short-lived intermediates of Quinifuryl photodecomposition are responsible for the phototoxicity of this compound. The data obtained in the present study are the first to indicate photocytotoxicity of a nitroheterocyclic compound and demonstrate the possibility of its application as a photosensitizer drug for photochemotherapy.

Key words

- Phototoxicity
- Nitrofurane derivatives
- Quinifuryl
- Oxygen and nitrogen active species

Introduction

Photochemotherapy, and photodynamic therapy in particular (1,2), are relatively new approaches to the treatment of various diseases, including cancer. An extensive search for new photochemotherapy agents contin-

ues (3-7) and studies on the mechanism of their phototoxicity are being developed (8,9).

Quinifuryl (Figure 1) is a representative of the family of 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinolines, which were synthesized in the early 70's by Dr. N.M. Sukhova at the Institute of Organic Synthesis, Latvian Academy of Sci-

ences, Riga, Latvia, with the aim of developing new antitumor agents. These compounds have shown significant toxicity to various lines of cancer cells (10,11), with Quinifuryl possessing the highest cytotoxic activity (10) and showing radiosensitizing activity *in vitro* (12).

Quinifuryl absorbs light in the visible spectral region owing to the presence of a developed system of π -conjugation that makes it photolabile under irradiation in this spectral region. The excited singlet state is the first product of photoexcitation and may either decompose or form the excited triplet state (13). The latter reacts with either an electron donor, including another molecule of Quinifuryl in the ground state, or transfers its excitation energy to molecular oxygen (13). Illumination of a system containing the drug should therefore result in a decrease of Quinifuryl concentration and the formation of new compounds resulting from its phototransformation. Thus, the effect of illumination on Quinifuryl cytotoxicity is unpredictable because the products of phototransformation may be more or less toxic to transformed cells than Quinifuryl itself.

In the present study, the cytotoxicity of Quinifuryl to mouse leukemia P388 cells was compared in the dark and under continuous illumination with light in the spectral region from 390 to 500 nm.

Material and Methods

Cells

A mouse macrophage monocyte line, P388D₁, that grows in semi-suspension cul-

ture was obtained from the American Type Culture Collection (No. CCL46). Cells were grown in Fisher's medium supplemented with 10% heat-inactivated horse serum in 175-cm³ culture flasks at 37°C with 5% CO₂. On the day before the experiment, cells were seeded at 5 x 10⁵ cells/ml. The number of cells in suspension was calculated using a Neubauer chamber (0.0025 mm²). Slow magnetic stirring was used to maintain the suspension in a homogeneous state. All manipulations were carried out under low intensity red light (λ >550 nm) at room temperature (22°C).

Drug

A stock solution of 43.0 mM Quinifuryl, 2-(5'-nitro-2'-furyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbamoyl} quinoline (Figure 1), was prepared in Milli-Q quality water (Millipore).

Tests

The cell survival test (test 1) was based on the method of intravital staining (14) using Trypan blue (TB) as a dye to which the living cell is impermeable (15). The number of dead P388 cells was counted using a Neubauer chamber (0.0025 mm²) with 10 μ l of TB added to 90- μ l aliquots of a cell suspension withdrawn consecutively from the sample or control mixtures after appropriate time intervals. This test was employed for the comparative examination of the cytotoxicity of Quinifuryl in the dark and of the final products of its photodecomposition to P388 cells.

The toxicity test was based on the tetrazolium salt 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay and was performed in two ways as described previously (11) and designated here as tests 2 and 3. MTT is reduced only by live cells to yield a colored product that may be interpreted as a measure of viability (16). For the

Figure 1. Structure of Quinifuryl, 2-(5'-nitro-2'-furyl)ethenyl-4-{N-[4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl]carbamoyl} quinoline.

MTT assay, cells were seeded in DMEM containing 5% FBS into 96-well ELISA-type plates and exposed to Quinifuryl concentrations ranging from 0.2 to 20 μM for time intervals of 60 min in the dark or of 10 to 90 min in the presence of illumination. At the end of the drug exposure periods, plates were centrifuged to pellet the cells and the supernatants were displaced with either MTT dissolved in PBS (test 2) or with fresh medium (test 3). In the latter case, the cells were incubated for an additional 52 h (2 cell population-doubling times) with daily medium changes, followed by the MTT assay. Plates with MTT were incubated in the dark for 4 h, after which the water-insoluble MTT-formazan crystals were dissolved in DMSO, and the absorbance was determined with an ELISA plate reader Dynex MRX spectrophotometer (Dynex Technologies Inc., Chantilli, VA, USA) at 570 nm. The initial seeding densities ranged from 2×10^4 to 6×10^4 cells/well. Cell viability was assessed by TB dye exclusion at the beginning of each experiment and was always greater than 96%.

