

ESTUDO DO COMPLEXO HIPERICINA-EURÓPIO PARA USO EM DIAGNÓSTICO CLÍNICO

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

*Aluno de Mestrado pelo 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

Este trabalho visa, de maneira simples, investigar as propriedades ópticas do complexo hipericina:lantanídeos.

Através da análise dos espectros de absorção e emissão obtidos experimentalmente, verificaram-se: a) os efeitos da inserção de íons lantanídeos em soluções hipericina e b) sua potencialidade para uso em diagnóstico clínico.

Notou-se que a adição de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ao complexo hipericina:európio é capaz de introduzir variações que permitem seu uso como biossensor, como será mostrado a seguir.

Introdução

Hipericina, cuja estrutura molecular encontra-se representada na Figura 1, apresenta-se como potencial candidato a figurar como droga da nova geração enquanto agente fotossensibilizador e marcador luminescente [1-4].

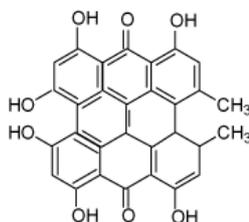


Figura 1: Estrutura molecular da hipericina.

A hipericina, um pigmento natural do tipo antroperilene quinina, originário de certas espécies de insetos e também de plantas do gênero *Hypericum*, despertou o interesse de pesquisadores do mundo todo ao serem reveladas suas excelentes propriedades farmacológicas. Entre elas, podemos citar sua ação como agente antidepressivo e como potente antiviral; destaca-se, contudo, sua atividade antitumoral induzida por radiação, que impulsionou intensas pesquisas nos últimos anos [1-4].

Tendo-se em vista a superação de alguns inconvenientes que esta substância apresenta, como por exemplo baixa solubilidade em água, o que impediria sua aplicação de maneira intravenosa, buscou-se a alteração da sua estrutura através de formação de complexos com íons metálicos, como íons lantanídeos.

Uma aplicação relativamente recente explorada para complexos de lantanídeos refere-se ao uso como marcadores luminescentes. Isso se deve ao fato de que, geralmente, íons lantanídeos trivalentes, como o európio (Eu³⁺), apresentam excelentes propriedades ópticas e espectroscópicas, ou seja, grande “Stokes shift”, tempo de decaimento longo e bandas de emissão estreitas e intensas [5], [6].

Materiais e Métodos

Para possibilitar a análise espectroscópica desejada, foram preparadas algumas soluções de hipericina:lantanídeos, como consta:

Primeiramente, diluiu-se 1mg de hipericina em 1ml de etanol absoluto, caracterizando a solução denominada solução I. Separou-se metade da solução I (o correspondente a 500μl), adicionando-se em seguida 1mg de cloreto de európio hexahidratado (EuCl₃.6H₂O), para preparar a solução II. Por fim, foram separados frascos contendo 100μl da solução II hipericina:európio, aos quais foram acrescentados 10μl, 20μl, 30μl, 40μl, 50μl, 80μl e 100μl de H₂O₂ (sendo esta última solução com concentração de 100μl de H₂O₂ denominada de solução III), o que nos ofereceu ampla variedade de complexos para um estudo mais abrangente.

Também foi preparada uma solução de hipericina contendo cloreto de lantânio heptahidratado (LaCl₃.7H₂O) – solução IV -, à semelhança da solução II.

Foram realizadas medidas de absorção, utilizando-se o espectrofotômetro Olis-Cary 17D, bem como de emissão óptica, das soluções preparadas. Para obtenção dos espectros de emissão, as amostras, acondicionadas em cubeta de 1mm de espessura, foram excitadas com uma lâmpada de Xenônio de 300W e um monocromador (Jarrel Ash) de 0,25m em 400 ou 580nm. As emissões das amostras foram analisadas com um monocromador de 0,5m (Spex) e um detector PMT. O sinal foi amplificado por um *lock-in* EG&G 7220 e processado por um computador. Os erros relativos nas medidas de emissão estão estimados inferiores a 10%.

Resultados

Na Figura 2 são mostrados os espectros de absorção das soluções I, II e III (100μl de H₂O₂),

que correspondem a hipericina pura, hipericina:európio e hipericina:európio:peróxido de hidrogênio.

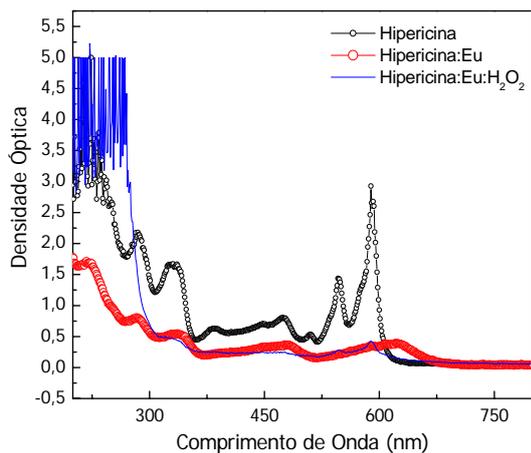


Figura 2: Espectros de absorção óptica das amostras de Hipericina, Hipericina:Eu e Hipericina:Eu:H₂O₂.

