

Raport stiintific sintetic

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie 2013–decembrie 2013

Aceasta etapa a avut ca scop studiul fotofizic si fotochimic al compusilor de interes in cadrul proiectului constand in fotosensibilizatori (de tip ftalocianinic, coloranti)-molecula de legatura (olefine sintetizate in laborator) si medicamente (au fost selectate fenotiazinele -molecule utilizate in terapia fotodinamica antibacteriana).

Au fost obtinute urmatoarele rezultate:

*Au fost realizate masuratori ale fotostabilitatii unor fenotiazine functie de parametrii de iradiere prin spectroscopie de absorbtie (Dinache, Rom. Rep. Phys. 2013).

*Au fost realizate masuratori ale timpilor de viata ale starilor de triplet prin fotoliza flash si masurarea hidrofilitatii prin tensiune superficiala pentru compusi de interes de tip ftalocianinic in amestec de solventi, studiu care se concretizeaza intr-un manuscript aflat in curs de submitere la Journal of Molecular Structure. Un studiu privind fotofizica unor ftalocianine a fost publicat in Rom. Rep. in Phys. (Staicu, 2013).

*S-a realizat studiul fotofizic si fotochimic al fenotiazinei CPZ, s-a masurat randamentul quantic de generare a oxigenului singlet si a ratei de interactie a CPZ cu oxigenul singlet si deasemenea a unor compusi de tip olefinic in conexiune cu molecula de fotosensibilizator cresyl violet. Produsi obtinuti au fost analizati prin spectroscopie de IR (studiu trimis la Journal of Biomedical Optics – aflat sub revizie).

Rezultatele acestor studii sunt sintetizate in continuare.

Structura compusilor de tip olefine- colorant studiatii sunt ilustrati in Fig. 1. L1 si L4 sunt 2 olefine (sintetizate de colaboratori de la Universitatea de Beancan) care sunt analizate functie de cresyl violet L3. De asemenea a fost studiat si compusul complex L2 care a constat in molecula de fotosensibilizator L3 legata cu olefina L1.

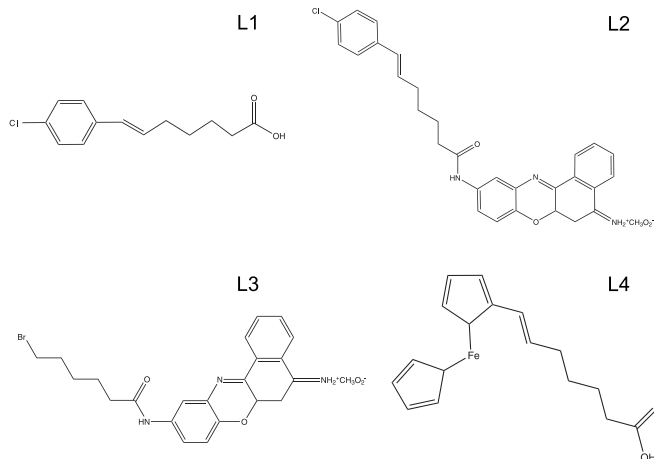


Fig. 1 Structuri chimice L1, L2, L3 si L4.

Interacția dintre compusi si oxigenul singlet generat de fotosensibilizator a fost investigata prin masurarea fosforescentei oxigenului singlet in timp real. Constanta de rata a interacției dintre L1 si L4 cu oxigenul singlet a fost, de asemenea, masurata. Timpul de viața al oxigenului singlet, generat prin excitarea moleculelor de L3 utilizând radiația laser, a fost determinat pentru compusi L1, L4 (concentrații 2 mM- 25 mM) in amestec cu L3 având o concentrație de 25 μM. Soluțiile au fost preparate in DCM. Rata de stingere a oxigenului a fost de $2.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pentru L1 si de $2,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pentru L4. In Fig.2 este reprezentata grafic relatia Stern-Volmer pentru compusul

L4. Se poate observa ca se produce o rata de stingere a oxigenului singlet cu un ordin de marime mai mare, daca in structura olefinei sunt prezente cele doua inele ciclopentadienice legate prin Fe comparativ cu cazul in care acestea sunt substituite de clorbenzen.

