

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FFCLRP – DEPARTAMENTO DE FÍSICA E MATEMÁTICA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FÍSICA APLICADA À MEDICINA E BIOLOGIA

**"Estudos da dinâmica de fototransformação do agente antibacteriano  
Nitrofurantoína e da formação das espécies ativas durante sua  
fototransformação"**

GUSTAVO GIMENEZ PARRA

Ribeirão Preto – SP  
2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUSTAVO GIMENEZ PARRA

**“Estudos da dinâmica de fototransformação do agente antibacteriano Nitrofurantoína e da formação das espécies ativas durante sua fototransformação”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientação: Prof. Dr. Iouri Borissevitch

Ribeirão Preto – SP

2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Parra, Gustavo Gimenez

Estudos da dinâmica de fototransformação do agente antibacteriano Nitrofurantoína e da formação das espécies ativas durante sua fototransformação. Ribeirão Preto, 2010.

93 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Orientador: Borissevitch, Iouri.

1. Nitrofurantoína. 2. Fotoquimioterapia. 3. Dinâmica de fototransformação. 4. Estado tripleto. 5. Espécies reativas.

Nome: PARRA, Gustavo Gimenez

Título: Estudos da dinâmica de fototransformação do agente antibacteriano Nitrofurantoína e da formação das espécies ativas durante sua fototransformação

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: Física Aplicada à Medicina e Biologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais Hélio e Cláudia; irmã Marina pelo amor, carinho, compreensão e apoio nas escolhas certas e principalmente nas equivocadas.*

*A minha namorada Carla por acreditar na minha capacidade quando nem mesmo eu acreditava.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iouri Borissevitch pela orientação, paciência e motivação para realizar esse trabalho. Aos ensinamentos que ele me proporcionou não apenas sobre Ciência mas também sobre cultura em geral.

Ao Prof. Dr. Gustavo Ballejo Olivera do Departamento de Farmacologia – FMRP-USP pelos experimentos sobre fotoliberação de NO realizados em seu laboratório.

A Profa. Dra. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro do Departamento de Físico-Química – IQSC-USP pelos experimentos sobre o estado tripleto realizados em seu laboratório.

A minha família, Hélio, Cláudia, Marina, Carla, sempre presentes em minha vida. Ao meu avô, Juan Donato, que dizia que a melhor herança que se podia deixar para um filho é um DIPLOMA.

Aos amigos de Ribeirão Jorge, Harumi, Letícia, Kléber (Ovo), Felipe (Perdido), João (Curió) e muitos outros que provavelmente esquecerei-me de agradecer nesse momento. Obrigado a todos pelo apoio nos momentos difíceis e pelas situações engraçadas que passamos juntos.

Aos amigos de Mogi Mirim Aleksandro (Zóio), Jackson (Bozzo), Aloízio e Ana Livia. Pessoas que estudei desde 1996 e são meus amigos até hoje. Valeu pessoal, chegamos lá!

Aos amigos do Laboratório de Fotobiofísica – DFM-FFCLRP-USP, Sérgio, Ana, Marina Berardi, Danilo, Luciana, Leonardo Matias, Dru, Wagner, Cássia e Pablo. Esses últimos professores no IF-UFG desde 2009.

Ao DFM-FFCLRP-USP e a CAPES pela infra-estrutura e apoio financeiro fornecidos ao longo de todo o trabalho.

A primeira lei da natureza é a tolerância – já que temos todos uma porção de erros e fraquezas.

Devemos julgar um homem mais pelas suas perguntas que pelas respostas.

**François-Marie Arouet (Voltaire)**



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente. Adaptado de [14].	21
<b>Figura 2.2</b> Esquema representativo das etapas envolvidas no tratamento de doenças utilizando a técnica da TFD. Adaptado de [23].	26
<b>Figura 2.3</b> 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 (ci); (ii) promover uma reação do Tipo I; ou (iii) transicionar por cruzamento intersistemas (cis) 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).	27
<b>Figura 2.4</b> Fórmula estrutural dos derivados de nitrofurano. A letra R é um radical com a presença de pelo menos um átomo de nitrogênio em sua cadeia.	34
<b>Figura 4.1</b> Estrutura química da Nitrofurantoína.	38
<b>Figura 5.1</b> Esquema experimental para detecção do radical livre $\text{NO}(\text{g})\bullet$ pelo método de quimiluminescência do estado excitado do $\text{NO}_2$ .	42
<b>Figura 5.2</b> Esquema principal de um sistema típico de <i>flash</i> -fotólise com análise dos produtos por absorção óptica. (1) Fonte da luz de análise (lâmpada ou laser); (2) e (4) Sistemas ópticos; (3) Amostra; (5) Monocromador; (6) Fotomultiplicadora; (7) Fonte de alta tensão; (8) Registrador (osciloscópio digital); (9) Analisador (computador PC); (10) Fonte de corrente elétrica; (11) Fonte de pulsos de luz de excitação (lâmpada ou laser); (12) Fonte da potência para pulsos de excitação.	44
<b>Figura 5.3</b> Determinação da absorção diferencial.	46
<b>Figura 6.1</b> Espectro de transmissão do filtro Kopp Standard Filters – Kopp Blue 5030 (CS 5-57).	48
<b>Figura 7.1</b> Estrutura química da NFT com indicação dos estados de protonação: $\text{pK}_1 = 3,5$ e $\text{pK}_2 = 7,8$ [43]. A existência de um terceiro ponto de $\text{pK}_a$ no nitrogênio de posição 13 não foi confirmada experimentalmente.	54
<b>Figura 7.2</b> Esquema inicial proposto da fotoliberação do $\text{NO}^\bullet$ pela fototransformação da NFT.	80

- Figura 7.3** Estrutura química do produto primário (a) nitrofuraldeído e seu respectivo fotoproducto (b) 5-idroximetileno-2(5H)-furanona. Adaptado de [56]..... 87
- Figura 7.4** Acúmulo e queda de NFA a partir da fotólise do derivado de nitrofurano furaltadona em água deionizada. Adaptado de [56]..... 87
- Figura 7.5** Esquema final proposto da fotoliberação do  $\text{NO}^{\bullet}$  pela fototransformação da NFT.  
..... 88

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 6.1** Espectro de irradiação do sistema contendo lâmpada de xenônio RLO XBO 75W / 2 - OSRAM sem e com o filtro Kopp Blue 5030 (CS 5-57). ..... 48
- Gráfico 6.2** Pulsos de quimiluminescência do **NO<sub>2</sub>** \* formado pela redução do **NO<sub>2</sub>(aq)** – em **NO(g)**• em água Milli-Q segundo a seqüência de reações 6.2.1 e 6.2.2. .... 49
- Gráfico 6.3** Dependência linear ( $R^2 = 0,9999$ ) de área dos pulsos em função da quantidade de nitrito injetado com constante de proporcionalidade igual a  $B = (8,32 \pm 0,04) \times 10^{12} \text{ mV.s.mol}^{-1}$ . ..... 50
- Gráfico 7.1** a1) Espectros de absorção da NFT ( $[NFT] = 65,0 \mu\text{M}$ ) em tampão fosfato ( $[PBS] = 20,0 \text{ mM}$ ) em função do pH; a2) Perfil da intensidade de absorção da NFT em função do pH; (■)  $\lambda = 275 \text{ nm}$ . ..... 53
- Gráfico 7.2** Espectro de absorção da NFT nos pHs 2,5 (estado mono protonado) e 10,0 (estado não protonado). Máximos de absorção em:  $\lambda = 366 \text{ nm}$  para o pH 2,5 (—) e  $\lambda = 386 \text{ nm}$  para o pH 10,0 (—). ..... 55
- Gráfico 7.3** Espectro de absorção da NFT em função de sua concentração (a1) para o pH 2,5 com  $[NFT] = 65,0 \mu\text{M}$  e  $[PBS] = 20,0 \text{ mM}$ ; Ajuste linear da absorbância em função da concentração (a2) para 3 diferentes amostras de NFT em  $\lambda = 366 \text{ nm}$ . ..... 56
- Gráfico 7.4** Espectro de absorção da NFT em função de sua concentração (b1) para o pH 10,0 com  $[NFT] = 65,0 \mu\text{M}$  e  $[PBS] = 20,0 \text{ mM}$ ; Ajuste linear da absorbância em função da concentração (b2) para 3 diferentes amostras de NFT em  $\lambda = 386 \text{ nm}$ . ..... 57
- Gráfico 7.5** Espectro normalizado de absorção em função da concentração da NFT. Ausência de agregação da NFT nessas faixas de concentrações no pH 2,5. .... 58
- Gráfico 7.6** Espectro normalizado de absorção em função da concentração da NFT. Ausência da agregação da NFT nessas faixas de concentrações no pH 10,0. .... 59
- Gráfico 7.7** Comparação entre a convolução (—) do espectro normalizado de absorção da NFT e seu respectivo espectro experimental (—) no pH 7,3 (próximo  $pK_2$ ). ..... 60
- Gráfico 7.8** Formação dos pontos isobésticos em  $i = 286 \text{ nm}$  e  $ii = 326 \text{ nm}$  após fototransformação da NFT no pH 2,5 (a1) com conseqüente destruição (a2) dos pontos isobésticos após  $t = 360 \text{ s}$ . ..... 62

- Gráfico 7.9** Cinéticas normalizadas de decaimento da absorção das amostras da NFT em função do tempo da irradiação para os pHs 2,5, 4,0 e 5,5 (a1) e pHs 5,5, 6,7 e 10,0 (a2). Absorbância em  $\lambda = 366$  nm para  $\text{pH} \leq 6,7$  e em  $\lambda = 386$  nm para  $\text{pH} = 10,0$ . ..... 63
- Gráfico 7.10** Cinéticas normalizadas de decaimento da absorção das amostras da NFT em função do tempo da irradiação para os pHs 2,5, 4,0 e 5,5 (b1) e os pHs 5,5, 6,7 e 10,0 (b2). Absorbância em  $\lambda = 304$  nm para  $\text{pH} \leq 6,7$  e em  $\lambda = 316$  nm para  $\text{pH} = 10,0$ . ..... 64
- Gráfico 7.11** Espectros de absorção do fotoproduto em função do pH. O fotoproduto possui três estados de protonação: mono protonado para  $5,3 < \text{pK}_1$ , não protonado para  $5,3 \leq \text{pK}_1 \leq 10,9$  e desprotonado  $\text{pK}_2 > 10,9$ . ..... 65
- Gráfico 7.12** Perfil da intensidade de absorção do fotoproduto em função do pH (■)  $\lambda = 350$  nm. O fotoproduto possui dois pontos de  $\text{pK}_a$ :  $\text{pK}_1 \cong 5,3$  e  $\text{pK}_2 \cong 10,9$ . ..... 66
- Gráfico 7.13** Pontos isobésticos (O) em  $\lambda = 231$  nm,  $\lambda = 286$  nm e  $\lambda = 326$  nm após a fototransformação da NFT em solução de pH 2,5 com tempo total de irradiação com filtro igual a 750 s. Em  $t = 750$  s temos a coexistência de duas espécies: NFT + FP1. .... 67
- Gráfico 7.14** Pontos isobésticos (O) em  $\lambda = 238$  nm e  $\lambda = 264$  nm após a quase total fototransformação da NFT em pH 2,5 com tempo total de irradiação sem filtro igual a 3570 s. Fotodecomposição do FP1 em FP2 ( $\lambda_{\text{máx}} = 209$  nm) em  $t \geq 2970$  s. .... 68
- Gráfico 7.15** Cinéticas de decaimento da absorção em  $\lambda_{\text{máx}} = 366$  nm (■),  $\lambda_{\text{máx}} = 304$  nm (●) e  $\lambda_{\text{máx}} = 209$  nm (▲) em função do tempo da irradiação no pH 2,5. O tempo total de irradiação da amostra foi de  $t = 3870$  s com a retirada do filtro. .... 69
- Gráfico 7.16** Espectros de absorção em pH 2,5 para (—) NFT com  $\lambda_{\text{máx}} = 366$  nm, (—) Fotoproduto 1 com  $\lambda_{\text{máx}} = 304$  nm e (—) Fotoproduto 2 com  $\lambda_{\text{máx}} = 209$  nm. .... 69
- Gráfico 7.17** Cinéticas de decaimento da absorção em  $\lambda_{\text{máx}} = 366$  nm (■),  $\lambda_{\text{máx}} = 304$  nm (●) e  $\lambda_{\text{máx}} = 209$  nm (▲) em função do tempo da irradiação em pH 2,5. O tempo total de irradiação da amostra foi de  $t = 21970$  s utilizando filtro. Os ajustes não lineares foram feitos de acordo com as equações descritas acima. .... 72
- Gráfico 7.18** Pontos isobésticos (O) de NFT + fotoproduto em  $\lambda = 255$  nm,  $\lambda = 298$  nm e  $\lambda = 338$  nm após a fototransformação da NFT em solução de pH 10,0 com tempo total de irradiação igual a 8130 s utilizando filtro. .... 72
- Gráfico 7.19** Pontos isobésticos (O) de FP1 + FP22 em  $\lambda = 228$  nm,  $\lambda = 298$  nm e  $\lambda = 328$  nm após a fototransformação da NFT em solução de pH 10,0 com tempo total de irradiação igual a 58530 s utilizando filtro. .... 73

<b>Gráfico 7.20</b> Espectros de absorção da NFT em pH 10,0 após a irradiação sem filtro da amostra. ....	73
<b>Gráfico 7.21</b> Cinéticas de decaimento da absorção para $\lambda_{\text{máx}} = 386 \text{ nm}$ (■) e $\lambda_{\text{máx}} = 216 \text{ nm}$ (▲) em função do tempo da irradiação em pH 10,0. De acordo com a equação 7.2.1.5, $k1_{\text{pH}} = 2,5 \approx k1_{\text{pH}} = 10,0$ nas mesmas condições de irradiação. ....	74
<b>Gráfico 7.22</b> Liberação de $\text{NO}^\bullet$ pela fotólise da NFT em função do tempo de irradiação no pH 2,5 sem filtro KOPP BLUE 5030. ....	78
<b>Gráfico 7.23</b> Perfil da cinética de fotodecomposição similar à fotoliberação do $\text{NO}^\bullet$ . ....	78
<b>Gráfico 7.24</b> Perfil monoexponencial da liberação do $\text{NO}^\bullet$ através da fotólise da NFT em função do tempo de irradiação no pH 2,5 utilizando filtro. ....	79
<b>Gráfico 7.25</b> Perfil biexponencial da liberação do $\text{NO}^\bullet$ através da fotólise da NFT em função do tempo de irradiação no pH 10,0 sem o uso de filtro. ....	80
<b>Gráfico 7.26</b> Decaimento monoexponencial do tempo de vida do estado tripleto na faixa de pH estudado. ....	83
<b>Gráfico 7.27</b> Espectro diferencial normalizado do estado tripleto da NFT para os pHs 2,5 e 10,0. Máximo de absorção do estado tripleto em: $\lambda = (540 \pm 5) \text{ nm}$ para o pH 2,5 (—■—) e $\lambda = (580 \pm 5) \text{ nm}$ para o pH 10,0 (—▲—). ....	85
<b>Gráfico 7.28</b> Comparação entre a convolução (—■—) do espectro diferencial normalizado de absorção da NFT e seu respectivo espectro experimental (—■—) no pH 7,3 (próximo $\text{pK}_2$ ). ...	86

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 7.1</b> Valores médios do coeficiente de absorção molar e posição do máximo de absorção para a NFT em função do pH.....	58
<b>Tabela 7.2</b> Valor médio das constantes da queda e da acumulação da NFT e dos produtos FP1 e FP2 durante a fotólise em função do pH. ....	71
<b>Tabela 7.3</b> Valor médio das constantes $k_1$ e $k_2$ nos pHs 2,5 e 10,0 em função da força iônica. ....	75
<b>Tabela 7.4</b> Valor médio das constantes $k_1$ e $k_2$ nos pHs 2,5 e 10,0 em função da concentração da NFT. ....	76
<b>Tabela 7.5</b> Valor médio das constantes $k_1$ e $k_2$ nos pHs 2,5 e 10,0 em função da concentração do oxigênio molecular.....	76
<b>Tabela 7.6</b> Massas consumida de NFT ( $M_{NFT}$ ) e total de $NO^*$ formada ( $M_{NO}$ ) durante a fotólise da NFT e seu respectivo rendimento de fotoliberação para a faixa de pH estudado.	81
<b>Tabela 7.7</b> Valor médio da constante $k_T$ nos pHs 2,5 e 10,0 em função da concentração do oxigênio molecular.....	83

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{NO}^\bullet$	óxido nítrico
$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
$\tau_T$	tempo de vida do estado tripleto
$S_0$	estado fundamental singleto
$S_1$	estado excitado singleto de menor energia
$T_1$	estado excitado tripleto de menor energia
$\text{H}_2\text{O}_2$	peróxido de hidrogênio
$\text{O}_2^{\bullet-}$	ânion superóxido
$\text{OH}^{\bullet-}$	radical hidroxila
$^3\text{O}_2$	estado fundamental tripleto do oxigênio
$^1\text{O}_2$	estado excitado singleto do oxigênio
$E_T$	energia do estado tripleto
$\Phi_T$	rendimento quântico do estado tripleto
$\text{NO}$	monóxido de nitrogênio
$\text{NO}^+$	cátion nitrosônio
$\text{NO}^-$	ânion nitroxila
$D$	constante de difusão
$\text{ONOO}^-$	peroxinitrito

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

<b>FQT</b>	Fotoquimioterapia
<b>FS</b>	Fotossensibilizador
<b>TFD</b>	Terapia Fotodinâmica
<b>IUPAC</b>	do Inglês <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
<b>NFT</b>	Nitrofurantoína
<b>AEC</b>	Antes da Era Cristã
<b>PUVA</b>	Fototerapia com Psoraleno+UVA
<b>HpD</b>	Derivados de hematoporfirina
<b>A2F</b>	Ação fotodinâmica via absorção de dois fótons
<b>IARC</b>	do Inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>JECFA</b>	do Inglês <i>Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>
<b>SCAN</b>	do Inglês <i>Scientific Committee on Animal Nutrition</i>
<i>ci</i>	Conversão interna
<i>cis</i>	Cruzamento intersistemas
<b>FP1</b>	Fotoproduto 1
<b>FP2</b>	Fotoproduto 2
<b>FP3</b>	Fotoproduto 3
<b>NFA</b>	Nitrofuraldeído



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>2</b>	<b>BASE CIENTÍFICA</b> .....	21
2.1	Fotofísica de uma molécula orgânica.....	21
2.2	Aspectos históricos do uso da luz na medicina.....	24
2.3	Terapia Fotodinâmica.....	25
2.3.1	Fatores limitantes na TFD.....	27
2.4	O radical óxido nítrico .....	29
2.4.1	Propriedades físico-químicas do NO <sup>•</sup> .....	30
2.4.2	Propriedades biológicas do NO <sup>•</sup> .....	30
2.4.3	Papel do NO <sup>•</sup> em tecidos cancerígenos.....	31
2.4.4	A influência do radical NO <sup>•</sup> na eficiência da TFD .....	32
2.5	Possível aplicação do NO <sup>•</sup> na Fotoquimioterapia .....	33
2.6	Derivados de nitrofurano .....	33
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA</b> .....	36
3.1	Objetivos gerais.....	36
3.1.1	Objetivos específicos.....	36
3.2	Justificativa .....	37
<b>4</b>	<b>OBJETO DE ESTUDO</b> .....	38
4.1	Nitrofurantoína (NFT).....	38
<b>5</b>	<b>MÉTODOS EXPERIMENTAIS</b> .....	40
5.1	Espectroscopia de Absorção Óptica .....	40
5.2	Método da quimiluminescência.....	41
5.2.1	A detecção e a quantificação da liberação do radical NO <sup>•</sup> pela quimiluminescência ..	41
5.3	Técnica de <i>Flash</i> -fotólise .....	43
5.3.1	Análise de espécies transientes pela absorção óptica .....	43
<b>6</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	47
6.1	Cinéticas da fotodecomposição .....	47
6.2	Detecção e quantificação da fotoliberação de óxido nítrico (NO <sup>•</sup> ) .....	49
6.3	Estado tripleto.....	50
<b>7</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	51

7.1	Estudo do estado de protonação da NFT.....	51
7.2	Estudos da dinâmica de fototransformação da NFT.....	60
7.2.1	Efeito do pH.....	61
7.2.2	Efeito da força iônica e da concentração da NFT.....	75
7.2.3	Efeito do oxigênio.....	76
7.3	Estudos da cinética liberação do $\text{NO}^\bullet$ pela fotólise da NFT.....	77
7.4	Estudos do estado tripleto da NFT.....	82
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>89</b>
8.1	Perspectivas.....	89
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que afeta um grande número de pessoas no mundo, na maioria dos casos causando a morte precoce. Característica comum do câncer é o crescimento desordenado de células em neoplasias malignas. O câncer atinge todas as faixas etárias e ambos os sexos tendo maior probabilidade acontecer na população idosa. As causas do câncer são as mais diversas, possuindo fatores internos (genético) e externos (meio ambiente, hábitos ou costumes social e cultural) estando ambos inter-relacionados [1].

No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte por doença na população, atrás apenas de doenças cardiovasculares. Em 2007, o câncer representou quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados no Sistema de Informações sobre Mortalidade [2]. Para o biênio 2010-2011 as estimativas no Brasil apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer, sendo o de maior incidência o câncer de pele do tipo não melanoma com 53.410 e 60.440 casos novos entre os homens e as mulheres, respectivamente [2].

Entre as terapias convencionais existentes para o tratamento do câncer figuram a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia e a imunoterapia. Entretanto, essas técnicas apresentam alguns efeitos colaterais indesejáveis. Dentre eles a redução da resistência do organismo devido à ação da radiação ionizante e/ou devido à alta citotoxicidade causada pela ação de quimioterápicos, e indução de novas neoplasias pelo uso de radiação ionizante, que são mais perigosos. Além disso, a recidiva tumoral, ocasionada pela não eliminação da totalidade de células malignas durante a cirurgia ainda é freqüentemente observada. Diante desse quadro, nas últimas décadas tem-se procurado terapias alternativas capazes de promover a morte celular seletiva das células tumorais sem causar danos significativos ao organismo quando comparadas com os métodos de tratamento convencionais. Surge como alternativa, em meados de 1970, a Fotoquimioterapia (FQT).

A FQT utiliza os compostos que, sendo introduzidos dentro de um organismo, não possuem alguma atividade contra ele, e quando são excitados através de luz na região espectral de 320 até 800 nm produzem espécies reativas que induzem a morte celular. Esses

compostos são chamados de fotossensibilizadores (FS) e são administrados por via tópica ou intravenosa. Logo, a vantagem da FQT é que, sozinhos, FS e luz produzem baixo ou nenhum efeito negativo para o organismo.

Dentre as formas desenvolvidas em FQT, a de maior destaque e a que vem sendo mais utilizada em clínica é a Terapia Fotodinâmica (TFD) [3]. A TFD já vem sendo empregada em tratamentos oncológicos (como os tumores malignos de pele do tipo não melanoma, esôfago, colo retal, etc.), oftalmológicos (como a degeneração macular relacionada à idade) e dermatológicos (como psoríase, acne e estética) [4].

A TFD utiliza efeito fotodinâmico que, segundo a IUPAC [5] é definido como *“Term used in photobiology to refer to photoinduced damage requiring the simultaneous presence of ultraviolet, visible, or infrared radiation, a photosensitizer and molecular oxygen.”* Apesar das vantagens do uso da TFD, essa técnica possui limitações de sua eficiência, pois seu mecanismo está associado com a formação dos estados excitados do FS e do oxigênio molecular e, por isso, depende dos tempos de vida e rendimentos quânticos desses estados. Além disso, a existência de regiões tumorais com baixa concentração de oxigênio (anoxia) é outro fator limitante da TFD. Isso estimula a procura de caminhos alternativos da FQT cujo mecanismo se associa com a formação de espécies reativas não excitadas e que não dependem da presença do oxigênio.

Outro fator que limita a ampla aplicação da FQT na clínica é o alto custo dos FS utilizados atualmente. Por exemplo, o preço comercial da Photofrin é aproximadamente USD 29.000,00 por 1,0 g. Este estimula a busca de novos FS, que são mais viáveis economicamente.

No grupo de fotobiofísica do Departamento de Física e Matemática da FFCLRP-USP, temos trabalhado na busca de novos FS que possuam espécies reativas sem excesso de energia (não excitados) como, por exemplo, os radicais livres (peróxidos, ânion superóxido, radical hidroxila etc.), e que sejam mais viáveis economicamente em relação a outros FS já existentes no mercado. Surgiu, então, o interesse nos derivados de nitrofurano, fármacos já utilizados na clínica por terem atividade antibacteriana de amplo espectro (Gram-positivas e Gram-negativas), ação contra protozoários (geralmente as coccídeas) e fungos, tendo sido muito utilizados, tanto na terapêutica [6] como na profilaxia de infecções, em aves, porcos e coelhos [7]. São fotoativos e, ao sofrerem fototransformação, liberam vários tipos de espécies reativas. Foi demonstrado, por exemplo, que um derivado de nitrofurano Quinifuril

possui atividade fototóxica *in vitro* e, sob irradiação de luz na região do UV-Vísivel, produz simultaneamente os radicais  $\text{NO}^\bullet$  e ânion superóxido, além de forma ativa do oxigênio (oxigênio singlete) sendo considerado um candidato em potencial para aplicação em FQT [8,9,10,11].

Este trabalho dá continuidade à busca de novos FS para serem aplicados em FQT. Escolhemos dentre inúmeros derivados de nitrofurano a Nitrofurantoína (NFT), já utilizada na clínica médica desde 1950 [12], e que possui baixo custo. Já foi relatada sua atividade fototóxica por apresentar reações fotoalérgicas em pacientes depois de ser administrada [13]. Contudo, os mecanismos e dinâmica da fotoação da NFT ainda não estão bem estabelecidas.

Demonstramos que a NFT possui dinâmica de fototransformação complexa dependendo do seu estado de protonação. Verificamos que, durante a fototransformação da NFT, produz no mínimo uma espécie ativa,  $\text{NO}^\bullet$ , cujo rendimento também depende do estado de protonação da NFT.

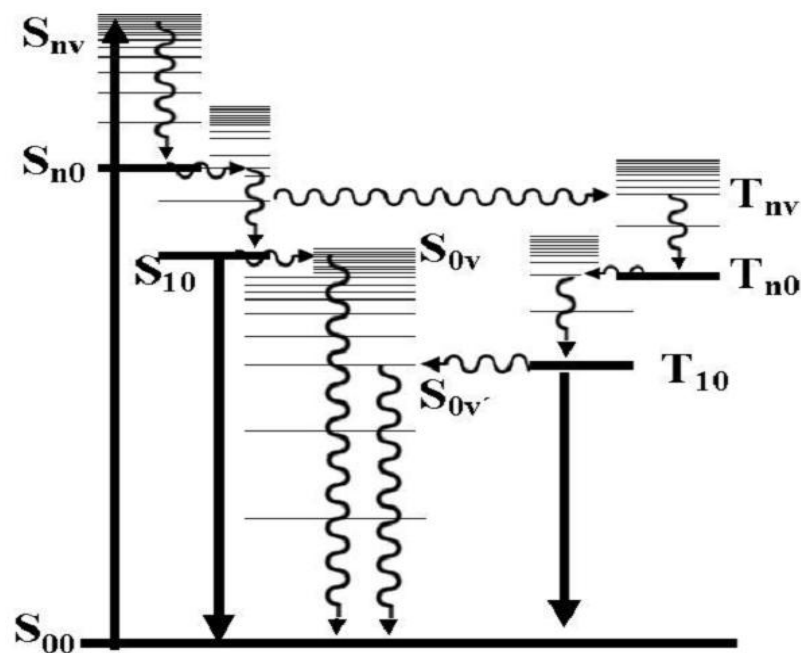
Propomos um esquema de fototransformação da NFT com a liberação de  $\text{NO}^\bullet$  em que o estado tripleto da NFT possui participação ativa em sua fototransformação, apresentando tempo de vida ( $\tau_T$ ) muito curto, provavelmente devido à formação de produto intermediário.

## 2 BASE CIENTÍFICA

### 2.1 Fotofísica de uma molécula orgânica

Os processos fotofísicos estão associados à absorção de radiação eletromagnética por uma molécula e à subsequente relaxação [14,15]. Esses processos são adequadamente explicados por um diagrama que mostra os níveis de energia da molécula e permitem analisar as transições envolvidas tanto nos processos de absorção quanto nos de relaxação.

Os processos de absorção e relaxação de uma molécula podem ser analisados baseando-se em um diagrama de energia de estados eletrônicos moleculares de Jablonski, que representa o estado fundamental de uma molécula e seus estados excitados singletos e tripletos, conforme representado na Figura 2.1. Os nomes singlete e tripleto são justificados pela multiplicidade destes níveis, que é dada através da expressão  $2S + 1$ , onde  $S$  é o número quântico de spin eletrônico total. Em um estado singlete, a soma dos spins de todos os elétrons da molécula (spin total) é nulo ( $S = 0$ ), enquanto que em um estado tripleto encontram-se dois elétrons com os spins paralelos e  $S = 1$ .



**Figura 2.1** Diagrama de níveis de energia de uma molécula orgânica. Os estados singletos e tripletos estão representados por S e T, respectivamente. Adaptado de [14].

No diagrama, os níveis de energia eletrônicos moleculares estão representados por linhas horizontais separadas verticalmente pela diferença de energia entre eles. A cada nível eletrônico estão associados níveis vibracionais (menores) e rotacionais (não mostrados), de maneira que os estados eletrônicos ( $n$ ) e vibracionais ( $v$ ) da molécula sejam indicados pelos índices subscritos como  $S_{nv}$  ou  $T_{nv}$  ( $n = 0, 1, 2, 3, \dots$ ;  $v = 0, 1, 2, 3, \dots$ ). O estado caracterizado pela menor energia eletrônica possível ( $S_{00}$ ) é denominado estado fundamental.

