

Investigação do comportamento óptico de complexos de lantanídeos: possíveis aplicações biomédicas

Daniel José Toffoli

Mestrando de Tecnologia Nuclear – Ipen/USP.
São Paulo – SP [Brasil]
daniel.j.t@uol.com.br

Lilia Coronato Courrol

Doutora em Tecnologia Nuclear;
Professora Adjunta – Unifesp;
Pesquisadora Colaboradora do Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares – CNEN/Ipen.
Diadema – SP [Brasil]
lcourrol@gmail.com

Laércio Gomes

Doutor em Tecnologia Nuclear;
Pesquisador Titular do Instituto
de Pesquisas Energéticas e Nucleares – CNEN/Ipen.
São Paulo – SP [Brasil]
lgomes@ipen.br

Nilson Dias Vieira Júnior

Doutor em Física – USP;
Pesquisador Titular do Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares.
São Paulo – SP [Brasil]
nilsondv@ipen.br

A hipericina (Hp), um cromóforo natural originário de plantas do gênero *Hypericum*, e a hipocrelina A (HA), cromóforo proveniente do fungo *Hypocrella bambusae*, vêm ganhando destaque por causa de suas atividades fotossensibilizantes. Sabe-se que a HA pode formar com o íon lantânio um complexo que exhibe grande rendimento quântico de geração de oxigênio singleto e janela de absorção deslocada para a região do vermelho, quando comparado à HA. Por esse motivo, a influência da adição dos íons lantânio e európio e de peróxido de hidrogênio nas propriedades da HA e da Hp foi investigada por meio de métodos de espectroscopia óptica. Assim, pôde-se determinar a potencialidade de tais complexos para uso em aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Hipericina. Hipocrelina A. Lantanídeos. Peróxido de hidrogênio.



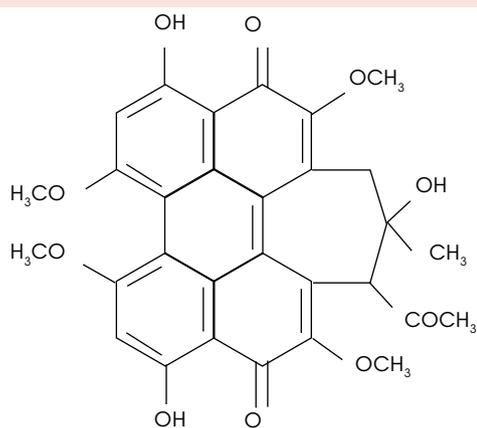
1 Introdução

A hipocrelina A (HA) ou *Hypocrella bambusae*, pigmento originário de um fungo muito comum em todo o continente asiático, principalmente em países como China e Sri Lanka, vem sendo alvo de vários estudos nas últimas duas décadas (Figura 1a). Tal interesse se justifica pelos ótimos resultados encontrados nessa substância no tocante à capacidade de produção de oxigênio singlete e a suas propriedades de absorção de luz na região espectral correspondente à cor vermelha.

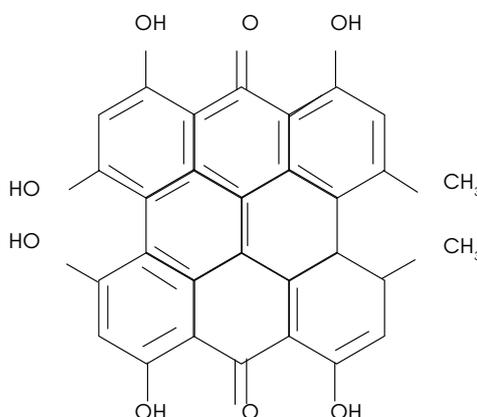
Esses resultados, já discutidos na literatura (MILLER et al., 1997), evidenciam sua potencialidade para utilização em uma técnica terapêutica que se baseia no processo fotoquímico de transferência de energia de um fotossensibilizador, que é responsável por absorver a radiação eletromagnética incidente, para o oxigênio em seu estado fundamental, dando origem a espécies excitadas de oxigênio, entre as quais o singlete. Tal técnica terapêutica, conhecida pela sigla PDT, do termo inglês *Photodynamic Therapy*, ou Terapia Fotodinâmica, destaca-se por sua alta seletividade e eficiência e pode ser empregada, inclusive, para tratamento de câncer, uma vez que os produtos da reação de transferência de energia e as espécies excitadas de oxigênio são extremamente reativos, a ponto de induzir morte celular. Devido a essa nobre aplicação da HA, pesquisadores (ZHOU et al., 2005; LEE et al., 2003; WANG et al., 2005) buscaram um aprimoramento das propriedades desse composto, de forma que a PDT pudesse tornar-se uma realidade em hospitais e clínicas pelo mundo. Para tanto, era necessário melhorar sua solubilidade (uma vez que a solução deveria entrar em contato com o fluido corpóreo) bem como deslocar seu espectro de absorção para regiões de maiores comprimentos de onda, o que maximizaria sua ação seletiva, visto que os tecidos do corpo humano são transparentes

