



Uso da solução fricke modificada com corantes para um controle em tratamentos fototerapêuticos

V. L. B. Souza^a; S. O. Santos^a; C. K. L. Fonseca^a; W. A. Silva^a

^a Centro Regional de Ciências Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear, 50740545, Recife-PE, Brasil

vlsoouza@cnen.gov.br

Due to the fact that, absorb light efficiently, dyes and pigments (photosensitized) are characterized by their ability to absorb visible light, and to participate in photochemical reactions. These dyes are used in medicine in the recommended dose for use in photodynamic therapy (PDT). There are lasers that can work with most of the phototherapeutic agents and are capable of providing light of considerable power with precision on the injured tissue. The use of light emitting diodes (LEDs) have become feasible, reducing the cost of the procedures. The Chemistry Dosimetry Laboratory CRCN / CNEN has worked with some dye use in phototherapy treatments, including: methylene blue, malachite green and toluidine blue. Samples are prepared with a volume of 2.6 mL of the Fricke solution modified by the addition of dyes and ethanol, that was transferred into test tubes and they were irradiated with light: red, blue and green LED array (12-19). This procedure was realized by 24, 48, 72 and 96 h, using test tubes located in the acrylic surface simulator 110 mm x 110 mm x 80 mm perpendicular to the central axis of the radiation beam at a distance of 6.5 cm from the light source. Obtaining excellent correlations (above 0.97) showing proportionality between irradiation time and optical density measured. Suggests that the dosimeter can be applied to perform a quality control in photodynamic therapy. However, others experiments, should be performed before a wide application of this technique.

INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT) é um novo tratamento utilizado para diferentes tipos de tumores (DOUGHERTY et al., 1998; SIBATA et al., 2000), 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 absorverem 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 (SCHAFFER et al., 2002, BENSTEAD; MOORE, 1990; AUSTERLITZ, et al., 2008), o efeito sobre a pele normal desta modalidade combinada do tratamento foi avaliado como produzindo aumento significativo de necrose da pele (BENSTEAD; MOORE, 1990). A modificação da radiosensibilidade de porfirinas em vários derivados in vivo e ensaios in vitro foram também estudados (SCHAFFER et al., 2002; SCHAFFER et al., 2003; SCHAFFER et al., 2005; COLASANTI et al., 2004; LUKŠIENĖ, 2004). 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⁻, 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

International Joint Conference RADIO 2014

Gramado, RS, Brazil, August 26-29, 2014

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA - SBPR

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) (NÚÑEZ, 2007).

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 (SOUZA et al., 2011).

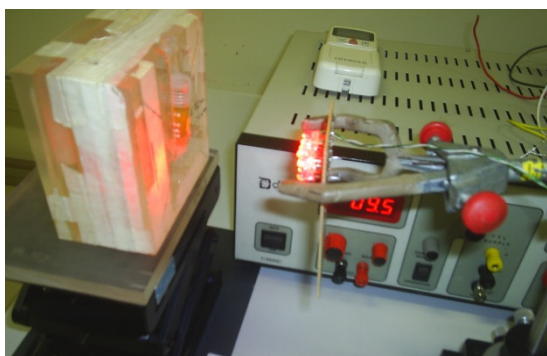
Visto que um bom dosímetro requer algumas características intrínsecas dentre elas: apresentar boa linearidade (que demonstra proporcionalidade da resposta: aumento da densidade óptica com o aumento do tempo de irradiação) e não se degradar com o passar do tempo (MÜLLER et al., 1998); foram averiguadas as linearidades do dosímetro FATA (solução Fricke modificada com azul de toluidina acrescida de álcool) e seus comportamentos antes e após irradiação.

MATERIAIS E MÉTODOS

A solução Fricke foi preparada com 0,392 g de sulfato ferroso amoniacal, 0,06 g de NaCl, 22 mL de H₂SO₄ para 1L de solução aquosa e as soluções Fricke modificadas foram preparadas adicionando-se 100µg/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

Figura 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.

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.

