

Estudo da cinética de fototransformação do acridina laranja na interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível

Study of the kinetics of acridine orange phototransformation in the interaction with microorganized systems under the action of visible light

Érika R. Silva, Iouri Borissevitch

Departamento de Física e Matemática da Universidade de São Paulo (USP), Ribeirão Preto (SP), Brasil.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética das fototransformações do corante acridina laranja, produzidas pela ação da luz visível. Para isso, foram analisadas as mudanças em função do tempo da irradiação nas características espectrais deste corante em soluções homogêneas aquosas e na presença das micelas sodium dodecyl sulfate (SDS), tanto na presença como na ausência de oxigênio molecular. A importância desse estudo foi verificar a ocorrência de fototransformação das moléculas acompanhada com a perda da sua fotoatividade, gerando subprodutos possivelmente tóxicos ao organismo e verificar a facilidade de eliminação desses subprodutos, tendo em vista a possível aplicação desse corante em fotoquimioterapia.

Palavras-chave: Laranja acridina; micelas; fotólise.

Abstract

The objective of this work was to study the kinetics of acridine orange phototransformations produced by the action of visible light. For this, changes in function of time irradiation in the spectral characteristics of this dye were investigated in homogeneous aqueous solutions and in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles, both in the presence and absence of molecular oxygen. The importance of this study was to verify the occurrence of phototransformation of the molecules accompanied with the lost of their photoactivity, generating possibly toxic subproducts to the organism and to verify the facility of elimination of these, in view the possible application of this dye in photochemotherapy.

Keywords: Acridine orange; micelles; photolysis.

Introdução

O câncer é definido como um grupo de doenças que se caracterizam pela perda do controle da divisão celular e pela capacidade de invadir outras estruturas orgânicas. Pela sua natureza específica, o único jeito de tratá-lo é matar os tecidos cancerígenos. Isso determina a especificidade dos métodos tradicionais de tratamento, tais como radioterapia e quimioterapia, métodos que possuem alta capacidade de matar as células, tanto cancerígenas quanto saudáveis.

Em meados dos anos 1970, iniciou-se a aplicação clínica de um novo método de tratamento, chamado fotoquimioterapia (FQT). O princípio desse método é introduzir no organismo do paciente um composto que não é ativo no seu estado fundamental e que absorve luz na

região visível (fotossensibilizador – FS) e, após certo tempo, iluminar a região a ser tratada com luz. A luz ativa o FS, gerando espécies reativas do oxigênio, que matam as células causando uma ação curativa. Os métodos de FQT tornam-se eficientes e proveitosos para uso na Medicina, pois a ação da luz visível não causa danos aos tecidos saudáveis. Entre os diferentes métodos de FQT, a forma mais desenvolvida para uso clínico é a terapia fotodinâmica (TFD)¹.

O efeito fotoquimioterapêutico está baseado na produção de espécies ativas pela ação da luz visível que induzem a morte celular. Essas espécies são formadas devido à fotoexcitação das moléculas do FS através da luz.

Tipicamente, a luz aplicada é da região de 600 a 800 nm, chamada “janela terapêutica”, onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes.

Correspondência: Érika Ribeiro e Silva – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Avenida Bandeirantes, 3.900 – Monte Alegre – CEP 14040-901 – Ribeirão Preto (SP), Brasil – E-mail: erika_rs@pg.ffclrp.usp.br

Para a aplicação terapêutica de um FS é essencial o estudo dos efeitos do ambiente nas suas características, especialmente os efeitos causados devido à presença de estruturas micro-organizadas, tais como DNA, proteínas e membranas celulares². Estas constituem as principais estruturas com as quais os FS interagem no organismo.

