

Raport stiintific

privind implementarea proiectului in perioada ianuarie – decembrie 2015

Aceasta etapa a avut ca scop studiul fotofizic si fotochimic al compusilor de interes in cadrul proiectului de tip CNT- fotosensibilizator –molecula de legatura- medicament. Astfel au fost sintetizati compusi prin metode de legare covalenta iar acestia au fost analizati din punct de vedere al proprietatilor de absorbtie, microfluidica (tensiune superficiala), proprietatilor de fluorescenta, de generare de specii active (oxigen singlet) si al structurii vibrationale prin spectroscopie Raman.

Principalul obiectiv al etapei a fost sintetizarea chimica si caracterizarea fotofizica a unei structuri supramoleculare care sa inglobeze nanotuburi de carbon (SWCNT) ca vehicule purtatoare (nano-vectori), un element fotosensibilizator generator de oxigen singlet (1O_2) prin foto-excitare si un compus medicamentos antitumoral legat de SWCNT prin intermediul unui linker clivabil sub actiunea oxigenului singlet. Acest concept de configurare a entitatii supramoleculare permite eliberarea unui medicament intr-o locatie precisa si la un moment determinat prin iradiere optica adecvata.

Pentru atingerea scopului etapei a fost realizat initial studiul fotofizic al compusilor chimici selectionati pe baza proprietatilor lor fizice si chimice astfel incat sa indeplineasca atat conditiile impuse de functionalitatea lor in compusul supramolecular cat si pe cele privind posibilitatea legarii lor covalente in structura supramoleculara in relatie cu ceilalti parteneri din structura. Structura complexa Fotosensibilizator-Vehicul-Linker-Medicament (VP-SWCNT-AF-MTX (FVLM) s-a realizat exclusiv prin constituirea de legaturi covalente intre compusii selectati in jurul vectorului CNT (Shema 1).



Schema 1

Caracterizarea fotofizica a complexului sintetizat - spectroscopie de absorbtie, de fluorescenta, Raman, studiul hidrofilicitatii si al generarii de oxigen singlet.

1. Spectroscopie de absorbtie

Spectrul de absorbtie al AF in DMF (Figura 1) arata ca acesta prezinta o singura banda de absorbtie in domeniul spectral UV, departe de "fereastra" de transparenta a tesuturilor (rosu-NIR) utilizata in general pentru excitarea fotosensibilizatorilor (incluzand VP-ul) ceea ce elimina orice efecte de interferenta asupra comportarii de clivaj a compusului la iradiere.

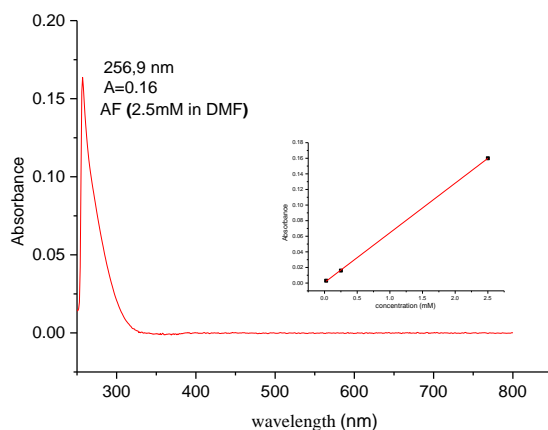


Figura 1 Absorbanta AF in DMF

Pe domeniul de concentratie de interes absorbanta optica a AF este liniara atat in cazul solventului DMF (inset) cat si pentru apa (not shown).

Compusul antitumoral MTX are absorbanta in domeniul spectral UV –VIS cu benzi de absorbtie cu maxime la 297 nm si 386 nm (Figura 2) departe de zona de activare optica a fotosensibilizatorilor si dovedeste liniaritate a dependentei absorbantei de concentratie (inset).