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

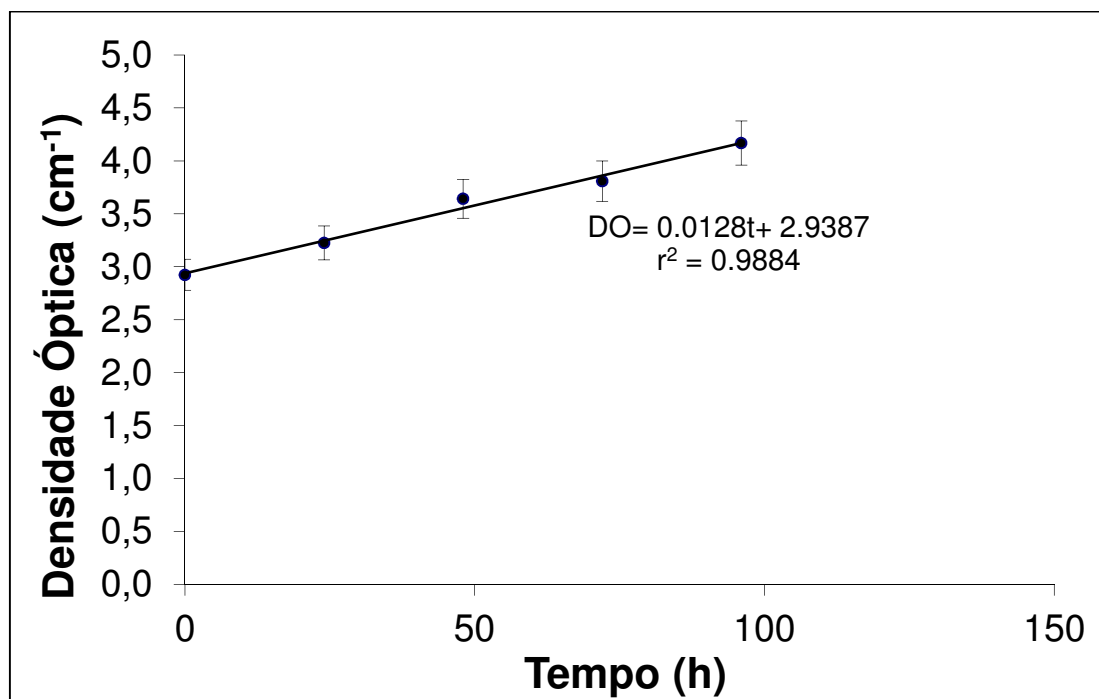


Figura 3: Densidade Óptica como função do tempo de irradiação (durante a irradiação) do dosímetro FATA com luz verde.

