

2 Base científica

2.1 Terapia fotodinâmica

Entre os vários tipos de fotoquimioterapia o método de Terapia fotodinâmica (Photodynamic Therapy, PDT) é o mais desenvolvido e já aplicado na clínica em vários países.

O efeito fotodinâmico, no qual se baseia a PDT, ocorre pela seqüência de processos fotofísicos e fotoquímicos. A molécula do fotosensibilizador absorve um fóton e sai do seu estado fundamental (S_0) para o estado excitado singleto (S_1). Neste momento pode ocorrer a perda de energia por processos de fluorescência ou conversão interna (CI) do estado S_1 para S_0 e/ou ocorrer o processo de cruzamento intersistema (CIS) levando a molécula para o estado excitado tripleto (T_1). A razão das constantes de velocidades destes processos determina o rendimento quântico do estado tripleto ϕ_T .

$$\phi_T = k_{cis1} / (k_{fl} + k_{ci} + k_{cis1})$$

Onde k_{cis1} , k_{fl} , e k_{ci} são constantes de velocidade (taxas) dos processos de CIS do estado S_1 para estado T_1 , de fluorescência e de CI, respectivamente.

A energia do estado T_1 pode ser dissipada pelo processo de CIS devolvendo a molécula para o estado S_0 ou ser transferida para outras moléculas no meio. Estes processos determinam o tempo de vida τ_T deste estado.

$$\tau_T = 1 / (k_{cis2} + \sum k_{qi} [Q]_i)$$

Onde k_{cis2} é a constante de velocidade do processo de CIS do estado T_1 para o estado S_0 e k_{qi} é a constante de supressão do estado tripleto para vários supressores e $[Q]_i$ são as concentrações destes supressores.

Quando a molécula do fotosensibilizador no seu estado excitado tripleto encontra com uma molécula de oxigênio, que tem seu estado fundamental também tripleto, ela transfere sua energia para esta molécula formando o estado excitado singlete do oxigênio ($^1\Delta_g$) [5,6,11,20,21]. Este estado do oxigênio é quimicamente muito ativo e pode induzir várias reações em cadeia com componentes da célula tais como DNA, proteínas, fosfolipídios da membrana celular, etc., tendo como resultado a morte da célula [5,6,11]. Este caminho se chama “**reações tipo II**”.

Por outro lado, a molécula de oxigênio no estado $^1\Delta_g$ pode perder a energia por processos de emissão de fóton ou de ISC e voltar para seu estado fundamental sem começar as reações. Todos estes processos determinam o tempo de vida $\tau(^1\Delta_g)$ do estado $^1\Delta_g$:

$$\tau(^1\Delta_g) = 1 / (k_{em} + k_{cis3} + \sum k_{ri} [R]_i)$$

onde k_{cis3} é a constante de ISC para o estado $^1\Delta_g$, k_{em} e k_{ri} são as constantes de velocidade dos processos de emissão de fótons e de reação química entre o oxigênio singlete e as moléculas no seu ambiente (reagentes) e $[R]_i$ que são as concentrações destes reagentes.

Então, a eficiência do processo fotodinâmico aumenta quando o rendimento quântico e o tempo de vida do estado tripleto do fotosensibilizador aumentam, bem como quanto maior for o tempo de vida do estado $^1\Delta_g$ do oxigênio. Para aumentar a eficiência do processo também pode ser aumentada a concentração do oxigênio molecular dentro de organismo, colocando o paciente numa barocâmara de alta pressão (até 4 atm) com alto conteúdo de oxigênio. Outra possibilidade é aumentar a velocidade de reação do oxigênio singlete com biomoléculas e membranas. Isto acontece quando o oxigênio singlete é gerado perto destes sistemas, o que significa aumentar a probabilidade de encontro entre estes sistemas e o oxigênio singlete. Um caso especial é quando o sensibilizador que fornece sua energia para oxigênio já está ligado com o sistema. Portanto, mais um caminho para aumentar a eficiência

do processo fotodinâmico é aumentar a afinidade do sensibilizador com as estruturas que devem ser destruídas.

