CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DE DERIVADOS XANTENOS VISANDO USO COMO FOTOSSENSIBILIZADORES

Hualace Vinicius Emiliano (PIBIC/Fundação Araucária/UEPG), Anderson Gomes (coorientador - PG), Luciane Cristina Schlüter Ferreira (PG), Jaqueline Aparecida Marques (PQ) e Christiane Phillipini Ferreira Borges (Orientadora-PQ)
cpfborges@uol.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Química/Físico-Química

Palavras-chave: Rosa de Bengala, Eosina, Terapia Fotodinâmica, Micelas.

Resumo

As características espectroscópicas dos xantenos os tornam espécies com um grande potencial para serem utilizados como fotossensibilizadores (FS) na Terapia Fotodinâmica (TFD) e na Inativação Fotodinâmica de Microorganismos (PDIMO). O presente trabalho buscou analisar as características espectroscópicas apresentadas pelos derivados de Rosa de Bengala (RBB) e Eosina Y (EOS) em diferentes meios, utilizando-se absorção molecular no UV-Vis e fluorescência molecular. Também foram realizadas avaliações do pKa dos derivados ésteres, em meio aquoso e micelar, além de avaliar os efeitos causados pelos substituintes na propriedade dos compostos. Ao mudar os solventes observaram-se alterações na ordem de grandeza, enquanto testes de pKa não apresentaram proteção do surfactante. Os valores de Kp demonstraram hidrofobicidade apenas para a EOS Y, enquanto os demais anfifílicos. A partir dos dados obtidos podemos afirmar que o caráter anfifílico dos compostos podem contribuir para um potencial uso como medicamentos em TFD.

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento que se baseia na administração tópica ou sistêmica de um composto fotossensibilizador (FS), não tóxico, seguida da irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado. O FS ativo, na presença de oxigênio encontrado nas células reage com moléculas por transferência de elétrons ou hidrogênio ou energia, levando à produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) que provocam a morte celular.[1] A crescente resistência de bactérias patogênicas a antibióticos levou ao desenvolvimento de novas alternativas que possam substituí-los. Uma das alternativas investigadas atualmente é a inativação fotodinâmica (IFD). Várias associações entre fotossensibilizadores (FS) e fontes de luz são utilizadas para inativar diferentes micro-organismos, comprovando a eficiência dessa terapia.[2]

O alto custo da Terapia Fotodinâmica em aplicações clínicas é um dos fatores que diminuem as perspectivas do uso da TFD devendo não apenas ao custo dos equipamentos nos procedimentos de irradiação, mas também dos FS empregados[1].

Materiais e Métodos

Foram investigadas as propriedades espectroscópicas da Rosa de Bengala comercial (RBB), Eosina Y comercial (EOS), Rosa de Bengala Hexíl Ester (HexRBB), Rosa de Bengala 2 Metil Ester (2MeRBB), Eosina Hexíl Éster (HexEOS), sendo trabalhadas faixas de concentração de 1,20x10^{-6} mol.L^{-1} a 2,25x10^{-6} mol.L^{-1} em espectrofotômetro Cary 100 da Varian. Todos os experimentos foram conduzidos sob a temperatura de 21,0°C ± 2,0 °C em soluções aquosas ou etanol. Os derivados xantênicos RBB e EOS Y foram preparados em água, etanol e Tween 80, sendo os derivados HEXRBB e HEXEOS, preparadas em soluções de Tween 80 e octanol.

A absortividade molar (ε) foi determinada para todos os compostos com cinco concentrações diferentes na faixa de 1 a 20 μmol.L^{-1} em água e etanol e Tween 80, para os compostos RBB, e EOS-Y, já para derivados HEXRBB e HEXEOS os solventes utilizados foram Tween 80 e octanol. Para avaliação da estabilidade dos compostos com a variação do pH em meio aquoso e Tween 80 em concentrações fixas, e diferentes pHs, variando de 0,0 a 14.

Para determinar o coeficiente de partição (Kp), uma mistura contendo 50% de água e octanol (v/v), sendo posteriormente adicionado a espécie xantênica em análise (7,72x10^{-5} mol.L^{-1}), a solução foi levada para o shake-flash por 10 minutos, em seguida para o vortex por 2 minutos, posteriormente foi centrifugado por 15 minutos em 2000 rpm, foi determinado a sua concentração tanto em água quanto em octanol. Utilizando o espectro de absorção no UV-Vis, e com a formula (1), foi possível determinar o valor de Kp para os compostos.

$$kp = \frac{[PS]oct}{[PS]water} \qquad (1)$$

Onde [*PS*]*oct* e [*PS*]*água* são as concentrações de corante em octanol/água, respectivamente.

Resultados e Discussão

Determinação de absortividade molar dos derivados xantênicos em meio aquoso e micelar

Foram realizadas caracterizações espectroscópicas da RBB e EOS Y nos meios aquoso e etanol, enquanto para a RBB2MET realizou-se a determinação da absortividade molar em etanol, para a RBBHEX e a EOSHEX em octanol, a Figura 1 apresenta o espectro de absorção no UV-Vis para EOS Y em água.

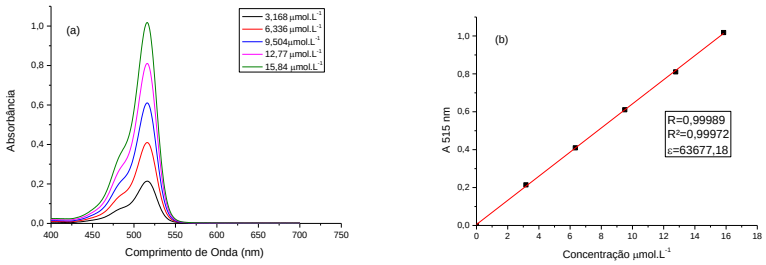


Figura 1 - (a) Espectros de absorção UV - Vis da EOS Y em água em diversas concentrações. (b) Gráfico de absorbância em 515 nm versus a concentração.

