



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO
DIMETIL-2-(ACRIDIN-9-ILMETILENO)MALONATO**

SINARA MÔNICA VITALINO DE ALMEIDA

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ BEZERRA DE CARVALHO JUNIOR
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO ISIDORO CARNEIRO BELTRÃO

RECIFE-PE
2011

SINARA MÔNICA VITALINO DE ALMEIDA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO
DIMETIL-2-(ACRIDIN-9-ILMETILENO)MALONATO**

Dissertação apresentada como exigência parcial das exigências para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

RECIFE-PE
2011

Almeida, Sinara Mônica Vitalino de

Síntese, caracterização e aplicação biotecnológica do Dimetil-2-(Acridin-9-metileno) malonato/ Sinara Mônica Vitalino de Almeida. – Recife: O Autor, 2011.

109 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior

Coorientador: Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2012.

Inclui bibliografia e anexo

- 1. Histoquímica 2. Lectina 3. Luminescência I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de II. Beltrão, Eduardo Isidoro Carneiro III. Título**

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-070

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO
DIMETIL-2-(ACRIDIN-9-ILMETILENO)MALONATO**

Recife, _____ de _____ de 2011

Banca Examinadora:

Prof^o. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior
Orientador (Presidente)

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima
(1^o Membro)

Prof.^a Dr.^a Maria da Paz de Carvalho Silva
(2^o Membro)

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior
(3^o Membro)

RECIFE-PE
2011

*A todos os meus familiares, em especial à meus pais Geraldo e Edenilda, com carinho
OFEREÇO, porque sempre me estimularam a buscar meus sonhos a cada dia.
Aos meus irmãos, Nayara e Magella, que sempre me apoiaram, DEDICO.*

*“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus:
Tempo para nascer, e tempo para morrer;
Tempo para plantar, e tempo para arrancar o que foi plantado;
Tempo para matar, e tempo para sarar;
Tempo para demolir, e tempo para construir;
Tempo para chorar, e tempo para rir;...
Tempo para calar, e tempo para falar; ...”*

(Eclesiastes 3, 1-7)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela maravilhosa oportunidade de viver, aprender, por ter me dado forças e iluminado meu caminho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, por me acolher como orientanda, e permitir conviver e aprender com o Senhor, seja por meio de seus ensinamentos que não se restringiram as questões acadêmicas, mas que perpassam para vida toda, seja por sua alegria, entusiasmo e sabedoria singular que contagia a todos que estão ao seu redor.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Eduardo Beltrão, pelo apoio, incentivo, amizade, pelas discussões tão valiosas no decorrer deste trabalho.

A razão do meu viver, meus pais, Geraldo e Edenilda, pelo incentivo, compreensão da ausência, por tudo o que me proporcionaram e por todo o amor que me deram sem nada pedir em troca.

Aos meus irmãos, Nayara e Magella, pela amizade, companheirismo e por se alegrar com minha felicidade.

Ao meu namorado, Kleber Moraes, por todo amor, compreensão, ajuda incondicional e conselhos tão valiosos na vida acadêmica.

À Prof.^a Dr.^a Maria Do Carmo, por abrir as portas do seu laboratório e me acolher com tanta alegria, obrigada pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ivan Pitta e à Prof.^a Dr.^a Suely Galdino pela total disponibilidade para a execução deste projeto.

À Prof.^a Dr.^a Teresa Correia e ao Prof. Dr. Severino Júnior, pela disponibilidade para realização de experimentos em seus laboratórios e explicações valiosas durante a realização destes.

À prof.^o Dr.^a Beate por permitir as análises na microscopia de fluorescência, e a todos os seus alunos, especialmente Paulo e Antônio, pela total disponibilidade e simpatia ímpar.

Ao Prof. Dr. Agenor Jácome, pela confiança e pelos ensinamentos adquiridos ao longo da iniciação científica e por me inserir no mundo da pesquisa.

Às minhas duas famílias científicas: IMOBIO: Lúcia, Luiza, Mariana, Ricardo, Mateus, Amanda, Camila, Larissa; e BmC: Juliana Lúcia, Juliana Brandão, Moacyr, Gabriela, João, Artur, Renato, Diego, Bruno, Petra, Stheffany, Eduardo Ramalho. Meus

dias sem vocês não seriam os mesmos, especialmente sem minhas três irmãzinhas: Mari, Ray e Lúcia.

A todos os alunos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, especialmente à Sandra Sarinho, Tiago Bento, Antônio Sérgio, Michele e Andreza, pela ajuda no entendimento dos processos químicos. E também aos alunos do BSTR, pela contribuição na obtenção e interpretação dos espectros.

Ao meu amigo Fernando, por me ensinar a operar o espectrofluorímetro, pelas discussões sobre os resultados e por me confiar objetos tão valiosos. Obrigada pela confiança.

Aos professores e funcionários do Mestrado em Bioquímica e Fisiologia pela dedicação e colaboração no decorrer do curso, especialmente ao nosso querido secretário Djalma e coordenadora Vera Menezes, pela imensa paciência. E a minha querida Prof.^a Maria da Paz pela alegria constante.

Aos meus amigos de turma do Mestrado, pelos dias e noites de estudos, pela amizade constante.

A todos os funcionários do LIKA, Eliete, Sr. Otaviano, Ilma, Conceição, Paulina, Felipe, Rafael, Moisés e Vera pela cooperação nas tarefas diárias.

Ao exemplo de compromisso e responsabilidade, Carmelita, com a qual aprendo todos os dias, não apenas como proceder corretamente no laboratório, mas também como encarar a vida com alegria.

Aos meus familiares que torcem e rezam por mim todos os dias, meus avós queridos, Manoel e Irene, Lourdes e José Vitalino, meus tios e primos, em especial minha tia Socorro, os quais desejo sempre poder orgulhar.

À todos os meus amigos de graduação, principalmente Pricila e Josineide, que sempre perguntam como vão os meus estudos e torcem para que tudo dê certo. Muito obrigada por não se esquecerem de mim. Além de Emmeline e Glêzia que me ajudam todos os dias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Componentes importantes da bioluminescência do <i>Photinus pyralis</i> .	19
Figura 2 - Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível.	20
Figura 3 - Tempos que as várias etapas na excitação e emissão fluorescente e fosforescente levam para acontecer.	22
Figura 4 - Estruturas químicas para Alexa 350, 514 3 594 e espectros de emissão para a série de corantes Alexa Fluor. À direita os números de cada fluoróforo corresponde ao comprimento de onda de excitação do composto.	24
Figura 5 - Estruturas de reagentes envolvidos em sistemas quimiluminescentes: lofina (1), luminol (2), lucigenina (3), 1,2-dioxetano (4), 1,2-dioxetanona (5), 1,2-dioxetanodiona (6), peróxido de difenoíla (7).	25
Figura 6 - Diagramas de níveis de energia potencial para (a) uma reação exotérmica $R \rightarrow P$ e (b) uma reação quimiluminescente $R \rightarrow P^*$.	25
Figura 7 - Estruturas da acridina (a) e derivados de acridina (b) e éster de acridina quimiluminescente (c).	28
Figura 8 - Mecanismo provável da quimiluminescência dos derivados de acridina.	29
Figura 9 - Modificação no éster de acridina (A) pela inserção de dois grupos metil no fenol conferindo estabilidade hidrolítica (B)	30
Figura 10 - Reação de ligação do éster de acridina com grupamentos amino	31
Figura 11 - Éster de acridina biotilado	32
Figura 12 - LPSF IP-29 (3-Acrídino-2-ciano-etilester ácido acrílico) ISÔMERO E	33
Figura 13 - Estrutura refinada de Concanavalina A complexada com α -metil-D-manopiranosídeo	34
Figura 14 - Ilustração esquemática de lectinas como alvos farmacêuticos diretos (A) e como sondas de reconhecimento de carboidratos endógenos (B).	35
Figura 15 - Esquema da síntese do LPSF/IP-81. A mistura reacional é mantida durante 24 h à 110°C até a formação do produto desejado.	40
Figura 16 - Mecanismo da reação de formação do LPSF/IP-81.	47
Figura 17 - Cristais do LPSF/IP-81.	48
Figura 18 - Espectroscopia IV por modo vibracional do LPSF/IP-81. As setas indicam: 1.737 (carboxila), 2.918 (CH ₃), 754 (deformação C-H fora do plano do anel aromático monossustituído)	48
Figura 19 - Espectrometria de massa do LPSF/IP-81. Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). Concentração final: ACN 50%, TFA 0,3%. Aquisição em modo refletido positivo. Voltagem de aceleração: 19 kV. Calibração externa utilizando mistura padrão de peptídeos (Bruker). Faixa de detecção: 0 – 1300 (m/z)	49
Figura 20 - Projeção ORTEP-3 da molécula LPSF/IP-81	49
Figura 21 - Espectros de absorção do LPSF/IP-81 em solventes polar e prótico (metanol) e polar apróticos (DMF, DMSO e acetonitrila).	50
Figura 22 - Espectros de absorção do LPSF/IP-81 em acetonitrila e metanol, ambas as soluções estão em concentração de $3,1 \times 10^{-5}$.	51

- Figura 23 - Espectros de fluorescência do LPSF/IP-81 em acetonitrila ($1,55 \times 10^{-5}$ M) mostrando a diferença de intensidade de acordo com o comprimento de onda excitação, na esquerda quando excitado em 250 nm e na direita, em 361. 53
- Figura 24 - Espectro de excitação do LPSF/IP-81 em acetonitrila ($1,55 \times 10^{-5}$ M). Emissão em 428 nm. 53
- Figura 25 - Espectros de fluorescência do LPSF/IP-81 em metanol ($1,55 \times 10^{-5}$ M) mostrando a diferença de intensidade de acordo com o comprimento de onda excitação, na esquerda quando excitado em 250 nm e na direita, em 361. 54
- Figura 26 - Espectro de emissão do LPSF/IP-81 diluído em PBS ($1,55 \times 10^{-5}$ M). 55
- Figura 27 - Espectros de excitação do LPSF/IP-81 em diferentes concentrações e diluído em acetonitrila e em PBS, mostrando as diferenças no perfil de excitabilidade do composto conforme a concentração. Emissão em 428 nm. 55
- Figura 28 - LPSF/IP-81 em acetonitrila ($1,55 \times 10^{-5}$) excitado em diferentes comprimentos de onda, onde podem ser observadas as diferenças de intensidades e desvios de emissão. 56
- Figura 29 - LPSF/IP-81 diluído em PBS ($1,55 \times 10^{-5}$) excitado em diferentes comprimentos de onda, onde podem ser observadas as diferenças de intensidades e desvios de emissão. 57
- Figura 30 - Espectros de absorção, excitação e emissão do LPSF/IP-81 diluído em PBS ($1,55 \times 10^{-5}$). Excitação em 360 nm e emissão em 428. 58
- Figura 31 - Curva de calibração LPSF/IP-81, a solução inicial do LPSF/IP-81 foi diluído em PBS para as concentrações desejadas, e estas soluções tiveram suas intensidades fluorescência analisadas com excitação em 360 nm e varredura de 380-600 nm. Os espectros de emissão foram utilizados para calcular as intensidades e depois estas foram correlacionadas com as concentrações das respectivas soluções. 58
- Figura 32 - Perfil protéico e fotoluminescente obtido das alíquotas colhidas da coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25) pós aplicação da solução de conjugação (500 μ L da solução protéica, contendo 2 mg de proteína + 15 μ L da solução do LPSF/IP-81, 0.1%). O conteúdo protéico foi determinado em 280 nm e a fluorescência em espectrofluorímetro. 60
- Figura 33 - Espectros de emissão do conjugado Con A-IP81 após 1 hora de incubação e da mistura de conjugação imediatamente aplicada na coluna e eluída ambos com excitação em 360 nm. 61
- Figura 34 - Tempo de retenção do LPSF/IP-81. Quinze microlitros da solução do IP-81 (0,1%) foi misturada com 500 μ L de tampão PBS, incubada por 1 h à 25 °C e depois aplicada na coluna Sephadex G-25 e 70 alíquotas foram coletadas. Tais alíquotas tiveram sua luminescência analisada em espectrofluorímetro com excitação em 360 nm. 62
- Figura 35 - Espectros de emissão do LPSF/IP-81 (ex 360) e FITC (ex 495) ambos conjugados à Con A e com concentrações protéicas iguais de 320 μ g/mL. 63
- Figura 36 - Perfil protéico e quimiluminescente obtido das alíquotas colhidas da coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25) pós aplicação da solução de conjugação (500 μ L da solução protéica, contendo 2 mg de proteína + 15 μ L da solução do LPSF/IP-81, 0.1%). O conteúdo protéico foi determinado em 280 nm e a quimiluminescência em luminômetro. 63

- Figura 37 - Espectro de IV da lectina Con A isolada e do conjugado Con A-IP81 com diferentes proporções de conjugações (2,5 e 20 eq). 64
- Figura 38 - Espectro de massa da lectina Con A (m/z 12.000 – 110.000). Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). As análises foram feitas em duplicata em dias diferentes. 65
- Figura 39 - Espectro de massa do conjugado Con A-IP81 (m/z 12.000 – 110.000). Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). As análises foram feitas em duplicata em dias diferentes. 65
- Figura 40 - Espectro de massa do conjugado Con A-IP81 (m/z 200 – 800), mostra m/z correspondente ao LPSF/IP-81. Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). 66
- Figura 41 - Tempos de retenção do conjugado Con A-IP81 e Con A pura, o que indica que o processo de conjugação não alterou a estrutura quaternária da proteína. Após aplicação da amostra na coluna, são coletadas 70 alíquotas de 1 mL cada, num fluxo de 1mL/min em Sephadex G-25. O monitoramento foi feito pela absorbância das alíquotas em 280 nm. 68
- Figura 42 - Perfil protéico e hemaglutinante do conjugado Con A-IP-81 pós coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25) em fluxo 1mL/min. 69
- Figura 43 - Exemplo de atividade hemaglutinante da Con A pura, e dos conjugados Con A-IP81 com e sem inibição dos sítios de reconhecimento antes da conjugação, e dialisados pós conjugação. 69
- Figura 44 - Espectros de emissão dos triptofanos da Con A pura (preto), Con A-FITC (vermelho) Con A-IP81_{acetonitrila} (verde). A excitação foi em 295 nm e emissão variada de 305-400 nm. 70
- Figura 45 - Espectro de CD obtido para as amostras de Con A pura, Con A-IP81 com inibição dos sítios de ligação a carboidratos, e sem esta inibição, além daquela dialisada. 71
- Figura 46 - CD dos conjugados obtidos em diferentes condições (temperatura, tempo de conjugação, e concentrações de proteína e LPSF/IP-81). Os números correspondentes à cada conjugado é o mesmo dos ensaios da tabela 2 mostrada anteriormente (ver acima). 72
- Figura 47 - Espectros de fluorescência dos conjugados armazenados à 4 °C (acima à esquerda) e à -20 °C (acima à direita), e resultados do centro de massa dos triptofanos de ambos conjugados, concentração protéica de aproximadamente 10 µM em tampão PBS pH 7,2. 73
- Figura 48 - Gráfico da fluorescência residual dos conjugados Con A-IP81 armazenados à 4 °C e à -20 °C durante 4 semanas. A fluorescência inicial foi considerada 100% e as demais foram calculadas como proporção desta. 74
- Figura 49 - Histoquímica com lectina em neoplasias cutâneas. * Epiderme normal (EN, n = 6); Ceratose actínica (CA, n = 7); Carcinoma epidermóide (CEC, n =12); Carcinoma basocelular (CBC, n = 22); Ceratoacantoma (KA, n = 6). Marcação tecidual com o conjugado formado pela lectina Con A (Concanavalina A) conjugada ao LPSF/IP-81. Área tumoral analisada: 0,5 cm². 75

- Figura 50 - Ensaio de inibição em histoquímica com lectina em neoplasias cutâneas, confirmando que a diferença de marcação identificada pelo LPSF/IP-81 é devido expressão tecidual diferente dos carboidratos analisados. Ceratose actínica (CA, n = 7); Carcinoma epidermóide (CEC, n =12); Carcinoma basocelular (CBC, n = 22); Ceratoacantoma (KA, n = 6). Marcação tecidual com o conjugado Con A-IP81 previamente inibido com α -metil-D-manopiranosídeo. Área tumoral analisada: 0,5 cm². 76
- Figura 51 - Tecidos humanos diagnosticados como ceratoacantoma (KA). (A) KA tratado com solução Con A-IP81 com inibição prévia da lectina; (B) KA incubado com conjugado Con A-IP81 pré lavagem com filtros AMICON; (C) KA incubado com o conjugado Con A-IP81 pós 4 lavagens; e (D) Controle positivo, KA incubado com o conjugado Con A-FITC. Essas imagens foram obtidas por excitação dupla em 488 e 543 nm. 77
- Figura 52 - Tecidos humanos diagnosticados como fibroadenoma (fib). (A) Fib tratado com solução de Azul de Evans; (B) Fib incubado com conjugado Con A-FITC; (C) Fib incubado com o conjugado Con A-IP81 pré lavagem com filtros AMICON; e (D) Fib incubado com o conjugado Con A-IP81 pós 4 lavagens com filtros AMICON. 78
- Figura 53 - Espectros de emissão do conjugado Con A-IP81 não submetido ao processo de lavagens, e após o processo de lavagens (4 vezes em tubos AMICON). Excitação em 360 nm. 79
- Figura 54 - Espectros de emissão dos lavados, mostrando emissão, no entanto essa emissão diminui com o aumento das lavagens. As lavagens foram feitas em tubo AMICON, por 10 min à 4.500g. Excitação em 360 nm. 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Luminóforos fluorescentes comuns usados para marcação	23
Tabela 2 - Planejamento fatorial para avaliação da influência da variação dos fatores na resposta final (FL e AH- Atividade Hemaglutinante)	42
Tabela 3 - Comprimentos de onda de absorção do LPSF/IP-81 em diferentes solventes	51
Tabela 4 - Parâmetros utilizados na espectroscopia de fluorescência	52
Tabela 5 - Resultados da quimiluminescência do LPSF/IP-81	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EA – Éster de acridina
LPSF/AC-2 - acridina-9-carboxialdeído
ACN - Acetonitrila
AH – Atividade Hemaglutinante
BL - Bioluminescência
BmC - Grupo de Pesquisa Biomarcadores no Câncer
Con A - *Concanavalina A*
Con A-IP81 – Concanavalina A conjugada ao IP81
Con A-FITC – Concanavalina A conjugada ao Isotiocianato de Fluoresceína
Con A-DMAE – Concanavalina A conjugada ao Dimetil Éster de Acridina
CA – Ceratose actínica
CBC – Carcinoma Basocelular
CEC – Carcinoma Epidermóide
CD – Dicroísmo Circular
CDI – Carcinoma Ductal Invasivo
CCD – Cromatografia de Camada Delgada
CRD – Domínio de Reconhecimento de Carboidrato
DMAE-NHS – Dimetil Éster de Acridina – Éster N-Hidroxisuccinamida
DMF - N, N - Dimetilformamida
DMSO – Dimeltisulfóxido
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
EM - Espectometria de Massa
Fib - Fibroadenoma
FITC – Isotiocianato de Fluoresceína
HCCA - Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico
IMOBIO – Grupo de Pesquisa Imobilização de Biomoléculas
IP-29 – LPSF/IP-29 (*cyanoacridin-9-yl-ethylacrylate ester*)
IP-81- LPSF/IP81 (*Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato*)
KA – Ceratoacantoma
MALDI-TOF - (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*).
PBS – Tampão fosfato-salino
FL – Fotoluminescência
PNA - *Peanut agglutinin*
QL - Quimiluminescência
Rf – Razão de frente
RLU – Unidades Relativas de Luz
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
TFA – Ácido Trifluoracético
u.m.a – unidades de massa atômica

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo sintetizar e caracterizar parcialmente as propriedades luminescentes do derivado de acridina (LPSF/IP-81) e de seu conjugado com a lectina Concanavalina A (Con A). A síntese do LPSF/IP-81 foi realizada a partir de AC-2 e dimetilmalonato, por aquecimento à 110 °C por 24 h com rendimento de 33%. Avaliação por técnicas espectroscópicas das propriedades luminescentes do LPSF/IP-81 mostrou que o mesmo é fotoluminescente por meio de excitação em 360 nm, e emissão por volta de 428 nm. No entanto o LPSF/IP-81 mostrou-se fracamente quimiluminescente quando excitado a partir de reação química com peróxido de hidrogênio. O rendimento quântico luminescente foi de 2%. LPSF/IP-81 foi conjugado com a lectina Con A e o conjugado foi separado usando cromatografia de exclusão molecular com Sephadex G-25. O conjugado Con A-IP-81 foi avaliado por meio da atividade hemaglutinante, conteúdo protéico e luminescência (fluorescência ou quimiluminescência). Análise por dicroísmo circular mostrou manutenção da estrutura terciária da Con A após conjugação com LPSF/IP-81. Medidas de fluorescência do conjugado Con A-IP-81 demonstraram manutenção das propriedades luminescentes do LPSF/IP-81. Con A-IP-81 foi empregado como sonda histoquímica, onde o LPSF/IP-81 atuou como marcador luminescente, na avaliação do perfil sacarídico de superfície celular de tumores humanos de pele e mama. A marcação dos tecidos foi avaliada em luminômetro e microscópio de fluorescência. Os tumores de pele analisados ceratoacantoma ($1,992 \pm 177$ RLU), ceratose actínica ($2,127 \pm 332$ RLU), carcinoma epidermóide ($2,920 \pm 721$ RLU) e carcinoma basocelular ($2,934 \pm 579$ RLU) mostraram uma maior expressão de resíduos de α -D-glicose/manose reconhecidos pelo conjugado Con A-IP-81 comparado aos tecidos normais (579 ± 145 RLU). Da mesma forma que os tecidos de mama e pele analisados pela microscopia de fluorescência mostraram marcação positiva para o mesmo conjugado. Esses resultados indicam que o LPSF/IP-81 pode ser usado como marcador em histoquímica.

Palavras-chave: Derivado de acridina, histoquímica, lectina, luminescência.

ABSTRACT

This study aimed to synthesize and partially characterize the luminescent properties of an acridine derivative (LPSF/IP-81) as well as its conjugate with Concanavalin A (Con A) lectin. LPSF/IP-81 synthesis was developed from AC-2 and dimethylmalonate by heating at 110°C for 24 h. The yield reaction was 33%. Evaluation of luminescent properties showed that LPSF/IP-81 is photoluminescent by excitation at 360 nm and emission around 428 nm. However IP-81 is a weak chemiluminescent molecule in chemical reaction with hydrogen peroxide with a luminescent quantum yield of 2%. LPSF/IP-81 was conjugated to Con A and separated using Sephadex G-25 chromatography. Con A-IP81 conjugate was assayed for hemagglutination activity, protein content and luminescence (photoluminescence or chemiluminescence). Circular dichroism of Con A-IP-81 indicated the maintenance of the tertiary structure of Con A. Fluorescent assays of Con A-IP-81 showed that LPSF/IP-81 remained fluorescent after conjugation with Con A. Con A-IP-81 was used as histochemistry probe to evaluate the saccharide profile of cell surface human tumors of skin and breast. The analyzed skin tumor types, keratoacanthoma ($1,992 \pm 177$ RLU), actinic keratosis ($2,127 \pm 332$ RLU), squamous cell carcinoma ($2,920 \pm 721$ RLU) and basal cell carcinoma ($2,934 \pm 579$ RLU), showed a higher expression of α -D-glucose/mannose residues recognized by Con A, compared to normal tissue (579 ± 145 RLU). The breast and skin tissues analyzed by fluorescence microscopy showed positive stain for the same conjugate. These results indicate the use of IP-81 as label and that this acridine derivative can join other lectin marker to be used in histochemistry.

Keywords: Acridine derivative, histochemistry, lectin, luminescence.

INDICE

AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Luminescência	19
2.1.1 Fotoluminescência	20
2.1.2 Fluoróforos e seus usos como sondas e marcadores	22
2.2 Quimiluminescência	24
2.3 Derivados de acridina: moléculas versáteis	27
2.4 Lectinas – Ferramentas biotecnológicas em histoquímica	33
3 OBJETIVOS	38
3.1 Geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Equipamentos	39
4.2 Reagentes	39
4.3 Síntese e caracterização do Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato (LPSF/IP-81)	39
4.4 Propriedades luminescentes do LPSF/IP-81	40
4.4.1 Espectroscopia de Absorção	40
4.4.2 Espectroscopia de fluorescência do LPSF/IP-81	41
4.4.3 Rendimento quântico do LPSF/IP-81	41
4.4.4 Avaliação da quimiluminescência	41
4.5 Conjugação do LPSF/IP-81 com a lectina Con A	42
4.5.1 Espectrometria de massa e IV do conjugado	43
4.6 Caracterização do conjugado Con A-IP81	43
4.6.1 Análises cromatográficas	43
4.6.2 Atividade hemaglutinante (AH)	44
4.6.3 Medidas de fluorescência e Dicroísmo Circular	44
4.6.4 Teste de estabilidade do conjugado Con A-IP81	45
4.7 Aplicação dos conjugados produzidos	45
4.7.1 Amostras de tecidos para histoquímica com lectinas	45

4.7.2 Histoquímica com Lectinas	46
4.8 Análise dos dados	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 Síntese e caracterização química do Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato (LPSF/IP-81)	47
5.2 Propriedades luminescentes do LPSF/IP-81	50
5.2.1 Espectroscopia de Absorção	50
5.2.2 Espectroscopia de fluorescência do LPSF/IP-81	52
5.2.3 Rendimento quântico do LPSF/IP-81	59
5.2.4 Avaliação da quimiluminescência	59
5.3 Conjugação do LPSF/IP-81 com a lectina Con A	60
5.4 Caracterização do conjugado Con A-IP81	67
5.4.1 Análises cromatográficas	67
5.4.3 Medidas de fluorescência e Dicroísmo Circular	69
5.5 Teste de estabilidade do conjugado Con A-IP81	72
5.6 Aplicação do conjugado Con A-IP81 em histoquímica	75
6 CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXO I – PATENTE	91

1. INTRODUÇÃO

Existe um interesse e demanda crescentes por marcadores luminescentes para uso na conjugação e detecção de materiais biológicos, porque moléculas luminescentes são geralmente estáveis, sensíveis e existe, atualmente, uma ampla faixa de métodos disponíveis para a marcação de biomoléculas. Tipicamente, o espectro de emissão de um marcador fluorescente é uma propriedade característica do composto e sua intensidade serve para detectar materiais marcados com tais moléculas fluorescentes (MOCZAR *et al.*, 2010).

As acridinas são compostos heterocíclicos que possuem a habilidade de interagir com outros componentes (KRZYMINSKI *et al.*, 2011). Por isso, esses compostos podem ser aplicados em diversas áreas, como diagnóstico (KRICKA, 2003) e terapêutica (APPLETON *et al.*, 2010). Entre as características apresentadas por estes compostos de particular interesse é sua habilidade para interagir com radiação Ultravioleta-Visível (UV-Vis) por causa de absorção relativamente forte e emissão na região do visível. Como resultado, derivados de acridina podem ser potencialmente usados como sensores espectrais ou como marcadores fluorescentes (KRZYMINSKI *et al.*, 2008).

Além disso, acridonas eletronicamente excitadas também ocorrem quando oxidantes fortes, por exemplo, peróxido de hidrogênio em meio alcalino reagem com tais compostos (NATRAJAN *et al.*, 2010). Esta característica abre possibilidades para o uso destas moléculas como indicadores quimiluminescentes ou parte de sondas fluorescentes.

Uma aplicação de éster de acridina quimiluminescente é conseguida por meio de sua ligação a uma classe de proteínas denominadas lectinas que reconhecem especificamente carboidratos livres ou ligados (CAMPOS *et al.*, 2006). O conjugado lectina-éster de acridina é adequado para diferenciação de tecidos neoplásicos malignos ou benignos e tecidos saudáveis, baseada nas modificações do padrão de expressão de carboidratos de glicoconjugados de superfície celular nestes tecidos. Isso mostra que os derivados de acridina são moléculas potenciais para técnicas de diagnóstico que empregam tecidos, além de validar os carboidratos como biomarcadores de células cancerosas.

Dessa forma, a síntese, a caracterização e posterior aplicação de derivados de acridina em técnicas de identificação de biomarcadores teciduais ou séricos abrem novas possibilidades de aplicação desta classe de moléculas. Em diagnóstico, o emprego de tais compostos pode auxiliar na melhor identificação de biomarcadores tumorais, pois os métodos luminescentes apresentam a grande vantagem dos baixos limites de detecção que permitem proporcionar ensaios sensíveis. Assim a inserção dos ésteres de acridina na histoquímica, por exemplo, diminuirá tanto a subjetividade do analisador quanto a possibilidade de marcações falso-positivas decorrentes das revelações enzimáticas com peroxidase.