Outro caminho que se chama “**reações tipo I**” inclui as reações de transferência de elétron entre a molécula do sensibilizador nos seus estados excitados S_1 ou T_1 , e as moléculas do ambiente. A participação deste processo para os sensibilizadores atualmente usados em PDT não ultrapassa 10% dos efeitos totais [22]. Para os corantes cianicos (CC), as “**reações tipo I**” podem ter uma participação maior no processo fotodinâmico, pois estes corantes podem oxidar a molécula de DNA fazendo com que ocorra a morte celular [16,17].

2.2 Corantes cianicos (CC)

Os corantes cianicos, ou polimetíneos, são compostos orgânicos que possuem estrutura linear do seu cromóforo com conjugação- π , e estão ligados nas suas extremidades com átomos de nitrogênio (Fig. 1).

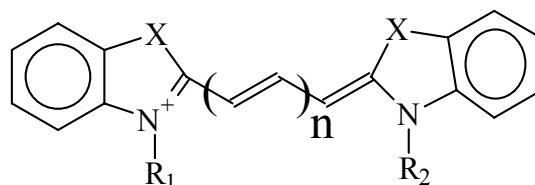


Figura - 1: Estrutura geral dos corantes cianicos

Este tipo de estrutura possibilita que os elétrons se movam dentro da cadeia com certa liberdade. As características espectrais dos CC podem ser calculadas com boa aproximação dentro do modelo do elétron livre numa caixa de potencial [23]. Em concordância com este modelo, a energia de transição entre dois níveis de energia da molécula de CC que determina a posição de máximo da banda de absorção é definida pela equação:

$$\Delta E = \frac{h^2(N+1)}{8mL^2}$$

e o comprimento de onda de transição é:

$$\lambda = \frac{8mcL^2}{h(N+1)}$$

onde, ΔE é a diferença de energia entre o estado fundamental e o 1º estado excitado, m a massa do elétron, N o número de elétrons dos orbitais π da molécula, h a constante de Planck, c a velocidade da luz e L o comprimento da caixa de potencial.

Aumentando o comprimento da cadeia (L) de conjugação- π é possível deslocar facilmente a posição do máximo do espectro de absorção ótica do corante para comprimentos de onda maiores. Os coeficientes de absorção molar característicos para os CC são muito altos

($\epsilon \approx 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [10]. Estas propriedades possibilitam sintetizar CC que absorvem luz com alta efetividade na região de comprimentos de onda maiores que 600 nm.

Outra característica favorável dos CC para usos como marcadores biológicos e fotosensibilizadores, é sua alta afinidade com microestruturas biológicas, tais como DNA, proteínas, e membranas biológicas [10,12]. Esta afinidade é devida tanto à presença de cargas positivas na sua estrutura, como também pela flexibilidade da cadeia de conjugação- π e a presença de heterociclos que podem intercalar dentro das microestruturas. Além disso, estes corantes são solúveis em água e são foto e quimicamente estáveis. Os CC são aplicados em diversas áreas da ciência e tecnologia, entre as principais aplicações estão: como marcadores de estruturas biológicas, em fotoquimioterapia, técnica de laser, filmes fotográficos, entre outras.

2.3 Corantes cianicos com dois cromóforos (BCD)

Os corantes cianicos com dois cromóforos (BCD) são formados por duas cadeias de conjugação π separadas por um heterociclo central, e por heterociclos nas extremidades das cadeias (Fig. 2). O heterociclo central determina o ângulo entre os cromóforos a largura e a altura da barreira de potencial que separa as cadeias polimetíneas, variando estes fatores ocorrem mudanças nas energias e intensidades das transições eletrônicas. Os heterociclos laterais possuem um átomo de nitrogênio que confere a estes corantes uma carga efetiva positiva que pode variar com o pH da solução.