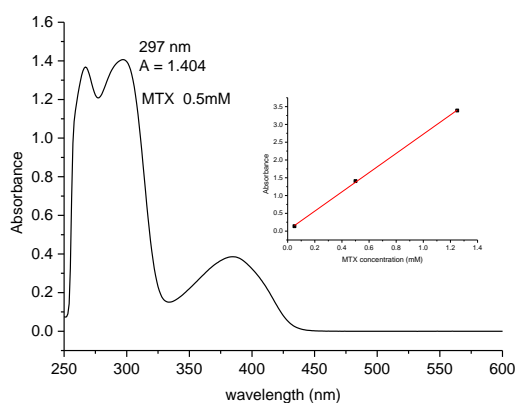


Figura 2 Spectrul de absorbtie al MTX in DMF,

Realizarea structurii complexe continand fotosensibilizatorul (VP), medicamentul (MTX) si linker-ul (AF) legate covalent la vehicolul purtator CNT este dovedita prin studiul spectroscopic al structurii sintetizate. Astfel in Figura 3 sunt prezentate spectrele de absorbtie ale structurilor sintetizate, compusul intermediar SWCNT-AF-MTX si respectiv cel final FP-SWCNT-AF-MTX. Pentru comparatie sunt date in aceeasi figura spectrele componentilor structurii. Concentratia probei masurate a fost 0.2 mg compus (F)VLM la 1 ml solvent DMF (drum optic 10 mm).

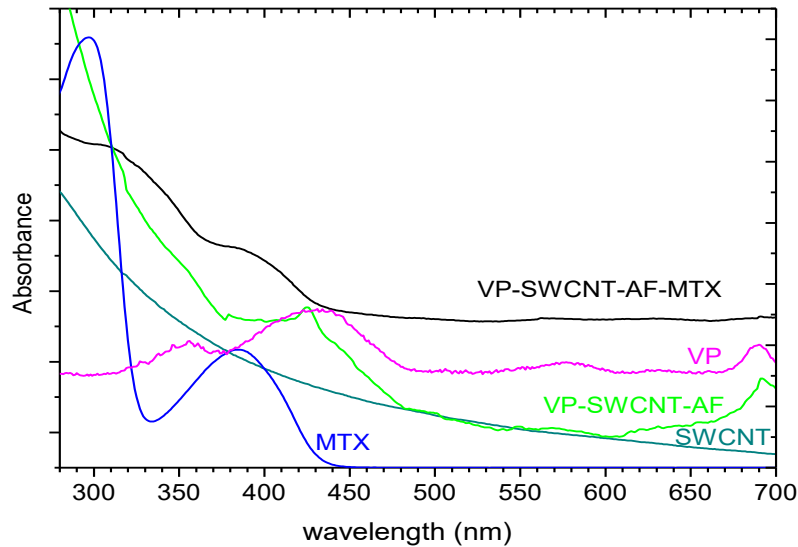


Figura 3. Spectrele de absorbtie ale compusilor sintetizati si ale componentelor acestora

Analiza curbei de absorbtie a compusilor sintetizati permite identificarea componentelor. Astfel caracterul ascendent al absorbantei catre lungimile de unda mici este o marca a prezentei SWCNT. La lungimile de unda de 300 nm si 386 nm sunt identificabile benzile de absorbtie specifice ale MTX. Analiza detaliata a absorbtiei compusilor in domeniul lungimilor de unda 689 nm – 699 nm arata existenta benzii specifice de absorbtie a VP cu maximumul la 690 nm.

2. Spectroscopie de fluorescenta

Utilizand spectroscopia de fluorescenta indusa laser (LIF) a fost masurata fluorescenta probelor continand produsul sintetizat. In Figura 4 este prezentat spectrul de fluorescenta al produsului sintetizat impreuna cu spectrul de fluorescenta al VP ($c = 10^{-7}M$) (singurul fluorofor component al produsului sintetizat care este excitat la lungimea de unda de 532 nm). Este evidenta prezenta pentru compusul sintetizat a benzii specifice de fluorescenta a VP cu maximumul la 700 nm. Acesta pune in evidenta prezenta in compusul complexat a VP.

