

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ÓPTICAS DO COMPLEXO HIPOCRELINA-LANTANÍDEOS

Daniel José Toffoli*, Lilia Coronato Courrol**, Luís Vicente Gomes Tarelho***, Laércio Gomes***, Nilson Dias Vieira Junior***.

*Aluno de Mestrado do IPEN/USP,

**Dra. Pelo CLA/IPEN, Prof.^a Plena da FATEC-SP,

***Drs. Pelo CLA/IPEN, Pesquisadores CLA/IPEN

e-mail: daniel.j.t@uol.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho é analisar as variações induzidas nas propriedades ópticas do composto orgânico hipocrelina após a formação de complexos com íons de elementos lantanídeos, com o intuito de se investigar sua possível utilização em terapia.

Para tanto, foram preparadas soluções de hipocrelina A utilizando-se álcool como solvente. Para a dopagem, foram empregados os íons lantanídeos lantânio (La^{3+}) e európio (Eu^{3+}).

Dessa forma, visava-se identificar a composição que proporcionaria melhores resultados na área de aplicação citada.

Introdução

A hipocrelina, um pigmento originário do fungo *Hypocrella bambusae*, cuja fórmula estrutural encontra-se representada na Figura 1, tem despertado o interesse de pesquisadores há aproximadamente duas décadas, época em que se verificou sua potencialidade para uso em terapia. Afinal, este composto apresenta uma ampla banda de absorção na região do visível do espectro, bem como um excelente rendimento quântico de geração de oxigênio singlete [1], [2], sendo este último fundamental para os casos de tratamento de câncer pela técnica de terapia fotodinâmica (PDT).

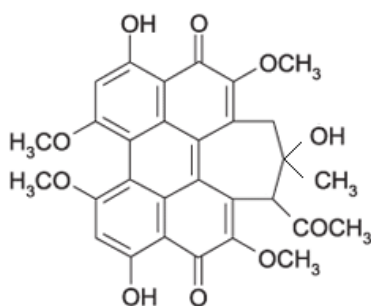


Figura 1: Estrutura molecular da hipocrelina A.

Dessa forma, muitos estudos foram realizados, a fim de melhorar sua solubilidade em água e deslocar seu espectro de absorção para a região da chamada “janela terapêutica”, visto que desta maneira se tornaria mais eficaz sua aplicação nesta técnica. Pesquisas conduziram, então, à formação de complexos com íons de elementos pertencentes ao grupo dos lantanídeos, tendo sido comprovado que a

adição do íon La^{3+} em hipocrelina atende às necessidades expostas [3].

Com base no que foi apresentado, torna-se importante analisar o comportamento de diversos complexos hipocrelina-lantanídeos, tendo-se em vista a identificação das condições mais apropriadas que venham a permitir sua utilização como agentes fotossensibilizadores em terapia.

Terapia

É crescente no mundo todo o surgimento de casos de câncer, doença crônica-degenerativa que desencadeia reprodução desenfreada das células do tecido atingido. Estima-se que, no Brasil, o câncer represente a segunda causa de morte por doença, logo após as doenças do coração [4].

Neste contexto, surge como meio de proporcionar avanços no que tange ao tratamento deste mal a terapia fotodinâmica, PDT (do termo inglês *Photodynamic Therapy*). A PDT consiste de uma técnica baseada em fototerapia, isto é, utiliza-se da radiação como agente terapêutico [2], [5].

No tratamento por PDT, um agente fotossensibilizador, injetado na corrente sanguínea do paciente, tem o papel de tornar a região doente sensível à incidência da radiação. Dessa maneira, após a exposição à luz, as moléculas do fotossensibilizador são excitadas (ou seja, ocorre absorção de energia) e encaminham-se a estados de maior energia, como mostra o Diagrama de Jablonski [5], [6] ilustrado pela Figura 2.

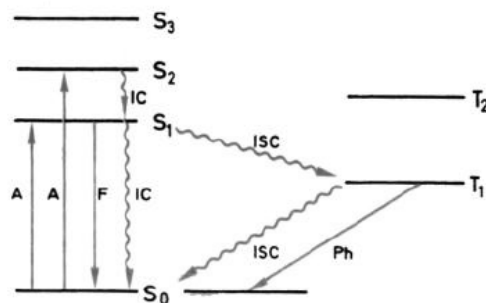


Figura 2: Diagrama de Jablonski, onde: S_0 = estado fundamental, S_1 , S_2 e S_3 = estados excitados singletos, T_1 , T_2 = estados excitados tripletos, A = absorção, F = fluorescência, Ph = fosforescência, IC = conversão interna, ISC = cruzamento intersistemas.

