

5. Formação de fotoprodutos fluorescentes de fenotiazinas

É sabido que fotoprodutos de fenotiazinas ocasionam efeitos colaterais e modificam a estabilidade estrutural e funcional de vários sistemas biológicos, tais como proteínas, membranas, etc. (Maruoka et al., 2008). Os radicais livres de fenotiazinas são as principais espécies criadas por irradiação (fotólise) e consistem em intermediários na formação de produtos mais estáveis. Existe também a possibilidade de que a irradiação induza reações químicas com o solvente aquoso. Por isso é importante caracterizar os fotoprodutos principais das fenotiazinas para poder levá-los em conta em sua interação com as proteínas e membranas.

5.1. Absorção e Fluorescência das Fenotiazinas

Os espectros de absorção ótica dos fenotiazínicos clorpromazina, flufenazina e trifluoperazina em tampão fosfato em pH 7,4 são mostrados na Fig. 5.1. Observa-se um pico de absorção em 254 nm para a CPZ, e em 258 nm para FPZ e TFP. Há também um pico de absorção menor em 306 nm para as três fenotiazinas. Na literatura foram encontrados os seguintes coeficientes de absorção molar: $\epsilon_{255}^{CPZ} = 2,7 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$, $\epsilon_{307}^{CPZ} = 3,5 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$, para a CPZ; $\epsilon_{308}^{TFP} = 3,2 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$, para a TFP (Bhattacharyya e Sen, 1998; Garcia et al., 2005).

Em geral, os espectros de absorção das fenotiazinas apresentam dois picos como os da Fig. 5.1: a absorção em 254 nm é atribuída a uma transição $\pi \rightarrow \pi^*$ e a absorção em 306 nm a uma transição $n \rightarrow \pi^*$. A transição $\pi \rightarrow \pi^*$ é devida aos elétrons dos orbitais moleculares π nos anéis da fenotiazina e a transição $n \rightarrow \pi^*$ devido aos pares de elétrons não ligantes “n” encontrados no enxofre do anel. (Garcia et al., 2005).

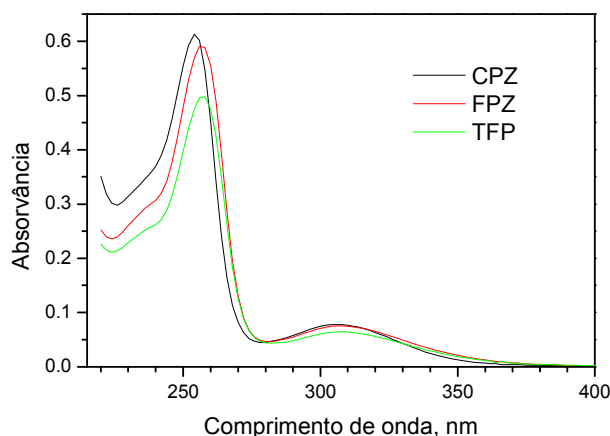


Figura 5.1. Espectros de absorção ótica de clorpromazina (CPZ), flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP) sem fotodegradação em tampão fosfato 20 mM pH 7,4, todas a 20 μ M em ambiente aeróbico.

A estrutura química das fenotiazinas utilizadas neste trabalho faz pequena diferença no espectro de absorção. O grupo na posição 2 do heterociclo (CF_3 para FPZ e TFP e Cl para CPZ) parece ser responsável pela diferença de 4 nm na posição do pico maior, referente a transições $\pi \rightarrow \pi^*$. O pico menor não tem muita variação para as três fenotiazinas, provavelmente porque as transições $n \rightarrow \pi^*$ são localizadas principalmente no enxofre, cujo entorno é semelhante nas três fenotiazinas.

Para os experimentos de fluorescência, que serão descritos no decorrer desse capítulo, escolhemos um comprimento de onda de excitação da fluorescência em 310 nm para todas as fenotiazinas. Observa-se que para concentração de 20 μ M, a absorvância em 310 nm é menor do que 0,1, o que evita a correção do efeito de filtro interno.

A Fig. 5.2 mostra os espectros de fluorescência das três fenotiazinas sem prévia irradiação. Observa-se que a fluorescência da CPZ é mais fraca que a das outras duas fenotiazinas. Seu rendimento quântico é de apenas $3,6 \times 10^{-3}$ (García et al., 2005). Os máximos de emissão para a CPZ, FPZ e TFP estão em 453 nm, 471 nm e 472 nm, respectivamente. Esses espectros são reprodutivos apenas na primeira varredura. Com irradiação contínua começam a aparecer outras espécies fluorescentes, como será visto nas próximas seções.

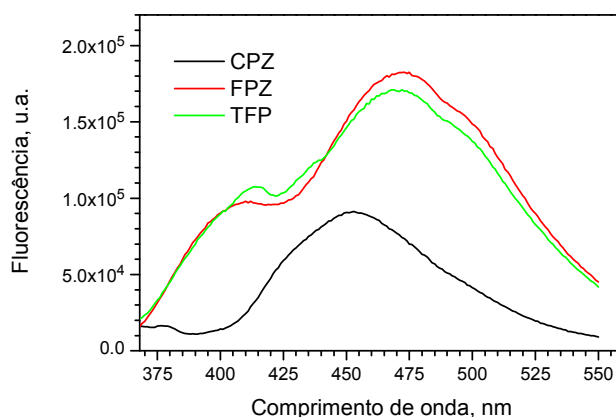


Figura 5.2. Espectros de fluorescência da CPZ, FPZ e a TFP (20 μ M) em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4. Amostras em ambiente aeróbico sem prévia irradiação.

A cadeia lateral (aminoalquílica ou piperazínica) não contribui para as propriedades de emissão das fenotiazinas (García et al., 2005). Isto está de acordo com o fato de que, mesmo apresentando cadeias laterais distintas na posição 10, os espectros de emissão de FPZ e TFP são praticamente iguais. Da mesma maneira que na absorção, é provável que a diferença entre os máximos de emissão esteja relacionada ao substituinte na posição 2 do heterociclo (Karpinska et al., 1996).

5.2. Fotodegradação das Fenotiazinas.

A sensibilidade de várias drogas à luz ambiental, particularmente nas regiões de UVA (320-400 nm) e UVB (290-320 nm), pode constituir um fator de risco em seu uso, visto que a foto-excitação eletrônica pode conduzir à fotodegradação seguida de um decréscimo em sua eficiência farmacêutica e da formação de produtos tóxicos.

As fenotiazinas em estudo sofrem fotodegradação quando são irradiadas com radiação ultravioleta UVB e, em menor intensidade, UVA. Suas propriedades de absorção e fluorescência vão se modificando, indicando modificações na estrutura química dessas fenotiazinas. Os orbitais moleculares (fundamental e excitado) das fenotiazinas são afetados, ligações químicas são quebradas, originando espécies moleculares estáveis e instáveis, e novas ligações químicas vão aparecendo.

A fotorreatividade das fenotiazinas é fortemente dependente da natureza do solvente e da presença de oxigênio. Por exemplo, Davies et al. (1976), ao utilizar como solvente o 2-propanol em condições anaeróbicas, encontraram como fotoprodutos da CPZ os radicais neutros $PZ^{\bullet}$ (promazinil) e o $Cl^{\bullet}$. Já em presença de oxigênio, nenhuma reação fotoquímica foi observada. Eles argumentaram que o 3O_2 desativa o primeiro estado triplete excitado de CPZ evitando que, por meio desse estado, se forme alguma outra espécie molecular. Em água, os resultados são mais complexos. Em presença de O_2 , são observados radicais livres $PZ^{\bullet}$ e o sulfóxido da fenotiazina como principais fotoprodutos, enquanto que em ausência de O_2 não se detectou esse último produto (Daveloose et al., 1978).

Para observar as espécies fluorescentes resultantes da irradiação das fenotiazinas com UV, assim como o efeito de oxigênio na formação dos fotoprodutos, fizemos medições de absorção e de fluorescência de CPZ, FPZ e TFP em ambiente aeróbico e anaeróbico.

5.2.1.

Absorção das fenotiazinas sob fotodegradação

Os espectros de absorção das fenotiazinas CPZ, FPZ e TFP foram obtidos após vários tempos de irradiação de 0 a 103 min com UV de 310 nm. Apresentamos, abaixo (Fig. 5.3), alguns dos espectros obtidos, assim como uma análise da diferença entre as taxas de degradação em ambiente aeróbico e anaeróbico.

Clorpromazina (CPZ)

A Fig. 5.3 mostra os espectros de absorção da CPZ intacta e modificada pela irradiação em 310 nm em ambiente anaeróbico (A) e aeróbico (B). Observamos que a fotodegradação da CPZ está acontecendo de forma diferente em presença e ausência de oxigênio (a diferença de concentração foi causada pelo fluxo de nitrogênio). Os espectros obtidos em função do tempo de irradiação apresentaram pontos isobésticos tanto em (A) como em (B), mas em posições diferentes, por exemplo, em 268 nm e em 264 nm, respectivamente. Os gráficos inseridos no canto superior direito em A e B mostram os espectros diferença, com relação à primeira medida, para um tempo de irradiação de 90 min.

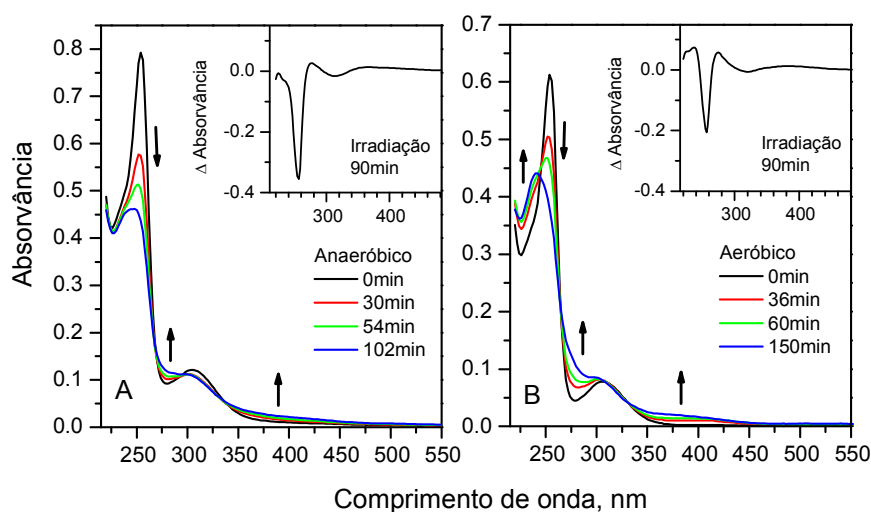


Figura 5.3. Espectros de absorção da CPZ (20 μ M) irradiada em 310 nm (0.23 mW) na condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

A Fig. 5.4 mostra a variação temporal da absorção em três comprimentos de onda em função do tempo de irradiação. A absorção em 256 nm diminui com o tempo de irradiação. Ajustando-se esses dados com o modelo de decaimento exponencial

$$A = A_0 + A_m e^{-t/\tau},$$

foram obtidas as seguintes constantes de tempo: $\tau = 61$ min para a condição aeróbica e $\tau = 34$ min para a anaeróbica (Fig. 5.4). Isso indica que a banda devido a CPZ decai cerca de duas vezes mais rapidamente em ambiente anaeróbico do que em aeróbico.

Em 238 nm aparece um pico de fotoproducto criado apenas em ambiente aeróbico. Este parece estar associado ao crescimento da absorção em 276 nm, conforme indica a Fig. 5.4. Esses picos são atribuídos a clorpromazina sulfóxido (Iwaoka e Kondo, 1974).

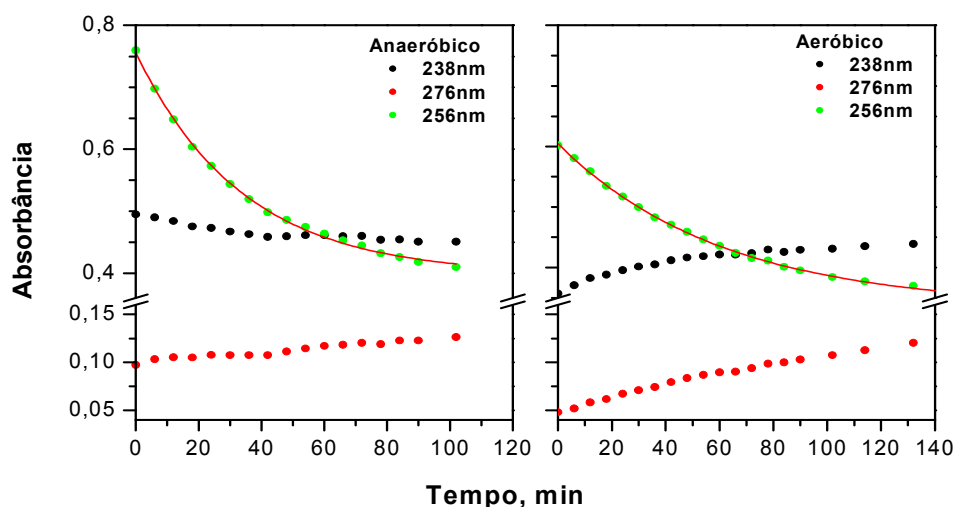


Figura 5.4. Absorbância da CPZ (20 μ M) em função do tempo na condição aeróbica e anaeróbica. Para a absorbância em 238nm tanto em ambiente anaeróbico e aeróbico ajustamos os dados experimentais com o modelo de decaimento exponencial conforme se mostra na curva contínua.