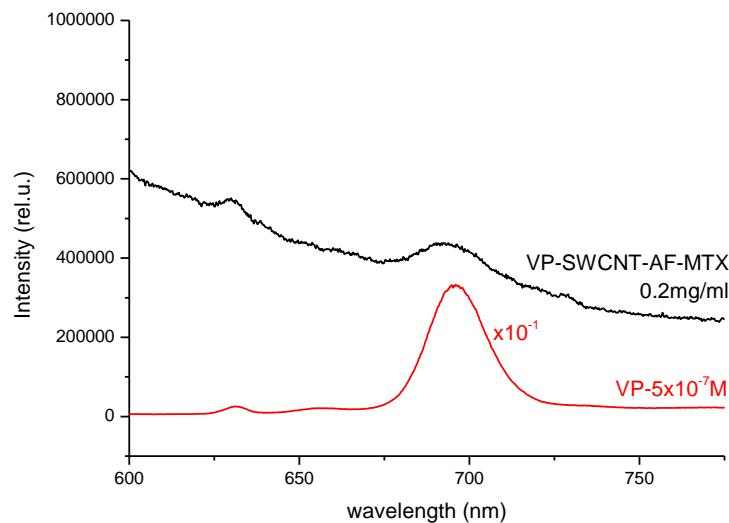


Figura 4. Spectrul LIF al complexului excitat cu lungimea de unda de 532 nm

3. Studiul proprietatilor microfluidice - tensiune superficiala

Avand in vedere potentialele utilizari ale tipului de produs sintetizat, de a elibera in mod controlat un compus medicamentos, este important de a cunoaste proprietatile fluidice ale acestuia. In acest context a fost studiata tensiunea superficiala a unor solutii ale AF in DMF, pana la concentratia maxima de $5 \times 10^{-2} \text{M}$ si evolutia in timp a acesteia pana la 1000 secunde (Figura 5).

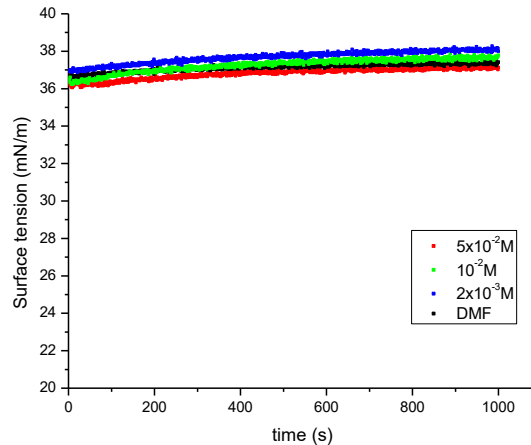


Figura 5. Tensiunea superficiala a compusului AF in DMF

Din analiza datelor experimentale reiese ca pentru concentratii de AF in DMF in domeniul 2×10^{-3} - $5 \times 10^{-2} \text{M}$ se produce o variatie a tensiunii superficiale fata de cea a solventului de +/- 1.3 % (0.5 mN/m) care este in limita erorilor de masura ale aparatului. Aceasta arata ca AF nu implica modificari ale tensiunii superficiale si nu polimerizeaza.

A fost studiat de asemenea efectul produs asupra tensiunii superficiale (in DMF) de legarea diferitelor componente la CNT si variatia acesteia pe durata a 1000 secunde.

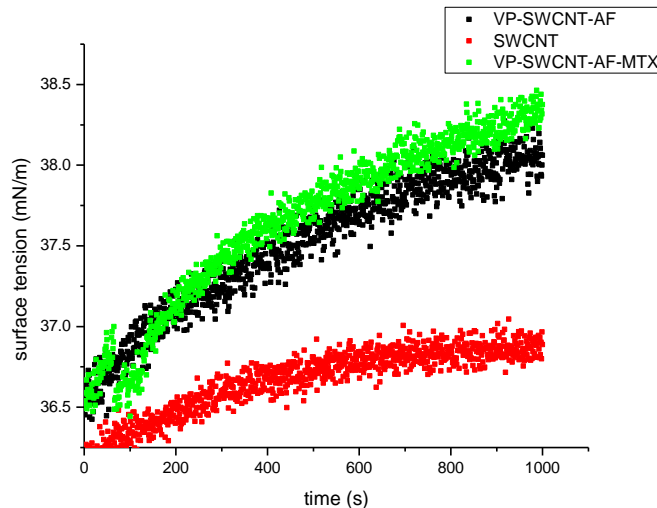


Figura 6. Tensiunea superficiala a compusilor sintetizati comparativ cu cea a SWCNT in DMF

Rezultatul masuratorilor este prezentat sintetic in Figura 6, unde este prezentata evolutia tensiunii superficiale masurate (in DMF) pentru suspensii de CNT amino functionalizate, de CNT la care sunt legate VP si AF si de CNT la care sunt legate VP, AF si MTX. Se poate observa ca legarea compusilor VP si AF produce o crestere a tensiunii superficiale, ceea ce indica faptul ca nanotuburile de carbon au fost functionalizate. Tensiunea superficiala

a suspensiei produsului complet, incluzand si MTX are de asemenea o crestere comparativ cu produsul intermediar. Asa cum s-a prezentat in raportul precedent al proiectului mixarea unor compusi in DMF produce o scadere a tensiunii superficiale raportat la solutia cu CNT, pe cand compusii functionalizati covalent au tensiune superficiala mai mare.

