

USO DA SOLUÇÃO FRICKE MODIFICADA COM CORANTES PARA FUTURA DOSIMETRIA EM TRATAMENTOS FOTOTERAPÊUTICOS

Mayara Gabriella Oliveira De Almeida^{1,2}, Rizia Keila Nascimento^{1,3}, Rafaela Etelvina De Amorim Vieira^{1,4} and Vivianne Lúcia Bormann Souza^{1,3}.

¹ Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste (CRCN-NE)
Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN)
Av. Professor Luiz Freire, nº 200 - CDU
50740-540 Recife, PE
mayaradqf@hotmail.com
riziakeila@hotmail.com
rafaelarodrigues@hotmial.com
ylsouza@cnen.gov.br

² Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
Av. Prof. Moraes Rego, nº 1235 - CDU
50670-901 Recife, PE
mayaradqf@hotmail.com

³ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos
52171-900 - Recife, PE
riziakeila@hotmail.com
ylsouza@cnen.gov.br

⁴ Faculdade Integrada De Pernambuco (FACIPE)
R. José Osório, nº76 - Madalena
50610-280 Recife, PE
rafaelarodrigues@hotmial.com

RESUMO

Em função do fato de absorverem luz eficientemente, corantes e pigmentos (fotossensibilizadores) são caracterizados pela sua habilidade de absorver luz visível, e de participar de reações fotoquímicas. Esses corantes são utilizados na medicina na dose preconizada para uso na terapia fotodinâmica (PDT). Existem lasers que podem atender a boa parte dos agentes fototerapêuticos e são capazes de fornecer luz de considerável potência com precisão sobre o tecido lesado. O uso de diodos emissores de luz (LED) têm se tornado viável, reduzindo o custo dos procedimentos. O laboratório de Dosimetria Química do CRCN/CNEN tem trabalhado com alguns corantes passíveis de uso em tratamentos fototerapêuticos, entre eles: azul de metileno, verde de malaquita e o azul de toluidina. Um volume de 2,6 mL dos dosímetros foi transferido para tubos de ensaio e estes foram irradiados com LED 24, 48 72 e 96 em simuladores de acrílico de 110 mm x 110 mm x 80 mm, à uma distância de 6,5 cm da fonte de luz a leitura das amostras irradiadas foi realizada num espectrofotômetro. Havendo a obtenção de ótimos coeficientes de correlação (acima de 0,97) para as curvas de calibração do dosímetro. Sugere-se que o dosímetro possa ser aplicado para efetuar um controle de qualidade em terapia fotodinâmica. Entretanto, outros experimentos devem ser realizados antes de uma ampla aplicação desta técnica.

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT) é um novo tratamento utilizado para diferentes tipos de tumores [1 - 2], em que um agente sensibilizador é injetado na corrente sanguínea do paciente ou aplicado topicamente na pele promovendo acumulação da droga, preferencialmente no tumor. Após 24 a 72 horas, o tumor é irradiado com uma luz laser visível (comprimento de onda de cerca de 630 nm). As moléculas fotossensibilizantes absorvem a luz e produzem radicais livres e oxigênio singlete, que destroem as células cancerosas.

Fotossensibilizadores têm uma configuração eletrônica estável correspondente a um estado singlete em seu nível de energia do estado fundamental. Após a absorção de um fóton de luz visível, a molécula é promovida a um estado excitado, o qual também é um estado de singlete e é de curta duração. O fotossensibilizador retorna para o estado fundamental, emitindo um fóton ou por conversão interna com a perda de energia na forma de calor. É também possível que a molécula possa converter-se para o estado de tripleto através de um cruzamento intersistema, o que implica uma mudança na rotação de um elétron. E isso é importante para a PDT.

Além de ser uma nova técnica e interessante para o tratamento do câncer, a PDT abriu novas possibilidades para melhorar a radioterapia convencional, devido aos seus efeitos sinérgicos com a radiação ionizante quando o tecido alvo é fotossensível com a hematoporfirina normalmente empregada no PDT [3, 4], o efeito sobre a pele normal desta modalidade combinada do tratamento foi avaliado como produzindo aumento significativo de necrose da pele [5]. A modificação da radiosensibilidade de porfirinas em vários derivados *in vivo* e ensaios *in vitro* foram também estudados [6-10]. O mecanismo deste efeito radiosuscetível não é completamente ainda compreendido. Os dados *in vitro*, contudo, suportam a hipótese de que a ação do sensibilizador envolvem radicais OH^\cdot , em adição a um potencial de deterioração dos mecanismos de reparação após danos sub letal de radiação ionizante