Sob a ação da luz visível os FS podem ser transformados, por um lado perdendo sua fotoatividade e, por outro, formando os fotoprodutos, que podem ser tóxicos para o organismo. A velocidade de fototransformação depende de vários fatores, tais como interação com nanoestruturas

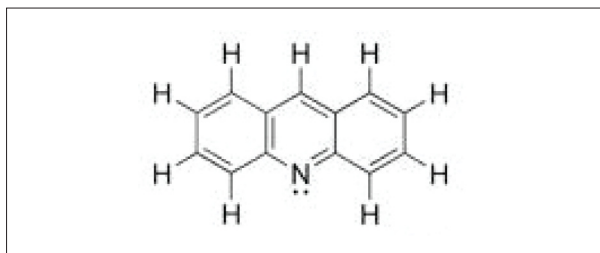


Figura 1. Estrutura do acridina laranja.

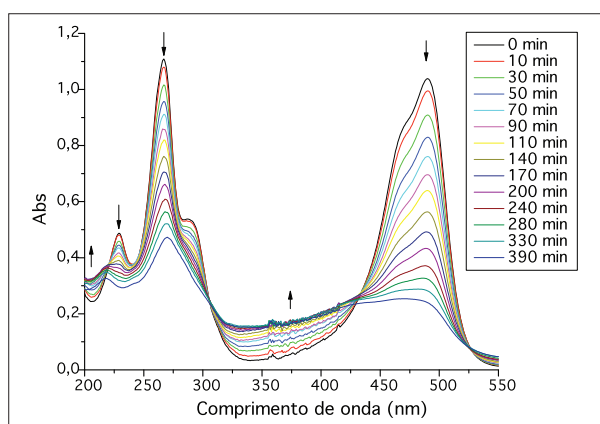


Figura 2. Espectros de absorção ótica do acridina laranja na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação (absorção inicial 1,0).

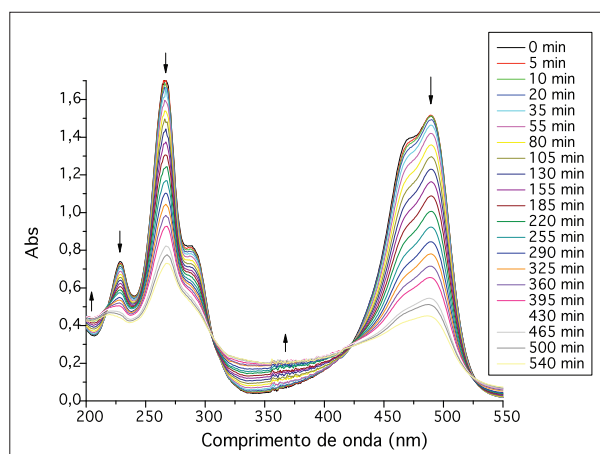


Figura 3. Espectros de absorção ótica do acridina laranja na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação (absorção inicial 1,5).

do organismo (membranas celulares e biopolímeros) e reação com diversos compostos. Entre os últimos, o oxigênio molecular possui o interesse especial, pois suprime efetivamente os estados excitados do FS, diminuindo assim, sua fotoatividade. Neste trabalho estudamos o efeito da interação com micelas de SDS e oxigênio molecular na dinâmica de fototransformação do acridina laranja (Figura 1), que é usado no fototratamento de diversas doenças da pele.

Material e métodos

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e as soluções foram preparadas em água purificada com sistema "Milli-Q". O corante acridina laranja foi obtido da Sigma Aldrich. A fonte de luz visível utilizada para a irradiação do corante foi uma lâmpada de potência 75 W construída pelo Grupo de Fotobiofísica situada num irradiador a cerca de 10 cm da amostra. A intensidade da luz branca é de 550 mW/cm² e, na faixa 490±2 nm, a intensidade foi 40 mW/cm². Durante a irradiação da amostra, foi utilizado um filtro para que a irradiação ficasse centrada na banda de interesse do corante (em torno de 490 nm). Os espectros de absorção foram monitorados com espectrofotômetro Beckman-Counter DU-640, utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de espessura.

Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas do corante acridina laranja em diferentes concentrações. Para verificar o efeito do oxigênio molecular, foram preparadas amostras desoxigenadas, obtidas com a inserção de nitrogênio comprimido durante um intervalo de tempo de aproximadamente 10 minutos.