Por isso, o presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar parcialmente as propriedades luminescentes de um derivado de acridina (IP-81), bem como de seu conjugado com a lectina Concanavalina A (Con A) e sua aplicação em histoquímica.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Luminescência

A luminescência é o termo utilizado para descrever a emissão de radiação eletromagnética por moléculas de comprimentos de onda que vão do ultravioleta ao infravermelho no espectro eletromagnético. Essas radiações resultam da transição de estado eletronicamente excitado para um estado de energia mais baixo (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000).

A luminescência é subdividida de acordo com a fonte de energia utilizada para obtenção dos estados excitados. Essa energia pode ser fornecida por radiação eletromagnética (fotoluminescência também chamada de fluorescência ou fosforescência); calor (piroluminescência); forças de atrito (triboluminescência), impacto de elétrons (catodoluminescência) ou cristalização (cristaloluminescência) (KUMALA; SUOMI, 2003).

Na quimiluminescência (QL) a radiação luminosa é produzida por uma reação química e a bioluminescência (BL) quando emitida a partir de um sistema químico presente em um organismo (BARTOLONI *et al.*, 2010; FERREIRA, ROSSI, 2002; ALBERTIN *et al.* 1998).

Segundo Bartoloni e colaboradores (2010) os primeiros escritos da civilização humana contêm referências sobre animais luminosos, tais como os vaga-lumes. Contudo, foi somente na década de 50 do século passado que foram isolados os principais componentes bioquímicos da reação luminescente do *Photinus pyralis*: a luciferina, um ácido carboxílico complexo, e a luciferase, uma enzima (figura 1).

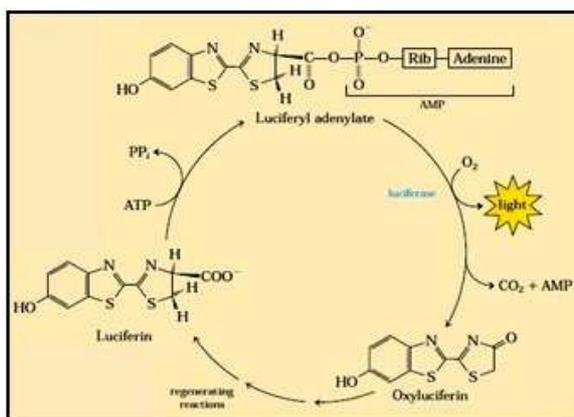


Figura 1 - Componentes importantes da bioluminescência do *Photinus pyralis*.

Fonte: Lehninger, 2006.

Dos tipos de luminescência existentes, a fotoluminescência e quimiluminescência são os mais estudados e este trabalho tem como foco estes dois tipos de luminescência.

2.1.1 Fotoluminescência

Fotoluminescência (FL) é a emissão de luz subsequente a absorção de luz por moléculas. O processo de absorção ou excitação ocasiona a interação da luz excitante com ligação π ou elétrons não ligados da molécula absorvente (SCHULMAN, 1985). Segundo Kumala e Suomi (2003) independentemente da necessidade de fontes de luz dispendiosas FL permanecerá por muito tempo sendo o método analítico luminescente mais significativa, e as diferentes formas de QL serão capazes de competir totalmente com ela somente em certas aplicações especiais. FL pode ser dividida dentro de duas subclasses principais: fluorescência e fosforescência.

Os fundamentos das transições que convertem estados excitados uns com os outros ou estados excitados com estado fundamental foram intensamente estudados na década de 1940 e o principal passo para esclarecer tais processos foi apresentado pelo físico Alexander Jablonski. O diagrama de Jablonski (figura 2) é usado para representar os níveis energéticos de uma molécula.

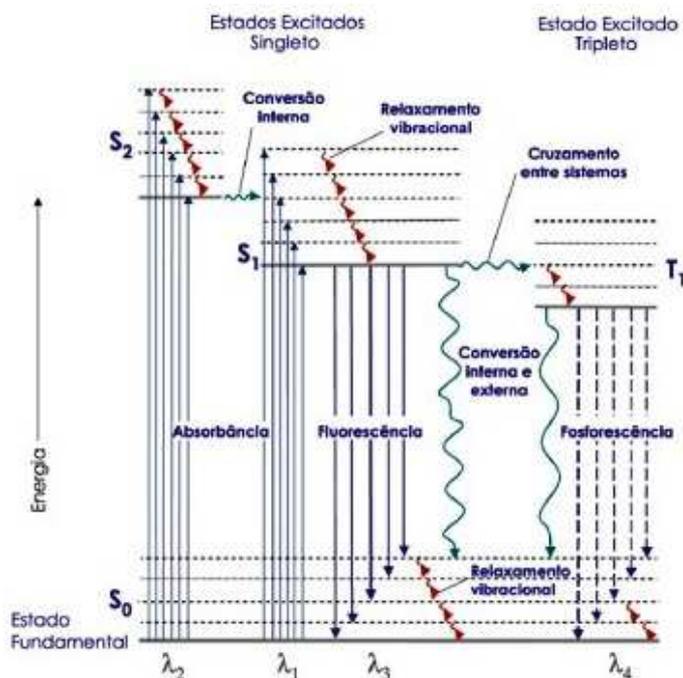


Figura 2 - Diagrama de Jablonski, mostrando os processos físicos que podem ocorrer após uma molécula absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível.

Fonte: Sotomayor *et al.*, 2008.

S_0 é o estado eletrônico fundamental; S_1 , e T_1 são os estados excitados singleto e tripleto de menor energia, respectivamente. S_2 é um segundo estado excitado singleto. As setas retas representam os processos envolvendo fótons, e as setas onduladas são as transições não-radioativas (que não emitem radiação). No estado eletrônico fundamental quase todas as moléculas ocupam o nível vibracional mais baixo à temperatura ambiente. Por excitação, através de absorção de luz UV ou visível, é possível promover a molécula de interesse para um dos vários níveis excitados vibracionais bem como níveis excitados eletrônicos (LAKOWICZ, 2006; ATVARS e MARTELLI, 2002b).

Fluorescência é um processo no qual um luminóforo absorve uma quantidade de luz de energia adequada (fóton) para arrancar um elétron de um orbital ocupado para um orbital vazio de maior energia, seguido pelo retorno do elétron para o nível energético do estado fundamental original. Este retorno é acompanhado por emissão de uma quantidade de luz com uma energia correspondente a diferença de energia entre o estado excitado e o nível do estado fundamental, de tal modo que o *spin* do elétron permanece inalterado do início ao fim do processo. Quando, em transições de elétrons para o nível do estado fundamental, o *spin* do elétron tiver que ser revertido, a emissão é muito mais lenta que na fluorescência e esse processo é chamado de fosforescência. Assim, transições permitidas por spin ($\Delta S = 0$) são chamadas de fluorescência e transições proibidas por spin ($\Delta S = 1$) são chamadas fosforescência (KULMALA, SUOMI, 2003; CRONEY *et al*, 2001).

Os estados eletronicamente excitados (S_1 e S_2 , por exemplo) são alcançados por absorção de luz. A energia eletrônica responsável pela transição fluorescente não envolve uma mudança no número quântico do *spin* do elétron, e passa do nível $S_0 \rightarrow S_1$, emitindo radiação desde o nível excitado S_1 para algum dos níveis vibracionais do estado eletrônico S_0 . Como consequência, a fluorescência possui tempos de vida extremamente curtos, com a luminescência cessando quase que imediatamente, por volta de 10^{-9} a 10^{-6} s (ns a μ s) como mostrado na figura 3 (CRONEY *et al*, 2001; SOTOMAYOR *et al*, 2008).

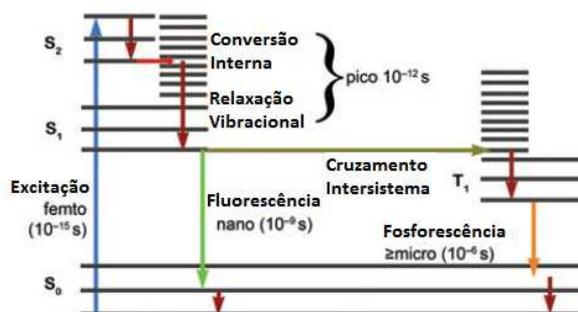


Figura 3 - Tempos que as várias etapas na excitação e emissão fluorescente e fosforescente levam para acontecer.

Fonte: Lichtman e Conchello, 2005.

A fluorescência é emitida em comprimentos de onda maiores que aqueles de excitação, deslocando-se entre 50 e 150 nm, quando comparado ao comprimento de onda da luz usado para a excitação da molécula (SOTOMAYOR *et al.*, 2008). Essa diferença entre os comprimentos de onda de excitação e emissão, conhecida como diferença de Stokes, é uma propriedade crítica que torna a fluorescência poderosa em técnicas analíticas (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005).

A utilização da fluorescência em técnicas analíticas é possível porque a maioria dos analitos não apresenta luminescência natural (SANTOS; GIL, 2010). Por isso, a marcação ou ligação com moléculas luminescentes pode ser uma boa ferramenta para análises sensíveis. Geralmente, a área de sondas, indicadores e marcadores luminescentes está crescendo continuamente. Desenho, síntese e caracterização de moléculas luminescentes estão em rápido progresso devido às necessidades urgentes por uma ampla variedade de aplicações analíticas, por exemplo, no campo das análises biológicas (SANTOS *et al.*, 2006; NOVA *et al.*, 2004; ZHAO *et al.*, 2009).

2.1.2 Fluoróforos e seus usos como sondas e marcadores

Moléculas que são usadas por causa de suas propriedades fluorescentes são chamadas fluoróforos. Considerando que muitas substâncias orgânicas têm fluorescência intrínseca (autofluorescência), mas poucas são úteis para marcação específica de componentes em sistemas biológicos, a abordagem típica para microscopia de fluorescência é tirar vantagem de compostos sintetizados que têm algum grau de ligações duplas conjugadas. Esses compostos são ótimos para microscopia de fluorescência porque as diferenças de energia entre estados excitado e fundamental são

pequenas que fótons de energia relativamente baixa, na parte visível do espectro eletromagnético, podem ser usados para excitar elétrons (KULMALA; SUOMI, 2003).

A probabilidade que um fluoróforo absorva um fóton é chamada de coeficiente de extinção molar, ϵ , em unidade de $M^{-1}cm^{-1}$ quando a luz passar através da solução contendo o fluoróforo. O valor de ϵ é especificado como o comprimento de onda que é o máximo de absorção. No entanto, para que ocorra a luminescência, uma molécula precisa ter estrutura apropriada e estar em um meio que favoreça a desativação radiativa, sendo esses dois fatores críticos na magnitude da eficiência quântica luminescente de uma substância (LICHTMAN; CONCHELLO, 2005).

Para avaliação da eficiência de uma molécula emissora de luz é utilizado uma medida chamada rendimento quântico luminescente, que é a razão entre o número de fótons emitidos por fluorescência e o número de fótons absorvidos pela espécie química. Assim, se a eficiência quântica tiver magnitude entre 0,1 e 1, a molécula será significativamente luminescente (DEMAS; CROSBY, 1971; IKI, *et. al.*, 2001)

Após excitação, se uma molécula emprega ou não a fluorescência para liberar a energia de excitação eletrônica depende da estrutura molecular. Porém, o solvente no qual uma molécula está solubilizado pode ter um efeito dramático sobre a emissão fluorescente (KRZYMINSKI *et al.*, 2010), além da concentração (KRZYMINSKI *et al.*, 2011), pH do meio (SMITH *et al.*, 2000, BROWN *et al.*, 1998) e a presença de espécies capazes de diminuir ou eliminar a luminescência por meio de interações com o fluoróforo (CRONEY *et al.*, 2001). Esse fenômeno é chamado supressão (do inglês, *quenching*) da luminescência (LICHTMAN, CONCHELLO, 2005; SCHULMAN, 1985).

Por causa da presença de grupos adequados para ligação com biomoléculas, os fluoróforos são submetidos a um processo comumente chamado de reação de conjugação onde, por exemplo, uma proteína é ligada ao fluoróforo de interesse e a sonda resultante é frequentemente chamada de conjugado (WEEKS *et al.*, 1983; CAMPOS *et al.*, 2006, NATRAJAN *et al.*, 2010). Os marcadores luminóforos comumente utilizados nos processos de conjugação estão listados na tabela 1.

Tabela 1 - Luminóforos fluorescentes comuns usados para marcação

Luminóforo	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}(nm)$	Luminóforo	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}(nm)$
Isotiocianato de Fluoresceína (FITC)	494/ 518	Atto 488	501, 523
Rodamina B	540/ 625	Alexa Fluor 532	532, 553
Texas Red (TR)	596/ 615	Cy3	548, 562
Coumarin	384/ 469	Cy5	650, 670
Phycoerythrin (PE)	565/ 575	Cascade Blue	400, 420

Fonte: Kulmala e Suomi, 2003.

Na figura 4 estão os espectros de emissão e estruturas moleculares de alguns fluoróforos conhecidos como Alexa Fluor que recebem numerações específicas de acordo com o comprimento de onda de excitação e que, por meio de protocolos de conjugação, são utilizados para diversos fins.

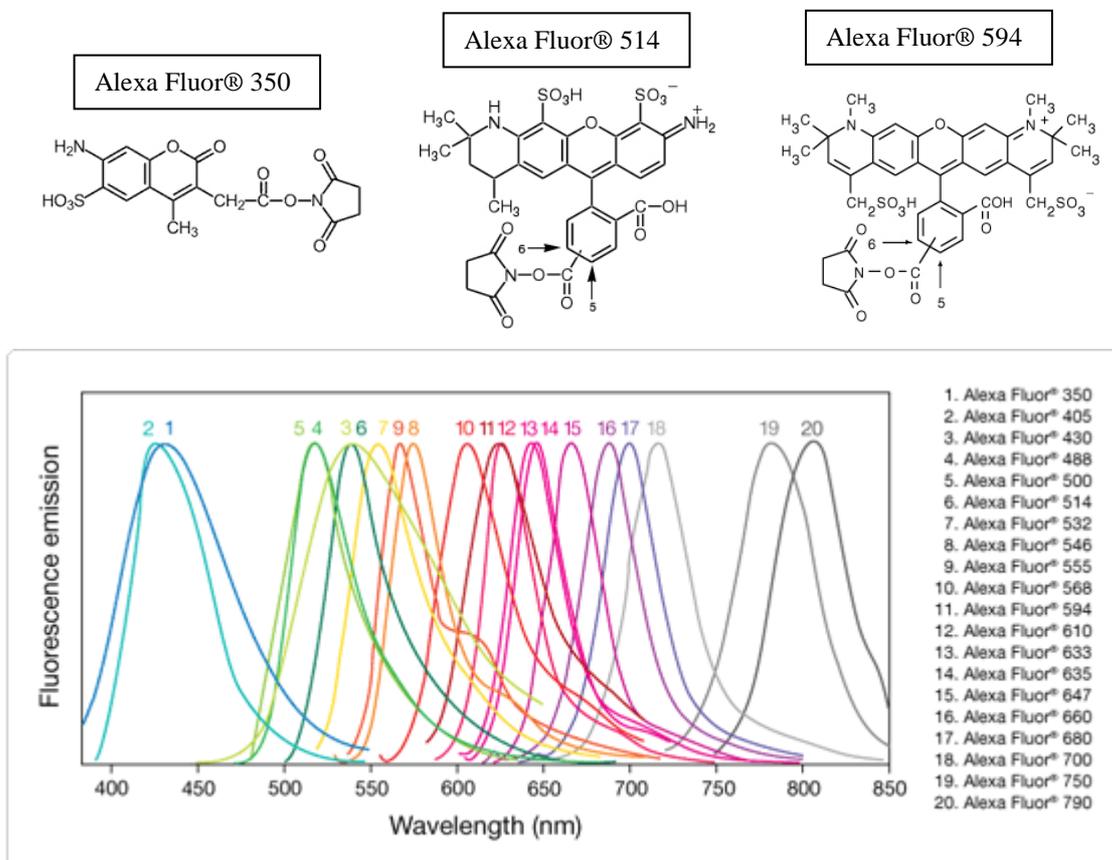


Figura 4 - Estruturas químicas para Alexa 350, 514 3 594 e espectros de emissão para a série de corantes Alexa Fluor. À direita os números de cada fluoróforo corresponde ao comprimento de onda de excitação do composto.

Fonte: <http://products.invitrogen.com/ivgn/product>

2.2 Quimiluminescência

O primeiro pesquisador a utilizar o termo “quimiluminescência” para descrever reações químicas que emitem luz visível foi Eilhardt Wiedemann, que, em 1888, propôs a seguinte definição: “emissão de luz ocorrendo junto a processos químicos” (SANTOS; SANTOS, 1993).

O primeiro composto sintético orgânico a apresentar uma reação quimiluminescente foi a lofina, ou 2,4,5-trifenilimidazol, preparada em 1887 (figura 5). No entanto, a primeira reação quimiluminescente bem caracterizada mecanisticamente foi a oxidação do luminol com peróxido de hidrogênio em meio básico, descrita em

1928 (DODEIGNE *et al.*, 2000). Além destes compostos exemplificados, outras substâncias como lucigenina, e dioxetanos participam como substratos de reações quimiluminescentes e suas fórmulas são apresentadas na figura 5 (BARTOLONI *et al.*, 2010; FERREIRA, ROSSI, 2002).

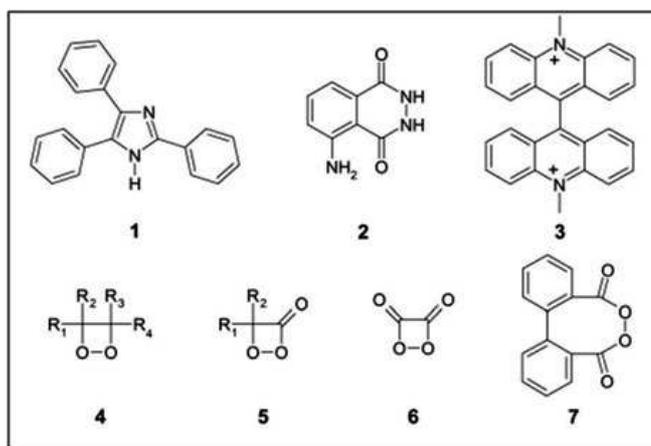


Figura 5 - Estruturas de reagentes envolvidos em sistemas quimiluminescentes: lofina (1), luminol (2), lucigenina (3), 1,2-dioxetano (4), 1,2-dioxetanona (5), 1,2-dioxetanodiona (6), peróxido de difenoíla (7).

Fonte: Bartoloni *et al.*, 2010.

Contudo, nem toda reação leva à formação de estados excitados, porque em uma reação térmica convencional, a energia absorvida por um reagente R, proveniente do choque randômico entre moléculas, é utilizada para alterar as ligações químicas da mesma (figura 6).

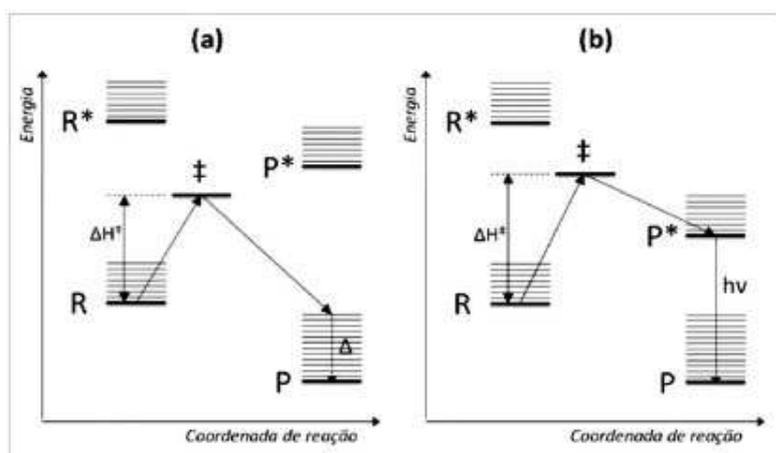


Figura 6 - Diagramas de níveis de energia potencial para (a) uma reação exotérmica $R \rightarrow P$ e (b) uma reação quimiluminescente $R \rightarrow P^*$.

Fonte: Bartoloni *et al.*, 2010.

A energia absorvida pelo reagente pode levá-lo ao estado de transição (\ddagger) que, em seguida, forma o produto P, inicialmente em um estado vibracional excitado, que

perde essa energia de excitação vibracional na forma de calor. Quando o reagente R possui energia térmica suficiente (adquirida no choque entre moléculas e/ou armazenada na forma de tensão estrutural) para formar o estado de transição e este, por sua vez, tem energia superior ao estado eletrônico excitado do produto (P*), o produto será formado no estado excitado (figura 6) (BARTOLONI *et al.*, 2010).

Depois de excitadas, as entidades quimiluminescentes, de acordo com a forma que perdem a energia de excitação, podem ser divididas em categorias: aquelas que resultam em um sinal de vida relativamente curto (segundos), mas de sinal intenso (tipo flash) e aquelas que produzem um sinal de vida mais longo (minutos ou horas) geralmente de uma intensidade menor (tipo brilho). Da primeira categoria (tipo flash) duas classes de composto têm maior aplicação, os chamados ésteres de acridina (AEs) e luminol (exemplo, aminobutiletilluminol). Nesse caso a quimiluminescência é iniciada pela adição de um oxidante em pH alcalino alto com (compostos tipo luminol) ou sem um catalisador (AE). O sinal resultante é de vida curta e, portanto, a iniciação geralmente deve ser feita *in situ*, ou seja, dentro da câmara de mensuração do luminômetro. Contrariamente, mensurações da quimiluminescência emitida de compostos da segunda categoria (tipo brilho) não requerem adição do iniciador *in situ* devido a natureza de vida relativamente longa do sinal (BROWN *et al.*, 1998).

O uso do reagente quimiluminescente adequado para análise não apresenta as desvantagens associadas com o uso de substâncias marcadoras radioativas (WEEKS *et al.*, 1983). Essas desvantagens são as seguintes: a formação do reagente radioativo envolve espécies potencialmente prejudiciais; segundo, o tempo de prateleira de tais reagentes radioativos é frequentemente pequeno por causa do seu contínuo decaimento, além do mais, a emissão da radiação dos radioisótopos pode ser deletéria para a substância que o radioativo é ligado (radiólise); terceiro, é difícil conjugar proteínas em uma quantidade suficiente para fornecer reagentes sensíveis e rapidamente detectáveis (WOODHEAD e WEEKS, 1985).

Em contraste, o reagente quimiluminescente é não-radiotóxico, estável, e pode ser quantificado tanto rapidamente quanto em pequenas quantidades, além disso, sua quimiluminescência não necessita de um catalisador adicional, ela pode ser simplesmente iniciada por peróxido de hidrogênio e base (WEEKS *et al.*, 1983).

Segundo Kricka (2003), a quimiluminescência surgiu como uma tecnologia de detecção extremamente útil em diagnósticos clínicos tanto para imunoenaios quanto para análises de ácidos nucleicos. Entre os vários marcadores quimiluminescentes que

são atualmente empregados, ésteres de acridina são particularmente atrativos porque eles têm altos rendimentos quânticos com limites de detecção na faixa de atomoles. Além disso, eles exibem emissão de luz rápida, com reação química simples e seu tamanho pequeno permite protocolos simples de ligação para proteínas e ácidos nucleicos.

2.3 Derivados de acridina: moléculas versáteis

Derivados de acridina são compostos orgânicos sintéticos que demonstram propriedades luminescentes e vêm sendo estudados há mais de quatro décadas (McCAPRA, 1976). Entre as características apresentadas por esses compostos, de particular interesse é sua habilidade para interagir com radiação UV-Vis por causa de uma absorção relativamente forte de radiação ultravioleta e emissão de radiação na região do visível (BOUZYK *et al.*, 2003). Como resultado, derivados de acridina podem ser potencialmente usados como sensores espectrais (MAHMOOD; PAUL; LADAME, 2010) ou como marcadores fluorescentes (JÁCOME-JÚNIOR, 2010). Acridonas eletronicamente excitadas também ocorrem quando oxidantes fortes, por exemplo, peróxido de hidrogênio em meio alcalino reagem com tais compostos (KRZYMINSKI *et al.*, 2011). Esses processos abrem possibilidades para o uso dessas entidades como indicadores quimiluminescentes ou parte de sondas fluorescentes.

A acridina (figura 7), $C_{13}H_9N$, é um composto orgânico heterocíclico de nitrogênio cujos derivados têm sido, por muito tempo, bem estabelecidos como uma classe de compostos ligantes de DNA. Esses compostos retêm o interesse de bioquímicos e químicos devido às possibilidades de seus usos clínicos (MOLONEY *et al.*, 2001). Muitas drogas são conhecidas por sua capacidade de se ligar ao DNA por meio da intercalação entre nucleotídeos consecutivos. Para essa classe de compostos pertencem vários agentes, como as imidazoacridinas, com atividade antitumoral contra vários tipos de células cancerosas (DZIEGIELEWSKI *et al.*, 2002), bem como drogas para doenças infecciosas como a tuberculose (APPLETON; PEARCE; COPP, 2010).

Derivados de acridina foram descobertas como moléculas quimiluminescentes desde que Glue e Petsch, em 1935, descobriram a emissão de luz azul ou verde do nitrato bis-N-metilacridina (lucigenina) (BARTOLONI *et al.*, 2010). Exceto para a lucigenina e diidroacridinas N-metil arilmetileno, todos os derivados de acridina

quimiluminescentes são constituídos de duas partes: o anel acridina heterocíclico e o grupo de saída X (figura 7). Cada parte tem um papel importante na emissão de luz. Além da presença de um grupo reativo para ligação com proteínas (NATRAJAN *et al.*, 2010).

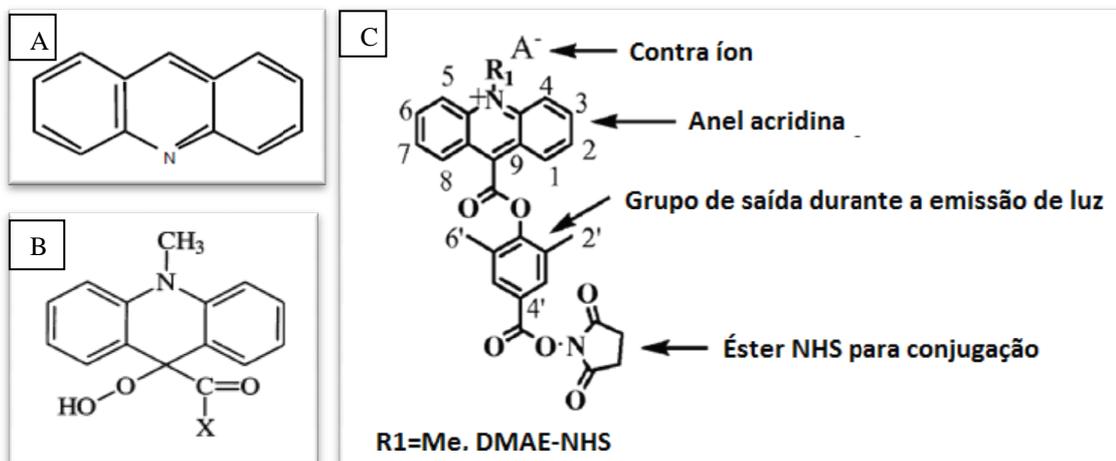


Figura 7 - Estruturas da acridina (a) e derivados de acridina (b) e éster de acridina quimiluminescente (c).

Fonte: Dodeigne, Thunus, Lejeune, 2000; Natrajan *et al.*, 2010.

O mecanismo de reação quimiluminescente dos derivados de acridina foi estudado em detalhes por McCapra (1976). O principal mecanismo provável é apresentado na figura 8. Todos os intermediários, exceto a dioxetanona, foram isolados e caracterizados. Nenhum catalisador é necessário em todas as reações, somente peróxido de hidrogênio e uma base forte para que ocorra emissão de luz (McCapra 1976; WEEKS *et al.*, 1983; NATRAJAN *et al.*, 2010; KRZYMINSKI *et al.*, 2011).

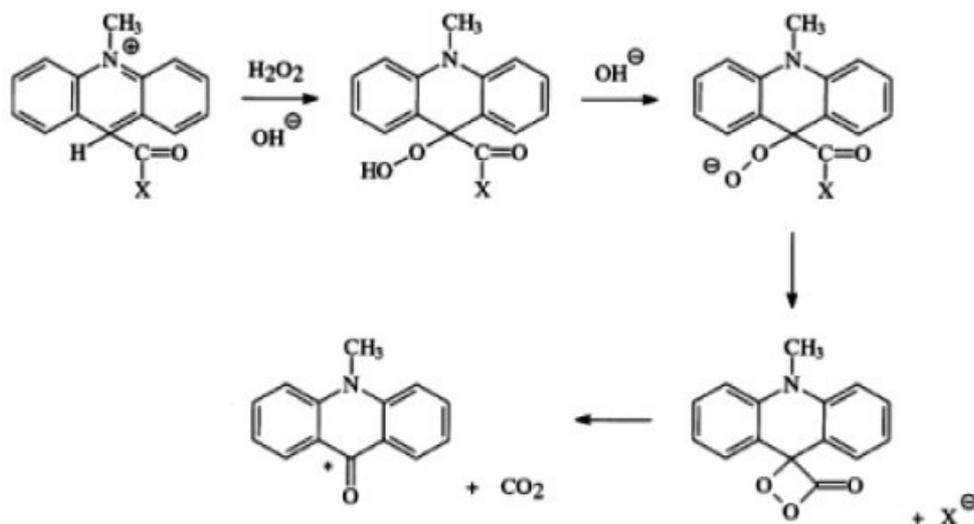


Figura 8 - Mecanismo provável da quimiluminescência dos derivados de acridina.