4. Generarea oxigenului singlet ($^1\text{O}_2$)

Experimentele privind masurarea oxigenului singlet foto-generat au fost realizate utilizand sistemul experimental pentru masurarea fosforescentei rezolvate in timp la lungimea de unda 1270 nm, prezentat in detaliu in rapoartele anterioare. Foto-generarea oxigenului singlet a fost facuta prin excitarea fotosensibilizatorului cu radiatia laserului Nd:YAG dublat in frecventa (532 nm).

Intrucat procesul de eliberare controlata a medicamentului se poate produce prin intermediul clivarii unei duble legaturi C=C a moleculei de legatura continuta in structura FVLM de catre oxigenul singlet, este important studiul generarii acestei specii tranziente si interactia sa atat cu molecula de legatura cat si cu celelalte molecule ale structurii FVLM. Datele obtinute in urma acestei serii de experimente au contribuit la stabilirea componentei structurii supra-moleculare tinta si apoi de elaborare a metodicii de sinteza chimica a acesteia.

4a. Rata de stingere a oxigenului singlet de catre AF

Pentru a determina rata de stingere (interactie) a oxigenului singlet cu acidul fumaric, au fost inregistrate semnalele de fosforescenta tranzienta ale oxigenului singlet pentru probe cu o concentratie constanta de fotosensibilizator si concentratie variabila de AF. S-au realizat 2 serii de masuratori: pentru fotosensibilizator VP si solvent DMF si pentru fotosensibilizator albatru de metil (MB) si solvent apa. In Figura 7 este prezentat Stern-Volmer plot pentru inversul timpului de viata al oxigenul singlet functie de concentratia AF in cazul folosirii VP ca sensibilizator (conc. $5 \times 10^{-6} \text{M}$).