Foi também preparada uma solução estoque de *sodium dodecyl sulfate* (SDS) cuja concentração ($2,0 \times 10^{-2}$ mol/L) era suficiente para termos a formação de micelas. A partir dessa solução foi possível estudar a interação do corante com as micelas. Nessa parte também preparamos amostras desoxigenadas para verificar o efeito do oxigênio.

A cinética de fotodecomposição foi medida por meio de monitoramento dos espectros de absorção das amostras em função do tempo da irradiação.

As mudanças da concentração do acridina laranja foram determinadas usando a relação entre a absorbância da amostra (A) e a concentração do composto (C), o coeficiente de absorção molar do composto ($\epsilon_{493}=53000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)³ e o caminho ótico da amostra (L) (espessura da cubeta)⁴:

$$A = \epsilon CL \quad (1)$$

Resultados

Os espectros de absorção do acridina laranja em soluções aquosas em função do tempo de irradiação encontram-se nas Figuras 2 e 3.

Os espectros iniciais são caracterizados pelos máximos de absorção em 266 nm (primeiro pico) e 490 nm (segundo pico), ambos atribuídos ao monômero. Para efeito de análise, levamos em conta apenas o segundo pico.

Nas Figuras 4 e 5 podemos observar o decaimento da absorbância normalizada da banda de 490 nm dos monômeros do acridina laranja na presença e na ausência de oxigênio, respectivamente, em função do tempo de irradiação.

Analisando as curvas de decaimento das bandas, verificamos que as mudanças que ocorrem com as absorções óticas com relação ao tempo de irradiação possuem caráter monoexponencial, tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. Os perfis das curvas obtidas são descritas pela equação:

$$[A]=[A_0] e^{-t/\tau} \quad (2)$$

onde A e A_0 são, respectivamente, a absorção final e a absorção inicial da amostra, t é o tempo e τ é a constante de tempo.

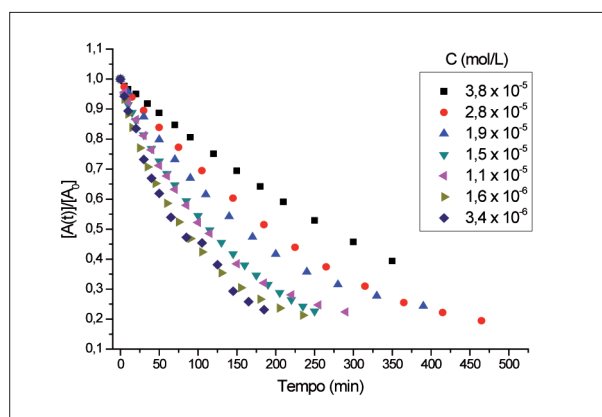


Figura 4. Decaimento da absorção normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda=490$ nm do monômero do acridina laranja na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

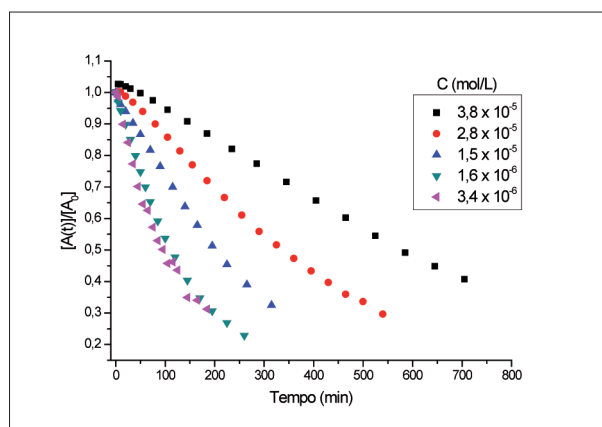


Figura 5. Decaimento da absorção normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda=490$ nm do monômero do acridina laranja na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

A partir desses gráficos foi possível obter as constantes de tempo para cada uma das amostras. A Tabela 1 contém os resultados para os experimentos realizados na presença de oxigênio e a Tabela 2, resultados para experimentos na ausência deste. A última coluna corresponde ao tempo total de irradiação utilizado no experimento.