Fonte: Dodeigne; Thunus; Lejeune, 2000.

A reação quimiluminescente desejada é iniciada pelo ataque do ânion peróxido no C-9 do anel acridina. Adição de base causa a eliminação do ânion X^- e a formação do anel dioxetano, seguido pela formação de dióxido de carbono e a forma N-metilacridona excitada. Essa espécie excitada produz a quimiluminescência mensurada (McCAPRA, 1976; KRZYMINSKI *et al.*, 2011). Porém, sobre condições básicas, ânions hidróxidos competem com o ânion peróxido pelo C-9 para formar espécies pseudo-bases que podem reagir ou com o ânion peróxido ou com o ânion hidróxido. Em ambos os casos, N-metilacridona é produzida no estado fundamental e a quimiluminescência não é observada. Assim, a quimiluminescência analiticamente útil é somente obtida quando o éster intacto predomina (KALTENBACH e ARNOLD, 1992). Dessa forma, o pH da solução do éster será um parâmetro crítico na utilidade do sistema analítico (SMITH *et al.*, 2000).

Em 1983, o éster de acridina 4-(2-succinimidiloxicarboniletil)fenil-10-metilacridina-9-carboxilato fluorosulfonado (figura 9) foi desenvolvido para uso como um marcador em bioensaios por causa da necessidade de substituição dos radioisótopos utilizados até então (WEEKS *et al.*, 1983).

Os relatos iniciais descrevendo as aplicações desse éster fenil de acridina em imunoensaios (WEEKS *et al.*, 1983) e detecção de ácidos nucleicos (ARNOLD *et al.*, 1989) apontaram seu potencial como marcadores úteis em diagnósticos clínicos. A principal desvantagem desses ésteres de acridina era sua instabilidade resultando em fácil hidrólise da ligação éster entre o anel acridina e o grupamento fenol (SATO, 1996). Essa instabilidade foi usada engenhosamente em ensaios homogêneos de sondas de DNA onde foi observado que sondas marcadas com éster de acridina quando hibridizadas para seus alvos eram protegidas de hidrólise. Portanto, sondas livres *versus* marcadas poderiam ser diferenciadas por hidrólise seletiva da primeira (NELSON, 1995).

Devido à eficiência que o primeiro marcador éster de acridina demonstrou em imunoensaio, muito esforço foi dedicado para sua modificação estrutural, com o objetivo de melhorar sua estabilidade e propriedades quimiluminescentes. Ambos Law e colaboradores (1989) e Yin e colaboradores (2008) descreveram o uso de um éster de acridina hidroliticamente estável chamado dimetil éster de acridina (DMAE) que permitiu aplicações comerciais desses compostos em instrumentos automatizados (figura 9).

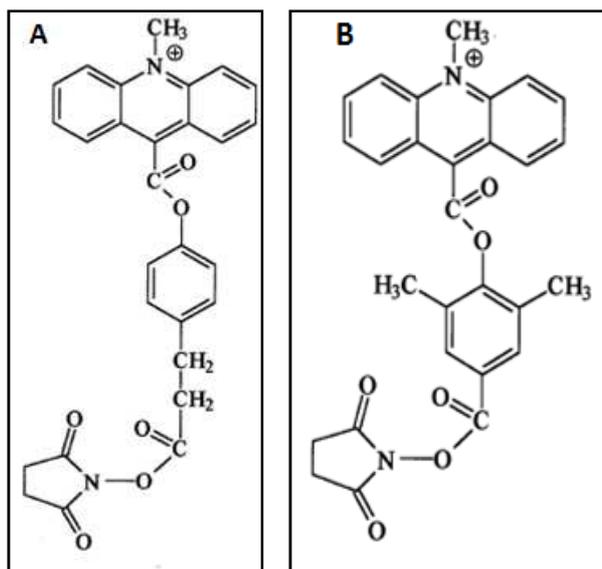


Figura 9 - Modificação no éster de acridina (A) pela inserção de dois grupos metil no fenol conferindo estabilidade hidrolítica (B)

Fonte: Smith *et al.*, 2009.

Esses ésteres não apresentaram nenhuma perda de atividade quimiluminescente mesmo depois de uma semana à 37°C em pH 7.0 considerando que os ésteres de acridina sem estes substituintes perdem 90% de sua atividade (SMITH *et al.*, 2009). Ésteres de acridina quimiluminescentes estáveis foram também produzidos pela substituição do grupo éster fenil com N-sulfonilcarboxiamidas. Esses compostos são estruturalmente bastante distintos dos ésteres fenil de acridina, mas eles usam os mesmos reagentes químicos e exibem propriedades emissivas similares (NATRAJAN *et al.*, 2010).

Além da instabilidade hidrolítica, os primeiros ésteres de acridina apresentavam baixa solubilidade tornando-os inadequado para o uso em imunoenaios. Por isso, diversos grupos tentam sintetizar ésteres de acridina com um alto rendimento quântico comparável ao sintetizado inicialmente, mas com maiores estabilidade e solubilidade (SATO, 1996; SMITH *et al.*, 2000, AGIAMARNIOTI *et al.*, 2004; SMITH, 2009; NATRAJAN *et al.*, 2010).

A presença e a posição de grupos substituintes no anel fenol ou acridina pode influenciar no rendimento quimiluminescente dos ésteres de acridina como mostrado recentemente por Smith e colaboradores (2009) que prepararam vários compostos ésteres de acridina com o grupo fenil ligado nas posições *orto* e *meta*, além de testar a influência de grupos substituintes. Todos os derivados ésteres de acridina preparados exibiram quimilumescência na presença de peróxido de hidrogênio, e os compostos

orto-ligados no anel fenol, exceto o derivado dibromo, exibiram uma melhoria no rendimento quântico da luminescência. O derivado 4-bromo-6-metil no anel fenol exibiu um rendimento quântico de luminescência cerca de quatro vezes maior que o análogo *para*-ligado não substituído que é amplamente usado em ensaios biológicos. Essa mudança deve-se a efeitos estéricos e eletrônicos que são importantes em determinar a faixa na qual a reação quimiluminescente ocorre (SMITH *et al.*, 2009).

Porém, não basta apenas avaliar as características que influenciam a quimiluminescência ou fotoluminescência de derivados de acridina, pois, a aplicação destes na maioria dos testes diagnósticos depende de sua ligação para os compostos de interesse. O EA mostrado na figura 10 é covalentemente ligado para compostos contendo aminas primárias por meio de reação específica do éster NHS com a amina primária do anticorpo (GARCIA-CAMPAÑA, 2002).

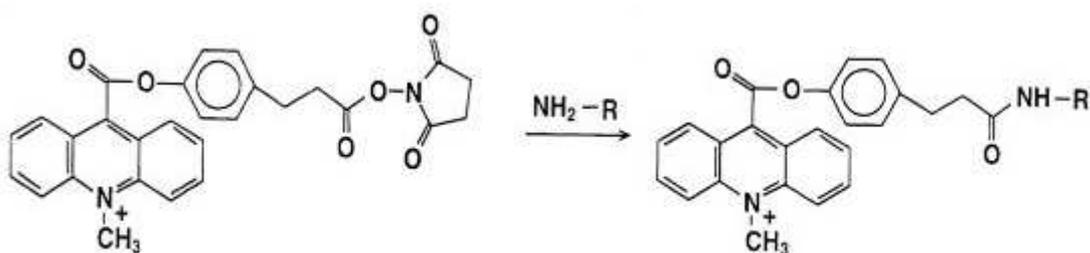


Figura 10 - Reação de ligação do éster de acridina com grupos amino
Fonte: García-Campaña *et al.*, 2003.

O uso do sistema biotina-estreptavidina em imunoenaios resulta em uma amplificação do sinal e melhoria da sensibilidade, às vezes, até próximo à 100 vezes comparado ao método convencional. Então, seu uso tem se tornado indispensável à biociência moderna (SCORILAS *et al.*, 2005). Por isso, alguns ésteres de acridina biotinilados (figura 11) têm sido sintetizados e testados em imunoenaios (AGIAMARNIOTI *et al.*, 2004; SCORILAS *et al.*, 2005; LIN *et al.*, 2008). Esses derivados são moléculas bifuncionais de ligação sem nenhuma técnica necessária para conjugação com anticorpos, além de apresentar bom rendimento químico e reprodutibilidade nas mensurações quimiluminescentes (AGIAMARNIOTI *et al.*, 2004).

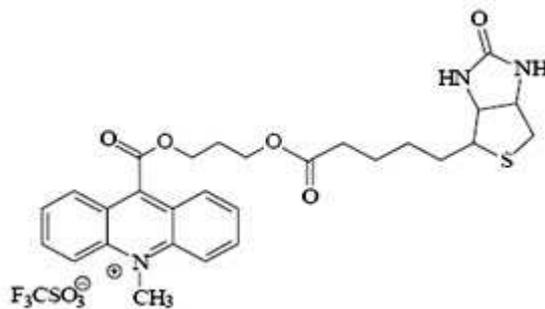


Figura 11 - Éster de acridina biotilado
Fonte: Scorilas *et al.*, 2005.

Além dos ésteres de acridina biotilados, outros exemplos de derivados de acridina sintetizados para ligantes específicos incluem ésteres de acridina-9-carboxiamida modificados com proteína ligadora de folato-ácido fólico (ADAMCZYK *et al.*, 2004a), fator intrínseco-vitamina B12 (ADAMCZYK *et al.*, 2004b) e glicoproteína-boronato (ADAMCZYK *et al.*, 2006).

Visto que os ésteres de acridina contendo ésteres NHS são capazes de se ligar a aminas primárias de qualquer proteína, não só de anticorpos, Campos e colaboradores (2006) conjugaram o DMAE-NHS à uma classe de proteínas denominadas lectinas que são utilizadas em histoquímica de tecidos neoplásicos para identificação do padrão de expressão tecidual de carboidratos. O conjugado obtido mostrou-se uma ferramenta potencial para diferenciação entre tecidos mamários normais daqueles com carcinoma ductal infiltrante.

Nessa perspectiva, o grupo de Imobilização de Biomoléculas (IMOBIO) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) em conjunto com o Departamento de Antibióticos, tem trabalhado na tentativa de desenvolver uma sonda biológica luminescente através da conjugação de lectinas com derivados de acridina por eles sintetizados. Uma hipótese recentemente testada foi o derivado de acridina LPSF/IP-29 (3-Acridino-2-ciano-etilester ácido acrílico) conjugado com a lectina *Concanavalina A* (Con A), o produto obtido mostrou-se fortemente fotoluminescente, mas pouco quimiluminescente (figura 12) (JÁCOME-JÚNIOR 2010).

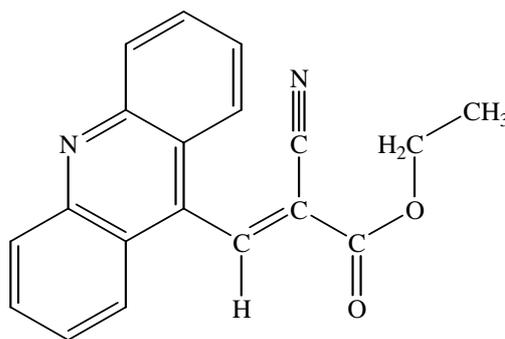


Figura 12 – LPSF/IP-29 (3-Acridino-2-ciano-éster de ácido acrílico) ISÔMERO E
Fonte: Jácome-Júnior, 2010.

2.4 Lectinas – Ferramentas biotecnológicas em histoquímica

O termo lectina é usado para designar proteínas ou glicoproteínas que reconhecem e se associam de forma reversível, com alta afinidade e especificidade a carboidratos, sem, contudo, promover modificações químicas na estrutura covalente dos mesmos e sem apresentar atividade enzimática (LORIS *et al.*, 1998; PEUMANS, VANDAMME, 1996; SHARON, 2007). Com relação à especificidade de reconhecimento de carboidratos, as lectinas são agrupadas nos seguintes grupos: fucose, manose, ácido siálico, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina-galactose e grupo glicanos complexos (PEUMANS; VAN DAMME, 1996).

Lectinas são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas (MACEDO *et al.*, 2007), microorganismos e animais (MOURA *et al.*, 2006; HAVT *et al.*, 2005), sua ampla ocorrência em diferentes espécies, tecidos ou células, mostra a importância dessas moléculas na natureza (ELGAVISH, SHAANAN, 1997; RÜDIGER, GABIUS, 2001).

De todas as lectinas de plantas estudadas até hoje, Concanavalina A (Con A), a lectina de *Canavalia ensiformes* (feijão de porco) é o membro mais conhecido das lectinas de leguminosas por causa de suas numerosas aplicações biológicas. Con A é uma lectina glicose/manose-específica, e sua estrutura quaternária depende do pH, onde a proteína é tetramérica acima de pH 7,0 com cada monômero (PM=26,000 aproximadamente) apresentando um sítio de ligação à carboidrato, e dimérica abaixo de pH 5,0. O dímero formado em pH baixo é o dímero canônico, e em pH neutro ou superior dois dímeros se associam formando o tetrâmero (SINHA *et al.*, 2005) como observado na figura 13.

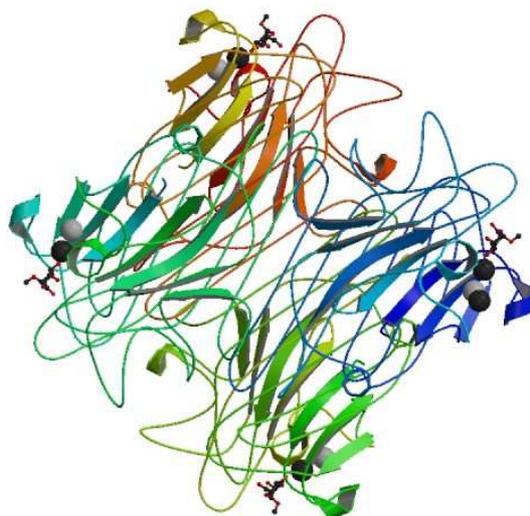


Figura 13 - Estrutura refinada de Concanavalina A complexada com α -metil-D-manopiranosídeo
Fonte: <http://www.pdb.org/pdb/explore/images>)

Mesmo sendo muito abundantes na natureza, as lectinas começaram a ser exploradas como ferramentas em Glicobiologia somente quando a comunidade científica se deu conta que os oligossacarídeos compreendem um sistema extraordinário de armazenagem de informação de alta densidade (GABIUS *et al.*, 2002; OPPENHEIMER, 2008). Desde então, diversos aspectos das lectinas para posteriores aplicações têm sido amplamente estudados, como por exemplo, aplicação como sondas para identificação de alteração na glicosilação em tecidos humanos ou animais (PETROSSIAN *et al.*, 2007; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2004).

A superfície celular consiste de proteínas, lipídeos e carboidratos. Os carboidratos de glicoproteínas e glicolipídeos geralmente atravessam a superfície celular, estando, portanto envolvidos nas interações com outras células e substratos. Deste modo, carboidratos desempenham um papel chave nas interações celulares (OPPENHEIMER, 2006). As modificações em expressões de carboidratos na superfície celular em diferentes situações, como no câncer, podem ser examinadas por meio do emprego de lectinas por meio da avaliação de biomarcadores teciduais, que nesse caso são os carboidratos (BELTRÃO, 1998; 2003).

Desse modo, alguns tumores contêm carboidratos como antígenos associados à superfície celular. Estes antígenos foram usados em testes para produção de vacinas contra câncer, mas apenas respostas imunes fracas foram induzidas. Porém, quando estes antígenos foram conjugados com carreadores, exemplo lectinas, uma maior

resposta imune foi induzida (OPPENHEIMER, 2008). Dessa forma, as lectinas podem ser utilizadas como ferramenta para a produção dos chamados medicamentos inteligentes como o exemplo da figura 14 a seguir, que diferem dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais provocados pela quimioterapia atualmente empregada (GHAZARIAN; IDONI; OPPENHEIMER, 2010). Mas, por enquanto, agentes anti-câncer ligados à lectinas não estão sendo utilizados clinicamente (PETROSSIAN *et al.*, 2007), pois como algumas lectinas são mitogênicas, não se sabe ainda exatamente seu comportamento frente às células (MACIEL *et al.*, 2004).

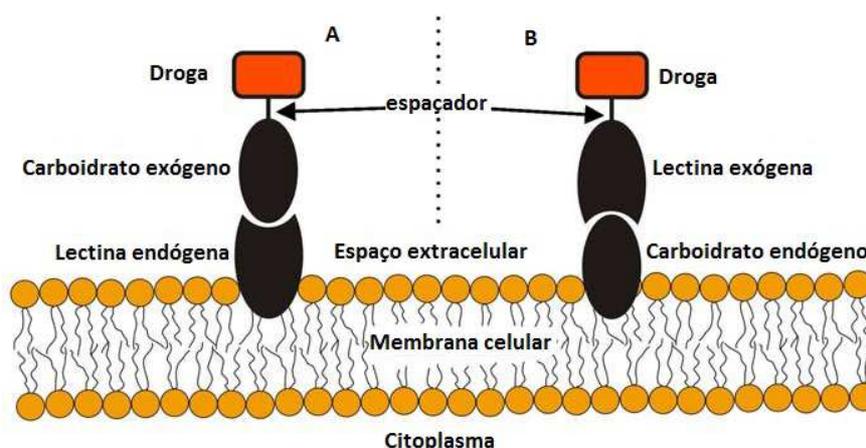


Figura 14 - Ilustração esquemática de lectinas como alvos farmacêuticos diretos (A) e como sondas de reconhecimento de carboidratos endógenos (B). (Fonte: Ghazarian *et al.*, 2010).

Na histoquímica, as lectinas são utilizadas como sondas para análise do padrão de marcação e subseqüente determinação da expressão tecidual dos carboidratos específicos para as lectinas utilizadas. As lectinas têm sido testadas como sondas para auxílio em diagnósticos patológicos de tumores e distúrbios metabólicos, isto porque não existe um critério absoluto, dentro da patologia, permitindo o reconhecimento de moléculas malignas sem que haja a marcação de células normais. Porém, o emprego dessas proteínas nessa técnica depende de sua conjugação com reveladores que permitam a identificação da marcação existente (BELTRÃO, 1998; BELTRÃO, 2003; LIMA *et al.* 2010).

No grupo de estudo denominado Biomarcadores no Câncer (BmC) da Universidade Federal de Pernambuco, já foram realizados estudos que empregaram a técnica histoquímica com lectina em tumores de próstata (LIMA *et al.*, 2010; ARAÚJO-FILHO *et al.*, 2006), estroma de tecidos neoplásicos (RÊGO *et al.*, 2010), investigações

do cólon (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2004); em tumores meningoteliais (BELTRÃO *et al.*, 2003); em pele (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006); no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose mansônica (GUIMARÃES *et al.*, 2008), mucosa gástrica (MELO-JÚNIOR *et al.*, 2008) além de tumores benignos e malignos de mama (BELTRÃO *et al.*, 1998; CAMPOS *et al.*, 2006)

No entanto, para visualização da ligação entre lectina-carboidrato na técnica de histoquímica faz-se necessário a ligação das lectinas empregadas a sistemas de revelação como a enzima peroxidase, com ou sem o sistema de amplificação avidina-biotina, (ARENAS *et al.*, 1999; MELO-JÚNIOR *et al.*, 2006; BANERJEE *et al.*, 1995; BROOKS, WILKINSON, 2003; COBO *et al.*, 2004), além de substâncias fluorescentes como o CdS-Cd(OH)₂ *core shell quantum dots* (SANTOS *et al.*, 2006), criptatos de lantanídeos (NOVA *et al.*, 2004) ou quimiluminescentes como o éster de acridina (CAMPOS *et al.*, 2006).

A vantagem deste último revelador, para a ligação lectina-carboidrato, consiste na quantificação da expressão dos carboidratos, pois a quimiluminescência é dada em Unidades Relativas de Luz (RLU), com eliminação da subjetividade do olhar do analisador existente nas outras formas de identificação. Nesse sentido a introdução da quimiluminescência na histoquímica por meio de sondas específicas, como as lectinas, pode melhorar a sensibilidade e exatidão na verificação de diferenças existentes entre tecidos analisados (BELTRÃO, 1998), além de indicar uma nova área de aplicação para a quimiluminescência, visto que até então ela tem sido utilizada na rotina clínica de análise somente para detecção de analitos em solução (KRICKA, 2003).

Vale salientar que qualquer revelador luminescente, seja ele quimiluminescente ou fotoluminescente, apresenta vantagens sobre as revelações enzimáticas na histoquímica em tecidos com câncer, pois estas metodologias geralmente utilizam peróxido de hidrogênio na fase de reação para o surgimento da coloração. Recentemente, estudos mostram que tecidos com câncer apresentam níveis elevados de peróxido de hidrogênio devido alterações no metabolismo das células transformadas (LÓPEZ-LÁZARO, 2010; HEIDEN *et al.*, 2009) o que pode aumentar falsamente a marcação por esse tipo de metodologia.

Dessa forma, o surgimento de novos reveladores que não se fundamentam nesse princípio é de grande valia para essa área de estudo. Assim, os derivados de acridina luminescentes mostram-se reveladores potenciais para aplicação na técnica em questão. Por isso, este trabalho destina-se a avaliar as características luminescentes de um

derivado de acridina produzido no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE, com subsequente aplicação em metodologias utilizadas pelos grupos de Imobilização de Biomoléculas (IMOBIO) e Biomarcadores no Câncer (BmC), também da mesma Universidade.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Sintetizar o Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato (LPSF/IP-81) e caracterizar parcialmente suas propriedades luminescentes, seu conjugado com a lectina Concanavalina A (Con A) e aplicar o conjugado em histoquímica com lectinas.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar o Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato (LPSF/IP-81) e avaliar sua estrutura molecular por meio de cristalografia de Raios-X, Espectroscopias de Massa (EM), infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN de Hidrogênio);
- Avaliar as propriedades espectroscópicas e luminescentes do LPSF/IP-81 bem como calcular seu rendimento quântico de emissão;
- Conjugar o LPSF/IP-81 à Con A e caracterizar o conjugado resultante por métodos cromatográficos, espectroscopia de luminescência, dicroísmo circular e atividade hemaglutinante;
- Empregar Con A-IP-81 em histoquímica com lectinas de tecidos humanos de pele (ceratoacantoma, CBC, CEC e ceratose actínica) e mama (fibroadenoma) como potencial sonda molecular histoquímica luminescente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Equipamentos

A determinação do ponto de fusão foi realizada num aparelho Quimis Modelo 340.27. Na Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel 60 (Merck, USA), de 0,25 mm de espessura, analisadas em luz UV (254 ou 366 nm). Os espectros de IV foram realizados em pastilha de KBr em espectrofotômetro FTIR Modelo IFS (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) foram efetuados em espectrofotômetros Varian Modelo Plus de 200 MHz e de 300MHz. Os espectros de massa foram registrados em espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). A microscopia de fluorescência foi realizada em microscópio Leica (USA).

4.2 Reagentes

A lectina Con A e o Sephadex G-25 foram obtidos da Sigma. Todos os reagentes utilizados para síntese ou solubilização do LPSF/IP-81 foram de grau analítico provenientes das marcas Acros Organics, Sigma/Aldrich, Merck e Vetec.

4.3 Síntese e caracterização do Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato (LPSF/IP-81)

O LPSF/IP-81 foi sintetizado no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). A síntese do LPSF/IP-81 foi feita partindo-se de 0,5 g de acridina-9-carboxialdeído (LPSF/AC-2) (P.M.=207) e 0,275 mL de dimetilmalonato (M.M. 132,12, d=1,156), em meio benzênico (10 mL) e morfolina como catalisador (0,2125 mL), todos em concentrações equimolares. Os reagentes necessários à síntese foram colocados em balão sob agitação em condensador à 110°C com *deanstarck* acoplado. Todas as etapas foram acompanhadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) com o sistema *n*-hexano/acetato de etila (7:3). A reação foi retirada após 24 horas, o

solvente foi evaporado e o balão armazenado a -20°C . Em seguida, o LPSF/IP-81 foi purificado por cromatografia tipo “flash” (sob pressão) em sílica gel 60 Merck, iniciando com o *n*-hexano como solvente, depois com *n*-hexano/acetato de etila (9,5:0,5) e, por fim, com a proporção 9:1 dos mesmos solventes. A rota sintética do LPSF/IP-81 está descrita na figura 15. Para confirmação da estrutura química proposta, o LPSF/IP-81 foi avaliado por meio de técnicas como: Cristalografia, absorção no infravermelho (IV) e espectrometria de massa (EM). Além disso, foram determinadas as propriedades físico-químicas, como dos pontos de fusão, rendimentos e razões de frente (RF), luminescência e a capacidade de se ligar covalentemente à proteína em análise (lectina).

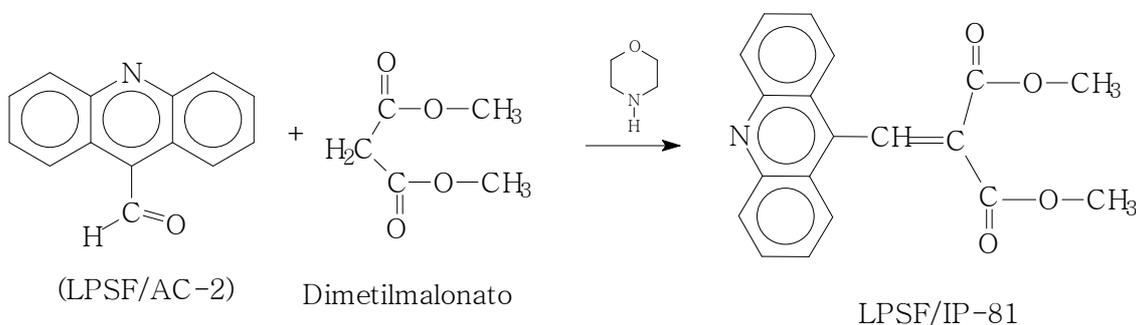


Figura 15 - Esquema da síntese do LPSF/IP-81. A mistura reacional é mantida durante 24 h à 110°C até a formação do produto desejado.

4.4 Propriedades luminescentes do LPSF/IP-81

4.4.1 Espectroscopia de Absorção

Depois de sintetizado, o LPSF/IP-81 foi solubilizado em diferentes solventes (DMF, DMSO, acetonitrila e metanol) em concentração de $1,55 \times 10^{-5}\text{ M}$ e/ou $3,1 \times 10^{-5}\text{ M}$. Estas soluções tiveram suas propriedades de absorção ultravioleta-visível (UV-Vis) avaliadas num espectrofotômetro *Ultraspec 3000 PRO* por varredura de 200-900nm, usando cubeta de quartzo com 1 cm de espessura. A partir dos valores de absorção determinou-se o coeficiente de extinção molar do LPSF/IP-81, por meio da seguinte fórmula:

$$A = \epsilon l C \quad (1)$$

Os máximos de absorção foram utilizados como comprimentos de onda para verificação inicial das emissões na espectroscopia de luminescência.

4.4.2 Espectroscopia de fluorescência do LPSF/IP-81

As medidas de fluorescência foram feitas em espectrofluorímetro JASCO FP-6300, utilizando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Foram obtidos os espectros de emissão por meio de fixação do comprimento de onda de excitação, que inicialmente foi o máximo obtido na espectroscopia de absorção. Posteriormente, a obtenção dos espectros de excitação deu-se por fixação da emissão e varredura por faixa selecionada para verificar a excitação. Avaliou-se modificação do perfil emissivo de acordo com solventes utilizados e concentração das soluções produzidas. Foram avaliadas soluções em acetonitrila, metanol, DMF e DMSO, diluídas ou não em PBS e em concentrações entre $1,55 \times 10^{-5}$ M e $3,1 \times 10^{-5}$ M. Para avaliar em qual faixa a emissão era linear, foi plotada uma curva padrão em diferentes concentrações do LPSF/IP-81.

O FITC foi utilizado como padrão nos testes realizados.