à luz da região espectral de, aproximadamente, 600 a 900 nm – a janela terapêutica (LEE et al., 2006). Entre as opções que permitem atingir tais resultados, a formação de complexos com íons lantânio mostrou-se a mais eficaz (ZHOU et al., 2005; ZHOU et al., 2003).

A hipericina (Hp), outro pigmento proveniente de plantas do gênero *Hypericum* (Figura 1b), em razão de suas excelentes propriedades farmacológicas (em especial no que diz respeito à ação antitumoral induzida por radiação), apresentou evolução semelhante à descrita para a HA (SHEN et al., 2006; DUMAS et al., 2003).



(a)



(b)

Figura 1: Estruturas moleculares de: a) hipocrelina A ($C_{30}H_{26}O_{10}$) e b) hipericina ($C_{30}H_{16}O_8$)

Fonte: Shen e colaboradores, 2006, p. 1414-1417.

Deve-se mencionar também que, em geral, complexos de lantanídeos apresentam-se como excelentes compostos luminescentes, possuindo grande deslocamento de Stokes, longo tempo de vida e bandas de emissão bem definidas e de intensidade elevada (LIN, 2004). Foi verificado (WU et al., 2005) que íons európios, em determinadas soluções, são sensíveis à presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), subproduto de diversas reações enzimáticas, o que evidencia sua potencialidade como agente de diagnóstico *in vitro*.

Por esses motivos, há uma grande motivação para investigar as propriedades ópticas de HA e Hp, dopadas com diferentes íons lantanídeos (La^{3+} e Eu^{3+}) e sob a presença de peróxido de hidrogênio, com o intuito de determinar sua potencialidade de uso em ciências biomédicas como sondas luminescentes e agentes fotossensibilizadores.

2 Parte experimental

2.1 Materiais

A HA, a Hp, o etanol absoluto e os cloretos de lantanídeos empregados ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$ e $LaCl_3 \cdot 7H_2O$) foram adquiridos da Sigma Aldrich e da Molecular Probes, todos com pureza analítica.

A seguir, será apresentado o modo de preparação das soluções estudadas:

- **Soluções de hipericina:**

Inicialmente, diluiu-se 1 mg de hipericina em 1 mL de etanol absoluto. Separou-se metade dessa solução (o correspondente a 500 μ L), adicionando-se, em seguida, 1 mg de cloreto de európio hexahidratado ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$). Por fim, foram separados frascos contendo 100 μ L de solução hipericina:európio, e acrescidos 10 μ L, 20 μ L, 30 μ L, 40 μ L, 50 μ L e 100 μ L de H_2O_2 , o

que forneceu ampla variedade de complexos para um estudo mais abrangente.

- **Soluções de hipocrelina A:**

Inicialmente, adicionou-se a 1 mg de HA 1 mL de etanol absoluto, fazendo-se a diluição. A seguir, reservaram-se 500 μ L dessa solução, aos quais foram acrescentados 1000 μ L de etanol. Essa solução foi dividida em três porções iguais de 500 μ L cada: a primeira não sofreu adição de nenhum dopante, a segunda recebeu o acréscimo de 1 mg de cloreto de európio hexahidratado ($EuCl_3 \cdot 6H_2O$) e, aos outros 500 μ L, adicionou-se 1 mg de cloreto de lantânio heptahidratado ($LaCl_3 \cdot 7H_2O$).