Os espectros de absorção do acridina laranja em soluções aquosas de SDS em função do tempo de irradiação encontram-se nas Figuras 6 e 7.

Nas Figuras 8 e 9 podemos observar o decaimento da absorbância normalizada da banda dos monômeros do acridina laranja na interação com SDS na presença e na ausência de oxigênio, respectivamente, em função do tempo de irradiação.

Tabela 1. Valores das constantes de tempo, concentrações e tempo total de irradiação dos monômeros do acridina laranja (na presença de oxigênio).

Absorção inicial	C (mol/L)	τ	Tempo (min)
2	$3,8 \times 10^{-5}$	626 ± 37	350
1,5	$2,8 \times 10^{-5}$	286 ± 12	465
1	$1,9 \times 10^{-5}$	183 ± 5	390
0,8	$1,5 \times 10^{-5}$	168 ± 5	250
0,6	$1,1 \times 10^{-5}$	128 ± 3	290
0,4	$1,6 \times 10^{-6}$	92 ± 3	235
0,2	$3,4 \times 10^{-6}$	94 ± 10	185

Tabela 2. Valores das constantes de tempo, concentrações e tempo total de irradiação dos monômeros do acridina laranja (na ausência de oxigênio).

Absorção inicial	C (mol/L)	τ	Tempo (min)
2	$3,8 \times 10^{-5}$	2911 ± 636	705
1,5	$2,8 \times 10^{-5}$	878 ± 116	540
0,8	$1,5 \times 10^{-5}$	484 ± 57	315
0,4	$1,6 \times 10^{-6}$	152 ± 7	260
0,2	$3,4 \times 10^{-6}$	100 ± 7	283

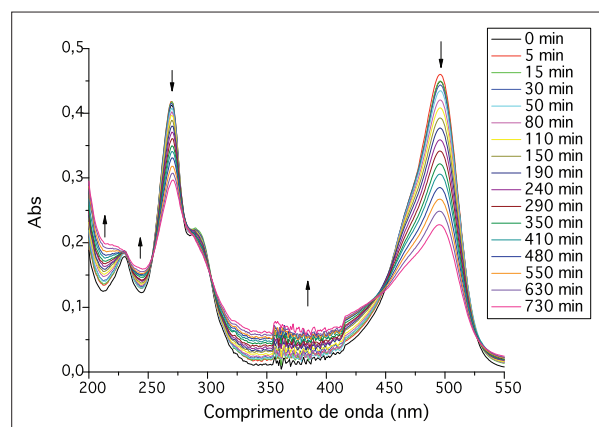


Figura 6. Espectros de absorção ótica do acridina laranja interagindo com SDS na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação (absorção inicial 0,4).

Nas Tabelas 3 e 4 encontram-se os valores das constantes de tempo.

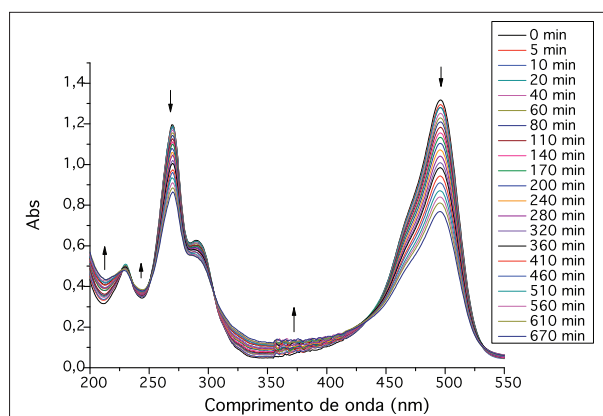


Figura 7. Espectros de absorção ótica do acridina laranja interagindo com SDS na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação (absorção inicial 1,2).