Pode-se perceber, inicialmente, que a hipericina pura apresenta grande absorção em torno de 600nm, possuindo coloração de tom vermelho intenso. Com a adição de európio à hipericina, ocorre a supressão do referido pico de absorção. Como este pico estava localizado na região do vermelho do espectro, justifica-se a coloração esverdeada adquirida pela solução hipericina: európio. Além disso, percebe-se o ligeiro deslocamento de tal pico de absorção para a região de maiores comprimentos de onda.

Por fim, com o acréscimo de peróxido de hidrogênio à solução hipericina:európio, nota-se a tendência à reconstrução da banda de absorção em torno de 600nm; devido a este fato, a amostra passa a adquirir novamente uma coloração de tom avermelhado, agora menos intenso em relação à hipericina pura.

Na Figura 3, mostramos o espectro de emissão obtido para a solução hipericina:európio e para as demais soluções com acréscimo progressivo de peróxido de hidrogênio.

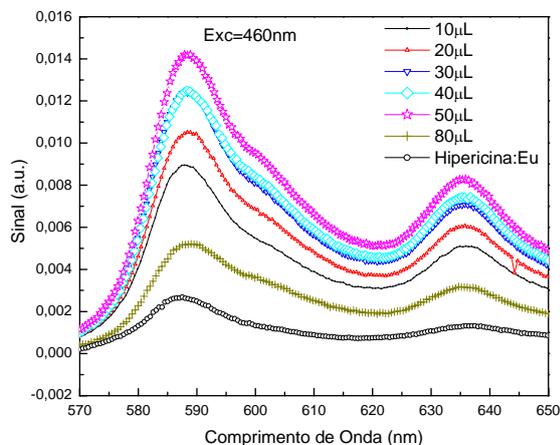


Figura 3: Espectros de emissão óptica das amostras de Hipericina:Eu com diferentes concentrações de H₂O₂, excitadas a 460nm.

Nota-se que, conforme se dá o aumento da concentração de H₂O₂, há um proporcional aumento da intensidade do sinal obtido, ou seja, da intensidade de emissão das amostras. Isso não é verdade apenas para o caso da emissão da solução contendo 80µl de H₂O₂. Supõe-se que em algum ponto antes da referida concentração houve saturação de peróxido de hidrogênio, que acabou por reduzir novamente a intensidade do sinal emitido.

A questão abordada fica mais evidente pela análise da Figura 4, que mostra a intensidade do sinal emitido em razão da concentração de H₂O₂ em solução.

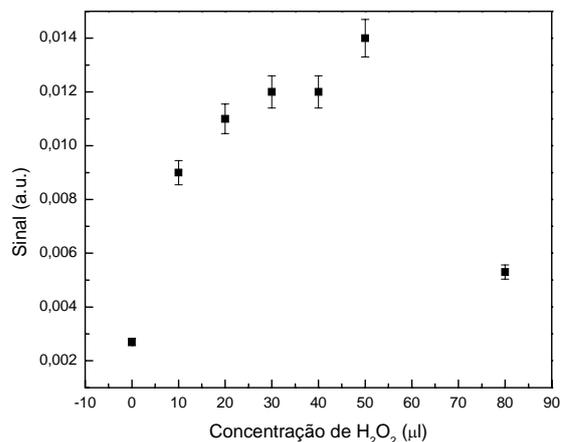


Figura 4: Relação entre sinal emitido e concentração de H₂O₂, com margem de erro de $\pm 5\%$.

Pode-se verificar também que, conforme se dá o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio em solução, a coloração passa a adquirir tons mais intensos de vermelho. Em outras palavras, a solução, antes esverdeada devido à presença de apenas íons európio, torna-se gradativamente avermelhada, coloração original da hipericina.

Desse modo, ocorre a restauração da banda de emissão do composto hipericina. Vale ressaltar que a adição de íons európio na hipericina, que visava proporcionar uma maior solubilidade em água, bem como deslocar o espectro de absorção para a região da “janela terapêutica” (região de aproximadamente 600nm a 900nm), provocou também uma diminuição da intensidade de emissão. Percebe-se, portanto, que a adição de H₂O₂ na solução hipericina:európio é capaz de restaurar a intensidade de absorção original da hipericina.

Por fim, analisa-se a influência da natureza do íon lantanídeo empregado para a elaboração da solução, através de comparações diretas entre a intensidade de sinal obtida para a solução hipericina:európio e hipericina:lantânio (soluções II e IV). Os respectivos espectros encontram-se ilustrados pela Figura 5.