2.2 Métodos

Tendo-se as soluções preparadas em mãos, foram medidos os respectivos espectros de absorção óptica, com o auxílio de um espectrofotômetro Olis Cary, modelo 17-D, da Varian, e de emissão óptica, por meio de montagem, utilizando a técnica de *lock-in*. Nesse caso, as amostras foram excitadas por um conjunto de iluminação composto de lâmpada de xenônio de 300 W e por um monocromador de excitação Jarrell-Ash de 0,25 m. O sinal de emissão foi analisado por um monocromador Spex 0,5 m e uma fotomultiplicadora PMT Hamamatsu acoplada a um amplificador lock-in EG&G-PAR, que opera na frequência de um obturador óptico (chopper – Stanford) posicionado na excitação.

Tanto nas medidas de absorção óptica quanto nas de emissão, as amostras foram acondicionadas em cubetas com caminhos ópticos de iluminação de 1,0 mm.

3 Resultados e discussão

Na Figura 2, são mostrados os espectros de absorção das soluções de hipericina pura (Hp) e de hipericina:európio (Hp:Eu).

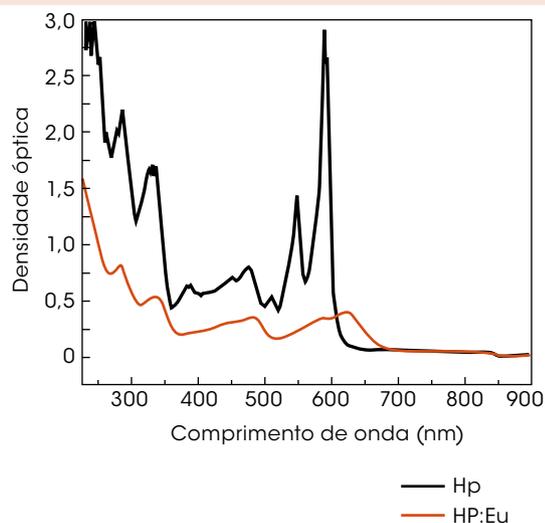


Figura 2: Espectros de absorção óptica das amostras de hipericina (Hp) e hipericina európio (Hp:Eu) em etanol, mostrando a supressão dos picos de absorção da Hp em 545 nm e 589 nm e a formação de um novo máximo em 620 nm, quando há o acréscimo de íons Eu^{3+}

Fonte: Os autores.

É interessante verificar que a Hp, de coloração em tom vermelho intenso, apresenta larga banda de absorção, que pode ser dividida em duas regiões mais significativas: a primeira delas para comprimentos de onda inferiores a 360 nm, com picos em 225 nm, 285 nm e 331 nm, e a outra se estendendo de 450 nm a 600 nm, com máximo de absorção mais significativo em torno de 460 nm, 545 nm e 589 nm.

Numa primeira análise, poder-se-ia pensar que o fato de a Hp possuir variados picos de absorção pudesse ser útil à sua aplicação como agente fotossensibilizador. Essa idéia, contudo, é precipitada, uma vez que são interessantes apenas os picos de absorção na região de 600 nm a, aproximadamente, 800 nm, para que haja profunda penetração da luz nos tecidos, permitindo, assim, adequada excitação do fotossensibilizador. Logo, pode-se dizer que a Hp não se enquadra nas necessidades das aplicações clínicas como fotossensibilizador pela limitação citada, referente à banda de absorção.

Adicionando-se európio à Hp, percebe-se mudança na coloração da solução, que adquire um tom esverdeado, bem como acentuada diminuição na quantidade de luz absorvida, supressão dos picos em 545 nm e 589 nm e um ligeiro deslocamento do máximo de absorção de 589 nm para cerca de 620 nm. Esse deslocamento é interessante, uma vez que, quanto maior o comprimento de onda incidente, menor a absorção por parte dos tecidos biológicos e, conseqüentemente, mais eficaz será o tratamento por meio da terapia fotodinâmica (PDT).

A contribuição de H_2O_2 à absorção do complexo Hp:Eu é apresentada na Figura 3.