Os processos fotofísicos primários associados à absorção da luz por uma molécula e subsequente relaxação podem ser analisados da seguinte forma: quando um fluxo de fótons incide no material, suas moléculas podem absorver energia e sofrer uma transição do estado fundamental para um estado excitado. A transição pode acontecer entre diferentes estados eletrônicos, vibracionais ou rotacionais da molécula, produzindo, em geral, uma transição eletrônica-vibracional-rotacional [16]. No diagrama da Figura 2.1 essas transições estão mostradas pelas setas retilíneas verticais, orientadas para cima.

Após a absorção da radiação, a molécula se encontra em um estado com excesso de energia e, se ela não sofrer nenhuma reação ou "degradação", irá encontrar alguma forma de perder essa energia e retornar ao estado fundamental  $S_{00}$ . Os processos de perda de energia entre dois estados eletrônicos podem ser: radiativos ou não radiativos. Os radiativos consistem na relaxação por emissão de radiação e são denominados de fluorescência e fosforescência, quando envolvem transições de  $S_{10} \rightarrow S_{0v}$  e  $T_{10} \rightarrow S_{0v}$ , respectivamente. Geralmente, são caracterizados por uma taxa ( $k_r$ ) e estão representados pelas setas retilíneas orientadas para baixo, Figura 2.1.

Os processos não radiativos que ocorrem entre estados eletrônicos de mesmo spin,  $S_n \rightarrow S_m$  ou  $T_n \rightarrow T_m$  ( $n > m$ ), são chamados de conversão interna (ci) e são caracterizados pela taxa  $k_{ci}$ . Aqueles que ocorrem entre os estados do spin diferente  $S_n \rightarrow T_m$  são denominados de cruzamento intersistemas (cis) e são caracterizados pela taxa  $k_{cis}$ . Devido à regra de seleção de spin, que proíbe transições entre estados de diferentes multiplicidades, geralmente,  $k_{ci} \gg k_{cis}$ . Ambos os processos não radiativos ocorrem de forma isoenergética entre os estados vibracionais dos estados inicial e final, e são representados pelas setas onduladas horizontais.

Em um estado eletrônico, a relaxação ocorre entre os níveis vibracionais de maior ( $S_{nv}$  ou  $T_{nv}$ ) para os de menor energia, finalizando no nível de energia menor possível ( $S_{n0}$  ou  $T_{n0}$ ). Este processo é denominado de relaxação vibracional e está ilustrado na Figura 2.1

como setas onduladas orientadas de cima para baixo. Apresentam tempos característicos extremamente rápidos da ordem de  $10^{-15}$ - $10^{-12}$  s [16].

Desta forma, após uma absorção  $S_{00} \rightarrow S_{nv}$  (Figura 2.1), ocorrerá uma rápida relaxação vibracional não radiativa de  $S_{nv} \rightarrow S_{n0}$  seguida por uma conversão interna  $S_{n0} \rightarrow S_{1v}$ . Neste estado, seguirá uma nova relaxação vibracional  $S_{1v} \rightarrow S_{10}$ . Em  $S_{10}$  as moléculas podem: i) relaxar de volta ao estado fundamental radiativamente, ou ii) não radiativamente, sofrendo uma conversão interna  $S_{10} \rightarrow S_{0v}$ , ou iii) não radiativamente, sofrendo um cruzamento intersistemas  $S_{10} \rightarrow T_{nv}$ .

Como consequência, tem-se um decaimento exponencial da população do estado  $S_{10}$ . O tempo de vida também pode ser considerado o tempo médio que uma molécula permanece no estado excitado e pode ser medido através de técnicas resolvidas no tempo.

De maneira análoga aos estados singletos, teremos os decaimentos tripletos  $T_{nv} \rightarrow T_{n0}$ ,  $T_{n0} \rightarrow T_{1v}$  e  $T_{1v} \rightarrow T_{10}$ . O decaimento final  $T_{10} \rightarrow S_{0n}$  pode ser radiativo (fosforescência) ou não radiativo através do cruzamento intersistemas. Devido ao fator de restrição de spin, os tempos de vida típicos do estado tripleto  $T_1$  ( $\tau_{T1}$ ), para moléculas orgânicas em sistemas líquidos, são da ordem de  $10^{-6}$ - $10^{-3}$  s.

A eficiência da formação de estado tripleto  $T_1$  é a razão entre a taxa de cruzamento intersistemas pela soma de todas as taxas de todos os processos que despopulam o estado  $S_1$ :

$$\phi_T = \frac{k_{cis}}{k_r + k_{ci} + k_{cis}} \quad (2.1.1)$$

ou, ainda, em termos dos tempos de vida:

$$\phi_T = \frac{\tau_{S1}}{\tau_{cis}} \quad (2.1.2)$$

Absorvendo os fótons nos estados excitados  $S_{10}$  e  $T_{10}$ , a molécula pode ser promovida aos estados de energias mais elevadas  $S_{nv}$  ou  $T_{nv}$ , respectivamente. Estes estados mais elevados irão relaxar em relação aos estados iniciais  $S_{10}$  e  $T_{10}$ , como descritos previamente. Tripletos mais elevados também podem ser populados pelo cruzamento intersistemas de



estados singletos mais elevados, caso os valores das taxas forem competitivas para a conversão interna e o cruzamento intersistemas nos estados superiores.

Geralmente, as moléculas no estado excitado possuem maior reatividade em comparação com as no estado fundamental por dois motivos:

- energia de excitação eletrônica é maior do que térmica nas condições ambientais, e este permita a molécula ultrapassar uma barreira de reação mais fácil;
- a molécula no estado excitado possui uma vaga no estado fundamental para aceitar um elétron da outra molécula.

As reações entre as moléculas podem competir com processos monomoleculares de perda da energia de excitação.

## 2.2 Aspectos históricos do uso da luz na medicina

O tratamento utilizando os compostos ativados por luz tem sido empregado, desde a Antiguidade, na cura de diversas doenças, como psoríase, vitiligo, raquitismo e o câncer.

Existe uma diferença entre Fototerapia e Fotoquimioterapia. A primeira usa somente luz no tratamento da doença, por exemplo, o tratamento da icterícia ou hiperbilirrubinemia neonatal, relacionada à falta de maturidade do fígado, incapaz de metabolizar a bilirrubina. Caso não seja diagnosticada e tratada a tempo, a doença pode causar sérios problemas neurológicos. O tratamento consiste na exposição do recém-nascido a uma fonte luminosa que emite fótons na região espectral entre  $350 \text{ nm} \leq \lambda \leq 500 \text{ nm}$ , sendo a região de absorção da bilirrubina. A Fototerapia, inicialmente desenvolvida pelo médico dinamarquês Niels Ryberg Finsen, laureado com o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina em 1903 por "*in recognition of his contribution to the treatment of diseases, especially lupus vulgaris, with concentrated light radiation, whereby he has opened a new avenue for medical science*" [17].

Por outro lado, a FQT combina a aplicação de um composto fotossensível seguido por sua ativação pela luz nos tecidos em que o composto está localizado.

Os primeiros relatos do uso da FQT datam de 3000 AEC quando a civilização indiana usou psoralenos para tratar vitiligo e, em 1200 AEC, a civilização egípcia também usou psoralenos com a mesma finalidade. Já em 1834, Kalbrunner isolou o composto bergapteno,

ou 5-metoxipsoroleno, do óleo da bergamota sem utilizá-lo para tratamento. Mas, em meados de 1970, os psoralenos começaram a ser empregados na FQT com Psoraleno+UVA (PUVA) para o tratamento de psoríases, vitiligo e, depois, em imunoterapia [18,19].

O conceito de Terapia Fotodinâmica [3,20,21] foi desenvolvido no início do século XX, quando um estudante alemão de medicina chamado Oscar Raab relatou que certos comprimentos de ondas eram letais ao microorganismo *Paramecium caudatum*, ao estudar os efeitos do vermelho de acridina no protozoário causador da malária. Raab concluiu que, sozinhos nem luz, nem vermelho de acridina causaram o efeito citotóxico *in vitro*, mas sim, um produto da fotoativação. Posteriormente, ele postulou que esse efeito foi provocado pela ativação do composto químico pela luz, similar ao que ocorre nas plantas depois da absorção da luz pela clorofila. Em 1907 seu professor, Herman von Tappeiner, juntamente com um colaborador, Jodlbauer, demonstraram a necessidade da presença de oxigênio para as reações fotossensíveis. Surgiu aí o termo "ação fotodinâmica" para descrever o fenômeno.

O marco na forma moderna de TFD iniciou-se em 1972 com a publicação do trabalho de Diamond e colaboradores no periódico *The Lancet*. Diamond e colaboradores relataram as propriedades em localizar tumores e atividade fototóxica nestes através do uso de porfirinas. Mas foi em 1975 que Dougherty e colaboradores em Buffalo, EUA relataram o primeiro sucesso na cura de tumores em cobaias através da administração de HpD (derivados de hematoporfirina), a partir da ativação por luz vermelha.

### **2.3 Terapia Fotodinâmica**

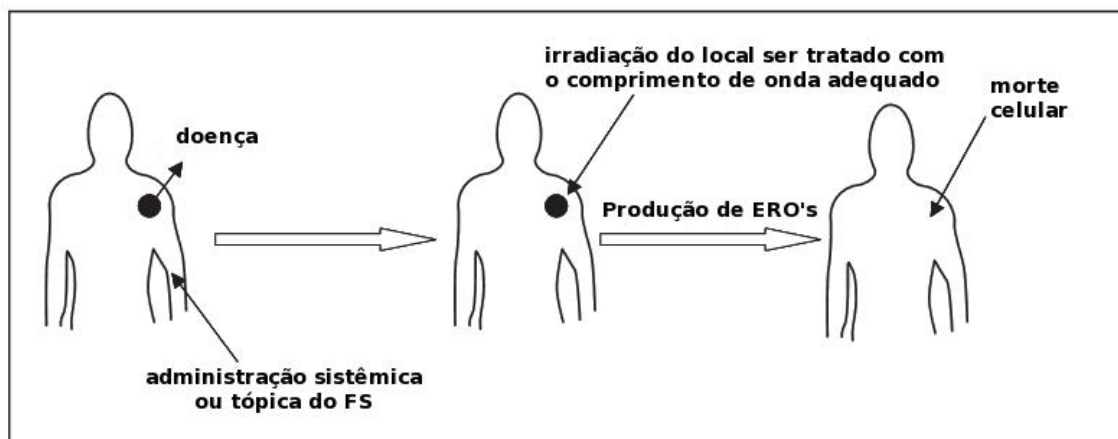
Por mais de vinte e cinco anos, a TFD concentrou esforços no tratamento do câncer. Porém, na última década, o uso da TFD mostrou pontos favoráveis ao tratamento de outras doenças, como a degeneração da mácula e infecções microbianas (vírus, bactérias, fungos ou protozoários), por exemplo [22].

A técnica da Terapia Fotodinâmica baseia-se no efeito fotodinâmico, já descrito na introdução deste trabalho. Ela depende do uso conjunto de três fatores: uma droga

fotoativa (fotossensibilizador), um ativador (luz) e um cofator (oxigênio). A ausência de qualquer um destes bloqueia a ação da TFD.

O protocolo de tratamento em TFD segue os seguintes passos (Figura 2.2):

1. Administração do FS via sistêmica ou tópica;
2. Consumo do FS e com seletiva acumulação/retenção, preferencialmente nas células alvo ou tecido;
3. Subsequente irradiação do fotossensibilizador com luz de comprimento de onda apropriado.

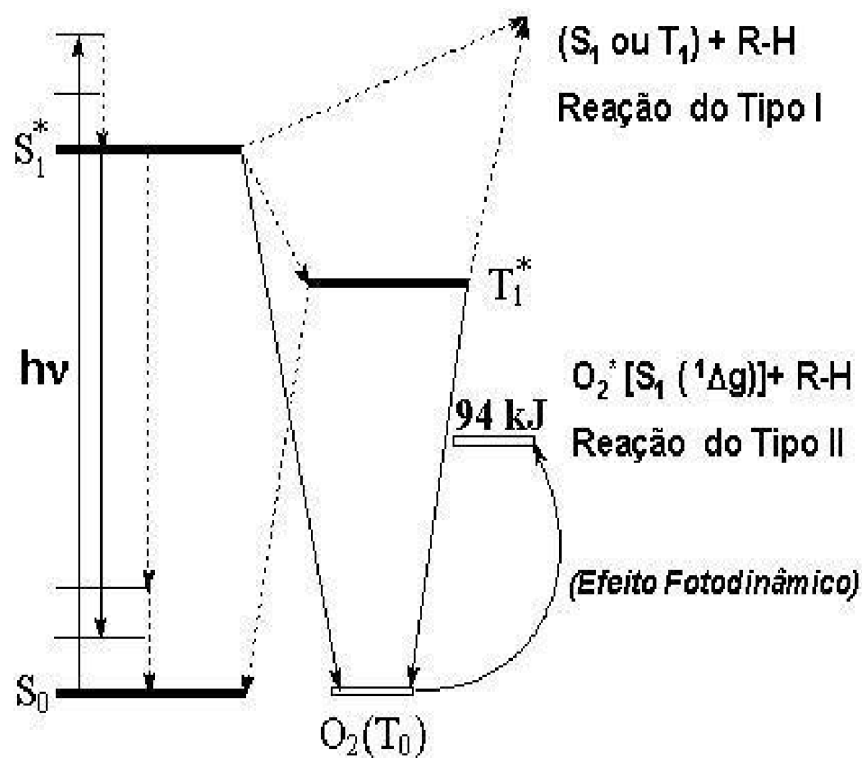


**Figura 2.2** Esquema representativo das etapas envolvidas no tratamento de doenças utilizando a técnica da TFD. Adaptado de [23].

Após a absorção da luz pelo FS, tem início o efeito fotodinâmico. O FS em seus estados excitados  $S_1$  ou  $T_1$  podem induzir mudanças químicas em sua vizinhança por dois caminhos competitivos: mecanismos Tipo I e/ou Tipo II [22,24],25].

No mecanismo do Tipo I (Figura 2.3), há a formação de radicais livres através da transferência de elétrons (ou prótons) para o substrato ou moléculas adjacentes para formar íons radicais. Estes radicais reagem com o oxigênio molecular e formam espécies altamente reativas ( $H_2O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet-}$ ).

Já no mecanismo do Tipo II (Figura 2.3), ocorre a transferência de energia do estado excitado,  $S_1$  ou  $T_1$  do FS para o oxigênio molecular. Após essa transferência de energia, o oxigênio molecular passa do seu estado fundamental, que é tripleto ( $^3O_2$ ), para o estado excitado singleto ( $^1O_2$ ). O oxigênio singleto é muito reativo, podendo desencadear reações de oxidação na membrana plasmática, mitocôndrias, lisossomos e no DNA, acarretando a morte celular.

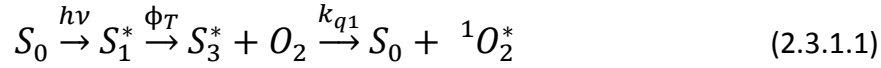


**Figura 2.3** Diagrama de Jablonski modificado. O fotossensibilizador no estado fundamental ( $S_0$ ) ao absorver um fóton ( $h\nu$ ) é promovido ao estado excitado singlete  $S_1$ . No estado  $S_1$  o fotossensibilizador poderá: (i) retornar ao  $S_0$  por interconversão (ci); (ii) promover uma reação do Tipo I; ou (iii) transicionar por cruzamento intersistemas (cis) 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).

Ambos os mecanismos, Tipo I e Tipo II, ocorrem em paralelo, e a relação entre eles depende de vários parâmetros, como o fotossensibilizador utilizado, concentração de oxigênio local, e o ambiente em torno são os mais importantes em um sistema biológico. Para a maioria dos fotossensibilizadores atualmente empregados em TFD, o mecanismo do Tipo II representa o mecanismo predominante.

### 2.3.1 Fatores limitantes na TFD

Apesar do sucesso obtido até o momento com aos atuais FS, ainda existem fatores que limitam o uso desses na TFD. As reações abaixo resumem as etapas de mecanismo tipo II, que é principal para FS atualmente usados. Um FS ao ser excitado com um fóton de energia produz as espécies reativas:



A reação 2.3.1.1 tem como produto final o FS no estado fundamental ( $S_0$ ) e oxigênio singleto ( ${}^1O_2^*$ ) com excesso de energia. Dois são os fatores que limitam a eficiência nesta etapa: o rendimento quântico do estado tripleto do FS ( $\phi_T$ ) e a constante de supressão do estado tripleto do FS pelo oxigênio molecular ( $k_{q1}$ ). Já a reação 2.3.1.2 representa a volta ao estado fundamental do FS quando este se encontra no estado tripleto ( $S_3^*$ ), pelos processos monomoleculares de cruzamento intersistemas e da fosforescência com tempo característico de vida do estado tripleto do FS ( $\tau_T$ ).

A etapa 2.3.1.3 inclui as reações efetivas do oxigênio singleto, caracterizadas pelos constantes de reação  $k_B$ , com alvos biológicos com formação de algum produto. A etapa 2.3.1.4, caracterizada pelos constantes  $k_{q2}$ , é supressão do oxigênio singleto pelas outras moléculas, inclusive seus alvos, sem produzir alguma reação. A etapa 2.3.1.5 é a desativação do oxigênio singleto pelos processos monomoleculares de cruzamento intersistemas e da fosforescência. O tempo característico dessa etapa é  $\tau_O$ .

Logo, a equação 2.3.1.6 descreve a eficiência do tratamento em TFD pelo caminho tipo II em termos das variáveis fotofísicas apresentadas acima. Embora  $\phi_T$  seja dado por 2.1.1, devemos aqui acrescentar a dependência entre as constantes de supressão e a concentração das moléculas supressoras ( $\sum_i k_{qi}[Q_i]$ ).

$$\phi_R = \phi_T * \frac{k_{q1}[O_2]}{\frac{1}{\tau_T} + \left( \sum_j k_{qj} \right) [O_2]} * \frac{\sum_l k_{Rl}[B_l]}{(1/\tau_O) + \sum_l k_{Rl}[B_l] + \sum_l k_{ql}[B_l]} \quad (2.3.1.6)$$

$$\phi_T = \frac{k_{isc1}}{k_{ic} + k_{fl} + k_{isc1} + \sum_i k_{qi}[Q_i]} \quad (2.3.1.7)$$

Em suma, a eficiência do tratamento em TFD em termos das variáveis fotofísicas depende, principalmente, dos seguintes fatores:

1. rendimento quântico do estado tripleto do FS;
2. tempo de vida do estado tripleto do FS;
3. constante de transferência da energia da molécula em estado tripleto para oxigênio molecular;
4. tempo de vida do oxigênio singleto;
5. concentração de oxigênio na região de tratamento;
6. constantes de reação entre oxigênio singleto e seus alvos.

Pode-se ver que as espécies com excesso da energia, tais como estados excitados do FS e oxigênio singleto, possuem as limitações da sua eficiência, pois podem perder a energia de excitação sem algum resultado positivo.

Contudo, para contornar tais limitações, buscaram-se novos FS que possuam espécies reativas sem excesso de energia como os radicais livres, por exemplo. Estes apresentam alta reatividade em seu estado eletrônico fundamental, bastando sua produção controlada a partir de um provedor fotoativado. Entre esses radicais, o óxido nítrico,  $\text{NO}^\bullet$ , merece destaque.

## 2.4 O radical óxido nítrico

Até 1992, molécula de óxido nítrico era tida como mais uma molécula tóxica, dentre muitas presentes na poluição ambiental e na fumaça de cigarros, causadora de câncer e precursora da chuva ácida. Porém, em 1992, cientistas provaram que o NO estava envolvido em processos biológicos importantes, desde o cérebro até o sistema imunológico. Assim, essa molécula, antes considerada somente como tóxica e "negativa" para um organismo, passou a ser um importantíssimo participante em processos metabólicos [26].

### 2.4.1 Propriedades físico-químicas do NO<sup>•</sup>

O óxido nítrico, NO<sup>•</sup>, é um radical livre, gasoso (nas CNTP), incolor, cuja molécula possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado no orbital antiligante  $2p-\pi$ . A remoção desse elétron forma NO<sup>+</sup>, por outro lado, a adição de um elétron nesse orbital forma NO<sup>-</sup>, íons com potencial oxidativo biológico diferente. Devido à neutralidade da molécula de óxido nítrico, é atribuída a facilidade de difusão em meio aquoso e em membranas celulares [27],28].

O NO<sup>•</sup> é relativamente solúvel em água (1 atm), com saturação igual a 1,9 mM (25 °C) e 130,0 mM em solventes apolares como *n-hexano*. Por isso, o óxido nítrico dissolve-se seletivamente em membranas e porções lipídicas da célula, estabelecendo um reservatório desta molécula nas adjacências da membrana plasmática. Logo, cria-se uma difusão bidirecional entre os meios intra e extracelulares que, em condições fisiológicas, tem constante de difusão,  $D$ , igual a  $3,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Consequentemente, esse valor de  $D$  revela que a molécula de óxido nítrico pode percorrer longas distâncias dentro do sistema biológico a partir do local em que foi produzida [29].

Do ponto de vista biológico, as reações mais importantes do NO<sup>•</sup> são aquelas ocorridas com o oxigênio e suas várias formas redoxes (O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, ou radicais peróxidos) através da estabilização do elétron desemparelhado, acarretando a formação de espécies como NO<sub>2</sub><sup>•</sup> e OONO<sup>-</sup>, por exemplo. Essas reações, sejam elas em fase gasosa ou em meio aquoso, são complexas e caracterizadas por reações de segunda ordem em relação à concentração de NO<sup>•</sup> ( $k[\text{NO}^{\bullet}]^2[\text{O}_2]$ ). O óxido nítrico também forma complexos com íons metálicos de transição, incluindo aqueles encontrados nas metaloporfirinas [27,29].

### 2.4.2 Propriedades biológicas do NO<sup>•</sup>

Atualmente, o NO<sup>•</sup> constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. O NO<sup>•</sup> apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande

importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto, o  $\text{NO}^\bullet$  é potencialmente tóxico. A toxicidade faz-se presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante [28].

O  $\text{NO}^\bullet$  também faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida. Assim, está demonstrada sua ação bactericida, antiparasítica e antiviral. Nestes casos, o  $\text{NO}^\bullet$  atua em concentrações maiores do que as de mensageiro, sendo tóxico aos microorganismos invasores. Existe um limite tênue de concentração tissular entre a não toxicidade às células do hospedeiro e a toxicidade necessária para ação microbicida [28]. No caso de doenças autoimunes e situações de sobrecarga exagerada do organismo, o  $\text{NO}^\bullet$  encontra-se em concentrações tóxicas para as células do organismo. Portanto, o  $\text{NO}^\bullet$  atua como toxina conforme a concentração e o tecido em questão.

### 2.4.3 Papel do $\text{NO}^\bullet$ em tecidos cancerígenos

A importância do  $\text{NO}^\bullet$  em diversos processos biológicos já foi descrito acima. Sua ação paradoxal também está presente na fisiopatologia de tumores.

O crescimento de tumores sólidos está intimamente ligado às condições de hipóxia com uma grande vascularização, seja através de células musculares lisas, endoteliais ou macrófagos. Por isso, existe produção endógena de  $\text{NO}^\bullet$  por estes tipos de células. Logo, ao explorar terapias que alterem a concentração de  $\text{NO}^\bullet$  na região tumoral, abre-se caminho para o uso de novas terapias. Há evidências significativas tanto *in vitro*, quanto em cobaias ou seres humanos, na qual a alteração da concentração local de  $\text{NO}^\bullet$  na região tumoral provoca a angiogênese tumoral/vasodilatação e conseqüente aumento no suprimento de oxigênio e nutrientes ao tumor ou o seu retardamento. Isso porque o nível de  $\text{NO}^\bullet$  existente no tumor irá determinar se o seu papel é basicamente como um mensageiro ou como uma molécula citotóxica [30].



A toxicidade do  $\text{NO}^\bullet$  nas células geralmente é caracterizado pelo aspecto morfológico e bioquímico da apoptose. O  $\text{NO}^\bullet$ , em altas concentrações (> nanomolar), pode induzir à apoptose em uma grande variedade de tipos de células, incluindo as células tumorais. A citotoxicidade do  $\text{NO}^\bullet$  está relacionada com a sua capacidade de induzir estresse oxidativo. O estresse oxidativo caracteriza-se pela exposição dos tecidos vivos às espécies radicalares reativas de oxigênio ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e radicais hidroxilas ( $\text{OH}^{\bullet-}$ ). O estresse oxidativo pode contribuir para a apoptose e há evidências significativas de que o  $\text{NO}^\bullet$  inicia a resposta de estresse em células, quando presente em concentração elevada. A reação de  $\text{NO}^\bullet$  com  $\text{O}_2^{\bullet-}$  para formar peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), pode contribuir para esse efeito pró oxidativo do  $\text{NO}^\bullet$ , e o  $\text{ONOO}^-$  pode, também, induzir a apoptose. Devemos frisar que a citotoxicidade do  $\text{NO}^\bullet$  só pode ser significativa em níveis que produzem toxicidade inaceitável ao tecido normal, já que as células possuem mecanismos para neutralizar essa toxicidade [31].

#### **2.4.4 A influência do radical $\text{NO}^\bullet$ na eficiência da TFD**

A TFD, dentre outros fatores limitantes, depende da concentração de oxigênio molecular no local da irradiação para a produção de oxigênio singleto. Tal concentração diminui ao longo do tempo de irradiação, tornando a região irradiada/tratada hipoxia. Entretanto, a citotoxicidade do  $\text{NO}^\bullet$  não depende da concentração de oxigênio. Ao ocorrer a fotoliberação do  $\text{NO}^\bullet$ , também há um aumento do fluxo sanguíneo local, por ocorrer vasodilatação, aumentando a oferta de oxigênio para a região tumoral. Esse aumento na oferta de  $\text{O}_2$  também pode influenciar na produção de oxigênio singleto. Portanto, há uma série de eventos associados às respostas do tumor a TFD que são influenciadas pela presença de  $\text{NO}^\bullet$ . Pode-se supor que, além de influenciar no fluxo sanguíneo e na disponibilidade de oxigênio, o  $\text{NO}^\bullet$  controla a atividade das plaquetas, neutrófilos e outros leucócitos, bem como a liberação de mediadores inflamatórios na vascularização dos tumores tratados com TFD [32],24].

## 2.5 Possível aplicação do NO<sup>•</sup> na Fotoquimioterapia

Como já foi dito anteriormente, o aumento da concentração fisiológica do NO<sup>•</sup> numa região tecidual pode induzir a morte celular [28]. Assim, os compostos que liberam o NO<sup>•</sup> sob ação da luz podem ser considerados como FS potenciais para a Fotoquimioterapia. A vantagem deste caminho é possuir espécies reativas sem excesso da energia (não excitados) e, por isso, não dependem do tempo de vida de excitação.

Entretanto, compostos atualmente estudados necessitam de luz com maior energia para liberar NO<sup>•</sup> ( $\lambda \leq 400$  nm), região espectral onde os tecidos biológicos não são transparentes. Essa séria limitação pode ser contornada através da mudança na estrutura dos atuais fotossensibilizadores com o prolongamento da cadeia  $\pi$ -conjugada. Assim, tem-se um deslocamento para regiões  $\lambda > 400$  nm, fazendo com que eles absorvam em outra faixa espectral mais adequada [32]. Por outro lado, esses compostos já podem ser usados em aplicações tópicas para tratamento de doenças.

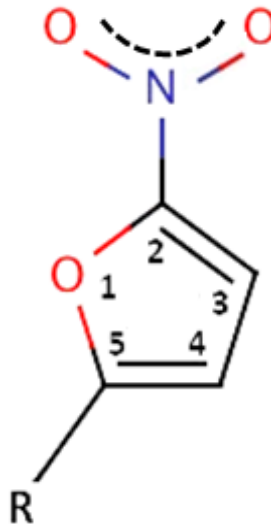
Outra forma de contornar esse problema é via absorção de dois fótons (A2F). A2F é um processo óptico, não linear, no qual dois fótons são simultaneamente absorvidos pela molécula, levando-a a um estado excitado cuja energia é a soma da energia dos dois fótons absorvidos. Neste caso, como a energia de cada fóton individual utilizado é menor do que aquela utilizada na absorção de um fóton (A1F) convencional ( $380 \text{ nm} \leq \lambda \leq 500 \text{ nm}$ ), este processo permite o uso de luz na região de transparência dos tecidos ( $600 \text{ nm} \leq \lambda \leq 800 \text{ nm}$ ) [33].

## 2.6 Derivados de nitrofurano

Entre os compostos que liberam o NO<sup>•</sup> sob ação da luz, o grupo de derivados de nitrofurano atrai o interesse especial devido às suas propriedades já discutidas, mais detalhado abaixo.

Os nitrofuranos são um grupo de substâncias que caracterizam-se pela presença de

um radical nitro ( $\text{NO}_2$ ) na posição 2 do anel furano (Figura 2.4). Existem centenas de derivados de nitrofurano, sendo a furazolidona, a nitrofurazona, a furaltadona, a nitrofurantoína e o nifursol os mais utilizados na medicina e medicina veterinária [6].



**Figura 2.4** Fórmula estrutural dos derivados de nitrofurano. A letra R é um radical com a presença de pelo menos um átomo de nitrogênio em sua cadeia.

Estas substâncias possuem uma atividade antibacteriana de amplo espectro (Gram positivos e Gram negativos), assim como ação contra protozoários (nomeadamente as coccídeas) e fungos, tendo sido muito utilizadas há várias décadas, tanto na terapêutica como na profilaxia de infecções de diversas espécies animais destinadas para o consumo humano, como aves, porcos e coelhos [34]. Por esse motivo, nos últimos anos esses compostos foram objetos de avaliações efetuadas por diferentes comitês internacionalmente reconhecidos, nomeadamente o IARC (do Inglês *International Agency for Research on Cancer*), a JECFA (do Inglês *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*), e o SCAN (do Inglês *Scientific Committee on Animal Nutrition*) [35].

Somente em 1990, a União Européia, em consequência da reavaliação dos eventuais riscos para a saúde humana decorrentes da exposição a estas substâncias, proibiu a sua administração em animais para a produção de alimentos, o que significa que a população esteve exposta durante um longo período de tempo a resíduos de nitrofuranos [34].

