

Título em Português: Determinação de espécies reativas de oxigênio produzidas em reações sonodinâmicas

Título em Inglês: Determination of reactive oxygen species produced in sonodynamic reactions

Autor: Murilo de Oliveira Souza

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Sebastião Pratavieira

Área de Pesquisa /
SubÁrea: Física Geral

Agência Financiadora: CNPq - PIBIC

Determinação de espécies reativas de oxigênio produzidas em reações sonodinâmicas

Autor: Murilo de Oliveira Souza¹
Orientador: Sebastião Pratavieira²

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo - Brasil
murilodeoliveira8@usp.br¹ prata@ifsc.usp.br²

Objetivos

O objetivo desse projeto é determinar as espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas por sensibilizadores (SS) durante a interação com o ultrassom terapêutico, podendo ao final desta pesquisa, relacionar essas produções com a mudança da concentração das moléculas e dos parâmetros do ultrassom, como a frequência, modo de irradiação e intensidade. Esta pesquisa tem o intuito de ajudar na compreensão dos efeitos sonodinâmicos sobre as moléculas sensibilizadoras durante a Terapia Sonodinâmica.

Materiais e Métodos

para entender melhor a interação entre o ultrassom e o SS, que leva à geração de oxigênio singlete, foram realizados estudos de espectroscopia. Para a espectroscopia UV-Vis, o 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) foi utilizado como sensor químico de oxigênio singlete. Para a análise de EPR, devido ao tempo de vida baixo do $^1\text{O}_2$, utilizou-se um spin-trap, 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidino (TEMP) para estabilizá-lo. Os SS's estudados foram: Protoporfirina IX (PpIX), Curcumina (CCM), Azul de Metileno (MB), Indocianina Verde (ICG) e Clorina e6 (Ce6) e os parâmetros do ultrassom foram intensidade de 2.0 W/cm^2 , frequência de 100 Hz, ciclo de trabalho de 50% e tempo de tratamento de 1 minuto, constantes ao longo de todos os experimentos realizados em triplicatas.

Resultados

O sequestrador químico DPBF, possui um pico de absorvância característico no comprimento de onda de 417 nm, entretanto, quando essa molécula reage com o oxigênio singlete, atuando como sequestrador químico, ele perde esse pico característico de absorvância, desse modo, mo-

nitorar tal queda de absorvância, se torna uma maneira indireta de se medir a geração de oxigênio singlete no meio. (Figura 1)

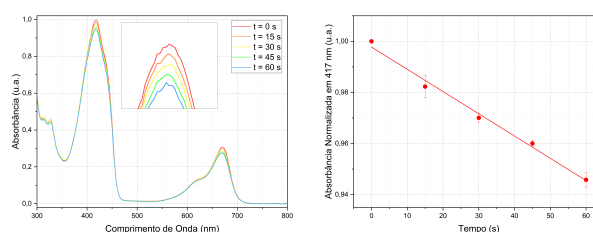


Figura 1: Espectro de absorvância para uma amostra de azul de metileno [1 μM] com DPBF [25 μM] durante um tratamento com US e monitoramento do comprimento de onda de 417nm.

Utilizando o valor absoluto do coeficiente angular encontrado em cada um dos sensibilizadores, encontramos a constante de decaimento da molécula, o que nos permite comparar os sensibilizadores estudados. (Figura 2)

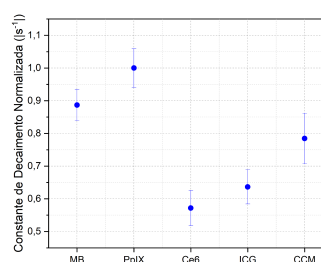


Figura 2: Análises das constantes de decaimentos para os cinco sensibilizadores testados.

Para complementar o estudo podemos utilizar outras técnicas espectroscópicas como a ressonância paramagnética eletrônica (EPR), utilizando um sequestrador de radicais conhe-

cido como *spin-trap*, especificamente o 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidino (TEMP), que forma um aduto estável quando ligado com o 1O_2 . Esse aduto, um radical nitróxido paramagnético, pode ser facilmente detectado pela técnica de EPR. Os espectros típicos desse aduto mostram três picos de tamanhos semelhantes, correspondentes às interações hiperfinas entre o elétron livre e o núcleo de nitrogênio. (Figura 3)

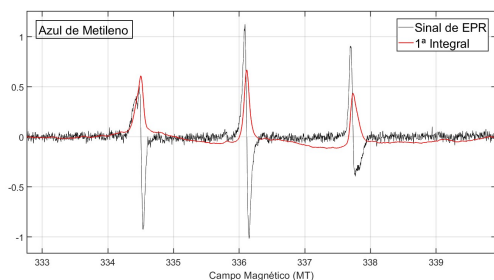


Figura 3: Espectro de EPR gerado pela interação do sequestrador TEMP [50 uM] com 1O_2 durante tratamento de uma amostra com azul de metileno.