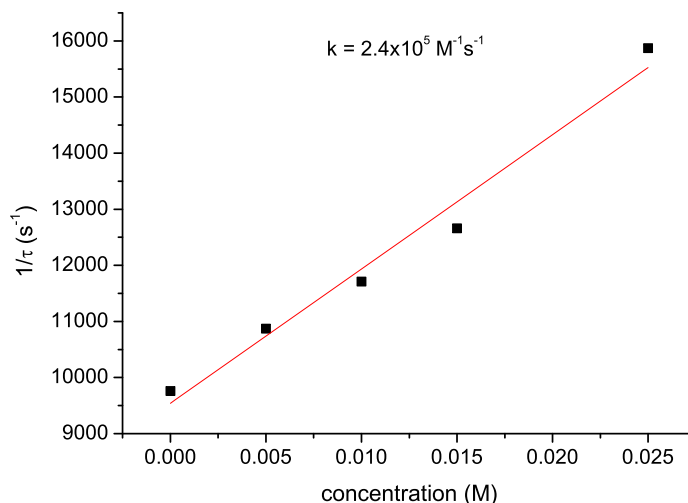


Figura 2 Stern-Volmer plot pentru compusul L4.

Compusul L2, obținut din L1 și L3, a fost de asemenea studiat. Variația timpului de viață al oxigenului singlet pentru L2 a fost comparat cu cel pentru L3. Dependența în timp a intensității fosforescenței oxigenului singlet pentru L2 și L3 la o concentrație de 25 μM este prezentată în Figura 3. Aproximativ aceleași valori ale intensității semnalelor, poate fi o indicație că stingerea oxigenului singlet nu este de tip static în cazul compusului L2. Scaderea concentrației acestui compus determină o creștere a timpului de viață al oxigenului singlet, ceea ce indică o stingere dinamică având o rată de $1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

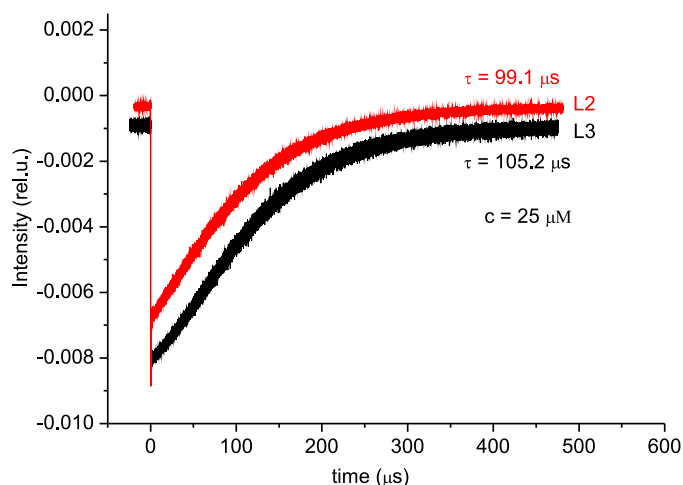


Figura 3 Fosforescența oxigenului singlet ca funcție de timp pentru L2 și L3 având concentrații de 25 μM.

Cantitatea de un mL de soluție de L3 și L1/L4 a fost iradiată timp de o ora utilizând radiația din domeniul spectral vizibil emisă de o lampă cu Xe având puterea de 145 mW. Producții obținute în urma iradierii au fost investigați prin spectroscopie FTIR. Pentru amestecul L1 și L3 nu s-au observat modificări în spectrul soluției iradiate comparativ cu cel al soluției neiradiate. Pentru amestecul ce conține 0.5 mL de L3 și 0.5 mL de L4 iradiat timp de o ora se pot observa modificări în spectrul IR față de cel neiradiat (Figura 4).