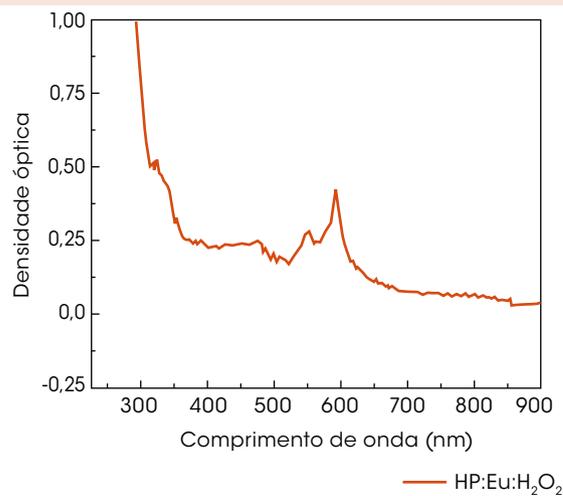


Figura 3: Espectro de absorção óptica da solução hipericina:európio contendo 100 µL de H_2O_2 (Hp:Eu: H_2O_2)

Fonte: Os autores.

Comparando-se a Figura 2 com a 3, percebe-se que, na região do visível (aproximadamente 400 nm a 700 nm), as curvas para as soluções de Hp:Eu: H_2O_2 e de Hp possuem forma semelhante. Verifica-se, portanto, tendência à reconstrução da banda original da Hp, que havia sido suprimida pela adição de európio, quando do acréscimo de H_2O_2 ao complexo Hp:Eu. Isso implica que um meio com maior ou menor concentração de H_2O_2 poderia ser facilmente iden-

tificado, mediante o complexo Hp:Eu. Caso o meio em que este se encontre seja livre de H_2O_2 , o complexo manterá sua coloração habitual verde; se o meio for rico, haverá alterações em sua coloração, que passará a assumir tons mais intensos de vermelho quanto maior for a concentração de H_2O_2 . Essas observações são complementadas na Figura 4, que expõe os espectros de emissão óptica do complexo Hp:Eu: H_2O_2 sob excitação em 460 nm.

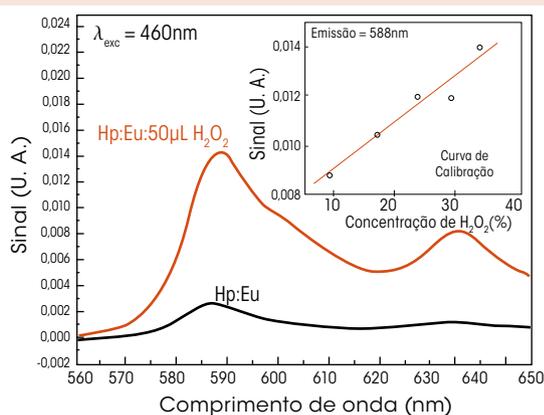


Figura 4: Espectro de emissão comparativo da solução de hipericina:europio (Hp:Eu) e hipericina:europio:peróxido de hidrogênio (Hp:Eu: H_2O_2), obtido sob excitação em 460 nm. A figura interna mostra a curva de calibração para peróxido de hidrogênio em soluções de Hp:Eu, exibindo uma região linear correspondente a concentrações de 9% (10 μ L) a 33% (50 μ L) em volume de peróxido de hidrogênio

Fonte: Os autores.

Por motivos de clareza, na Figura 4, é apresentado apenas o espectro de emissão da solução com 50 μ L de H_2O_2 em comparação com o complexo Hp:Eu. Pode-se dizer que todas as soluções com acréscimo progressivo de H_2O_2 possuem espectros de emissão muito semelhantes, com picos em torno de 588 nm e 635 nm, diferindo apenas pela intensidade de sinal emitido, que se torna tão maior quanto mais alta a concentração de H_2O_2 em Hp:Eu. Desse modo, sugere-se outra forma de detecção e quantificação de peróxido

de hidrogênio, com base na intensidade de emissão do composto Hp:Eu. A curva de calibração, apresentada na Figura 4, relaciona intensidade de luminescência com a porcentagem em volume de H_2O_2 em solução Hp:Eu. É importante notar que o aumento na intensidade de emissão, para a solução com 50 μ L de H_2O_2 , chega a, aproximadamente, 700%. Isso evidencia a alta sensibilidade do método proposto, que é capaz de detectar (pela curva de calibração apresentada) concentrações de 9% até 33% em volume de peróxido de hidrogênio (o correspondente a variações de 10 μ L a 50 μ L de H_2O_2).