Nossos resultados foram semelhantes aos de Iwaoka e Kondo (1974), embora esses autores tenham feito experimentos em pH 4,7 irradiando CPZ com radiação de 253,7 nm. O espectro formado em condições aeróbicas foi atribuído à clorpromazina sulfóxido.

Flufenazina (FPZ)

A Fig. 5.5 mostra as mudanças nos espectros de absorção da FPZ por efeito da irradiação, em condição anaeróbica (A) e aeróbica (B). Os espectros diferença no canto superior de A e B mostram como na ausência de oxigênio a FPZ fotodegrada mais rapidamente (256nm).

A partir desses espectros observa-se melhor o aparecimento de novos picos de absorção em 236 nm e 274 nm. Além disso, observa-se o aparecimento de um ombro em 352 nm em A e em 358 nm em B. Essas absorbâncias, nas duas condições, parecem estar associadas à mesma espécie. A Fig. 5.6 mostra a variação temporal da absorbância em 236, 260 e 274 nm para a FPZ.

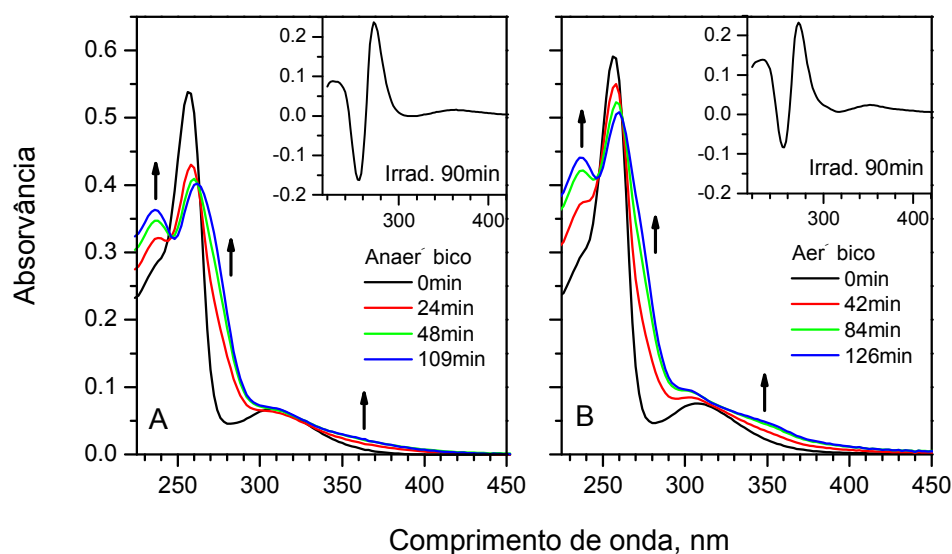


Figura 5.5. Espectros de absorção da Flufenazina ($20 \mu\text{M}$) irradiada em 310nm (0.23mW) na condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

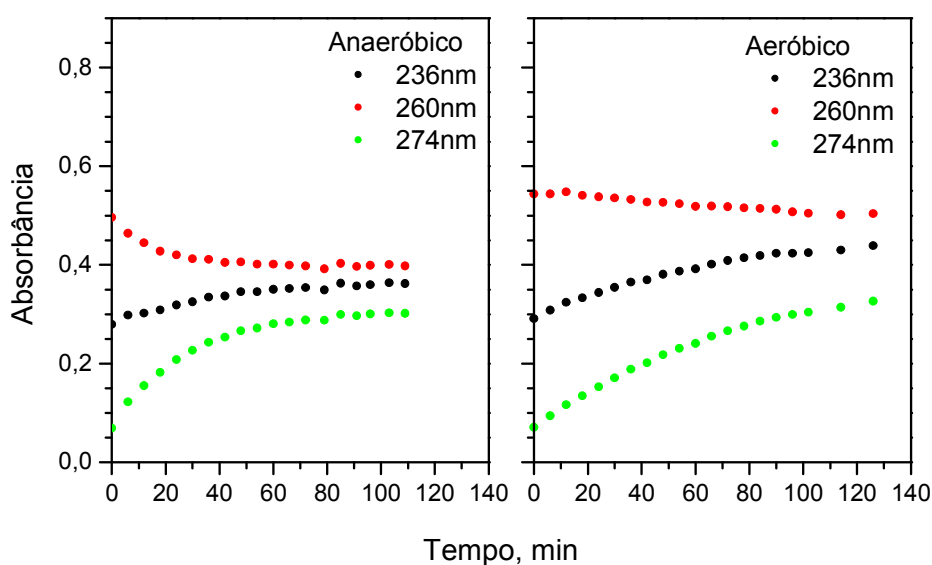


Figura 5.6. Absorbância da FPZ ($20 \mu\text{M}$) em função do tempo em condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

Trifluoperazina

Como mostram os espectros da Fig. 5.7, a TFP é fotodegradada quase da mesma maneira que a FPZ (Fig. 5.5). Na Fig. 5.7 também vemos que a absorção

em 236 nm e 274 nm parece ser da mesma espécie em ambiente aeróbico e anaeróbico.

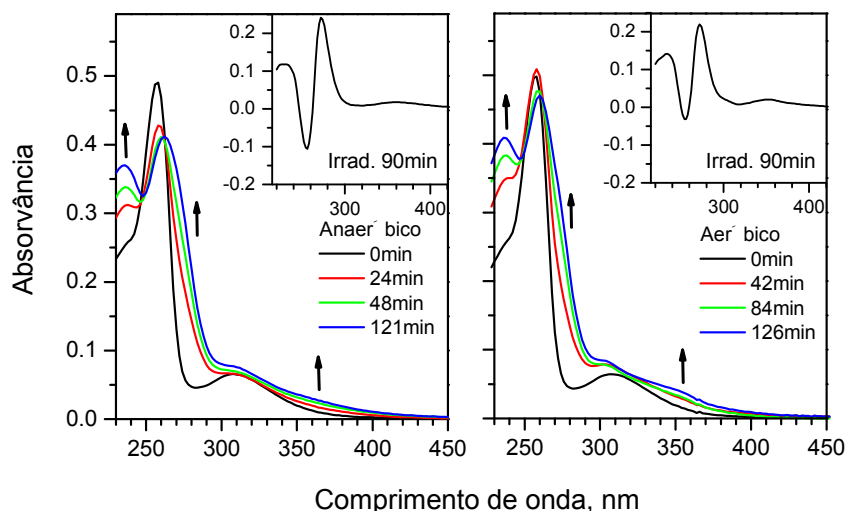


Figura 5.7. Espectros de absorção da Trifluoperazina (20 μ M) irradiada em 310 nm (0,23 mW) na condição aeróbica e anaeróbica. Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

As variações espectrais que aparecem com a fotodegradação da FPZ e da TFP apresentam sinais de formação da espécie sulfóxido, como anteriormente observado por Rodrigues et al. (2006), que encontraram picos em 230, 273, 302 e 348 nm para essa espécie.

De acordo com os espectros de absorção, o oxigênio parece desacelerar a taxa de formação dos fotoprodutos de fenotiazinas, em maior grau na TFP e FPZ. Talvez o O_2 destrua alguns dos radicais livres que continuariam provocando danos que modificariam os espectros de absorção.

5.2.2.

Fluorescência dos produtos de fotodegradação das fenotiazinas

Para estudar as espécies fluorescentes resultantes da fotodegradação, a variação da fluorescência estacionária e resolvida no tempo foi obtida submetendo-se soluções de fenotiazinas, em diferentes valores de pH, a diferentes tempos de irradiação ultravioleta UVB (em torno de 310 nm). Também foram realizadas medidas de fluorescência em condições aeróbicas e anaeróbicas para observar o efeito do oxigênio molecular na fotodegradação.

Clorpromazina

Fluorescência estacionária

A Fig. 5.8 mostra a variação dos espectros de fluorescência em consequência da fotodegradação de CPZ.

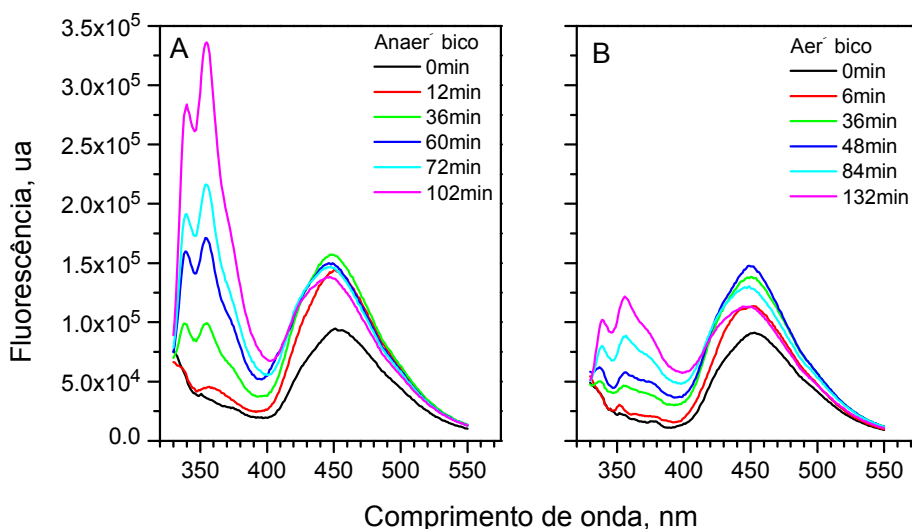


Figura 5.8. Espectros de fluorescência da CPZ (20 μ M) irradiada e excitada em 310 nm (0,23 mW) em condição anaeróbica (A) e aeróbica (B). Tampão fosfato a pH 7.4 (cubeta 3 ml).

Para a análise dos espectros, consideramos duas etapas:

Na primeira etapa, que consistiu nos primeiros 48 min, a fluorescência do pico inicial da CPZ em 453nm cresce, deslocando-se levemente para o azul (451 nm). Começa a aparecer uma espécie fluorescente com pico triplo de emissão (em 340 e 355 nm, com um ombro em 372 nm). Em ambiente anaeróbico essa espécie cresce muito mais do que na presença de oxigênio. Esse espectro nunca foi descrito antes na literatura.

Na segunda etapa, o pico de fluorescência em 451 nm diminui, enquanto que a intensidade do sinal triplo continua crescendo, especialmente em ambiente anaeróbico. Em vácuo, observamos que o pico de emissão em 450 nm, atribuído ao fotoproduto promazina (PZ), cresce e se estabiliza, sem o posterior decaimento (espectros não mostrados), enquanto que o fotoproduto de pico triplo continuou aumentando. Concluímos que em ausência de oxigênio a PZ é estável.

É muito provável que o crescimento do pico de 453 nm esteja associado à perda de Cl do anel, com formação de PZ, cujo rendimento quântico ($14,3 \times 10^{-3}$) é quatro vezes maior do que o da CPZ ($3,6 \times 10^{-3}$) (García et al., 2005). Isso já havia sido sugerido por Kochevar e Horn (1983) e também está de acordo com o espectro de massa que apresentaremos posteriormente.

Principalmente em ambiente anaeróbico, mas também em aeróbico, em pequena quantidade, se origina a espécie fluorescente com pico triplo. Inicialmente pensamos que essa espécie reagisse com oxigênio para formar um produto não fluorescente. No entanto, ao introduzirmos oxigênio na amostra anaeróbica, verificamos que o sinal fluorescente não decresce consideravelmente (~10%).

A Figura 5.9 mostra os espectros de excitação, não corrigidos, da espécie com emissão em 450 nm (de CPZ ou PZ) e da espécie de pico triplo (emissão em 340, 354 e 372 nm). É importante dizer que esses espectros são muito distorcidos, pois abaixo de 260 nm a absorbância da CPZ é muito grande (ver Fig. 5.3) e o efeito de filtro interno predomina; além disso, a intensidade da luz de excitação é bem mais baixa em comprimentos de onda menores. Mesmo tendo em conta as distorções causadas por esses efeitos, a espécie de pico triplo de emissão apresenta picos de excitação bem definidos em 240, 268, 304 e 333 nm.

A Fig. 5.9 B, obtida com a mesma amostra de A, mas deixando-se entrar oxigênio, mostra que a tendência de aumento da fluorescência da espécie de pico triplo de emissão é interrompida pelo ingresso de oxigênio na cubeta. Isso indica que essa espécie, uma vez formada, não reage rapidamente com O₂, mas sugere que ela é criada a partir de um radical livre rapidamente aniquilado em presença de O₂. A fotodecomposição de PZ (pico de fluorescência em 450 nm) não foi observada em ausência de oxigênio (gráfico não mostrado).