Irradiation

Samples and controls were irradiated in the spectral range from 390 to 500 nm using a standard tungsten lamp (150 W) through a colored glass filter 5-57 KOPP (Dieburg, Germany). Irradiation was performed either in a standard quartz 1-cm cuvette (test 1) or directly in ELISA-type plates (tests 2 and 3). The illumination intensity was 22 mW/cm^2 , as measured with a Spectra-Physics 407A radiometer. A standard 1-cm quartz cuvette with water was used as a thermal filter to prevent collateral heating effects. Absorbance was monitored using a DU 650 Beckman spectrophotometer (Fullerton, CA, USA).

The protocol for the Quinifuryl photocytotoxicity studies is summarized in Table 1 and is described as follows: a) sample (S): Quinifuryl was added to a cell suspension

and the mixture was immediately irradiated for time intervals up to 60 min; b) control 1 (C1) - the cell suspension was maintained in phosphate buffer for ≥ 60 min in the dark and in the absence of Quinifuryl; c) control 2 (C2) - the cell suspension was incubated for ≥ 60 min in the presence of Quinifuryl in the dark; d) control 3 (C3) - the cell suspension was irradiated for ≥ 40 min in the absence of Quinifuryl. This series of experiments was repeated six times.

Calculation and statistical analysis

The toxic effect (TE) of Quinifuryl was calculated as $\text{TE} = [\text{DC}]/[\text{Cell}]^{\text{control}}$, where $[\text{Cell}]^{\text{control}}$ is the cell concentration in control wells (cells incubated for the same period of time without the drug) and [DC] is the dead cell concentration. [DC] is calculated as $[\text{Cell}]^{\text{control}} - [\text{Cell}]^{\text{final}}$, where $[\text{Cell}]^{\text{final}}$ is the live cell concentration in wells exposed to the drug (5). The cell concentration was measured using a calibration curve constructed for P388 cells by the MTT-staining method.

The LC_{50} of Quinifuryl was estimated as $100 \times (T^0 - T)/T^0 = 50$, where T^0 and T are the absorbances of the test well at time zero (when the drug is added) and after exposure to the test compound (17), respectively. The data are presented as the mean $\pm$ SD of 6 measurements, and statistical analyses were

Table 1. Protocol for the study of Quinifuryl photocytotoxicity.

Group	Irradiation time (min)	Incubation time (min)*	Post-incubation time (h)	Quinifuryl (μM)
S1 Sample, test 1	0 to 60	0 to 60	No	20
S2 Sample, test 2	0 to 90	0 to 90	No	0.2; 2; 20
S3 Sample, test 3	60	60	52	0.2; 2; 20
S4 Sample, test 3	0	60	52	0.2; 2; 20
C1 Control	0	0 to 60	No	No
C2 Control	0 to 60	0	No	0.2; 2; 20
C3 Control	0 to 40	0	No	No

For details of S1-S4 samples and C1-C3 controls, see Material and Methods.

*Time of cell incubation with Quinifuryl.

Figure 2. Photocytotoxicity of Quinifuril (20 μ M) to mouse leukemia P388 cells measured by methods of dye exclusion (Trypan blue (TB), dead cells; open circles) or dye inclusion (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), living cells, triangles). Controls: C1 - cells incubated with Quinifuril in the dark (closed circles) and C2 - cells illuminated for the time intervals indicated in the absence of Quinifuril (squares). Cell concentration was $\sim 1 \times 10^6$ /ml in sodium phosphate buffer, pH 7.4. $T_{LC_{50}}$ is the irradiation time that was necessary to kill 50% of cells at 20 μ M Quinifuril. For the other experimental conditions, see Material and Methods.