Verifica-se, assim, a potencialidade de uso desse complexo como sonda luminescente *in vitro*. Amostras de sangue poderiam ser colocadas na presença do complexo Hp:Eu que, por ser sensível à presença de H_2O_2 , atuaria como um biossensor, indicando quantitativamente a presença desse composto.

São mostrados na Figura 5 os espectros de absorção óptica das soluções de HA, HA:Eu e HA:La. Inicialmente, pode-se perceber por esses espectros que a hipocrelina A apresenta larga banda de absorção, desde cerca de 350 nm até aproximadamente 600 nm, com picos de maior intensidade em torno de 460 nm, 540 nm e 580 nm, o que justifica sua coloração em tom vermelho. Confirma-se, desse modo, que a HA não apresentaria eficiência ideal na PDT, visto que a incidência de luz, em seus picos de absorção, acarretaria absorção também por parte dos tecidos biológicos.

Nesse contexto, a adição de íons lantanídeos em HA provocou modificações em suas propriedades de absorção. Percebe-se que a adição de europio não se revela proveitosa do ponto de vista da absorção na janela terapêutica, uma vez que os picos de absorção de tal solução encontram-se abaixo dessa região. A dopagem com lantânio, por sua vez, deu origem a picos em torno de 475

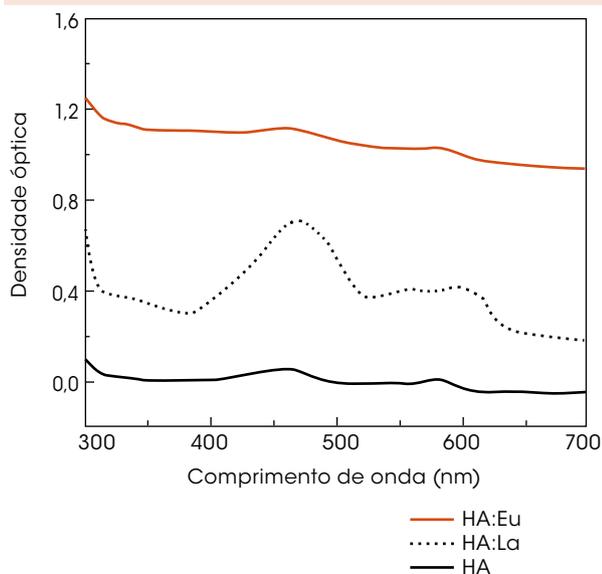


Figura 5: Espectros de absorção óptica das amostras de hipocrelina A (HA), hipocrelina A: európio (HA:Eu) e hipocrelina A:lantânio (HA:La)

Fonte: Os autores.

nm, 560 nm e 600 nm, ou seja, provocou um ligeiro deslocamento do espectro de absorção da HA para a região de maiores comprimentos de onda, o que torna a solução mais eficiente para uso em PDT.

Também foi feito um estudo da emissão dessas soluções sob excitação em 460 nm (Figura 6) e em 580 nm (Figura 7). Observou-se, com base nos espectros de emissão obtidos, que, entre as três amostras, a solução que contém apenas HA foi a que mais emitiu esse material. Essa amostra apresenta larga banda de emissão, com máximos em torno de 600 nm e 630 nm. A solução HA:Eu sofre um acentuado decréscimo de intensidade de emissão, mas praticamente conserva os picos característicos da hipocrelina A. Percebe-se também que o acréscimo de lantânio em hipocrelina A gera uma pequena diminuição da intensidade de emissão; todavia, ao contrário do que ocorre com a amostra com európio, produz uma supressão da banda em torno de 600 nm.