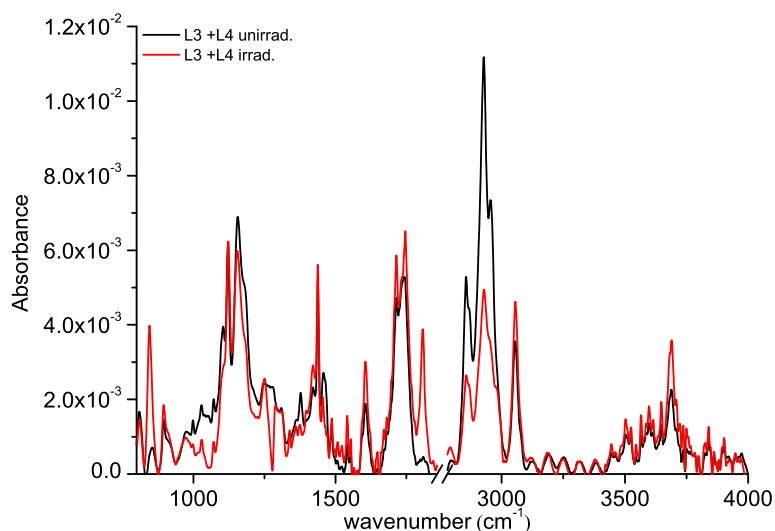


Figura 4. Spectrul FTIR pentru amestecul L3 si L4 neiradiat si iradiat

Noul maxim de la 1808 cm^{-1} din spectrul IR al soluției iradiate poate fi atribuit vibrației de întindere a legaturii C=O de lângă inelul ciclopentadienic. Acest lucru poate fi o indicație a formării legaturii de carbonil prin reacția de cicloadiție (2+2) datorită ruperii legaturii de C=C din cadrul structurii olefinei. Pe de altă parte, apariția unei noi benzi la 845 cm^{-1} poate fi atribuită formării peroxidului ca rezultat al unei reacții de tip ene. Între cele două reacții menționate anterior are loc un proces competitiv. O altă indicație a producerii reacției ene este scăderea intensității celor două benzi de la 2856 cm^{-1} și 2928 cm^{-1} (responsabile pentru vibrațiile de întindere simetrice și asimetrice ale legaturii C-H a CH_2) cu 50% respectiv 55% (scăderea în intensitate a vibrației specifice legaturii CH_2 se datorează înlocuirii legaturii C-C cu cea de C=C din cadrul reacției ene).

Rata de stingere a oxigenului singlet a fost determinată pentru trei substanțe ce aparțin clasei olefinelor. Prezența în structura olefinelor a două inele ciclopentadienice legate prin atomul de Fe oferă o rată de stingere a oxigenului singlet cu un ordin de mărime mai mare decât în cazul în care aceasta este substituită cu un clorbenzen. Acestea susțin faptul că L4 poate fi utilizat ca linker în cazul livrării medicamentelor prin interacția cu oxigenul singlet.

Studiul fotofizic și fotochimic al fenotiazinei clorpromazina

Spectrul UV-Vis al CPZ este caracterizat de două benzi de absorbție cu maxime la 254 nm și 307 nm. Ca rezultat al interacției compusului cu radiația laser UV (266 nm) se poate observa că după 30 de minute de iradiere, banda de la 307 nm dispare, fiind acompaniata de apariția altor două maxime la 503 nm și 540 nm (Figura 5).

Spectrul de fluorescență indusă laser (LIF) al soluției apoase de CPZ având o concentrație de 2 mg/mL prezintă un maxim la 500 nm. Intensitatea fluorescenței crește cu timpul de iradiere până la 5 minute, apoi începe să descrească. (Figura 6).

