

ESTUDOS DA INTERAÇÃO DO FÁRMACO FOTOATIVO HIPERICINA E DO SEU PRÓ-FÁRMACO PROTOHIPERICINA COM SISTEMAS BIOTRANSPORTADORES NANOESTRUTURADOS: ASPECTOS CINÉTICOS E TERMODINÂMICOS.

Mariana Alves Zampar (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Wilker Caetano (Orientador),
e-mail: mariana.zampar@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas/
Departamento de Química/Maringá, PR.

Ciências Exatas e da Terra/Química

Palavras-chave: Hipericina, Sistemas surfactantes, Parâmetros termodinâmicos.

Resumo

O projeto teve como objetivo de estudo, a determinação dos parâmetros termodinâmicos de ativação da reação fotoquímica que leva à formação da Hipericina, a partir do seu pró-fármaco Protohipericina. A cinética de reação da fotoconversão foi monitorada em várias temperaturas, em meio homogêneo (etanol e acetona), em sistemas micro-heterogêneos nano-estruturados formados por micelas dos surfactantes iônicos (SDS e CTABr), e também em surfactantes copolímeros da classe dos Pluronic®. Foram avaliadas as constantes de velocidade da foto-reação nos diversos meios, bem como a influência da temperatura e condições de iluminação. Na segunda etapa, foi feita a determinação da constante de ligação (K_b) dos fármacos com micelas iônicas e poliméricas em diversas temperaturas, quantificando assim a interação entre as moléculas dos fotossensibilizadores e as micelas em cada sistema.

Introdução

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade clínica que se baseia em reações fotoquímicas, em que a energia da luz é utilizada para ativar um composto chamado fotossensibilizador (FS). Uma vez ativado, o FS leva à formação de espécies altamente reativas, como por exemplo o oxigênio singlete 1O_2 , que atacam a célula e desencadeiam os processos de morte celular. (Simplicio et al., 2002). As reações fotoquímicas são exemplos de fenômenos de interação luz e matéria, onde moléculas absorvem a radiação na forma de fótons passando para um estado eletrônico excitado, obtendo características foto-físicas e físico-químicas diferentes da molécula em seu estado fundamental (Salem, 1975).

Uma molécula promissora como fotossensibilizador é a Hipericina, que pertence à família das naftodiantronas. Ela pode ser encontrada no extrato de plantas do gênero *Hypericum perforatum*, mais conhecidas como erva de São João (Figura 1), podendo ser obtida através do processo de extração das flores da planta ou por um processo de síntese, tendo como precursor o emodin. A obtenção sintética da Hipericina ocorre a partir de uma reação fotoquímica que leva ao fechamento do segundo anel na parte central da molécula, transformando a Protohipericina em Hipericina (Figura 1) (Kitanov, 2001).

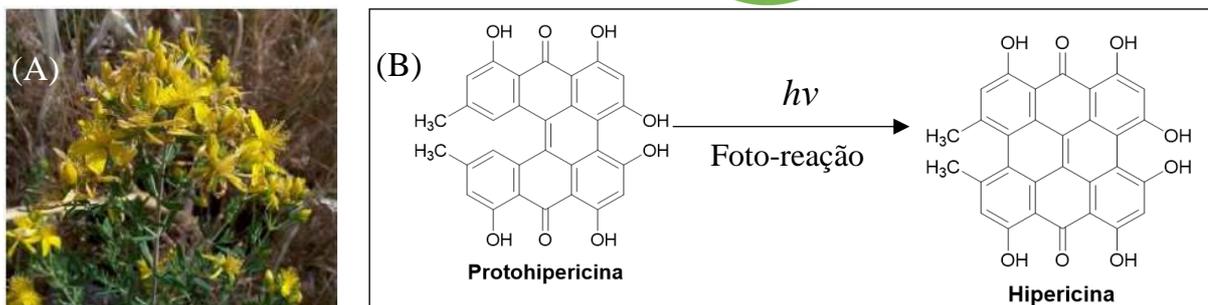


Figura 1: (A) Imagem da planta do gênero *Hypericum perforatum* e (B) representação esquemática da foto-ciclicação da Protohipericina.