Em resumo:

- essas substâncias são, de uma forma geral, bem absorvidas pelo trato gastrointestinal, extensamente metabolizadas e excretadas pela urina;

- a sua ingestão, através de gêneros alimentícios, não constitui risco de intoxicação aguda;
- a JEFCA considerou que a nitrofurazona é um cancerígeno secundário e que a furazolidona possui efeitos carcinogênicos e genotóxicos;
- a IARC considerou que a furaltadona é um agente possivelmente carcinogênico para humanos. No entanto, a nitrofurantoína não é classificada quanto ao seu potencial ser carcinogênico para humanos;
- apesar da nitrofurantoína não estar autorizada para administração em animais destinados à produção de alimentos, pode ser utilizada, a nível humano, na terapêutica de infecções urinárias. É de salientar que esta utilização não origina exposição continuada a essa substância;
- o risco decorrente da ingestão dos nitrofuranos está relacionado a possíveis efeitos cancerígenos, variáveis estas aplicadas a substância em questão, eventualmente observáveis a longo prazo.

Os derivados de nitrofurano mostram atividade, sendo irradiados com a luz UV ou visível. Recentemente, foi mostrada no grupo de Fotobiofísica do DFM-FFCLRP-USP a fotoatividade de três derivados de nitrofurano: Nitracrina, Quinifuril e NFT contra vários tipos de células cancerígenas *in vitro* [9,10]. Além disso, foi documentada atividade fotoalérgica da NFT [13]. Para Quinifuril foi mostrado, também, que seu estado tripleto tem participação ativa na formação das espécies reativas produzidas durante a sua fototransformação [8,11].

Todas estas propriedades tornam os derivados de nitrofurano promissores para aplicação em FQT.

### 3 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

#### 3.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais deste trabalho são estudar a dinâmica da fotodecomposição da NFT e a liberação de radical  $\text{NO}^\bullet$  em soluções aquosas em função da composição do ambiente, tendo em vista analisar sua potencialidade para aplicação em fotoquimioterapia de diversas doenças, inclusive o câncer.

##### 3.1.1 Objetivos específicos

- Estudar a dinâmica de fototransformação da NFT em função:
  - do pH,
  - da força iônica,
  - da presença do oxigênio molecular,
  - da concentração da NFT.
- Detectar a fotoliberação do  $\text{NO}^\bullet$  e estudar a cinética e o rendimento quântico da sua fotoliberação em função do pH.
- Analisar o papel do estado tripleto da NFT na sua fotodecomposição.
- Baseando-se nos dados obtidos experimentalmente, propor uma esquema de fototransformação da NFT.

### 3.2 Justificativa

Este trabalho dá continuidade à busca de novos FS para serem aplicados em FQT, iniciada no Laboratório de Fotobiofísica do Departamento de Física e Matemática da FFCLRP-USP. Os FS que buscamos devem possuir a capacidade de formar, sob ação de luz, as espécies reativas não excitadas, o que torna a sua efetividade independente do tempo de vida da excitação. Além disso, eles devem ser mais viáveis economicamente em comparação aos já existentes no mercado.

Utilizado na clínica médica desde a metade do século passado, a NFT tem um custo por miligrama de produto USD 0,003/mg, que é dez mil vezes menor do que o custo de Photofrin, composto aplicado atualmente em TFD. Inúmeros artigos já foram publicados, sendo o tema central a Nitrofurantoína, porém, em sua grande maioria, são artigos clínicos.

Portanto, o estudo das fotorreações da NFT torna-se imprescindível para o entendimento dos mecanismos de ação da droga e para uma melhor utilização de seu potencial terapêutico, inclusive em Fotoquimioterapia. Neste sentido, o trabalho aqui apresentado vem preencher essa lacuna com algumas respostas.

## 4 OBJETO DE ESTUDO

### 4.1 Nitrofurantoína (NFT)

Neste trabalho, escolhemos como objeto de estudo a Nitrofurantoína (1 - [(E) - [(5-nitrofurano-2-il) metildieno] amino] imidazolidina-2, 4-diona), Figura 4.1, um composto sintético derivado de nitrofurano largamente aplicada em clínica no tratamento de infecções do trato urinário como agente antibacteriano [12] e de custo relativamente baixo (Sigma NFT 1,0 g ~ USD 3,00). Já foi documentada sua fototoxicidade contra diversos tipos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, aeróbicas ou anaeróbicas [26,27], como, também, sua ação fotoalérgica [13]. Devido ao seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, a NFT também tem sido utilizada na alimentação animal como aditivo para prevenir ou tratar várias infecções gastrointestinais [7,38]. Sua citotoxicidade está relacionada à redução enzimática por seu grupo nitro com formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio [39,40,41,42]. A NFT possui intensa absorção entre 320-420 nm devido às transições  $\pi$ - $\pi^*$  ( $\epsilon_{370\text{nm}} = 1,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , pH 7,0) [43]. Devido à presença dos átomos de nitrogênio na sua estrutura, a NFT pode ser protonada possuindo dois pontos pKa [43,44], cuja posição depende da força iônica.

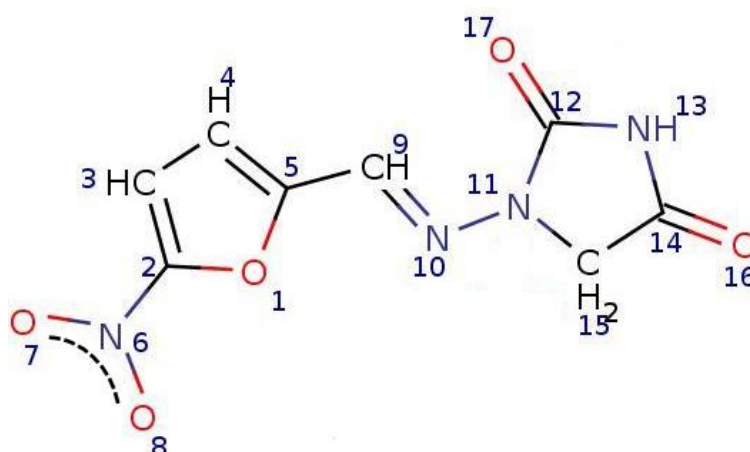


Figura 4.1 Estrutura química da Nitrofurantoína.

Uma desvantagem dos derivados de nitrofurano é que vários entre eles são carcinogênicos. Dentre os mais importantes estão a furazolidona, nitrofurazona,

furaltadona, nifursol. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) excluiu a NFT da categoria de compostos potencialmente cancerígenos por apresentar evidências limitadas dos efeitos carcinogênicos tanto em animais quanto em humanos [45].



## 5 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

### 5.1 Espectroscopia de Absorção Óptica

O espectro de absorção óptica de uma molécula – a dependência de absorção de energia da luz do seu comprimento da onda – é uma característica física útil por obter informações tanto qualitativas (identificação) quanto quantitativas (concentração).

A condição necessária para que um fóton possa ser absorvido é a igualdade da energia do fóton e a diferença das energias,  $\Delta E$ , do estado inicial e final de transição,  $\Delta E = h\nu = hc/\lambda$ , onde  $h$  é a constante do Planck,  $\nu$  e  $\lambda$  são a frequência e o comprimento de onda do fóton, respectivamente, e  $c$  é a velocidade da luz.

Os grupos químicos dentro da estrutura da uma molécula, que têm absorção óptica característica, são chamados cromóforos. Qualquer alteração da estrutura química ou mudança nas características do ambiente altera a estrutura eletrônica do cromóforo e, conseqüentemente, altera a energia dos seus estados. Logo, o espectro de absorção óptica sofre alteração.

As bandas de absorção na região espectral UV-Vísivel são formadas pela transição eletrônica entre os níveis de energia do estado fundamental ( $E_0$ ) e do estado excitado ( $E_n$ ). A banda de absorção é caracterizada pelo coeficiente de absorção molar ( $[\varepsilon(\lambda)] \equiv \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ), que depende do comprimento de onda ( $[\lambda] \equiv \text{nm}$ ). O  $\varepsilon(\lambda)$  é uma característica intrínseca de cada composto que depende da sua estrutura eletrônica que, por sua vez, depende da interação da molécula com seu ambiente. Assim, medindo a absorção, podemos estudar os efeitos da interação das moléculas entre si e com o ambiente (efeito de solvente, força iônica, etc.) [46].

O  $\varepsilon(\lambda)$  pode ser determinado através da lei de Lambert-Beer.

$$\varepsilon(\lambda)CL = \log(I_0/I) \quad (5.1.1)$$

Em que  $I_0$  é a intensidade que incide sobre uma amostra,  $I$  é a intensidade de luz que atravessa a amostra,  $C$  é a concentração do composto e  $L$  é espessura da amostra (caminho óptico). O valor  $\varepsilon(\lambda)CL=A$  chama-se “absorbância” ( $[A] \equiv$  sem unidade de medida) [46].

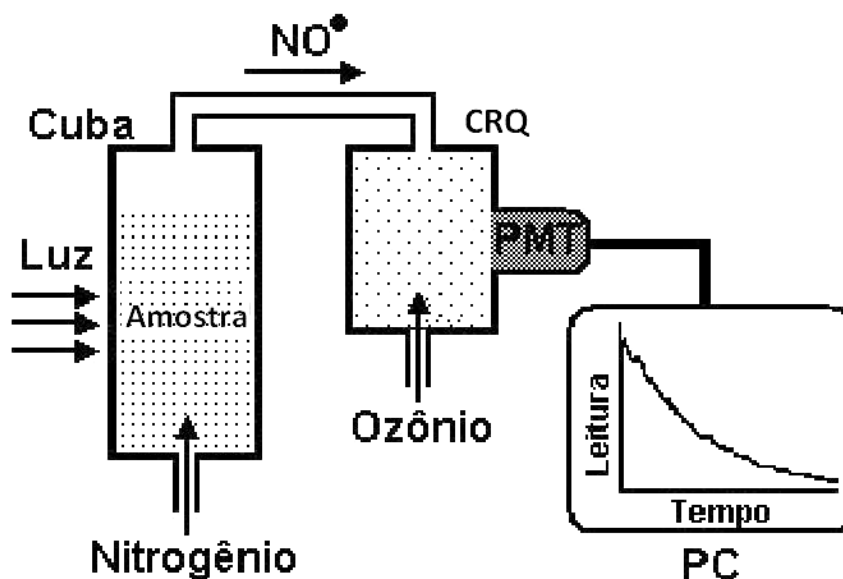
Neste trabalho usamos esse método nos estudos dos efeitos do pH e força iônica, e nas características da NFT e da cinética da sua fototransformação. O equipamento utilizado foi o espectrofotômetro Beckman Coulter™ DU®640.

## 5.2 Método da quimiluminescência

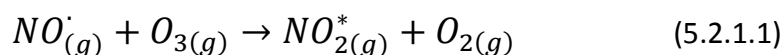
O método da quimiluminescência baseia-se na detecção da luminescência da amostra, emitida pelos seus estados eletronicamente excitados, formados por alguma reação química sem excitação através de luz [47]. O método está caracterizado pela alta sensibilidade, permitindo determinar as concentrações até  $10^{-12}$  M em sistemas líquido. Neste trabalho utilizamos este método para detecção e quantificação do radical  $\text{NO}^\bullet$  liberado durante a fototransformação da NFT.

### 5.2.1 A detecção e a quantificação da liberação do radical $\text{NO}^\bullet$ pela quimiluminescência

A detecção do radical livre  $\text{NO}^\bullet$  pela quimiluminescência baseia-se no registro direto da quimiluminescência emitida na região espectral  $\lambda > 600$  nm pelo estado excitado do  $\text{NO}_2$  ( $\text{NO}_{2(g)}^*$ ) formado pela reação de  $\text{NO}_{(g)}^\bullet$  com o gás ozônio ( $\text{O}_3$ ) (equação 6.2.1). O  $\text{NO}_{(g)}^\bullet$  formado é transportado por arraste através de um fluxo de gás nitrogênio para uma câmara de reação da quimiluminescência (CRQ) acoplada a cuba do analisador de óxido nítrico GE Sievers NOA 208i (Figura 5.1) [48].



**Figura 5.1** Esquema experimental para detecção do radical livre  $\text{NO}^\bullet_{(g)}$  pelo método de quimiluminescência do estado excitado do  $\text{NO}_2$ .



A reação 5.2.1.1 ocorre dentro da CRQ ( $\cong 20$  mL) a qual possui uma janela óptica ligada a uma fotomultiplicadora, que produz um sinal elétrico proporcional ao número de fótons emitidos pelas moléculas  $\text{NO}^*_{2(g)}$  quando elas retornam ao seu estado fundamental (reação 5.2.1.2). Essa fotomultiplicadora está conectada a uma placa de aquisição de sinal em um computador PC, e fornece uma resposta em tensão ( $\sim$  mV)  $\times$  tempo ( $\sim$  s). O equipamento utilizado tem sensibilidade maior que uma parte por bilhão (amostras gasosas) ou 1 picomolar (amostras líquidas).

A determinação do rendimento quântico da fotoliberação do  $\text{NO}^\bullet$  pela fotólise da NFT ( $\phi_{\text{NO}}^{\text{NFT}}$ ) dá-se da seguinte forma:

$$\phi_{\text{NO}}^{\text{NFT}} = \frac{M^{\text{NO}}}{M^{\text{NFT}}} \quad (5.2.1.3)$$

onde  $M_{\text{NO}}$  e  $M_{\text{NFT}}$  são as massas formada de  $\text{NO}^\bullet$  e consumida de NFT respectivamente.

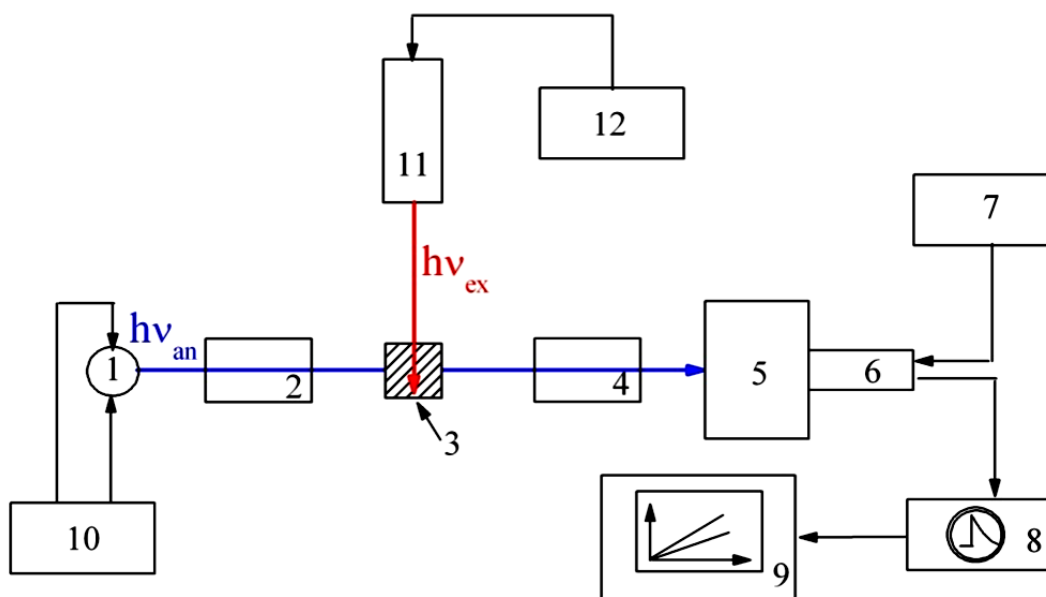
### 5.3 Técnica de *Flash*-fotólise

A partir do desenvolvimento de fontes de excitação pulsadas (lâmpadas de pulso e mais tarde dos lasers) o estudo de estados excitados e espécies intermediárias cujos tempo de vida são extremamente curtos ( $\sim 10^{-3}$ - $10^{-13}$  s) tiveram um enorme avanço [49],50]. A técnica de flash fotólise permite estudar os espectros e dinâmica de formação e desativação dos estados excitados (eletrônicos, vibracionais e rotacionais) dos radicais livres, dos fotoisômeros e da formação de fotoprodutos secundários [51,52].

O princípio da técnica concentra-se na excitação do sistema sob estudo através de um curto e intenso pulso de luz e da observação em seguida às mudanças em função do tempo e de algumas características de amostra excitada, tais como absorção óptica, fluorescência, condutividade etc.

#### 5.3.1 Análise de espécies transientes pela absorção óptica

A estrutura de um sistema de *flash*-fotólise com a utilização para análise da absorção óptica da amostra (Figura 5.2) contém dois canais: o de excitação (geralmente um pulso de laser) e o de análise com fonte da luz contínua ou pulsada.



**Figura 5.2** Esquema principal de um sistema típico de *flash*-fotólise com análise dos produtos por absorção óptica. (1) Fonte da luz de análise (lâmpada ou laser); (2) e (4) Sistemas ópticos; (3) Amostra; (5) Monocromador; (6) Fotomultiplicadora; (7) Fonte de alta tensão; (8) Registrador (osciloscópio digital); (9) Analisador (computador PC); (10) Fonte de corrente elétrica; (11) Fonte de pulsos de luz de excitação (lâmpada ou laser); (12) Fonte da potência para pulsos de excitação.

Uma vez que o espectro de absorção da espécie transiente é diferente do composto em estado inicial, a cinética da formação e de decaimento dessa espécie (por exemplo, estado tripleto  $T_1$ ) podem ser medidas através de absorção óptica. A determinação da variação da absorção no comprimento de onda de análise pode ser obtida segundo o esquema abaixo:

Antes do flash

$$I_1 = I_0 10^{-A_1} \quad (5.3.1.1)$$

$$I_2 = I_0 10^{-A_2} \quad (5.3.1.2)$$

Depois do flash

$$\text{Assim, } \frac{I_2}{I_1} = 10^{\Delta A} \quad (5.3.1.3)$$

com  $\Delta A = A_1 - A_2$

Em que  $I_0$  é a intensidade da luz atingindo a amostra,  $I_1$  é a intensidade da luz transmitida pela amostra antes do pulso do flash, quando a amostra tem absorção  $A_1$ , e  $I_2$  é a intensidade da luz transmitida pela amostra após o pulso do flash quando a amostra tem absorção  $A_2$ ,

$$A_1 = \varepsilon_{SS}C_0; A_2 = \varepsilon_{SS}C_1 + \varepsilon_{TT}C_T; C_0 = C_1 + C_T$$

onde  $\varepsilon_{SS}$  é o coeficiente de absorção molar no estado singlete,  $\varepsilon_{TT}$  é o coeficiente de absorção molar da espécie transiente e  $C_T$  é a concentração de espécies transiente. A absorção diferencial

$$\Delta A = A_1 - A_2 = \Delta A = (\varepsilon_{SS} - \varepsilon_{TT})C_T$$

varia com o tempo devido à variação da  $C_T$ . Em caso de decaimento da primeira ordem temos:

$$C_T = C_{T_0}e^{-kt} \text{ e } \Delta A = \Delta A_0e^{-kt} \quad (5.3.1.4)$$

Disso podemos determinar a taxa (constante) de decaimento  $k$  como

$$k = \frac{\ln(\Delta A_0/\Delta A)}{t} \quad (5.3.1.5)$$

Uma maneira prática e usual de analisar as medidas de absorção óptica das espécies transientes é segundo a Figura 5.3 abaixo:

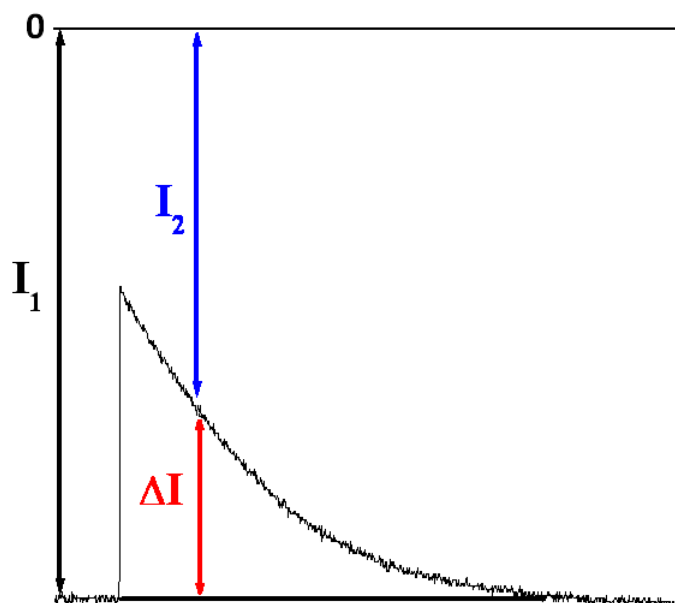


Figura 5.3 Determinação da absorção diferencial.

Logo, pode ser obtida a partir da Figura 5.3 e da equação 6.3.1.3:

$$\frac{I_2}{I_1} = \frac{I_1 - \Delta I}{I_1} = 1 - \Delta I / I_1 = 10^{\Delta A} \quad (5.3.1.6)$$

$$\log \left( 1 - \Delta I / I_1 \right) = \Delta A \quad (5.3.1.7)$$

Como  $\log \left( 1 - \Delta I / I_1 \right) < 0$ , usualmente o gráfico é mostrado como  $-\log \left( 1 - \Delta I / I_1 \right)$ .

Variando o comprimento de onda de análise, podemos obter um espectro diferencial de absorção da espécie transiente como  $\Delta A(\lambda)$ .

Neste trabalho usamos a técnica de *flash*-fotólise nos estudos dos tempos de vida e dos espectros do estado tripleto da NFT.

## 6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A nitrofurantoína foi adquirida da empresa Sigma®. As soluções estoques de tampão fosfato e NFT foram preparadas em água Milli-Q. Todas as amostras foram preparadas em tampão fosfato (PBS), com a utilização de uma cubeta de quartzo (10 mm) para a realização dos experimentos, exceto no experimento de detecção de NO\*, em que necessariamente a amostra deveria ser irradiada na cuba de reação do analisador de óxido nítrico. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Para estudar o efeito do oxigênio tanto na cinética de fotodecomposição quanto no tempo de vida do estado tripleto, as amostras foram borbulhadas ora com gás nitrogênio ora com oxigênio medicinal durante 20 minutos. As amostras de NFT foram estudadas em região do pH de pH 2,5 até pH 10,0.

Os valores de pH foram controlados por um pHmetro Corning 430 e ajustados com soluções estoques concentradas de NaOH e HCl. Todos os experimentos foram realizados em ambiente de penumbra a temperatura ambiente.

Os resultados foram analisados através do programa comercial Origin®Pro 8 SR4 versão 8.0951(B951): OriginLab Corporation, 2008.

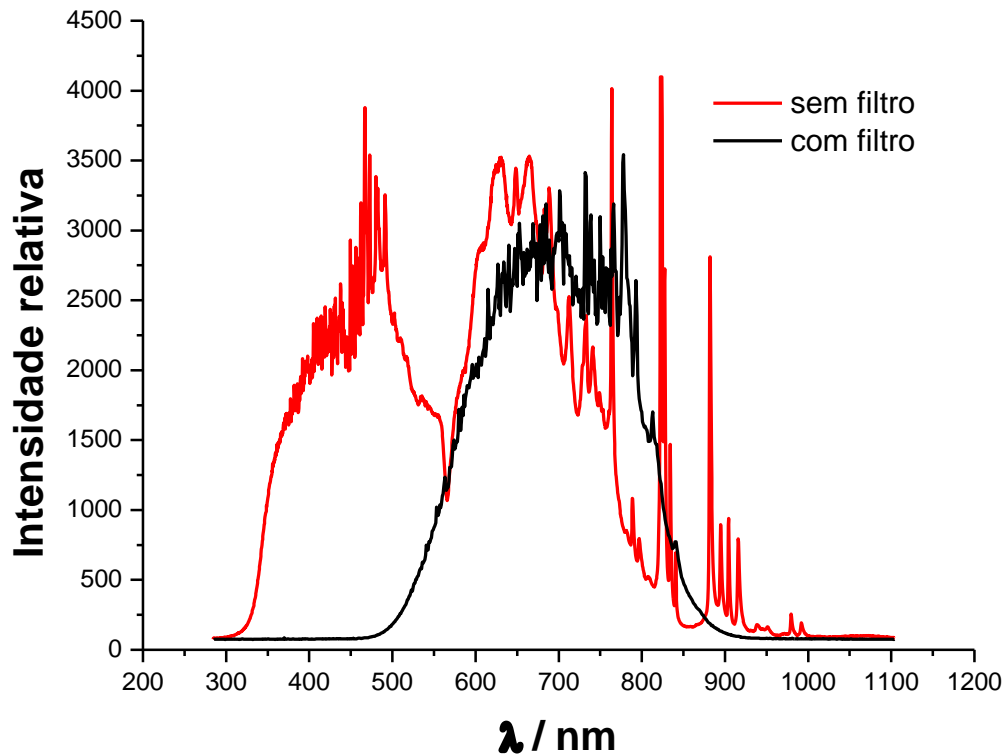
### 6.1 Cinéticas da fotodecomposição

As amostras foram irradiadas com um sistema equipado com uma lâmpada de xenônio RLO XBO 75W / 2 – OSRAM (Gráfico 6.1). As amostras foram inicialmente irradiadas em  $\lambda > 390$  nm usando um filtro de vidro (Figura 6.1) e depois sem o filtro em  $\lambda > 320$  nm.

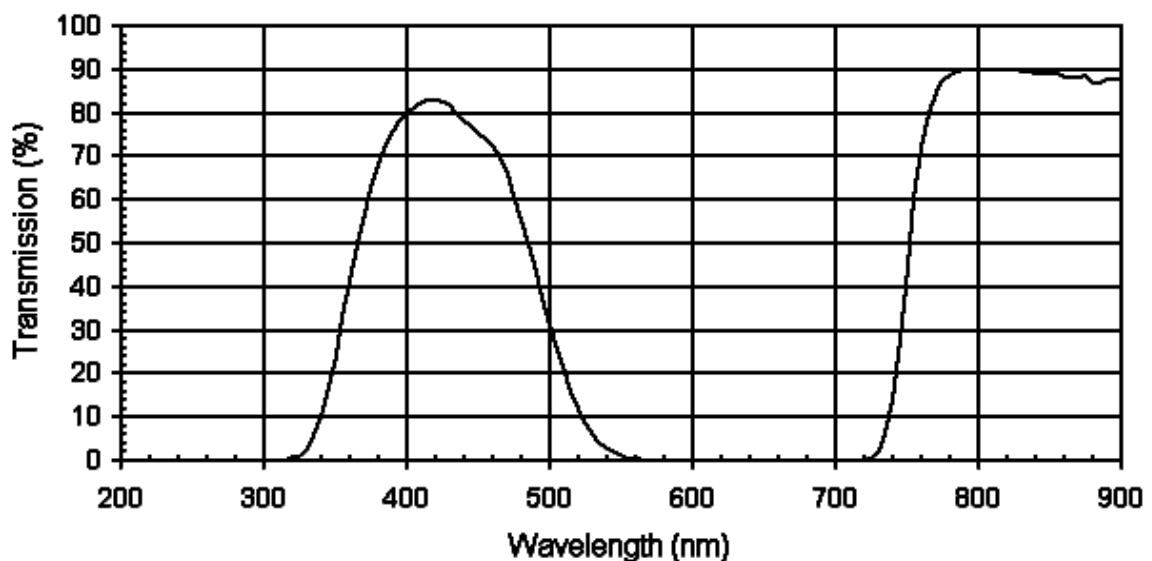
O efeito da força iônica, na cinética de fotodecomposição, foi estudado variando a concentração do tampão fosfato no intervalo  $0,05 \text{ M} \leq [\text{PBS}] \leq 1,00 \text{ M}$ . A influência da concentração da droga na cinética de fotodecomposição foi estudada em três concentrações diferentes 6,5, 65,0 e 100,0  $\mu\text{M}$ . Em todas as amostras a concentração de tampão fosfato foi de 20,0 mM.



As radiâncias medidas com filtro e sem filtro foram  $122 \pm 8 \text{ mW.cm}^{-2}$  e  $866 \pm 70 \text{ mW.cm}^{-2}$ , respectivamente, obtidas através do radiômetro Spectra Physics-407A no ângulo de incidência de  $0^\circ$ . Para evitar efeitos térmicos, uma cubeta de quartzo com água foi posicionada entre o irradiador e a amostra. Foi utilizado um agitador magnético para homogeneizar a amostra durante a irradiação.



**Gráfico 6.1** Espectro de irradiação do sistema contendo lâmpada de xenônio RLO XBO 75W / 2 - OSRAM sem e com o filtro Kopp Blue 5030 (CS 5-57).