Analiza pH-ului pentru soluțiile de CPZ arată o descreștere a acestuia de la 5.75 la 2.23 de-a lungul iradierii. Acest comportament poate fi justificat prin formarea cationului de hidroniu datorită ruperii atomului de clor din structura aromatică a CPZ

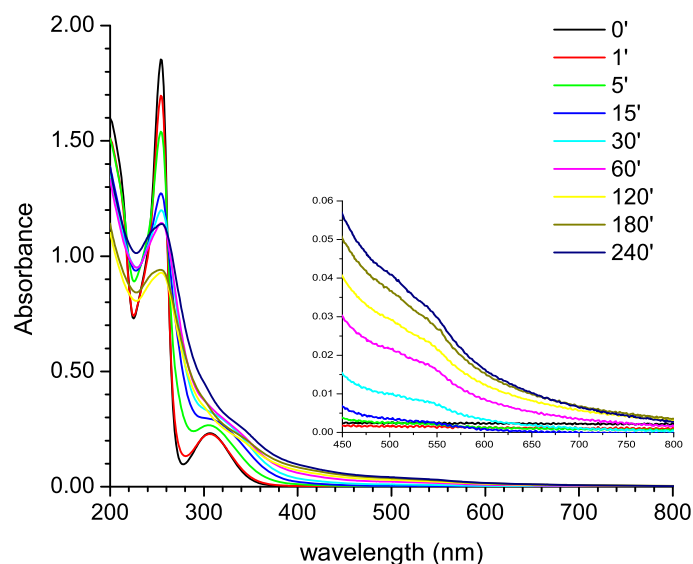


Figura 5 Spectrul de absorbție al unei soluții apoase de CPZ având o concentrație de 0.2 mg/mL între 200-800 nm pentru timpi de iradiere între 0 - 240 minute.

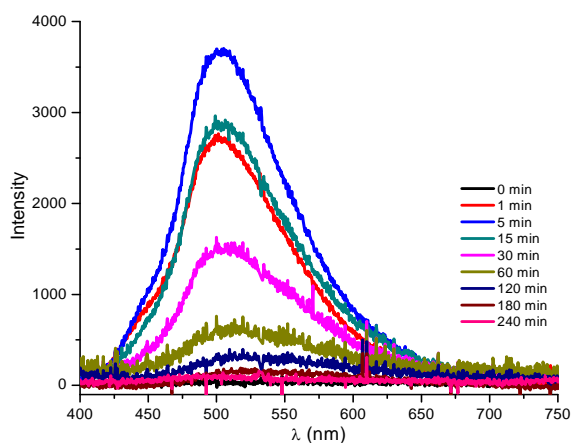


Figura 6 Spectrul LIF al soluției de CPZ (2 mg/mL) pentru timpi de iradiere între 0-240 min.

Atat soluția de CPZ neiradiată ca și cea iradiată au fost analizate, de asemenea, prin spectroscopie FTIR, benzile de vibrație specifice diferitelor legături din structura CPZ fiind identificate. Spectrul pentru CPZ neiradiat a fost comparat cu cel pentru CPZ iradiat 240 de minute, iar diferențele au fost evidențiate (Figura 7). Formarea de noi compuși este dovedită prin apariția unor noi benzi în spectrul FTIR. Într-un studiu anterior (Pascu et. al., PLoS One 2013) au fost identificați 5 fotoprodusi în soluția iradiată de CPZ folosind tehnici ca HPLC MS/MS și HPLC-DAD: Clorpromazina sulfoxid (CPZ-SO), Promazina (Pz), Hidroxipromazina (Pz-OH), Hidroxipromazina sulfoxid (PZ-OH-SO) și Promazina sulfoxid (Pz-SO).

Benzile IR caracteristice acestor compuși au putut fi identificate și în cazul soluției apoase de CPZ, având o concentrație de 2 mg/mL și iradiate timp de 240 minute, prin spectroscopie FTIR. Maximul de la 1265 cm^{-1} este atribuit vibrației de întindere a legăturii C-O a grupării fenol, indicând formarea Pz-OH și/sau PZ-OH-SO. Maximul de la 1085 cm^{-1} se datorează vibrației de întindere a legăturii S-O datorată sulfoxidului, dovedind formarea de Pz-SO și/sau PZ-OH-SO. Nu în ultimul rând, maximul de la 804 cm^{-1} , atribuit legăturii C-Cl, dispăre din spectrul probei iradiate arătând formarea Pz. Deplasarea de 6 cm^{-1} către numere de undă mai mari observate pentru toate benzile se datorează dispariției totale a CPZ și indică formarea de noi produse ce prezintă vibrații caracteristice diferite.