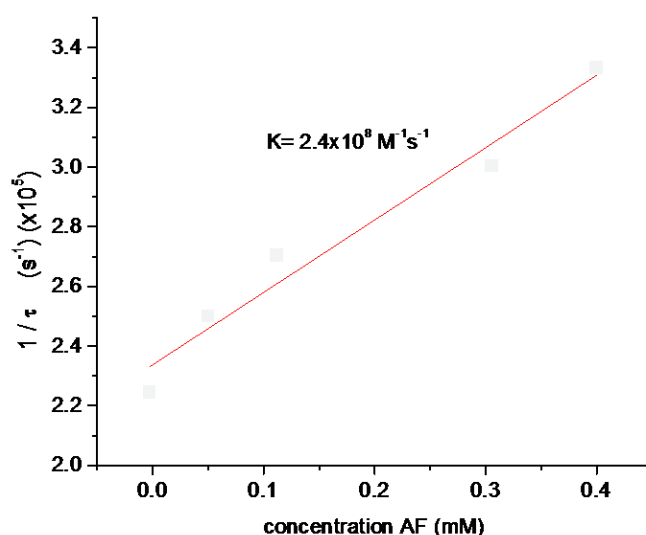


Figura 7 Stern Volmer plot pentru AF in DMF

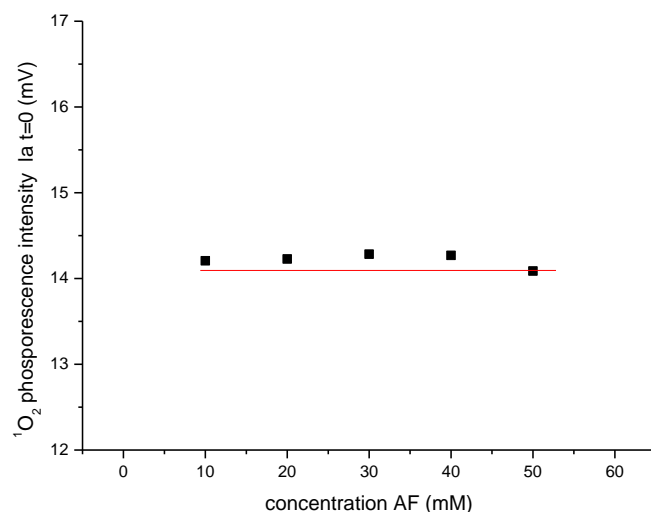


Figura 8 Stingere oxigen singlet de catre AF in DMF

Cantitatea de oxigen singlet generata la momentul initial de fotosensibilizator nu depinde de concentratia stingatorului acid fumaric (Figura 8).

In Figura 9 este prezentat timpul de viata al oxigenului singlet generat de MB, $c = 2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ in solutii apoase la cresterea concentratiei de AF. Se observa o variatie foarte rapida a timpului de viata al oxigenului singlet pe un domeniu ingust de variatie a concentratiei acidului fumaric (0 – 0.5 mM). Pentru acest domeniu se poate determina din Stern Volmer plot o rata de interactie intre oxigenul singlet si acidul fumaric de $2.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. La concentratii mai mari de 1mM ale AF se observa o saturare a efectului stingator al AF asupra $^1\text{O}_2$.

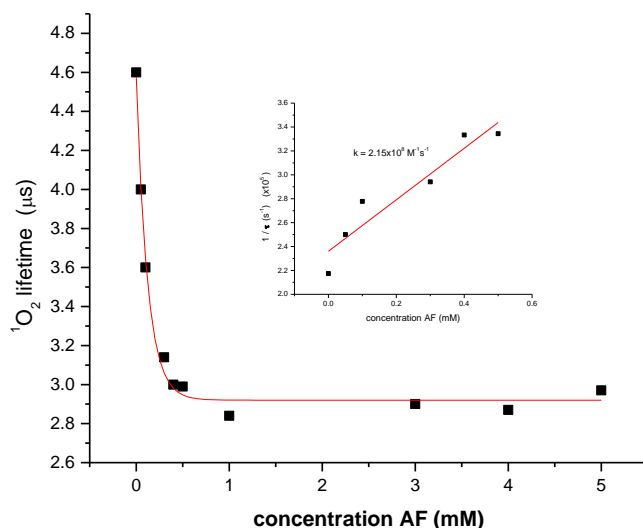


Figura 9 Timpul de viata al oxigenului singlet functie de concentratie AF (fotosensibilizator MB, solvent apa) Inset: Stern-Volmer plot $1/\tau$ versus concentration

Este de mentionat ca efectul de saturare evidentiat de datele reprezentate in Figura 9 nu este datorat dimerizarii acidului fumaric, absorbanta acestuia depinzand liniar de concentratie cel putin pana la concentratii de 4mM.

4.b. Oxigen singlet generat de VP si stins de MTX in solvent DMF.

Datele experimentale arata ca timpul de viata al oxigenului singlet (solvent DMF) produs de catre fotosensibilizatorul Verteporfin scade odata cu cresterea concentratiei de MTX de la 23 μs la 11 μs cand concentratia de MTX ajunge la 5mM, ceea ce indica interactia (stingerea) moleculelor excitate de $^1\text{O}_2$ de catre moleculele compusului antitumoral. In Figura 10 este prezentat plot-ul Stern-Volmer $1/\tau$ pentru variatii ale concentratiei MTX in domeniul 0-5 mM. Din panta dreptei este determinata o constanta de stingere a oxigenului singlet de $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

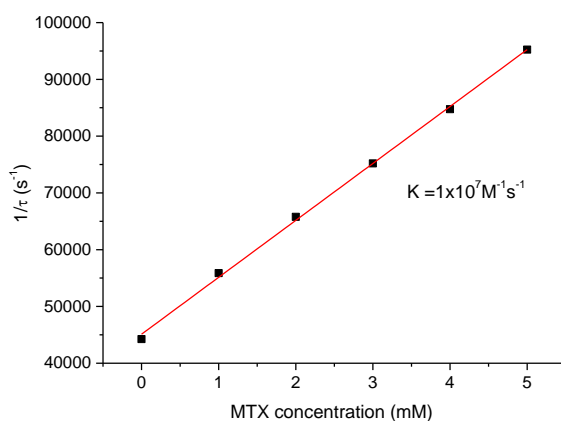


Figura 10 Stern Volmer plot pentru stingerea oxigenului singlet de catre MTX

Pe de alta parte, experimentele arata in acelasi timp (Figura 11) ca intensitatea fosforescentei oxigenului singlet nu variaza la cresterea concentratia compusului stingator (MTX) ceea ce indica faptul ca transferul de energie VP – $^1\text{O}_2$ este un proces pur bi-molecular.