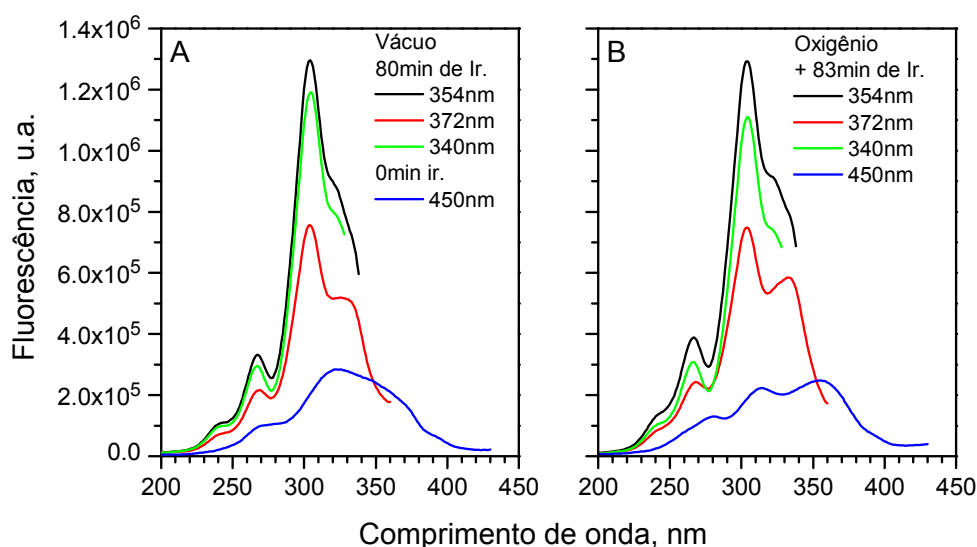


Figura 5.9. Espectros de excitação da CPZ (20 μ M) irradiada 80 min em ausência de O₂ e logo depois irradiada 84 min em presença de O₂. A irradiação foi feita em 310 nm (0.815mW) e as emissões dos espectros de excitação foram em 340, 354, 372 e 450 nm. O tampão utilizado foi em fosfato a pH 7.4 (cubeta de 3 ml).

Fotodegradação de CPZ em função do pH

Experimentos de fotodegradação em ambiente aeróbico foram realizados em tampão citrato-fosfato em diversos valores de pH (Fig. 5.10). Observou-se que o pH do meio é um fator importante na formação dos fotoprodutos da CPZ. Para uma faixa de pH 3,0-4,7, encontramos um fotoproduto que tem picos de absorção como a CPZSO (Fig. 5.10 A), descritos por Iwaoka T. et al., 1974 (244, 274, 294 e 334 nm) e Saldanha et al., 2002 (270, 302 e 336 nm); mas que emite só um pico, 372 nm (Fig. 5.10 B). Já para pH mais alto, entre 5,6-7,0, o resultado foi o mesmo que os apresentados nas Figs. 5.3 e 5.8. Concluimos também dos espectros de absorção e fluorescência (Fig. 5.10 A e B) que o fotoproduto fluorescente é mais abundante em meio mais ácido. Ainda mais, notou-se que uma vez formado o fotoproduto em dado pH, o espectro de fluorescência não variava com nova mudança de pH.

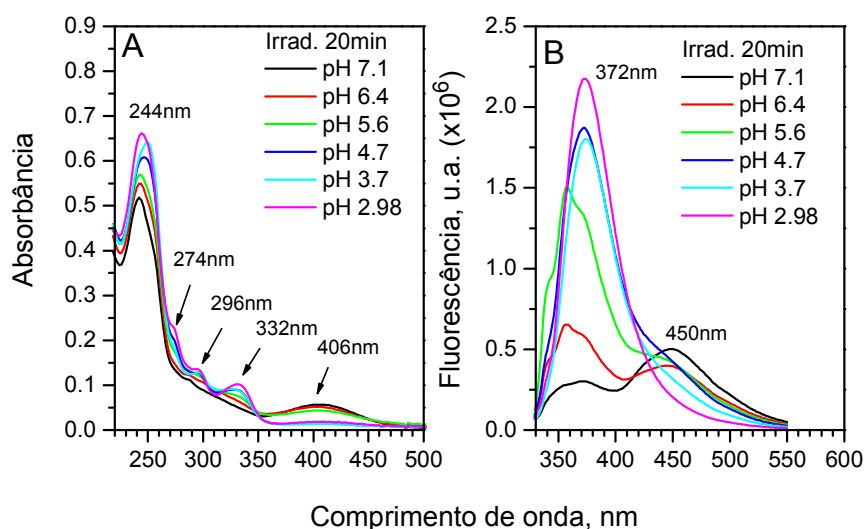


Figura 5.10. Espectros de absorção (A) e fluorescência (B) da CPZ (20 μ M) irradiada e excitada em 310 nm (0.57 mW) em condição aeróbica. Tampão citrato-fosfato (cubeta 3 ml).

Experimentos de fotodegradação em diversos valores de pH (tampão citrato-fosfato) também foram realizados em ambiente anaeróbico. Nos espectros de absorção (não mostrados) não apareceram picos característicos da espécie sulfóxida (CPZSO), indicando que a espécie sulfóxida precisa de O_2 para se formar. No entanto, entre pH 6,45-7,26 apareceu um ombro de absorbância em 406 nm, semelhante ao que apareceu em ausência de O_2 em pH 7.1 (Fig. 5.10), conforme incrementávamos o tempo de irradiação.

A Fig. 5.11 mostra os espectros de emissão (A) e de excitação (B) da CPZ em pH 3,1, antes e depois de irradiada por 20 min. Dos espectros de emissão observa-se que a fluorescência em 450 nm aumenta muito, indicando fotólise de Cl. Observa-se também que a espécie de triplo pico aparece com menor intensidade. Já a espécie fluorescente que foi observada em ambiente aeróbico, com pico em 370 nm (Fig. 5.10 B), não se formou na ausência de O_2 , indicando que foi correta a atribuição desse pico à espécie sulfóxida.

Os espectros de excitação da Fig. 5.11 B são muito distorcidos por causa do efeito de filtro interno nos comprimentos de onda de excitação (ver absorção na Fig. 5.3) e pela variação da potência da lâmpada com o comprimento de onda.

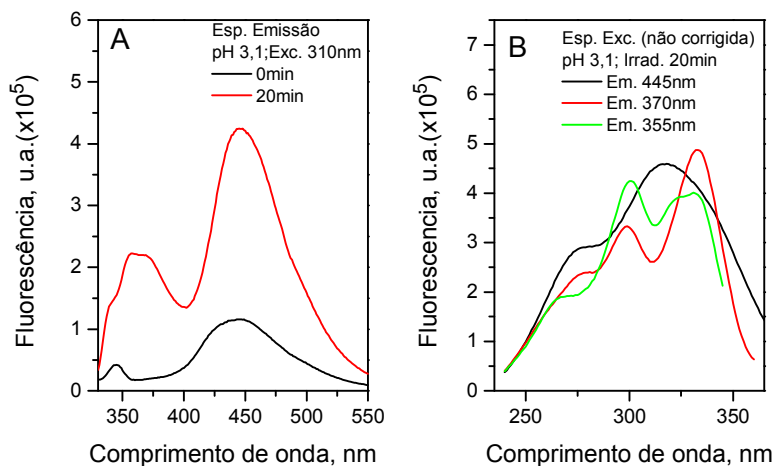


Figura 5.11. (A) Espectro de emissão da CPZ (20 μ M) não irradiada e irradiada 20 min (exc. 310 nm; 0.57 mW). (B) Espectros de excitação da amostra irradiada, não corrigidos, para emissões em 355, 370, 445 nm. Tampão citrato-fosfato, pH 3,1.

A variação da potência, na posição da amostra, em função do comprimento de onda da luz de excitação aparece na Fig. 4.1, cuja curva ajustada aos pontos experimentais foi usada para correção. A correção do filtro interno foi feita usando o espectro de absorção da amostra irradiada, usando o fator $10^{(A(\lambda)/2)}$. Os espectros de emissão corrigidos são mostrados na Fig. 5.12.

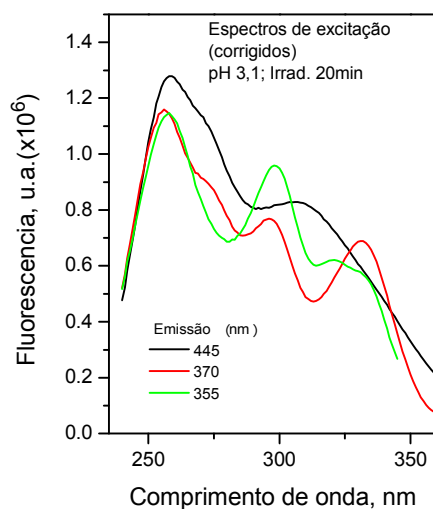


Figura 5.12. Espectros de excitação corrigidos por filtro interno e pela variação da potência da lâmpada (Fig. 4.1), a partir dos espectros da Fig. 4.11 B.

Esta correção é confiável em comprimentos de onda maiores do que a 275 nm, já que a partir daí a absorbância não é muito grande e potência da

lâmpada não é muito baixa. Na região abaixo de 275 nm a correção não é garantida. Observa-se um pico em 256 - 258 nm em todos os espectros de excitação, causado pela correção de filtro interno. Nesta região os espectros originais (Fig. 5.11 B) não mostraram pico algum.

Outra precaução que devemos ter nos espectros de excitação (Fig. 5.12) é verificar a posição do pico de espalhamento Raman da água (banda principal “stretching” em $3,4 \times 10^3 \text{ cm}^{-1}$). Assim, a relação entre os comprimentos de onda da luz incidente λ_{exc} e espalhada inelasticamente λ_R é dada por:

$$1/\lambda_R = 1/\lambda_{exc} - 3.4 \times 10^{-4} \quad (\text{para } \lambda_R \text{ e } \lambda_{exc} \text{ em nm})$$

No espectro de emissão da amostra não irradiada (Fig. 5.11 A) observa-se que, para excitação em 310 nm, o Raman aparece em 346 nm. Picos Raman em 445, 370 e 355 nm corresponderiam a excitações em 386, 329 e 317 nm, respectivamente. Observando os espectros de excitação da Fig. 5.12, nota-se apenas o pico Raman em 317 nm (na curva de emissão em 355 nm). Para a curva de emissão em 370 nm o pico Raman aparece superposto a um pico de excitação da própria amostra.

Tendo em conta essas observações no processo de correção dos espectros de excitação, podemos garantir que a espécie em 445 nm tem pico excitação em 306 nm e corresponde a CPZ e PZ. Os picos de emissão em 355 e 370 nm têm ambos, excitação em 298 e em 332 nm. No entanto, os espectros não são iguais para as emissões em 355 e 370 nm, não se podendo garantir que correspondam à mesma espécie.

A Fig. 5.13 apresenta as evoluções temporais da intensidade de fluorescência de CPZ em ambiente anaeróbico em (A) 355, (B) 370 e (C) 445 nm. Notamos que a emissão da espécie de pico triplo aumenta muito com o aumento de acidez do meio (Fig. 5.13 A e B). A presença de O_2 suprime seu crescimento (Fig. 5.8, 5.9). Na Fig. 5.13 C observa-se que a taxa de crescimento da espécie (PZ), que emite em 445 nm com maior rendimento quântico devido à saída do cloro, também é maior em meio mais ácido, mas parece saturar em doses menores de irradiação.