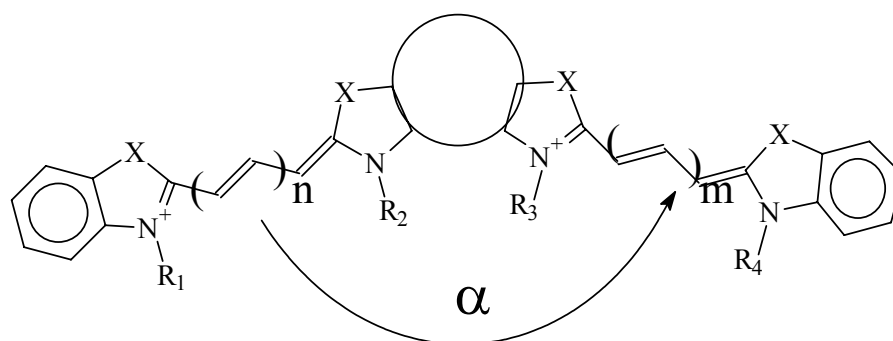


Figura - 2: Estrutura geral dos BCD

Os BCD possuem absorção muito intensa ($\epsilon \sim 10^5$) na região entre 580 - 650 nm, onde os tecidos biológicos são transparentes, e têm o rendimento quântico do estado tripleto (ϕ_T) relativamente alto ($> 20\%$) já em soluções homogêneas [15].

As energias das bandas de transição eletrônica para os BCD podem ser calculadas usando o modelo do elétron livre numa caixa de potencial com barreira [13]. Os heterociclos laterais representam as paredes de potencial da caixa, sendo os átomos de nitrogênio os limites da caixa. O heterociclo central representa a barreira de potencial no centro da caixa (Fig. 3).

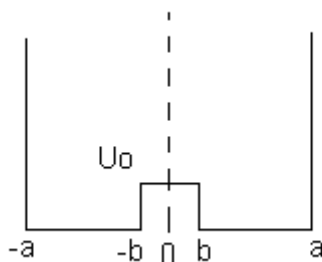


Figura – 3: Esquema do poço de potencial com barreira representando uma molécula de BCD

Neste modelo os elétrons dos orbitais π podem se mover entre as distâncias **a** e **b**, e quando a energia dos elétrons π é menor que U_0 pode ocorrer também o efeito quântico de tunelamento dos elétrons pela barreira central. As interações que ocorrem nos cromóforos, e entre eles, que dão origem às transições eletrônicas dos BCD são: o efeito de tunelamento e a interação dipolo-dipolo, respectivamente. Estas interações dependem do ângulo entre os cromóforos, do comprimento e altura do heterociclo central, e do comprimento das cadeias polimetíneas. Os cálculos mostram que para um corante cianico com um cromóforo é esperado apenas uma transição eletrônica S_0 - S_1 , mas para os BCD ocorre o desdobramento (*splitting*) deste nível, dando origem a duas transições eletrônicas. Este desdobramento ocorre pela soma dos efeitos de tunelamento e de interação dipolo-dipolo (Fig. 4):

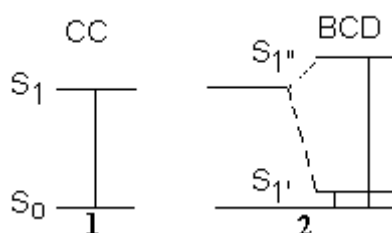


Figura – 4: Ilustração dos níveis de energia de transições eletrônica para os CC (1), e para os BCD (2)

onde **1** representa uma transição para os corantes cianicos com um cromóforo, e **2** o *splitting* do nível S_1 e aparecimento de dois níveis S_1' e S_1'' para os BCD.

Este modelo explica as bandas de absorção para os BCD e consegue prever os valores numéricos para a diferença dos dois níveis de energia dos BCD, *short wave (sh)* e *long wave (l)*.