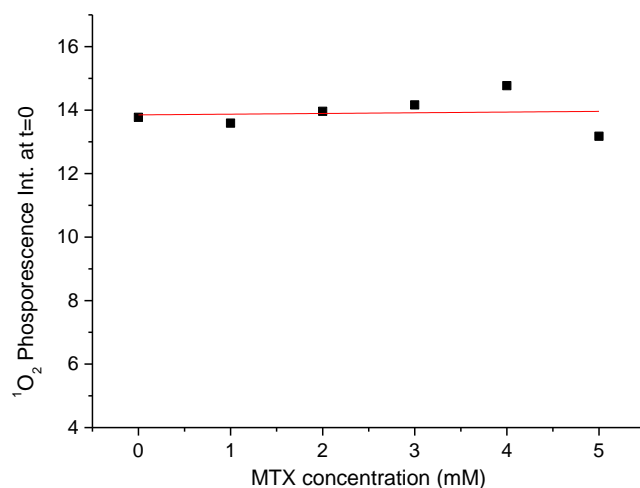


Figura 11 Intensitatea fosforescentei oxigenului singlet functie de concentratia MTX

4.c. Oxigen singlet generat de compusii sintetizati

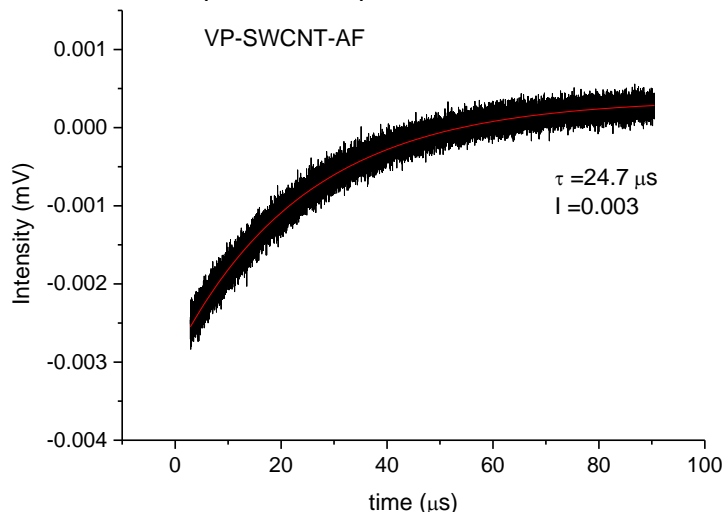
Pentru realizarea studiilor de generare a oxigenului singlet de catre structurile sintetizate s-a facut utilizand sistemul experimental de masurare rezolvata in timp a radiatiei optice la 1270 nm, descris in Raportul pentru anul 2014 la proiect.

Rolul de generare a speciei active (tranziente) oxigen singlet le revine, in structura complexa sintetizata, moleculelor de VP legate covalent de nanotuburile de carbon. Studiul generarii de oxigen singlet de catre structura VP legat de nanotuburile de carbon SWCNT(NH₂) a fost prezentat in Raportul pentru anul 2014 al proiectului, fiind masurata o rata de stingere a oxigenului singlet generat de VP de catre nanotuburile de carbon $k = 4.27 \times 10^4 \text{ Lg}^{-1}\text{s}^{-1}$. Valorile obtinute pentru randamentele quantice de generare a oxigenului singlet pentru compusii studiati au fost $\Phi_m = 0.23$ pentru compusul SWCNT-VP mixed, $\Phi_l = 0.51$ pentru compusul SWCNT-VP linked, $\Phi_{VP} = 0.85$ pentru VP in DMF.