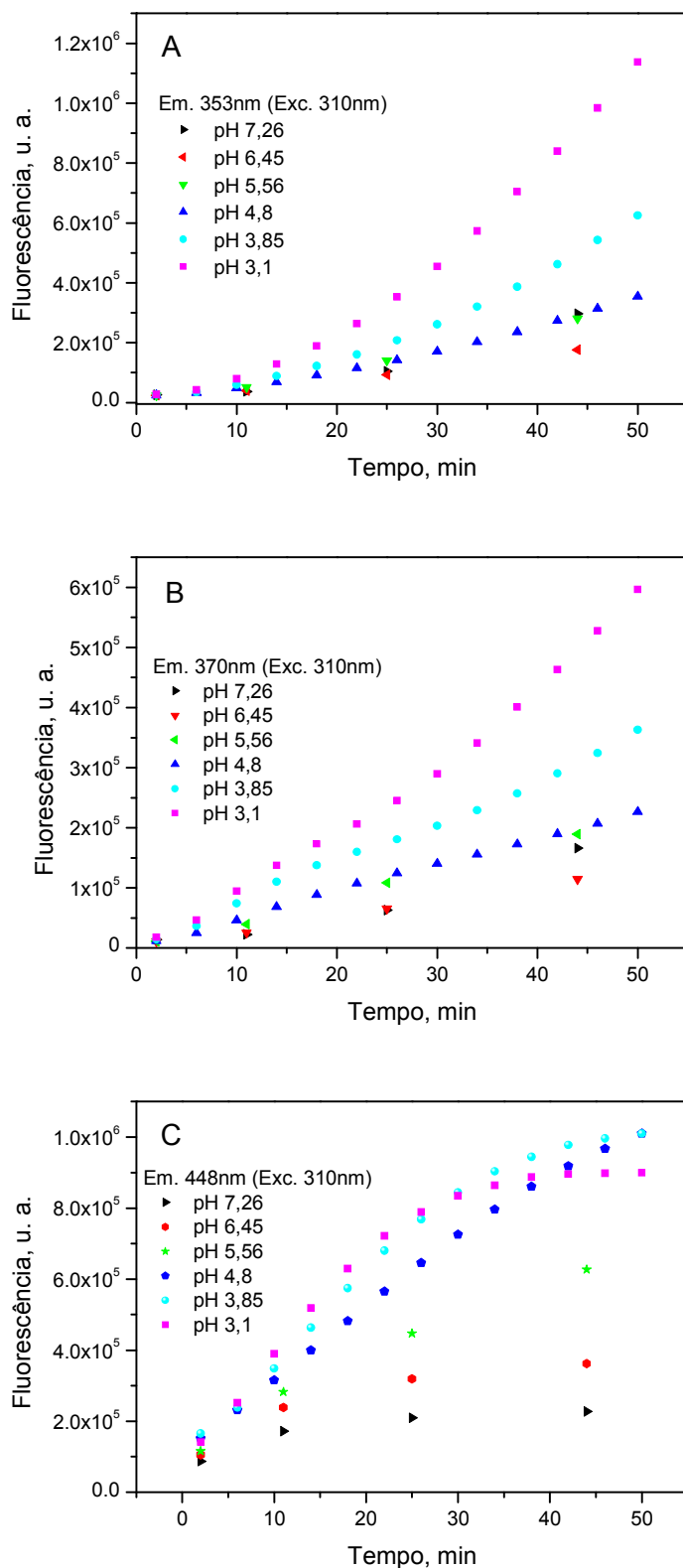


Figura 5.13. Intensidade de fluorescência em função do tempo de irradiação em ambiente anaeróbico em diferentes valores de pH. A excitação foi em 310nm, o tampão citrato-fosfato (cubeta 3 ml). Emissão em (A) 355 nm; (B) 370 nm; (C) 445 nm.

Fluorescência resolvida no tempo

Foram realizadas medidas de fluorescência resolvida no tempo para emissão em 450 nm e em 378 nm. Os resultados aparecem na Fig. 5.14. Antes de analisar os tempos de vida associados a esses decaimentos, devemos notar que tempos de vida da CPZ e PZ, para emissão em 452 nm, foram medidos por outros autores (Garcia et al., 2005; Buettner et al, 1989). Os tempos de vida observados para a PZ em tampão fosfato encontraram-se entre 1,7 e 2,1 ns e para a CPZ e outros derivados de 2-cloro ficaram entre 0,35 e 0,50 ns. Atribuiu-se o pequeno valor do tempo de vida da CPZ à presença do Cl, que aumenta o acoplamento spin - órbita nos processos de cruzamento intersistema.

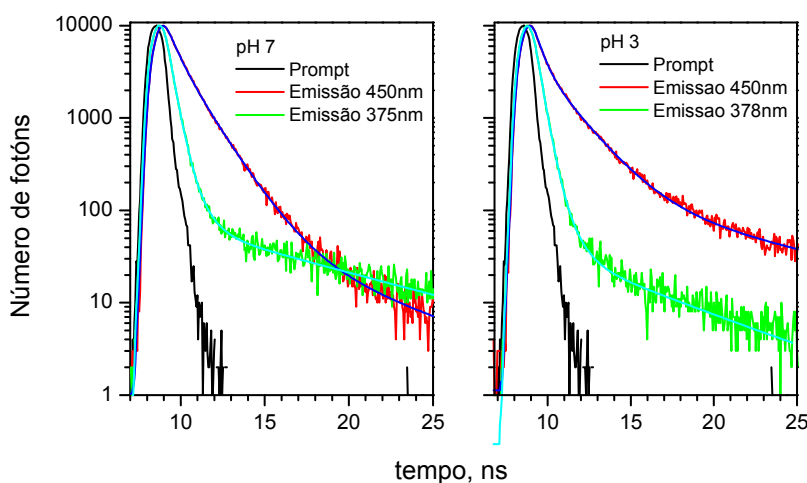


Figura 5.14. Curvas de decaimento da fluorescência de CPZ (20 μ M) irradiada em 310 nm. O tampão utilizado foi fosfato-citrato, pH 7 e pH 3. A curva preta (prompt) corresponde ao LED de excitação (330 nm).

As curvas de decaimento para emissão em 450 nm foram ajustadas com três exponenciais. A Tabela 5.1 apresenta os tempos de vida e suas respectivas contribuições fracionárias (f_1 , f_2 e f_3 , Eq. 3.9). Observa-se que tanto em pH 3,0 quanto em pH 7,0, em 450 nm há contribuição importante de espécie com tempo de vida $\sim 0,4$ ns, provavelmente CPZ intacta, e de espécie com tempo de vida $\sim 1,4$ a 1,7 ns, provavelmente devido a PZ, (de acordo com o tempo de vida da PZ e com os espectros de massa dos fotoprodutos da CPZ). Há ainda contribuição pequena de um tempo de vida mais longo (8,3 ns em pH 3,0 ou 4,4 ns em pH 7,0).

Tabela 5. 1 Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos da Fig. 5.14, para amostra aeróbica de CPZ (20 μ M) irradiada em 310 nm (excitação 330 nm; emissão 450 nm ou 378 nm).

pH	$\lambda_{em}(nm)$	$\tau_1(ns)$	$f_1\%$	$\tau_2(ns)$	$f_2\%$	$\tau_3(ns)$	$f_3\%$	χ^2
3.0	450	0,37	39	1,7	50	8,3	11	1,19
7.0		0,43	26	1,4	68	4,4	6	1,17
3.0	378	0,30	97			4,9	3	1,10
7.0		0,30	94			8,4	6	1,02

Já as curvas de decaimento para emissão em 378 nm foram ajustadas com duas exponenciais. A Tabela 5.1 também mostra os tempos de vida e suas respectivas contribuições relativas (f_1 e f_3) para essa emissão. O tempo de vida longo tem contribuição bem menor. Observa-se que o tempo de vida curto (0,3 ns), dos fotoprodutos com fluorescência em ~ 375 nm, é um pouco menor do que os de CPZ intacta e tem contribuição de mais de 90% tanto em pH 3,0 como em pH 7,0. Nesse comprimento de onda não aparece contribuição de tempos característicos de PZ.

Fizemos também medidas de tempo de vida com emissão em 450 nm para a faixa de concentrações de 5 – 80 μ M de CPZ sem prévia iluminação. Foram preparadas, para isso, cinco amostras de diferentes concentrações.

Tabela 5. 2. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos de fluorescência (não mostrados) de amostras aeróbicas de CPZ em TRIS 50 mM a pH 7,0 sem irradiar (excitação 330 nm; emissão 450 nm).

μ M	$\tau_1(ns)$	$f_1\%$	$\tau_2(ns)$	$f_2\%$	$\tau_3(ns)$	$f_3\%$	χ^2
5	0,44	63	1,9	23	8,2	14	1,19
10	0,39	66	1,7	23	8,2	11	1,31
20	0,41	77	1,7	16	8,2	7	1,18
40	0,40	76	1,6	20	8,2	4	1,23
80	0,39	75	1,5	23	8,2	2	1,20

A Tabela 5.2 apresenta os tempos de vida e suas respectivas contribuições relativas (amplitudes relativas f_1 , f_2 e f_3). Observamos a CPZ intacta ($\sim 0,4$ ns) como a espécie predominante nas soluções e seu fotoproducto PZ ($\sim 1,5$ a $1,9$ ns). Existe também a contribuição de uma componente de tempo de vida longo ($8,2$ ns) cuja contribuição tende a diminuir conforme aumentamos a concentração. Este tempo de vida pode estar associado a alguma impureza, pois nota-se que sua contribuição é maior quando a concentração de CPZ é mais baixa e o tempo de aquisição é grande.

Flufenazina (FPZ) e trifluoperazina (TFP)

Fluorescência estacionária

A Fig. 5.15 mostra as mudanças nos espectros de fluorescência da FPZ (A e B) e TFP (C e D) por efeito da irradiação (310 nm) em ambiente anaeróbico e aeróbico. Observa-se que o fotoproducto principal de ambas fluoresce em 410 nm e se forma muito mais em presença de oxigênio. A Fig. 5.16 apresenta os espectros de excitação do fotoproducto com emissão em 410 nm para as duas drogas. Esse espectro não foi corrigido pela intensidade da lâmpada nem pelo efeito de filtro interno e, portanto, está muito distorcido. No entanto, apresenta picos bem definidos em 276 , 304 e 352 nm, que são os picos de absorção do sulfóxido (Saldanha et al., 2002). Portanto, o fotoproducto formado é, muito provavelmente, a espécie sulfóxido.

Medidas do espectro de emissão da FPZ em diferentes valores de pH do meio (menores do que $7,0$) nos informam que o fotoproducto se desenvolve mais num meio ácido (espectros não mostrados).

O espectro de fluorescência da TFP (Fig. 5.15, C e D) muda de forma similar ao da FPZ indicando que ocorre o mesmo caminho de fotodegradação, formando os mesmos transientes.

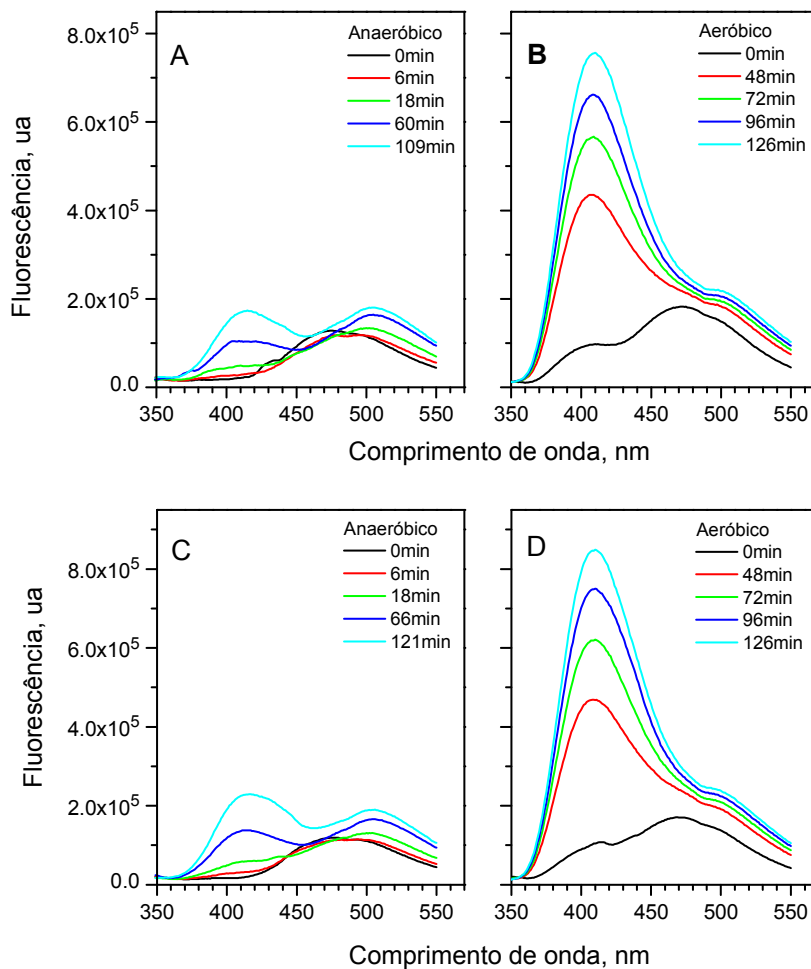


Figura 5.15. Espectros de fluorescência de (A, B) FPZ ($20 \mu\text{M}$) e (C, D) TFP ($20 \mu\text{M}$) irradiadas e excitadas em 310nm (0,23 mW) em condição anaeróbica (A, C) e aeróbica (B, D). Tampão fosfato pH 7,4 (cubeta 3 ml).

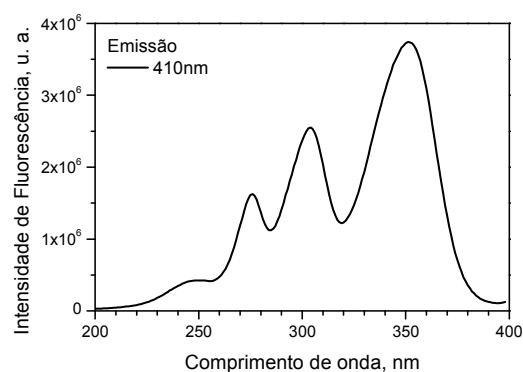


Figura 5.16. Espectro de excitação da FPZ ($20 \mu\text{M}$) irradiada 30 min em presença de O_2 . A irradiação foi feita em 310 nm (0.815 mW) e a emissão em 410 nm. O tampão utilizado foi fosfato pH 7.4, 20 mM em cubeta de 3 ml.