Uma vez que as fontes de luz laser, necessárias, são relativamente caras, espera-se que o advento de outras fontes de luz, bem como novos medicamentos de fotossensibilização da pele (pois a luz atinge também os tecidos normais que acumularam o fotossensibilizador), poderá auxiliar no convencimento dos médicos para a aplicação da PDT. Como o laser é caro e os fotossensibilizadores são importados e de maior custo, este trabalho tem o objetivo de mostrar que é possível a realização da PDT com diodos emissores de luz (LED, que são de baixo custo) e com fotossensibilizadores derivados de corante (também muito mais baratos) e a possibilidade de se utilizar a dosimetria Fricke para a dosimetria destas fontes de luz. Pois, o dosímetro Fricke baseia-se numa solução contendo Fe^{2+} em meio aquoso que quando exposto à radiação oxida-se a Fe^{3+} , havendo proporcionalidade entre o tempo de irradiação e a densidade óptica medida.

Em função do fato de absorverem luz com elevada eficiência, em determinada região do espectro visível, corantes e pigmentos (fotossensibilizadores) são caracterizados pela sua habilidade de absorver luz visível, de induzir ou participar de reações fotoquímicas. Esses corantes passaram a ser utilizados na medicina e são seguros na dose preconizada para uso na terapia fotodinâmica (PDT) [11].

O uso de diodos emissores de luz (LED) tem também se tornado viável, possibilitando uma maior redução no custo dos procedimentos. O uso de fotossensibilizadores importados e mais

caros (como a porfirina), geralmente, impossibilita o acesso ao tratamento com terapia fotodinâmica à população mais carente. O laboratório de Dosimetria Química do Centro Regional de Ciências Nucleares tem trabalhado com alguns corantes, como possíveis agentes fotossensibilizadores e passíveis de uso em tratamentos fototerápicos, entre eles: azul de metileno, verde de malaquita e o azul de toluidina e de mais baixo custo. O laboratório também tem verificado que a adição de etanol pode melhorar a ação dos corantes em solução dosimétrica, em relação à solubilidade dos corantes e a estabilidade da solução dosimétrica [12].

Visto que um bom dosímetro requer algumas características intrínsecas dentre elas: apresentar boa linearidade (que demonstra proporcionalidade da resposta: aumento da densidade óptica com o aumento do tempo de irradiação) e não se degradar com o passar do tempo [13]; foram averiguadas as linearidades do dosímetro FATA (solução Fricke modificada com azul de toluidina acrescida de álcool) e seus comportamentos antes e após irradiação.

2. METODOLOGIA

A solução Fricke foi preparada com 0,392 g de sulfato ferroso amoniacal, 0,06 g de NaCl, 22 mL de H_2SO_4 para 1L de solução aquosa e as soluções Fricke modificadas foram preparadas adicionando-se $100\mu g/mL$ dos fotossensibilizadores (azul de toluidina e/ou azul de metileno), produzindo-se assim o dosímetro FAT (solução Fricke dopada com azul de toluidina). Posteriormente, acrescentou-se etanol aos dosímetros originando o dosímetro FATA (solução Fricke modificada com azul de toluidina acrescida de álcool).

Um volume de 2,6 mL dos dosímetros (a solução Fricke modificada com a adição de corantes e etanol) foi transferido para tubos de ensaio armazenados em geladeira em recipiente escuro até o momento da irradiação, a fim de evitar a oxidação dos íons ferrosos. E estes foram irradiados com luz: vermelha, azul e verde num arranjo de 12-19 LED (Diodos Emissores de Luz) por 24, 48 72 e 96 h, em tubos de ensaios localizados na superfície de simuladores de acrílico de 110 mm x 110 mm x 80 mm, perpendicular ao eixo central do feixe de radiação a uma distância de 6,5 cm da fonte de luz. Ilustrado na figura 1 abaixo:

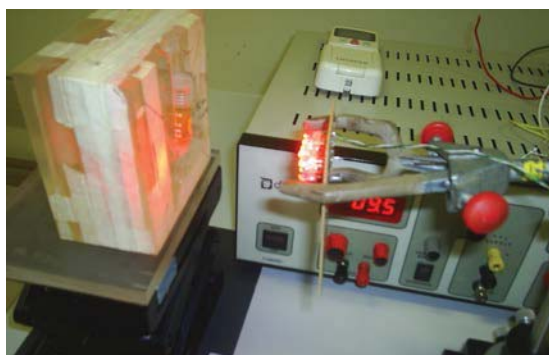


Fig 1. Arranjo experimental de irradiação.