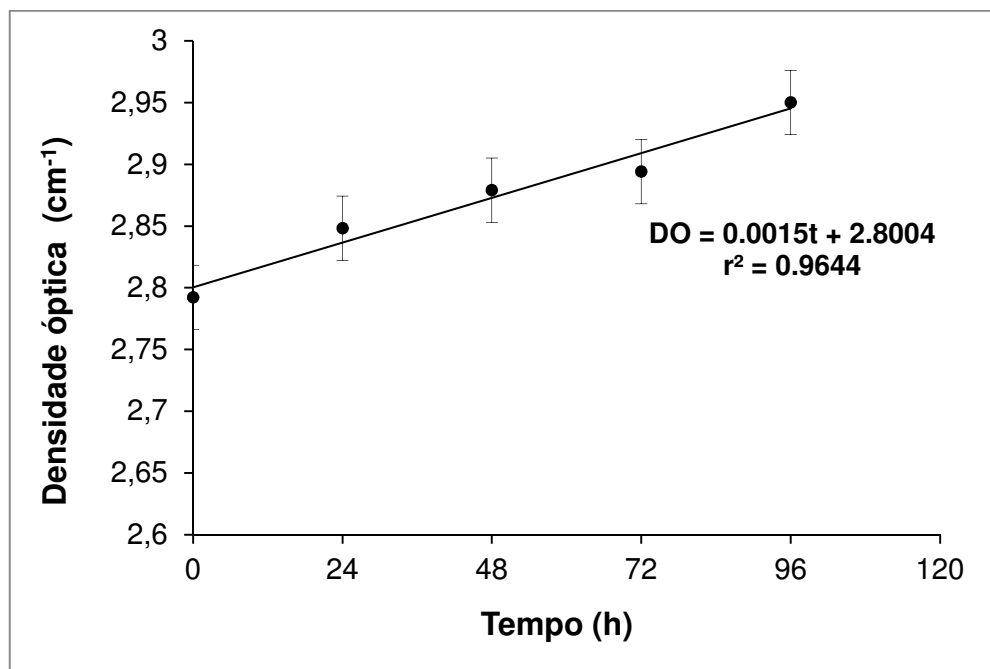
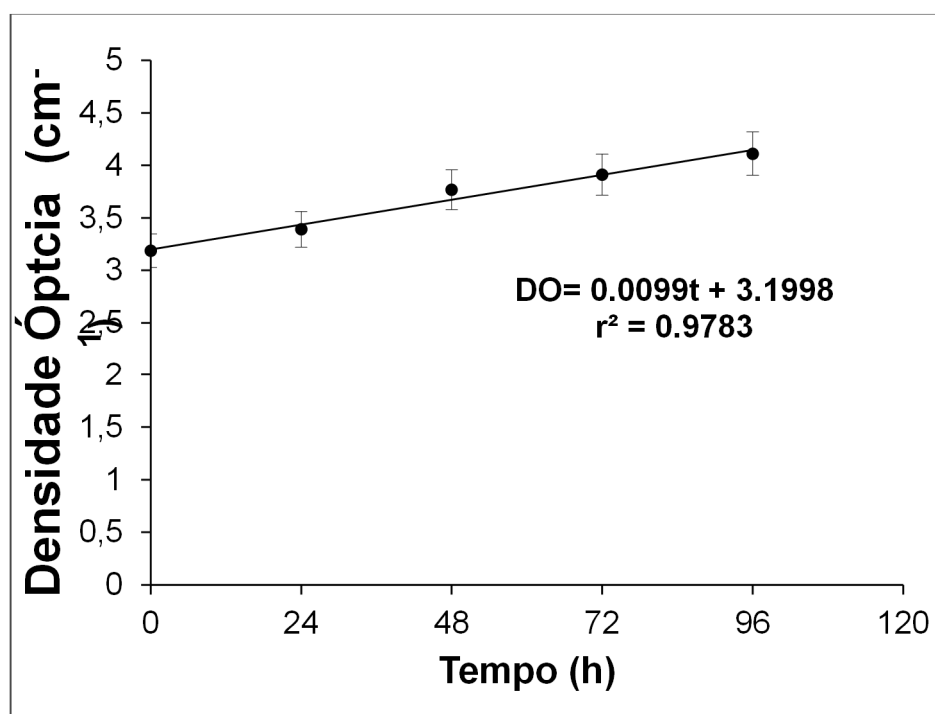
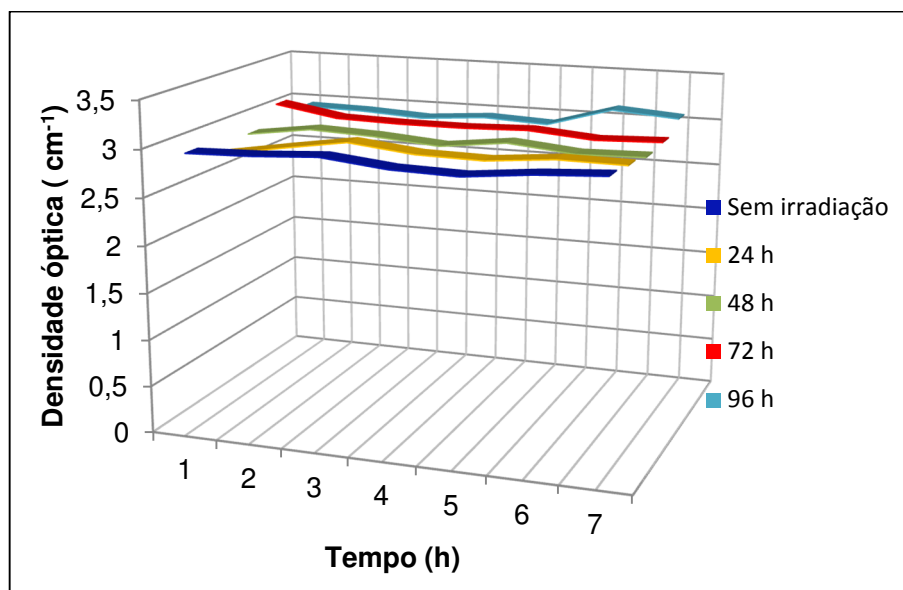


Figura 4: Densidade Óptica como função do tempo de irradiação (durante a irradiação) do dosímetro FATA com luz azul.