Fluorescência resolvida no tempo

As curvas de decaimento de fluorescência em pH 7 e pH 3 foram obtidas fixando-se a emissão em 505 ou 470 nm, para observar a FPZ intacta, e fixando-se a emissão em 410 nm para seu fotoproduto. Os decaimentos em 470 nm e 410 nm aparecem na Fig. 5.17.

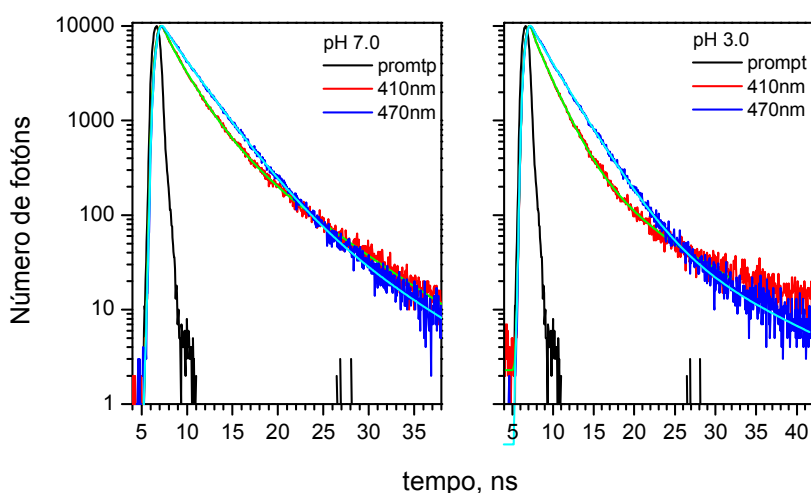


Figura 5.17. Curvas de decaimento de fluorescência da FPZ irradiada em 310nm em ambiente aeróbico. O tampão utilizado foi fosfato-citrato a pH 7 e pH 3. A curva mais estreita corresponde ao perfil da lâmpada (LED de 330 nm).

A análise das curvas de decaimento foi feita com um modelo de três exponenciais. Os tempos de vida e suas contribuições relativas (f_i) são apresentados na Tabela 5.3. Analisando a contribuição principal (f_1), encontramos que a FPZ intacta (emissão em 470 nm) tem um tempo de vida de 3,0 - 3,2 ns e que seu fotoproduto (em. em 410 nm) decai com tempo de vida de 2,1 - 2,4 ns.

Tabela 5.3 Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos da fluorescência, para amostra aeróbica de FPZ irradiada em 310nm (excitação 330 nm).

pH	$\lambda_{em}(nm)$	$\tau_1 (ns)$	$f_1 \%$	$\tau_2 (ns)$	$f_2 \%$	$\tau_3 (ns)$	$f_3 \%$	χ^2
3.0	505	3,0	91	8,1	5	0,2	4	1,16
3.0	470	3,0	91	10,3	4	0,5	5	1,15
3.0	410	2,1	76	7,5	13	0,2	11	1,21
7.0	505	3,2	90	7,2	7	0,2	3	1,17
7.0	470	3,1	87	7,3	9	0,5	4	1,10
7.0	410	2,4	68	6,6	23	0,5	9	1,03

De forma análoga ao procedimento com FPZ, as curvas de decaimento de fluorescência em pH 7 e pH 3 foram obtidas fixando-se a emissão em 505 ou 470 nm para observar a TFP e fixando-se a emissão em 410 nm para observar seu fotoproduto. Os decaimentos em 470 nm e 410 nm são apresentados na Fig. 5.18. A análise das curvas de decaimento também foi feita com o modelo de três exponenciais. Os tempos de vida e suas contribuições relativas (f_i) são apresentados na Tabela 5.4.

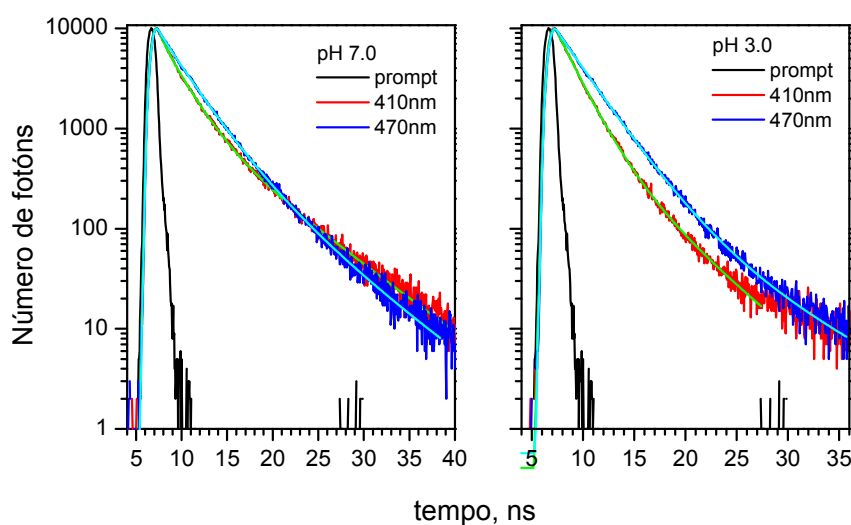


Figura 5.18. Curvas de decaimento da TFP irradiada em 310nm. O tampão utilizado foi fosfato-citrato a pH 7 e pH 3. A curva preta corresponde ao perfil da lâmpada (led de 330 nm).

Tabela 5.4. Tempos de vida e amplitudes relativas obtidos do ajuste dos decaimentos da fluorescência, para amostra aeróbica de TFP irradiada em 310nm (excitação 330 nm).

pH	λ_e (nm)	τ_1 (ns)	f_1 %	τ_2 (ns)	f_2 %	τ_3 (ns)	f_3 %	χ^2
3,0	505	3,0	88	7,1	5	0,04	7	1,04
3,0	470	2,9	88	7,1	8	0,2	4	1,14
3,0	410	1,9	77	4,9	18	0,2	5	1,03
7,0	505	3,1	74	5,3	18	0,04	8	1,16
7,0	470	2,9	74	6,0	22	0,2	4	1,08
7,0	410	2,3	62	6,3	31	0,4	7	1,17

Tem-se como resultado um tempo de vida para a TFP intacta entre 2.9-3.1 ns. Seu fotoproduto principal, que emite em 410 nm, decai com tempos entre 1.9-2.3 ns. Observamos também a contribuição de componentes com tempos de vida longos de 5,0-7,1 ns para pH 3,0 e de 5,3-6,3 ns para pH 7,0, que, como no caso da FPZ.

5.2.3.

Espectrometria de massa das fenotiazinas irradiadas.

Foram realizadas medidas de espectrometria de massa por dessorção a laser (LDI) em fenotiazinas nativas e fotodegradadas. Foram feitas medidas de amostras concentradas de fenotiazinas diluídas em etanol e depositadas diretamente no porta-amostra. Nesse caso a possível fotodegradação é causada em ambiente anaeróbico pelo feixe do laser (337 nm). Foram também utilizadas amostras em solução aquosa (40 μ M em tampão fosfato pH 7.4) tanto não iluminadas quanto previamente fotodegradadas com lâmpada de xenônio do espectrofluorímetro em condições aeróbicas. As amostras fotodegradadas foram iluminadas durante 45 min com luz ultravioleta (310 nm) (1,45 mW).

Nos espectros de massa, a região de menor massa é geralmente dominada por íons atômicos, íons de fragmentos não específicos e íons da substância na qual se deposita ou se dilui a amostra. Em geral, omite-se essa região. Na região de maior massa o espectro nos fornece íons de fragmentos e moléculas com informação estrutural.

Clorpromazina

As Figs. 5.19 e 5.20 apresentam os espectros de massa da amostra de CPZ depositada diretamente no porta-amostra a partir da solução em etanol. A Fig. 5.19 mostra o espectro completo de cátions, onde são observados picos em massas tanto menores como maiores do que a de CPZ^+ (318 Da).

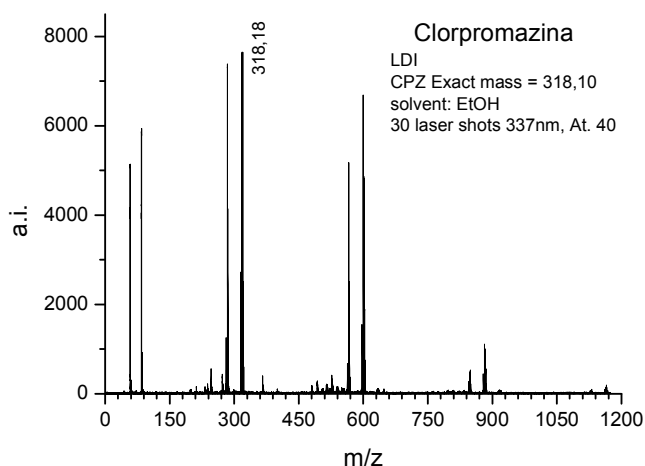


Figura 5.19. Espectrometria de massa da CPZ na faixa de 0 - 1200 Da. A CPZ não foi previamente diluída em PB nem irradiada pelo espectrofluorímetro.

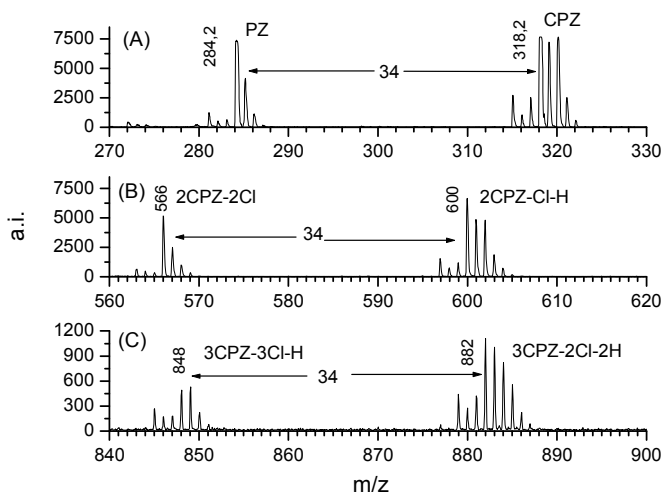


Figura 5.20. Espectrometria de massa da CPZ na faixa de 270 – 900 Da. A CPZ não foi previamente diluída em PB nem irradiada pelo espectrofluorímetro.

A faixa de 270-330 Da (Fig. 5.20 A) mostra o pico de CPZ^+ e de seu fotoproduto PZ^+ (284 Da). Na região de maiores massas são observados cátions de dímeros (Fig. 5.20 B) e trímeros (Fig. 5.20 C). O cloro tem dois isótopos com massas de 35 e 37 cujas abundâncias são de 75,8 e 24,2 %, respectivamente. É fácil, portanto, identificar a presença e a perda de átomos de Cl num espectro de massa. As atribuições dos picos da Fig. 5.20 foram feitas com base na presença ou ausência desses isótopos. Observa-se que os dímeros e trímeros se formam pela saída do cloro de pelo menos uma das moléculas de CPZ. Este resultado foi observado por Motten et al. (1985), que comentaram que o radical promazinil

pode reagir com outro radical promazinil ou com a CPZ para formar dímeros e polímeros maiores, e que esses fotoprodutos são observados principalmente em soluções mais concentradas.

A Fig. 5.21 mostra uma comparação entre os espectros de massa de cátions da CPZ obtidos a partir de amostra em tampão fosfato pH 7,4 sem prévia irradiação (A) e irradiada em ambiente aeróbico (B). As intensidades dos picos foram menores que na Fig. 5.19, devido à menor concentração de CPZ. Não foram detectadas massas moleculares na região de dímeros e polímeros, possivelmente a concentração utilizada não foi suficiente para formá-los. Na faixa de 260 – 340 Da (Fig. 5.22 A) amostra não irradiada, também são observados os picos relativos à CPZ^+ e PZ^+ . Esses picos quase desaparecem na amostra irradiada (Fig. 5.22 B). O espectro dessa última mostra um pico em 300,3 Da, que pode pertencer tanto a $PZOH^+$ como a $PZSO^+$, cujas fórmulas estruturais são mostradas na Fig. 5.23. Apareceu também um pico em 268,3 Da, que não se conseguiu identificar.