4.4.3 Rendimento quântico do LPSF/IP-81

O rendimento quântico luminescente foi avaliado de acordo com Demas e Crosby, 1971, utilizando a seguinte equação:

$$\Phi_x = \Phi_{réf} \left(\frac{I_x}{I_{réf}} \right) \left(\frac{A_{réf}(\lambda_{réf})}{A_x(\lambda_x)} \right) \left(\frac{I^{exc}(\lambda_{réf})}{I^{exc}(\lambda_x)} \right) \left(\frac{n_x^2}{n_{réf}^2} \right) \quad (2)$$

Onde ref. é composto padrão e x será o LPSF/IP-81. I é a integrada do espectro de emissão corrigido, $A(\lambda)$ é a absorvância da solução utilizada no mesmo λ_{exc} . $I^{exc}(\lambda)$ é a intensidade da luminescência de excitação em λ_{exc} . n^2 é o índice de refração e $\Phi_{réf}$ é o rendimento quântico do padrão. O sulfato de quinina foi utilizado como padrão para o rendimento quântico fotoluminescente.

4.4.4 Avaliação da quimiluminescência

Para avaliação da emissão de luz por meio da excitação em reação química, solução do LPSF/IP-81 em acetonitrila, DMF ou DMSO, foi exposta a dois reagentes, sendo eles: reagente ácido composto por 0,5% de peróxido de hidrogênio e ácido nítrico

0,1N; e o reagente básico que contém hidróxido de sódio 0,25N e surfactante em luminômetro modelo *Modulus*. São usadas quantidades iguais das três soluções.

4.5 Conjugação do LPSF/IP-81 com a lectina Con A

A Con A é uma proteína tetramérica de 102.332 u.m.a. composta de 948 resíduos de aminoácidos, sendo que 148 desses resíduos apresentam cadeias laterais terminadas em grupamentos amins ou amidas, sendo eles: asparagina, glutamina, lisinas e argininas. Assim, estes resíduos são passíveis de ligação aos grupos ésteres presentes no LPSF/IP-81.

Dessa forma, o LPSF/IP-81 foi submetido ao processo de conjugação conforme descrito por Weeks e colaboradores (1983). No entanto, avaliou-se a influência das condições de conjugação por meio de planejamento fatorial na resposta final (tabela 2). Uma solução de Con A, nas concentrações especificadas na tabela 2, foi incubada com uma solução do LPSF/IP-81 pelos tempos e temperaturas indicados em cada ensaio. O conjugado Con A-IP-81 foi separado do LPSF/IP-81 não ligado por cromatografia de exclusão de tamanho, com Sephadex G-25, por meio de eluição com tampão fosfato de sódio (PBS) pH 7,2 contendo NaCl 150mM. Foram coletadas 70 alíquotas de 1 mL, num fluxo de 1mL/min. Todas as alíquotas tiveram o conteúdo protéico (280 nm) e luminescência (quimiluminescência e fotoluminescência) avaliados.

Tabela 2 - Planejamento fatorial para avaliação da influência da variação dos fatores na resposta final (FL e AH- Atividade Hemaglutinante)

Standard Run	Design: 2**(4-1) design (Spreadsheet3 in sinara)					
	[Ester] (%)	Proteína (mg/ml)	Tempo de conjugacao (h)	Temperatura (°C)	FL	AH
1	0,05	2,00	1	4		
2	0,10	2,00	1	25		
3	0,05	4,00	1	25		
4	0,10	4,00	1	4		
5	0,05	2,00	5	25		
6	0,10	2,00	5	4		
7	0,05	4,00	5	4		
8	0,10	4,00	5	25		

Depois de definir as melhores condições de conjugação, ainda desenvolveu-se as conjugações em duas situações adicionais: com o bloqueio do sítio de reconhecimento a carboidrato da lectina com solução de 300mM de α -metil-D-manopiranosídeo e sem o

bloqueio, antes da conjugação. Desta forma, se identificou possíveis alterações destes sítios durante a conjugação e assim, concluir a respeito de quaisquer alterações estruturais e manutenção de sua atividade biológica.

Para avaliação da ligação entre LPSF/IP-81 e lectina, os conjugados obtidos foram analisados por cromatografia de exclusão de tamanho (Sephadex G-25), espectroscopia de IV e MALDI-TOF.

4.5.1 Espectrometria de massa e IV do conjugado

Para verificar mudanças na massa da proteína submetida à conjugação, por conta da incorporação do LPSF/IP-81, lectina Con A e conjugado Con A-IP-81 foram analisados por MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*). Após conjugação Con A-IP-81 foi transferido para tubos AMICON 15-mL (cutoff MW 10,000) e diluído com 10mL de água deionizada. O volume foi reduzido para aproximadamente 0,5 mL por centrifugação à 4.500g por 10 minutos. As soluções concentradas dos conjugados foram diluídas com 10 mL de água deionizada e centrifugadas novamente para reduzir o volume. Esse processo foi repetido por um total de 4 vezes. Finalmente, os conjugados concentrados foram analisados por espectrometria de massa MALDI-TOF. A matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). Concentração final: ACN 50%, TFA 0,3%. A aquisição foi feita em modo linear positivo, com voltagem de aceleração de 20 kV, “*Pulsed ion extraction time*” (“*extraction delay time*”): 150 ns, e faixa de detecção: 12000 – 110000 (m/z). A calibração foi externa, utilizando mistura padrão de proteínas (Bruker). Alíquotas dos mesmos conjugados foram analisados por espectroscopia de IV.

4.6 Caracterização do conjugado Con A-IP81

4.6.1 Análises cromatográficas

Todas as cromatografias de exclusão foram realizadas em Sephadex G-25 a eluição foi realizada como descrita anteriormente.

Foram determinados os tempos de retenção tanto da Con A (500 μ L, concentração 4 mg/mL) quanto do LPSF/IP-81 (15 μ L de solução 0,1% em 500 μ L de tampão PBS) isolados, com propósitos de comparação dos perfis de ambos eluídos sozinhos com aquele obtido a partir do conjugado. Todas as cromatografias seguiram o mesmo protocolo descrito anteriormente (cromatografia de exclusão de tamanho em Sephadex G-25, fluxo 1mL/min).

4.6.2 Atividade hemaglutinante (AH)

Para esse teste, foram utilizadas suspensões 2,5% v/v de hemácias de coelho glutarizadas segundo Coelho *et al.*, 1995. A avaliação da atividade hemaglutinante foi realizada em placas de microtitulação (8 x 12 poços), onde foram colocados 50 μ L de NaCl 0,15 M em cada poço de uma fileira. Adicionou-se 50 μ L da solução de lectina a partir do segundo poço (o primeiro é o controle negativo) e se fez uma diluição seriada. A cada poço foi adicionado 50 μ L da suspensão de hemácias e se incubou por 45 minutos em repouso a 25° C. Todos os conjugados foram avaliados quanto a sua atividade hemaglutinante.

4.6.3 Medidas de fluorescência e Dicroísmo Circular

Os espectros de fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano da Con A isolada e conjugados Con A-IP-81 e Con A-FITC foram realizados para verificar a integridade estrutural da proteína após conjugação. As análises foram realizadas em espectrofluorímetro JASCO FP-63000 usando cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. O comprimento de onda para a excitação dos triptofanos foi de 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 305 a 450 nm. Quando necessário foi calculado o centro de massa do triptofano a partir da seguinte fórmula:

$$\nu = \frac{\sum \nu_i F_i}{\sum F_i} \quad (3)$$

onde F_i é a emissão fluorescente no comprimento de onda ν_i .

A técnica de Dicroísmo Circular (CD), baseada no desvio da luz circularmente polarizada incidente em compostos assimétricos, o carbono alfa da ligação peptídica neste caso, indica o perfil dos espectros emitidos pode ser associado às transições eletrônicas do carbono em diferentes vizinhanças assimétricas, refletindo a estrutura

secundária da proteína permitindo, com a utilização de programas quantificar alfa hélices, folhas e voltas beta, *random* e estruturas desordenadas (KELLY *et al.*, 2005).

Medidas de dicroísmo circular foram realizadas em Espectropolarímetro J-815 (Jasco Corporation, Tokyo, Japan) na região do UV-distante (195 a 240 nm) como a média de 16 aquisições, à 20°C, em cubeta de quartzo (com caminho óptico de 10 mm). As soluções analisadas continham de 1-6 µM de Con A em tampão PBS 100 mM, sendo as seguintes amostras analisadas: Con A isolada como padrão, Con A conjugada sem e com inibição prévia do sítio de reconhecimento a carboidrato, além do conjugado submetido ao processo de diálise pós-conjugação para remoção dos carboidratos inibidores. Além destas condições, as amostras resultantes do planejamento fatorial foram também analisadas por dicroísmo, para confirmar os resultados da AH e decidir quais as melhores condições de conjugação para os próximos experimentos.

4.6.4 Teste de estabilidade do conjugado Con A-IP81

Para análise da estabilidade dos conjugados produzidos (Con A-IP81), os conjugados em tampão PBS pH 7,2 foram armazenados em tubos de vidro âmbar e mantidos à -20° C e 4° C. Ambas as soluções tiveram suas AH, luminescência dos triptofanos e fluorescência verificadas após a conjugação (tempo zero) e depois de 1, 2, 3 e 4 semanas de armazenamento. O volume guardado para ambas as temperaturas foi de 2 mL e concentração protéica de aproximadamente 10 µM.

4.7 Aplicação dos conjugados produzidos

4.7.1 Amostras de tecidos para histoquímica com lectinas

Para avaliação do potencial quimiluminescente do conjugado produzido, foram selecionados biópsias de pele diagnosticados como ceratose (n=7), carcinoma basocelular (n=22), carcinoma epidermóide (n=12) e ceratoacantoma (n=6) provenientes do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, além dos fragmentos de pele normal (n=6).

Para os testes em microscopia de fluorescência, foram utilizados tecidos transformados de mama (fibroadenoma e carcinoma ductal invasivo) e pele

(ceratoacantoma e carcinoma basocelular) todos com n=2, para fins avaliativos de aplicabilidade do conjugado produzido. As amostras de mama foram dos arquivos do Setor de Patologia do LIKA da UFPE.

4.7.2 Histoquímica com Lectinas

As biópsias selecionadas foram cortadas (8 μm para quimiluminescência e 4 μm para microscopia), desparafinizadas, hidratadas em graus decrescentes de concentração de álcool (3 x 100%, v/v, e 1 x 70%, v/v) e incubadas com o conjugado Con A-IP-81 (100 μL de solução 100 $\mu\text{g/mL}$) por 2 h à 4° C, com posterior lavagem com tampão PBS. Os tecidos foram cortados com área de 0,5 cm^2 e os cortes obtidos foram transferidos para tubos tipo *ependorf* contendo 50 μL de tampão PBS. Em seguida os tecidos foram incubados com reagentes para reação quimiluminescente como descrito na seção 4.4.4, e medição da luz emitida em Unidades Relativas de Luz (RLU). Os cortes de tecidos para análise por microscopia de fluorescência não sofreram este processo de corte (áreas de 0,5 cm^2), mas uma etapa adicional de tratamento com solução de Azul de Evans (5mg% - 20 min) antes da incubação com o conjugado, para inibir a autofluorescência tecidual. Os controles foram constituídos de amostras dos tecidos não transformados e de amostras previamente incubadas com o carboidrato específico da Con A (metil- α -D-manopiranosídeo).

Na microscopia de fluorescência três situações adicionais foram avaliadas para confirmar a marcação do tecido via conjugado Con A-IP-81: os tecidos foram incubados com (1) conjugados Con A-IP-81 pós separação em coluna de exclusão molecular sem nenhuma lavagem em tubos AMICON; (2) conjugados Con A-IP-81 lavados quatro vezes após o processo de separação cromatográfico em tubos AMICON; e (3) conjugado previamente inibido com metil- α -D-manopiranosídeo. O controle positivo foi o conjugado Con A-FITC (100 μL de solução 50 $\mu\text{g/mL}$). Todos os testes seguiram o protocolo anteriormente descrito.

4.8 Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados utilizando os Softwares SigmaPlot, Excel, Origin 8.0 e Statistica para a análise estatística dos dados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização química do Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato (LPSF/IP-81)

O LPSF/IP-81 foi sintetizado após 24 h do início da reação através de confirmação por CCD. O rendimento da reação foi de 10 mg, 33,4%. O mecanismo reacional da formação do LPSF/IP-81 está descrito na figura 16.

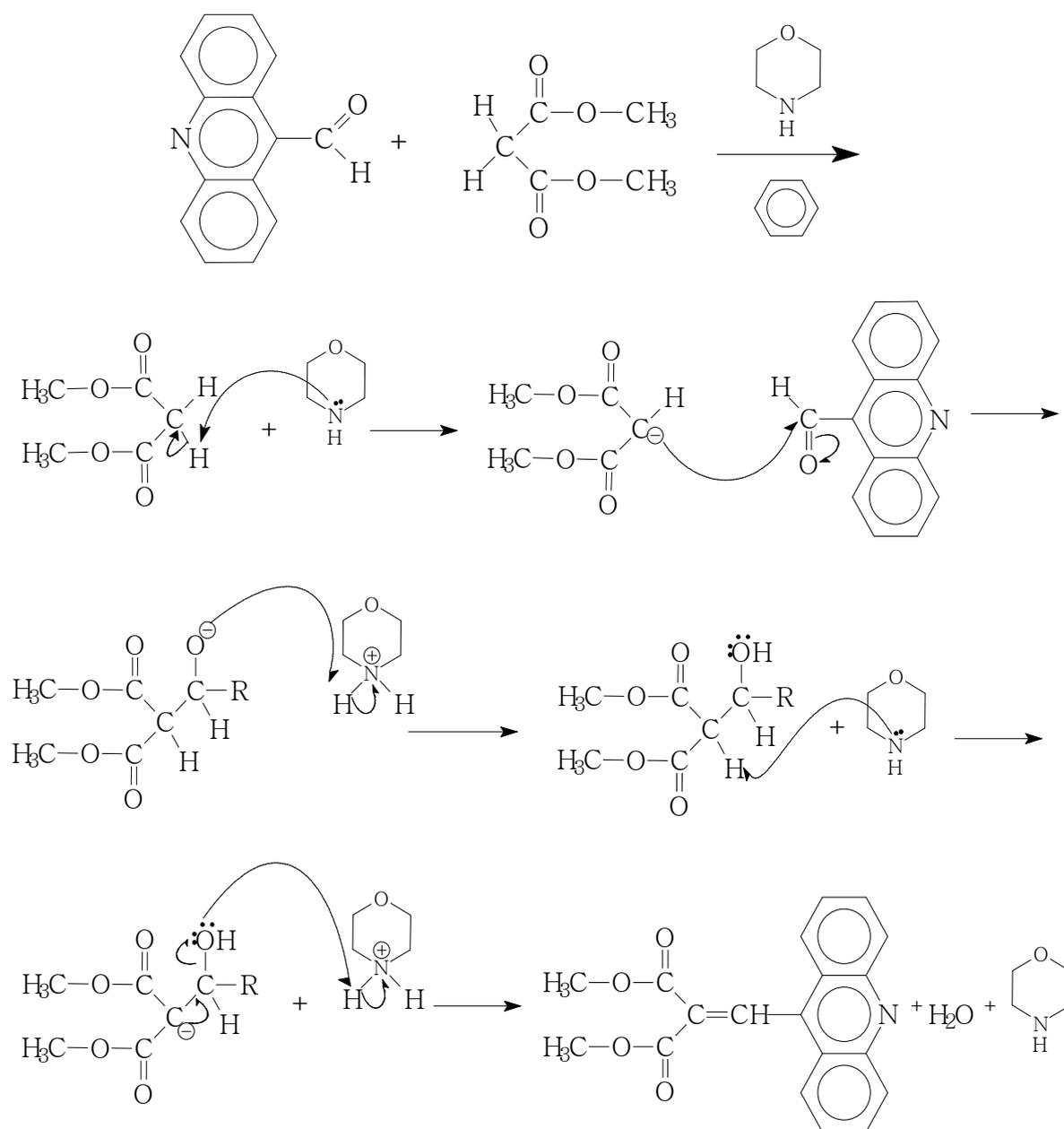


Figura 16 - Mecanismo reacional de formação do LPSF/IP-81.

Após coluna tipo “flash” em sílica para separar o LPSF/IP-81 de impurezas e evaporação dos solventes utilizados na eluição, houve formação de cristais amarelos (figura 17).



Figura 17 - Cristais do LPSF/IP-81.

Fórmula química: $C_{19}H_{15}NO_4$.

C 72,02%; H 4,71%; N 4,36%; O 19,92%

Massa molecular calculada: 321,1 g/Mol.

O ponto de fusão: 132-134 °C.

Razão de frente: 0,43 (*n*-hexano/acetato de etila 7:3)

O espectro de IV (figura 18) mostra a presença de bandas características dos grupos funcionais presentes no LPSF/IP-81: 1.737 (carboxila), 2.918 (CH_3), 754 (deformação C-H fora do plano do anel aromático monossustituído), o que confirma sua estrutura proposta.

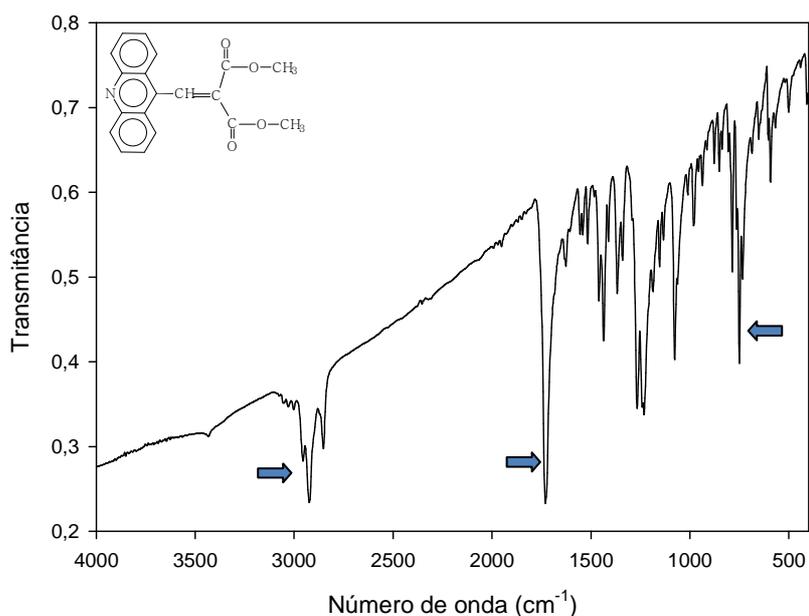


Figura 18 - Espectroscopia IV por modo vibracional do LPSF/IP-81. As setas indicam: 1.737 (carboxila), 2.918 (CH_3), 754 (deformação C-H fora do plano do anel aromático monossustituído)

Na espectrometria de massa (figura 19) os picos obtidos foram da massa do íon molecular mais H^+ = 322,1 e 641 duas vezes a massa do LPSF/IP-81 (dímero) mais H^+ . Tal resultado confirma a massa teórica proposta para o LPSF/IP-81.

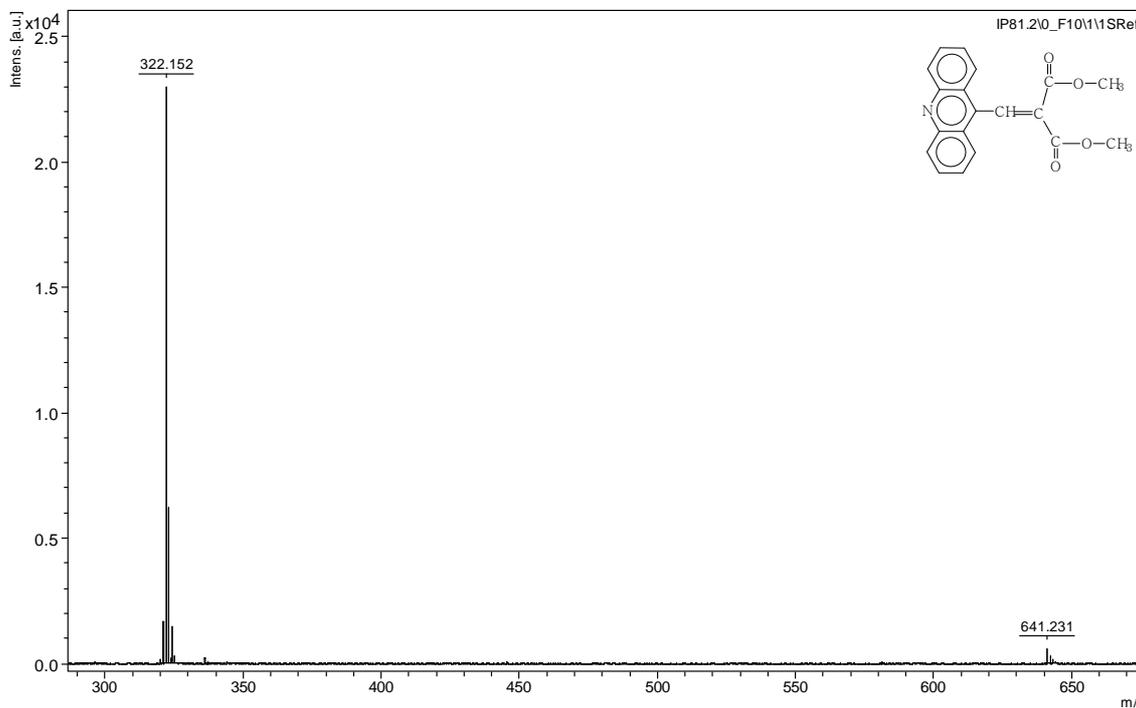


Figura 19 - Espectrometria de massa do LPSF/IP-81. Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). Concentração final: ACN 50%, TFA 0,3%. Aquisição em modo refletido positivo. Voltagem de aceleração: 19 kV. Calibração externa utilizando mistura padrão de peptídeos (Bruker). Faixa de detecção: 0 – 1300 (m/z).

Os resultados da cristalografia confirmaram a estrutura molecular final, conforme verificado na figura 20.

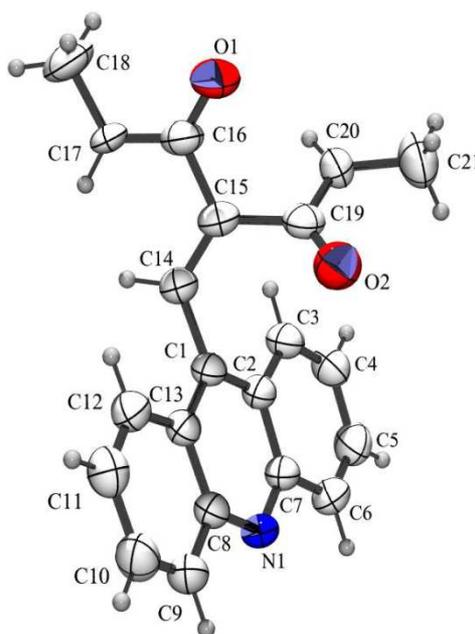


Figura 20 - Projeção ORTEP-3 da molécula LPSF/IP-81

5.2 Propriedades luminescentes do LPSF/IP-81

5.2.1 Espectroscopia de Absorção

Com relação à solubilidade, o LPSF/IP-81 mostrou-se solúvel em DMF, DMSO, acetonitrila e metanol, mas não em água ou PBS. No entanto, depois de devidamente solubilizado nos solventes citados, a solução foi diluída em PBS sem formação de precipitado. Devido à instabilidade que os derivados de acridina apresentam depois de solubilizados, optou-se por utilizar, em todos os testes, soluções preparadas imediatamente antes do início do procedimento para assegurar que não ocorresse nenhuma degradação do LPSF/IP-81 e, conseqüentemente, resultados diferentes por esta razão.

Os resultados para os espectros de absorção do LPSF/IP-81 em DMF, DMSO, acetonitrila e metanol podem ser visualizados na figura 21.

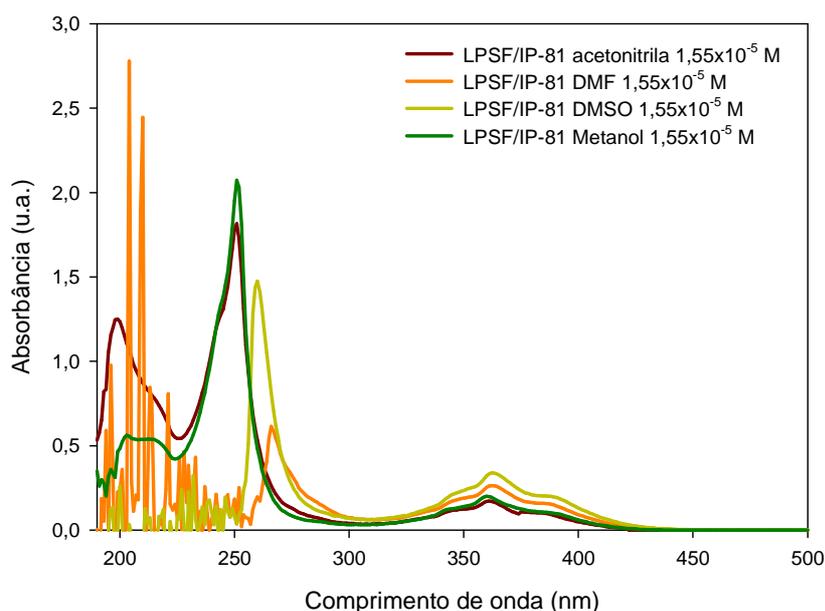


Figura 21 - Espectros de absorção do LPSF/IP-81 em solventes polar e prótico (metanol) e polar apróticos (DMF, DMSO e acetonitrila).

Observou-se que os solventes DMF e DMSO interferem a absorção do composto, enquanto que nas soluções preparadas em metanol e acetonitrila não se observou interferência quanto à absorção do composto. Isso porque acetonitrila e metanol possuem *cutoff* de absorção de <190nm e <205nm, respectivamente, por esta razão, estes foram os solventes de escolha para as análises subsequentes. Além disso,

tanto DMF, DMSO e acetonitrila são solventes polares apróticos, assim, não se espera ter diferenças de absorção do LPSF/IP-81 solubilizado em qualquer um deles. No entanto, a absorção de composto pode variar entre solventes com diferentes características, como acetonitrila e metanol (BOUZYK *et al.*, 2003). Os perfis de absorção do LPSF/IP-81 em acetonitrila e metanol podem ser visualizados na figura 22 abaixo.

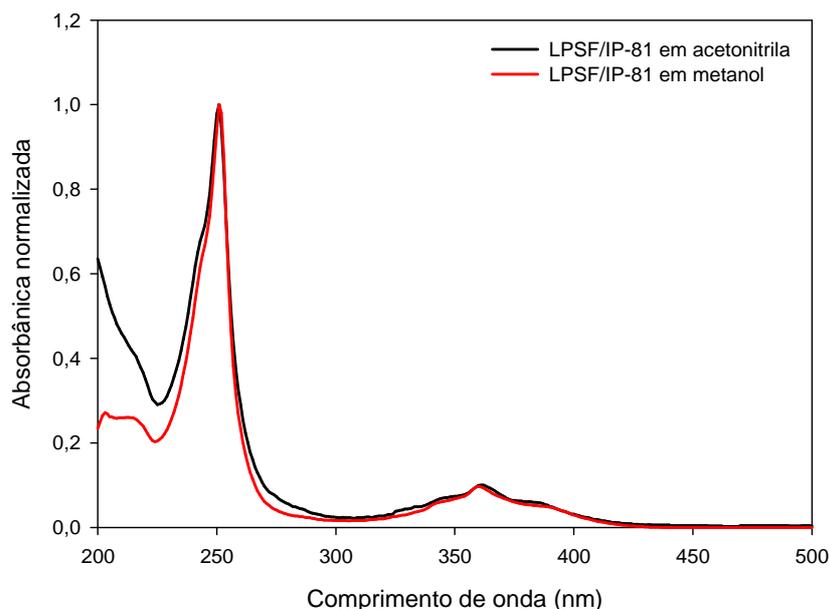


Figura 22 - Espectros de absorção do LPSF/IP-81 em acetonitrila e metanol, ambas as soluções estão em concentração de $3,1 \times 10^{-5}$.

Nos dois solventes escolhidos (metanol e acetonitrila), o LPSF/IP-81 mostrou dois picos principais de absorção, o primeiro por volta de 250-260 nm e o segundo em torno de 360nm. O maior pico de absorção em 250 nm é característico de compostos que possuem o anel acridina (XIAO-JING *et al.*, 2009). O pico de absorção em 360 nm é menor que aquele visto em 250 nm, porém esse comprimento de onda se situa próximo aos comprimentos de onda de excitação e absorção de outros derivados de acridina (KRZYMINSKI *et al.*, 2008; BOUZKY *et al.*, 2003; KRZYMINSKI *et al.*, 2010). Os picos obtidos em cada solução podem ser visualizados na tabela 3.