Studiul speciilor active generate a continuat prin masurarea oxigenului singlet generat de catre structurile sintetizate. Astfel au fost realizate masuratori comparative ale semnalelor de fosforescenta generate de dezexcitarea moleculelor de oxigen excitate (singlet) produse de fotosensibilizatorul VP legat in structuri in cazurile in care:

- (a) in structura compusului intra (in afara vectorului CNT si a fotosensibilizatorului VP), linker-ul AF (structura VP-CNT-AF)
- (b) in structura compusului intra (in afara vectorului CNT si a fotosensibilizatorului VP), linker-ul AF si medicamentul MTX legat de acesta (structura VP-CNT-AF-MTX)

In Figura 12 sunt prezentate semnalele de fosforescenta masurate in cele doua cazuri. Calculele arata ca in cazul structurii mai simple VP-CNT-AF timpul de viata al oxigenului singlet (solvent DMF, concentratie suspensie 0.2 mg/ml) este de 24.7 μs , pe cand pentru structura completa VP-CNT-AF-MTX timpul de viata al oxigenului singlet (acelasi solvent si aceeasi concentratie a suspensiei) este 21.8 μs , ceea ce indica faptul ca prin adaogarea compusului MTX se produce o stingere suplimentara a speciei active. Masuratorile arata de asemenea un raport de 0.07 a intensitatii maxime de fosforescenta a oxigenului singlet (la momentul pulsului laser) pentru cele doua tipuri de compusi.



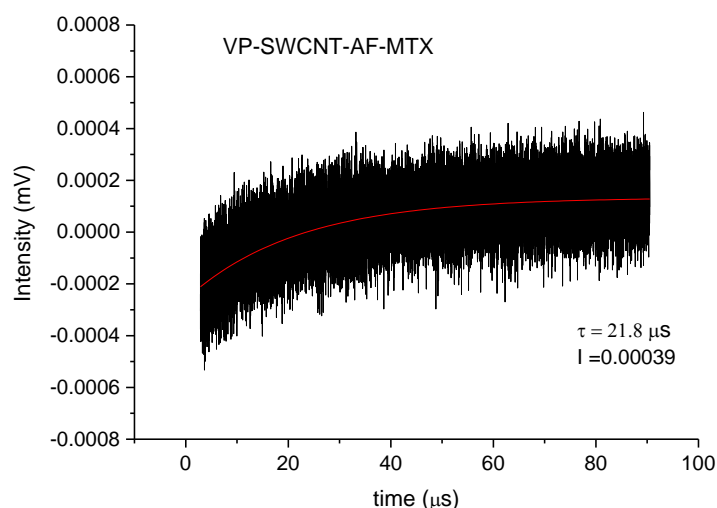


Figura 12. Semnalele tranziente ale fosforescenței oxigenului singlet generat de compusii sintetizati (intermediar, final) (concentratie 0.2 mg/ml in DMF)

5. Spectroscopie Raman

Au fost realizate masuratori de spectroscopie Raman pentru identificarea legaturilor vibrationale corespunzatoare grupurilor functionale din compusii sintetizati si componentele acestora. Spectrele Raman au fost inregistrate utilizand un microscop Raman dispersiv model NRS-7200 (JASCO Inc -United States). Laserul de excitatie utilizat a fost cel cu HeNe cu emisie cw la 633 nm. Pentru obtinerea unui semnal Raman amplificat probele analizate au fost depozitate pe placute SERS din Ag.

In Figura 13, este prezentat spectrul Raman inregistrat pe domeniul 700- 1800 cm^{-1} pentru componentele compusului intermediar VP- SWCNT-AF (I) si pentru produsul sintetizat. In compusul intermediar dispar benzi caracteristice pentru SWCNT-NH₂ (marcate cu sageti albastre) dupa cum urmeaza: 1642 cm^{-1} – deformare in plan de tip forfecare ale gruparii amine primare NH₂, 1271 cm^{-1} - vibratie CN in amina primara, 752 cm^{-1} - amina - N-H vibratie de incovoiere in afara planului. Aceste modificari indica functionalizarea legaturii NH₂ si disparitia gruparii amino prin cuplarea cu gruparea COOH.

In compusul intermediar sintetizat apar benzi noi caracteristice VP - marcate cu sageti rosii la 1355 cm^{-1} si 1540 cm^{-1} si de asemenea apar benzi caracteristice gruparii amide care pun in evidenta carboxilarea si reactia intre gruparea amina si carboxil: 1533 cm^{-1} - amida secundara, vibratie de intindere pentru legatura C-N-C la 1475 cm^{-1} si CO la 1070 cm^{-1} .