No entanto, a Hipericina apresenta um elevado caráter hidrofóbico, necessitando ser solubilizada em sistemas biocompatíveis para aplicações clínicas. Sistemas surfactantes aquosos são amplamente empregados para esta finalidade. Assim, os FS foram solubilizados em surfactantes iônicos (SDS e CTABr) e surfactantes copoliméricos (Figura 2). Em meio aquoso, os monômeros de surfactantes iônicos se auto-estruturam para formar micelas com superfície iônica e core hidrofóbico. Já os surfactantes copoliméricos são constituídos de monômeros com estrutura tri-bloco com a seguinte configuração: $(\text{PEO})_x(\text{PPO})_y(\text{PEO})_x$. Ou seja, os blocos laterais de poli-óxido de etileno (PEO-hidrofílica) e o bloco central poli-óxido de propileno (PPO-hidrofóbica). Em concentrações acima da concentração micelar crítica (CMC) micelas poliméricas são formadas, sendo o sistema aquoso capaz de solubilizar drogas hidrofóbicas, tais como os FS, através do seu encapsulamento no núcleo micelar (core-PPO). (Yokoyama, 2005).

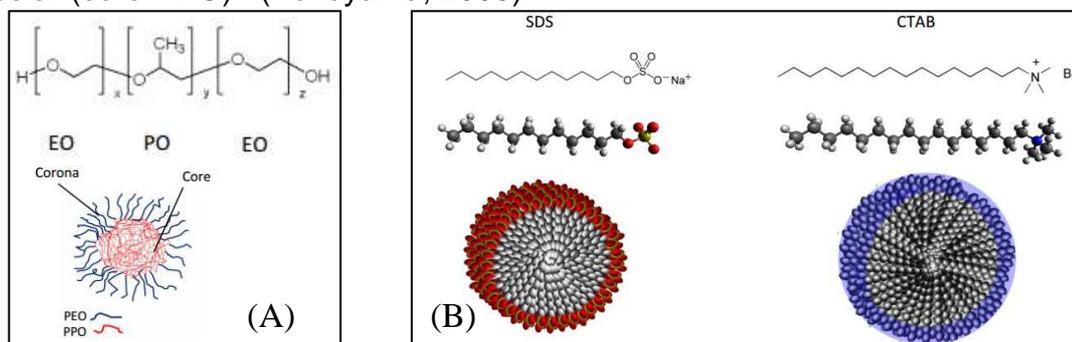


Figura 2: Representações esquemáticas de (A) estrutura genérica do unímero do copolímero e da micela polimérica formada e (B) estrutura dos monômeros dos surfactantes aniônico SDS e catiônico CTAB e suas respectivas micelas.

Materiais e métodos

Materiais

Todos os solventes utilizados eram de grau analítico e foram usados sem purificação adicional. Os surfactantes iônicos e copoliméricos da classe dos Pluronic®, foram adquiridos da Sigma-Aldrich, sendo secos antes da pesagem. Para a realização das medidas utilizou-se solução estoque da Protohipericina ($\sim 6,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), preparados semanalmente em etanol. Os equipamentos utilizados para o desenvolvimento desse trabalho foram: espectrofotômetro UV-VIS Varian Cary 50, espectrofluorímetro Varian Cary Eclipse, espectrofotômetro UV-VIS - Beckman DU-

800, todos com controle peltier de temperatura, espectrorradiômetro Ocean Optics USB 2000+ e um mini foto-reator de chip LED emitindo luz verde ($\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$).

Métodos

A Protohipericina foi sintetizada através de metodologia descrita na literatura e otimizada em nosso grupo de pesquisa. Em seguida, foram realizadas a foto-conversão da Protohipericina em Hipericina nos meios homogêneos (etanol e acetona), e surfactantes (iônicos e copoliméricos), em diversas temperaturas, avaliando os parâmetros termodinâmicos de ativação da foto-reação em cada meio. Com o ajuste dos dados cinéticos pode-se obter as constantes de velocidade de reação em cada temperatura. Por fim, a partir dos dados de absorção eletrônica UV-Vis e emissão de fluorescência foram determinados os parâmetros de ligação entre os fotossensibilizadores e os sistemas micelares.

Resultados e Discussão

Inicialmente foi realizada a síntese da Protohipericina por meio da rota sintética que utiliza o emodin como reagente de partida.

As reações de foto-conversão foram realizadas em etanol e acetona com temperaturas entre 18 e 42°C. Estes solventes foram utilizados, pois segundo a literatura, o etanol proporciona a monomerização da Hipericina e a acetona é um solvente que apresenta uma elevada capacidade solubilização desse fotossensibilizador.

Também realizou-se a foto-conversão da Protohipericina em meios micro heterogêneos, como os surfactantes iônicos (SDS e CTABr) e surfactantes copoliméricos nos intervalos de temperatura de 18 a 42°C (Tabela 1). De forma geral, pode-se observar que tantos os surfactantes não poliméricos, quanto os surfactantes copoliméricos apresentaram constantes comparáveis. No entanto, é perceptível que entre os surfactantes iônicos, SDS apresenta uma maior constante de velocidade, sendo o valor neste meio maior do que o verificado nas reações em solventes orgânicos. Já na foto-conversão utilizado surfactantes copoliméricos é nítido que os valores obtidos do Polímero B são aproximadamente 2 vezes maior que o sistema com o Polímero A.