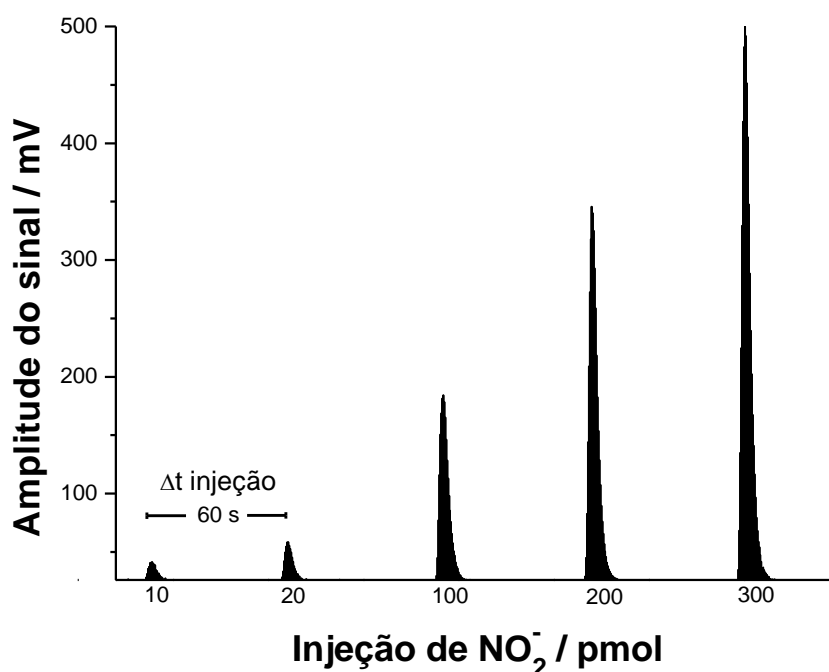
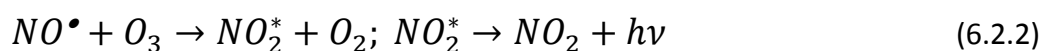
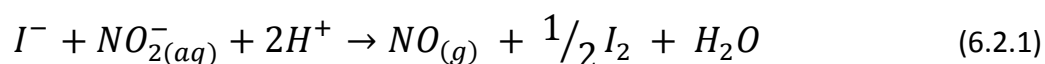


**Figura 6.1** Espectro de transmissão do filtro Kopp Standard Filters – Kopp Blue 5030 (CS 5-57).

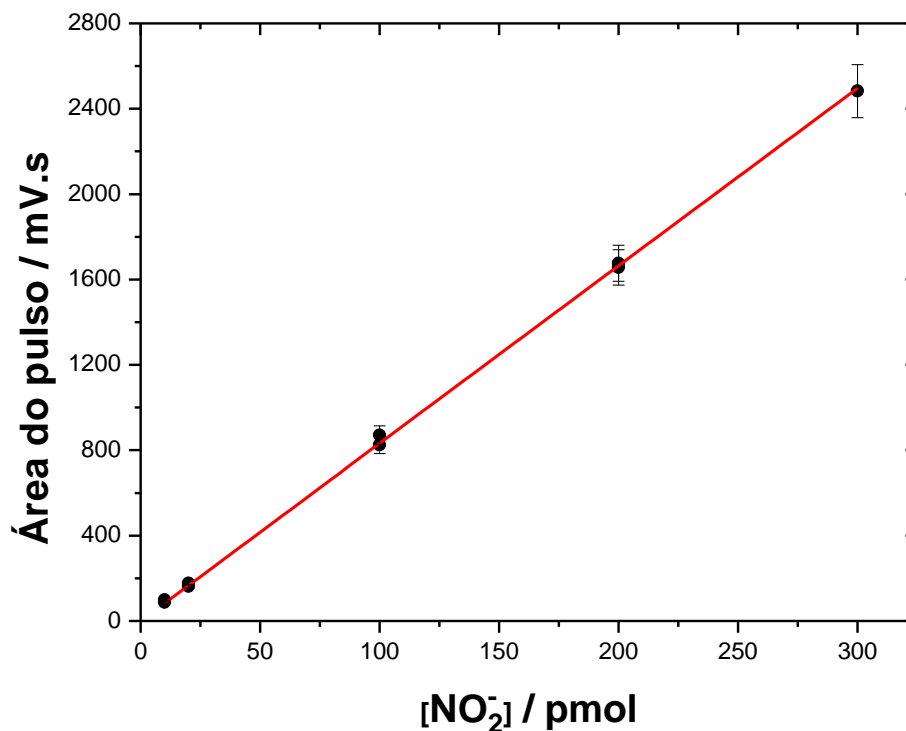
## 6.2 Detecção e quantificação da fotoliberação de óxido nítrico (NO<sup>•</sup>)

A detecção do radical NO<sup>•</sup> foi realizada pelo analisador de óxido nítrico GE Sievers NOA 208i.

Para quantificar a liberação de NO<sup>•</sup> pela fotólise da NFT (equação 5.2.1.3), foi preparada a curva de calibração usando as reações 6.2.1 e, em seguida, 6.2.2. Para isso adicionamos quantidades conhecidas de nitrito (NaNO<sub>2</sub>, 0 pmol ≤ [NO<sub>2</sub><sup>-</sup>] ≤ 300 pmols) na cuba de reação, contendo 1,0 mL de iodeto de sódio (0,3 M) e 6,0 mL de ácido acético. A curva de calibração foi obtida a partir das medidas da área de pulsos registrados (Gráfico 6.2) em função da quantidade de NaNO<sub>2</sub> injetado (Gráfico 6.3), cuja relação entre a área do pulso (mV.s) e a concentração de nitrito (pmol) fornece uma constante de proporcionalidade (coeficiente angular da reta) entre a quantidade de nitrito injetado e a quantidade de NO<sup>•</sup> formado, já que a relação é de 1:1.



**Gráfico 6.2** Pulsos de quimiluminescência do NO<sub>2</sub><sup>\*</sup> formado pela redução do NO<sub>2</sub><sup>-</sup>(aq) em NO<sup>•</sup>(g) em água Milli-Q segundo a seqüência de reações 6.2.1 e 6.2.2.



**Gráfico 6.3** Dependência linear ( $R^2 = 0,9999$ ) de área dos pulsos em função da quantidade de nitrito injetado com constante de proporcionalidade igual a  $B = (8,32 \pm 0,04) \times 10^{12} \text{ mV.s.mol}^{-1}$ .

### 6.3 Estado tripleto

O estado tripleto foi produzido pela irradiação da amostra com pulsos de 10 ns, 20 mJ de terceiro harmônico (355 nm) de um laser de Nd:YAG, em aparelho Quantel Brilliant B. O espectro de absorção do estado tripleto foi monitorado na região espectral  $400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$  e a cinética de decaimento em  $\lambda = 560 \text{ nm}$ .

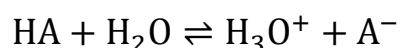
## 7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 7.1 Estudo do estado de protonação da NFT

O equilíbrio químico envolvendo ácidos e bases, principalmente em meio aquoso, é de fundamental importância, haja vista sua atuação em uma variedade de funções nos organismos vivos, como transporte de elétrons e prótons.

Determinar o valor de  $pK_a$  é importante porque, ao realizarmos posteriormente a fototransformação da NFT em função do pH, será imprescindível conhecer a(s) espécie(s) presente(s) nesse determinado pH. Logo, poderemos relacionar essa característica à dependência do pH com relação às fases características da fototransformação do composto nessas condições na cinética da fototransformação.

Para melhor compreendermos o comportamento do composto estudado, prosseguimos com a medida dos pontos de protonação,  $pK_a$ . Neste valor de pH há a coexistência de duas espécies que divergem quanto ao estado de protonação. Formalmente, o ponto de  $pK_a$  é definido a partir do equilíbrio entre a forma ácida HA e sua base conjugada  $A^-$ , segunda a classificação de Bronsted-Lowry [53]



A determinação da constante de dissociação para esse equilíbrio é realizada utilizando o coeficiente de atividade das espécies (constante de dissociação termodinâmica,  $K_a$ ) ou, por simplicidade, suas concentrações (em mol.L<sup>-1</sup>) [53]. Neste caso, utilizaremos a concentração das espécies, conforme a equação 7.1.1:

$$K_a \approx \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (7.1.1)$$

Esta equação demonstra que a razão de concentrações da forma ácida pela básica pode ser controlada pela concentração de íons hidrônio. Tomando o logaritmo nos dois membros da igualdade na equação 7.1.1:

$$\text{pK}_a = \text{pH} + \log\left(\frac{[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}\right) \quad (7.1.2)$$

com

$$\text{pH} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+] \quad (7.1.3)$$

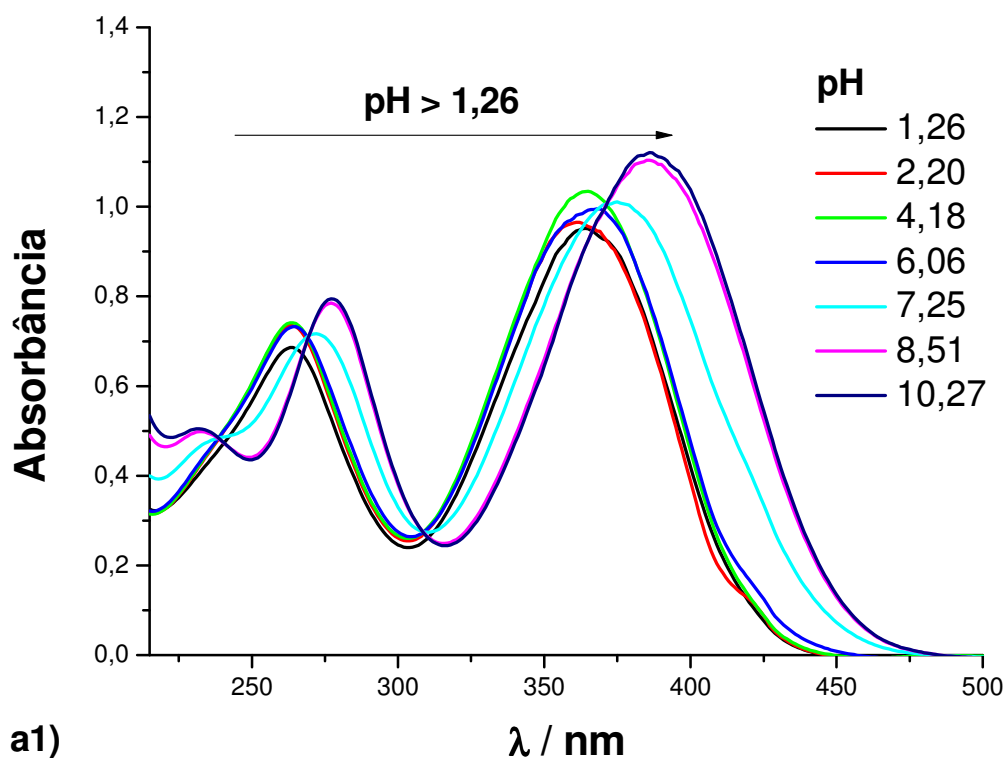
e

$$\text{pK}_a = -\log K_a \quad (7.1.4)$$

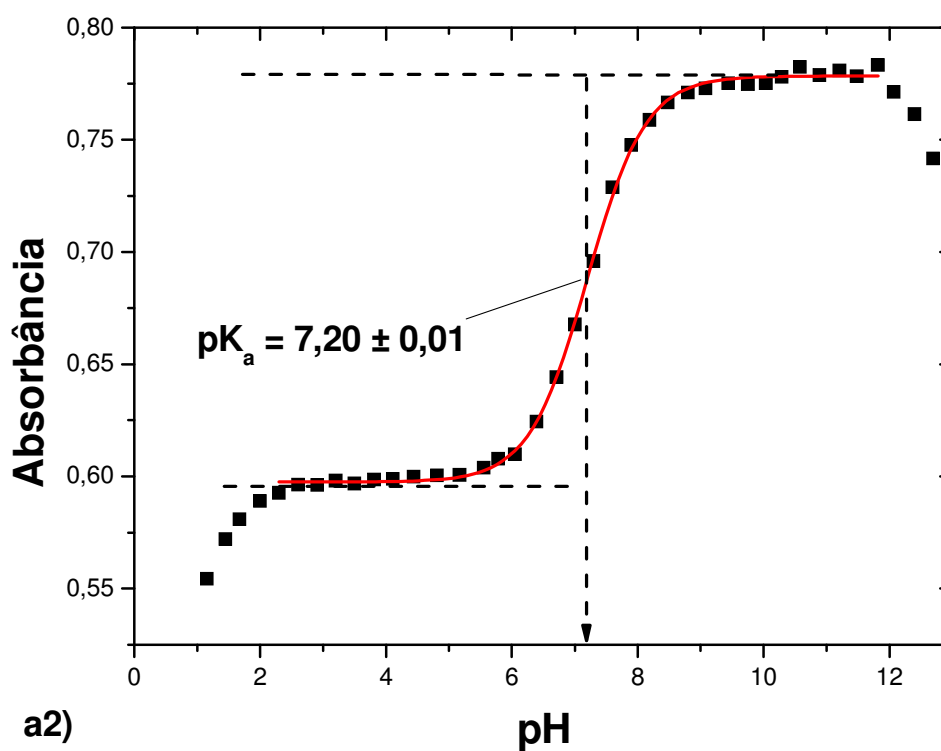
A equação 7.1.2, também conhecida como Equação de Henderson-Hasselbalch, mostra que, quando a concentração da espécie ácida é igual à da básica, temos a definição de  $\text{pK}_a$ . Ou seja,  $[\text{HA}]/[\text{A}^-] = 1$ , portanto,  $\log[\text{HA}]/[\text{A}^-] = 0$ .

Podemos determinar o ponto de  $\text{pK}_a$  a partir do gráfico da absorvância em função do pH, pois segundo a lei de Lambert-Beer (equação 5.1.1), a concentração da espécie absorvente é proporcional à sua absorvância. O formato do gráfico de uma propriedade diretamente proporcional à razão de concentrações (ou a própria concentração de uma das espécies) em função do pH experimental tem o formato de 'S' (ou 'S' invertido), segundo a equação 7.1.2. Assim, o ponto de inflexão da curva sigmoidal fornece o valor de  $\text{pK}_a$ .

Dessa forma, do Gráfico 7.1 abaixo temos:



a1)

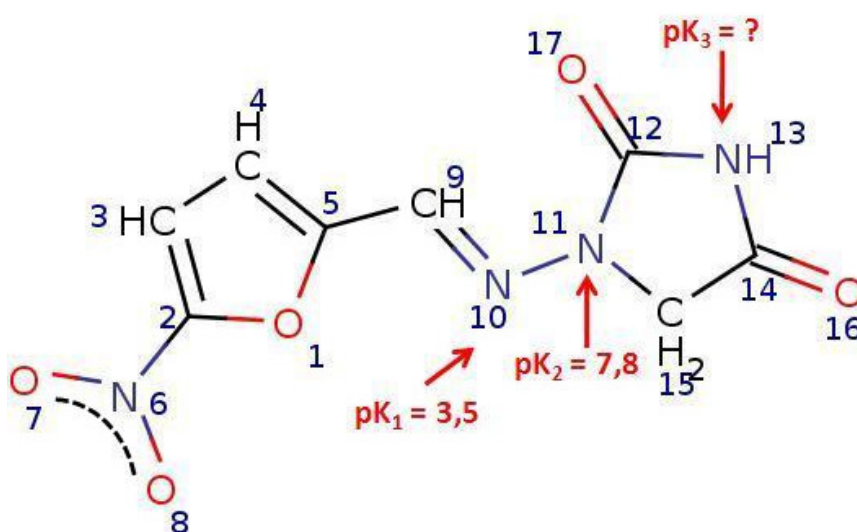


a2)

**Gráfico 7.1** a1) Espectros de absorção da NFT ([NFT] = 65,0 μM) em tampão fosfato ([PBS] = 20,0 mM) em função do pH; a2) Perfil da intensidade de absorção da NFT em função do pH; (■) λ = 275 nm.

Assim, foi obtido experimentalmente o ponto  $pK_a = 7,20 \pm 0,01$ . Estes valores foram obtidos em tampão fosfato com concentração igual a 20 mM. O valor de  $pK_a$  condiz com o encontrado no *The Merck Index* [54].

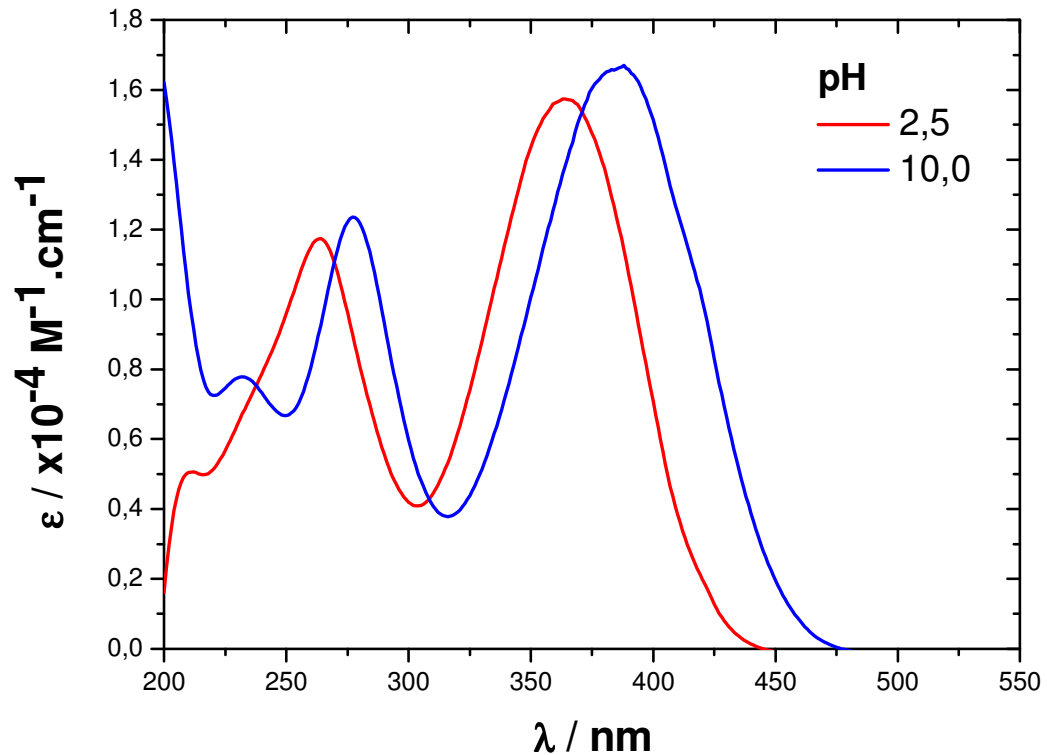
Segundo Burmicz, Smyth e Palmer [43] a protonação ocorre no nitrogênio de posição 10 ( $pK_1 = 3,5$ ) e posição 11 ( $pK_2 = 7,8$ ), conforme Figura 7.1. Nosso valor diverge de Burmicz e colaboradores porque, como sabemos, o valor de  $pK_a$  diminui com o aumento da força iônica do ambiente, que foi 20 mM de tampão fosfato em nossos experimentos e 40 mM de tampão Britton–Robinson em [43]. Há evidências de que existe um terceiro ponto de  $pK_a$  correspondendo à desprotonação do nitrogênio na posição 13. Porém, esse valor, segundo os autores, é difícil de ser determinado experimentalmente devido à baixa absorção molar dessa espécie.



**Figura 7.1** Estrutura química da NFT com indicação dos estados de protonação:  $pK_1 = 3,5$  e  $pK_2 = 7,8$  [43]. A existência de um terceiro ponto de  $pK_a$  no nitrogênio de posição 13 não foi confirmada experimentalmente.

A faixa de pH escolhida foi a de  $2,5 \leq \text{pH} \leq 10,0$  porque é mais importante para aplicações biológicas e médicas. O ponto de  $pK_2$  é próximo da faixa do pH fisiológico, que é de  $7,2 \leq \text{pH} \leq 7,4$ .

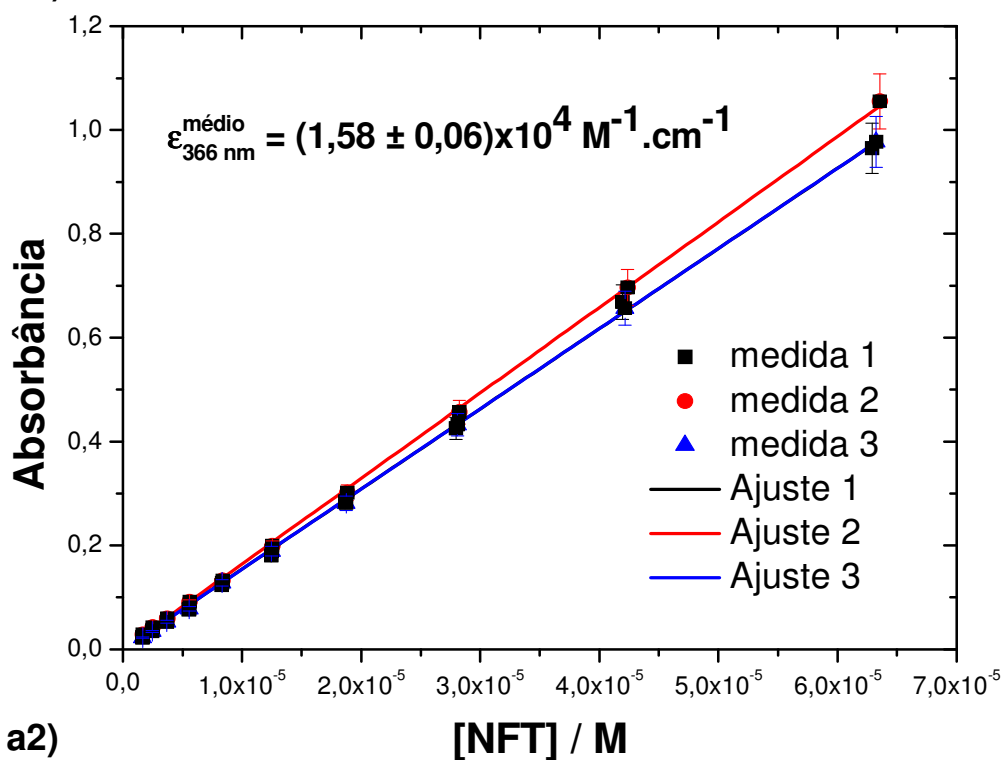
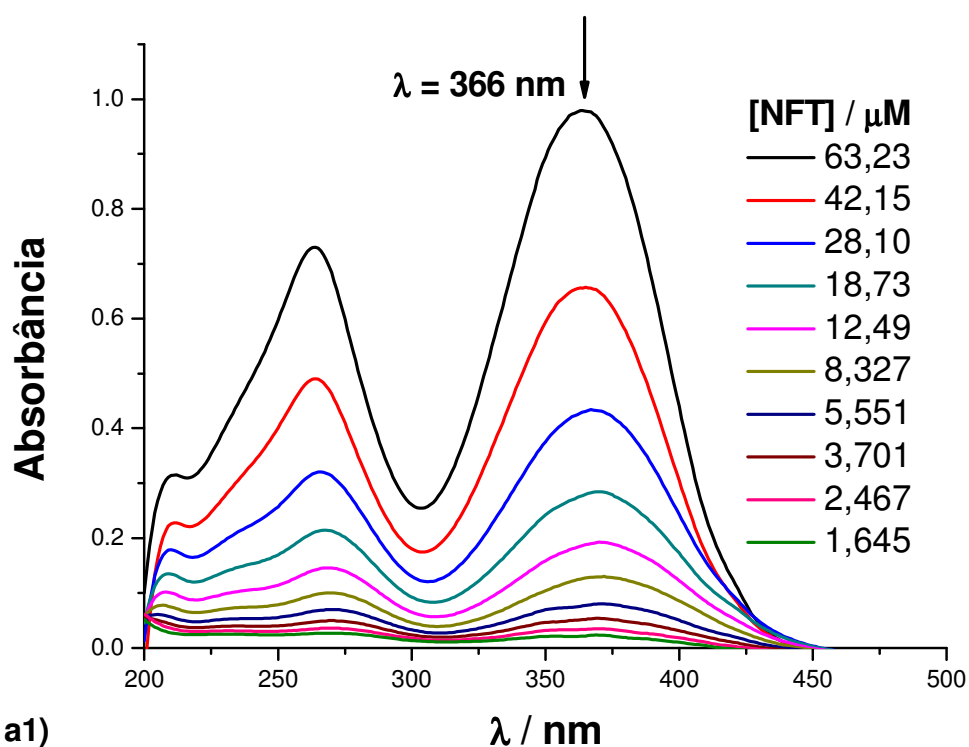
A diferença nos espectros de absorção UV-Visível entre o pH 2,5 e o pH 10,0 é, provavelmente, atribuída a protonação do nitrogênio 11. Tal mudança no estado de protonação altera o sistema  $\pi$ -conjugado da molécula. Por isso, há um deslocamento no espectro de absorção UV-Visível de  $366 \pm 1$  nm (pH 2,5) para  $386 \pm 1$  nm (pH 10,0) (Gráfico 7.2). Pode-se confirmar, visualmente, essa alteração pela descoloração da amostra de amarelo (pH 10,0) para incolor (pH 2,5) quando titulado HCl para aumentar a concentração de prótons.



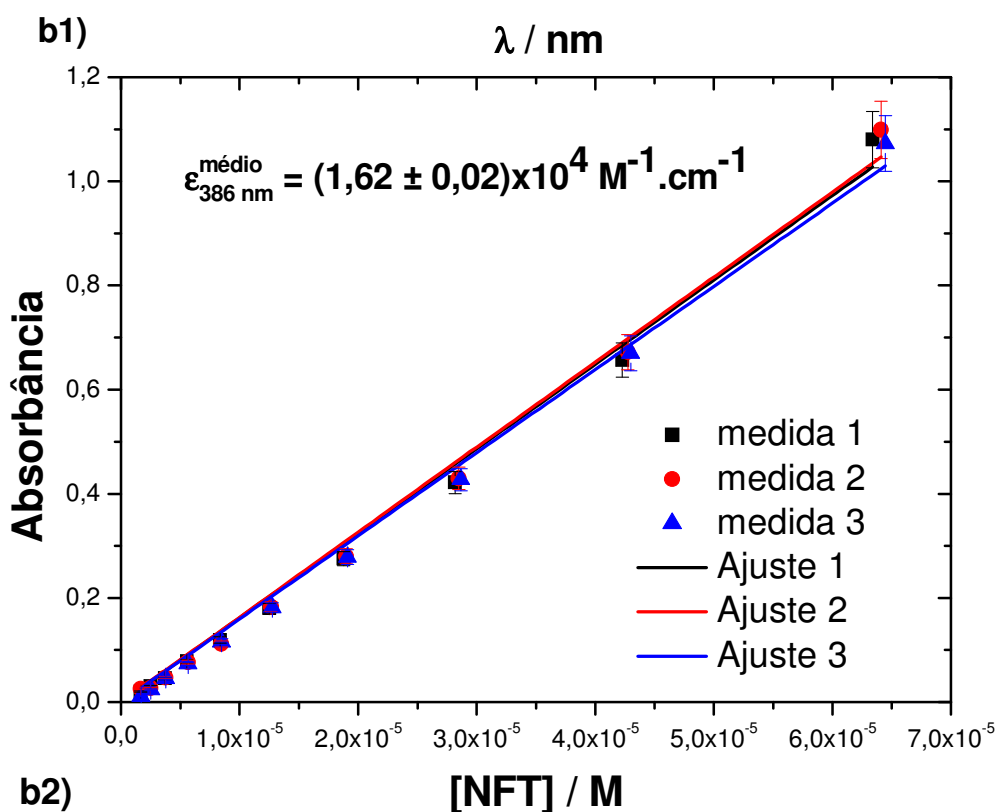
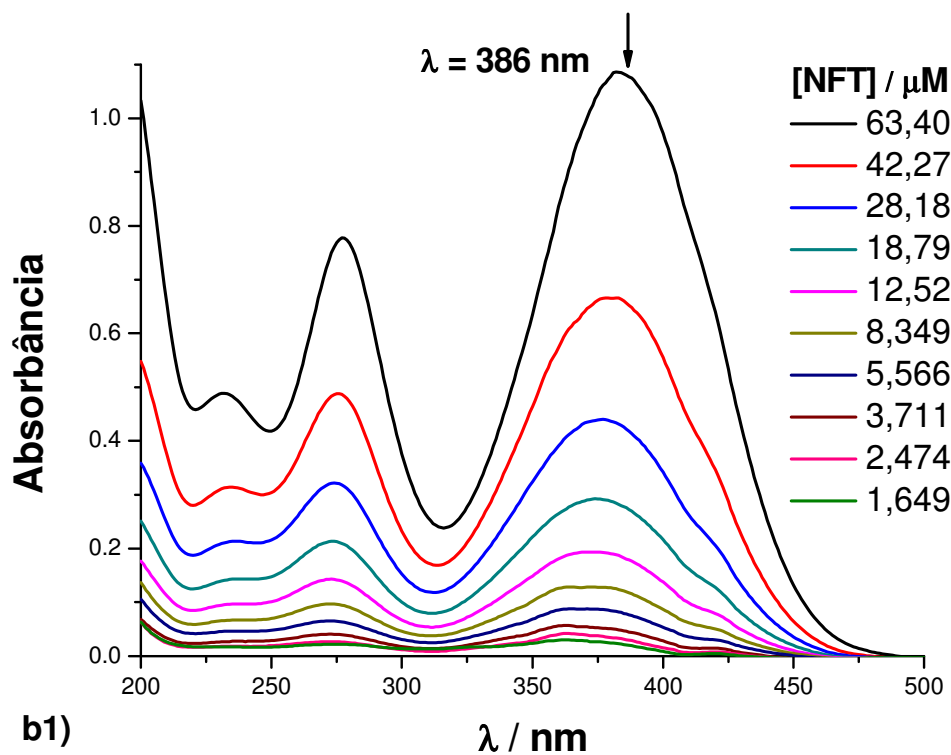
**Gráfico 7.2** Espectro de absorção da NFT nos pHs 2,5 (estado mono protonado) e 10,0 (estado não protonado). Máximos de absorção em:  $\lambda = 366$  nm para o pH 2,5 (—) e  $\lambda = 386$  nm para o pH 10,0 (—).

Como exposto no item 5.1, Espectroscopia de Absorção Óptica, o coeficiente de absorção molar  $\epsilon(\lambda)$  tem dependência com o comprimento de onda e pode ser determinado através da lei de Lambert-Beer (equação 5.1.1). Dessa forma, ao titularmos uma solução de NFT de concentração inicialmente conhecida, deveremos obter uma dependência linear entre a absorbância e a concentração, já que o caminho óptico da luz ( $L$ ) ao atravessar a amostra permanecerá constante com  $L = 1,00$  cm. Os Gráficos 7.3 e 7.4 demonstram tal afirmação para os pH's 2,5 (estado mono protonado) e 10,0 (estado não protonado), em tampão fosfato,  $[PBS] = 20,0$  mM.





**Gráfico 7.3** Espectro de absorção da NFT em função de sua concentração (a1) para o pH 2,5 com [NFT] = 65,0  $\mu\text{M}$  e [PBS] = 20,0 mM; Ajuste linear da absorbância em função da concentração (a2) para 3 diferentes amostras de NFT em  $\lambda = 366 \text{ nm}$ .