Figure 3. Photodecomposition of Quinifuril under illumination with filtered light in the visible region. A, Spectral changes showing photobleaching of Quinifuril (20 μ M) in the presence of P388 cells. The arrow shows the direction of spectral changes. Numbers show the time of illumination in min. The dashed line shows the spectrum of glass filter absorption. B, Dynamics of Quinifuril photobleaching at $\lambda_{max} = 396$ nm (arrow, A) in the absence (circles) and presence (triangles) of P388 cells. Conditions of illumination and measurements of spectra were the same as described in the legend to Figure 2.

performed by the Student *t*-test. The Tukey test with a 95% confidence interval was applied to compare the means. The statistical analyses were done using the InStat software program for Windows (GraphPads software, San Diego, CA, USA).

Results and Discussion

The results presented in Figure 2 show the effect of illumination on Quinifuril toxicity to P388 cells which was measured by both dye (TB) exclusion and dye (MTT) inclusion methods. A significantly elevated toxic effect of Quinifuril on P388 cells was observed under illumination of the incubation mixture with visible light (390-500 nm). A 20 μ M Quinifuril concentration caused death of 50% of cells after 26 min (dye inclusion method) or 32.5 min (dye exclusion method) of illumination, and >80% of cells died after 60 min of illumination. The toxicity observed for 60-min illumination in the absence of Quinifuril (Figure 2, curve C1) or in the presence of Quinifuril in the dark (Figure 2, curve C2) was <10% of that observed under illumination in the presence of Quinifuril.

The photocytotoxic effect of Quinifuril under irradiation was accompanied by photodecomposition of Quinifuril (Figure 3A) that was monitored by a decrease of the specific absorption of the compound at 396 nm ($\epsilon_{396} = 2.47 \times 10^4$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$; Ref. 18). The presence of P388 cells did not alter the dynamics of Quinifuril photobleaching (Figure 3B).

The photocytotoxic effect of Quinifuril was further investigated in a series of experiments with different Quinifuril concentrations performed using the MTT inclusion method (test 2). The time dependence of the toxic effect of Quinifuril on P388 cells shows that the drug cytotoxicity in the dark was significantly reduced compared to the photocytotoxicity over the range of drug concentrations from 0.2 to 20 μ M (Figure 4). According to these data, the TE_L/TE_D ratios

(toxic effects under illumination and in the dark, respectively) after 60 min of drug incubation with cells were 6.6 ± 1.4 , 2.4 ± 0.7 , and 9.9 ± 2.4 at initial Quinifuryl concentrations of 0.2, 2.0, and 20.0 μM , respectively.

The LC_{50} values estimated from the drug concentration dependence of the toxic effect

(Figure 5) confirmed the above conclusion that the Quinifuryl toxicity was much higher under illumination than in the dark. Indeed, for 60 min of cell incubation with Quinifuryl under illumination, the death of 50% of the cells was observed with the drug concentration of 10 μM , while cell incubation with up

Figure 4. Time dependence of the toxic effect of Quinifuryl [Q] on P388 cells measured in the dark (filled symbols) and under illumination with visible light (390-500 nm) (open symbols). Initial drug concentrations were: 0.2 μM (inverted triangles), 2 μM (triangles), and 20 μM (squares). Experiments were performed in 96-well ELISA-type plates (2×10^4 cells/well) by dye (MTT) inclusion methods (for further details, see test 2 in Material and Methods). $\text{TE} = [\text{DC}]/[\text{Cell}]^{\text{control}}$, where TE is toxic effect, $[\text{Cell}]^{\text{control}}$ is cell concentration in control wells (cells incubated for the same period of time with no compound) and [DC] is the dead cell concentration. Each point indicates the mean $\pm$ SD of 6 measurements.

Figure 5. LC_{50} estimation: the concentration dependence of the toxic effect of Quinifuryl on P388 cells measured in the dark (dashed line, filled squares) and under illumination with visible light (390-500 nm; solid line, open squares). The time of drug incubation with cells was 60 min. Experiments were performed and toxic effect values calculated as described in the legend to Figure 4. The LC_{50} was estimated as $100 \times (T^0 - T)/T^0 = 50$, where T^0 and T are the absorbances of the test well at time zero (when the compound is added) and after exposure to Quinifuryl. Conditions of illumination were the same as described in the legend to Figure 2. Each point represents the mean $\pm$ SD of 6 measurements.