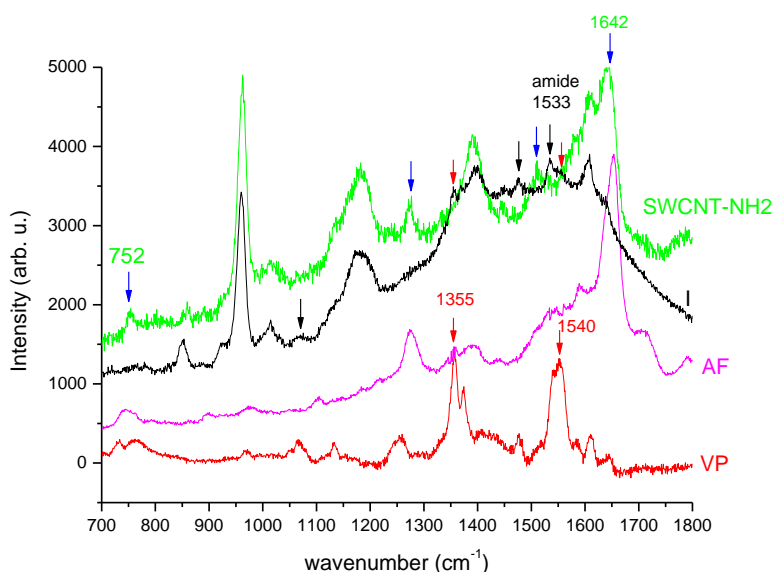


Figura 13 Spectrul SERS pentru compusul intermediar I si componentele acestuia

In Figura 14 sunt prezentate spectrele Raman pentru compusul intermediar I, pentru medicamentul MTX si complexul final I-MTX. Astfel pentru compusul final apar benzi specifice gruparii amide: 1637 cm^{-1} (amide I) si 1534 cm^{-1} (amide II) si benzii caracteristice MTX la 1602 , 1520 , 1197 , 692 cm^{-1} . De asemenea se poate observa disparitia pentru compusul final a benzii de la 1271 cm^{-1} care este caracteristica vibratiei gruparii CN din amine. Acestea pun in evidenta functionalizarea covalenta a compusului intermediar cu MTX.

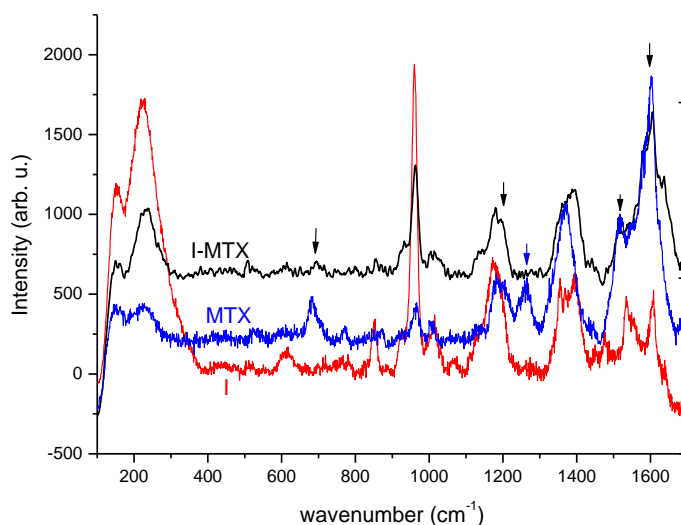


Figura 15 Spectrul SERS pentru compusul final (I-MTX) si componentele acestuia

Concluzii

In etapa 2015 a proiectului au fost sintetizati si studiat, din punctul de vedere al proprietatilor fotofizice compusi de tip FVLM. Astfel, studiul fotofizic prin spectroscopie de absorbtie, spectroscopie de fluorescenta indusa laser si spectroscopie Raman au pus in evidenta functionalizarea nanotuburilor cu componentele complexului tinta. Au fost de asemenea studiate proprietati micro-fluidice ale produsului sintetizat, ca si functia de generare a speciilor active, care a confirmat, prin rezultatele obtinute, realizarea structurii tinta.