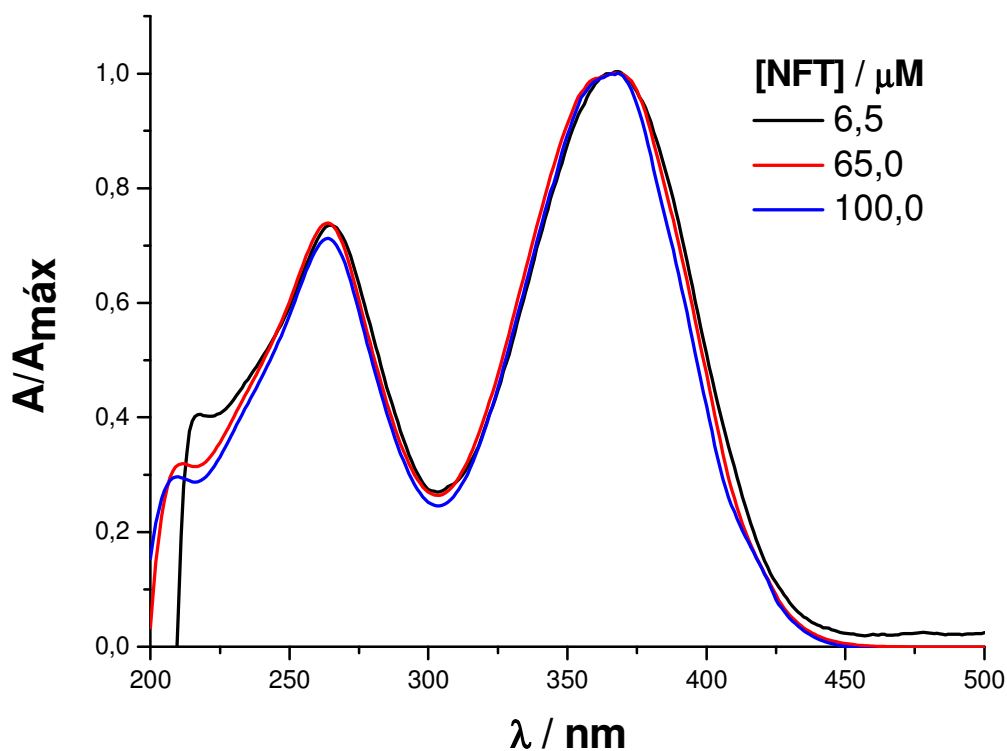
**Gráfico 7.4** Espectro de absorção da NFT em função de sua concentração (b1) para o pH 10,0 com [NFT] = 65,0  $\mu\text{M}$  e [PBS] = 20,0 mM; Ajuste linear da absorbância em função da concentração (b2) para 3 diferentes amostras de NFT em  $\lambda = 386 \text{ nm}$ .

Os valores de  $\epsilon$  (Tabela 7.1) nos pH's 2,5 e 10,0 são próximos, considerando o erro experimental.

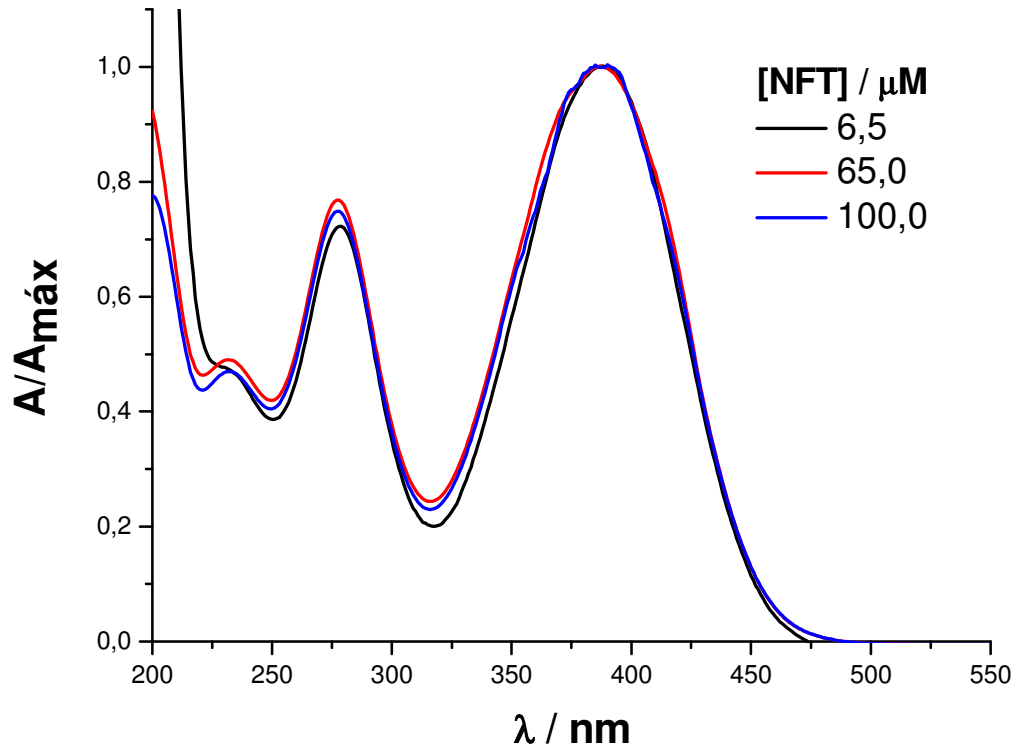
**Tabela 7.1** Valores médios do coeficiente de absorção molar e posição do máximo de absorção para a NFT em função do pH.

pH	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\langle \epsilon_{\text{nm}} \rangle = A \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
2,5	$\approx 366$	$1,58 \pm 0,06$
10,0	$\approx 386$	$1,62 \pm 0,02$

A dependência linear entre a absorbância e a concentração das amostras em todas as faixas de concentrações usadas, indicando a ausência da agregação da NFT nessas faixas de concentrações e de pH. Para confirmar esta conclusão, monitoramos os espectros de absorção da NFT em concentrações ainda maiores (Gráficos 7.5 e 7.6).



**Gráfico 7.5** Espectro normalizado de absorção em função da concentração da NFT. Ausência de agregação da NFT nessas faixas de concentrações no pH 2,5.



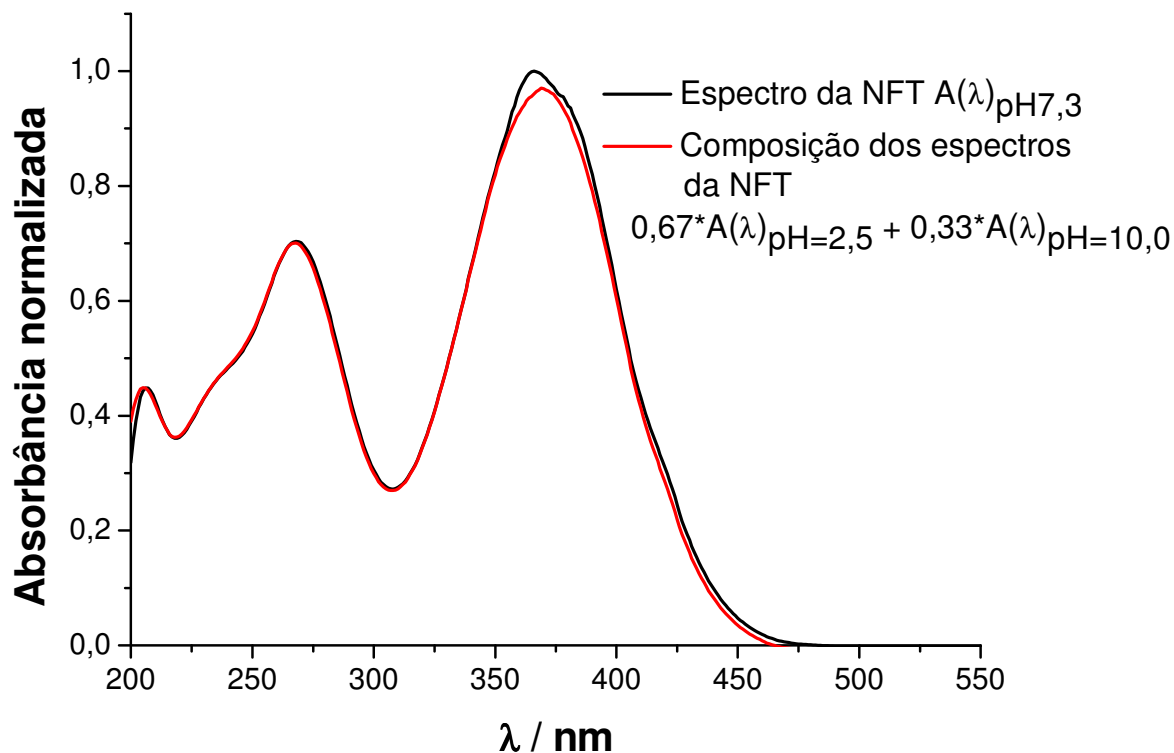
**Gráfico 7.6** Espectro normalizado de absorção em função da concentração da NFT. Ausência da agregação da NFT nessas faixas de concentrações no pH 10,0.

Portanto, os perfis dos espectros tanto em pH 2,5 quanto em pH 10,0 não mudam com o aumento de concentração da NFT, indicando ausência de sua agregação.

A convolução dos espectros em vários pHs ( $A(\lambda)_{\text{pH}}$ ) conforme a equação 8.1.5

$$A(\lambda)_{\text{pH}} = a \cdot A(\lambda)_{\text{pH}=2,5} + (1-a) \cdot A(\lambda)_{\text{pH}=10,0} \quad (8.1.5)$$

em que  $A(\lambda)_{\text{pH}=2,5}$  e  $A(\lambda)_{\text{pH}=10}$ , são os espectros em pH 2,5 e pH 10,0, respectivamente, e  $a$  é um coeficiente de contribuição da espécie protonada (Gráfico 7.7), demonstrou que há a coexistência somente entre estas duas espécies em região  $2,5 \leq \text{pH} \leq 10,0$ .



**Gráfico 7.7** Comparação entre a convolução (—) do espectro normalizado de absorção da NFT e seu respectivo espectro experimental (—) no pH 7,3 (próximo  $pK_2$ ).

## 7.2 Estudos da dinâmica de fototransformação da NFT

O estudo da dinâmica de fototransformação é uma etapa de extrema importância para a caracterização de compostos a serem empregados em FQT. Ao estudarmos a dinâmica de fototransformação em função do pH, da força iônica, da concentração da NFT e da presença do oxigênio molecular, podemos encontrar as fases características da fototransformação do composto nessas condições bem como o número de componentes presentes na determinada condição, além de afirmar que estes possuem dependência, ou não, em relação ao parâmetro estudado.

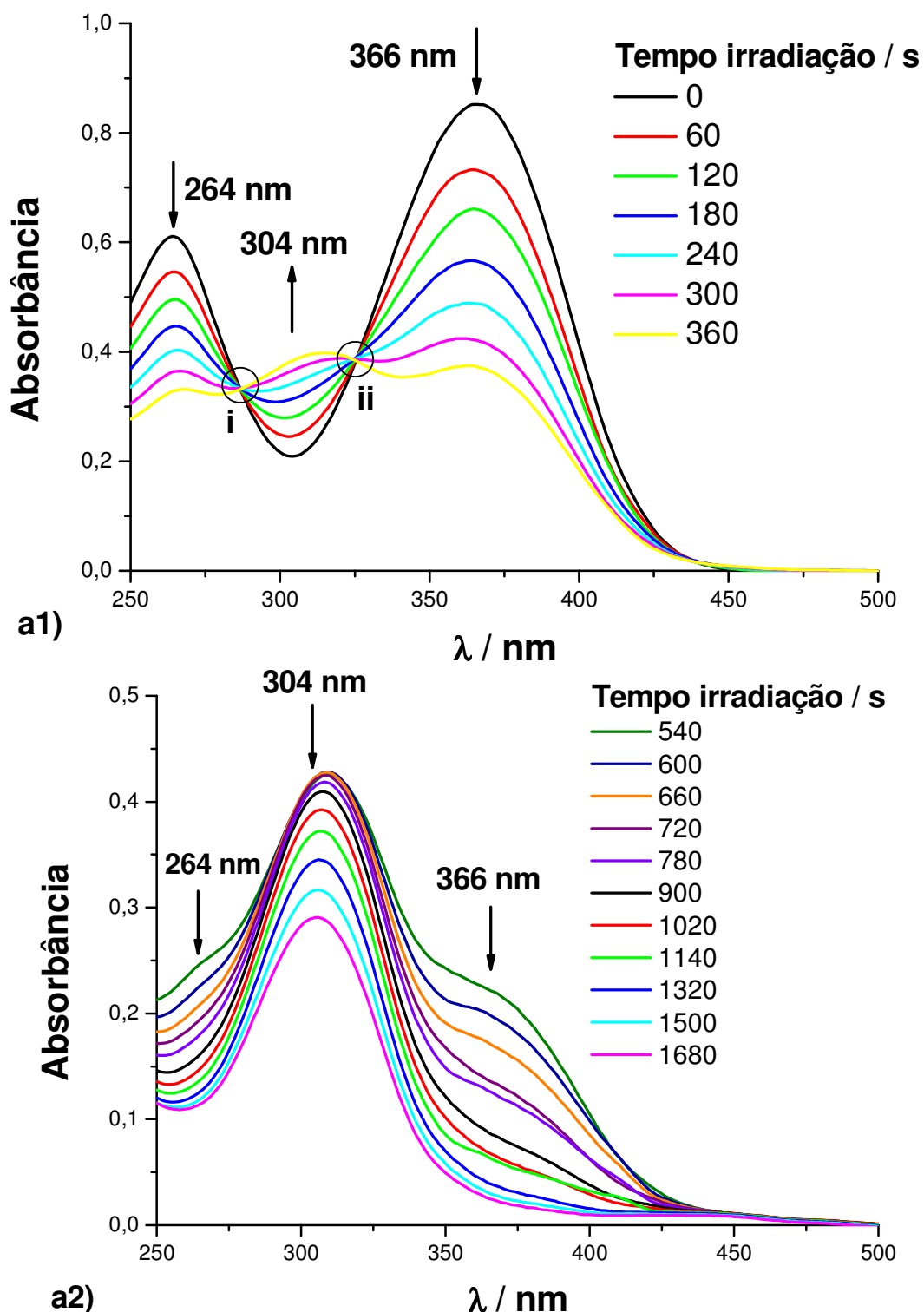
### 7.2.1 Efeito do pH

Inicialmente, estudamos a dependência da dinâmica de fototransformação da NFT em soluções aquosas em função do pH. A faixa de pH escolhida foi  $2,5 \leq \text{pH} \leq 10,0$ , na qual teríamos a presença de duas espécies – monoprotionada e desprotonada – previamente determinadas a partir do ponto  $\text{pK}_2$  (próximo pH fisiológico), cujo conteúdo relativo depende do pH. Mostraremos, também, como as variações da força iônica e da concentração da NFT podem influenciar na sua taxa de fototransformação.

Na primeira etapa do estudo, estudando o efeito do pH, utilizamos como sistema de irradiação um projetor de slides equipado com uma lâmpada de tungstênio (150 W, potência nominal) sem o uso de filtro externo (ver item 6.1 Cinéticas da fotodecomposição). Irradiaram-se as amostras até não mais ser observado qualquer mudança espectral na banda principal com o aumento do tempo de irradiação, garantindo, dessa forma, que toda a NFT foi fototransformada e que somente os fotoprodutos da fototransformação estivessem presentes na solução.

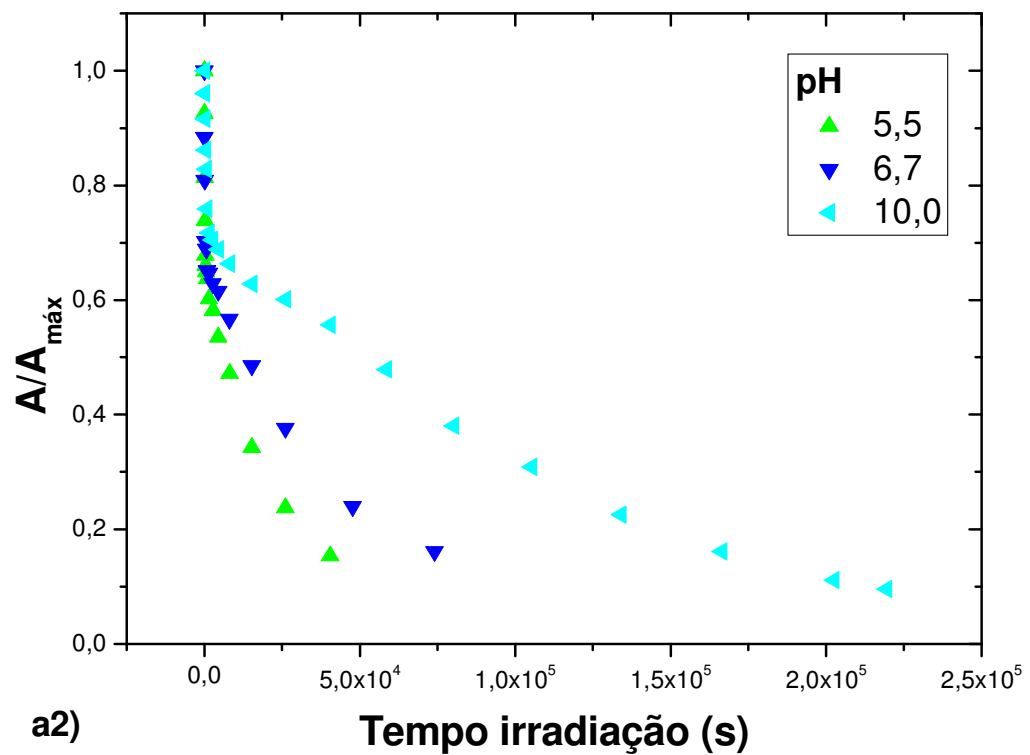
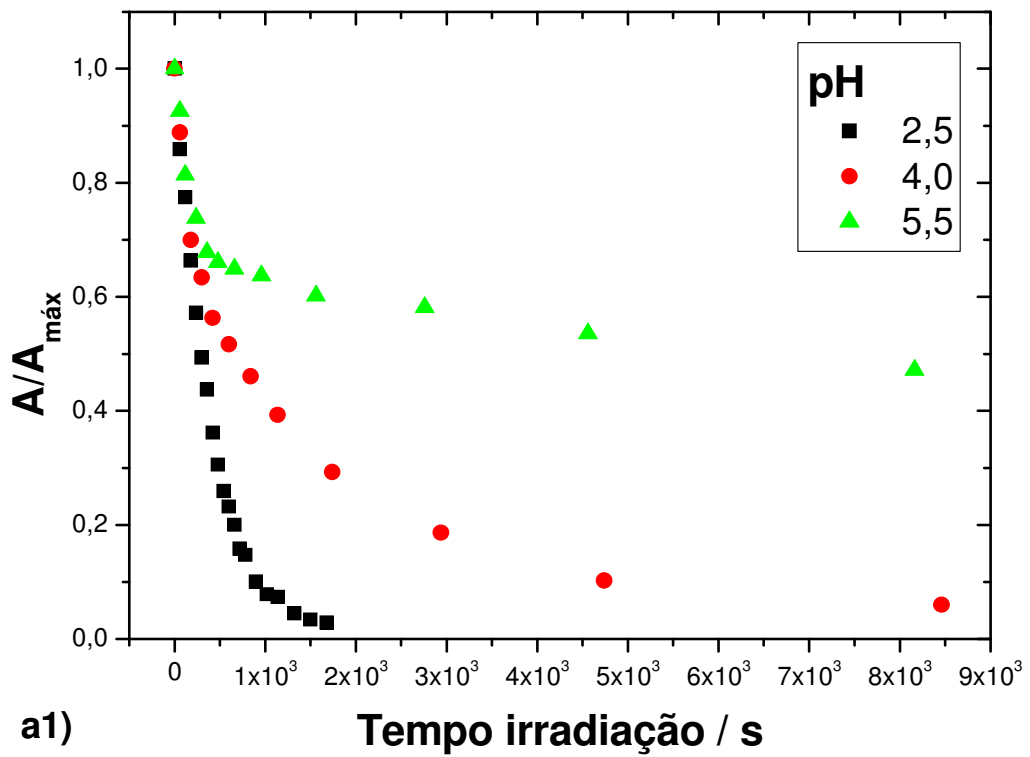
Os resultados obtidos são apresentados nos Gráficos 7.8-11, abaixo, nos quais mostram uma mudança no espectro de absorção da NFT em função do tempo de irradiação, e das curvas de decaimento de absorção de NFT num comprimento de onda fixo em função do tempo de irradiação nos pHs estudados.

A análise mostra que em toda faixa do pH estudado sob irradiação, além de diminuição da intensidade das bandas de absorção da NFT com máximos característicos em  $\approx 270\text{-}280\text{ nm}$  e  $360\text{-}390\text{ nm}$ , há a formação de um novo máximo de absorção  $\approx 300\text{-}310\text{ nm}$  (Gráfico 7.8 e 7.9), que associamos com a formação de um fotoproduto. A existência de pontos isobésticos (Gráfico 7.8 – a1) nos tempos iniciais de fototransformação indicou presença na solução somente de duas espécies absorvedoras em equilíbrio: NFT e seu fotoproduto. Com o aumento do tempo de irradiação o ponto isobéstico desaparece, indicando o começo da fototransformação do fotoproduto (Gráfico 7.8 – a2).



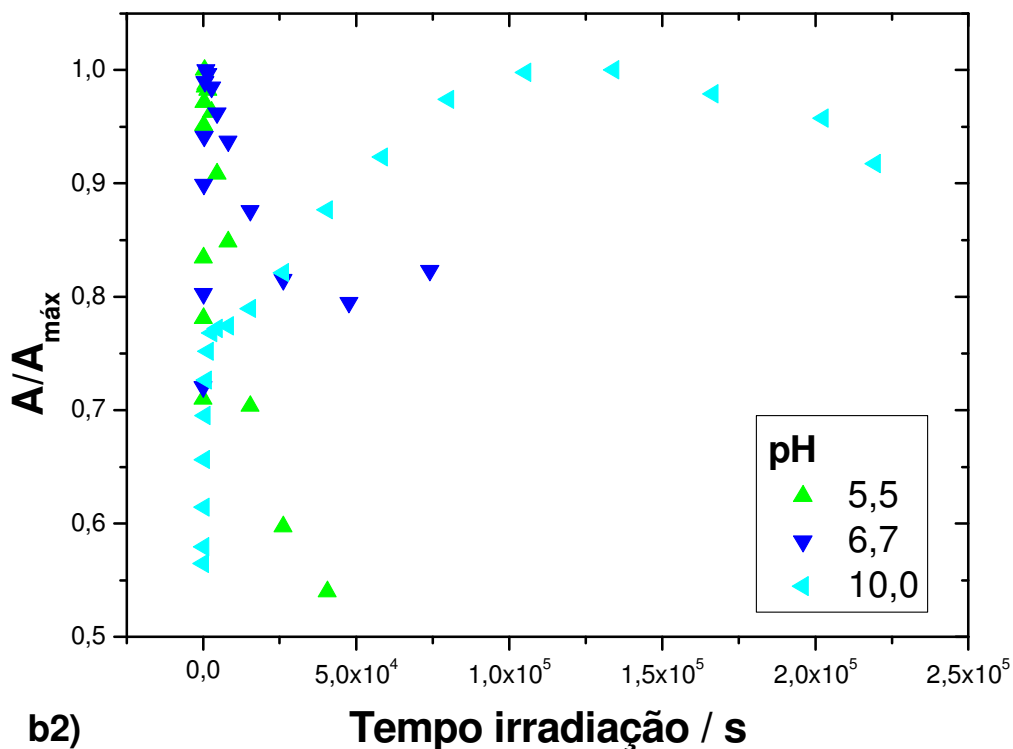
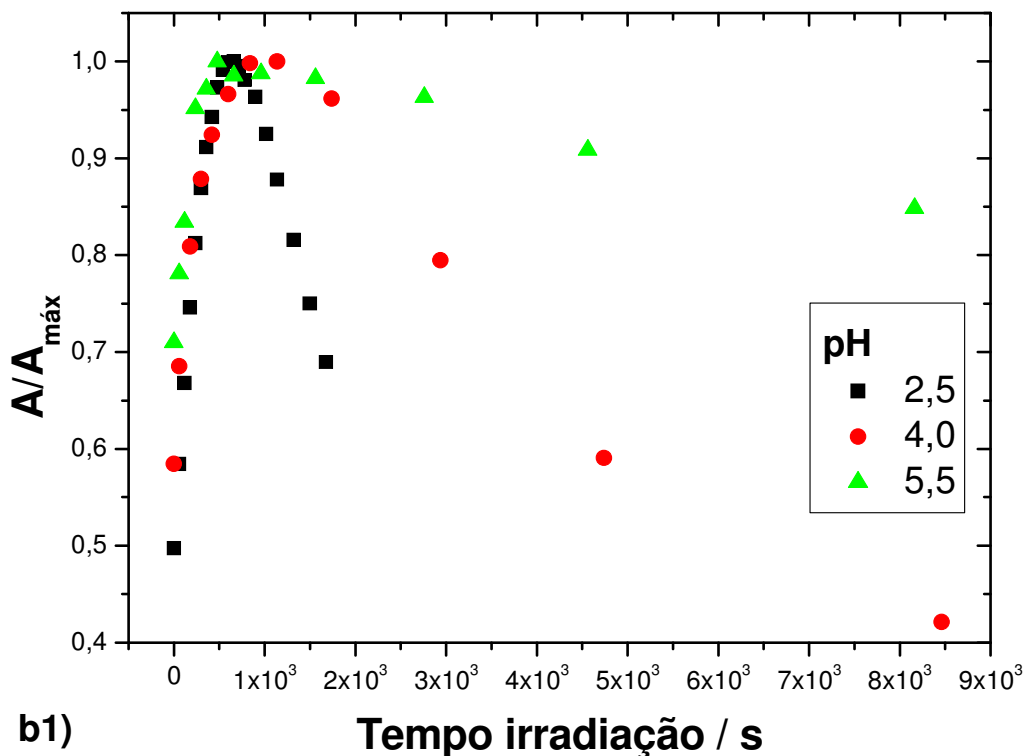
**Gráfico 7.8** Formação dos pontos isobésticos em  $i = 286 \text{ nm}$  e  $ii = 326 \text{ nm}$  após fototransformação da NFT no pH 2,5 (a1) com consequente destruição (a2) dos pontos isobésticos após  $t = 360 \text{ s}$ .

Em pH 2,5 observamos em  $\lambda = 366 \text{ nm}$  decaimento mono-exponencial da absorção da NFT (Gráfico 7.9 – a1) e em  $\lambda = 304 \text{ nm}$  observamos a acumulação e, na sequência, a fotodecomposição do fotoproduto (Gráfico 7.10 – b1). Em  $\text{pH} \geq 4,0$  na região  $\lambda > 350 \text{ nm}$  observa-se o decaimento biexponencial da absorção sob irradiação (Gráfico 7.9 – a1).



**Gráfico 7.9** Cinéticas normalizadas de decaimento da absorção das amostras da NFT em função do tempo da irradiação para os pHs 2,5, 4,0 e 5,5 (a1) e pHs 5,5, 6,7 e 10,0 (a2). Absorbância em  $\lambda = 366$  nm para pH  $\leq 6,7$  e em  $\lambda = 386$  nm para pH = 10,0.

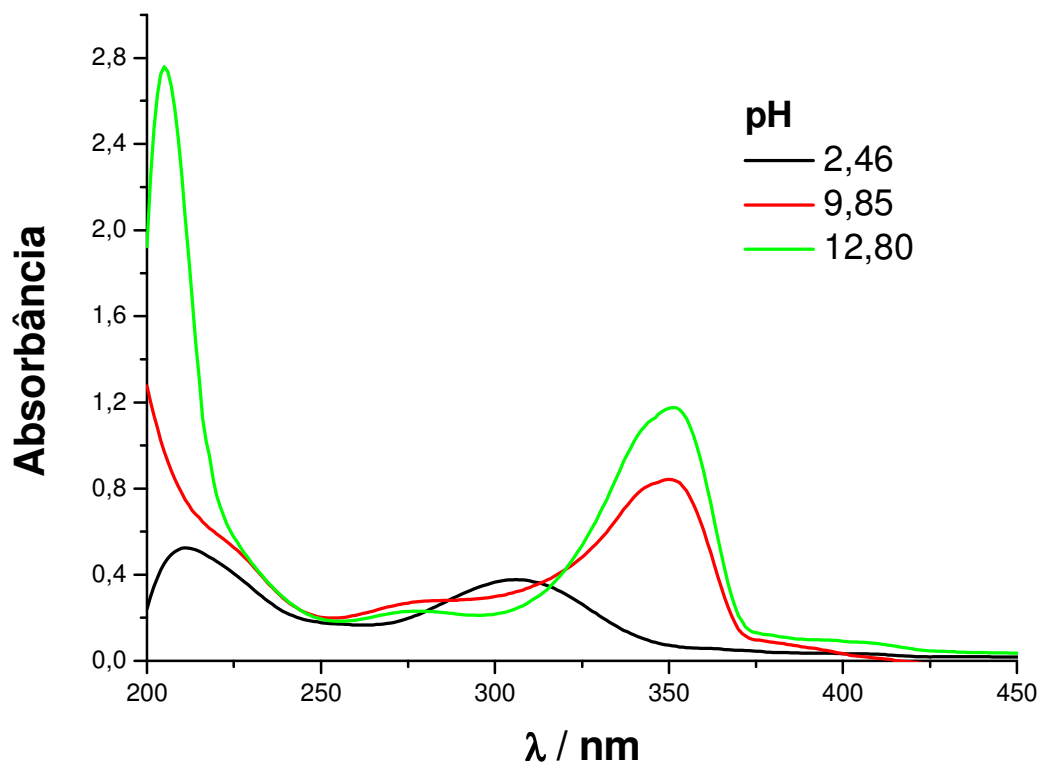




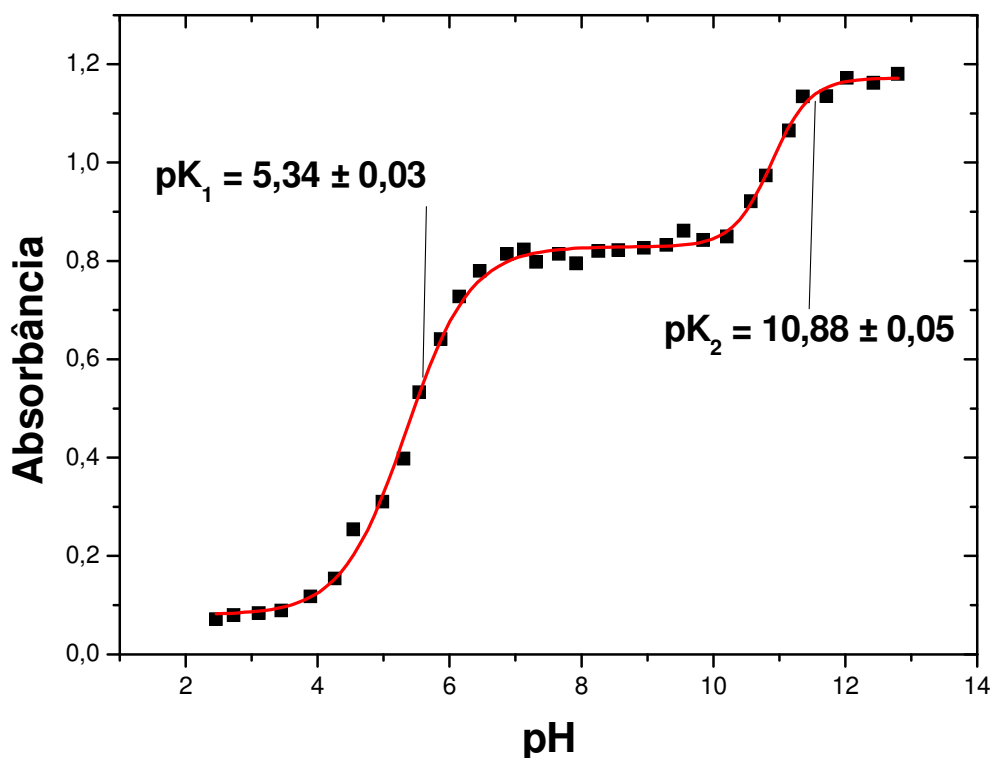
**Gráfico 7.10** Cinéticas normalizadas de decaimento da absorção das amostras da NFT em função do tempo da irradiação para os pHs 2,5, 4,0 e 5,5 (b1) e os pHs 5,5, 6,7 e 10,0 (b2). Absorbância em  $\lambda = 304$  nm para  $\text{pH} \leq 6,7$  e em  $\lambda = 316$  nm para  $\text{pH} = 10,0$ .