As amostras foram irradiadas em triplicatas e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS, Beckman DU-640 no comprimento de onda de 304 nm. Sendo calculada a média das amostras após três repetições de cada, após dez medidas para cada amostra realizadas automaticamente pelo equipamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Como um dosímetro ideal requer uma boa linearidade de resposta (o que demonstra a proporcionalidade da resposta: aumentar a densidade óptica com o aumento do tempo de irradiação) e não deve sofrer influência das condições ambientais, tais como luz e temperatura ao longo do tempo. Neste trabalho, verificou-se a linearidade do dosímetro e o comportamento dosímetro antes e após a irradiação (medido a sua estabilidade em relação às condições do ambiente do laboratório e a exposição ao ar, luz e calor). Obteve-se, com o dosímetro FATA, ótimos coeficientes de correlação (acima de 0,97) demonstrando uma proporcionalidade entre o tempo de irradiação e a densidade óptica medida (resposta do dosímetro), como pode ser visto nas Figuras 2, 3 e 4.

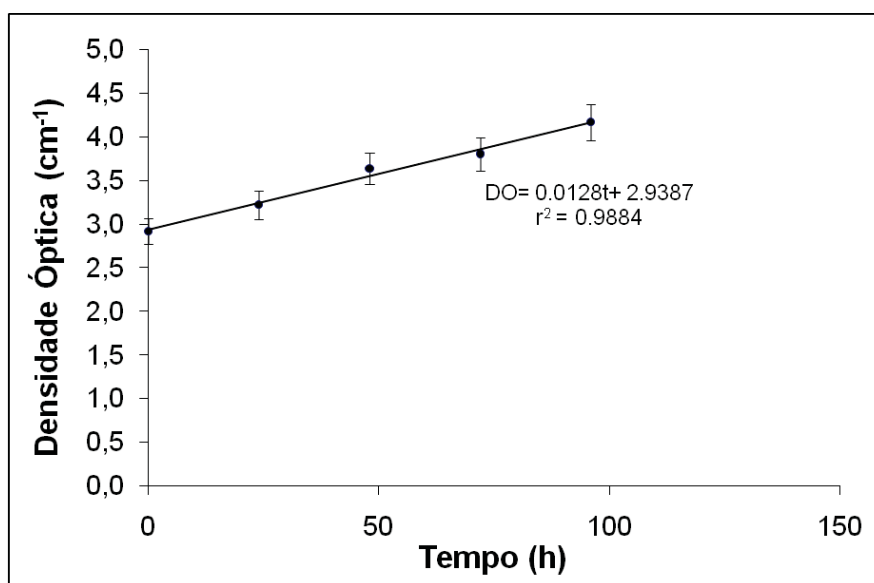


Fig. 2. Densidade Óptica como função do tempo de irradiação(durante a irradiação) do dosímetro FATA com luz vermelha.

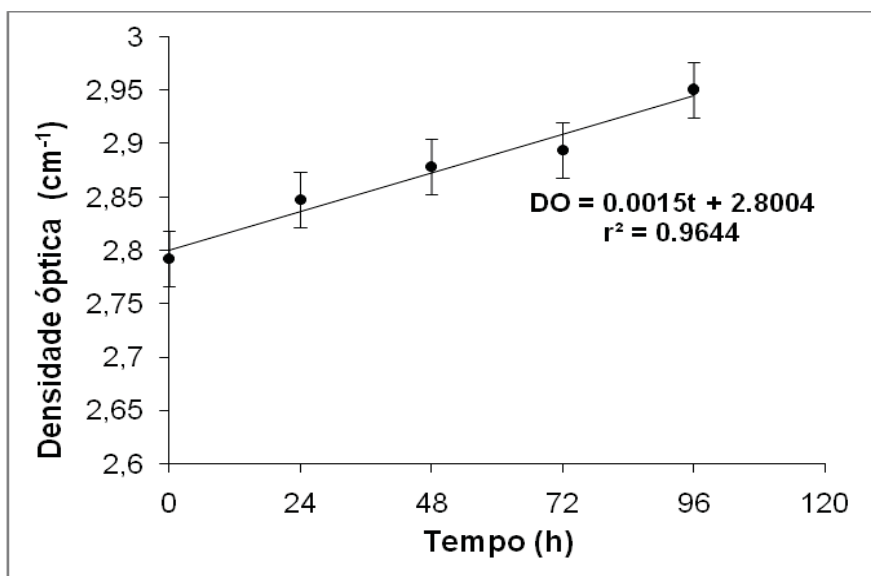


Fig. 3. Densidade Óptica como função do tempo de irradiação(durante a irradiação) do dosímetro FATA com luz verde.