Quando no estado singleto excitado S_1 , a molécula do fotossensibilizador pode sofrer um cruzamento intersistemas (ISC), deslocando-se até o primeiro estado tripleto excitado T_1 . Uma vez neste estado, há a tendência de a molécula liberar energia para o meio, a fim de retornar ao estado fundamental S_0 (mais favorável energeticamente). Esta devolução de energia pode ocorrer de duas formas distintas, como esquematizado na Tabela 1:

Tabela 1: Mecanismos de atuação dos fotossensibilizadores

	Mecanismo Tipo I	Mecanismo Tipo II
Interação	Substrato	Oxigênio Fundamental
Tipo de Reação	Transferência de elétrons ou de Hidrogênio	Transferência de energia
Produtos	Radicais	Oxigênio Singleto

Os produtos formados, radicais intermediários de oxigênio (mecanismo tipo I) e oxigênio singleto (mecanismo tipo II), são substâncias altamente citotóxicas. Logo, pode-se afirmar que, no tratamento por PDT, a incidência da luz sobre o fotossensibilizador induz a morte celular (apoptose).

É importante ressaltar que o fotossensibilizador apresenta aderência apenas no tecido neoplásico, fato este que minimiza a ocorrência de efeitos colaterais. Afinal, a seletividade do agente fotossensibilizador garante que apenas os tecidos atingidos pelo câncer sejam sensibilizados, sendo os únicos, portanto, a sofrerem apoptose.

A apoptose é um processo de morte celular fisiológica programada, que é apropriada em determinados momentos do ciclo de vida de um organismo e propicia renovação aos tecidos. Na PDT, a apoptose pronuncia-se como o principal indutor de morte das células do tecido doente, uma vez que os produtos gerados pelos mecanismos tipo I e II possuem a capacidade de alterar o potencial transmembrana das células, levando-as a emitir uma série de sinais específicos que têm por finalidade dar início ao processo de morte programada [7].

Materiais e Métodos

Para este estudo, foram preparadas quatro soluções, como segue:

Inicialmente, adicionou-se a 1mg de hipocrelina A (HA) 1000 μ l de etanol absoluto, procedendo-se com sua diluição, a fim de se obter a chamada solução I.

A seguir, reservou-se 500 μ l da solução I, aos quais foram acrescentados 1000 μ l de etanol. Esta solução foi dividida em três porções iguais de 500 μ l cada, sendo a primeira delas denominada solução II. A segunda parte recebeu o acréscimo de 1mg de cloreto de európio hexahidratado, ($\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),

constituindo assim a solução III, enquanto que aos restantes 500 μ l adicionou-se 1mg de cloreto de lantânio heptahidratado ($\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), formando a solução IV.

Tendo-se as soluções II, III e IV em mãos, foram medidos os respectivos espectros de absorção óptica, com o auxílio de um espectrofotômetro Olis-Cary 17D.

Também foram realizadas medidas de emissão, utilizando-se a técnica *lock-in*, como ilustra a Figura 3:

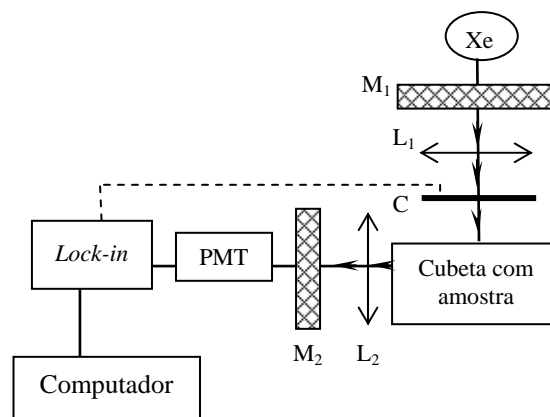


Figura 3: Arranjo experimental.

Segue uma breve explanação sobre seu princípio de operação:

Uma lâmpada de xenônio (Xe), de 300W, é feita incidir primeiramente sobre o monocromador Jarrel Ash (M_1), que tem por função selecionar o comprimento de onda a excitar a amostra. Esta, ao receber a radiação, absorve energia e realiza a conseqüente emissão de luz, que é captada a 90° pelo monocromador analisador Spex 0,5m (M_2), passando pela fotomultiplicadora de cátodo S-20 (PMT), pelo *lock-in* EG&G 7220 e finalmente atingindo o computador, responsável pela análise dos dados obtidos e pela interface homem-máquina. As lentes convergentes L_1 e L_2 possuem a função de focalizar os raios de luz. Já o *chopper* (C) constitui-se de um disco com perfurações a distâncias pré-determinadas que gira com uma frequência estipulada. Dessa forma, dá-se a geração de um sinal de onda quadrada com frequência específica, que é analisado pelo *lock-in* de forma a impedir a passagem de comprimentos de onda com frequências diferentes. Assim, evita-se que qualquer sinal que não seja o proveniente da emissão da amostra seja indevidamente interpretado, colaborando com a minimização de erros.