Figure 6. Cytotoxicity of Quinifuryl (filled symbols) and final products of its photodecomposition (open symbols) to mouse leukemia P388 cells in the dark (open circles, filled triangles) and under illumination (filled squares, open triangles) as measured by the dye exclusion method (Trypan blue; test 1, Material and Methods). Cell concentration was $\sim 5 \times 10^4$ in sodium phosphate buffer, and Quinifuryl concentration was 2 μM , pH 7.4. Each point represents the mean $\pm$ SD of 3 measurements.

to 20 μM Quinifuryl for the same period of time in the dark caused the death of no more than 15% of cells.

In contrast to test 2 that indicated only the killing effect of the drug, test 3 revealed the complete cytotoxicity that included cell proliferation arrest. The results obtained using this method are presented in Table 2, along with the data obtained using test 2 (the killing effect of Quinifuryl). These data show that Quinifuryl not only caused death, but also attenuated the proliferation of the surviving P388 cells. Both effects were significantly enhanced under illumination. A further conclusion from these data is that the toxic effect of Quinifuryl on P388 cells is due to cell proliferation arrest rather than to cell death.

The cell survival test (test 1, Material and Methods) was employed to determine whether the final products of Quinifuryl photodecomposition might be responsible for the elevated toxicity of this drug under illumination. For this reason, P388 cells (5×10^4 cells/ml) were incubated for up to 100 min with either Quinifuryl (at a final concentration of 2 μM) or final products of photodecomposition of the drug. In the latter case, the 18 μM Quinifuryl solution was illuminated until the major

Quinifuryl peak at 396 nm disappeared (see Figure 3A). Then, cells were added to a post-photolysis mixture and incubated in the dark. The results presented in Figure 6 show that the final products of Quinifuryl photodecomposition as well as Quinifuryl itself had low toxicity in the dark, causing death of less than 10% cells at 100 min of incubation. The final products of Quinifuryl were also non-toxic under 60-min illumination, while Quinifuryl itself caused death of nearly 90% of the cells. These results clearly show that the final products of Quinifuryl photodecomposition are not responsible for the cytotoxicity of this drug.

Based on the data presented above, it seems that the detailed mechanisms of photocytotoxicity of Quinifuryl deserve special investigation. The observation that the photoactivation of Quinifuryl significantly accelerates cell killing, along with the observation that the final products of Quinifuryl photolysis are not responsible for this acceleration, should be interpreted as evidence that more toxic short-lived intermediates are formed during photolysis. Evidence of the formation of reactive species during Quinifuryl photolysis by visible light was reported in our previous studies (13,18). The formation of the triplet excited state of the drug molecule was observed (13), which is capable of producing singlet oxygen (19,20). We had also detected the reactions of the triplet state with the drug in the ground state and with electron donors (13,21), with the formation of superoxide anion radical (18). The formation of reactive oxygen species in the course of Quinifuryl photolysis may be responsible for the photocytotoxicity of the drug. However, the possible toxicity of short-lived intermediates of Quinifuryl decomposition should be further investigated.

To the best of our knowledge, the data presented here are the first to indicate photocytotoxicity of a nitroheterocyclic compound and demonstrate the possibility of its application as a photosensitizer drug for photochemotherapy.

Table 2. Toxic effects (test 2) and post-effects (test 3) of Quinifuryl on P388 cells after 60 min of incubation with cells either in the dark or under illumination with visible light (390-500 nm).

Quinifuryl (μM)	Toxic effect			
	Dark		Illumination	
	Test 2	Test 3	Test 2	Test 3
0.2	0.014 ± 0.002	0.62 ± 0.11	0.09 ± 0.02	0.99 ± 0.005
2	0.12 ± 0.02	$0.91 \pm 0.08^*$	0.29 ± 0.09	$0.96 \pm 0.008^*$

Post-effects were measured 52 h after drug removal from the cell culture. Toxic effects (TE) were measured using the MTT assay and calculated as: $\text{TE} = [\text{DC}] / [\text{Cell}]^{\text{control}}$, where $[\text{Cell}]^{\text{control}}$ is the cell concentration in control wells (cells incubated for the same period of time without the drug) and $[\text{DC}]$ is the dead cell concentration. $[\text{DC}]$ is calculated as $[\text{Cell}]^{\text{control}} - [\text{Cell}]^{\text{final}}$, where $[\text{Cell}]^{\text{final}}$ is the live cell concentration in wells exposed to drug. $[\text{DC}]$ was measured either immediately after drug removal (test 2) or after cell incubation with fresh medium for 52 h (test 3). For further details, see Material and Methods.