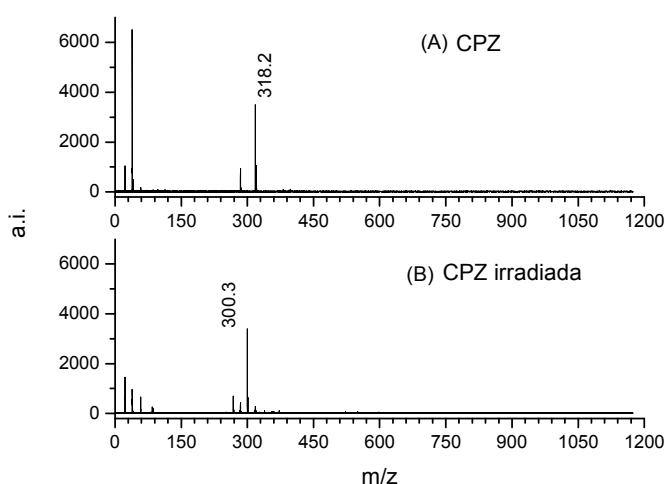


Figura 5.21. Espectro de massa de cátions da CPZ na faixa de 0 - 1200 Da. A CPZ foi previamente diluída em tampão fosfato (pH 7.4) em ambiente aeróbico. (A) CPZ não irradiada e (B) CPZ previamente irradiada no espectrofluorímetro em 310 nm.

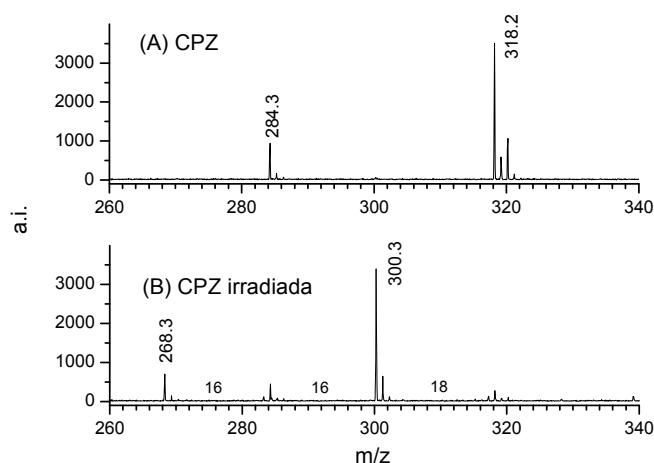


Figura 5.22. Faixa de 260 – 340 Da dos espectros de massa completos da Fig. 5.19. (A) CPZ não irradiada e (B) CPZ previamente irradiada.

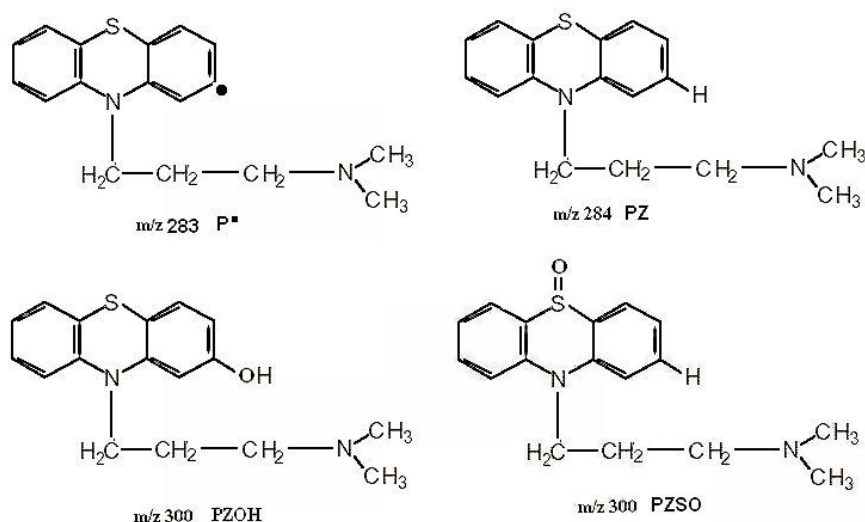


Figura 5.23. Estrutura química do radical neutro promazinil (PZ•), promazina (PZH), promazina hidroxilado (PZOH) e da promazina sulfóxido (PZSO).

Kochevar et al. (1983) acharam que, na ausência de oxigênio, a irradiação da CPZ em solução aquosa produz PZ, PZOH, produtos diméricos e poliméricos. Sugeriram que o estado excitado triplete T_1 da CPZ produz o radical neutro $PZ^{\bullet}$ e um átomo de cloro $Cl^{\bullet}$, via fissão homolítica (decloração da CPZ). Essa espécie instável, $PZ^{\bullet}$, reagiria com a água para formar a PZ e PZOH (Buettner G. R, et al., 1986). Motten A. et al.(1985), irradiando em 330 nm, também concluíram que o cloro sai da CPZ para formar o radical $PZ^{\bullet}$, que seria capaz de pegar um átomo de hidrogênio ou uma hidroxila do solvente para formar PZ e PZOH. Existe também

a possibilidade de que o radical $PZ^{\bullet}$ possa reagir com o oxigênio molecular para transformar-se num intermediário peroxi e formar a PZOH.

De nossos resultados de espectrometria de massa parece que a PZ, PZOH e PZSO são os possíveis fotoprodutos, formados em solução aquosa. Parece que a decoloração da CPZ é necessária tanto para a formação dos fotoprodutos (Fig. 5.22) como para a formação dos dímeros e trímeros (Fig. 5.20). Disto pode-se afirmar que a decoloração é um dos caminhos predominantes de fotodegradação da CPZ.

Segundo Van Den Broeke et al. (1994), irradiando CPZ com UVA-B em PBS (0,1 M, pH 7,4), produz-se a PZOH (65-90%) em maior quantidade que a PZ (5-7%) e que CPZSO (0-2%) e que PZOH sofre fotodecomposição. De fato, a CPZSO (334 Da) não foi observada em nossos espectros de massa e a massa molecular de 268 Da (Fig. 5.22 B) poderia ser uma consequência da fotodecomposição da PZOH. Já os espectros de excitação de fluorescência (Fig. 5.8) sugerem que o fotoproduto fluorescente produzido em maior quantidade que os outros fotoprodutos é PZSO e não PZOH, como sugerido em (Van Den Broeke et al., 1994).

Flufenazina

A Fig. 5.24 mostra o espectro de massa de flufenazina, obtido por LDI com amostra previamente diluída em etanol, sem prévia iluminação. A Fig. 5.24 A, apresenta o espectro completo, mostrando o pico relativo da FPZ^+ , em 437,12 Da. Ao contrário do ocorrido com CPZ, não foram detectadas massas moleculares maiores, referidas a dímeros ou polímeros (Fig. 5.24 B). Isso sugere que a quebra da ligação com cloro na posição 2 é importante para a formação de polímeros. São formados produtos de menores massas moleculares, causados pelo laser do espectrômetro de massa. Um desses picos (421,3 Da) parece estar relacionado com a saída de um oxigênio na FPZ. Não aparecem fragmentos associados à perda de CF_3 (69 Da), o que explica a ausência de dímeros ou trímeros.

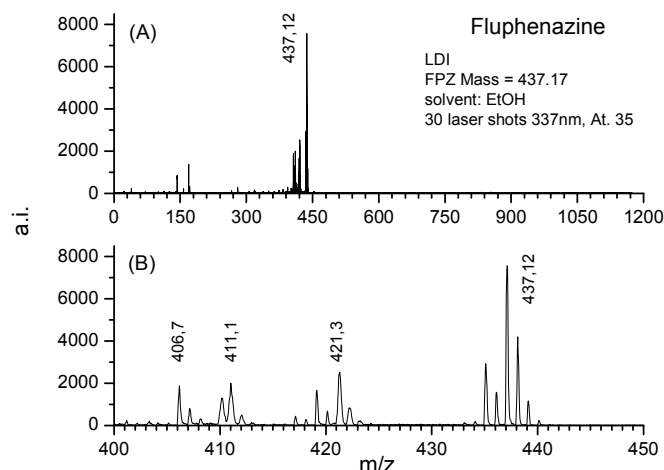


Figura 5.24. Espectrometria de massa FPZ na faixa de 0 - 1200 Da. A FPZ foi previamente diluída em etanol e não foi previamente irradiada.

A Fig. 5.25 mostra os espectros completos de massa da FPZ em tampão fosfato, antes (A) e depois de uma prévia irradiação em condições aeróbicas (B). Aqui também não foram detectados picos relativos a dímeros e polímeros. Na faixa de 380 - 450 Da (Fig. 5.26) a amostra previamente irradiada apresenta mais fotoprodutos com massas moleculares menores (382.3 Da e 387.3 Da). Não apareceu pico algum que indicaria a adição de um átomo de oxigênio, mas apareceu um pico extra em 413.2 Da.

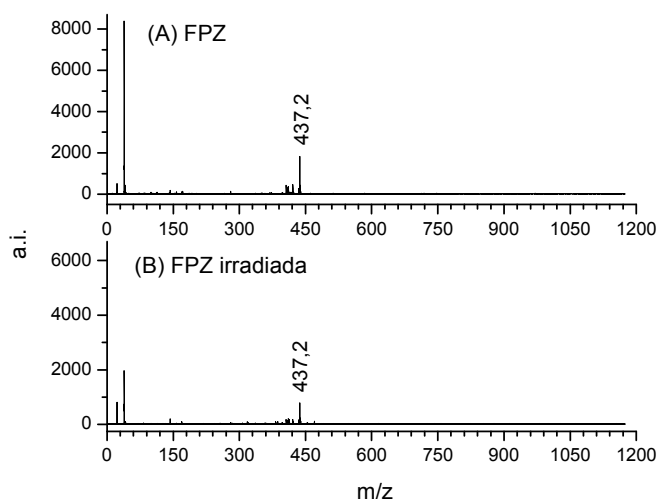


Figura 5.25. Espectros de massa da FPZ na faixa de 0 - 1200 Da. As amostras aeróbicas foram de 40µM de FPZ em PB a pH 7. A seção (A) é a FPZ não irradiada e a (B) a FPZ irradiada pelo espectrofluorímetro em 310nm.

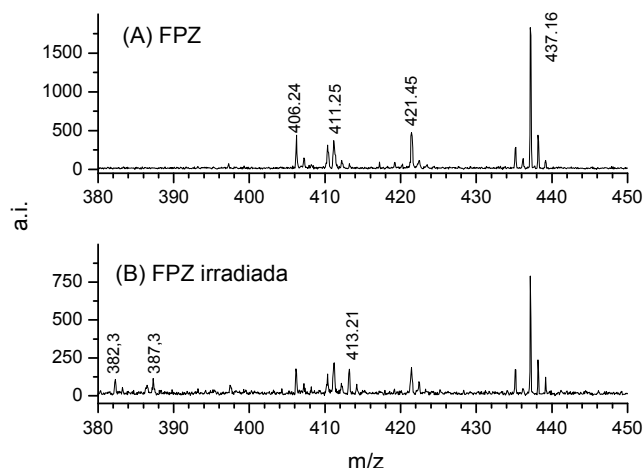


Figura 5.26. Faixa de 380 – 450 Da dos espectros de massa completos da Fig. 5.24. (A) FPZ não irradiada e (B) FPZ irradiada em ambiente aeróbico.

É importante notar que Miolo G. et al. (2006), depois de irradiarem flufenazina (10^{-2} M) com luz de 365 nm em metanol-água (1:1), encontraram dois fotoprodutos principais. Um dos fotoprodutos, com massa molecular de 413,2 Da, apresentou um deslocamento para o vermelho de 3 nm no maior pico de absorção, assim como um novo pico em 233 nm. Utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear (NMR) concluíram que o grupo $-\text{CF}_3$ é substituído pelo $-\text{COOH}$ (Fig. 5.27), que estaria associado ao pico de 413,2 Da.



Figura 5.27. Estrutura química do fotoproduto da FPZ de peso molecular 413 Da.

Trifluoperazina

A Fig. 5.28 mostra o espectro de massa da TFP previamente diluída em etanol, sem previa iluminação. O espectro A, completo, mostra o pico relativo à TFP^+ em 407,2 Da. Mostra também que a irradiação do laser provoca a formação de menos fragmentos do que na FPZ e na CPZ. Ao contrário da FPZ, só apareceu um pico de massa molecular menor que a TFP (B).

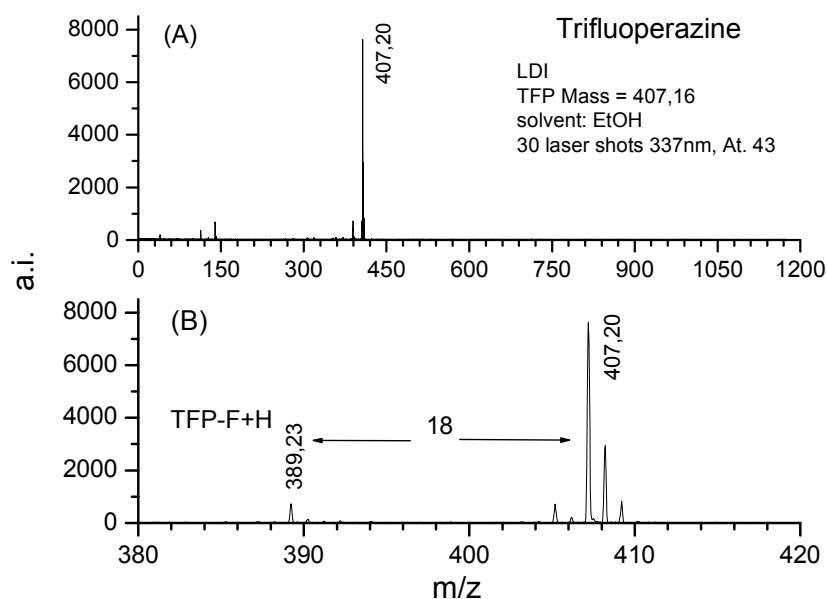


Figura 5.28. (A) espectrometria de massa TFP na faixa de 0 - 1200 Da. (B) faixa de 380 – 420 Da. A TFP foi previamente diluída em etanol e não foi previamente irradiada.