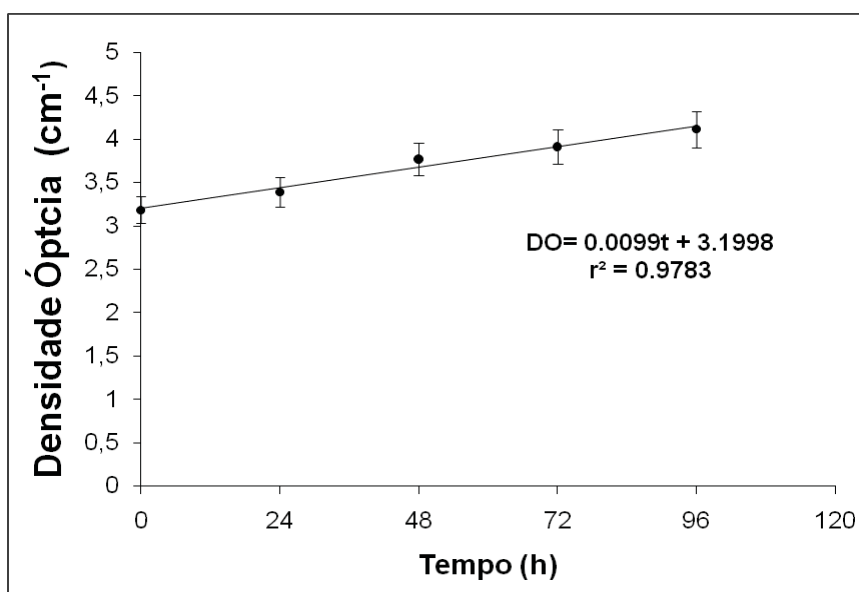


Fig. 4. Densidade Óptica como função do tempo de irradiação(durante a irradiação) do dosímetro FATA com luz azul.

A inclinação da reta nos informa que a luz vermelha atua melhor no dosímetro FATA, do que as luzes: azul e verde. Na PDT, a luz vermelha (a partir de lasers e/ou diodo emissor de luz) é preferencialmente utilizada porque aumenta o poder de penetração no tecido, quando

comparada com a luz azul, embora alguns autores sugiram o uso da luz verde [1]. No entanto, como o fotossensibilizador é azul, a luz azul também foi testada nos experimentos.

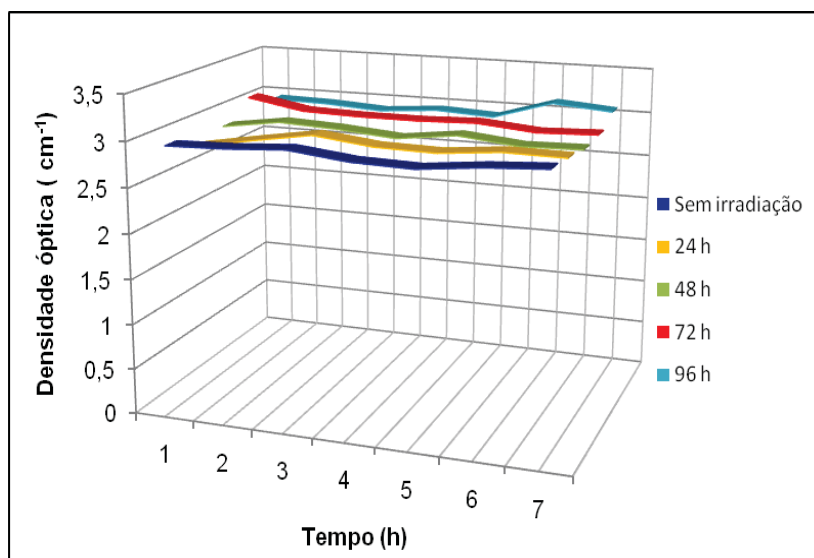


Fig. 5. Densidade Óptica como função do tempo de irradiação quando averiguada por uma semana após a irradiação.

As amostras foram lidas antes da irradiação e por uma semana depois de terem sido irradiadas para avaliar a estabilidade; na Figura 5, observa-se o comportamento do dosímetro antes e após irradiação. Neste estudo verificou-se que o etanol não aumenta a sensibilidade dos dosímetros [14], no entanto, (a adição de etanol) melhorou a estabilidade da solução, mesmo após irradiação.