Tabela 3 - Comprimentos de onda de absorção do LPSF/IP-81 em diferentes solventes

Solvente	λ Absorção 1	λ Absorção 2
Acetonitrila	250	361
Metanol	251	360

O coeficiente de extinção molar do LPSF/IP-81 em 360 foi de $9.838 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A partir destes resultados, decidiu-se utilizar os dois picos de absorção como comprimentos de onda de excitação iniciais na espectroscopia de fluorescência.

5.2.2 Espectroscopia de fluorescência do LPSF/IP-81

Para obtenção dos espectros de emissão foram testados os picos de observados nos espectros de absorção, pois o comprimento de onda de excitação corresponde aproximadamente ao de absorção da amostra (BOUZYK *et al.*, 2003). A partir dos testes iniciais, foram definidos os parâmetros para cada composto e soluções usadas. Estes parâmetros estão descritos na tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados na espectroscopia de fluorescência

Composto	Solvente	λ Excitação (nm)	Varredura (nm)	Banda de Excitação	Banda de Emissão	Resposta	Sensibilidade
LPSF/IP-81	Acetonitrila	360	380-600	5 nm	10 nm	Média	Alta
LPSF/IP-81	DMF	360	380-600	5 nm	5 nm	Média	Alta
LPSF/IP-81	DMSO	360	380-600	5 nm	10 nm	Média	Alta
LPSF/IP-81	Metanol	360	380-600	2,5 nm	5 nm	Média	Alta
FITC	Acetonitrila	495	510-550	5 nm	10 nm	Média	Alta
FITC	Tampão PBS	495	510-550	2,5 nm	2,5 nm	Média	Média
FITC	DMSO	495	510-550	5 nm	5 nm	Média	Alta
FITC							
Con A-IP81	Metanol	495	510-550	2,5 nm	2,5 nm	Média	Alta
	PBS	360	380-600	5 nm	10nm	Média	Alta
Con A-FITC	PBS	495	510-550	5 nm	5 nm	Média	Média

Os espectros de emissão fluorescente do LPSF/IP-81 em acetonitrila, com excitação tanto 250 nm quanto em 360 nm, podem ser observados na figura 23.

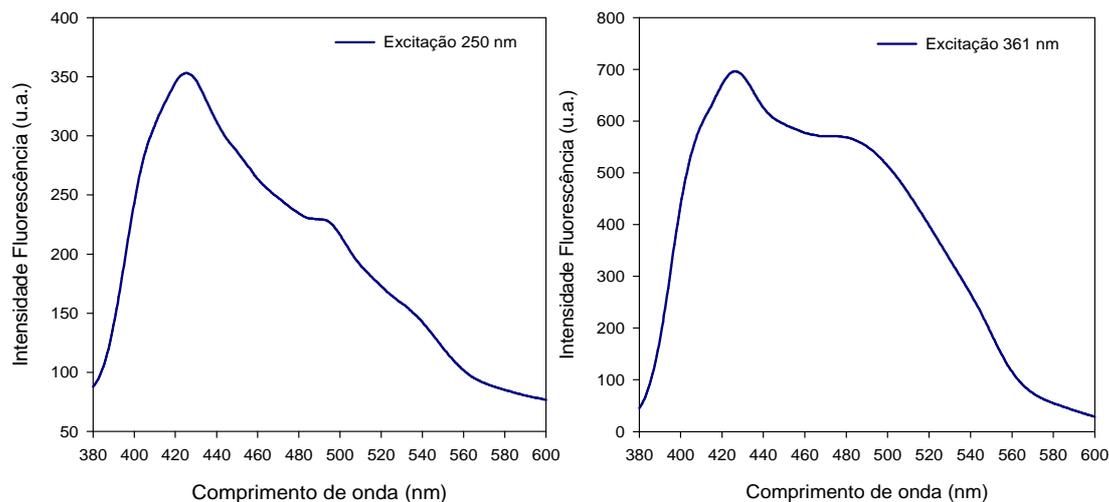


Figura 23 - Espectros de fluorescência do LPSF/IP-81 em acetonitrila ($1,55 \times 10^{-5}$ M) mostrando a diferença de intensidade de acordo com o comprimento de onda excitação, na esquerda quando excitado em 250 nm e na direita, em 361.

Depois da obtenção dos espectros de emissão, para confirmação dos comprimentos de excitação, se avaliou o espectro de excitação do composto nas mesmas condições utilizadas para a emissão. O máximo de emissão do LPSF/IP-81 em acetonitrila foi em 428 nm, assim o espectro de excitação do LPSF/IP-81 com emissão monitorada em 428 nm pode ser verificado na figura 24.

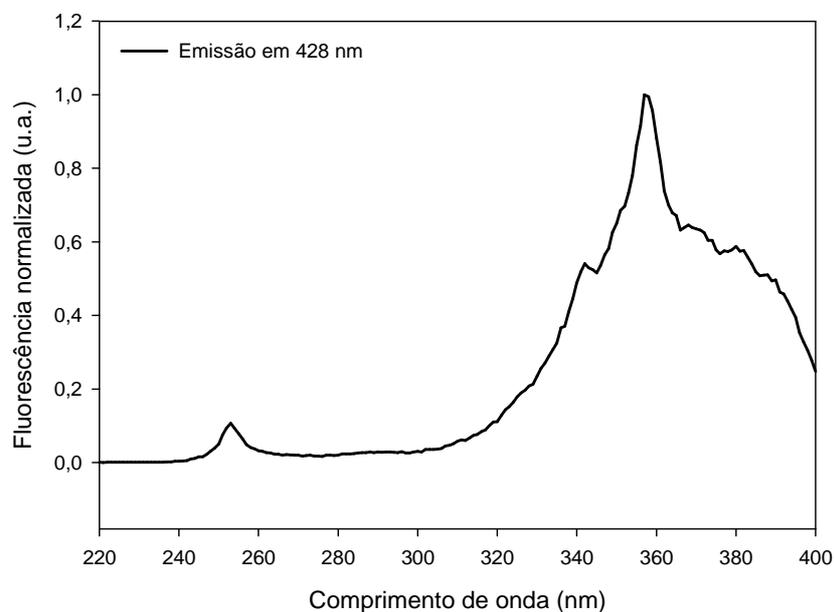


Figura 24 - Espectro de excitação do LPSF/IP-81 em acetonitrila ($1,55 \times 10^{-5}$ M). Emissão em 428 nm.

Como observado na figura 23, em concentrações iguais, o LPSF/IP-81 mostra uma fluorescência cerca de 2 vezes maior quando excitado em 361 nm que em 250 nm.

Esses resultados foram confirmados pelo espectro de excitação da figura 24. Essa diferença de excitabilidade pode ser devido à perda de energia por conversão interna ou colisões com o solvente, além disso, em 250 nm diversas moléculas absorvem podendo haver transferência de energia entre elas.

Dessa forma, a escolha de um comprimento de onda de excitação para propósitos analíticos é, usualmente, feito com base na intensidade fluorescente e isolamento de picos de excitação de substâncias interferentes (LAKOWICZ, 2006). No caso do conjugado produzido (Con A-IP81), a substância interferente será a proteína que possui resíduos de fenilalanina, tirosina e triptofano que são fluorescentes quando excitados próximo à 250 nm, como é o caso da fenilalanina com excitação em 260 nm. Além disso, nessa região, a proteína pode atuar como um supressor (substância que impede emissão) através de um processo de transferência de energia.

Em metanol, o LPSF/IP-81 mostrou o mesmo comportamento visto em acetonitrila. Contudo, a diferença de intensidades foi maior, cerca de 4 vezes, como pode ser observado na figura 25.

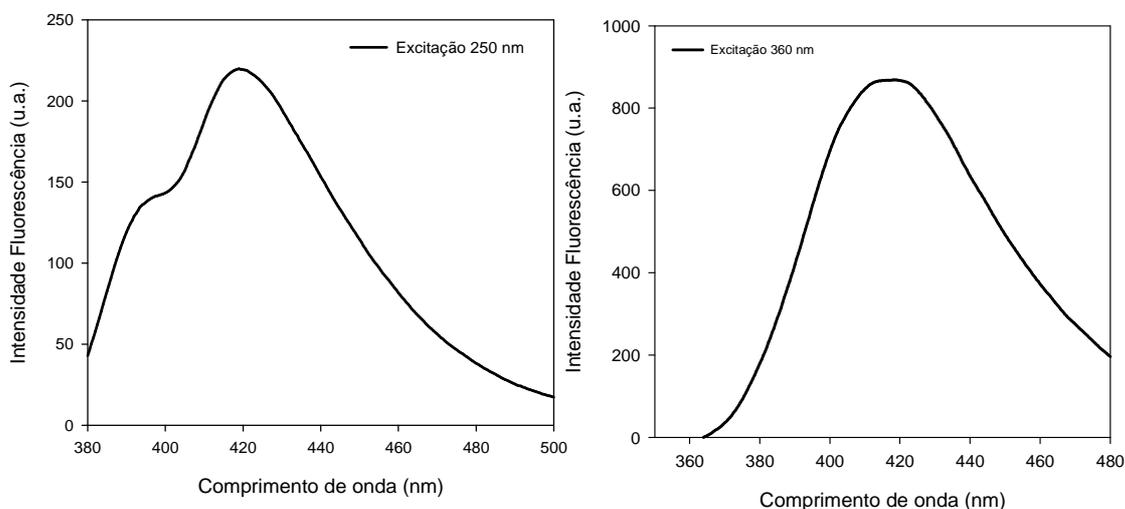


Figura 25 - Espectros de fluorescência do LPSF/IP-81 em metanol ($1,55 \times 10^{-5}$ M) mostrando a diferença de intensidade de acordo com o comprimento de onda excitação, na esquerda quando excitado em 250 nm e na direita, em 361.

Os resultados de emissão do LPSF/IP-81 solubilizado em acetonitrila e posteriormente diluído (1:100) em PBS, concentração final de $1,55 \times 10^{-5}$ M, mostrou resultado similar aqueles vistos anteriormente (figura 26) com relação a diferença de intensidade de acordo com o comprimento de onda de excitação. No entanto, a diferença de intensidade aumentou para 5 vezes quando excitado em 360 nm, além de

haver uma mudança no perfil emissivo (estreitamento do espectro) com um desvio para o vermelho do máximo de emissão de cerca de 10 nm, passando de 428 para 438 nm.

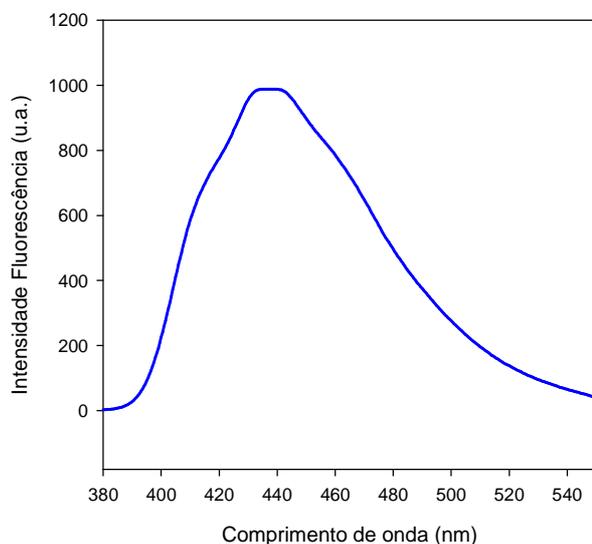


Figura 26 - Espectro de emissão do LPSF/IP-81 diluído em PBS ($1,55 \times 10^{-5}$ M).

A partir desses resultados, o comprimento de onda de excitação em 360 nm foi utilizado como comprimento de onda de escolha para os testes subsequentes. Vale salientar ainda, que o perfil de excitação do LPSF/IP-81 varia de acordo com a concentração como observado na figura 27.

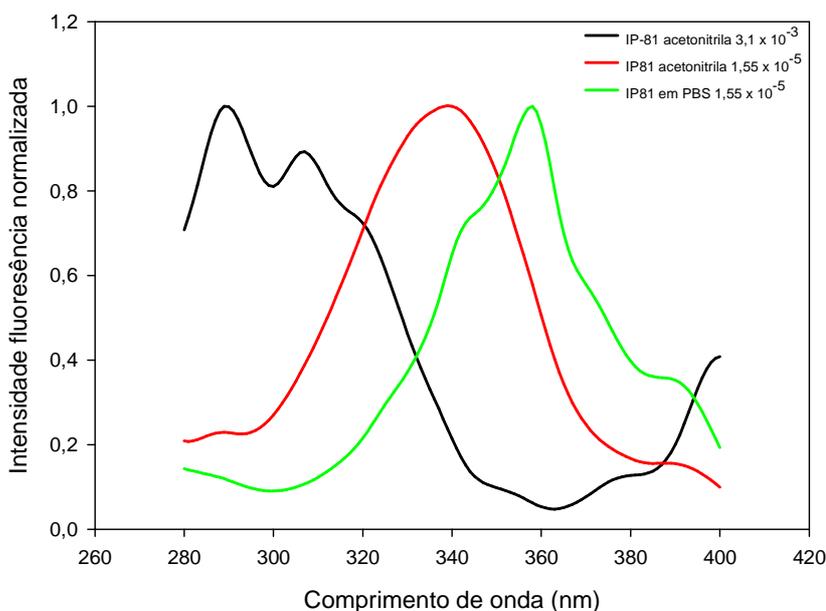


Figura 27 - Espectros de excitação do LPSF/IP-81 (IP-81) em diferentes concentrações e diluído em acetonitrila e em PBS, mostrando as diferenças no perfil de excitabilidade do composto conforme a concentração. Emissão em 428 nm.

De acordo com a figura 27, quando concentrado, o LPSF/IP-81 é excitado em diversos comprimentos de onda (picos em 306, 320, 360, 377 e 398), mas quando diluído em acetonitrila mostra um único pico em torno de 340 nm. Da mesma forma que em tampão PBS, o composto mostra apenas um pico em 360 nm, ou seja, devido o solvente ocorre um desvio para o vermelho de 20 nm para excitação do composto.

Para avaliar a influência do comprimento de onda de excitação na emissão do composto, foram utilizados todos os comprimentos de onda para os quais o LPSF/IP-81 mostrou excitabilidade como comprimentos de onda de excitação. Os espectros de emissão para tal teste podem ser verificados na figura 28, onde o LPSF/IP-81 estava diluído em acetonitrila e em PBS na figura 29.

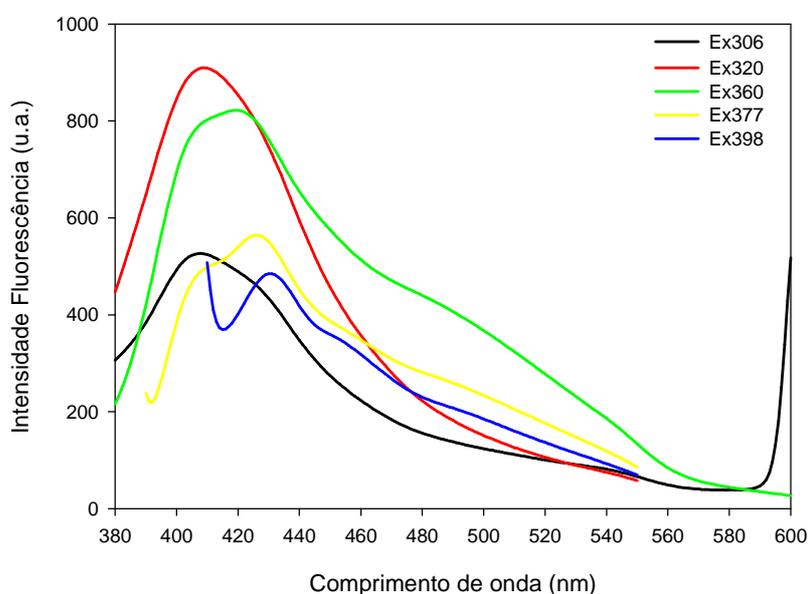


Figura 28 - LPSF/IP-81 em acetonitrila ($1,55 \times 10^{-5}$) excitado em diferentes comprimentos de onda, onde podem ser observadas as diferenças de intensidades e desvios de emissão.

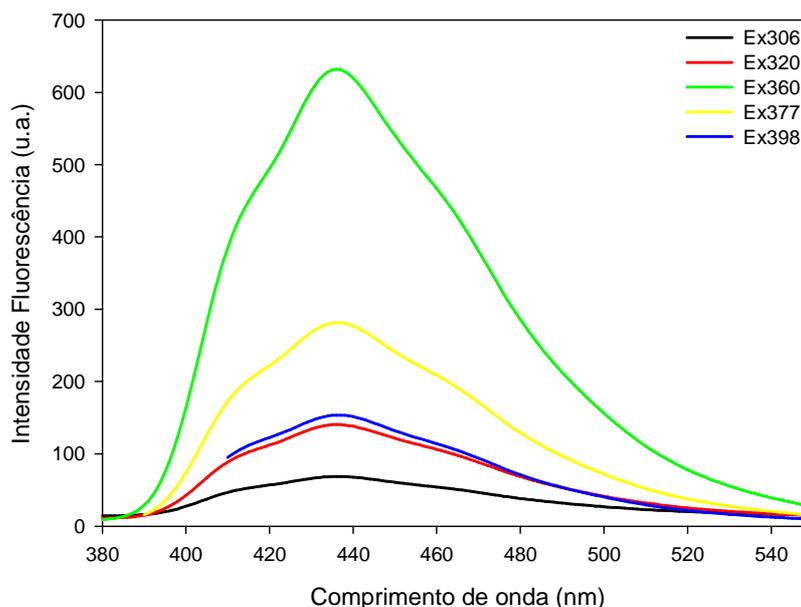


Figura 29 - LPSF/IP-81 diluído em PBS ($1,55 \times 10^{-5}$) excitado em diferentes comprimentos de onda, onde podem ser observadas as diferenças de intensidades e desvios de emissão.

Como visto nas figuras 28 e 29, não ocorre desvio do máximo de emissão mesmo com diferentes comprimentos de onda de excitação, no entanto, há mudança na intensidade da fluorescência do LPSF/IP-81 quando diluído em PBS e modificação das bandas de emissão quando o LPSF/IP-81 está em acetonitrila.

Segundo Atvars e Martelli (2002), no caso da espectroscopia de emissão, podem ocorrer diversos tipos de processos produzidos pela concentração. No entanto, pode-se considerar que, quando a solução está diluída, a emissão é aquela característica da molécula isolada. Ao se aumentar a concentração, podem ocorrer vários tipos de processos: (i) formação de dímeros no estado eletrônico fundamental; (ii) formação de dímeros no estado eletrônico excitado, que recebe o nome de excímero; (iii) transferência não-radiativa de energia; e (iv) transferência radiativa de energia. Todos esses processos interferem no espectro de fluorescência quer modificando a intensidade total da banda quer dando lugar a bandas que diferem daquela atribuída à molécula isolada.

Como nos testes subsequentes, o LPSF/IP-81 será solubilizado em acetonitrila e posteriormente diluído em tampão PBS, o comprimento de onda de excitação utilizado será o 360 nm. A absorção, excitação e emissão do LPSF/IP-81 podem ser visualizadas na figura 30.

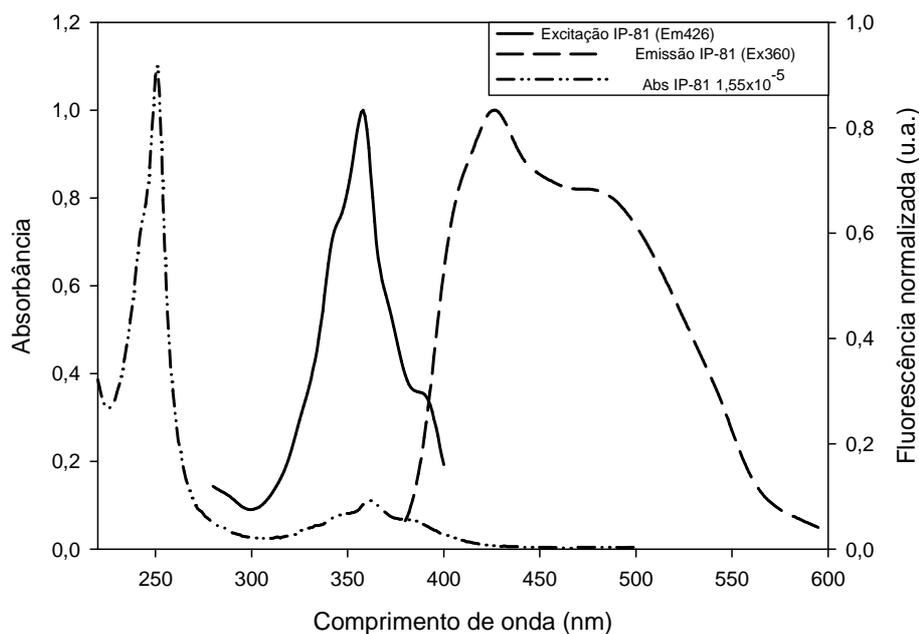


Figura 30 - Espectros de absorção, excitação e emissão do LPSF/IP-81 (IP-81) diluído em PBS ($1,55 \times 10^{-5}$). Excitação em 360 nm e emissão em 428.

A alta sensibilidade é comum para praticamente todos os métodos luminescentes e não é extraordinário ter limites de detecção mesmo em níveis sub-picomolar. Além disso, a intensidade *versus* concentração pode ser linear por várias ordens de magnitude de concentração. A figura 31 mostra a curva de calibração do LPSF/IP-81 diluído em tampão PBS com linearidade e intensidade, em baixas concentrações, características de compostos luminescentes.

Curva de calibração LPSF/IP-81

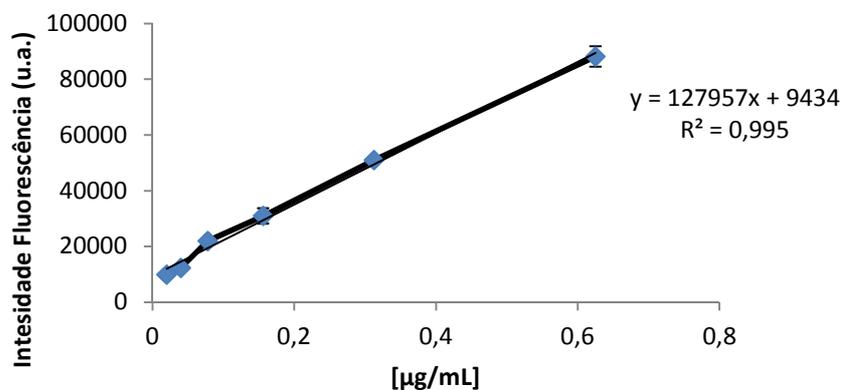


Figura 31 - Curva de calibração LPSF/IP-81, a solução inicial do LPSF/IP-81 foi diluído em PBS para as concentrações desejadas, e estas soluções tiveram suas intensidades fluorescência analisadas com excitação em 360 nm e varredura de 380-600 nm. Os espectros de emissão foram utilizados para calcular as intensidades e depois estas foram correlacionadas com as concentrações das respectivas soluções.

5.2.3 Rendimento quântico do LPSF/IP-81

O rendimento quântico calculado para o LPSF/IP-81 foi de 2%. Esse valor está de acordo com os valores de outros derivados de acridina (KRZYMINSKI *et al.*, 2010). Em estudo sobre características espectrais de derivados de acridina realizado por Krzyminski *et al.*, (2008), de vinte e quatro compostos produzidos e testados, o rendimento quântico fluorescente de somente uma entidade excedeu 10 %, e apenas três derivados apresentaram rendimento acima de 2 %. Todos os demais tiveram rendimento quântico abaixo de 2%, ou seja, inferior ao observado para o LPSF/IP-81.

5.2.4 Avaliação da quimiluminescência

Os resultados da quimiluminescência do LPSF/IP-81 em DMF, DMSO e acetonitrila, podem ser visualizados na tabela 5.

Tabela 5 - Resultados da quimiluminescência do LPSF/IP-81

SOLVENTE	RLU1	RLU2	RLU3	MÉDIA	SD
Acetonitrila	4.284	4.626	4.574	4.495	184,286
DMF	69.947	64.264	145.570	93.260	45390,53
DMSO	6.784	6.946	6.811	6.847	86,79286

Visto que os valores de RLU do LPSF/IP-81 solubilizado em DMF foram os maiores, decidiu-se utilizar esse solvente nos testes quimiluminescentes subsequentes. A baixa quimiluminescência do LPSF/IP-81 deve-se à não presença do grupamento éster ligado diretamente ao C-9 do anel acridina, que é o grupamento éster que proporciona o ataque do ânion peróxido ao C-9 (NATRAJAN *et al.*, 2010). No IP-81, nenhum dos grupamentos ésteres da molécula está nesta posição. Além disso, segundo Xiao-Jing e colaboradores (2009), também é fundamental para a quimiluminescência, que o Nitrogênio do anel acridina seja metilado, pois a ausência da carga positiva aumenta a densidade eletrônica do anel acridina. Isso enfraquece a habilidade do ataque nucleofílico do H₂O₂ para o grupo carbonila na posição 9, que é essencial para que a reação quimiluminescente ocorra.

Mesmo com intensidade baixa, a quimiluminescência do LPSF/IP-81 foi testada em análises posteriores em tecidos transformados, pois a luz emitida pelo composto pode ser capaz de diferenciar os tecidos analisados.

5.3 Conjugação do LPSF/IP-81 com a lectina Con A

A avaliação inicial de ligação entre Con A e LPSF/IP-81 foi feita através da verificação de sobreposição dos picos de proteína e luminescência em alíquotas coletadas de cromatografia de exclusão molecular. O perfil obtido das soluções submetidas à conjugação pode ser visualizado na figura 32.

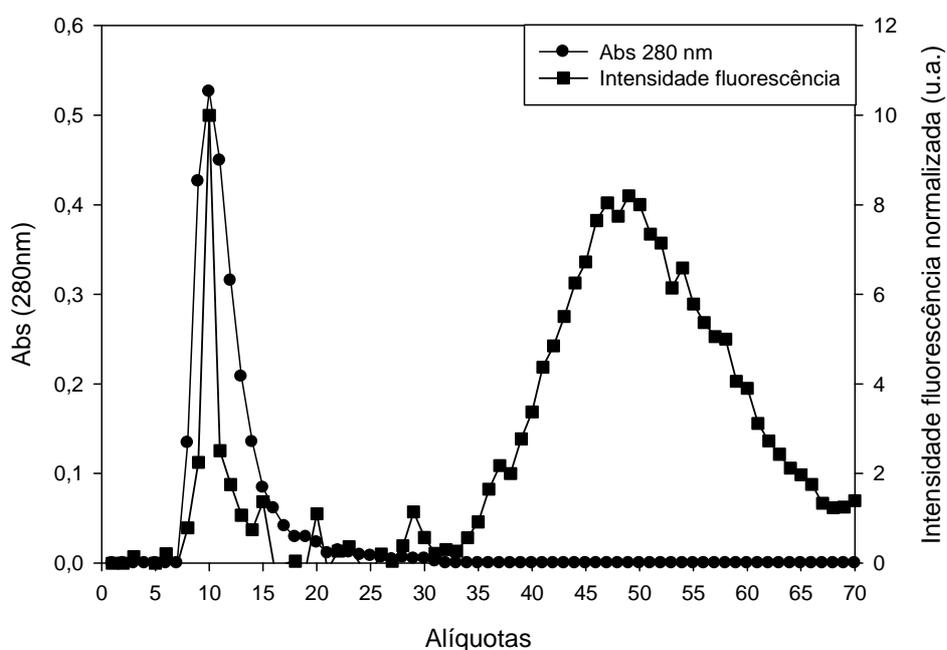


Figura 32 - Perfil protéico e fotoluminescente obtido das alíquotas colhidas da coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25) pós aplicação da solução de conjugação (500 μ L da solução protéica, contendo 2 mg de proteína + 15 μ L da solução do LPSF/IP-81, 0.1%). O conteúdo protéico foi determinado em 280 nm e a fluorescência em espectrofluorímetro.

O perfil de eluição da solução de conjugação do LPSF/IP-81 com Con A mostra sobreposição (alíquotas de 8 a 15) dos picos de proteína e fluorescência, o que indica interação entre a proteína e o LPSF/IP-81. Com relação ao planejamento fatorial, não

houve diferenças significantes em nenhuma das condições avaliadas, por esta razão, as condições de escolha foram aquelas inicialmente propostas, a saber: 500 μ L da solução protéica (4 mg/mL) + 15 μ L da solução do LPSF/IP-81 (0,1%) incubada à 25 °C por no mínimo 1 hora.

Para averiguar se a sobreposição observada não é provocada apenas pela saída simultânea dos compostos submetidos à conjugação, a Con A e o LPSF/IP-81 foram misturados e aplicados imediatamente na coluna de Sephadex G-25 com posterior eluição da mistura. Não houve sobreposição de fluorescência e proteína, e o pico de proteína não exibiu fluorescência quando excitado em 360 nm (figura 33). Além disso, o tempo de retenção do LPSF/IP-81 mostra que, quando aplicado sozinho na coluna, ele começa a ser eluído a partir da alíquota 30 (figura 34). Assim, a luminescência das alíquotas com conteúdo protéico é resultante de interação química (ainda não avaliada) entre proteína e LPSF/IP-81.