A Fig. 5.29 mostra os espectros completo de massa da TFP em tampão PB, antes (A) e depois da irradiação em condições aeróbicas (B). A amostra irradiada apresentou espectro de massa bastante diferente da não irradiada, ao contrário do que se obteve para a FPZ. Observamos também que não se formaram dímeros ou polímeros, mas se formam produtos com massas maiores que a TFP.

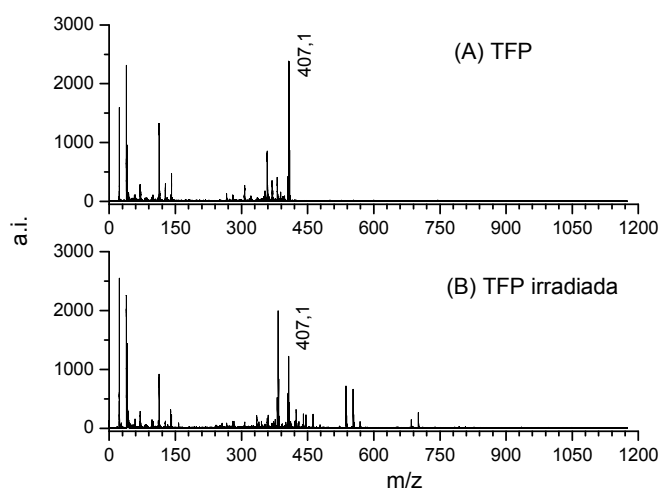


Figura 5.29. Espectros de massa da TFP na faixa de 0 - 1200 Da. (A) TFP não irradiada e (B) a TFP irradiada pelo espectrofluorímetro em 310nm. As amostras aeróbicas foram de 40µM de TFP em PB a pH 7.

A Fig. 5.30 mostra com mais detalhe algumas regiões. A Fig. 5.30 C mostra que, depois da irradiação, aparecem dois picos que indicam a adição de oxigênio à TFP: o pico em 424 Da seria a adição de um OH (17 Da), ou de um oxigênio e um hidrogênio em posições diferentes da molécula, e o pico em 440 Da à adição de mais um átomo de oxigênio. Os outros picos de massas maiores possivelmente consistem da agregação de fragmentos pequenos com a TFP. Com relação à menor massa molecular 383 Da, parece também que seu grupo trifluorometil sofre substituição por COOH, em quantidades maiores do que FPZ.

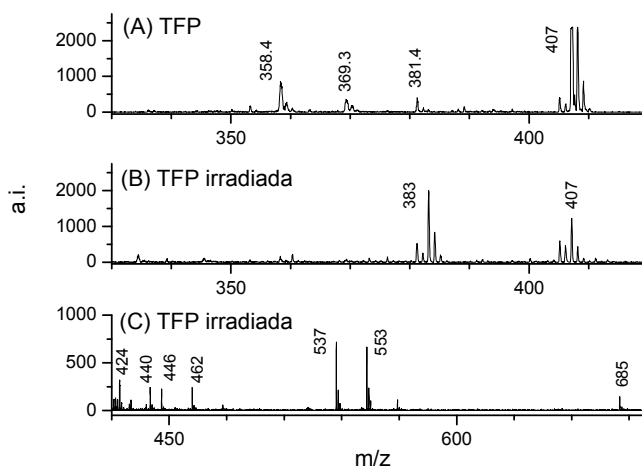


Figura 5.30. Espectros de massa da TFP sem irradiar na faixa de 330 – 420 Da (A) e irradiada na faixa de 320 – 700 Da (B e C).

Os fotoprodutos de TFP formados principalmente pela irradiação do laser na câmara de vácuo do espectrômetro de massa, segundo a Fig. 5.28 (ambiente anaeróbico), foram diferentes dos fotoprodutos criados por prévia irradiação aeróbica em tampão fosfato mostrada na Fig. 5.29 B (condição aeróbica).

5.2.4.

Discussão sobre a fotodegradação de fenotiazinas

Neste trabalho observamos que as propriedades de absorção e fluorescência das fenotiazinas são dependentes do tipo de substituinte ou grupo radical localizado na posição 2 no heterocíclico (Fig. 5.31). Por outro lado, dependem pouco do substituinte na posição 10, como mostra a similaridade na absorção e emissão observada em TFP e FPZ intactas.

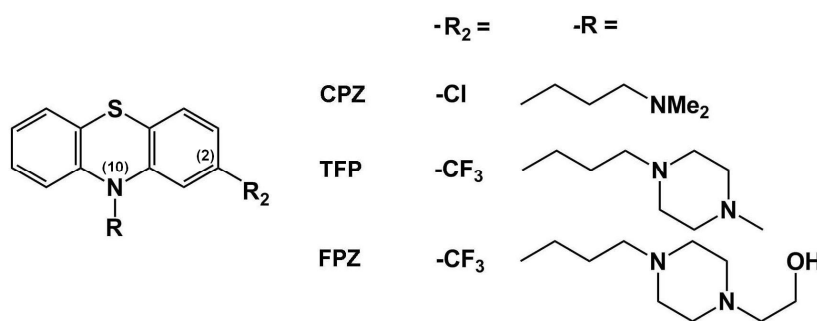


Figura 5.31. Estrutura química da CPZ, TFP e FPZ intactas.

As três fenotiazinas utilizadas neste trabalho fotodegradam tanto em ambiente anaeróbico como aeróbico. Os espectros de absorção tomados a diferentes tempos de irradiação das fenotiazinas sugerem que a fenotiazina 5-SO é uma das espécies formadas (Iwaoka T. et al., 1974; Rodrigues et al., 2006, Joshi R. et al., 2008). Os espectros de excitação dos fotoprodutos complementaram os resultados de absorção, mostrando que a espécie fluorescente possui picos de excitação nas mesmas posições que as espécies sulfóxidas (Fig. 5.9 e 5.16).

Nas três fenotiazinas, os espectros de emissão medidos a diferentes tempos de iluminação mostraram a formação de fotoprodutos fluorescentes com deslocamento Stokes bem menores do que os das fenotiazinas intactas.

Os produtos fluorescentes de TFP e FPZ desenvolvidos em presença de oxigênio foram identificados como as espécies sulfóxidas, com único pico de emissão em 410nm. Para CPZ, a espécie sulfóxida só aparece em pH ácido em presença de O_2 (Fig. 5.10). Em pH neutro e ácido, por outro lado, desenvolve-se em ambiente anaeróbico um fotoproduto com espectro de fluorescência ainda não descrito na literatura (Fig. 5.8 A, 11 e 13 A-B). Esta espécie fluorescente de triplo pico de emissão não pode ser uma espécie hidroxilada da CPZ já que se desenvolve em maior quantidade em meio ácido.

Medidas de fluorescência da CPZ sob irradiação em condições anaeróbicas mostraram que a PZ (com pico em 450 nm) fica estável em ausência de O_2 em pH neutro e ácido (Fig. 5.13 C). Por outro lado, a espécie de pico triplo continua incrementando sua intensidade. Isto nos quer dizer que esta última espécie não pode ser originada de PZ. Também se viu que esta espécie depende do pH, desenvolvendo-se em maior quantidade em meio ácido.

Medidas de tempo de vida das fenotiazinas em meio ácido (pH 3.0) e neutro (pH 7.0), mostraram tempos de vida maiores para derivados de 2- CF_3 de

fenotiazinas, TFP e FPZ, do que para o derivado 2-Cl, CPZ. O pequeno tempo de vida da CPZ (0,37-0,43 ns) é causado pela presença do cloro, que ocasiona outros caminhos de desativação da fluorescência. O tempo de vida da PZ (fotoproduto da CPZ) entre 1,37-1,71 ns, muito maior que o de CPZ, é atribuído à saída do cloro na CPZ. O fotoproduto fluorescente da CPZ (emissão em 378 nm na Tabela 5.1) parece ainda conter o cloro em sua estrutura, já que seu tempo de vida é muito curto e parecido ao da CPZ (0,3 ns).

A FPZ e TFP intactas, com tempos de vida parecidos (~ 3 ns), apresentaram fotoprodutos fluorescentes com tempo de vida menores (~ 2 ns) (Tabelas 5.3 e 5.4). Componentes com tempos de vida mais longos também foram observados em pequenas proporções nas três fenotiazinas irradiadas.

Karpinska et al. (1996) notaram que o substituinte na posição 10 do anel fenotiazínico não tem influência na fluorescência destes derivados, ao contrário do substituinte na posição 2. De fato, TFP e FPZ, que possuem o mesmo substituinte na posição 2, -CF₃, mostraram os mesmos resultados de fluorescência estacionária e resolvida no tempo, tanto na forma intacta quanto em relação aos fotoprodutos. Já a CPZ, com substituinte diferente na posição 2, Cl, apresentou comportamento bem diferente.

Medidas de espectrometria de massa por dessorção a laser (LDI) foram feitas com fenotiazinas não previamente irradiadas e também fotodegradadas em solução aquosa a pH 7,4. Para amostras sem previa irradiação, mais concentradas e depositadas no porta-amostras a partir de uma solução em etanol, encontrou-se que somente a CPZ forma dímeros (Fig. 5.20 B) e trímeros (5.20 C), com perda do Cl na posição 2 do anel. Isso indica que em TFP e FPZ o grupo CF₃ não sofre fotólise. Já para amostras previamente fotodegradadas, irradiando-se soluções aquosas da ordem de 40 µM, os resultados de espectrometria de massa mostraram a ausência de dímeros ou polímeros maiores também para CPZ, (Fig. 5.19), provavelmente pela pequena concentração.

A PZ (284,3 Da) é um fotoproduto conhecido da CPZ e está presente em todos os resultados de espectrometria de massa da CPZ (Fig. 5.20 A e 5.22). Para formar esta espécie é preciso que o átomo de cloro saia da CPZ, formando o radical PZ[•], que em ambiente aquoso pode reagir com um átomo de hidrogênio ou uma hidroxila para formar a PZ ou PZOH (300 Da). Também se observou que a saída do cloro traz como consequência a formação de dímeros e trímeros de CPZ

(Fig. 5.20). A dechlorinação parece ser um dos principais caminhos para a fotodegradação da CPZ (Buettner et al., 1986; Motten et al., 1985).

A massa molecular de 300 Da na Fig. 5.22, formada pela irradiação em ambiente aeróbico pode estar associada a PZSO ou a PZOH (Fig. 5.23). A ausência do pico de massa 300 Da no espectro de massa obtido sem prévia irradiação, em ambiente anaeróbico (Fig. 5.20), seria devido à ausência de O₂ ou de água durante a irradiação com o laser.

Iwaoka T. et al. (1974), irradiando a CPZ em água ou etanol em condições aeróbicas e anaeróbicas (pH 4.7), sugeriram que o oxigênio molecular é indispensável tanto para formação do radical cátion da CPZ (CPZ^{•+}) como para a formação da CPZSO, e que o átomo de oxigênio no sulfóxido se origina do oxigênio atmosférico e não da água. Nossos resultados também mostraram que a espécie sulfóxida encontrada para a CPZ (Fig. 5.10) somente se desenvolve em meio ácido em presença de O₂. No entanto, o crescimento do fotoproducto de triplo pico de emissão é favorecido em ausência de O₂, em presença de água (em etanol não cresce) e em meio ácido.

A FPZ e TFP mostraram resultados distintos nas medidas de espectrometria de massa, apesar de resultados de fluorescência similares. Em amostras previamente irradiadas, os espectros de massa da TFP mostraram picos de massa de pouca intensidade que indicam a adição de átomos de oxigênio (Fig. 5.30). Isso não foi observado nos espectros da FPZ. Os espectros de excitação similares em ambas as fenotiazinas (Fig. 5.13) mostram picos similares aos das espécies sulfóxidas encontrados na literatura (Mellinger et al., 1963; Ragland et al., 1964). Com esses resultados podemos concluir que as espécies sulfóxidas de TFP e FPZ são as espécies fluorescentes criadas em nosso trabalho. Também observamos que os fotoproductos de TFP e FPZ (Fig. 5.12 e 5.15) são similares (emissão em 410 nm), mas possuem características de fluorescência bem diferentes das do fotoproducto de CPZ (emissão 340 nm, 352 nm e 372 nm). Seus crescimentos dependem da presença de O₂ de maneira inversa.

5.3.