* $P < 0.01$ for comparison between the appropriate data obtained in the dark and under illumination (Tukey test).

References

1. Dougherty TJ (1993). Photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 58: 895-900.
2. Ochsner M (1997). Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 39: 1-18.
3. Sobolev AS, Jans DA & Rosenkranz AA (2000). Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 73: 51-90.
4. Franck B & Nonn A (1995). Novel porphyrinoids for chemistry and medicine by biomimetic syntheses. *Angewandte Chemie (International Edition, English)*, 34: 1795-1811.
5. Oertel M, Schastak SI, Tannappel A, Hermann R, Sack U, Mossner J & Berr F (2003). Novel bacteriochlorine for high tissue-penetration: photodynamic properties in human biliary tract cancer cells *in vitro* and in mouse tumour model. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 71: 1-10.
6. Bourre L, Simonneaux G, Ferrand Y, Thibaut S, Lajat Y & Patrice T (2003). Synthesis, and *in vitro* and *in vivo* evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 69: 179-192.
7. Kassab K (2002). Photophysical and photosensitizing properties of selected cyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 68: 15-22.
8. Dobrucki JW (2001). Interaction of oxygen-sensitive luminescent probes Ru(phen)₃²⁺ and Ru(bipy)₃²⁺ with animal and plant cells *in vitro*: Mechanism of phototoxicity and conditions for non-invasive oxygen measurements. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 65: 136-144.
9. Bohm F, Edge R, Foley S, Lange L & Truscott TG (2002). Antioxidant inhibition of porphyrin-induced cellular phototoxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 65: 177-183.
10. Verovskiy VN, Degterev IA, Sukhova NM, Buzukov AA, Leonova EYu & Tatarskaya NK (1990). Interrelation between structure, microsomal metabolizing activation, mouse toxicity, cytotoxicity and antitumor activity of heterocyclic and nitroheterocyclic compounds. *In vitro and in vivo study. Pharmaceutical Chemistry Journal*, 24: 20-24.
11. Rossa MM, Rocha-e-Silva TAA, Terruggi CHB, Tedesco AC, Selistrede-Araujo HS, Borissevich IE & Degterev IA (2003). Comparison of the cytotoxicity of two nitroheterocyclic drugs (NHCD) towards transformed and non-transformed cells. *Pharmaceutical Research*, 48: 369-375.
12. Voronina SS, Tatarskaya NK, Degterev IA, Serebrianiy AM, Pelevina II & Sukhova NM (1985). Radiosensitizing activity and metabolism of some nitrofur derivatives. *Radiobiology*, 25: 748-751.
13. Borissevich YE, Daghasanli NA & Degterev IA (2003). Primary processes of photodecomposition of 2-(5'-nitro-2'-furanyl)ethenyl-4-[N-(4'-(N,N-diethylamino)-1'-methylbutyl)carbamoyl] quinoline. Effect of oxygen and compound concentration. *Journal of Photochemistry and Photobiology. A, Chemistry*, 159: 213-217.
14. Kochevar IE, Lambert CR, Lynch MC & Tedesco AC (1996). Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1280: 223-230.
15. Kaltenbach JP, Kaltenbach MH & Lyons WB (1958). Nigrosin as a dye for differentiating live and dead ascites cells. *Experimental Cell Research*, 15: 112-117.
16. Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63.
17. Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Hose C, Langley J, Cronise P & Vaigro-Wolff A (1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, 83: 757-766.
18. Smirnov SM, Jurav MA, Tatarskaja NK, Borisevich YE & Degterev IA (1989). Quinifur photoreduction and nitroanion radical formation. *Chemical Physics*, 8: 1723-1725.
19. Moan J & Berg K (1992). Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochemistry and Photobiology*, 55: 931-948.
20. Henderson BW & Dougherty TR (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*, 55: 145-157.
21. Kuzmin VA, Levin PP, Borisevich YE, Degterev IA & Smirnov SM (1988). Triplet exciplex of nitrofur derivative with aromatic amines. *Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Chemistry*, 7: 1510-1514.