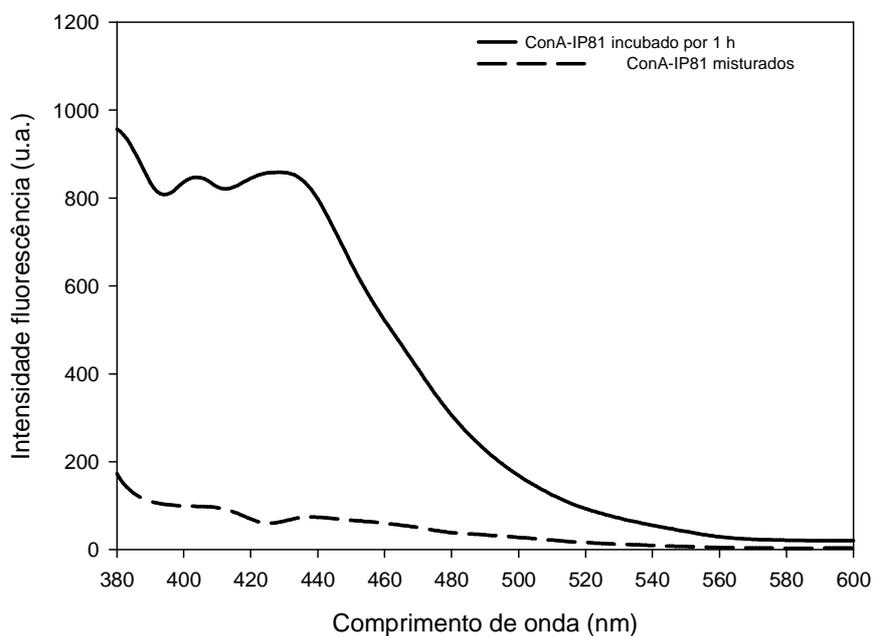


Figura 33 - Espectros de emissão do conjugado Con A-IP81 após 1 hora de incubação e da mistura de conjugação imediatamente aplicada na coluna e eluída ambos com excitação em 360 nm.

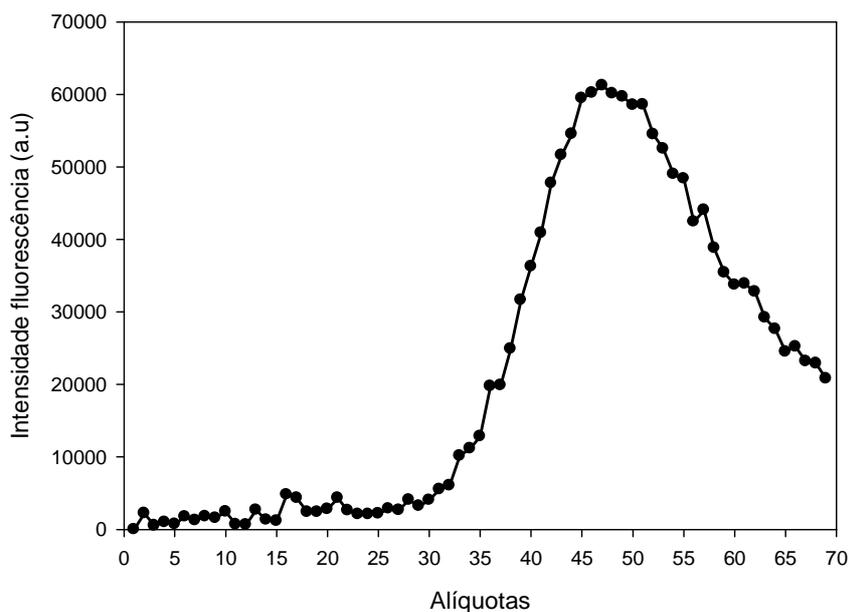


Figura 34 - Tempo de retenção do LPSF/IP-81. Quinze microlitros da solução do LPSF/IP-81 (0,1%) foi misturada com 500 μ L de tampão PBS, incubada por 1 h à 25 °C e depois aplicada na coluna Sephadex G-25 e 70 alíquotas foram coletadas. Tais alíquotas tiveram sua luminescência analisada em espectrofluorímetro com excitação em 360 nm.

A excitação do conjugado mostrou dois picos principais: o da proteína (280 nm) e do LPSF/IP-81 (360 nm). Além disso, o conjugado Con A-IP81 obtido possui espectro de emissão característico quando excitado em 360 nm, além de mostrar fluorescência equivalente ao conjugado Con A-FITC (figura 35) quando ambos são excitados nas condições pré-determinadas para cada composto (tabela 4), mas em concentração protéica igual (320 μ g/mL). Visto que o FITC possui um rendimento quântico maior que o LPSF/IP-81, esse resultado pode ser devido à uma maior quantidade de LPSF/IP-81 ligado à lectina utilizada.

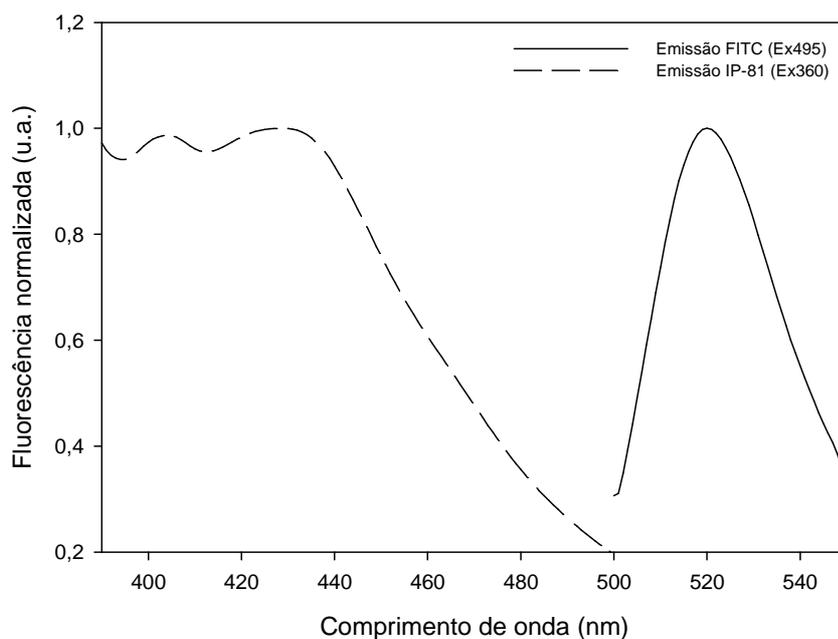


Figura 35 - Espectros de emissão do LPSF/IP-81 (ex 360) e FITC (ex 495) ambos conjugados à Con A e com concentrações protéicas iguais de 320 $\mu\text{g/mL}$.

Além de manter emissão semelhante ao composto isolado, o conjugado produzido também mostra excitação nos mesmos comprimentos de onda do LPSF/IP-81 isolado, o que indica que o processo de conjugação não modifica as propriedades luminescentes do LPSF/IP-81. A mesma sobreposição (proteína e quimiluminescência) foi observada nas alíquotas que tiveram sua luminescência determinada em luminômetro (figura 36).

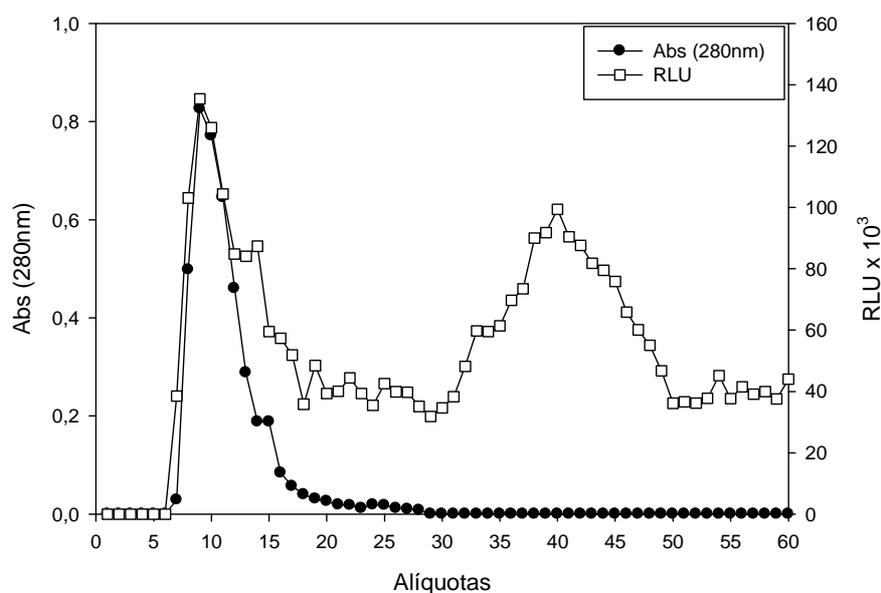


Figura 36 - Perfil protéico e quimiluminescente obtido das alíquotas colhidas da coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25) pós aplicação da solução de conjugação (500 μL da solução protéica, contendo 2 mg de proteína + 15 μL da solução do LPSF/IP-81, 0.1%). O conteúdo protéico foi determinado em 280 nm e a quimiluminescência em luminômetro.

Apesar de haver indícios, pelos dados cromatográficos descritos anteriormente, da interação entre proteína e LPSF/IP-81, o espectro de IV não mostrou nenhuma alteração quando comparado Con A isolada e Con A-IP81 com diferentes concentrações do LPSF/IP-81 no processo de conjugação (figura 37). Não houve modificação aparente das bandas da lectina isolada e daquelas submetidas ao processo de conjugação. No entanto, tal resultado pode ser devido à multiplicidade de grupamentos funcionais que a proteína possui, não sendo possível a visualização da formação amida entre LPSF/IP-81 e Con A.

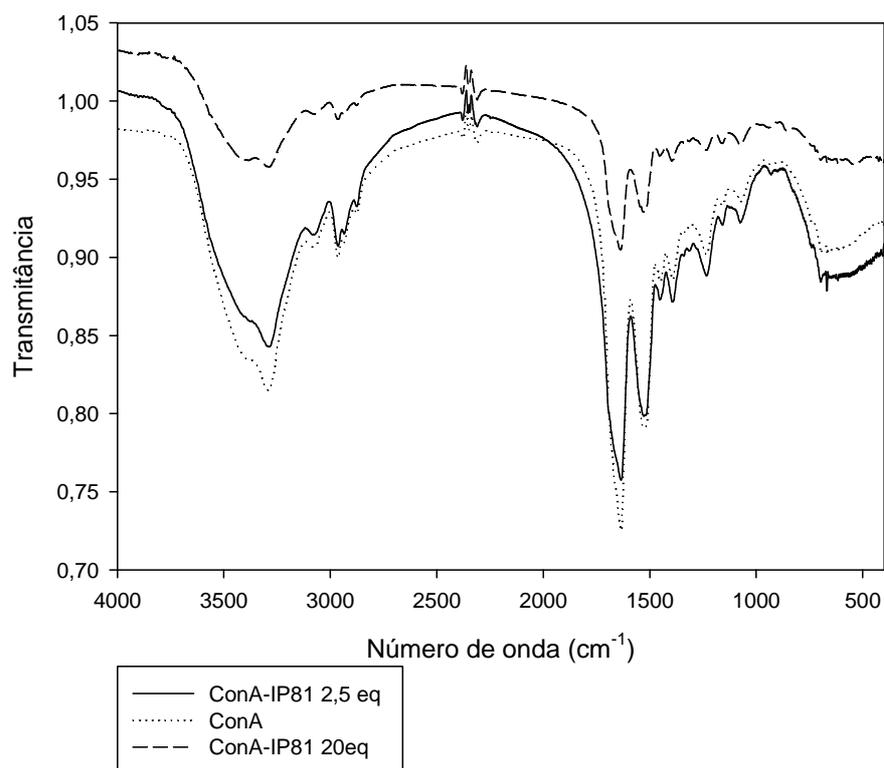


Figura 37 - Espectro de IV da lectina Con A isolada e do conjugado Con A-IP81 com diferentes proporções de conjugações (2,5 e 20 eq).

A partir desses resultados, resolveu-se fazer espectrometria de massa (EM) para averiguar se o processo de conjugação alterava a massa da proteína. A EM foi feita com o intuito de observar modificações correspondentes à massa do LPSF/IP-81 na massa total do conjugado. Os resultados da lectina Con A isolada (figura 38) e conjugado Con A-IP81 (figura 39), podem ser visualizados a seguir.

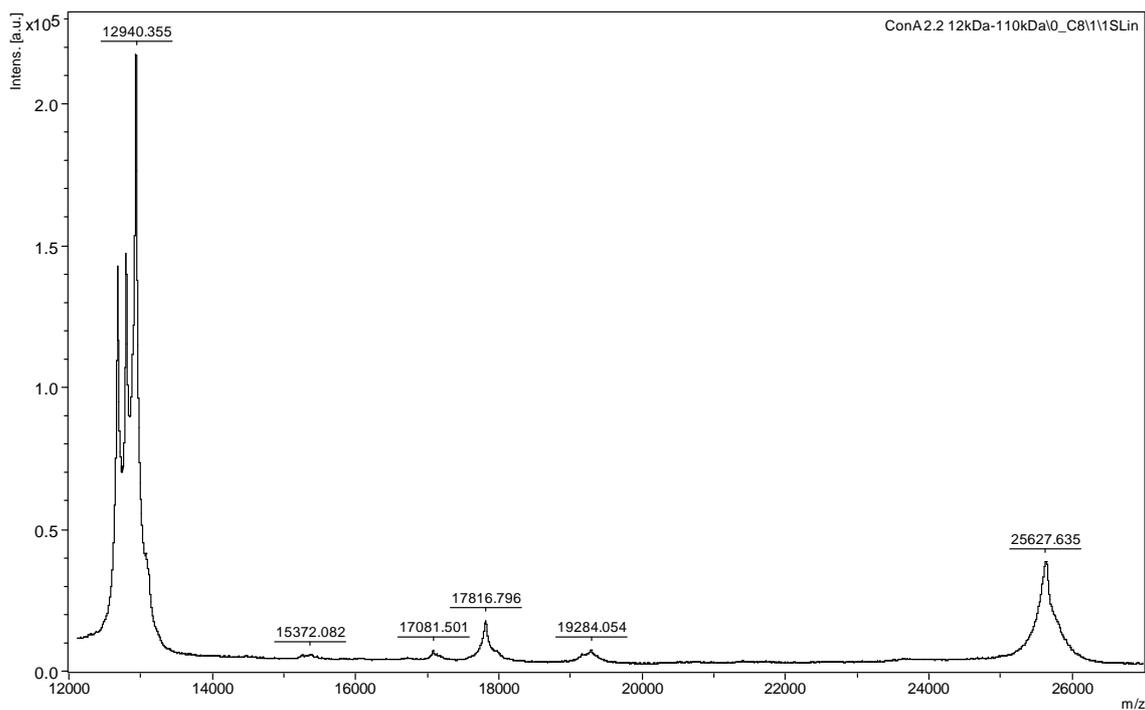


Figura 38 - Espectro de massa da lectina Con A (m/z 12.000 – 110.000). Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). As análises foram feitas em duplicata em dias diferentes.

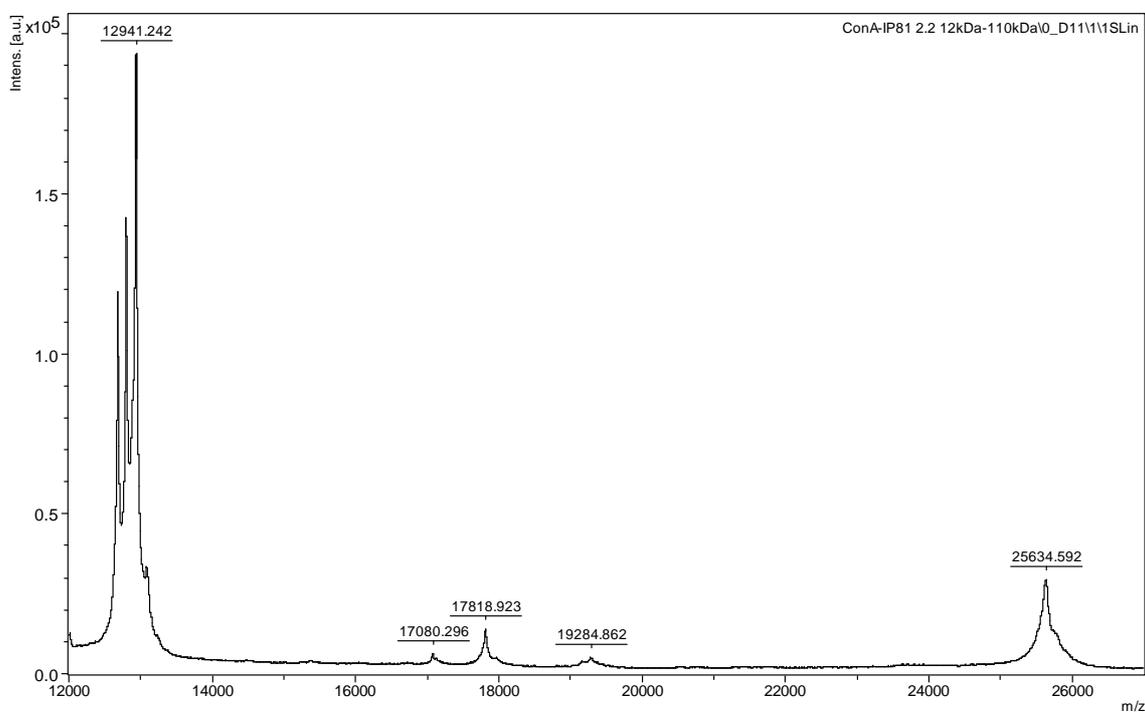


Figura 39 - Espectro de massa do conjugado Con A-IP81 (m/z 12.000 – 110.000). Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5). As análises foram feitas em duplicata em dias diferentes.

O resultado da figura 38 confirma a estrutura já bem estabelecida da Con A que possui monômeros com massa molecular de 25,627 Da, o pico em m/z aproximada de 12,940 corresponde ao monômero duplamente carregado ($[M+2H]^{2+}$). No entanto, quando comparado ao espectro de massa do conjugado, não foi possível visualizar nenhuma modificação na massa da proteína. Tal resultado está em desacordo com aquele observado por Natrajan e colaboradores (2010), onde os autores, por meio do MALDI-TOF, observaram que houve modificação na massa da proteína (anticorpo) correspondente a 8 vezes a massa do éster de acridina utilizado por eles.

Visto que tais resultados também não concordam com aqueles da sobreposição de proteína e luminescência, resolveu-se analisar os conjugados na faixa de massa do LPSF/IP-81 (m/z 300 – 800) com o intuito de identificar a massa do composto. Como pode ser visualizado na figura 40, houve detecção da massa correspondente à do LPSF/IP-81.

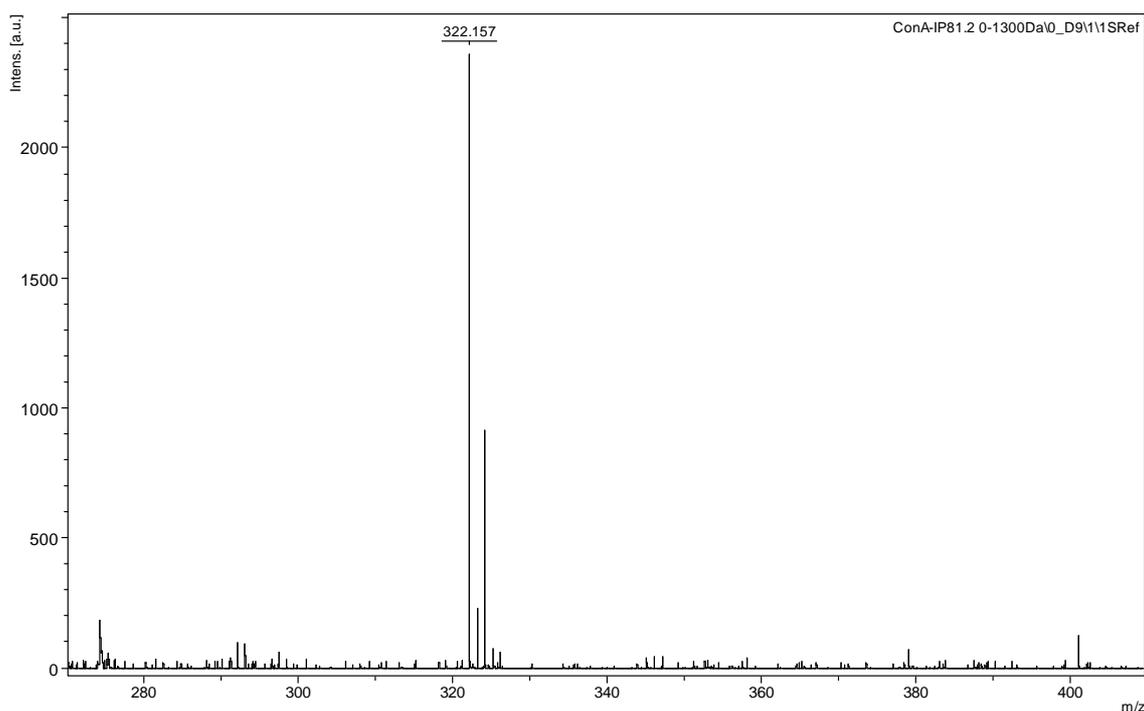


Figura 40 - Espectro de massa do conjugado Con A-IP81 (m/z 200 – 800), mostra m/z correspondente ao IP-81. Matriz utilizada foi o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA, (10 mg/mL) em acetonitrila P.A. / água MilliQ / ácido trifluoracético (TFA) 3% (2,5 / 2 / 0,5).

Esses resultados podem ter duas explicações: não está havendo formação de ligação covalente entre Con A e LPSF/IP-81, por esta razão, a massa do LPSF/IP-81 não foi detectada juntamente com a massa da proteína; ou, durante a ionização com o *laser*, o LPSF/IP-81 que estava ligado à Con A é fragmentado e detectado isoladamente.

Tais resultados necessitam de análises adicionais para determinar qual dessas hipóteses está ocorrendo e confirmar a interação entre LPSF/IP-81 e proteína.

Depois da avaliação da ligação entre lectina e LPSF/IP-81, avaliou-se a integridade estrutural da Con A por meio de técnicas que avaliam a função da lectina (atividade hemaglutinante - AH). As técnicas cromatográficas e espectroscópicas são usadas de forma complementar para obtenção de informações que permitam correlacionar mudanças conformacionais ou estruturais das proteínas em suas diferentes formas, e ainda com relação aos locais de interação destas com seus ligantes.

5.4 Caracterização do conjugado Con A-IP81

5.4.1 Análises cromatográficas

Con A é uma lectina cuja estrutura quaternária depende do pH, onde a proteína é tetramérica acima de pH 7,0 com cada monômero apresentando um sítio de ligação à carboidrato e abaixo de sete ela tende a assumir a forma dimérica preferencialmente (SINHA *et al.*, 2005). O processo de conjugação pode fazer com que haja dissociação dos dímeros conjugados (formadores da estrutura tetramérica) e assim, a lectina passa para sua forma dimérica. Tal dissociação pode ser visualizada por meio da cromatografia de exclusão de tamanho, onde as moléculas pequenas penetram nos poros e apresentam um maior tempo de retenção, enquanto as maiores são excluídas.

A comparação entre os tempos de retenção da Con A pura e do conjugado Con A-IP-81, ambos eluídos em Sephadex G-25 (figura 41) mostra que o processo de conjugação não alterou a estrutura quaternária da proteína, pois tanto a proteína quanto o conjugado apresentaram o mesmo tempo de retenção, com apenas um pequeno desvio para esquerda. Isso indica que no processo de conjugação ocorre um pequeno aumento do tamanho da proteína e conseqüente diminuição do tempo de retenção. Esse aumento observado pode ser devido à incorporação das moléculas de LPSF/IP-81 à proteína.

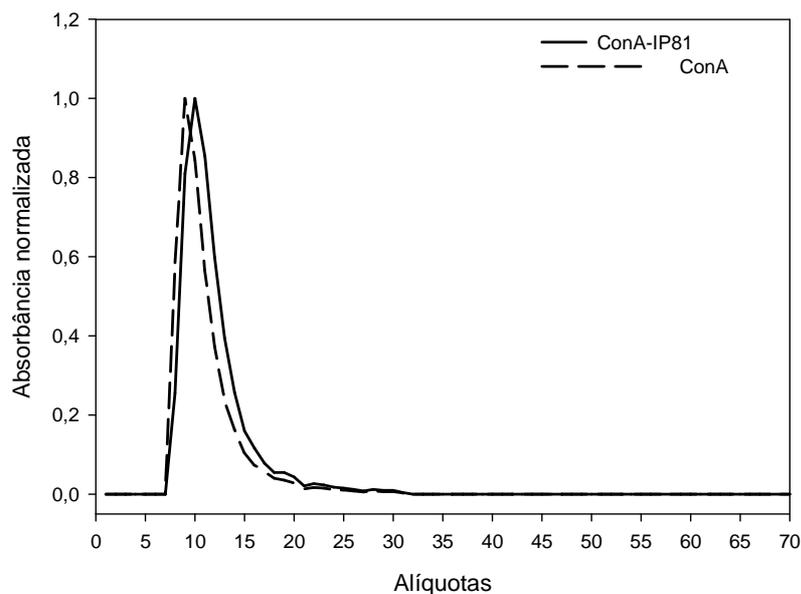


Figura 41 - Tempos de retenção do conjugado Con A-IP81 e Con A pura, o que indica que o processo de conjugação não alterou a estrutura quaternária da proteína. Após aplicação da amostra na coluna, são coletadas 70 alíquotas de 1 mL cada, num fluxo de 1mL/min em Sephadex G-25. O monitoramento foi feito pela absorvância das alíquotas em 280 nm.

4.4.2 Atividade hemaglutinante

A forma mais comum para a detecção da presença de lectinas é o teste da Atividade Hemaglutinação (KENNEDY *et al.*, 1995). Uma vez que a Con A possui sítios de reconhecimento a carboidratos em todos os seus monômeros, mesmo que ocorra alguma perturbação em sua estrutura quaternária, espera-se, ainda, que ela continue biologicamente ativa desde que não tenha sofrido perturbações em sua estrutura terciária, principalmente nos sítios de reconhecimento a carboidratos.

Em nenhuma das conjugações realizadas, houve perda da atividade hemaglutinante. Isso indica, que a interação entre LPSF/IP-81 e Con A não altera os sítios de reconhecimento a carboidratos da proteína. O perfil de hemaglutinação é correspondente para o conteúdo protéico das frações coletadas durante a eluição na cromatografia de exclusão molecular, como visto na figura 42.

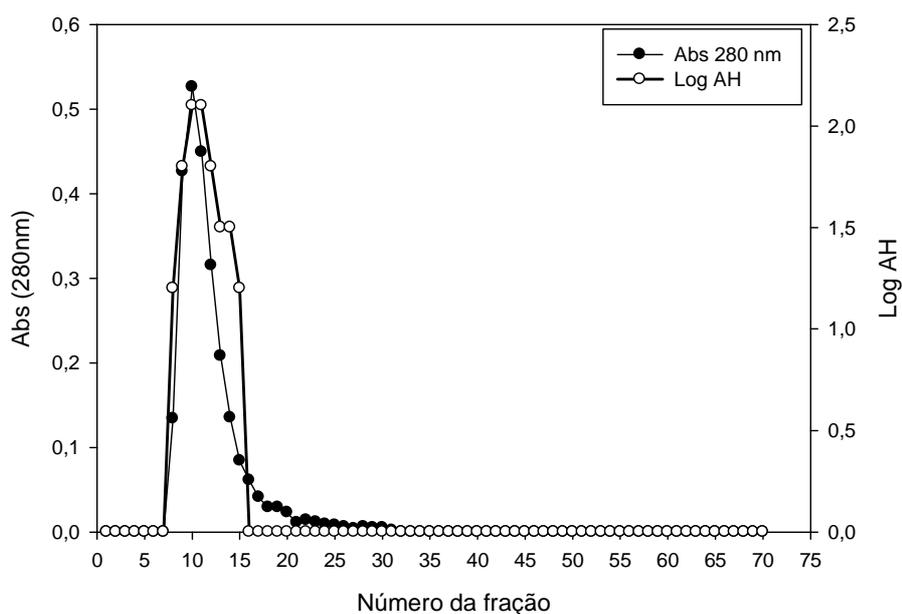


Figura 42 - Perfil protéico e hemaglutinante do conjugado Con A-IP-81 pós coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25) em fluxo 1mL/min.