Fenotiazinas como sensor óptico de oxigênio e de radiação ultravioleta baseado na fotodegradação

A radiação ultravioleta (UV) é uma pequena parte da radiação solar (10 %). Algumas regiões da radiação UV recebem denominação especial: UVA para 320 - 400nm (é quase toda absorvida pelo ozônio), UVB para 280 - 320nm (boa parte é absorvida pelo ozônio) e UVC para 200 - 280nm (não é absorvida pelo ozônio).

A radiação UV é não ionizante, excita os elétrons de uma molécula ou átomo para um nível energético superior, deixando-os em estado ativado (excitado). A radiação UV interage com muitas moléculas biológicas como o DNA (ácido desoxirribonucléico), que absorve no UVC e parte de UVB provocando quebras em suas cadeias e com isso alterações genéticas. A interação com a radiação UV também é benéfica e mesmo essencial à sobrevivência, como na síntese da vitamina D. Esta molécula ajuda na absorção do cálcio e do fosfato pelo aparelho digestivo e, portanto, contribui para o crescimento normal e para o desenvolvimento do esqueleto.

O ar é uma mistura gasosa constituída por 21% de O₂. O oxigênio além de ser um gás de muita importância para os seres vivos, também está envolvido em muitas reações bioquímicas seja como um reagente ou produto.

Um sensor é um dispositivo capaz de detectar algo através da medida de alguma grandeza física associada à sua presença. Os sensores óticos e eletroquímicos formam dois grandes grupos entre a imensa variedade de sensores existentes no mercado. Os sensores óticos são principalmente baseados na detecção de mudanças na absorbância, refletância, fluorescência, quimioluminescência, polarização de luz, etc. (Woflbeis, 1993)

Na atualidade, sensores óticos baseados na fluorescência são os mais desenvolvidos, já que a espectroscopia de fluorescência é uma técnica de alta sensibilidade, especificidade e versatilidade comparada com a espectroscopia de absorção. A fluorescência é uma técnica inerentemente mais seletiva que a absorção porque se podem medir pelo menos cinco variáveis independentes que caracterizam uma componente fluorescente numa amostra: a intensidade de emissão como função do comprimento de excitação (espectro de excitação), a intensidade de excitação como função do comprimento de emissão (espectro de emissão), o rendimento quântico, o tempo de vida do estado excitado e a

polarização da emissão. Os princípios de operação dos sensores óticos são muitas vezes baseados na supressão da intensidade de fluorescência de uma molécula conhecida. Na supressão dinâmica e estática, a intensidade de fluorescência medida está relacionada com a concentração do supressor; como exemplo, menciona-se o oxigênio que é um conhecido supressor colisional de fluoróforos (supressão dinâmica).

Nesta seção proporemos outro método de detecção da radiação UV ou da concentração de oxigênio, que sirva de base para construir sensores de UV ou de oxigênio. O princípio é baseado no fenômeno da fotodegradação das fenotiazinas trifluoperazina (TFP) e flufenazina (FPZ) estudado nas seções anteriores. Estas drogas fotodegradam-se num fotoproduto fluorescente estável em presença de oxigênio. A intensidade de fluorescência do fotoproduto, espécie sulfóxida, é dependente da concentração de oxigênio molecular presente no ambiente e das doses de irradiação UVB. Descrevemos, a seguir, os procedimentos realizados com TFP para obter a dependência da fluorescência do fotoproduto com a dose de irradiação UV e com a concentração de oxigênio. Os resultados com FPZ são semelhantes.

5.3.1. Arranjo experimental

Para determinar o aumento de fluorescência sob irradiação, devido à produção de TFPSO, como função da concentração de oxigênio, nós preparamos soluções de TFP sob atmosfera controlada. Em presença de oxigênio molecular dissolvido na solução aquosa contida na cubeta forma-se o fotoproduto fluorescente de TFP.

Na Fig. 5.32, mostra-se o diagrama dos passos experimentais executados para a calibração de oxigênio. A cubeta anaeróbica (C) possui uma válvula que permite abrir e fechar a entrada de misturas de gases. A cubeta (C) contém TFP diluída em tampão (2,4 ml). Para preparar a seringa (B) com uma quantidade conhecida de oxigênio primeiro a preenchemos com certa quantidade de nitrogênio e, rapidamente a completamos com ar (0, 2, 4 ... ml).

No passo (1) o oxigênio é bombeado para fora da célula (C). No passo (2), a célula é preenchida com a mistura N_2 /ar, ao se conectar a seringa. A solução é submetida a agitação magnética por cerca de 15 min, a fim de se estabelecer o

equilíbrio. Então a seringa é desconectada, deixando-se a pressão interna total da célula igual à pressão atmosférica.

O terceiro passo (3) consiste em submeter a amostra à irradiação contínua (em 310 nm) e medir a intensidade de fluorescência em 410 nm em função do tempo para cada pressão parcial de O_2 (% atm). A irradiação em 310 nm induz o aparecimento do fotoproduto fluorescente e também excita a fluorescência.

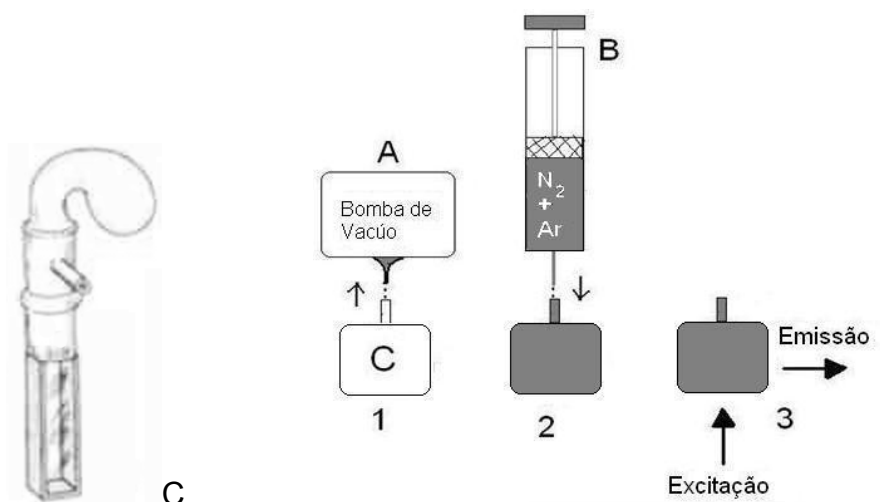


Figura 5.32. Cubeta anaeróbica e diagrama dos passos experimentais seguidos para a calibração de O_2 .

5.3.2.

Resultados da variação da fluorescência com a dose de radiação e com a concentração de oxigênio

A Fig. 5.33 mostra o espectro de emissão (excitação em 310 nm, 0,45mW) e de excitação (emissão em 410 nm) de TFP depois de sofrer irradiação por um tempo de 3 horas. Lembramos que o fotoproduto de TFP, que se forma numa solução aquosa em ambiente aeróbico, apresenta as seguintes propriedades: emite em 410 nm com uma intensidade muito maior que na ausência de oxigênio; de seu espectro de excitação achamos que pode ser excitado em 276 nm, 306 nm e 353 nm. Seu máximo de emissão se desloca para o azul (aprox. 5 nm) em pH mais ácido e é um pouco mais intenso num meio mais básico. Esta espécie fluorescente possui um tempo de vida entre 1.9-2.3 ns, que é menor do que TFP intacta (~ 2.9 ns).

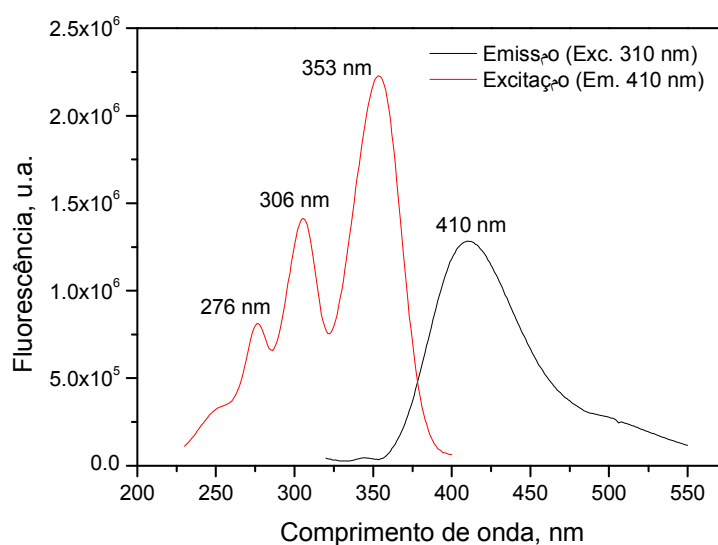


Figura 5.33. Espectro de emissão (exc. 310 nm) e excitação (em. 410 nm) da TFP (30 μ M) depois de 3 horas de irradiação (0, 453 mW) em condição aeróbica. Tampão utilizado foi fosfato em pH 7.4.

A Fig. 5.34 mostra a intensidade de fluorescência da TFPSO (emissão 410 nm) em função da energia total de irradiação (potência $\times$ tempo de irradiação) para diferentes concentrações de O_2 . Para os valores utilizados nas fendas do monocromador de excitação fixamos a potência de irradiação em 0,45 mW. Estes resultados mostram que a TFP pode ser calibrada como sensor de O_2 (a constante irradiação UV) e como sensor UV (a solução saturada de O_2).

Observa-se também da Fig. 5.34 que o fotoproduto de TFP possui uma cinética de formação lenta, tornando ampla a faixa de energia de irradiação na calibração como de sensor UV. As curvas experimentais foram analisadas usando a equação de associação de um exponencial: $F = F_0 + F_1[1 - \exp(-E / \varepsilon)]$. Para 0% e 21%, encontrou-se para a energia característica, ε , os valores de 0,95 J ($\sim$ 35 min de irradiação) e 0,58 J ($\sim$ 21 min de irradiação), respectivamente. Isto indica que a cinética de formação da TFPSO é mais rápida em presença de O_2 , precisando-se para isso de menos energia de irradiação. Para baixas energias de irradiação, menores de 0,27 J (aprox. 10 min de irradiação), observam-se as curvas experimentais comportando-se quase linearmente.

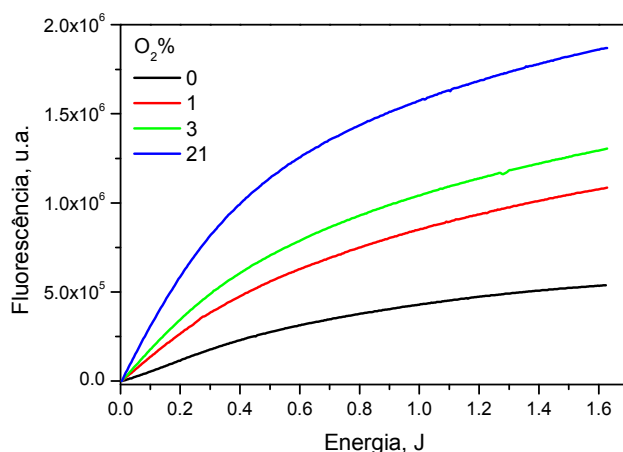


Figura 5.34. (A) Intensidade de fluorescência corrigida da TFPSO (emissão 410 nm) em função de energia de irradiação a diferentes concentrações de O_2 . A TFP foi excitada em 310 nm em tampão fosfato pH 7.4.

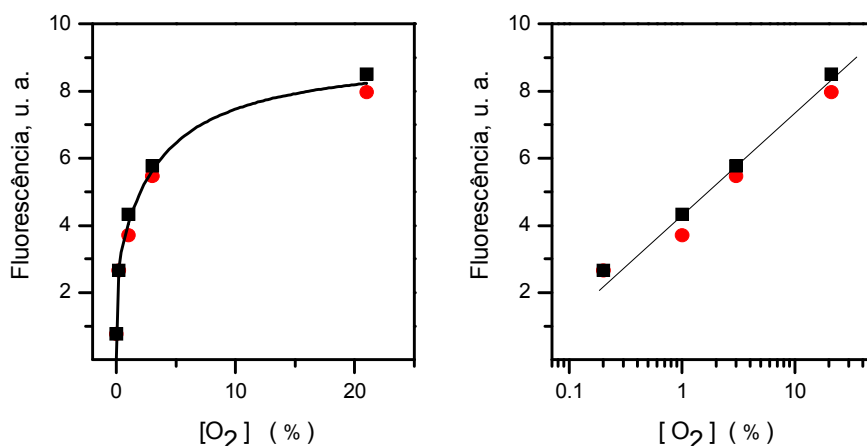


Figura 5.35. Intensidade de fluorescência corrigida da TFPSO em função da $\%O_2$ (à esquerda, escala linear e à direita, escala logarítmica). Os dois símbolos correspondem a duas séries de medidas.

A Fig. 5.35 mostra a fluorescência do fotoproduto (TFPSO) como função do $O_2\%$ para um tempo de irradiação UV de 60 min (1,6 J). Daqui vemos que o método é particularmente sensível para concentrações baixas de O_2 , menos de 3%. Concluimos então que também a TFP por meio da fluorescência de seu fotoproduto TFPSO pode ser calibrada como sensor de O_2 .