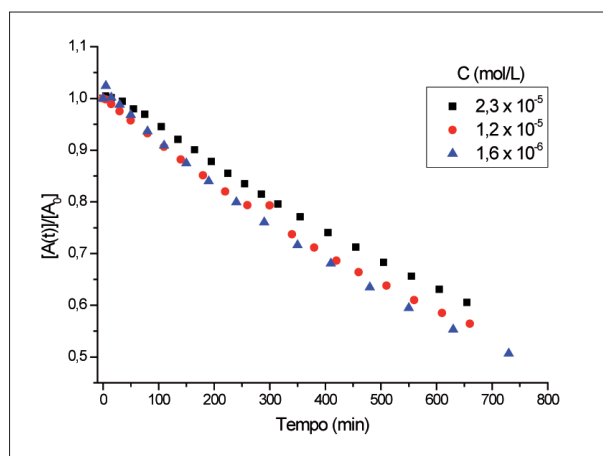


Figura 8. Decaimento da absorção normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda=496$ nm do monômero do acridina laranja na interação com SDS na presença de oxigênio em função do tempo de irradiação.

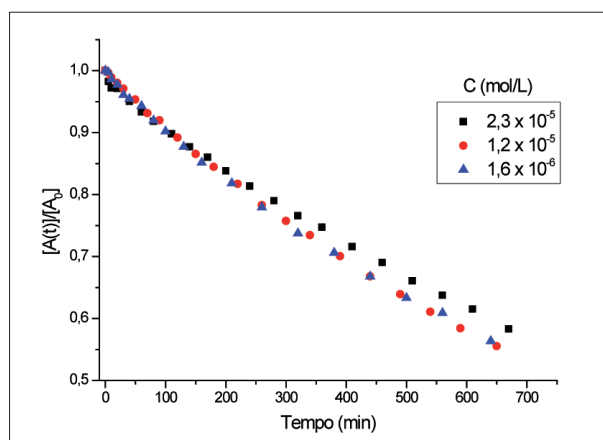


Figura 9. Decaimento da absorção normalizada $[A(t)]/[A_0]$ em $\lambda=496$ nm do monômero do acridina laranja na interação com SDS na ausência de oxigênio em função do tempo de irradiação.

Tabela 3. Valores das constantes de tempo, concentrações e tempo total de irradiação dos monômeros do acridina laranja na interação com SDS (na presença de oxigênio)

Absorção inicial	C (mol/L)	τ	Tempo (min)
1,2	$2,3 \times 10^{-5}$	1948 ± 393	655
0,6	$1,2 \times 10^{-5}$	1088 ± 145	660
0,4	$1,6 \times 10^{-6}$	865 ± 68	730

Tabela 4. Valores das constantes de tempo, concentrações e tempo total de irradiação dos monômeros do acridina laranja na interação com SDS (na ausência de oxigênio).

Absorção inicial	C (mol/L)	τ	Tempo (min)
1,2	$2,3 \times 10^{-5}$	1084 ± 115	670
0,6	$1,2 \times 10^{-5}$	972 ± 36	650
0,4	$1,6 \times 10^{-6}$	781 ± 47	640

Discussão e conclusões

A partir dos resultados, podemos verificar que há uma dependência entre a concentração e a velocidade de fotodecomposição do corante. Quando retiramos oxigênio, percebe-se que a velocidade de fotodecomposição diminui, possivelmente porque esse processo depende de oxigênio molecular.

Se compararmos os experimentos em soluções homogêneas aquosas com os experimentos com SDS, podemos observar que os valores das constantes de tempo na presença de surfactantes são bem maiores que na ausência destes. Entretanto, quando é retirado o oxigênio, a velocidade de fotodecomposição é mais rápida quando há interação com o SDS.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos.

Referências

- Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *J Photochem Photobiol B.* 1997;39(1): 1-18.
- Scharbele F. Efeitos do Meio e da Interação com DNA e Micelas nas Características Espectrais dos Corantes Cianicos com Dois Cromóforos [Tese]. Ribeirão Preto: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2007.
- Gurrieri S, Smith SB, Wells KS, Johnson ID, Bustamante C. Real-time imaging of the reorientation mechanisms of YOYO-labelled DNA molecules during 90 degrees and 120 degrees pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 1996;24(23):4759-67.
- Ewing GW. Métodos instrumentais de análise química. São Paulo: Edgard Blücher LTDA; 1969.