A análise do espectro de fotoproduto isolado em pH 2,5 (Gráfico 7.11) mostrou que sua absorção em região  $\lambda > 350$  nm é baixa. Por isso, os espectros da NFT e este fotoproduto não sobrepõem-se em  $\lambda = 366$  nm. As medidas do espectro do fotoproduto em função do pH

(Gráfico 7.12) mostraram que na região do  $2,5 \leq \text{pH} \leq 10,0$  ele sofre a protonação com ponto  $\text{p}K_1 \cong 5,3$ . O espectro da forma não protonada do fotoproduto é mais largo do que a protonada, e seu máximo se desloca para comprimentos de onda maiores. Por isso, em  $\text{pH} \geq 4,0$  acontece uma sobreposição dos espectros da NFT e do fotoproduto, e a cinética de decaimento da absorção se torna biexponencial. Além disso, a cinética de fotodecomposição do fotoproduto se torna mais lenta conforme o aumento do pH.



**Gráfico 7.11** Espectros de absorção do fotoproduto em função do pH. O fotoproduto possui três estados de protonação: mono protonado para  $5,3 < \text{p}K_1$ , não protonado para  $5,3 \leq \text{p}K_1 \leq 10,9$  e desprotonado  $\text{p}K_2 > 10,9$ .



**Gráfico 7.12** Perfil da intensidade de absorção do fotoproduto em função do pH (■)  $\lambda = 350$  nm. O fotoproduto possui dois pontos de  $pK_a$ :  $pK_1 \cong 5,3$  e  $pK_2 \cong 10,9$ .

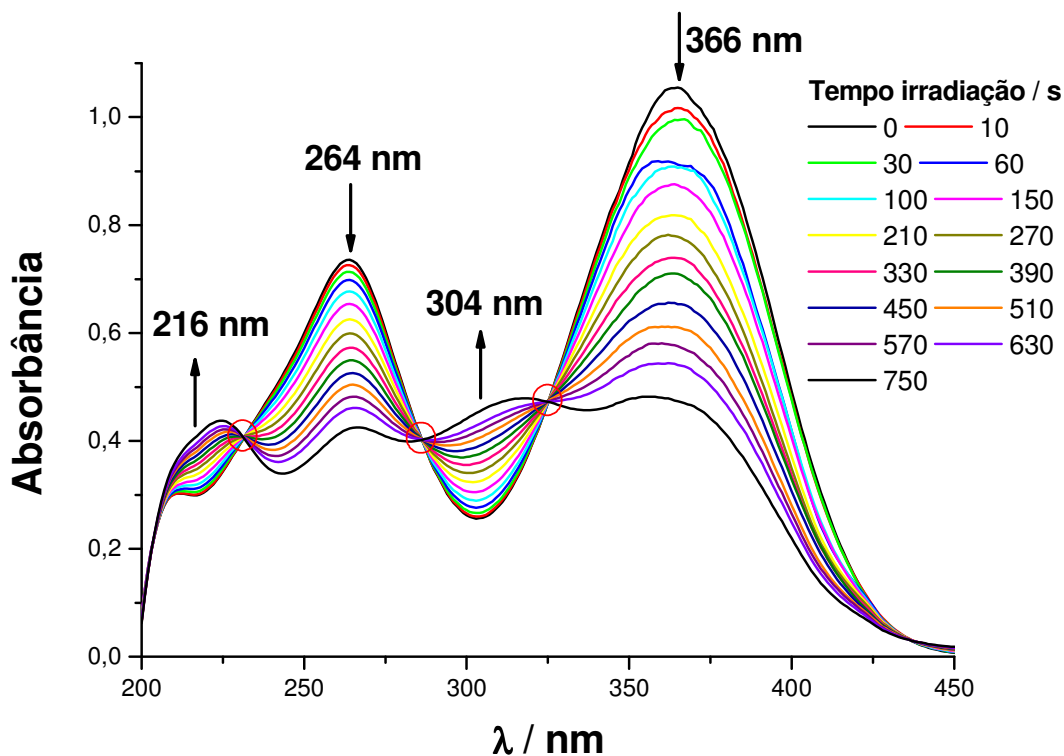
A análise dos espectros próximo ao ponto de  $pK_a$  (Gráfico 7.7) demonstrou que há coexistência de duas formas da NFT: monoprotônica e não protonada. Para estudar separadamente as fotorreações dessas duas formas, a partir de agora, nosso estudo se limitará aos pH's 2,5 e 10,0.

Com o intuito de aprofundar os estudos sobre a dinâmica de fototransformação da NFT e estudar a cinética de formação e fototransformação do fotoproduto, irradiamos as amostras utilizando um sistema equipado com uma lâmpada de xenônio (75,0 W, potência nominal) e um filtro, item 6.1 Cinéticas da fotodecomposição. Dessa forma, conseguiríamos fotolisar, praticamente só NFT, utilizando o filtro, sem fotolisar o produto e, depois, irradiar com maior eficiência a região  $\lambda \geq 320$  nm quando o filtro é retirado, aumentando a taxa de formação e fototransformação do fotoproduto em relação a da NFT.

Nossa análise será concentrada na tentativa de demonstrar que o fotoproduto primário também sofre fototransformação resultando em um ou mais fotoprodutos e, caso ocorra, se estes fotoprodutos secundário e/ou terciário também sofrem fototransformação.

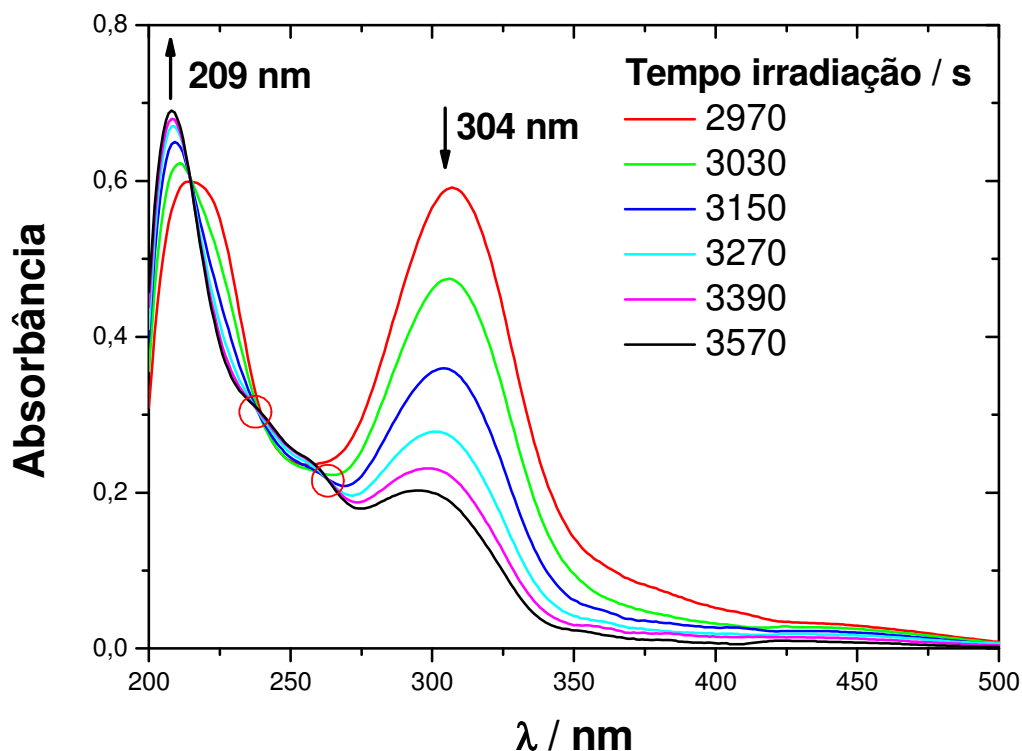
Analisando as mudanças espectrais durante a fotólise com filtro no pH 2,5 encontramos três pontos isobésticos em  $\lambda = 231$  nm,  $\lambda = 286$  nm e  $\lambda = 326$  nm (Gráfico

7.13), que se conservam até os tempos de irradiação  $t = 750$  s, mostrando que, até este momento, temos a transformação da NFT somente em um fotoproduto (FP1), e a fotólise deste produto ainda é desprezível.



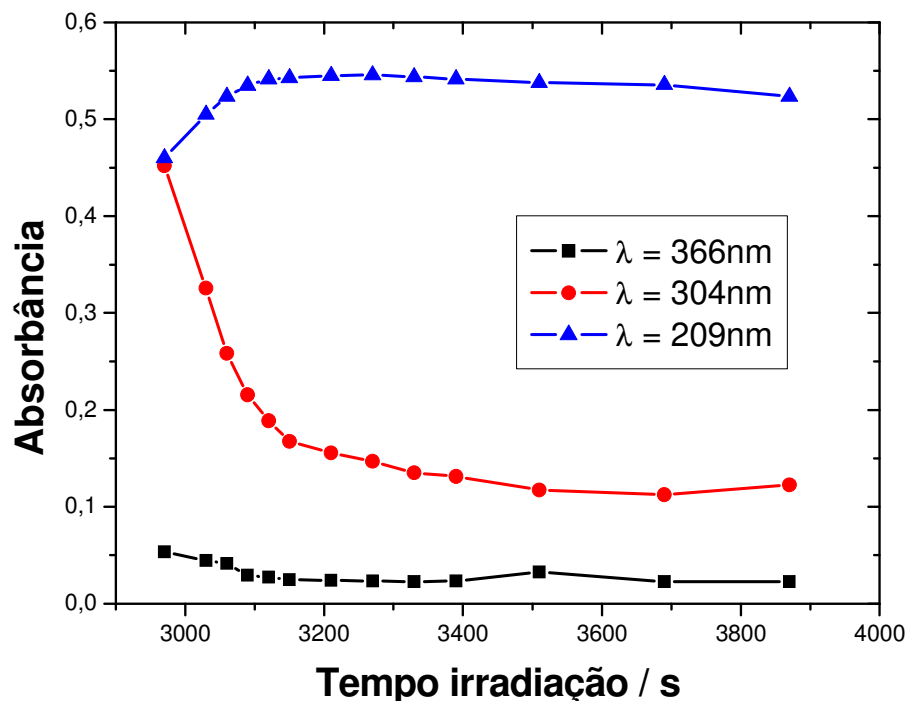
**Gráfico 7.13** Pontos isobésticos (○) em  $\lambda = 231$  nm,  $\lambda = 286$  nm e  $\lambda = 326$  nm após a fototransformação da NFT em solução de pH 2,5 com tempo total de irradiação com filtro igual a 750 s. Em  $t = 750$  s temos a coexistência de duas espécies: NFT + FP1.

O tempo de conservação dos pontos isobésticos neste experimento é muito maior do que nos experimentos descritos anteriormente, pois o filtro utilizado diminui a excitação do produto, cujo espectro de absorção está deslocado para região UV em comparação com o da NFT. Entretanto, com o aumento do tempo de irradiação, os pontos isobésticos se destroem, mostrando o começo de fototransformação do FP1 em fotoproduto 2 (FP2), como ilustrado no Gráfico 7.14. A absorbância de FP1 atingiu o máximo em  $t = 2970$  s e começou a cair em favor da formação de FP2 (Gráfico 7.15), que tem pico característico de absorção em 209 nm.

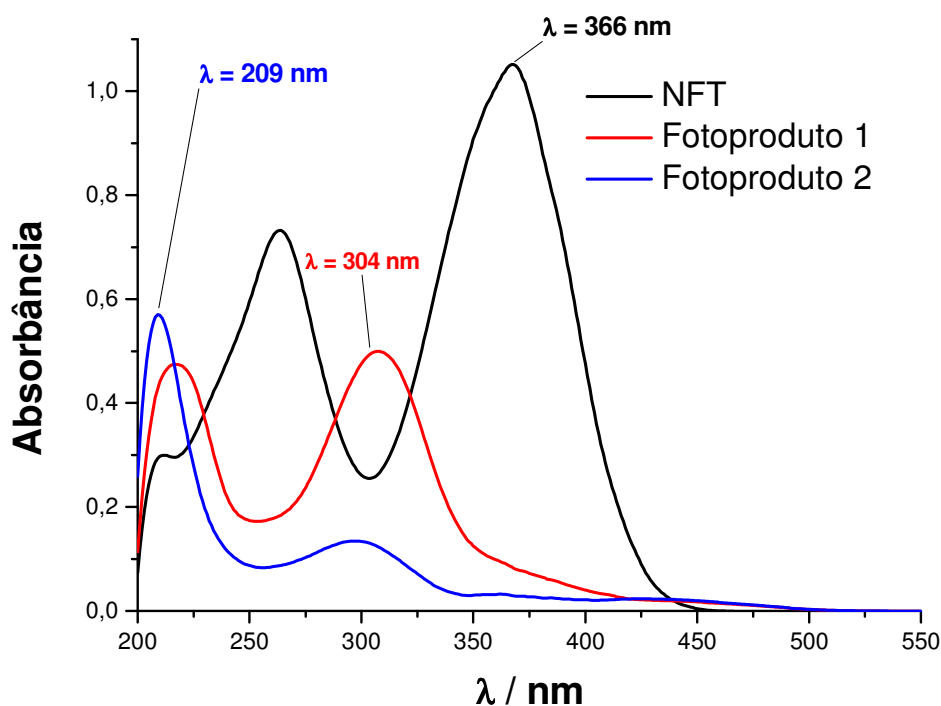


**Gráfico 7.14** Pontos isobésticos (○) em  $\lambda = 238$  nm e  $\lambda = 264$  nm após a quase total fototransformação da NFT em pH 2,5 com tempo total de irradiação sem filtro igual a 3570 s. Fotodecomposição do FP1 em FP2 ( $\lambda_{\text{máx}} = 209$  nm) em  $t \geq 2970$  s.

Contudo, a velocidade de fototransformação do FP1 é muito menor quando comparada com a da NFT, que pode ser associado com menor probabilidade de sua excitação devido ao deslocamento do seu espectro para região UV. Esta hipótese foi comprovada quando irradiamos a amostra com FP1 em região  $\lambda > 320$  nm, tirando o filtro (Gráfico 7.15). Nesse caso, a fototransformação  $\text{FP1} \xrightarrow{h\nu} \text{FP2}$  foi muito mais profunda e rápida (Gráfico 7.15), mas não foi observada nos espectros de fotoprodutos (Gráfico 7.16), mostrando que, realmente, FP1 se transforma em FP2 e este último é fotoestável ou de fotodecomposição muito lenta ( $k_3 \ll k_2$ ).



**Gráfico 7.15** Cinéticas de decaimento da absorção em  $\lambda_{\text{máx}} = 366\text{ nm}$  (■),  $\lambda_{\text{máx}} = 304\text{ nm}$  (●) e  $\lambda_{\text{máx}} = 209\text{ nm}$  (▲) em função do tempo da irradiação no pH 2,5. O tempo total de irradiação da amostra foi de  $t = 3870\text{ s}$  com a retirada do filtro.



**Gráfico 7.16** Espectros de absorção em pH 2,5 para (—) NFT com  $\lambda_{\text{máx}} = 366\text{ nm}$ , (—) Fotoproduto 1 com  $\lambda_{\text{máx}} = 304\text{ nm}$  e (—) Fotoproduto 2 com  $\lambda_{\text{máx}} = 209\text{ nm}$ .

Finalmente, podemos concluir que em pH 2,5 a NFT está sofrendo uma sequência de fototransformações, que pode ser apresentada conforme o esquema:



Este esquema pode ser descrito com as seguintes equações diferenciais:

$$d[NFT]/dt = -k_1[NFT] \quad (7.2.1.2)$$

$$d[FP1]/dt = k_1[NFT] - k_2[FP1] \quad (7.2.1.3)$$

$$d[FP2]/dt = k_2[FP1] \quad (7.2.1.4)$$

em que [NFT], [FP1] e [FP2] são as concentrações de NFT, FP1 e FP2, respectivamente, e  $k_1$  e  $k_2$  são as constantes (taxas) de fototransformações, que dependem das condições de irradiação.

As soluções dessas três equações diferenciais são triviais e comumente encontradas em livros texto de cálculo diferencial e integral e/ou cinética química [55]. Portanto,

$$[NFT] = [NFT]_0 e^{-k_1 t} \quad (7.2.1.5)$$

$$[FP1] = \frac{[NFT]_0 k_1}{(k_2 - k_1)} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \text{ para } [FP1]_0 = 0 \quad (7.2.1.6)$$

Usando o balanceamento das massas na reação 7.2.1.1 temos

$$[NFT] + [FP1] + [FP2] = [NFT]_0, \text{ em } t = 0 \text{ quando a NFT é a única espécie presente}$$

$$\therefore [FP2] = [NFT]_0 - [NFT] - [FP1]$$

Dessa forma, substituindo as equações 8.2.1.5, 8.2.1.6 em [FP2], temos

$$[FP2] = [NFT]_0 \left[ 1 + \frac{1}{(k_1 - k_2)} (k_2 e^{-k_1 t} - k_1 e^{-k_2 t}) \right] \quad (7.2.1.7)$$

O ajuste das cinéticas experimentais usando as equações 7.2.1.5-7 mostrou que o esquema 7.2.1.1 descreve adequadamente o processo de fotodecomposição da NFT, ou seja, esses processos são monomoleculares ou pseudomonomoleculares, caso exista na

amostra outro reagente em concentrações muito maiores do que NFT, por exemplo, o oxigênio.

As constantes características dos processos estão apresentadas na Tabela 7.2.

**Tabela 7.2** Valor médio das constantes da queda e da acumulação da NFT e dos produtos FP1 e FP2 durante a fotólise em função do pH.

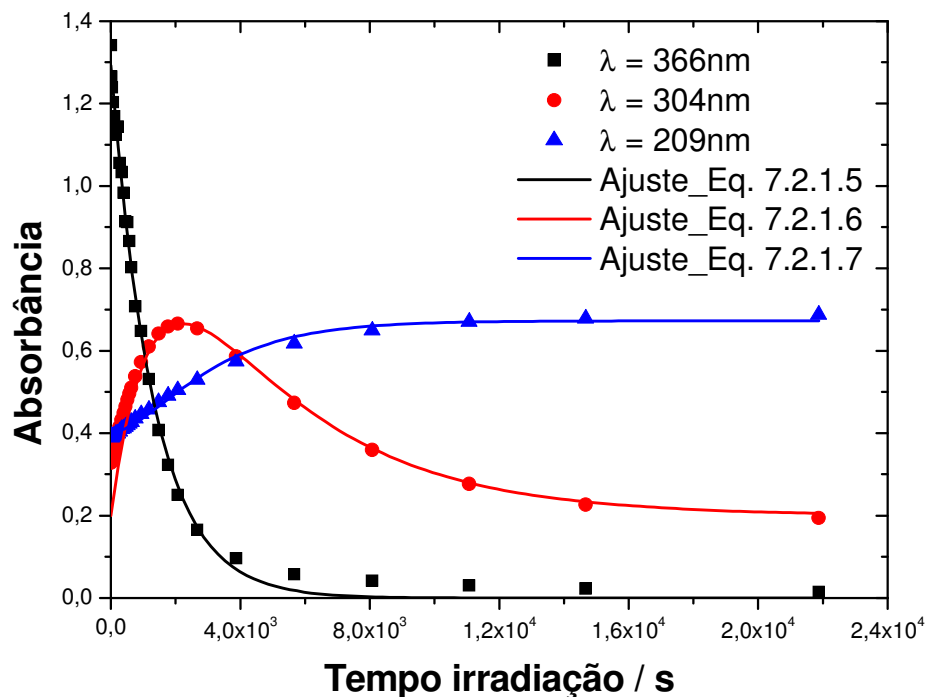
pH	$\langle k_1 \rangle / s^{-1}$		$\langle k_2 \rangle / s^{-1}$	
	NFT, queda	FP1, acumulação	FP1, queda	FP2, acumulação
2,5	$(9,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(9,3 \pm 0,7) \times 10^{-4}$	$(2,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$
10,0	$(8,1 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(8,2 \pm 0,8) \times 10^{-4}$	$(3,0 \pm 0,7) \times 10^{-6}$	$(6,6 \pm 0,3) \times 10^{-6}$

As equações acima são apresentadas segundo as concentrações das espécies. Porém, essa abordagem não é a mais correta porque a única espécie que temos na concentração exata é a NFT, pois é apenas dela que conhecemos o coeficiente de absorção molar,  $\epsilon$ . Por não conseguir determinar de forma direta a concentração dos fotoprodutos, um gráfico de concentração em função do tempo de irradiação estaria equivocado, já que a formação e fotodecomposição dos fotoprodutos se dão de forma simultânea a da NFT. Logo, é impossível a determinação dos seus respectivos coeficientes de absorção molar através de espectroscopia de absorção UV-Visível, sendo necessário o uso de técnicas complementares como HPLC, por exemplo.

Do Gráfico 7.17 conseguimos obter de forma direta o valor de  $k_1$  quando  $t_{\text{irrad}} \rightarrow \infty$ , pois  $[NFT] \rightarrow 0$ . O valor de  $k_2$  foi determinado indiretamente através de um ajuste não linear dos dados experimentais a partir da equação 7.2.1.6.

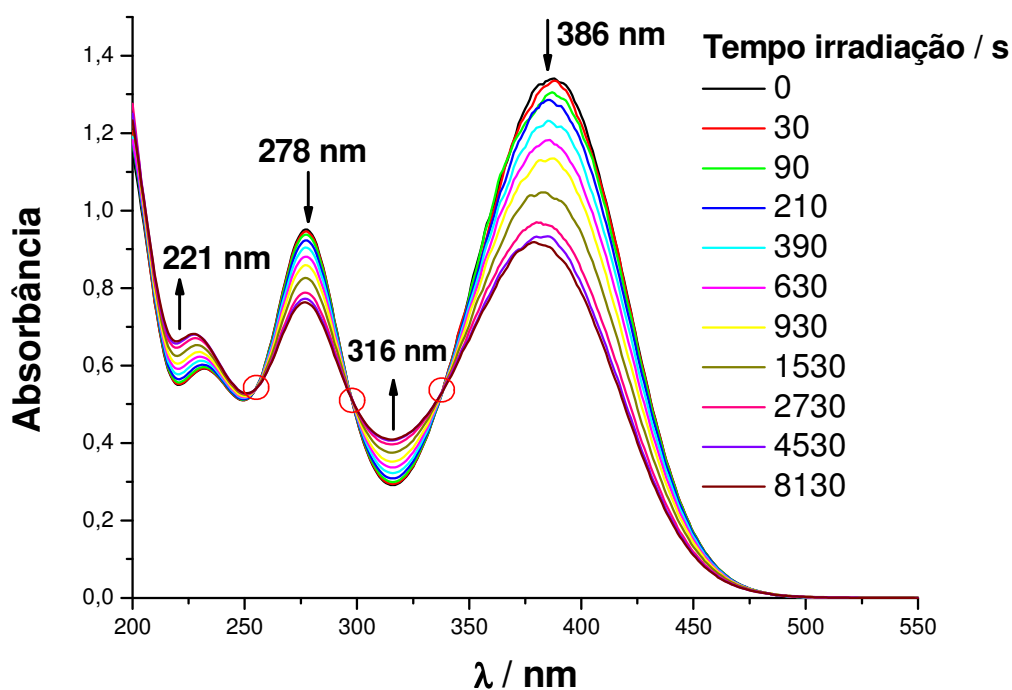
A concentração do FP2 com aumento do tempo da irradiação ( $t_{\text{irrad}} \rightarrow \infty$ ) deve atingir a concentração inicial da NFT,  $[FP2]_{\infty} = [NFT]_0$ . Entretanto, nos gráficos Absorbância  $\leftrightarrow$  tempo, não observamos esta igualdade devido a diferença de coeficientes de absorção molar  $\epsilon_{FP2}$  e  $\epsilon_{NFT}$ ,  $A_{FP2} = [FP2]_{\infty} \neq A_{NFT} = \epsilon_{NFT}[NFT]_0$ .



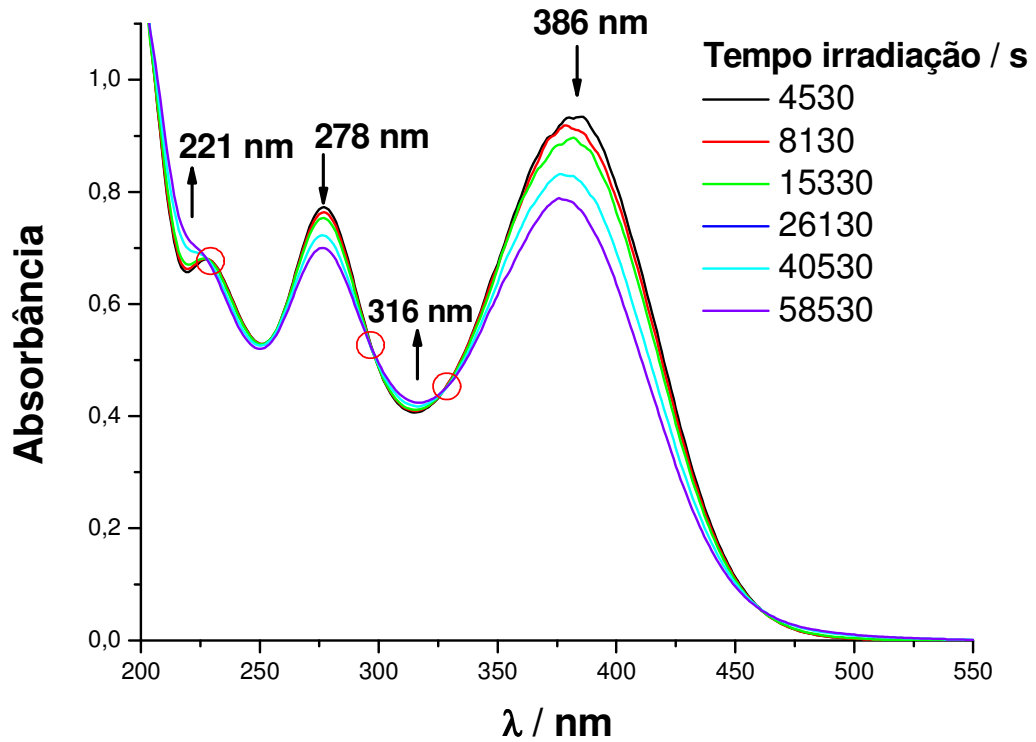


**Gráfico 7.17** Cinéticas de decaimento da absorção em  $\lambda_{máx} = 366 \text{ nm}$  (■),  $\lambda_{máx} = 304 \text{ nm}$  (●) e  $\lambda_{máx} = 209 \text{ nm}$  (▲) em função do tempo da irradiação em pH 2,5. O tempo total de irradiação da amostra foi de  $t = 21970 \text{ s}$  utilizando filtro. Os ajustes não lineares foram feitos de acordo com as equações descritas acima.