O sinal medido tem relação indireta com a concentração de radicais livres na solução, por isso deve ser integrado duas vezes e o valor total (Amplitude) deve ser normalizado para efeitos de comparação entre as moléculas estudadas. (Figura 4)

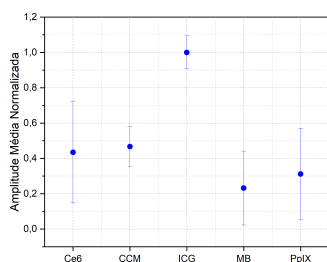


Figura 4: Comparação do valor da segunda integral do sinal de EPR gerado para cada sensibilizador estudado.

Desse modo, quanto maior o valor pico-á-pico de nosso espectros maior é a quantidade de interações presentes em nosso meio, o que indica uma maior presença de espécies reativa, no caso, 1O_2 .

Conclusões

A partir do resultados obtidos é possível inferir algumas conclusões. Inicialmente, a espectroscopia óptica mostra que a absorção das soluções diminui, indicando captura de 1O_2 pelo sequestrador DPBF. A análise das constantes de decaimento revela que a protoporfirina IX (PpIX) e o azul de metileno (MB) geram mais 1O_2 . No entanto, a interação do ultrassom com o sequestrador pode introduzir erros experimentais. A EPR, por outro lado, com o uso do *spin-trap* TEMP, demonstrou que a indocianina verde (ICG) gerou mais 1O_2 , enquanto os outros sensibilizadores apresentaram resultados estatisticamente semelhantes.

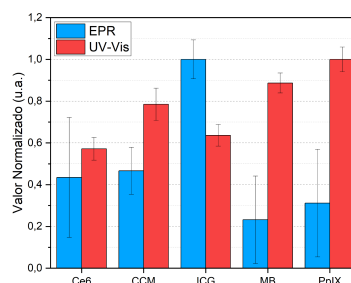


Figura 5: Análise comparativa dos dois métodos utilizados para se medir a geração de 1O_2 para cinco diferentes moléculas submetidas a um mesmo tratamento de ultrassom.

Os resultados contrastantes entre as técnicas sugerem a necessidade de novas medições com outros sequestradores e novos parâmetros de estudo, para melhorar a precisão e confiabilidade dos resultados, entretanto é possível notar que todos os sensibilizadores estudados de fato apresentam geração de 1O_2 , comprovado pelo uso de duas técnicas espectroscópicas.

Referências

- [1] Rosenthal, I. et al. Sonodynamic therapy: a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, n. 6, p. 349-363, Sept. 2004.
- [2] Sang Kuk Han et al. Evidence of singlet oxygen and hydroxyl radical formation in aqueous goethite suspension using spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR). In: *Chemosphere* 84.8 (2011), pp. 1095–1101.

Determination of reactive oxygen species produced in sonodynamic reactions

Author: Murilo de Oliveira Souza¹

Advisor: Sebastião Pratavieira²

Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo - Brasil

murilodeoliveira8@usp.br¹ prata@ifsc.usp.br²

Objectives

The aim of this project is to determine the reactive oxygen species (ROS) generated by sensitizers (SS) during interaction with therapeutic ultrasound. At the end of this research, it will be possible to relate these productions to changes in the concentration of the molecules and ultrasound parameters such as frequency, irradiation mode and intensity. This research aims to help understand the sonodynamic effects on sensitizing molecules during Sonodynamic Therapy.

Materials and Methods

To better understand the interaction between ultrasound and SS, which leads to the generation of singlet oxygen, spectroscopy studies were carried out.

For UV-Vis spectroscopy, 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF) was used as a chemical sensor for singlet oxygen. For the EPR analysis, due to the low lifetime of 1O_2 , a spin-trap, 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol (TEMP) was used to stabilise it. The SS's studied were: Protoporphyrin IX (PpIX), Curcumin (CCM), Methylene Blue (MB), Indocyanine Green (ICG) and Chlorine e6 (Ce6) and the ultrasound parameters were intensity of 2.0 W/cm², frequency of 100 Hz, duty cycle of 50% and treatment time of 1 minute, constant throughout all the experiments carried out in triplicates.

Results

The chemical scavenger DPBF has a characteristic absorbance peak at a wavelength of 417 nm, however, when this molecule reacts with singlet oxygen, acting as a chemical scavenger, it loses this characteristic absorbance peak, so monitoring this drop in absorbance becomes an indirect way of measuring the generation of singlet oxygen in the medium (Figure 1).