Esses resultados são similares àqueles correspondentes para lectina pura nas mesmas concentrações. Exemplo de diferenças de atividade hemaglutinante pode ser verificado na figura 43, onde estão as atividades hemaglutinantes das lectinas que passaram pelo processo de conjugação com e sem inibição prévia dos sítios de reconhecimento.

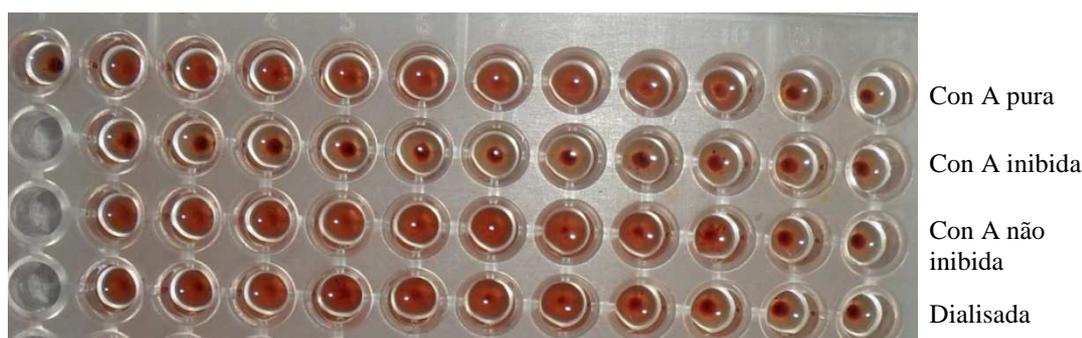


Figura 43 - Exemplo de atividade hemaglutinante da Con A pura, e dos conjugados Con A-IP81 com e sem inibição dos sítios de reconhecimento antes da conjugação, e dialisados pós conjugação.

5.4.3 Medidas de fluorescência e Dicroísmo Circular

Os espectros de fluorescência do triptofano dos conjugados e lectina isolada podem ser visualizados na figura 44.

Em todas as amostras avaliadas observa-se um máximo de emissão em torno de 335 nm. No entanto, o conjugado Con A-FITC apresentou um pequeno desvio para o azul quando comparado a Con A isolada e ao conjugado Con A-IP-81. Nenhum deslocamento pôde ser observado entre lectina isolada e conjugado produzido, indicando que não houve mudança nas vizinhanças do triptofano. Esse resultado sugere que a estrutura terciária da proteína não foi essencialmente perturbada pela conjugação, dado confirmado pela atividade hemaglutinante inalterada dos conjugados produzidos. Quando ocorre alguma alteração na estrutura protéica os resíduos de triptofano são expostos e ocorre um desvio para o vermelho no espectro de emissão da Con A, quando excitada em 295 (VAREJÃO *et al.*, 2010).

Cada unidade monomérica da Con A possui 4 resíduos de triptofano que mostram fluorescência, as diferenças de emissão de fluorescência das proteínas são atribuídas à forma como o anel aromático do triptofano interage com o seu microambiente, quanto mais exposto, maior a luminescência. É possível verificar, por meio da espectroscopia de fluorescência, as mudanças do enovelamento protéico (estrutura terciária) decorrentes do processo de conjugação por causa do aumento da fluorescência decorrente da exposição de aminoácidos que estavam internalizados na estrutura conformacional nativa. Dessa forma, a fluorescência intrínseca de proteínas provenientes dos resíduos de triptofano é um excelente indicador da estrutura e dinâmica de proteínas (CHATTERJEE e MANDAL, 2003; VAREJÃO *et al.*, 2010).

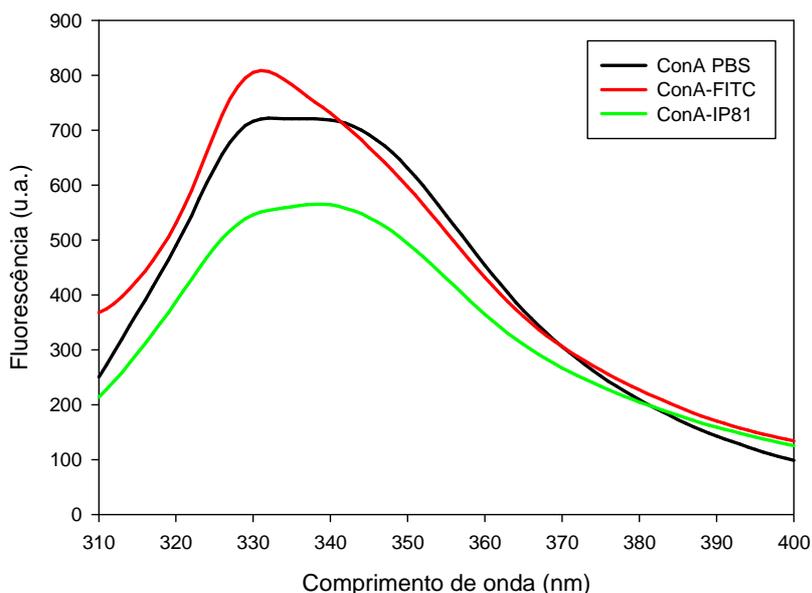


Figura 44 - Espectros de emissão dos triptofanos da Con A pura (preto), Con A-FITC (vermelho) Con A-IP81_{acetoneitrila} (verde). A excitação foi em 295 nm e emissão variada de 305-400 nm.

Na Figura 45 pode-se observar as medidas de Dicroísmo Circular (DC) para as amostras: Con A nativa e conjugada, com ou sem inibição dos seus sítios de reconhecimento a carboidratos, como também daquela dialisada pós conjugação, todas em solução PBS 0,01 M, pH 7,2.

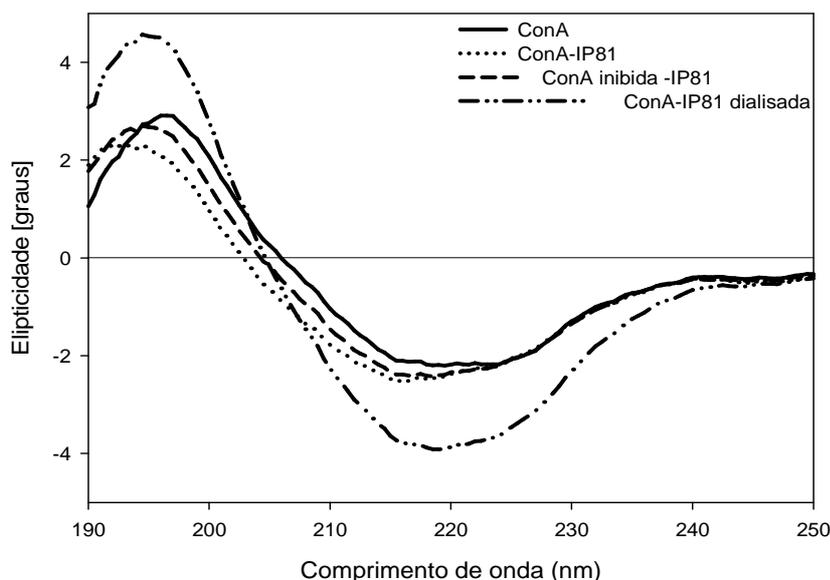


Figura 45 - Espectro de CD obtido para as amostras de Con A pura, Con A-IP81 com inibição dos sítios de ligação a carboidratos, e sem esta inibição, além daquela dialisada.

Na proteína nativa ocorre um máximo positivo em 197 nm e um mínimo negativo em 223 nm, perfazendo um espectro característico de folhas β . Quando as lectinas são conjugadas, pode-se observar que os mínimos e máximos são mantidos, indicando que a estrutura secundária da lectina não foi perturbada pela conjugação. Por esta razão, não há necessidade de proceder a conjugação com inibição prévia dos sítios de reconhecimento, eliminando assim a diálise necessária para remoção do açúcar quando a proteína é inibida.

Mudanças estruturais nas proteínas podem ser causadas pela ligação de moléculas ligantes em uma parte essencial da proteína. DC fornece uma ferramenta muito conveniente de detectar tais mudanças que podem ser examinados em diferentes regiões do espectro obtido (KELLY, 2005).

Além disso, DC pode ser usado para avaliar as concentrações do ligante, extensão e velocidade sobre as quais, tais mudanças estruturais ocorrem. Por esta razão,

o CD foi realizado para confirmar que nenhuma das condições testadas no planejamento fatorial altera a estrutura secundária da proteína. Com relação à avaliação do tempo e temperatura, bem como as concentrações das soluções submetidas à conjugação, pode-se verificar, na figura 46, que não houve perturbação da estrutura protéica em nenhuma das condições testadas. Tais resultados corroboram com aqueles obtidos no teste de atividade hemaglutinante.

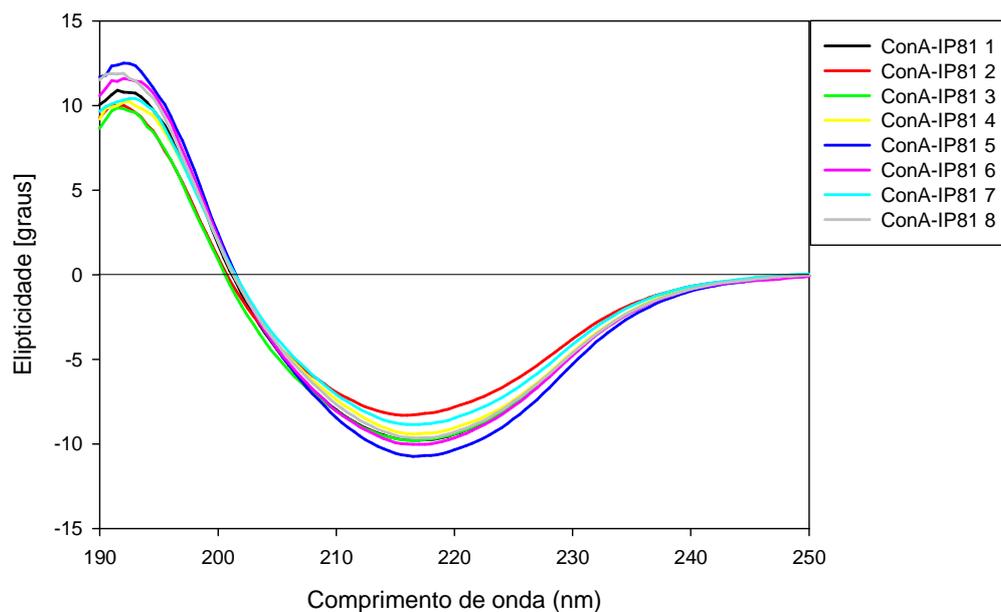


Figura 46 - CD dos conjugados obtidos em diferentes condições (temperatura, tempo de conjugação, e concentrações de proteína e LPSF/IP-81). Os números correspondentes à cada conjugado é o mesmo dos ensaios da tabela 2 mostrada anteriormente (ver acima).

Desta forma, pode-se afirmar que o método de conjugação desenvolvido, bem como a presença do LPSF/IP-81 ligado à proteína, não desestabilizaram sua estrutura secundária.

5.5 Teste de estabilidade do conjugado Con A-IP81

A estabilidade do conjugado produzido foi avaliada por três testes: luminescência dos resíduos de triptofano, fluorescência do LPSF/IP-81 e atividade hemaglutinante. Os resultados obtidos a partir do cálculo de centro de massa do triptofano dos conjugados armazenados à 4 °C e -20 °C estão mostrados na figura 47.

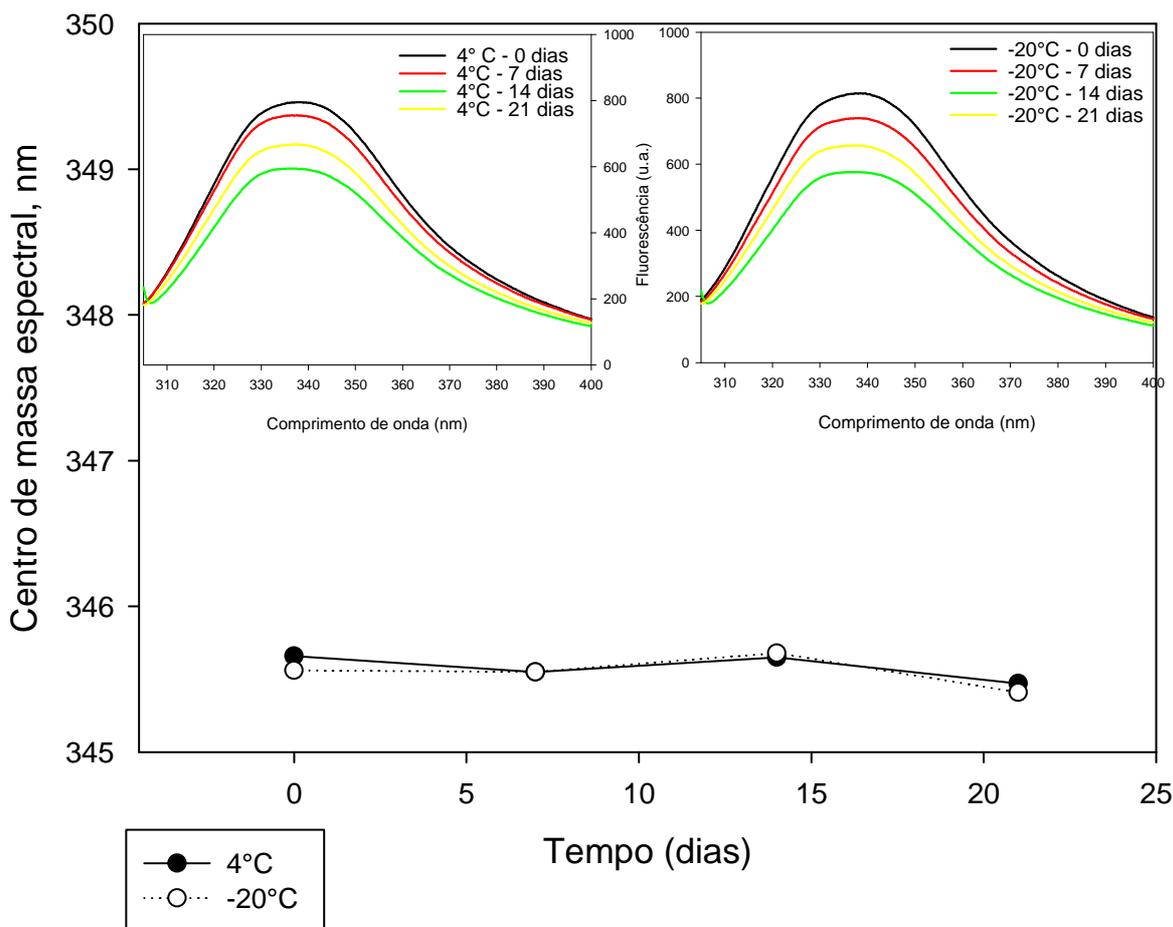


Figura 47 - Espectros de fluorescência dos conjugados armazenados à 4 °C (acima à esquerda) e à -20 °C (acima à direita), e resultados do centro de massa dos triptofanos de ambos conjugados, concentração protéica de aproximadamente 10 μ M em tampão PBS pH 7,2.

Segundo CHATTERJEE e MANDAL (2003), a avaliação da estabilidade de proteínas por meio de espectroscopia de fluorescência, visa verificar o aumento da fluorescência decorrente da exposição de aminoácidos que estavam internalizados na estrutura conformacional nativa. Assim, a fluorescência intrínseca de resíduos de triptofano é um excelente indicador da estrutura e dinâmica de proteínas. Os resultados do centro de massa mostram que não houve desvio no espectro nem aumento da luminescência da proteína, ou seja, não houve mudança nas vizinhanças dos resíduos de triptofano. Esse resultado sugere que a estrutura terciária da proteína não foi perturbada pelo armazenamento do conjugado em ambas as temperaturas utilizadas.

Com relação à atividade hemaglutinante, não houve modificação desta durante todo o período de estocagem nas duas temperaturas de armazenamento, dado que concorda com os resultados da fluorescência da figura 47.

Os resultados da fluorescência do LPSF/IP-81 das amostras estocadas estão descritos na figura 48.

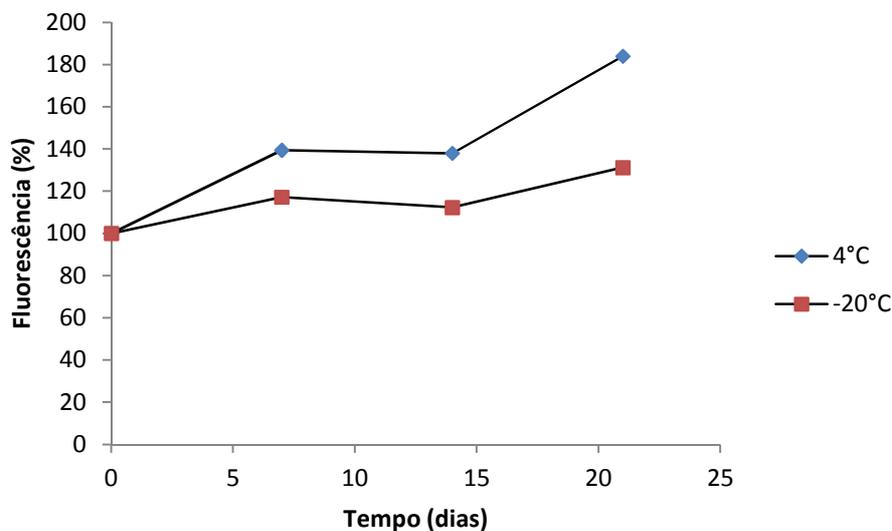


Figura 48 - Gráfico da fluorescência residual dos conjugados Con A-IP81 armazenados à 4 °C e à -20 °C durante 4 semanas. A fluorescência inicial foi considerada 100% e as demais foram calculadas como proporção desta.

De acordo com os resultados da figura 49, pode-se observar um aumento na intensidade fluorescente do conjugado ao longo do tempo de armazenamento tanto para 4 °C quanto para -20 °C, porém o aumento para os conjugados mantidos à 4 °C foi maior. Esses resultados foram inesperados, pois, é comum observar uma diminuição ao longo do período de estocagem como demonstrado por Smith e colaboradores (2000) que avaliaram a estabilidade de conjugados resultantes de anticorpos e ésteres de acridina com diferentes substituintes no anel fenol, durante estocagem em tampões com diferentes pH à 4, 25 e 37°C. Os autores verificaram que os efeitos estéricos dos substituintes explicam o fato que todos os novos compostos serem mais estáveis que o composto de referência. Além disso, o efeito de grupos doadores de elétrons, como CH₃ e OCH₃, resultam em grupos fenoxy substituídos mais estáveis a hidrólise. Em contraste, o grupo retirador de elétron tenderia a acelerar a hidrólise.

No caso do conjugado Con A-IP81, hidrólise entre proteína e o composto pode ter disponibilizado maior quantidade do LPSF/IP-81 para ser excitado, conseqüente, os resultados da fluorescência aumentaram. Além disso, caso ocorra adsorção do LPSF/IP-81 à proteína, este pode ser liberado na solução estoque e provocar o aumento observado. Essa última hipótese, pode ser suportada pelo maior aumento na

fluorescência da solução mantida a 4 °C, pois em fase líquida pode ocorrer uma maior liberação do LPSF/IP-81 adsorvido à proteína que à -20 °C.

5.6 Aplicação do conjugado Con A-IP81 em histoquímica

Os dados referentes à marcação com o conjugado Con A-IP81, estão na figura 49.

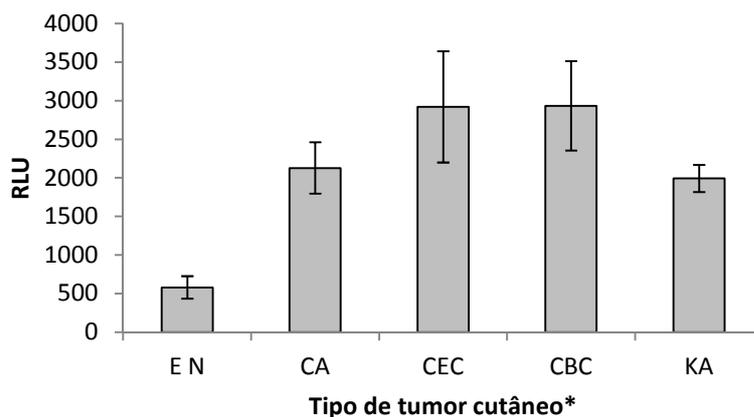


Figura 49 - Histoquímica com lectina em neoplasias cutâneas. * Epiderme normal (EN, n = 6); Ceratose actínica (CA, n = 7); Carcinoma epidermóide (CEC, n = 12); Carcinoma basocelular (CBC, n = 22); Ceratoacantoma (KA, n = 6). Marcação tecidual com o conjugado formado pela lectina Con A (Concanavalina A) conjugada ao IP-81. Área tumoral analisada: 0,5 cm².

Todos os tumores de pele analisados pela quimiluminescência emitida a partir do IP-81, KA (1,992 ± 177 RLU), CA (2,127 ± 332 RLU), CEC (2,920 ± 721 RLU) e CBC (2,934 ± 579 RLU), demonstraram uma maior expressão dos resíduos de α -D-glicose/manose reconhecidos pela Con A, comparado ao tecido normal (579 ± 145 RLU). Mesmo apresentando uma emissão quimiluminescente menor que a emissão do éster de acridina comercial (Dimetyl-acridinium ester - DMAE) (KA = 57 vezes; CA = 63 vezes; CEC = 41 vezes; CBC = 49 vezes), o perfil de RLU do conjugado Con A-IP-81 é equivalente para o perfil do conjugado Con A-DMAE (dados não mostrados, obtidos em trabalhos paralelos no mesmo laboratório) quando comparados com os tecidos normais.

As médias dos resultados quimiluminescentes mostraram diferenças estatisticamente significantes entre tecido normal e transformados, mas não entre as neoplasias avaliadas, por meio do teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney U ($p < 0.05$).

Os resultados encontrados diferem daqueles observados por Melo-Júnior e colaboradores (2006), que observaram que as lectinas utilizadas exibiram padrões variados de marcação entre as neoplasias benignas (KA e CA) e malignas (CBC e CEC). Utilizando Con A-peroxidase eles verificaram que o KA exibiu padrão aberrante de expressão dos carboidratos glucose/manose evidenciado pela intensa marcação da lectina Con A (94,7%) quando comparado à marcação da CA. Enquanto que os tumores malignos expressaram padrões de marcação distintos que os diferenciou das outras neoplasias cutâneas. O CEC exibiu marcação significativa apenas para a lectina PNA e o CBC exibiu padrões de marcação diferentes daqueles observados nas lesões benignas.

No entanto, como no trabalho de Campos e colaboradores (2006), onde o conjugado Con A-éster de acridina comercial revelou-se capaz de diferenciar tecido mamário com carcinoma ductal infiltrante do normal, o conjugado Con A-IP-81 conseguiu diferenciar os tecidos transformados dos normais. Campos e colaboradores (2006) observaram uma diferença de cerca de 500 vezes maior entre a RLU do tecido transformado e o tecido normal. A quimiluminescência verificada a partir das marcações utilizando o LPSF/IP-81 corresponde a expressões aberrantes de carboidratos nos tecidos avaliados, confirmados pela redução de RLU nos testes com conjugado inibido por sacarídeo (CA 59%, CEC 53%, CBC 67% e KA 55,5%), demonstradas na figura 50.

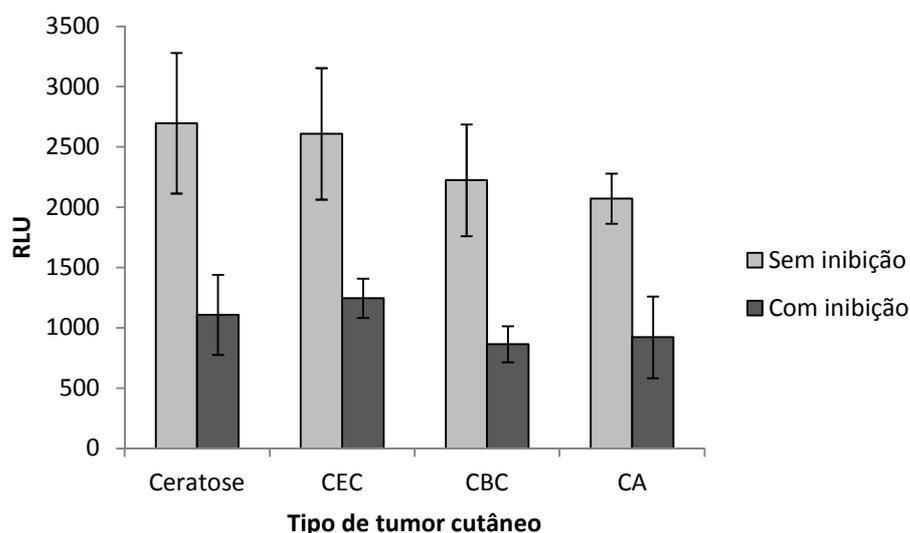


Figura 50 - Ensaio de inibição em histoquímica com lectina em neoplasias cutâneas, confirmando que a diferença de marcação identificada pelo LPSF/IP-81 é devido expressão tecidual diferente dos carboidratos analisados. Ceratose actínica (CA, n = 7); Carcinoma epidermóide (CEC, n =12); Carcinoma basocelular (CBC, n = 22); Ceratoacantoma (KA, n = 6). Marcação tecidual com o conjugado Con A-IP81 previamente inibido com α -metil-D-manopiranosídeo. Área tumoral analisada: 0,5 cm².

Além de verificar a aplicabilidade do conjugado Con A-IP-81 em histoquímica através de excitação por reação química, testou-se também a microscopia de fluorescência como ferramenta para análise dos tecidos marcados com o conjugado produzido. Os resultados da marcação de tecidos cutâneos com diagnóstico ceratoacantoma (KA), podem ser vistos na figura 51.

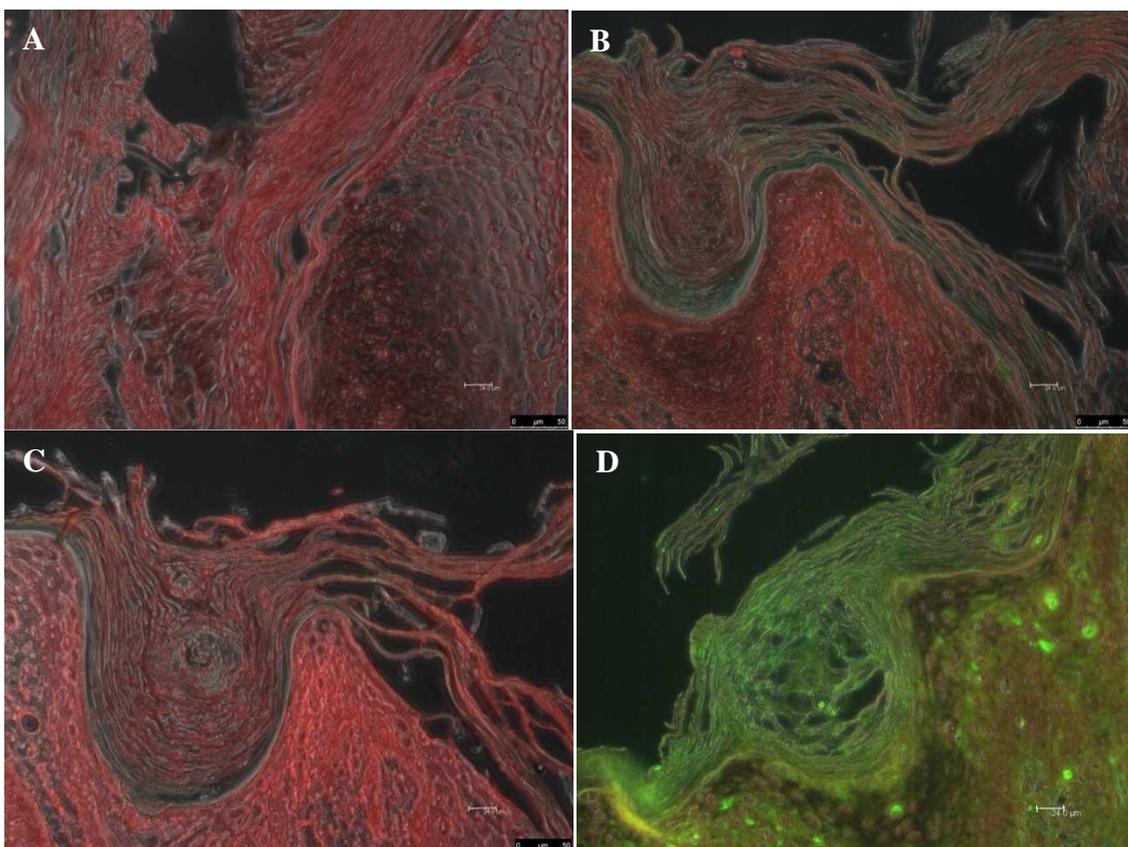


Figura 51 - Tecidos humanos diagnosticados como ceratoacantoma (KA). (A) KA tratado com solução Con A-IP81 com inibição prévia da lectina; (B) KA incubado com conjugado Con A-IP81 pré lavagem com filtros AMICON; (C) KA incubado com o conjugado Con A-IP81 pós 4 lavagens; e (D) Controle positivo, KA incubado com o conjugado Con A-FITC. Essas imagens foram obtidas por excitação dupla em 488 e 543 nm.