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.

Figura 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 (PODGORSK, 1989), 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 (ALMEIDA *et al.*, 2013), demonstrou ser mais apropriado.

CONCLUSÕES

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.

AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. G. O., LIMA, V. L., NASCIMENTO, R. K., Souza, V. L. B. 2013. Comparação entre o comportamento dos dosímetros FAM e FAT após irradiação com LED. *Sci. Plena*, 9(8), 081004-1 – 081004-9.

AUSTERLITZ C., SOUZA V. L. B, CAMPOS D. M. T., KURACHC. I, BAGNATO V., SIBATA C. Enhanced Response of the Fricke Solution Doped with Hematoporphyrin under X-Rays Irradiation. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 51, n. 02, p. 271-279. 2008.

International Joint Conference RADIO 2014

Gramado, RS, Brazil, August 26-29, 2014

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA - SBPR

BENSTEAD K., MOORE J. V., The effect of combined modality treatment with ionising radiation and TPPS-mediated photodynamic therapy on murine tail skin, **Br. J. Cancer**, v. 62, n. 1, p. 48-53. 1990.

COLASANTI A., KISSLINGER A., QUARTO M., RICCIO P., Combined effects of radiotherapy and photodynamic therapy on an *in vitro* human prostate model, **Acta Biochim. Pol.**, v. 51, n. 4, 1039–1046 2004.

DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; B. W HENDERSON.; JORI G., KESSEL D., KORBELIK M., MOAN J., PENG Q. Photodynamic Therapy, **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n. 12, p. 889-905. 1998.

LUKŠIENĖ Z., Experimental evidence on possibility to radiosensitize aggressive tumors by porphyrins, **Medicina Kaunas**, v. 40, n. 9, pp.868-874 2004.

MÜLLER S., WALT H., DOBLER-GIRDZIUNAITE D., FIEDLER D., HALLER U. Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v. 42, n. 1, pp. 67 – 70. 1998.

NÚÑEZ S. C., *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.

PODGORSK M. B. Fricke radiation dosimetry using nuclear magnetic resonance. Tese de Doutorado em Física, no departamento de McGill da Universidade de Montreal. (1989).

SCHAFFER, M. SCHAFER P. M. 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.**, v. 66, n. 3, p. 157-164. 2002.

International Joint Conference RADIO 2014

Gramado, RS, Brazil, August 26-29, 2014

SOCIEDADE BRASILEIRA DE PROTEÇÃO RADIOLÓGICA - SBPR

SCHAFFER M., SCHAFFER P. M. et al. Application of Photofrin II as a specific radiosensitising agent in patients with bladder cancer--a report of two cases, **Photochem. Photobiol. Sci.** v. 1, n. 9, pp. 686-689. 2002.

SCHAFFER M., ERTL-WAGNER B., et al., Porphyrins as radiosensitizing agents for solid neoplasms, **Curr. Pharm. Des.**, v. 9, n. 25, p. 2024-2035. 2003.

SCHAFFER M., ERTL-WAGNER B., et al., The Application of Photofrin II® as a Sensitizing Agent for Ionizing Radiation-A New Approach in Tumor Therapy?. **Curr. Med. Chem.**, v. 12, n.10, p. 1209-1215 2005.

SIBATA C. H., COLUSSI V. C. et al., Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment, **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 33, n. 8, p. 869-80. 2000.

SOUZA V. L. B., CUNHA M. S., SANTOS C. D. A., FIGUEIRÊDO M. D. C., RODRIGUES K. R.G., LIRA G. B. S., D. B., MELO R. T. A radiossensibilidade da solução Fricke dopada com corantes utilizados para fins terapêuticos. **Rev. Bras. Pesq. Desenv.**, v.13, p.122–125. 2011.