A partir dos dados obtidos foi elaborada a Tabela 1 com os valores obtidos de comprimento de onda máximo da banda de absorção e absortividade molar (ε) dos compostos estudados. Os valores determinados são próximos aos resultados descritos na literatura. Observou-se que os valores de ε são maiores em octanol, e que desvio padrão obtido foi baixo para todas as espécies em estudo.

Tabela 1 - Valores de absortividade molar e comprimento de onda máximo, com o seu respectivo desvio padrão, para as espécies comerciais e seus derivados em diferentes meios.

Derivados Xantenos (meio)	**λ_{max} (nm)**	**$\varepsilon/10^4$ L.com^{-1}. mol^{-1}**
EOS (água)	516	6,37 ± 0,11
EOSHEX (etanol)	540	9,27 ± 0,05
EOSHEX (octanol)	541	15,0 ± 0,10
RBB2MET (etanol)	567	8,29 ± 0,12
RBBHEX (etanol)	567	6,71 ± 0,12
RBBHEX (octanol)	573	10,12 ± 0,10
RBB (água)	548	5,66 ± 0,01

Determinação do pKa dos derivados xantenos

Investigou-se espectroscopicamente a variação do pH das espécies EOS Y e RBB em meio aquoso e Tween 80 em meio ácido, sendo possível verificar que houve um decréscimo na absorção quando ocorreu a diminuição do pH, devido a protonação dos grupos fenólicos, comportamento esse observado também em meio micelar.

Para o pKa do derivado rosa de bengala hexil éster RBBHEX**,** obteve-se pKa de 3,15 o qual pode ser devido a protonação do oxigênio do grupo carbonílico devida a ausência do substituinte carboxílico. A espécie EOSHEX compostos exibiram um pKa de 2,65 comprovando que o pKa obtido é referente a desprotonação do grupo fenólico, entretanto também pode-se observar uma grande sobreposição de bandas de absorção nos indicando a formação de outras formas (Tabela 2). A acidez dos grupos fenólicos e dos grupos carboxílicos podem ser correlacionadas a presença de substituintes nos corantes, considerando a mais representativa estrutura tautomérica.

Tabela 2 - Valores de pKa dos corantes xantênicos em soluções aquosas calculadas a 20°C.

Derivados Xantenos em diferentes meios	**pKa**
EOS (água)	3,00
EOS (Tween80)	3,24
EOSHEX (Tween80)	2,65
RBB (água)	3,77
RBB (Tween80)	3,67
RBBHEX (Tween80)	3,15

A sequência do efeito causado pela retirada dos substituintes: Br (EOS e EOSMET) < I (RBB e RBBHEX), o qual segue uma sequência da diminuição do pKa. Apresentando pKa típico de ácido benzoico em torno de 4,2 nos corantes xantenos, a substituição do H orto para o grupo carboxílico leva a alta acidez –COOH devido

ao efeito da retida de elétrons. Entretanto, os benzenos e anéis xantênicos devem ser aproximadamente ortogonais nesses derivados. Essa geometria faz o centro carboxílico menos sensível ao substituinte na estrutura do xanteno[4].

Podemos verificar que não houve uma proteção eficaz do surfactante, pois não houve uma diferença considerável para as espécies comparado o pKa em água.

Coeficiente de partição (Kp) nas fases octanol/água

Os valores obtidos de Log Kp estão listados na Tabela 3. Observou-se um decréscimo nos valores Log Kp (RBBHEX>EOSHEX>RBB>EOS) o que é seguido do aumento no volume dos substituintes adicionados à estrutura. Como apresentado na literatura.[3] Log Kp < 0 exibem características hidrofílicas EOS, enquanto as demais espécies RBB, EOSHEX e RBBHEX apresentaram um comportamento anfifílico Log Kp entre 0 e 1,5 aproximando de Log Kp > 1,5 características lipofílicas.

Tabela 3 - Coeficiente de Partição em água/octanol (1:1, v/v) a 30,0°C.

Corantes	EOS Y	RBB	EOSHEX	RBBHEX
Log Kp	-0,11	0,28	0,37	0,89

Conclusões

Os compostos estudados apresentam características foto-físicas que justificam a continuidade dos estudos visando uso dos mesmos como FS em TFD.

Agradecimentos

Agradecemos a Fundação Araucária, Capes, C-LABMU, SETI/Fundo Paraná.

Referências

1. BLANCO, K. C; INADA, N. M; SALVIO, A. G; VOLLET-FILHO J. D; BAGNATO, V. S. Clinical Photodynamic Therapy Review and the Brazilian Experience. **Journal of Tumor**, v. 4, p. 386-392, 2016.

2. PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n.4, p- 989- 992, 2007.

3.PELLOSI, D. S.; ESTEVÃO, B. M.; SEMENSATO, D.; BAPTISTA, M. S.; POLITI, M. J.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Photophysical properties and interactions of xanthene dyes in aqueous micelles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 247, p. 8-15, 2012.

4. BATISTELLA, V. R.; PELLOSI, D. S.; SOUZA, F. D.; COSTA, W. F.; SANTIN, M. O.; SOUZA, R. S.; CAETANO, W. pKa determinations of xanthene derivates in aqueous by multivariate. **Elsevier**, v. 79, p. 891-896, 2011.