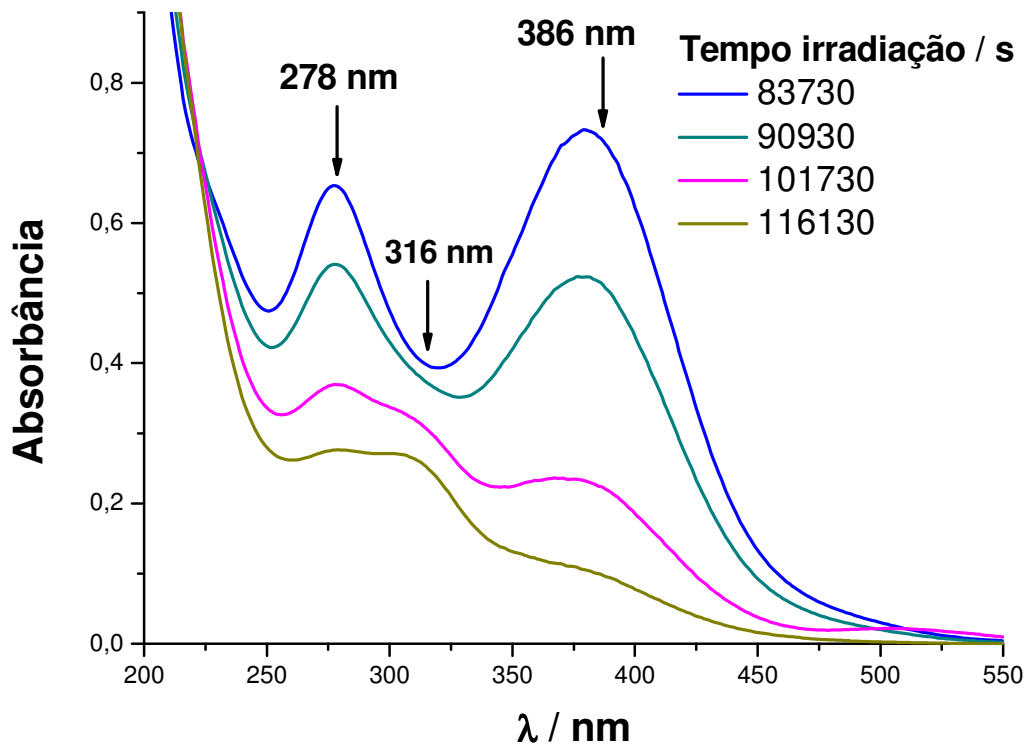
Procedendo de maneira semelhante para o pH 10,0, obtivemos resultados semelhantes: a NFT se fotodecompõe formando o fotoproduto FP1 que, por sua vez, sofre a fototransformação em fotoproduto FP2 (Gráficos 7.18-20).



**Gráfico 7.18** Pontos isobésticos (○) de NFT + fotoproduto em  $\lambda = 255 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 298 \text{ nm}$  e  $\lambda = 338 \text{ nm}$  após a fototransformação da NFT em solução de pH 10,0 com tempo total de irradiação igual a 8130 s utilizando filtro.



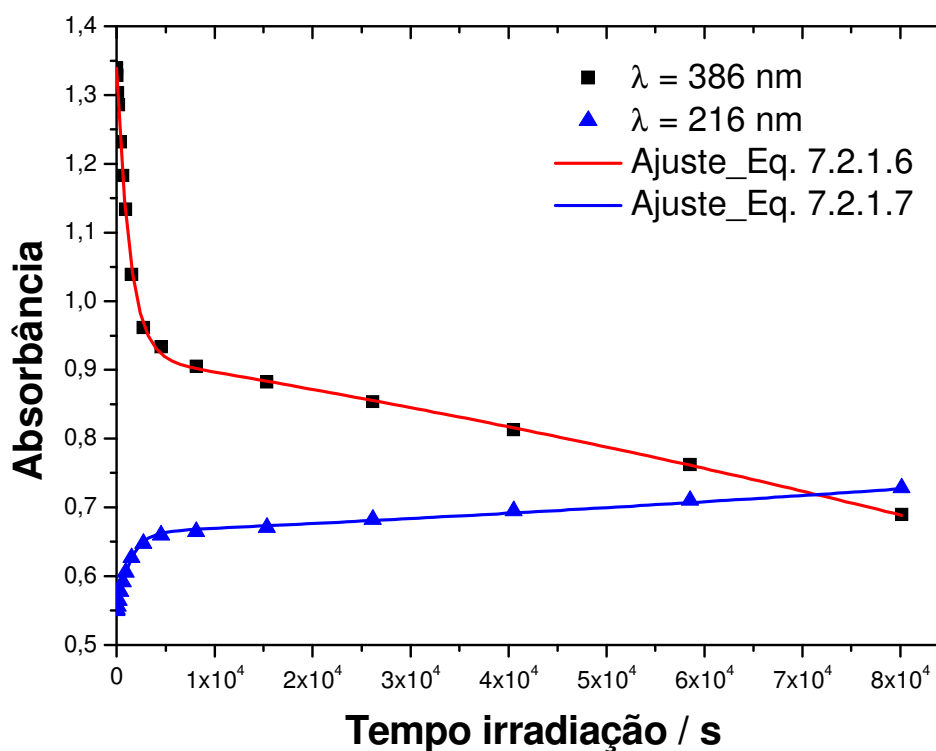
**Gráfico 7.19** Pontos isobésticos (○) de FP1 + FP22 em  $\lambda = 228 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 298 \text{ nm}$  e  $\lambda = 328 \text{ nm}$  após a fototransformação da NFT em solução de pH 10,0 com tempo total de irradiação igual a 58530 s utilizando filtro.



**Gráfico 7.20** Espectros de absorção da NFT em pH 10,0 após a irradiação sem filtro da amostra.

Entretanto, em pH 10,0 não conseguimos observar a cinética mono-exponencial de fotodecomposição da NFT, pois o espectro de FP1 está deslocado para comprimentos de onda maiores se compararmos com pH 2,5, e seu espectro sobrepõem-se com o espectro da NFT em toda sua região espectral.

Analisando as cinéticas de fototransformação (Gráfico 7.21), em acordo com a equação 7.2.1.5, observamos que as constantes características de fototransformação da NFT em pH 10,0 e pH 2,5 nas mesmas condições de irradiação são próximas (Tabela 7.2). Entretanto, no pH 10,0 o FP1 possui dinâmica de fototransformação mais lenta (Gráfico 7.21) em relação ao pH 2,5. Isto não pode acontecer devido ao deslocamento do espectro de absorção dele, pois o espectro se desloca para região de comprimentos de onda maiores e coincide melhor com o espectro de emissão da fonte.



**Gráfico 7.21** Cinéticas de decaimento da absorção para  $\lambda_{\text{máx}} = 386 \text{ nm}$  (■) e  $\lambda_{\text{máx}} = 216 \text{ nm}$  (▲) em função do tempo da irradiação em pH 10,0. De acordo com a equação 7.2.1.5,  $k_{1 \text{ pH}=2,5} \approx k_{1 \text{ pH}=10,0}$  nas mesmas condições de irradiação.

### 7.2.2 Efeito da força iônica e da concentração da NFT

Estudando os espectros de absorção da NFT, não observamos a formação de seus agregados. Entretanto, nesse ponto da vista, a dinâmica de fototransformação poderia ser mais sensível. A presença de outros íons também pode afetar os processos de fototransformação da NFT. Com o intuito de determinar os efeitos de concentração e da presença de íons realizamos os estudos da concentração e da força iônica na dinâmica de fototransformação da NFT.

Os efeitos da força iônica foram estudados variando a concentração do tampão fosfato, conforme explicado no item 6.1.

Os estudos mostraram que nem mudanças de concentração nem o aumento da força iônica influenciam nos perfis dos espectros de fotoprodutos FP1 e FP2 em ambos os pHs.

Não observamos, também, qualquer influência significativa da força iônica nas constantes de fototransformação da NFT e do FP1 (Tabela 7.3).

**Tabela 7.3** Valor médio das constantes  $k_1$  e  $k_2$  nos pHs 2,5 e 10,0 em função da força iônica.

[PBS] / M	pH 2,5		pH 10,0	
	$\langle k_1 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_2 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_1 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_2 \rangle / s^{-1}$
<b>0,05</b>	$(4,4 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(1,6 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(9,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$
<b>0,10</b>	$(3,0 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(9,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$
<b>0,25</b>	$(7,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(9,4 \pm 0,6) \times 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^{-2}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$
<b>0,50</b>	$(7,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(8,8 \pm 0,3) \times 10^{-3}$	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-5}$
<b>1,00</b>	$(7,7 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(2,2 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(7,4 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(2,0 \pm 0,3) \times 10^{-5}$

O aumento de concentração da NFT produz alguma diminuição fraca das constantes de fototransformação tanto da NFT quanto de FP1 (Tabela 7.4). Entretanto, devido à ausência de algumas mudanças espectrais, associamos esse efeito ao aumento da absorção óptica das amostras, que diminui a profundidade da penetração da luz dentro da amostra e, assim, diminui a velocidade de fotorreação (efeito de filtro interno) [2].

**Tabela 7.4** Valor médio das constantes  $k_1$  e  $k_2$  nos pHs 2,5 e 10,0 em função da concentração da NFT.

[NFT] <sub>0</sub> / μM	pH 2,5		pH 10,0	
	$\langle k_1 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_2 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_1 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_2 \rangle / s^{-1}$
6,5	$(1,8 \pm 0,2) \times 10^{-3}$	$(1,9 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(2,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(7,6 \pm 3,2) \times 10^{-6}$
65,0	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(3,2 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(4,6 \pm 0,4) \times 10^{-6}$
100,0	$(8,1 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(3,1 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(5,3 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(3,4 \pm 0,2) \times 10^{-7}$

### 7.2.3 Efeito do oxigênio

O oxigênio molecular afeta o processo de fototransformação de alguns derivados de nitrofurano [3]. Com esse intuito, estudamos os espectros e a dinâmica de fototransformação da NFT na ausência do oxigênio e nas soluções saturadas com ar e saturadas com oxigênio puro sob pressão atmosférica.

A análise dos dados mostrou que o oxigênio não produz qualquer mudança nos espectros de fotoprodutos em ambos os pHs usados e nas constantes de fototransformação em pH 2,5 (Tabela 7.5). Em pH 10,0 o aumento de concentração do oxigênio diminuiu fracamente a constante  $k_1$ , e seu efeito na constante  $k_2$  foi fraco e não regular (Tabela 7.5).

**Tabela 7.5** Valor médio das constantes  $k_1$  e  $k_2$  nos pHs 2,5 e 10,0 em função da concentração do oxigênio molecular.

[O <sub>2</sub> ] / mM	pH 2,5		pH 10,0	
	$\langle k_1 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_2 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_1 \rangle / s^{-1}$	$\langle k_2 \rangle / s^{-1}$
~ 0	$(9,3 \pm 0,2) \times 10^{-4}$	$(2,4 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(1,1 \pm 0,1) \times 10^{-3}$	$(5,7 \pm 0,7) \times 10^{-6}$
~ 0,3 (atm)	$(7,7 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(2,4 \pm 0,3) \times 10^{-4}$	$(8,1 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(3,0 \pm 0,7) \times 10^{-6}$
~ 1,5	$(8,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(2,4 \pm 0,2) \times 10^{-5}$	$(7,3 \pm 0,1) \times 10^{-4}$	$(7,8 \pm 0,4) \times 10^{-6}$

### 7.3 Estudos da cinética liberação do NO<sup>•</sup> pela fotólise da NFT

Os derivados de nitrofurano são conhecidos como as fontes da fotoliberação do radical NO<sup>•</sup> [4,5,6,7,8]. Em [56] foi suposto que a NFT também é capaz de liberar NO<sup>•</sup>. Entretanto, os estudos desse processo não foram feitos ainda. Neste trabalho, realizamos os estudos da liberação de NO<sup>•</sup> em função do tempo durante a fotólise da NFT nas mesmas condições de irradiação e da composição das soluções a serem irradiadas, previamente descritos no item 7.2 Estudos da dinâmica de fototransformação da NFT.

Observamos que a NFT, sob ação de luz, libera o NO<sup>•</sup> em toda região de pH  $2,5 \leq \text{pH} \leq 10,0$ . Semelhante à cinética de fotodecomposição, a cinética de fotoliberação de NO<sup>•</sup> também depende do estado de protonação da NFT.

A curva de liberação do NO<sup>•</sup> em função do tempo da irradiação sem filtro em pH 2,5 está apresentada no Gráfico 7.22. Pode-se observar três fases na cinética de liberação do NO<sup>•</sup> neste caso: decaimento inicial, crescimento e segundo decaimento.

No Gráfico 7.23 estão apresentadas as curvas cinéticas da fototransformação da NFT e do fotoproduto FP1. Observa-se a semelhança dos perfis das curvas da liberação do NO<sup>•</sup> e a junção das curvas de fototransformação.

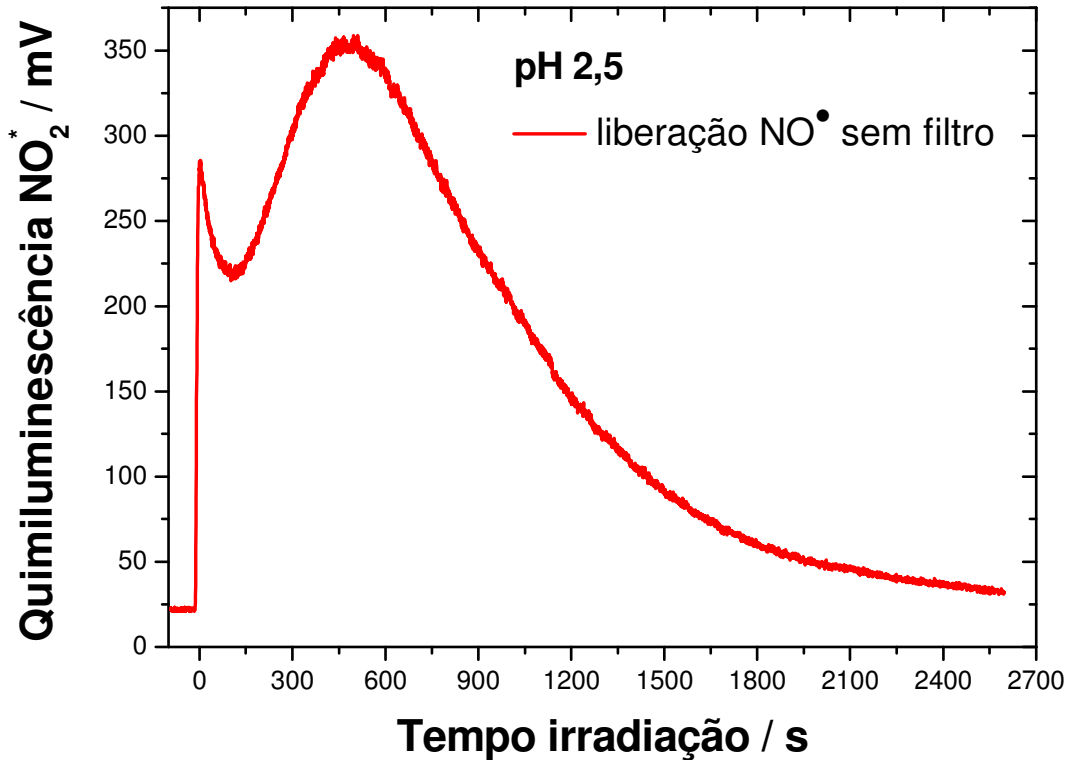


Gráfico 7.22 Liberação de NO• pela fotólise da NFT em função do tempo de irradiação no pH 2,5 sem filtro KOPP BLUE 5030.

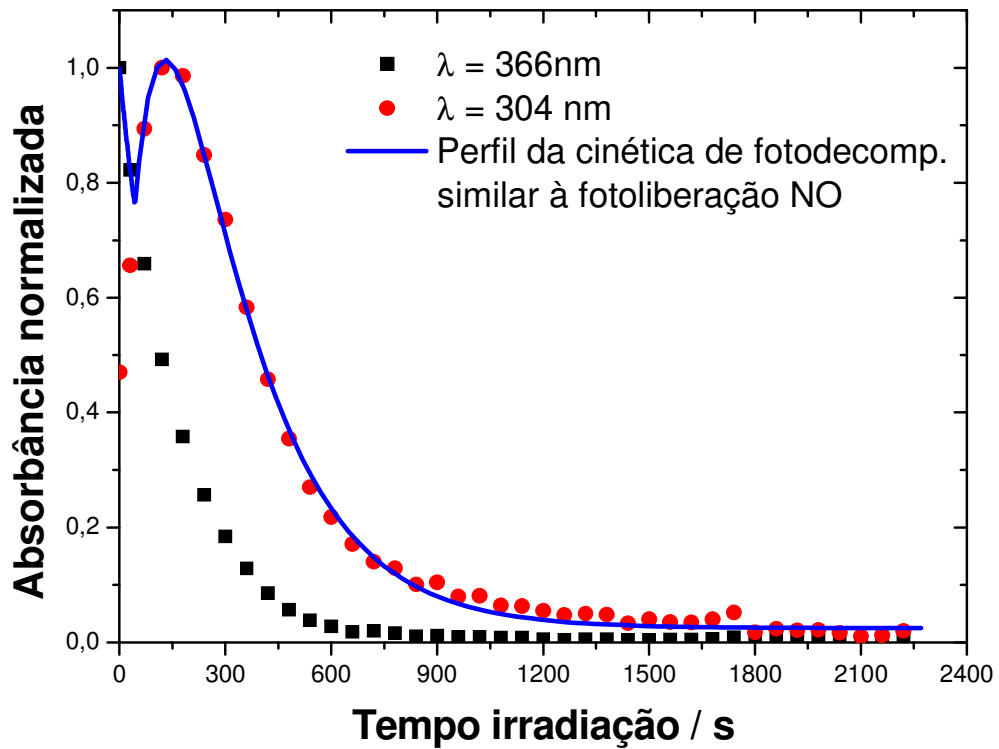
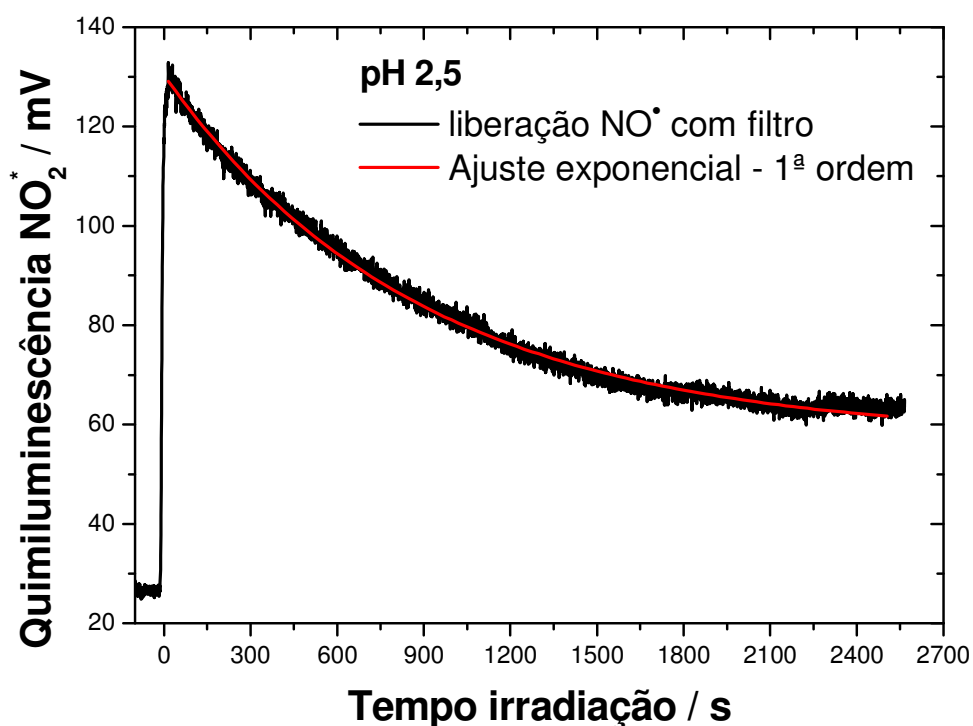


Gráfico 7.23 Perfil da cinética de fotodecomposição similar à fotoliberação do NO•.

Podemos concluir, baseando-se neste resultado, que o NO• é liberado tanto durante a fototransformação da NFT quando durante a fototransformação do fotoproduto FP1. Para

confirmar essa hipótese realizamos a fotólise da NFT com filtro (veja sessão 6.1 Cinéticas da fotodecomposição), pois neste caso o processo de fototransformação do FP1 é muito mais lento, e a cinética de liberação do  $\text{NO}^\bullet$  deve ser monoexponencial igual à cinética de fototransformação da NFT.

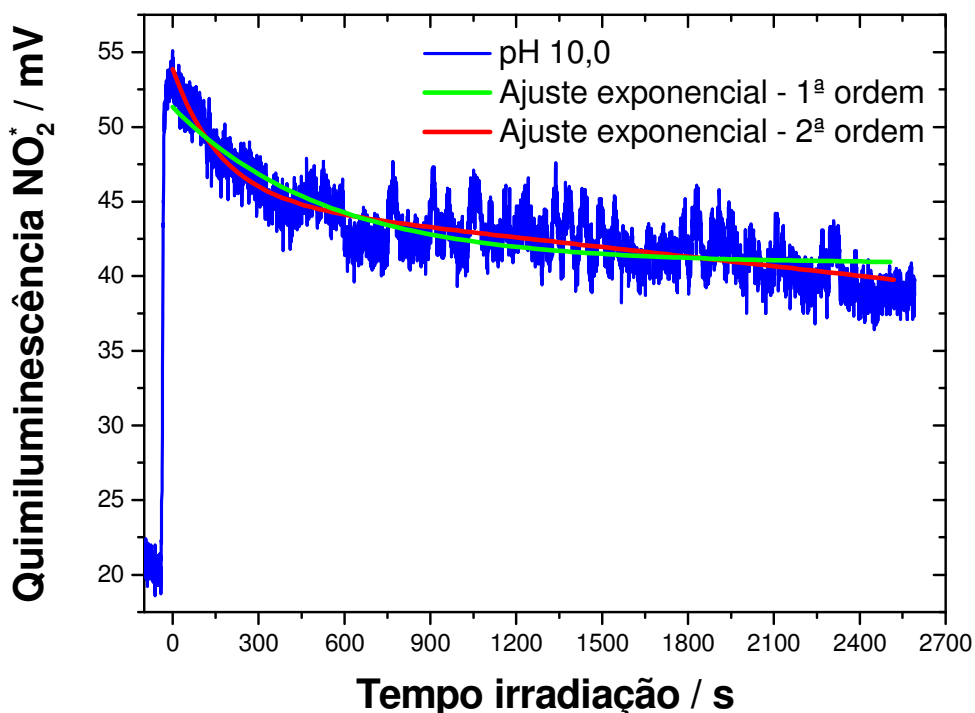
O experimento mostrou (Gráfico 7.24) que a cinética de liberação do  $\text{NO}^\bullet$  foi realmente monoexponencial.



**Gráfico 7.24** Perfil monoexponencial da liberação do  $\text{NO}^\bullet$  através da fotólise da NFT em função do tempo de irradiação no pH 2,5 utilizando filtro.

A cinética de fotoliberação do  $\text{NO}^\bullet$  em pH 10,0 foi biexponencial (Gráfico 7.25), que também é semelhante a cinética de fototransformação NFT  $\xrightarrow{h\nu_1}$  FP1  $\xrightarrow{h\nu_2}$  FP2.

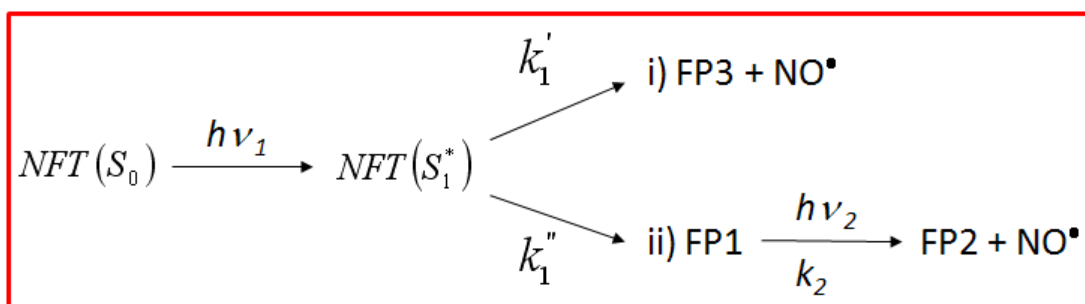




**Gráfico 7.25** Perfil biexponencial da liberação do NO• através da fotólise da NFT em função do tempo de irradiação no pH 10,0 sem o uso de filtro.

Assim, podemos concluir que em ambos seus estados de protonação a NFT libera o NO• tanto durante a fototransformação da NFT, quando durante a fototransformação do produto FP1. Entretanto na estrutura da NFT presente somente um grupo, que pode ser transformado em radical NO•: grupo NO<sub>2</sub> em posição 2 (Figura 7.1) Isto significa que, além de se transformar em fotoproduto FP1, a NFT libera NO• produzido paralelamente mais um fotoproduto (FP3) e o fotoproduto FP1 sob ação de luz também libera NO•, transformando-se em fotoproduto FP2. Temos que concluir que, por algum motivo, não podemos observar a formação do fotoproduto FP3 espectroscopicamente.

Baseando-se nestas conclusões propomos o seguinte esquema de fototransformação da NFT:



**Figura 7.2** Esquema inicial proposto da fotoliberação do NO• pela fototransformação da NFT.

em que  $\text{NFT}(S_0)$  e  $\text{NFT}(S_0^*)$  são os estados fundamental e primeiro estado excitado singlete da NFT,  $k_1'$  uma constante da fototransformação da NFT em seu estado  $\text{NFT}(S_0^*)$  pelo caminho (i) em fotoproduto FP3 com a liberação do  $\text{NO}^\bullet$ ,  $k_1''$  é uma constante de fototransformação da NFT em seu estado  $\text{NFT}(S_0^*)$  pelo caminho (ii) em fotoproduto FP1, e  $k_2$  é uma constante de fototransformação do fotoproduto FP1 em fotoproduto FP2 com a liberação do  $\text{NO}^\bullet$ .

Desse ponto de vista, as constantes  $k_1$  e  $k_2$ , que observamos experimentalmente, são  $k_1 = k_1' + k_1''$  e  $k_2 = k_2$ .

Baseando-se nos resultados obtidos, calculamos dos Gráficos 7.23 e 7.25 o rendimento de fotoliberação de  $\text{NO}^\bullet$ . Ou seja, tomando a área abaixo da curva experimental  $\text{NO}^\bullet$  formado durante a fotólise da NFT, determinamos a massa formada de  $\text{NO}^\bullet$ , dividindo essa área pela constante de proporcionalidade  $B = (8,32 \pm 0,04) \times 10^{12} \text{ mV.s.mol}^{-1}$ , obtida da curva de calibração (Gráfico 6.3 – 6.2 Detecção e quantificação da fotoliberação de óxido nítrico ( $\text{NO}^\bullet$ )). Por outro lado, a massa de NFT inicial é conhecida e, analisando o espectro de absorção, determinamos a massa de  $M_{\text{NFT}}$  consumida durante a fotólise. Já o rendimento de fotoliberação de  $\text{NO}^\bullet$  é dado pela equação 5.2.1.3 apresentada no item 5.2.1 A detecção e a quantificação da liberação do radical  $\text{NO}^\bullet$  pela quimiluminescência.

A Tabela 7.6 apresenta os valores obtidos.

**Tabela 7.6** Massas consumida de NFT ( $M_{\text{NFT}}$ ) e total de  $\text{NO}^\bullet$  formada ( $M_{\text{NO}}$ ) durante a fotólise da NFT e seu respectivo rendimento de fotoliberação para a faixa de pH estudado.

pH	$M_{\text{NFT}} / \text{nmol}$	$M_{\text{NO}} / \text{nmol}$	$\Phi_{\text{NO}}^{\text{NFT}}$
2,5	$178,5 \pm 0,1$	$42,3 \pm 0,1$	$0,237 \pm 0,001$
10,0	$31,5 \pm 0,1$	$16,9 \pm 0,1$	$0,536 \pm 0,005$

Conforme a Tabela 7.6, podemos observar que o maior rendimento é obtido durante a fotólise da NFT no pH 10,0 – espécie não protonada.

A partir do Gráfico 7.23 (pH 2,5) calculamos as quantidades de  $\text{NO}^\bullet$  formadas pelos caminhos (i) e (ii), que são iguais a 2,7 nmol e 39,6 nmol, dando os valores de rendimentos  $\Phi_{\text{NO}}^{\text{NFT}}(\text{i}) = 0,017$  e  $\Phi_{\text{NO}}^{\text{NFT}}(\text{ii}) = 0,22$ , respectivamente. Os rendimentos podem ser calculados como  $\Phi_{\text{NO}}^{\text{NFT}}(\text{i}) = \frac{k_1'}{k_1}$  e  $\Phi_{\text{NO}}^{\text{NFT}}(\text{ii}) = \frac{k_1''}{k_1}$ . Daqui podemos concluir que a constante

$k_1'' \cong 13k_1'$ , ou seja, que o caminho (ii) é treze vezes mais efetivo que o caminho (i) e o fotoproduto FP3 é formado em quantidades pequenas se compararmos com o FP1, por isso a sua formação não foi observada.