As intensidades das bandas de absorção destes corantes são determinadas por fatores geométricos referentes à posição relativa entre os cromóforos. Quando os cromóforos estão posicionados num ângulo de 0° entre seus planos, a intensidade é maior para comprimentos de onda menores. Isto acontece porque a onda eletromagnética incidente induz dipolos com o mesmo sentido nos dois cromóforos, aumentando a repulsão eletrostática entre eles e fazendo a transição com a energia maior mais provável (Fig. 5a).

Quando o ângulo entre as direções dos cromóforos é igual a 180° ocorre o contrário, os dipolos são induzidos de maneira que o pólo positivo de um fique ao lado do pólo negativo do outro cromóforo, aumentando a probabilidade de transição eletrônica da banda de menor energia (Fig. 5b). Já para o ângulo entre os planos dos cromóforos de 90° ocorre uma simetria na interação entre os dipolos induzidos nos cromóforos, resultando em intensidades iguais para as duas bandas.

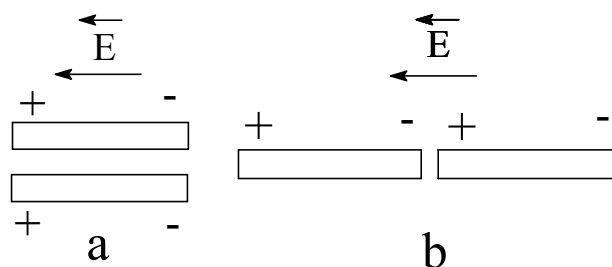


Figura - 5: Posição relativa dos dipolos induzidos pela luz: a) dipolos com 0° e b) dipolos com 180° entre os cromóforos

2.4 Ácido desoxiribonucléico (DNA)

O DNA é uma molécula que contém a informação necessária para o desenvolvimento de um organismo. Esta informação determina a síntese dos constituintes celulares e assegura seu funcionamento. O modelo atual da molécula de DNA foi proposto por Watson e Crick em 1953, e causou um grande avanço na área de biologia molecular. Devido à sua importância, o DNA é um dos principais alvos para matar as células.

As moléculas de DNA são formadas por constituintes menores que se ligam entre si. Estes constituintes são compostos por: uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato. O que diferencia cada constituinte são as bases nitrogenadas, que são: guanina (G), citosina (C), adenina (A) e timina (T). Os constituintes formam uma fita de DNA através de ligações fosfodiésteres entre os fosfatos, e a dupla fita pela ligação entre as bases nitrogenadas através de pontes de hidrogênio. As bases nitrogenadas são hidrofóbicas e pouco solúveis em água próximo do pH = 7. Uma das interações entre as bases é a hidrofóbica, onde estas se posicionam com os planos dos seus anéis em paralelo formando um empilhamento que envolve uma combinação de interações de van der Waals e dipolo-dipolo entre as bases [24,25].

O DNA possui carga efetiva negativa pela presença dos fosfatos, por isto moléculas com carga positiva se ligam na superfície do DNA. A superfície do DNA é composta por duas regiões distintas que se diferenciam pela geometria denominadas “*minor groove*” e “*major groove*”, sendo que uma forma uma cavidade menor e outra maior respectivamente (Fig. 6) [24,25].

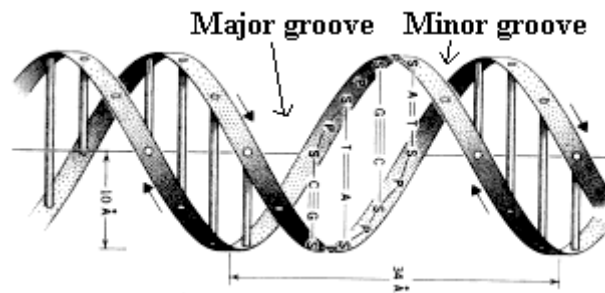


Figura - 6: Estrutura da molécula de DNA mostrando as regiões superficiais da molécula e as ligações fosfodiéster entre os fosfatos e pontes de hidrogênio entre as bases