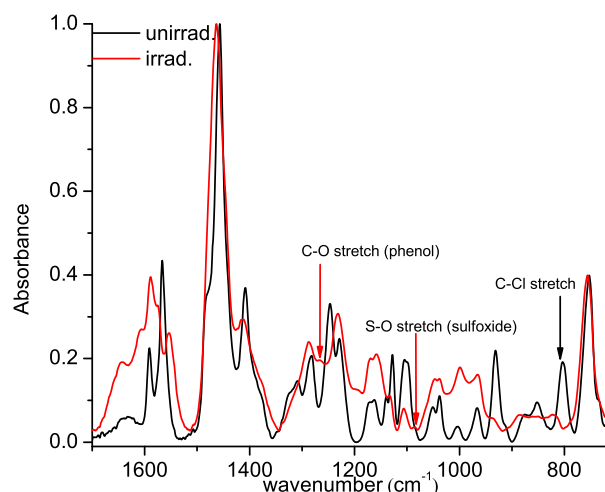


Figura 7 Spectrul FTIR pentru solutia neiradiata/iradiata deCPZ (concentratie de 2 mg/mL)

Datorita faptului ca rezultatele obtinute in urma analizelor FTIR si HPLC-MS/MS au indicat prezenta unor reactii fotoinduse prin oxidare, s-a verificat daca CPZ genereaza oxigen singlet prin fotosensibilizare. Probele au fost preparate in D₂O, deoarece acest solvent prezinta un timp de viata mai lung al oxigenului singlet comparativ cu cel al apei (30 μs fata de 3-4 μs). Randamentul generarii oxigenului singlet a CPZ a fost determinat utilizand ca referinta o solutie de ZnPc dizolvat in DMSO (randament cuantic pentru oxigenul singlet fotogenerat 0.67). Semnalele de fosforescenta rezolvata in timp a oxigenului singlet generat au fost inregistrate in aceleasi conditii pentru CPZ si standard, iar randamentul CPZ a fost calculat in concordanta cu urmatoarea formula:

$$\Phi = \Phi_{ref} \frac{I}{I_{ref}} \frac{A_{ref}}{A} \frac{n^2}{n_{ref}^2} \frac{\tau}{\tau_{ref}}$$

unde, Φ este randamentul generarii oxigenului singlet, I - intensitatea fosforescentei oxigenului singlet, A - absorbtia solutiei la 355 nm si τ - timpul de viata al oxigenului singlet, in timp ce indicele ref corespunde valorilor probei considerata referinta (ZnPc dizolvat in DMSO). Intensitatea fosforescentei este obtinuta prin extrapolarea la $t=0$ a curbei mono-exponentiale de fitare a cineticii fosforescentei.

Valoarea astfel determinate arandamentului generarii de oxigen singlet pentru CPZ in D₂O este de 3.3%. Pentru a estima interactia oxigenul singlet cu CPZ, a fost masurata cinetica de stingere a oxigenului singlet pentru diferite concentratii de CPZ ($5.75 \cdot 10^{-5}$ M – $5.6 \cdot 10^{-4}$ M). Din dreapta Stern-Volmer obtinuta (Figura 8) s-a determinat constanta de rata a stingerii dinamice a oxigenului singlet in cazul CPZ ca fiind de $1.53 \cdot 10^8$ M⁻¹s⁻¹.