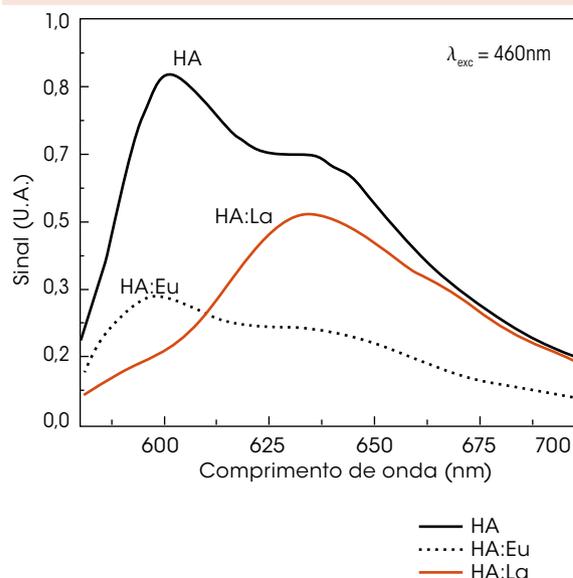


Figura 6: Espectros de emissão óptica das amostras de hipocrelina A (HA), hipocrelina A: európio (HA:Eu) e hipocrelina A:lantânio (HA:La) excitadas em 460 nm

Fonte: Os autores.

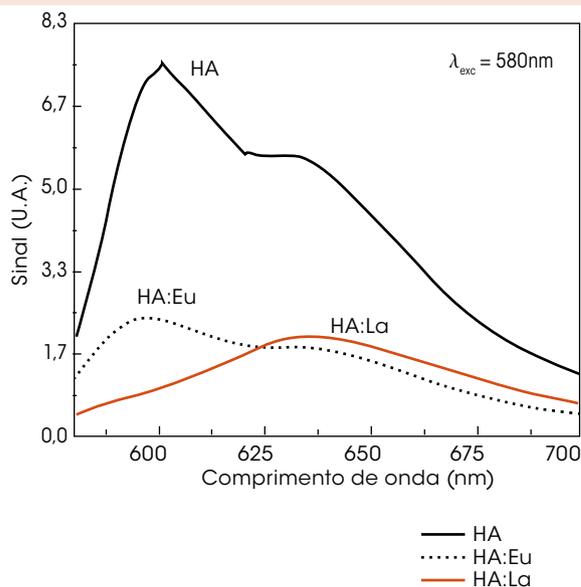


Figura 7: Espectros de emissão óptica das amostras de hipocrelina A (HA), hipocrelina A: európio (HA:Eu) e hipocrelina A:lantânio (HA:La) excitadas em 580 nm

Fonte: Os autores.

Acredita-se que as diferenças obtidas das propriedades ópticas da HA sob a presença de lantânio e európio sejam decorrentes de altera-

ções estruturais, principalmente no que diz respeito à quantidade de ligações perturbadas pelos lantanídeos. Também é possível que a diferença entre os raios atômicos desses elementos e as diferentes distribuições dos níveis de energia em cada solução tenham contribuído para explicar os diferentes comportamentos observados.

4 Considerações finais

Pela análise dos resultados obtidos, foi possível verificar que a presença dos íons lantanídeos em HA e em Hp modificou os níveis de energia dessas moléculas, assim como suas probabilidades de transições radiativas.

Foi mostrado o potencial da solução hipericina: európio como marcador luminescente para métodos de diagnóstico *in vitro*. Tal solução atua de forma rápida, conveniente e altamente específica, visto que concentrações pequenas de peróxido de hidrogênio alteram consideravelmente suas propriedades de absorção e de emissão.

Também foi possível verificar que a formação de complexos com lantânio é responsável por deslocar o espectro de absorção da hipocrellina A para a região de maiores comprimentos de onda, com a geração de picos de absorção em torno de 475 nm, 560 nm e 600 nm. Tal deslocamento, embora pequeno, é significativo do ponto de vista das aplicações clínicas da HA em PDT.

Observou-se, com base nos espectros obtidos, a potencialidade de utilização desses complexos na área biomédica. Em trabalhos futuros, pretendemos realizar medidas de tempo de vida e ensaios *in vitro* com cultura de bactérias, a fim de que se possa determinar a eficiência quântica de geração de oxigênio singlete por parte desses complexos bem como seu potencial citotóxico.