Quando compostos fotoativos se ligam na molécula de DNA, após serem iluminados podem produzir espécies radiculares ou espécies ativadas de oxigênio que irão interagir com as bases podendo destruir o DNA; também estes compostos podem transferir sua energia diretamente para a molécula de DNA. Um dos produtos mais estudados que são gerados no DNA por compostos fotoativos é o 8-oxo-7,8dihidro-2'-deoxiguaninose, sendo também, a guanina, o local mais observado de lesão por oxidação [26,27].

2.5 Interação de alguns compostos fotoativos com DNA

A interação dos compostos com DNA depende de características como a hidrofobicidade, carga e a estrutura espacial (tamanho, em particular). Os compostos hidrofóbicos ou anfífilicos, de tamanho adequado, podem se intercalar entre as bases nitrogenadas no DNA, ou, se possuem carga positiva, podem se ligar através da interação eletrostática na superfície da molécula de DNA, onde os grupos fosfatos conferem carga negativa para esta região. Os compostos podem se ligar em três regiões diferentes do DNA, duas regiões na superfície (*major groove e minor groove*) ou se intercalar entre as bases. Estudos mostram que a eletronegatividade das regiões na superfície do DNA em água é da seguinte ordem: GC (*major*) \geq AT (*minor*) \gg GC (*minor*) \geq AT (*major*) [28]. Por isso as ligações dos compostos carregados positivamente ocorrem preferencialmente nos sítios da GC no DNA do que nos da AT, porém este comportamento muda para alguns compostos com o aumento da concentração de sal [29].

Os corantes cianínicos interagem efetivamente com o DNA [12,16,17] e por este motivo são usados como marcadores para estudo desta molécula. Os CC podem tanto se intercalar entre as bases do DNA quanto se ligar na sua superfície. Os estudos do DNA com o uso dos CC acontecem através da fluorescência destes corantes que, quando ligados ao DNA, aumentam sua intensidade. Este aumento pode ser explicado pela restrição na rotação em torno das ligações metíneas entre os heterociclos nos CC quando ligados ao DNA [16,17].

2.6 Processos de formação e tipos de agregados

Um processo típico para compostos com sistema de conjugação π (os CC em particular) é a formação de agregados. A formação de agregados afeta as características espectrais e energéticas dos compostos, mudando seus espectros de absorção e fluorescência e diminuindo os tempos de vida e rendimentos quânticos dos estados excitados, diminuindo assim a eficácia do processo fotodinâmico [5,6,11].

Os agregados são constituídos pela junção de moléculas do mesmo composto, estas podem se unir devido às interações hidrofóbica, eletrostática, van der Waals, pontes de hidrogênio e complexos tipo π [25,31]. Estas interações podem variar dependendo das condições externas como a força iônica ou interação com polímeros, DNA em particular [30-32].

Quando é adicionado um sal em uma solução, o número de cargas livres dentro da solução aumenta. Com este aumento, as interações eletrostáticas crescem na solução podendo produzir vários efeitos nos compostos. A quantidade de partículas eletricamente carregadas numa solução define uma quantidade denominada força iônica. A força iônica pode ser matematicamente escrita como:

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2$$

onde c é a concentração dos íons na solução e z o número de cargas, sendo a somatória sobre todas as cargas da solução. A definição da força iônica é válida para uma solução iônica em equilíbrio.

Um dos modelos que fala sobre a ação dos íons numa solução é o de Debye e Huckel [36]. Este modelo considera uma solução iônica como pontos de carga que exercem atração eletrostática umas sobre as outras, sendo o solvente homogêneo e não estruturado. Um íon em particular tende a atrair outros íons, formando uma atmosfera carregada ao seu redor.