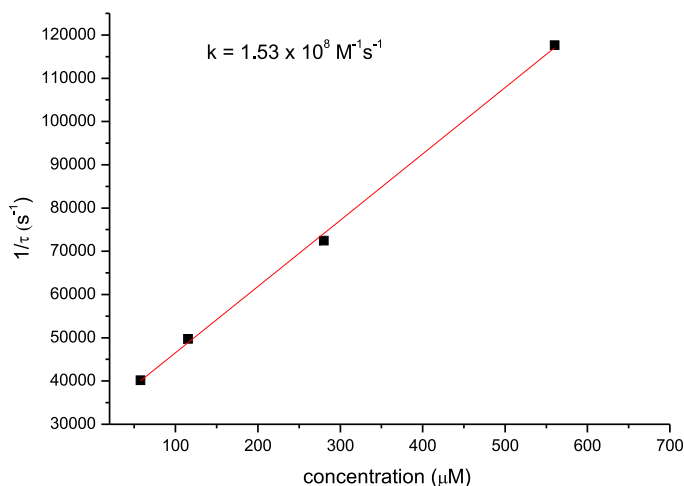


Figura 8 Dreapta Stern-Volmer pentru interactia oxigenului singlet cu CPZ.

Comportamentul fotochimic al CPZ a fost descris în literatura; iradierea cu UVA (320-400 nm) produce formarea radicalilor liberi în soluția de CPZ, în timp ce iradierea cu UVC (<270 nm) produce fotoionizarea. După formarea radicalilor liberi, oxigenul singlet sensibilizat de către starea excitată de triplet a CPZ poate duce la formarea derivaților sulfoxid.

Rezultatele noastre sugerează un punct critic al iradierii, acesta fiind la 120 de minute. Maximul de la 254 nm prezent în spectrul UV-Vis prezintă o scădere liniară în timpul celor 120 minute de iradiere, apoi începe să crească în intensitate până la sfârșitul celor 240 de minute. Valorile pH-ului scad de la 5.72 la 2.23 în cele 120 de minute, apoi acesta stabilizează-se. Spectrul fluorescenței induse laser prezintă o scădere a intensității până în momentul în care are loc stingerea acesteia după 120 de minute. Toate aceste rezultate sugerează transformarea completă a CPZ în fotoprodusi în timpul celor 120 minute de iradiere.

Este cunoscut faptul că o parte dintre fotoprodusii de reacție apar ca rezultat al fotolizei prin declorinare reductivă. Moleculele de Pz și Pz-OH sunt posibili produși de reacție care apar datorită proceselor de declorinare reductivă și hidroxilare.

Interacția dintre CPZ și oxigenul singlet generat de el însuși urmează următoarea cale de reacție, oxidarea având loc la atomul de sulf:

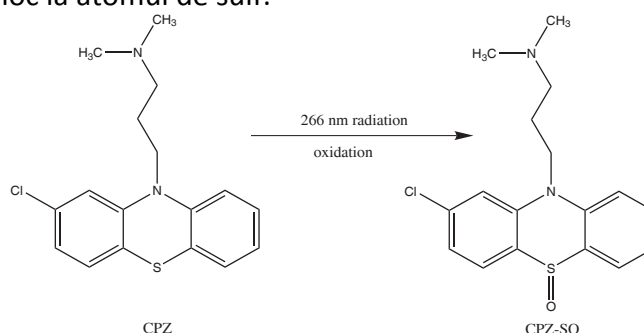


Figura 9 Formarea CPZ-SO prin oxidarea CPZ.

CPZ-SO produs de către foto-oxidarea CPZ în apă datorită interacției cu radiația UV a laserului este un proces similar cu cel obținut prin conversie metabolică a CPZ ca urmare a administrării împotriva bolilor psihotice.

Astfel, implicarea oxigenului singlet în reacții fotochimice induse prin expunerea la radiație laser a CPZ a fost analizată. Randamentul oxigenului singlet al CPZ a fost determinat ca fiind 3.3%. În concordanță cu acest lucru, au fost sugerate posibilele căi fotochimice de reacție a CPZ. Fotoprodusii au fost analizați prin spectroscopie FTIR iar modificările obținute la nivelul benzilor IR confirmă formarea produșilor obținuți în urma interacției cu radiația laser, identificați anterior prin HPLC-MS/MIS și HPLC-DAD (Pascu et al., PlosOne, 2013).