Resultados

São mostrados na Figura 4 os espectros de absorção óptica das soluções de números II, III e IV, que nos permitirão realizar algumas considerações.

Primeiramente, podemos perceber através destes espectros que a amostra correspondente à solução II, que contém apenas hipocrelina, de coloração avermelhada, apresenta larga banda de

absorção, desde cerca de 350nm até aproximadamente 600nm, com picos de maior intensidade em torno de 460nm, 530nm e 580nm.

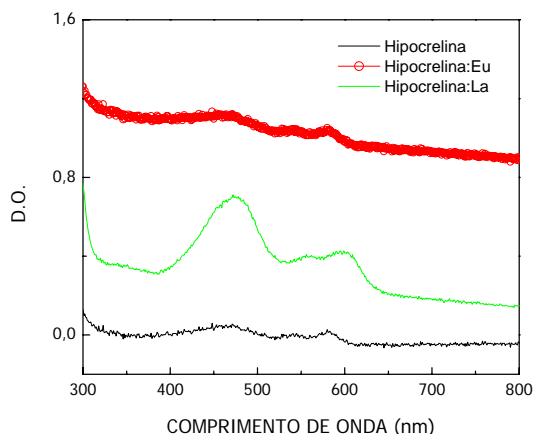


Figura 4: Espectros de absorção óptica das amostras de Hippocrellina, Hippocrellina:Eu e Hippocrellina:La.

A adição de elementos lantanídeos a esta solução de hipocrelina A provocou alterações em sua coloração, além de modificar suas propriedades de absorção, como mostram os espectros obtidos (Figura 4). A amostra formada pela solução III, HA:Eu³⁺, é de tom esverdeado, enquanto que a amostra HA:La³⁺ (solução IV), apresenta coloração vermelho-castanho. Percebe-se que a adição de európio pouco influencia no comportamento óptico da hipocrelina; já o acréscimo de lantânio dá origem a picos de absorção em torno de 480nm, 560nm e 600nm.

Na tentativa de se verificar a aplicabilidade das soluções contendo lantanídeos, foi executado um estudo da emissão destas sob excitação em 400nm (Figura 5) e em 580nm (Figura 6). Assim, seria possível, por meio de comparações entre a solução de hipocrelina e as soluções hipocrelina:lantanídeos, analisar a influência da adição dos íons La³⁺ e Eu³⁺.

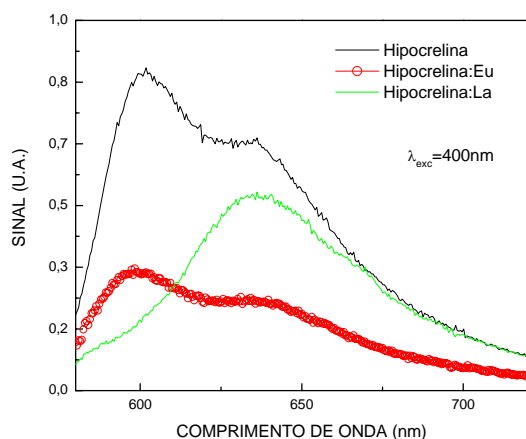


Figura 5: Espectros de emissão óptica das amostras de Hippocrellina, Hippocrellina:Eu e Hippocrellina:La excitadas em 400nm.

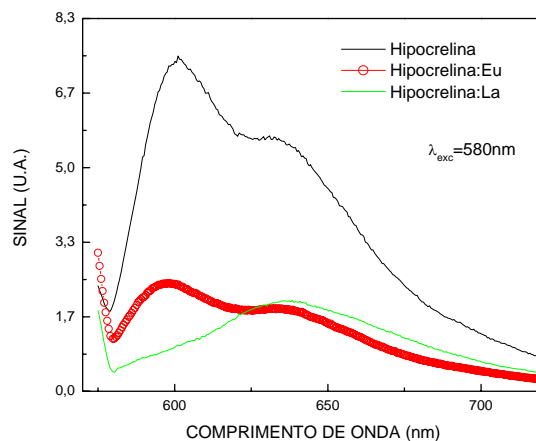


Figura 6: Espectros de emissão óptica das amostras de Hippocrellina, Hippocrellina:Eu e Hippocrellina:La excitadas em 580nm.