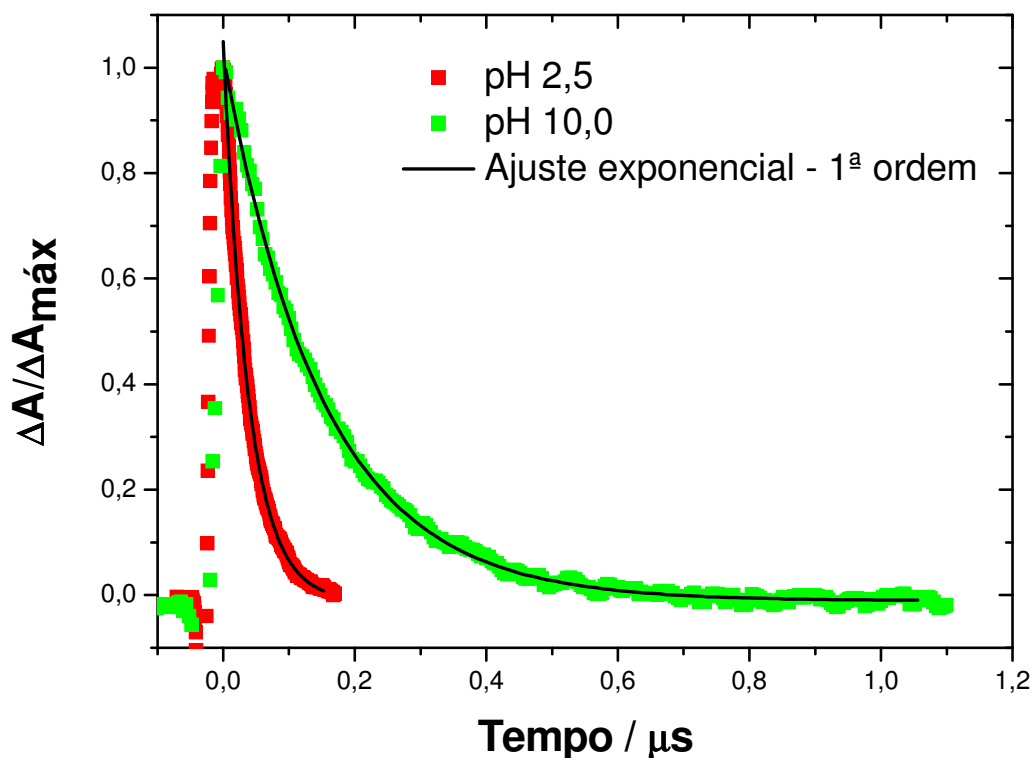
#### 7.4 Estudos do estado tripleto da NFT

Conforme apresentamos na base científica deste trabalho, o estado tripleto de uma molécula possui participação ativa na eficiência da TFD, pois é responsável pela formação do oxigênio singleto, equação 2.3.1.6. Mais do que isso, os estudo da fotoatividade do Quinifuril mostrou que seu estado tripleto possui papel importante na formação das suas espécies ativas [3,4].

Dentre os fatores limitantes dos processos que envolvem o estado tripleto está o seu tempo de vida  $\tau_T$ . Nessa etapa, estudamos as características do estado tripleto da NFT em função do pH e da presença do oxigênio.

Observamos que a excitação da solução da NFT com pulso curto (10 ns) em 355 nm, induz a formação de uma espécie metaestável, que associamos com o estado tripleto da NFT.

Demonstramos que o tempo de vida (Gráfico 7.26) e o espectro diferencial de absorção (Gráfico 7.27) dessa espécie dependem do estado de protonação da NFT.



**Gráfico 7.26** Decaimento monoexponencial do tempo de vida do estado tripleto na faixa de pH estudado.

Os perfis de decaimento para os pHs 2,5 e 10,0 são monoexponenciais, indicando a presença somente de uma espécie metaestável, tanto na presença quanto na ausência do oxigênio, e ausência dos processos bimoleculares, tipo de T-T aniquilação. As constantes características de decaimento da espécie ( $k_T$ ) em pH 10,0, na ausência do oxigênio, são dezessete vezes menor do que em pH 2,5 (Tabela 7.7).

**Tabela 7.7** Valor médio da constante  $k_T$  nos pHs 2,5 e 10,0 em função da concentração do oxigênio molecular.

[O <sub>2</sub> ] / mM	pH 2,5	pH 10,0
	$\langle k_T \rangle \times 10^7 / s^{-1}$	$\langle k_T \rangle \times 10^6 / s^{-1}$
~ 0	(2,5 ± 0,01)	(4,2 ± 0,03)
0,3	(2,5 ± 0,01)	(4,8 ± 0,03)
1,5	(2,7 ± 0,01)	(6,6 ± 0,01)

Um processo característico para o estado tripleto é sua supressão pelo oxigênio molecular, aumentando o valor de  $k_T$ . Este processo é limitado pela difusão, possuindo a constante bimolecular de supressão ( $k_q$ ) em soluções aquosas na faixa  $10^9 - 10^{10} M^{-1}s^{-1}$ .

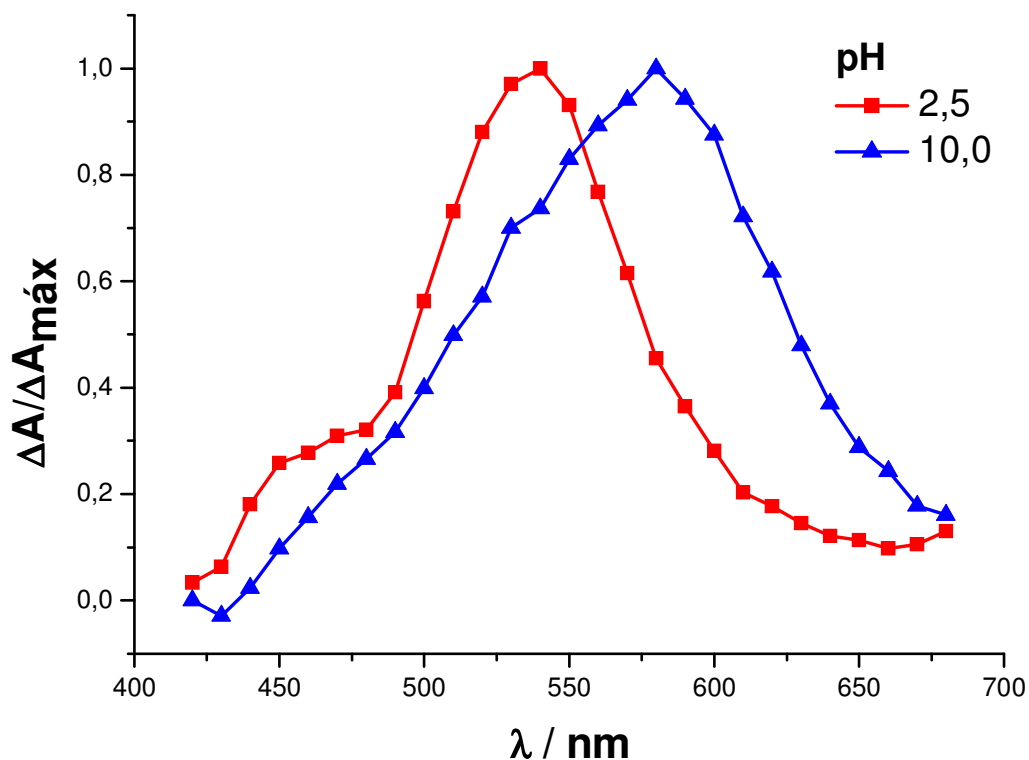
Os estudos mostraram que em pH 10,0 a constante  $k_T$  aumenta com o aumento da concentração do oxigênio. Embora, essa dependência seja muito fraca. Em pH 2,5 a dependência da  $k_T$  da concentração do oxigênio é desprezível. Esse fato nós explicamos da seguinte maneira. A constante de decaimento do estado tripleto na presença do oxigênio é

$$k_T = k_{T_0} + k_q * [O_2]$$

em que  $k_{T_0}$  é a constante de decaimento na ausência do oxigênio e  $[O_2]$  é a concentração do oxigênio. Em soluções aquosas, saturadas com ar em pressão atmosférica a  $[O_2] \cong 4 * 10^{-4} M$  e em soluções saturadas com  $O_2$  em pressão atmosférica a  $[O_2] \cong 2 * 10^{-3} M$ . Caso que  $k_q = 10^9 M^{-1} s^{-1}$ , o produto  $k_q * [O_2]$  no caso da solução saturada com ar é  $k_q * [O_2] 4 * 10^5 s^{-1}$ , e para saturado com oxigênio é  $k_q * [O_2] 2 * 10^6 s^{-1}$ . Esses valores em pH 10,0 são comparáveis com  $k_{T_0}$  e em pH 2,5 uma ordem de grandeza menor do que  $k_{T_0}$ . Por isso, o oxigênio produz uma fraca diminuição do  $k_T$  em pH 10,0 e praticamente não exerce influência no pH 2,5.

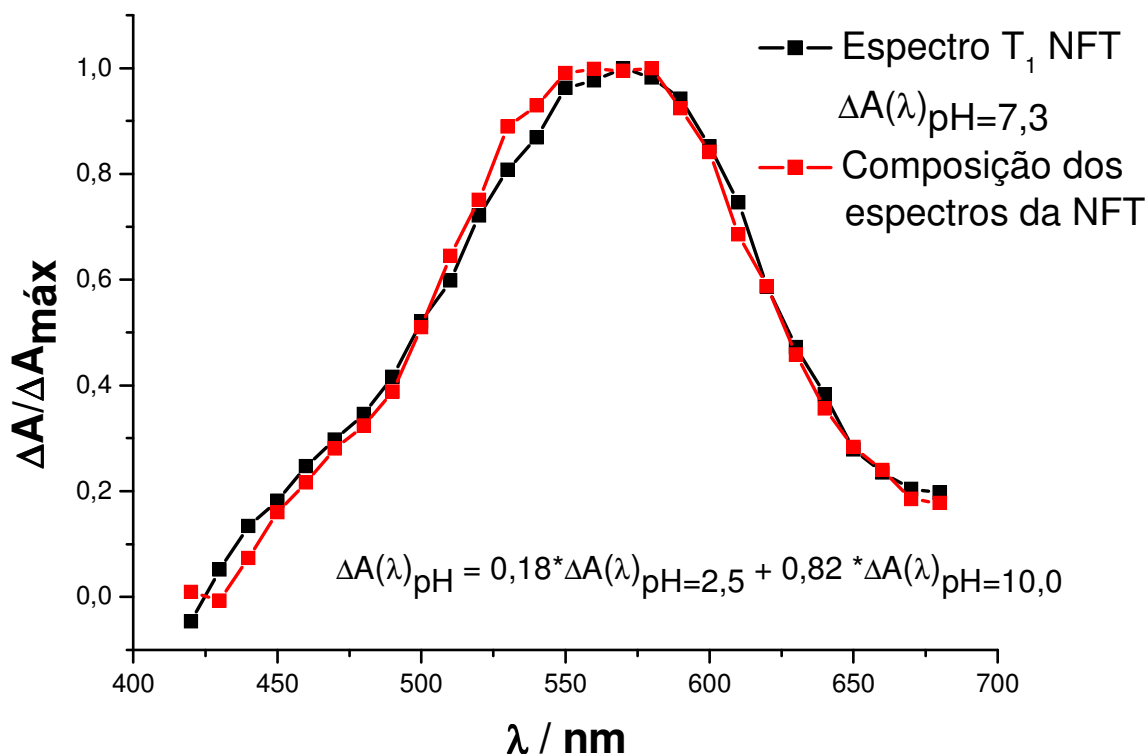
Estes resultados mostram que, devido ao tempo extremamente curto do estado tripleto da NFT, a produção do oxigênio singleto pela transferência da energia do estado tripleto para oxigênio molecular, neste caso, é não efetivo e os efeitos fototóxicos observados para a NFT são de outra natureza.

No espectro de  $T_1$  da NFT observamos um deslocamento de  $540 \pm 5$  nm (pH 2,5) para  $580 \pm 5$  nm (pH 10,0) (Gráfico 7.27). Atribuímos esta mudança a protonação do nitrogênio 11 da NFT (Figura 7.1), que altera o sistema  $\pi$ -conjugado da molécula, [9].



**Gráfico 7.27** Espectro diferencial normalizado do estado tripleto da NFT para os pHs 2,5 e 10,0. Máximo de absorção do estado tripleto em:  $\lambda = (540 \pm 5)$  nm para o pH 2,5 (—■—) e  $\lambda = (580 \pm 5)$  nm para o pH 10,0 (—▲—).

O máximo de absorção do tripleto para o pH 7,3 ( $570 \pm 5$ nm) é deslocado em relação ao pH 2,5, porém, está próximo ao máximo de absorção do pH 10,0 (Gráfico 7.27). Mostramos que, semelhante aos espectros de absorção  $S_0 \rightarrow S_1^*$  (veja Gráfico 7.7), este espectro pode ser apresentado como sobreposição dos espectros em pH 2,5 e pH 10,0 (Gráfico 7.28).



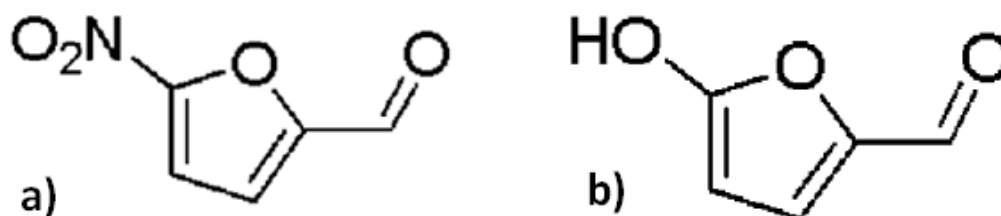
**Gráfico 7.28** Comparação entre a convolução (—■—) do espectro diferencial normalizado de absorção da NFT e seu respectivo espectro experimental (—■—) no pH 7,3 (próximo  $pK_2$ ).

Pôde-se ver que, diferente do espectro  $S_0 \rightarrow S_1^*$ , no espectro de  $T_1$  do pH 7,3, a espécie não protonada (pH 10,0) tem maior contribuição em relação a espécie monoprotonada (pH 2,5). Isso pode ser associado com o deslocamento do ponto  $pK$  do estado  $T_1$  da NFT para maior pH em comparação com o do seu estado fundamental.

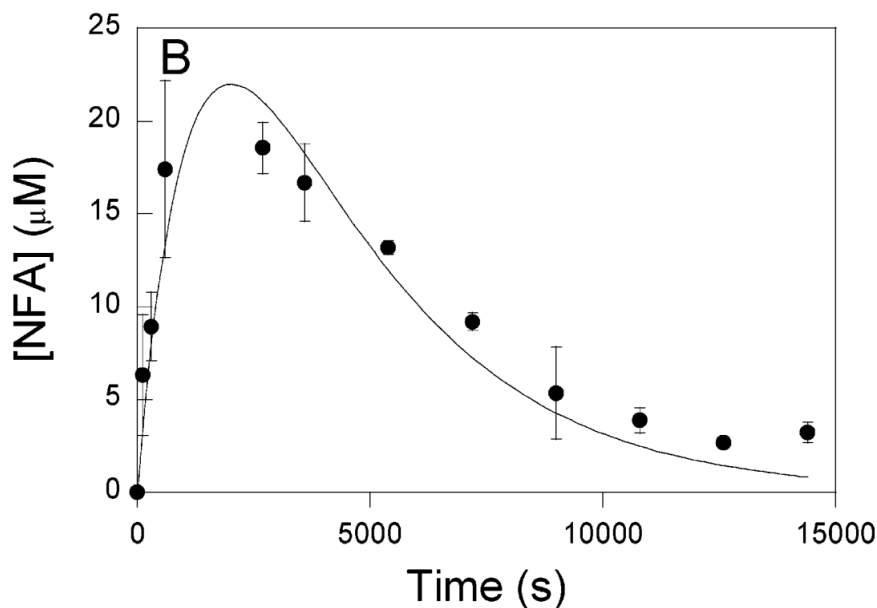
Temos que anotar, também, um seguinte fato importante. O tempo de vida do estado tripleto das moléculas em soluções líquidas tipicamente está na faixa de  $10^{-5}$ - $10^{-3}$  s. Todavia, o tempo de vida do estado  $T_1$  da NFT em pH 10,0 e pH 2,5 são  $2,0 \cdot 10^{-7}$  s e  $4,0 \cdot 10^{-8}$  s, respectivamente. Isto significa que para NFT, além de fosforescência e cruzamento intersistemas, existe no mínimo mais um canal da dissipação da sua energia. Provavelmente esse pode ser uma reação monomolecular de transformação da molécula. Podemos imaginar que esse canal é a transformação da molécula em fotoproducto FP1 e/ou FP3. Esta hipótese está em concordância com o fato que em pH 2,5, onde a fototransformação da NFT é mais rápida, o tempo de vida do estado  $T_1$  é mais curto do que em pH 10,0, cuja fototransformação é mais lenta. A hipótese também está em concordância com os resultados do estudo da fototransformação do Quinifuril [3], onde foi mostrado que o Quinifuril decompõe-se tanto direto do estado  $S_1^*$  quanto do  $T_1$ .

Tendo em mente o esquema proposto para a fotoliberação do  $\text{NO}^\bullet$  pela fototransformação da NFT (Figura 7.2), vamos discutir como os estudos realizados sobre o estado tripleto da NFT podem alterar esse esquema.

De acordo com Edhlund e colaboradores os derivados de nitrofurano, dentre os existentes a NFT, demonstraram que o nitrofuraldeído (NFA) (Figura 7.3-a) é o fotoproduto primário decorrente de fotólise direta [56]. Este produto não é fotoestável (Figura 7.4) e, ao ser irradiado, dá origem ao fotoproduto 5-hidroximetileno-2(5H)-furanona (Figura 7.3-b) e libera  $\text{NO}^\bullet$ .



**Figura 7.3** Estrutura química do produto primário (a) nitrofuraldeído e seu respectivo fotoproduto (b) 5-idroximetileno-2(5H)-furanona. Adaptado de [56].



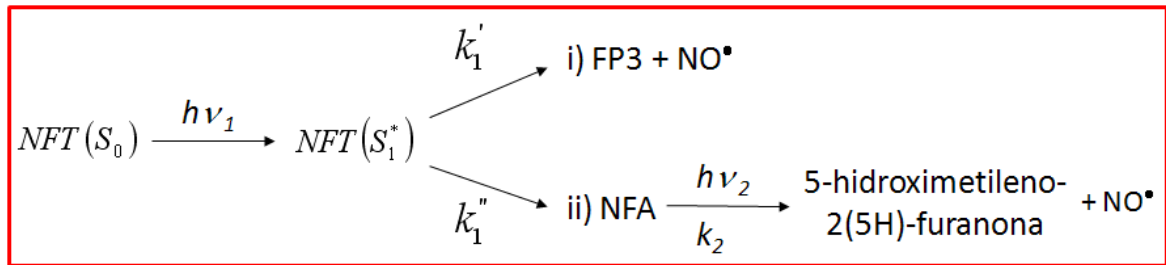
**Figura 7.4** Acúmulo e queda de NFA a partir da fotólise do derivado de nitrofurano furaltadona em água deionizada. Adaptado de [56].

Em acordo com estes resultados podemos considerar que o fotoproduto FP1, observado em nosso trabalho, é a nitrofuraldeído (NFA) que, sob ação da luz, se transforma em FP2 - 5-hidroximetileno-2(5H)-furanona, liberando  $\text{NO}^\bullet$ . Entretanto, a fotoliberação do  $\text{NO}^\bullet$  pela fotólise direta da NFT não foi observada anteriormente. Baseando-se nos estudos



do estado  $T_1$  da NFT, podemos sugerir que um dos caminhos da liberação do  $\text{NO}^\bullet$  passa pelo estado  $T_1$ . Todavia, essa hipótese precisa ser confirmada com experimentos futuros. Também não está esclarecida ainda a estrutura do produto de fotólise direta da NFT, FP3, que também necessita de estudos adicionais.

Assim, o esquema final da cinética de fotoliberação de  $\text{NO}^\bullet$  pela NFT é:



**Figura 7.5** Esquema final proposto da fotoliberação do  $\text{NO}^\bullet$  pela fototransformação da NFT.

## 8 CONCLUSÕES

Neste trabalho, demonstramos que durante a fototransformação da NFT é produzido no mínimo uma espécie ativa,  $\text{NO}^\bullet$ , cujo rendimento depende do estado de protonação da NFT com liberação de  $\text{NO}^\bullet$ , sendo realizada por duas vias paralelas: liberação direta pela molécula de NFT e através do seu fotoproduto. O estado tripleto da NFT possui participação ativa em sua fototransformação, apresentando tempo de vida ( $\tau_T$ ) muito curto, provavelmente devido à formação de produto intermediário. Pelo fato de ser muito curto, é pouco provável que  $\tau_T$  produza oxigênio singleto. Assim, podemos associar a fotoatividade da NFT com a liberação de  $\text{NO}^\bullet$ . Por fim, propusemos um esquema para a fotoliberação de  $\text{NO}^\bullet$  pela fototransformação da NFT.

### 8.1 Perspectivas

Em estudos futuros planejamos:

- Estudar a eficiência da formação do oxigênio singleto durante a fotólise da NFT.
- Estudar a possibilidade da formação de outras espécies ativas durante a fototransformação da NFT.
- Confirmar a participação do estado  $T_1$  da NFT na sua fototransformação e liberação do radical  $\text{NO}^\bullet$ .
- Esclarecer a estrutura do produto de fotólise direta da NFT, FP3.

**REFERÊNCIAS**

- [1] BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro, 2010. O que é o câncer? Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 25 Jun. 2010.
- [2] Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009. 98 p.
- [3] D.E. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nature Reviews. Cancer.* 3 (2003) 375-80.
- [4] S. BROWN, E. BROWN, I. WALKER, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *The Lancet Oncology.* 5 (2004) 497-508.
- [5] *Pure Appl. Chem. Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 2006)*, Vol. 79, No. 3, p. 390, 2007.
- [6] W. Raether, H. Hänel, Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity., *Parasitology Research.* 90 Supp 1 (2003) S19-39.
- [7] J. Barbosa, S. Moura, R. Barbosa, F. Ramos, M.I. da Silveira, Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry., *Analytica Chimica Acta.* 586 (2007) 359-65.
- [8] I. Borissevitch, N. Daghasanli, I. Degterev, 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, *Journal Of Photochemistry And Photobiology A: Chemistry.* 159 (2003) 213-217.
- [9] N.A. Daghasanli, I.A. Degterev, A.C. Tedesco, I.E. Borissevitch, Photocytotoxicity of a 5-nitrofuranyl-ethenyl-quinoline antiseptic (Quinifuryl) to P388 mouse leukemia cells., *Brazilian Journal Of Medical And Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.].* 37 (2004) 1873-9.
- [10] N.A. Daghasanli, M.M. Rossa, H.S. Selistre-De-Araujo, A.C. Tedesco, I.E. Borissevitch, I.A. Degterev, Cytotoxicity of nitroheterocyclic compounds, quinifuryl and nitracrine, towards leukaemic and normal cells on the dark and under illumination with visible light., *Journal Of Photochemistry And Photobiology. B, Biology.* 75 (2004) 27-32.
- [11] N.A. Daghasanli, I.A. Degterev, G.B. Olivera, A.B. Seabra, M.G. Oliveira, I.E. Borissevitch, Formation of cytotoxic intermediates in the course of photodecomposition of a nitroheterocyclic antiseptic quinifuryl, *Journal Of Photochemistry And Photobiology A: Chemistry.* 184 (2006) 98-104.

- [12] B.A. Cunha, New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited., *The Medical Clinics Of North America*. 90 (2006) 1089-107.
- [13] G.M. Beijersbergen van Henegouwen, (Systemic) phototoxicity of drugs and other xenobiotics., *Journal Of Photochemistry And Photobiology. B, Biology*. 10 (1991) 183-210.
- [14] Turro, N. J. *Modern Molecular Photochemistry*. Mill Valley, Calif.: University Science Books, 1991, p. 3-6.
- [15] Klessinger, M. and Michl, J., *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. New York, VCH Publishers, 1995.
- [16] GONÇALVES, P. J. Estudos das características fotofísicas da porfirina mesotetrasulfonatofenil (TPPS4): efeitos da protonação e interação com micelas de CTAB. 2006. 140 f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- [17] SUÉCIA. Nobel Foundation. Nobelprize.org. Stocolmo, 2010. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1903 Disponível em: <[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1903/](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/)>. Acesso em: 4 Ago. 2010.
- [18] I.M. Schmitt, S. Chimenti, F.P. Gasparro, Psoralen-protein photochemistry--a forgotten field., *Journal Of Photochemistry And Photobiology. B, Biology*. 27 (1995) 101-7.
- [19] M. Zanolli, Phototherapy treatment of psoriasis today\*1, *Journal Of The American Academy Of Dermatology*. 49 (2003) 78-86.
- [20] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, The history of photodetection and photodynamic therapy., *Photochemistry And Photobiology*. 74 (2001) 656-69.
- [21] D. Kessel, Photodynamic therapy: from the beginning, *Photodiagnosis And Photodynamic Therapy*. 1 (2004) 3-7.
- [22] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects., *Lasers In Medical Science*. 24 (2009) 259-68.
- [23] J.N. Ribeiro, A.R. Silva, R.A. Jorge, Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced by photodynamic therapy, *Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial*. 40 (2004) 383-390.
- [24] M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours., *Journal Of Photochemistry And Photobiology. B, Biology*. 39 (1997) 1-18.
- [25] *Pure Appl. Chem. Glossary of terms used in photochemistry (IUPAC Recommendations 2006)*, Vol. 79, No. 3, p. 397-98, 2007.
- [26] E. Culotta, D. Koshland, NO news is good news, *Science*. 258 (1992) 1862-1865.
- [27] J. Stamler, D. Singel, J. Loscalzo, Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms, *Science*. 258 (1992) 1898-1902.

- [28] BECKMAN, J. S. The physiological and pathological chemistry of nitric oxide. In: LANCASTER, J. Nitric oxide: principles and actions. California: Academic Press, 1996. p. 1-82.
- [29] J.F. Kerwin, J.R. Lancaster, P.L. Feldman, Nitric oxide: a new paradigm for second messengers., *Journal Of Medicinal Chemistry*. 38 (1995) 4343-62.
- [30] G.M. Tozer, S.A. Everett, Nitric oxide in tumour biology and cancer therapy. Part 1: Physiological aspects., *Clinical Oncology (Royal College Of Radiologists (Great Britain))*. 9 (1997) 282-93.
- [31] G.M. Tozer, S.A. Everett, Nitric oxide in tumor biology and cancer therapy. Part 2: Therapeutic implications., *Clinical Oncology (Royal College Of Radiologists (Great Britain))*. 9 (1997) 357-64.
- [32] E.N. Makareeva, E.L. Lozovskaia, A.S. Tatikolov, I.I. Sapezhinskiĭ, [Photosensitizing properties and antioxidant activity of furagin--an antimicrobial drug that is a derivative of nitrofurantoin], *Biofizika*. 42 (n.d.) 472-9.
- [33] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy., *Physics In Medicine And Biology*. 53 (2008) R61-109.
- [34] M. Vass, K. Hruska, M. Franek, Nitrofurantoin antibiotics : a review on the application , prohibition and residual analysis, *Veterinary Research*. 2008 (2008) 469-500.
- [35] WHO; IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man – Some anti-thyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals; International Agency for Research of Cancer, Vol. 7, 1974; 164:167.
- [36] R.R. Shah, G. Wade, Reappraisal of the risk/benefit of nitrofurantoin: review of toxicity and efficacy., *Adverse Drug Reactions And Acute Poisoning Reviews*. 8 (1989) 183-201.
- [37] H. Hof, J. Ströder, J.P. Buisson, R. Royer, Effect of different nitroheterocyclic compounds on aerobic, microaerophilic, and anaerobic bacteria., *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 30 (1986) 679-83.
- [38] P. Mottier, S. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, T. Goldmann, et al., Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry, *Journal Of Chromatography A*. 1067 (2005) 85-91.
- [39] R.J. Youngman, W.F. Osswald, E.F. Elstner, Mechanisms of oxygen activation by nitrofurantoin and relevance to its toxicity., *Biochemical Pharmacology*. 31 (1982) 3723-9.
- [40] Z.E. Suntres, P.N. Shek, Nitrofurantoin-induced pulmonary toxicity. In vivo evidence for oxidative stress-mediated mechanisms., *Biochemical Pharmacology*. 43 (1992) 1127-35.
- [41] P. Martinez, Nitrofurantoin-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Genotoxicity in Digestive Gland Microsomes and Cytosol of the Common Mussel (*Mytilus edulis* L.), *Toxicology And Applied Pharmacology*. 131 (1995) 332-341.

- [42] D.N. Rao, S. Jordan, R.P. Mason, Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, and 2- and 5-nitroimidazoles by rat hepatocytes., *Biochemical Pharmacology*. 37 (1988) 2907-13.
- [43] J.S. Burmicz, W.F. Smyth, R.F. Palmer, An ultraviolet spectral and polarographic study of nitrofurantoin, a urinary-tract antibiotic., *The Analyst*. 101 (1976) 986-91.
- [44] The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th ed.; Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Eds.; Merck & Co.: Whitehouse Station, NJ, 2001; entry 6632.
- [45] WHO; "IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Pharmaceutical drugs"; International Agency for Research of Cancer, Vol 50, 1990; 211:231.
- [46] Human, M.D., A.T., *Basic UV/Visible Spectrophotometry*. second edition ed. Vol. 1. 1997, England: Pharmacia Biotech Limited. 35.
- [47] J.C. Lima, A. Moreira, D. Lima, L.C. Correia, Validação da medida de proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR-as) por quimioluminescência para estimativa de risco cardiovascular em indivíduos ambulatoriais: análise comparativa com nefelometria, *Jornal Brasileiro De Patologia E Medicina Laboratorial*. 41 (2005) 15-19.
- [48] P.M. Sievers (Ed.), Nitric Oxide Analyser (NOA 280). *Operation and Service Manual*. Software Version 2.05, Sievers, USA, 1997.
- [49] G. Porter, Recent progress in free radical spectroscopy, *Spectrochimica Acta*. 14 (1959) 261-270.
- [50] Y.E. Borissevitch; A. S. Tatikolov; V. A. Kuzmin. The flash photolysis device with 1.5mks time duration. *High Energy Chemistry*, 5 (1978) 474-476.
- [51] G. Porter, Flash Photolysis and Spectroscopy. A New Method for the Study of Free Radical Reactions, *Proceedings Of The Royal Society A: Mathematical, Physical And Engineering Sciences*. 200 (1950) 284-300.
- [52] G. Porter, Flash Photolysis and Some of Its Applications., *Science (New York, N.Y.)*. 160 (1968) 1299-1307.
- [53] Atkins, P., de Paula, J.; tradução da Silva, E.C., *et. al.*, Atkins: Físico-química, 8.ed. Vol. 1. 2008, Rio de Janeiro: LTC.
- [54] Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Eds., The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 13th ed., 2001, Whitehouse Station, NJ: Merck & Co., entry 6632.
- [55] Cox, B.G., *Modern Liquid Phase Kinetics*, 1994, Oxford: Oxford University Press.
- [56] B.L. Edhlund, W.A. Arnold, K. McNeill, Aquatic photochemistry of nitrofurantoin antibiotics, *Environmental Science & Technology*. 40 (2006) 5422-7.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)