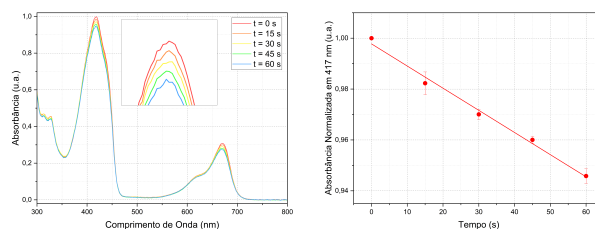


Figure 1: Absorbance spectrum for a sample of methylene blue [1 μ M] with DPBF [25 μ M] during a US treatment and monitoring of the 417nm wavelength.

Using the absolute value of the angular coefficient found in each of the sensitizers, we find the decay constant of the molecule, which allows us to compare the sensitizers studied (Figure 2).

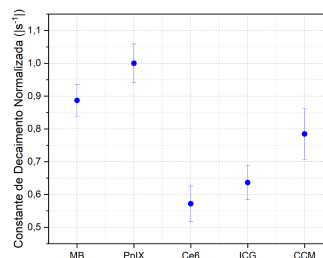


Figure 2: Analysis of decay rates for the five sensitizers tested.

To complement the study, we can use other spectroscopic techniques such as electron paramagnetic resonance (EPR), using a radical scavenger known as *spin-trap*, specifically 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol (TEMP), which forms a stable adduct when bound to 1O_2 . This adduct, a paramagnetic nitroxide radical, can be easily detected using the EPR technique. Typical spectra of this adduct show three peaks of similar size, corresponding to hyperfine interactions between the free electron and the nitrogen nu-

cleus.(Figure 3)

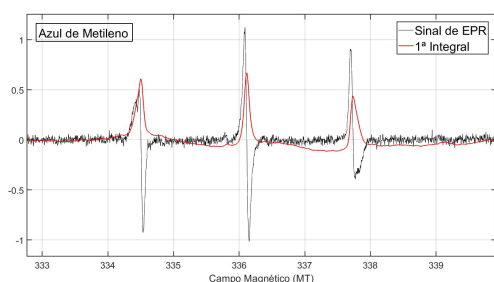


Figure 3: EPR spectrum generated by the interaction of the sequestering agent TEMP [50 μ M] with 1O_2 during treatment of a sample with methylene blue.

The measured signal is indirectly related to the concentration of free radicals in the solution, so it must be integrated twice and the total value (Amplitude) must be normalised for comparison purposes between the molecules studied (Figure 4).

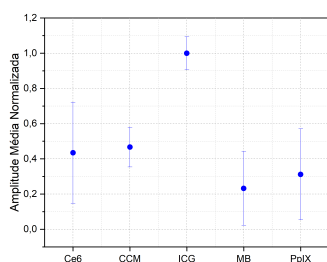


Figure 4: Comparison of the value of the second integral of the EPR signal generated for each sensitizer studied.

Thus, the higher the peak-to-peak value of our spectra, the greater the number of interactions present in our environment, which indicates a greater presence of reactive species, in this case, 1O_2 .

Conclusions

Some conclusions can be drawn from the results. Firstly, optical spectroscopy shows that the absorption of the solutions decreases, indicating the capture of 1O_2 by the DPBF sequesteror. Analysing the decay constants reveals that protoporphyrin IX (PpIX) and methylene blue (MB) generate more 1O_2 . However, the interaction of

ultrasound with the sequestering agent can introduce experimental errors. EPR, on the other hand, using *spin-trap* TEMP, showed that indocyanine green (ICG) generated more 1O_2 , while the other sensitizers showed statistically similar results.

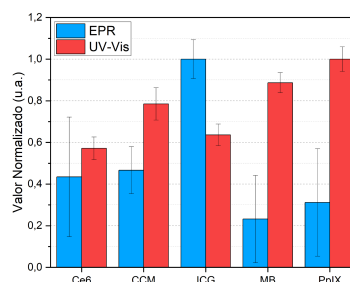


Figure 5: Comparative analysis of the two methods used to measure the generation of 1O_2 for five different molecules subjected to the same ultrasound treatment.

The contrasting results between the techniques suggest the need for new measurements with other sequestering agents and new study parameters, in order to improve the accuracy and reliability of the results. However, it is possible to note that all the sensitizers studied do indeed generate 1O_2 , as proven by the use of two spectroscopic techniques.

References

- [1] Rosenthal, I. et al. Sonodynamic therapy: a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 11, n. 6, p. 349-363, Sept. 2004.
- [2] Sang Kuk Han et al. Evidence of singlet oxygen and hydroxyl radical formation in aqueous goethite suspension using spin-trapping electron paramagnetic resonance (EPR). In: *Chemosphere* 84.8 (2011), pp. 1095–1101.