Observou-se a partir dos espectros de emissão obtidos (Figuras 5 e 6) que, dentre as três amostras, a maior emissão ocorreu para a solução II, HA. Esta amostra apresenta larga banda de emissão, com máximos em torno de 600nm e 630nm. A solução III, HA:Eu³⁺, sofre um acentuado decréscimo de intensidade de emissão, mas praticamente conserva os picos característicos da hipocrelina. Percebe-se também que o acréscimo de lantânio em hipocrelina gera uma diminuição da intensidade de emissão. Todavia, ao contrário do que ocorre com a amostra III, esta gera uma supressão da banda em torno de 600nm, além de um ligeiro deslocamento da banda de emissão em torno de 630nm para cerca de 640nm.

Acredita-se que as diferenças obtidas nas propriedades ópticas da HA sob a presença de lantânio e európio sejam decorrentes de alterações estruturais, principalmente no que diz respeito à quantidade de ligações que sofrem influência da molécula de água. Também se pode dizer que a diferença entre os raios atômicos destes elementos contribuiu para os diferentes comportamentos observados.

Em trabalhos futuros, pretendemos determinar como ocorre a geração de oxigênio singleto em cada uma das amostras em estudo, comparando os resultados entre si. Como o oxigênio singleto é o principal responsável pela indução da morte celular na PDT, estes resultados permitiriam a verificação efetiva da aplicabilidade das soluções produzidas em terapia.

Conclusão

Este trabalho nos permitiu analisar comparativamente o comportamento de três soluções, HA, HA:La³⁺ e HA:Eu³⁺. Através da análise dos espectros de emissão e de absorção, pôde-se perceber inicialmente que a adição de elementos lantanídeos à hipocrelina é capaz de modificar suas propriedades ópticas de maneira significativa.

Além disso, pode-se afirmar que a formação de complexos com lantânio e európio é responsável por deslocar o espectro de absorção para a região do vermelho do espectro. A formação do complexo HA:La³⁺, em particular, revelou-se capaz de propiciar a geração de picos de absorção em torno de 480nm, 560nm e 600nm.

Quanto aos espectros de emissão, verifica-se que esta mesma solução, HA:La³⁺, é responsável por um deslocamento da banda de emissão em direção aos maiores comprimentos de onda, quando comparada à hipocrelina pura. Também é válido ressaltar que o mesmo não ocorreu para a solução HA:Eu³⁺; os espectros apenas mostram um decréscimo na intensidade de emissão, com conservação dos picos correspondentes à hipocrelina.

É importante ressaltar que os íons La³⁺ e Eu³⁺ apresentaram efeitos distintos quando em solução com a hipocrelina. Este fato não era previsto, uma vez que lantânio e európio, ambos lantanídeos, apresentam distribuição eletrônica semelhante e, conseqüentemente, propriedades muito parecidas. Este comportamento inesperado foi devido provavelmente à diferente interação com moléculas de água presentes no cloreto utilizado.

Bibliografia

- [1] D. Jancura, S. Sánchez-Cortás, P. Miskovský, L. Rivas, J. Stanicová, J.V. García-Ramos. **“Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy of hypocrelin A: an effect of excitation wavelength and pH”**. Spectrochimica Acta Part A 54,1519–1526, 1998.
- [2] S. M. Ali, M. Olivo. **“Efficacy of hypocrelin pharmacokinetics in phototherapy”**. International Journal of Oncology, 21: 1229-1237, 2002.
- [3] J. Zhou, J. Liu, S. Xia, X. Wang, B. Zhang. **“Effect of chelation to lanthanum ions on the photodynamic properties of Hypocrelin A”**. J. Phys. Chem. B, 109, 19529-19535, 2005.
- [4] Instituto Nacional de Câncer – disponível em <<http://www.inca.gov.br>>
- [5] A. R. Silva. **“Análise das propriedades fotossensibilizantes do In(III)-mesotetrafenilporfirina para uso em terapia fotodinâmica”**. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2003.
- [6] Laboratorio de Síntesis Asimétrica – Disponível em <<http://wzar.unizar.es/acad/fac/cie/quiorg/asimetrica/mtm.html>>
- [7] A. C. Vasconcelos. **“Patologia Geral em hipertexto”**. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2000.