Tabela 1: Valores de constante velocidade de foto-conversão (k) em SDS e CTABr e surfactantes copoliméricos, iluminados com luz verde, em várias temperaturas.

T (°C)	k (min ⁻¹)		T (°C)	k (min ⁻¹)	
	SDS	CTABr		Polímero A	Polímero B
18	12,5 (± 0,2)	-	18	4,3 (± 0,1)	-
22	20,3 (± 0,3)	2,3 (± 0,1)	22	3,7 (± 0,1)	24,7 (± 0,8)
25	18,1 (± 0,2)	2,9 (± 0,3)	25	3,5 (± 0,1)	13,5 (± 0,3)
26	18,7 (± 0,5)	3,2 (± 0,2)	26	3,6 (± 0,1)	11,6 (± 0,2)
30	21,9 (± 0,9)	4,7 (± 0,3)	30	4,5 (± 0,1)	6,7 (± 0,2)
34	28,2 (± 1,4)	6,6 (± 0,1)	34	5,6 (± 0,1)	8,2 (± 0,4)
38	35,1 (± 0,8)	8,5 (± 0,3)	38	6,9 (± 0,1)	10,2 (± 0,2)
42	40,4 (± 1,1)	11,6 (± 0,1)	42	7,8 (± 0,1)	13,1 (± 0,7)

Além disso, em cada sistema foram determinados os parâmetros termodinâmicos de reação utilizado as Equações Arrhenius e Eyring. Os resultados demonstram que, dentre os surfactantes iônicos, o SDS apresenta uma menor energia de ativação,

existindo neste sistema uma forte influência da variação de entropia, o que caracteriza este meio como aquele com o menor valor avaliado de energia livre de ativação. Já os sistemas formados por surfactantes copoliméricos apresentaram valores de energia de ativação, entropia e energia livre muito próximos.

Por fim, estimou-se as constantes de ligação (K_b), constatando que nos surfactantes SDS e CTABr os valores foram relativamente baixos. Entretanto, o perfil das isotermas de ligação apontam para uma maior tendência de saturação da Hipericina em relação à Protohipericina. Também realizou-se a determinação de K_b nos surfactantes copoliméricos comparando os valores para Protohipericina nos dois sistemas tem-se um maior valor no Polímero A, o que provavelmente esteja relacionado com a estrutura da cadeia polimérica. Como observado nos surfactantes iônicos, nos sistemas copoliméricos também se verificou uma maior tendência de ligação da Hipericina em relação à Protohipericina.

Conclusões

A foto-ciclicação da Protohipericina para a obtenção de Hipericina foi realizada com sucesso em sistemas aquosos nano-estruturados, formados por micelas, tanto de surfactantes não-poliméricos, como em sistemas formados por copolímeros tri-bloco da classe dos Plurônicos®. As taxas de foto-conversão nos sistemas micro-heterogêneos são similares às verificadas em meio homogêneo (etanol e acetona), com verificação de efeitos específicos que elevam as velocidades de reação nos sistemas SDS e no Polímero B, sendo este um resultado importante tanto sobre a perspectiva da química verde como farmacológica, pois utiliza um sistema aquoso formado por um copolímero biodegradável e biocompatível.

As constantes de ligação avaliadas por emissão de fluorescência e absorção eletrônica UV-Vis demonstram que a Hipericina tem uma interação mais intensa com as micelas, o que é um efeito resultante da conformação estrutural da Protohipericina e sua menor hidrofobicidade. Como as constantes de ligação da Protohipericina, em todos os sistemas micelares avaliados, é significativamente menor que a observada para a Hipericina, este resultado pode ser explorado como fator diferencial no uso da Protohipericina em uma estratégia pró-fármaco para fotossensibilização com Hipericina em TFD.

Agradecimentos

CNPQ, CAPES, Fundação Araucária (SETI/UGF-PR)

Referências

- KITANOV, G. M. “Hypericin and pseudohypericin contents in some *Hypericum* species growing in Turkey”. *Pharmaceutical Biology* 46: 288–91. doi:10.1080/13880200701741211. 2001.
- SALEM, L. “Theory of Photochemical Reactions”. *Science* 191 (August): 822–30. 1975.
- SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; e HIOKA, N. “Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos: Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos”. *Química Nova* 25 (5): 801–7. 2002.
- YOKOYAMA, M. “Polymeric micelles for the targeting of hydrophobic drugs”. In *Polymeric Drug Delivery Systems*. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 2005.