Quando algum composto carregado (CC, por exemplo) aparece num meio com alta força iônica, os íons com carga oposta formam uma nuvem ao redor das moléculas, diminuindo assim a repulsão eletrostática entre elas e facilitando sua agregação através de outros tipos de interações atrativas.

Quando dois monômeros se unem de modo a interagirem eletronicamente entre si, cada monômero é perturbado pelo campo elétrico do outro. Os monômeros formam dipolos elétricos que vão interagir quando estes formarem dímeros, trímeros e agregados maiores. Os níveis de energia dos agregados dependem da orientação relativa entre os dipolos dos monômeros [34]. Pode-se escrever os Hamiltonianos para os dímeros como:

$$1 \quad H = H_1 + H_2 + V$$

Onde H_1 e H_2 são os Hamiltonianos dos monômeros sem interagirem, e V é o operador descrevendo a interação dipolo-dipolo:

$$2 \quad V = \frac{(\mu_1 * \mu_2)}{R_{12}^3} - 3 \frac{(\mu_1 * R_{12})(R_{12} * \mu_2)}{R_{12}^5}$$

onde μ_1 e μ_2 são os operadores de momento de dipolo dos monômeros 1 e 2, respectivamente, e R_{12} é a distância entre os dois monômeros (que deve ser no centro da densidade eletrônica dos dois monômeros).

As energias dos estados eletrônicos para os dímeros podem ser obtidas resolvendo a equação de Schrodinger com o Hamiltoniano descrito acima.

Seguindo os critérios da mecânica quântica: normalização, ortogonalidade e os estados sendo estacionários, apenas duas funções de ondas satisfazem a equação. Diante disto às frequências de absorção podem ser escritas como:

$$3 \quad \begin{aligned} \nu_+ &= \frac{1}{h}(\nu_{0a} + V_{12}) \\ \nu_- &= \frac{1}{h}(\nu_{0a} - V_{12}) \end{aligned}$$

e o momento de dipolo como:

$$4 \quad D_{0A^{\pm}} = D_{0a} \pm D_{0a} \cos\theta$$

$$\sqrt{D_{0a}} = |\langle \phi_{10} | \mu_1 | \phi_{1a} \rangle| = |\langle \phi_{20} | \mu_2 | \phi_{2a} \rangle|$$

onde θ é o ângulo entre os dipolos de transição dos monômeros 1 e 2.

Esta equação mostra que as intensidades relativas das bandas dos espectros de absorção dependem do ângulo entre os dipolos das moléculas que formam os agregados e são obtidas resolvendo as equações 2, 3 e 4. Para os agregados do **tipo J** a maior intensidade de absorção ocorre na região de comprimentos de onda maiores do que para os monômeros do mesmo composto, sendo que para os do **tipo H** esta intensidade é deslocada para comprimentos de onda menores. O ângulo entre os dipolos é definido pela direção do campo elétrico da radiação incidente, de modo que os dipolos das configurações tipo H e tipo J formam sempre um ângulo de 0° entre si (fig. 7). A explicação simplificada deste efeito é semelhante à que foi dada para os corantes cianícos com dois cromóforos.

Os agregados com ângulo de 180° entre os monômeros são denominados na literatura como do **tipo J** ou “**edge-to-edge**“ e os com 0° do **tipo H** ou “**face-to-face**” (Fig. 7).

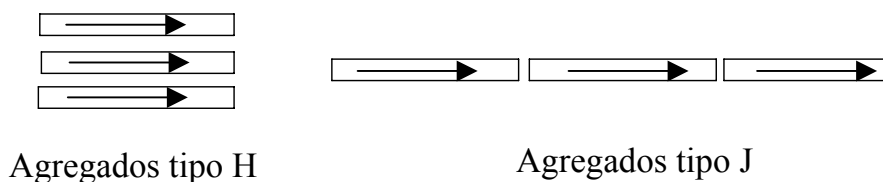


Figura – 7: Geometria dos agregados tipo H e tipo J