Optical behavior investigation of lanthanide complexes: possible biomedical applications

Hypericin (Hp), a natural chromophore found in plants of genus *Hypericum*; and hypocrellin A (HA), a chromophore from the fungus *Hypocrella bambusae*, have been gaining much notability due to their photosensitizing activities. It is known that HA can form a complex with lanthanum ion, which shows a large quantum yield of singlet oxygen generation and a red-shifted absorption window when it is compared with HA. For this reason, the influence of the addition of lanthanum ion, europium ion and hydrogen peroxide to the properties of the HA and Hp has been investigated by means of optic spectroscopy methods. Thus, it was possible to determine the potentiality of such complexes for use in biomedical applications.

Key words: Hydrogen peroxide. Hypericin. Hypocrellin A. Lanthanides.

Referências

- DUMAS, S.; LEPRÊTE, J.; LEPELLEC, A.; DARMANYAN, A.; JARDON, P. Reactivity of the photo excited forms of hypericin, hypocrellin A, hypocrellin B and methylated hypericin towards molecular oxygen – the role of charge transfer interaction. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, Lausanne, v. 163, p. 297-306, 2003.
- LEE, H.; CHEN, S.; ZHANG, M.; SHEN, T.; Studies on the synthesis of two hydrophilic hypocrellin derivatives with enhanced absorption in the red spectral region and on their photogeneration of O_2 and $O_2(^1\Delta_g)$. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Lausanne, v. 71, n. 1-3, p. 43-50, 2003.
- LEE, H.; ZHOU, Z.; SHEN, C.; ZHANG, M.; SHEN, T. New long-wavelength ethanalamino-substituted hypocrellin: photodynamic activity and toxicity to MGC803 cancer cell. *Dyes Pigment*, v. 68, n. 1, p. 1-10, 2006.
- LIN, Z. *Time-resolved fluorescence-based europium-derived probes for peroxidase bioassays, citrate cycle imaging and chirality sensing*. 2004. Doutorado – Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Regensburg, Alemanha, 2004.



MILLER, G.; BROWN, K.; BALLANGRUD, M.; BARAJAS, O.; XIAO, Z.; TULIP, J.; LOWN, J.; LEITHOFF, J.; ALLALUNIS, M.; METHTA, R.; MOORE, R. Preclinical assessment of hypocrellin B and hypocrellin B derivatives as sensitizers for photodynamic therapy of cancer: progress update. *Photochemistry and Photobiology*, Washington, v. 65, n. 4, p. 714-722, 1997.

SHEN, L.; JI, H.; ZHANG, H. Anion of hypericin is crucial to understanding the photosensitive features of the pigment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Oxford, v. 16, n. 5, p. 1414-1417, 2006.

WANG, L.; WANG, X.; ZHANG, H. A theoretical study on photobleaching mechanisms of hypocrellins. *Dyes Pigment*, v. 67, n. 3, p. 161-166, 2005.

WU, M.; LIN, Z.; SCHÄFERLING, M.; DÜRKOP, A.; WOLFBEIS, O. Fluorescence imaging of the activity of glucose oxidase using a hydrogen-peroxide-sensitive europium probe. *Analytical Biochemistry*, New York, v. 340, n. 1, p. 66-73, 2005.

ZHOU, J.; LIU, J.; XIA, S.; WANG, X.; ZHANG, B. Effect of chelation to lanthanum ions on the photodynamic properties of hypocrellin A. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, Lausanne, v. 109, n. 41, p. 19529-19535, 2005.

_____.; XIA, S.; CHEN, J.; WANG, X.; ZHANG, B. The photodynamic property improvement of hypocrellin A by chelation with lanthanum ions. *Chemical Communication*, Cambridge, v. 21, n. 12, p. 1372-1373, 2003.

Recebido em 18 dez. 2006 / aprovado em 6 mar. 2007

Para referenciar este texto

TOFFOLI, D. J. et. al. Investigação do comportamento óptico de complexos de lantanídeos: possíveis aplicações biomédicas. *Exacta*, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 119-126, jan./jun. 2007.