Alguns hospitais públicos do Rio de Janeiro já se utilizam da luz vermelha na terapia fotodinâmica. No entanto, o fotossensibilizador, geralmente utilizado é o azul de metileno e não azul de toluidina, que num outro estudo do nosso grupo [15] demonstrou ser mais apropriado.

4. CONCLUSÃO

As amostras irradiadas com LED mostraram sensibilidade para as luzes: vermelha, verde e azul, demonstrando que a PDT pode ser realizada com LED com um custo mais baixo, quando comparado com o uso de lasers. Além disso, os resultados mostram que é mais apropriado utilizar o azul de toluidina irradiado com a luz vermelha do que com as luzes: azul e verde. Os resultados obtidos mostram curvas de calibração com bons coeficientes de correlação, o que sugere que o FATA possa ser aplicado para efetuar um controle de qualidade em terapia fotodinâmica. Entretanto, outras experiências devem ser realizadas antes de uma ampla aplicação desta técnica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, a Comissão Nacional de Energia Nuclear e a FACEPE pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D.Kessel, M. Korbelik, J.Moan, Q. Peng, "Photodynamic Therapy," *Journal of the National Cancer Institute*, **Vol. 90**, n. 12, pp.889-905 (1998).
2. C. H. Sibata, V. C. Colussi, et al., "Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment," *Braz. J. Med. Biol. Res.* **Vol. 33**, n. 8, pp 869-80 (2000).
3. M. Schaffer, P. M. Schaffer, et al., "Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model," *J. Photochem. Photobiol.*, **Vol. 66** n. 3, pp.157-164 (2002).
4. C. Austerlitz, V. L. B. Souza, D. M. T. Campos, C. Kurachi, V. Bagnato, C. Sibata , "Enhanced Response of the Fricke Solution Doped with Hematoporphyrin under X-Rays Irradiation," *Brazilian Archives of Biology and Technology.* **Vol. 51** n. 02, pp. 271-279 (2008).
5. K. Benstead, J. V. Moore, "The effect of combined modality treatment with ionising radiation and TPPS-mediated photodynamic therapy on murine tail skin," *Br. J. Cancer*, **Vol. 62** n. 1, pp. 48-53 (1990).
6. M. Schaffer, P. M. Schaffer, et al., "Application of Photofrin II as a specific radiosensitising agent in patients with bladder cancer--a report of two cases," *Photochem. Photobiol. Sci.* **Vol. 1** n. 9, pp.686-9 (2002).
7. M. Schaffer, B. Ertl-Wagner, et al., "Porphyrins as radiosensitizing agents for solid neoplasms," *Curr. Pharm. Des.*, **Vol. 9** n. 25, pp.2024-35 (2003).
8. M. Schaffer, B. Ertl-Wagner, et al., "The Application of Photofrin II® as a Sensitizing Agent for Ionizing Radiation-A New Approach in Tumor Therapy?," *Current. Medicinal Chemistry*, **Vol. 12** n.10, pp. 1209-1215 (2005).
9. A. Colasanti, A. Kisslinger, M. Quarto, P. Riccio, "Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an *in vitro* human prostate model", *Acta Biochimica Polonica*, **51** n. 4, 1039–1046 (2004).
10. Z. Lukšienė, "Experimental evidence on possibility to radiosensitize aggressive tumors by porphyrins," *Medicina Kaunas*, **Vol. 40**, n. 9, pp.868-874 (2004).
11. S. C. Núñez, "Efeito da dinâmica de fotodegradação e agregação das fenotiazinas azul de metileno e azul de orto-toluidina com relação à eficiência fotodinâmica." *Tese (doutorado)*, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo (2007).
12. V. L. B. Souza, M. S. Cunha, C. D. A. Santos, M. D. C. Figueirêdo, K. R.G. Rodrigues, G. B. S. Lira, D. B. Silva, R. T. Melo "A radiosensibilidade da solução Fricke dopada com corantes utilizados para fins terapêuticos". *Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento*, **Vol.13**, pp.122 - 125 (2011).
13. S. Müller, H. Walt, D. Dobler-girdziunaite, D. Fiedler, U. Haller, "Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light", *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, **Vol. 42**, n. 1, pp. 67 - 70 (1998).
14. M. B. PODGORSK, "Fricke radiation dosimetry using nuclear magnetic resonance," *Tese de Doutorado em Física*, no departamento de McGill da Universidade de Montreal. (1989).

15. M. G. O. Almeida, V. L. Lima, R. K. Nascimento, V. L. B. Souza, “Comparação entre o comportamento dos dosímetros FAM e FAT após irradiação com LED,” *Sci. Plena*, Vol.9 nº 8, 081004-1 – 081004-9 (2013).