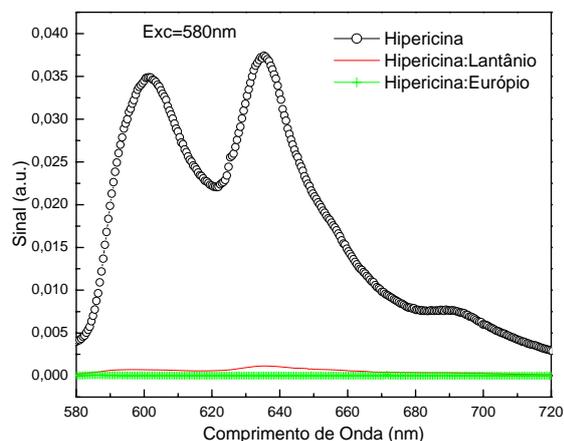
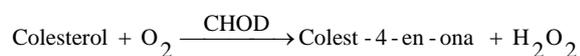


Figura 5: Espectros de emissão óptica das amostras de Hipericina, Hipericina:Eu e Hipericina:La excitadas em 580nm.

Da análise dos espectros da referida figura, verifica-se que a hipericina pura possui intensidade de emissão bem superior quando comparada às soluções com íons európio e lantânio. É importante perceber, entretanto, que a associação de peróxido de hidrogênio pode restituir a emissão em torno de 640nm quase integralmente.

Sob um ponto de vista mais específico, complexos hipericina:lanthanídeos poderiam ser empregados para coleta de informações acerca de moléculas como colesterol e glicose, que, através de reações de oxidação desencadeadas pelas enzimas colesterol oxidase (CHOD) e glicose oxidase (GOD), respectivamente, liberam peróxido de hidrogênio (H_2O_2):



Na literatura, não existe relato da interação formada entre hipericina e íons de európio ou da influência da adição de diferentes concentrações de H_2O_2 , com o intuito de se analisar sua potencial utilização como biossensor.

Este ramo apresenta notável importância pelo fato de que, atualmente, há uma contínua busca por métodos rápidos e altamente específicos de detecção e quantificação de substâncias químicas, bioquímicas e biológicas, para uso em variados setores. Destaca-se a área de análises clínicas, visto que estes métodos de detecção possibilitariam a investigação do comportamento de enzimas, materiais bioativos (como hormônios, por exemplo) e microorganismos patogênicos, principalmente aqueles relacionados a casos de doenças [4], [6].

O uso de marcadores luminescentes em diagnósticos clínicos constitui-se de um método bastante eficaz e seguro, uma vez que permite detecção rápida e extremamente sensível dos compostos em estudo.

Conclusão

Através da análise dos dados obtidos, podemos afirmar que a solução de hipericina:európio apresentou-se como um potencial complexo para utilização em análises clínicas enquanto marcador luminescente em meio de peróxido de hidrogênio.

Como indicado, materiais biológicos como colesterol e glicose sofrem reações de oxidação no organismo humano, quando em presença de determinadas enzimas, o que acarreta a eliminação de peróxido de hidrogênio. A amostra estudada, hipericina:európio: H_2O_2 , aumenta consideravelmente a banda de emissão da solução hipericina:európio; além disso, modifica sua tonalidade, passando de verde para vermelho intenso de acordo com a maior ou menor presença de H_2O_2 . Logo, esta amostra poderia ser empregada como biossensor, uma vez que reagiria à presença de colesterol e glicose aumentando sua emissão e mudando sua tonalidade.

Estes resultados sugerem, portanto, a aplicação deste complexo em, por exemplo, fitas de diagnóstico, que mudariam de cor de acordo com a presença de peróxido de hidrogênio em sangue. Isso consistiria em um método de determinação de colesterol e glicose em tempo real e com baixo custo, o que proporcionaria conforto a pacientes que se submetem aos atuais métodos de diagnóstico agressivos.

Bibliografia

- [1] K. N. Raymond, S. Petoud, S. M. Cohen, J. Xu. **“Phthalamide-lanthanide complexes for use as luminescent markers”**. University of California, California, US Patènt 6864103, 2001.
- [2] L. Shen, H. Ji e H. Zhang. **“Anion of hypericin is crucial to understanding the photosensitive features of the pigment”**. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 16, p. 1414-1417, 2005.
- [3] S. Dumas, J. Leprête, A. Lepellec, A. Darmany, P. Jardon. **“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, 163, 297-306, 2003.
- [4] M. Halder, P. Chowdhury, M. Gordon, J. Petrich. **“Hypericin and its perylene quinone analogs: probing structure, dynamics, and interactions with the environment”**. Advances in Photochemistry, 28, 2005.
- [5] J. Zhou, J. Liu, S. Xia, X. Wang, B. Zhang. **“Effect of chelation to lanthanum ions on the photodynamic properties of Hypocrellin A”**. J. Phys. Chem. B, 109, 19529-19535, 2005.
- [6] T. S. Martins, P. C. Isolani. **“Terras raras: aplicações industriais e biológicas”**. Química Nova, 28, 111-117, 2005.