As imagens do ensaio de inibição (A), não mostram fluorescência detectável. Os tecidos incubados com o conjugado Con A-IP-81 não submetido à lavagens (B), mostram fluorescência verde na camada córnea epidérmica. Já o conjugado Con A-IP-81 lavado quatro vezes (C), não apresenta essa marcação na camada córnea, enquanto as amostras marcadas com Con A-FITC (D) mostram uma luminescente forte na região do verde, característica deste marcador.

Os resultados dos tecidos de mama diagnosticados como fibroadenoma, podem ser visualizados na figura 52.

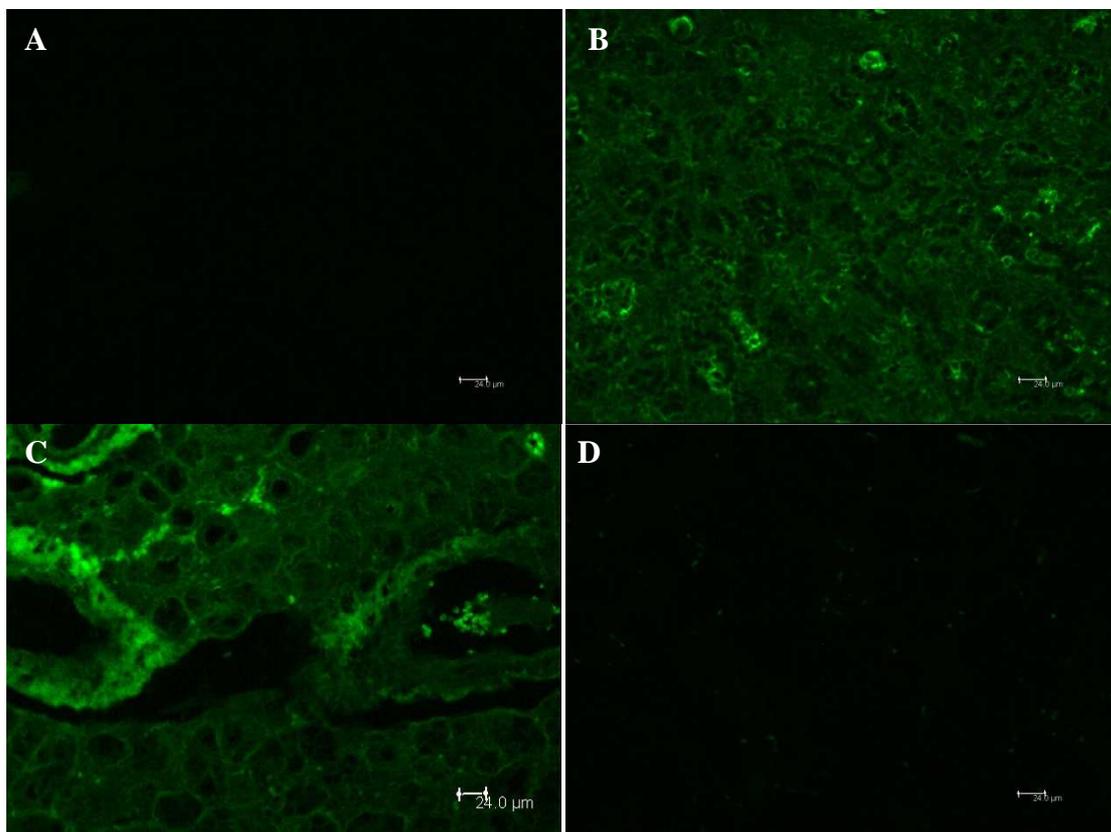


Figura 52 - Tecidos humanos diagnosticados como fibroadenoma (fib). (A) Fib tratado com solução de Azul de Evans; (B) Fib incubado com conjugado Con A-FITC; (C) Fib incubado com o conjugado Con A-IP81 pré lavagem com filtros AMICON; e (D) Fib incubado com o conjugado Con A-IP81 pós 4 lavagens com filtros AMICON.

A avaliação das imagens de microscopia de fluorescência na faixa de 500-535 nm, de amostras teciduais com fibroadenoma, mostra que os tecidos tratados somente com Azul de Evans (A), não mostra fluorescência detectável. As amostras marcadas com Con A-FITC (B) mostra uma forte fluorescência na região do verde, característica do FITC. Da mesma forma, os tecidos incubados com o conjugado Con A-IP-81 não submetido à lavagens (C), mostra fluorescência forte na região do verde. No entanto, quando o conjugado Con A-IP-81 é lavado quatro vezes, ocorre uma drástica redução na fluorescência emitida (D).

Essa diminuição observada na imagem D pode ser devido a natureza das ligações entre Con A e LPSF/IP-81 serem do tipo fraco, mas esses resultados necessitam de análises adicionais.

A diminuição da fluorescência do conjugado Con A-IP-81 após lavagens, foi confirmada através da análise das emissões dos conjugados pré e pós lavagens, na espectroscopia de fluorescência (figura 53).

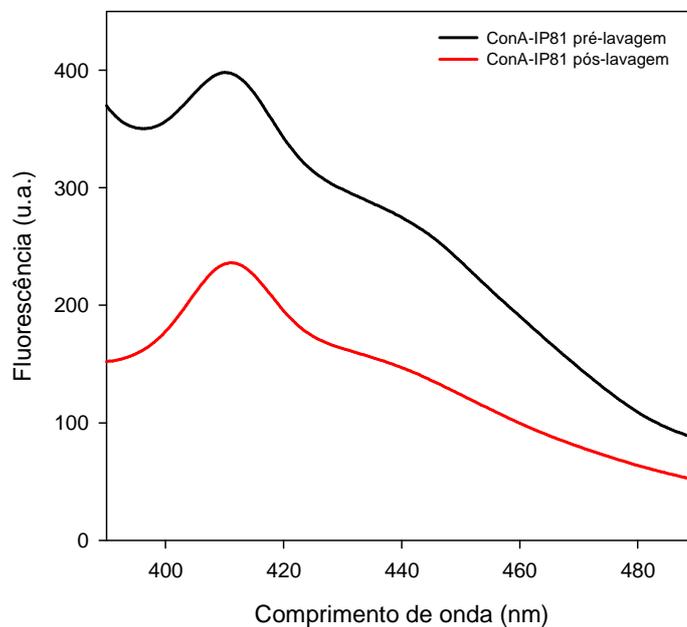


Figura 53 - Espectros de emissão do conjugado Con A-IP81 não submetido ao processo de lavagens, e após o processo de lavagens (4 vezes em tubos AMICON). Excitação em 360 nm.

Esses resultados explicam a diminuição, observada na figura 52, da emissão fluorescente dos tecidos marcados com o Con A-IP-81, pois ocorre uma diminuição de quase 100% (pico de 400 para aproximadamente 200 u.a.) da emissão do conjugado após as lavagens. Além disso, a emissão fluorescente (excitação em 360 nm) dos 4 lavados corroboram esses dados (figura 54).

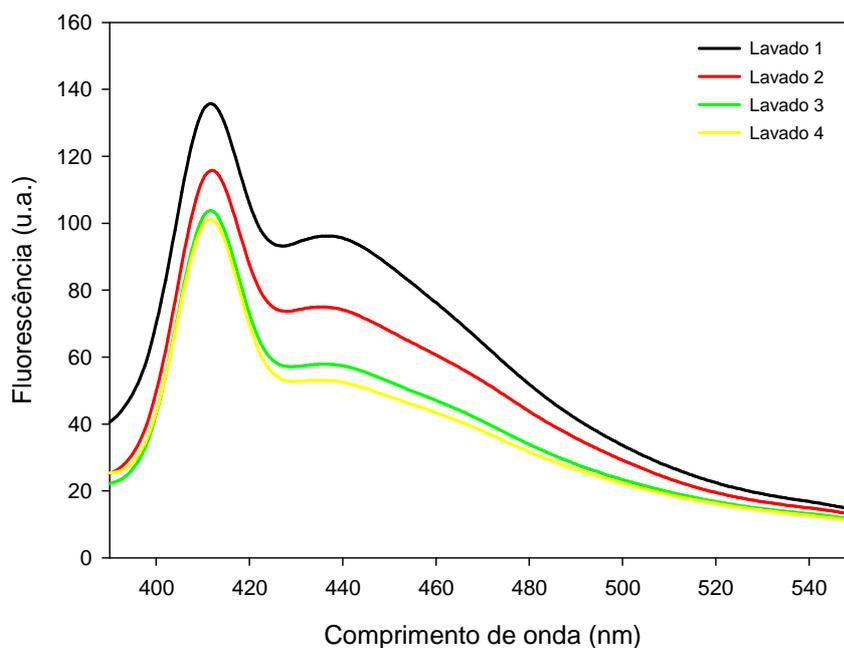


Figura 54 - Espectros de emissão dos lavados, mostrando emissão, no entanto essa emissão diminui com o aumento das lavagens. As lavagens foram feitas em tubo AMICON, por 10 min à 4.500g. Excitação em 360 nm.

Esses achados da diminuição da fluorescência ainda explicam aqueles resultados encontrados no MALDI-TOF e IV do conjugado Con A-IP81, pois a preparação das amostras incluiu 4 lavagens em tubos AMICON, tanto para remoção do tampão, quanto do derivado de acridina que não estivesse covalentemente ligado.

Faz-se necessário, portanto a inserção de grupamentos ésteres mais reativos, como os ésteres NHS utilizados em diversos marcadores derivados de acridina (WEEKS *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 2009; NATRAJAN *et al.*, 2010) para que ocorra formação de ligação covalente (ligação amida) entre LPSF/IP-81 e proteínas desejadas. Os resultados indicam que os grupamentos ésteres do LPSF/IP-81 não estão quimicamente posicionados de forma muito reativa para o processo de conjugação.

Esses resultados confirmam que os derivados de acridina podem ser utilizados como marcadores de sondas para identificação de biomarcadores teciduais na técnica de histoquímica, por meio de análise com microscópio de fluorescência.

6 CONCLUSÃO

O novo derivado de acridina Dimetil-2-(Acridin-9-ilmetileno)malonato (LPSF/IP-81) foi sintetizado e teve sua estrutura química elucidada por cristalografia, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa.

O LPSF/IP-81 mostrou-se fotoluminescente em todos os solventes testados, inclusive em tampão PBS, com excitação em 360 nm e emissão entre 428 e 438 nm, dependendo do solvente no qual ele está solubilizado. O rendimento quântico luminescente do LPSF/IP-81 foi de 2 %. Na quimiluminescência, o LPSF/IP-81 apresentou baixa RLU, o que é explicado pela estrutura molecular do derivado produzido, por não apresentar a carbonila ligada ao C-9 que permite o ataque nucleofílico e consequente formação da 9-acridona.

O processo de conjugação do LPSF/IP-81 com a lectina Concanavalina A (Con A) não alterou as propriedades luminescentes do LPSF/IP-81, nem a estrutura terciária da proteína, o que foi confirmado por meio de métodos cromatográficos, espectroscopia de luminescência, dicroísmo circular e atividade hemaglutinante para o conjugado obtido.

O LPSF/IP-81 apresentou fluorescência e quimiluminescência capazes de diferenciar os tecidos analisados na técnica de histoquímica com lectinas. Os resultados obtidos indicam que o LPSF/IP-81 pode ser usado como revelador em histoquímica para avaliação de carboidratos de glicoconjugados de superfície celular em tecidos cutâneos e de mama.

Este trabalho tem como perspectivas:

- Estabelecer a natureza da ligação entre LPSF/IP-81 e Con A.
- Conjugar o LPSF/IP-81 com outras lectinas e anticorpos e aplicar os conjugados obtidos em histoquímica;
- Alterar os grupos reativos para proteína do LPSF/IP-81;
- Sintetizar e testar outros ésteres de acridina com mudanças estruturais que favoreçam a quimiluminescência.

REFERÊNCIAS

ADAMCZYK, M.; BRASHEAR, R.J.; MATTINGLY, P.G. Rapid high-throughput detection of peroxide with an acridinium-9-carboxamide: A homogeneous chemiluminescent assay for plasma choline. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 16, 2407-2410, 2006.

ADAMCZYK, M.; FINO, J.R.; MATTINGLY, P.G.; MOORE, J.A.; PAN, Y. Chemiluminescence quenching of pteric acid-sulfonyl-acridinium-9-carboxamide conjugates by folate binding protein. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 14, 2312-2317, 2004a.

ADAMCZYK, M.; JOHNSON, D.D.; MATTINGLY, P.G.; MOORE, J.A.; PAN, Y. Intrinsic factor-mediated modulation of cyanocobalamin-N-sulfonyl-acridinium-9-carboxamide chemiluminescence. *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* 14, 3917-3921, 2004b.

AGIAMARNIOTI, K.; TRIANTIS, T.; PAPADOPOULOS, K.; DIMOTIKALI, D. Synthesis and chemiluminescent properties of novel biotinylated acridinium esters. *Acta Chim. Slov.*, 51, 67-76, 2004.

ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M.A.G.; BASTOS, E.L.; ROPKE, S.; SAKAI, P.N.; SANCHES, A.M.M.; STEVANI, C.V.; UMEZU, J.S.; YU, J.; BAADER, W.J. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Química Nova*, 21 (6), 1998.

ANDRADE, C.A.S.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 278, p. 435-445, 2004.

APPLETON, D.R.; PEARCE, A.N.; COPP, B.R. Anti-Tuberculosis natural products: synthesis and biological evaluation of pyridoacridine related to ascididemin. *Tetrahedron* 66, 4977-4986, 2010.

ARAÚJO-FILHO, J.L.S.; MELO-JÚNIOR, M.R.; LINS, C.A.B.; LINS, R.A.B.; MACHADO, M.C.F.; CARVALHO JR., L.B. 2006. Galectina-3 em tumores de próstata: imuno-histoquímica e análise digital de imagens. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 42(6): 469-475.

ARENAS, M.I.; ROMO, E.; GASPAR, I.; BETHENCOURT, F.R.; SÁNCHEZ-CHAPADO, M.; FRAILE, B.; PANIAGUA, R. A lectin histochemistry comparative study in human normal prostate, benign prostatic hyperplasia, and prostatic carcinoma. *Glycoconjugate Journal*, v. 16, n.7, p.375-82, 1999.

ARNOLD JR, L.J.; HAMMOND, P.W.; WLESE, W.A.; NELSON, N.C. Assay Formats Involving Acridinium-Ester-Labeled DNA Probes. *Clinical Chemistry*, vol. 35, Nº 8, 1989.

ATVARS, T. D. Z.; MARTELLI C., "Espectroscopia eletrônica de emissão", *Chemkeys*, 2002. Disponível em: <http://www.chemkeys.com>, acessado em 05/11/2010.

ATVARS, T. D. Z.; MARTELLI C., “Espectroscopia de luminescência”, *Chemkeys*, 2002. Disponível em: <http://www.chemkeys.com>, acessado em 05/11/2010b.

BANERJEE, S., ROBSON, P., SOUTTER, W.P., FOSTER, S.C. Modulated expression of glycoprotein oligosaccharides identifies phenotypic differentiation in squamous carcinomas of the human cervix. *Human Pathology*, v. 26, n. 9, p. 1005-1013, 1995.

BARTOLONI, F.H.; CISCATO, L.F.M.L.; PEIXOTO, M.M.M.; SANTOS, A.P.F.; SANTOS, C.S.; OLIVEIRA, S.; AUGUSTO, F.A.; PAGANO, A.P.E; BAADER, W.J. Luz: Um raro produto de reação. *Química Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-11, 2010.

BARBOSA, R.C.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R.M.T.; LIMA, E.F.; BARROS, S.S.; GIMENO, E.J.; MOLYNEUX, R.J.; GARDNER, D.R. Intoxication by *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea riedelli* in goats in the state of Paraíba, Northeastern Brazil. *Toxicon*, 47: 371-379, 2006.

BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S.; SILVA, J.F.; COELHO, L.C.C.B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 74, 125–134, 1998.

BELTRÃO, E.I.C; MEDEIROS, P.L.; RODRIGUES, O.G.; FIGUEREDO-SILVA, J.; VALENÇA, M.M.; COELHO, L.C.B.B.; L.B. CARVALHO JR, L.B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. *European Journal of Histochemistry*, vol. 47(2): 139-42, 2003.

BOUZYK, A., JOZWIAK, L.; KOLENDO, A.Y.; BLAZEJOWSKI, J. Theoretical interpretation of electronic absorption and emission transitions in 9-acridinones. *Spectrochimica Acta Part A*, 59, 543-558, 2003.

BROOKS, S. A.; WILKINSON, D. Validation of a simple avidin-biotin detection method for *Helix pomatia* lectin (HPA) binding as a prognostic marker in cancer. *Acta Histochemica*. 105(3) 205–212, 2003.

BROWN, R.C.; WEEKS, I.; FISHER, M.; HARBON, S.; TAYLORSON, C.J.; WOODHEAD, S. Employment of a phenoxy-substituted acridinium ester as a long-lived chemiluminescent indicator of glucose oxidase activity and its application in an alkaline phosphatase amplification cascade immunoassay. *Analytical Biochemistry*, 259, 142-151, 1998.

CAMPOS, L.M.; CAVALCANTI, C.L.B.; LIMA-FILHO, J.L.; CARVALHO-JR. L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Acridinium Ester conjugated to lectin as chemiluminescent histochemistry marker. *Biomarkers* 11(5): 480 – 484, 2006.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D.K. Denaturant-induced equilibrium unfolding of concanavalin A is expressed by a three-state mechanism and provides an estimate of its protein stability. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1648, 174-183, 2003.

COBO, E.R.; CAMPERO, C.M.; GIMENO, E.J.; BARBEITO, C.G. Lectin Binding Patterns and Immunohistochemical Antigen Detection in the Genitalia of *Tritrichomonas foetus*-infected Heifers. *J. Comp. Path.*, Vol. 131, p. 127–134, 2004.

CRONEY, J.C.; JAMESON, D.M.; LEARMONTH, R.P. Fluorescence spectroscopy in biochemistry: teaching basic principles with visual demonstrations. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29, 60-65, 2001.

DEMAS, J. N.; and CROSBY, G. A. The Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review. *Journal of Physical Chemistry.*, 1971, **75**, 991.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as diagnostic tool. A review. *Talanta*, 51, 415-439, 2000.

DZIEGIELEWSKI, J.; SLUSARSKI, B., KONITZ, A.; SKLADANOWSKI, A.; KONOPA, J. Intercalation of imidazoacridinones to DNA and its relevance to cytotoxic and antitumor activity. *Biochemical Pharmacology*, 63, 1653-1662, 2002.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences*, v.22, p. 462-467, 1997.

FERREIRA, E.C. & ROSSI, A.V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo de aplicação da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova*, vol.5, n.6, 1003-1011, 2002.

GABIUS, H-J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H.C. The sugar code: functional lectonomics. *Biochimica and Biophysical Acta*, 1572, 165-177, 2002.

GARCÍA-CAMPAÑA, A.M.; GÁMIZ-GRACIA, L.; BAEYENS, W.R.G.; BARRERO, F.A. Derivatization of biomolecules for chemiluminescent detection in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography b*, 793, 49-74, 2003.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochemica* (2010).

GUIMARÃES, M.T.; MELO-JÚNIOR, M.R.; COSTA-SILVA, R.B.; CAVALCANTI, C.L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Estudo Comparativo da Expressão de carboidratos no Sistema Ovoculoma Hepático na Esquistossomose Humana e Experimental. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. v. 67, p.57-61, 2008.

HAVT, A.; TOYAMA, M.H.; NASCIMENTO, N.R.F.; TOYAMA, D.O.; NOBRE, A.C.L.; MARTINS, A.M.C.; BARBOSA, P.S.F.; NOVELLO, J.C.; BOSCHERO, A.C.; CARNEIRO, E.M.; FONTELES, M.C.; MONTEIRO, H.S.A. A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 130-141, 2005.

HEIDEN, M.G.V.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* Vol. 324, 22, May 2009.

IKI, N.; HORIUCHI, T.; OKA, H.; KOYAMA, K.; MOROHASHI, N.; KABUTO, C.; MIYANO, S. Energy transfer luminescence of Tb³⁺ ion complexed with calix[4]arenetetrasulfonate and the thia and sulfonyl analogue. The effect of bridging groups. *Journal of the Chemistry Society, Perkin Transactions. 2*, 2219–2225, 2001.

JÁCOME-JÚNIOR, A.T. Emprego e caracterização de uma nova sonda molecular de lectinas conjugadas a um derivado de acridina (IP-29) no diagnóstico de patologias clínicas. Tese (doutorado em Química) – Universidade Federal de Pernambuco, 107 p. 2010.

KALTENBACH, M.S.; ARNOLD, M.A. Acridinium ester chemiluminescence: pH dependent hydrolysis of reagents and flow injection analysis of hydrogen peroxide and glutamate. *Mikrochimica Acta*, 108, 205-219, 1992.

KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORREIA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers*. 26: 219-230, 1995.

KELLY, S.M.; JESS, T.J.; PRICE, N.C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751: 119 – 139, 2005.

KRICKA, L.J. Clinical applications of chemiluminescence. *Analytica Chimica Acta* 500, 279–286, 2003.

KRZYMINSKI, K.; ROSHAL, A.D.; ZADYKOWICZ, B.; BIALK-BIELINSKA, A.; SIERADZAN, A. Chemiluminogenic properties of 10-methyl-9-(phenoxy-carbonyl)acridinium cations in organic environments. *Journal of Physical Chemistry A*, 114, 10550-10562, 2010.

KRZYMINSKI, K.; OZOG, A.; MALECHA, P.; ROSHAL, A.D.; WROBLEWSKA, A.; ZADYKOWICZ, B.; BLAZEJOWSKI, J. Chemiluminogenic features of 10-methyl-9-(phenoxy-carbonyl)acridinium trifluoromethanesulfonates alkyl substituted at the benzene ring in aqueous media. *Journal of Organic Chemistry*, 76, 1072-1085, 2011.

KRZYMINSKI, K.; ROSHAL, A.D.; NIZIOLEK, A. Spectral features of substituted 9-(phenoxy-carbonyl)-acridines and their protonated and methylated cation derivatives. *Spectrochimica Acta Part A* 70, 394-402, 2008.

KUMALA, S.; SUOMI, J. Current status of modern analytical luminescence methods. *Analytica Chimica Acta*, 500, 21-69, 2003.

LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 4th Printing., Springer, XXVI, 954 p. 2006.

LAW, S.T.; MILLER, T.; PIRAN, U.; KLUKAS, C.; CHANG, S.; UNGER, J. Novel polysubstituted aryl acridinium esters and their use in immunoassay, *J. Biolumin. Chemilumin.* 4: 88–98, 1989.

LEHNINGER, Albert L.; NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4.ed. São Paulo: Sarvier, 2006. 1202 p.

LICHTMAN, J.W.; CONCHELLO, J-A. Fluorescence microscopy. *Nature methods*, vol. 2, N° 12, december, 2005.

LIMA, A.L.R.; CAVALCANTI, C.C.B.; SILVA, M.C.C.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; BELTRÃO, E.I.C.; CORREIA, M.T.S. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2010.

LÓPEZ-LÁZARO, M. A New View of Carcinogenesis and an Alternative Approach to Cancer Therapy. *Mol med* 16 (3 - 4) 144-153, march - april 2010.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1383, 9-36, 1998.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (*BmoLL*) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part A 146, 486-498, 2007.

MACIEL, E.V.M.; ARAÚJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32: 57-60, 2004.

MAHMOOD, T.; PAUL, A.; LADAME. Synthesis and Spectroscopic and DNA-Binding Properties of Fluorogenic Acridine-Containing Cyanine Dyes. *Journal Organic Chemistry*, 75, 204-207, 2010.

McCAPRA, F. Chemical mechanisms in bioluminescence. *Accounts of Chemical Research*, volume 9, number 6. June, 1976.

MELO-JÚNIOR MR, ARAÚJO FILHO JLS, PATÚ VJRM, BELTRÃO EIC, CARVALHO JR LB. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 42:455-460, 2006.

MELO-JÚNIOR MR, TELLES ADRIANA MS, ALBUQUERQUE FEB, PONTES-FILHO NT, CARVALHO JR LB, BELTRÃO EIC. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2: 123-125, 2004.

MELO-JÚNIOR, M.R.; CAVALCANTI, C.L.B.; PONTES FILHO, N.T.; CARVALHO JR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. Lectin staining patterns in human gastric mucosae with and without exposure to *Helicobacter Pylori*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39:1-7, 2008.

MOCZAR, I.; HUSZTHY, P.; MEZEL, A.; KADAR, M.; NYITRAI, J.; TOTH, K. Synthesis and optical characterization of novel azacrown ethers containing an acridinone or an N-methylacridinone unit as potential fluorescent chemosensors. *Tetrahedron* 66, 350-358, 2010.

MOLONEY, G.P.; KELLY, D.P.; MACK, P. Synthesis of acridine-based DNA Bis-intercalating agents. *Molecules*, 6, 230-243, 2001.

MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; FOOK, J.M.S.L.L.; DIAS, A.S.F.; MONTEIRO, N.K.V.; RIBEIRO, J.K.C.; MOURA, G.E.D.D.; MACEDO, L.L.P.; SANTOS, E.A.; SALES, M.P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 145: 517-523, 2006.

NATRAJAN, A.; SHARPE, D.; COSTELLO, J.; JIANG, Q. Enhanced immunoassay sensitivity using chemiluminescent acridinium esters with increased light output. *Analytical Biochemistry* 406, 204-213, 2010.

NOVA, S.P. V.; PEREIRA, G.A.L.; SÁ, G.F.; ALVES JÚNIOR, S. Síntese, caracterização e propriedades espectroscópicas de criptatos de lantanídeo. *Química Nova*, Vol.27, Nº. 5, 709-714, 2004.

OPPENHEIMER, S.B., ALVAREZ, M., NNOLI, J. Carbohydrate-based experimental therapeutics for cancer, HIV/AIDS and other diseases. *Acta histochemica* 110: 6-13, 2008.

OPPENHEIMER, S.B. Cellular basis of cancer metastasis: a review of fundamentals and new advances. *Acta Histochemica*, 108:327-34, 2006.

PETROSSIAN, K.; BANNER, L.R.; OPPENHEIMER, S.B. Lectin binding and effects in culture on human cancer and noncancer cell lines: examination of issues of interest in drug design strategies. *Acta Histochemica*, 109: 338-42, 2007.

PEUMANS, W.J; VAN DAMME, E.J.M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. *Trends in Food Science & Technology*, Vol. 7, April 1996.

RÊGO, M. J. B. M. ; CORDEIRO, M. F. ; Cavalcanti, C.L.B. ; BELTRÃO, E. I. C. Análise da expressão de carboidratos no estroma do carcinoma ductal invasivo da mama e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos. *Revista Brasileira de Mastologia*, v. 20, p. 109-114, 2010.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H-J.. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal*. 18, 589-613, 2001.

SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F.; COSTA, M.F.D. Quimioluminescência e Bioluminescência. *Química Nova*, 16 (3): 200-209, 1993.

SANTOS, D.I.S.; GIL, E.S. Fluorimetria na análise farmacêutica: uma revisão. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.7, n.1, p.12-26, 2010.

SANTOS, B.S.; FARIAS, P.M.A.; MENEZES, F.D.; FERREIRA, R.C.; JÚNIOR, S.A.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; CARVALHO-JR, L.B.; BELTRÃO, E.I.C. CdS-Cd(OH)₂ core shell quantum dots functionalized with *Concanavalin A* lectin for recognition of mammary tumors. *Phys. Stat. Sol. (c)* 3, No. 11, 4017–4022 (2006).

SATO, N. Synthesis and properties of new luminescent 10-carboxymethylacridinium derivatives. *Tetrahedron Letters*, vol. 37, N°. 47, pp. 8519-8522, 1996.

SCHULMAN, Stephen G. **Molecular luminescence spectroscopy**. New York: Wiley, 1985.

SCORILAS, A., AGIAMARNIOTI, K., PAPADOPOULOS, K. Novel biotinylated acridinium derivatives: New reagents for fluorescence immunoassays and proteomics. *Clinica Chimica Acta*, 357: 159–167, 2005.

SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, N°. 5, pp. 2753–2764. 2007.

SINHA, S.; MITRA, N.; KUMAR, G.; BAJAJ, K.; SUROLIA, A. Unfolding Studies on Soybean Agglutinin and Concanavalin A Tetramers: A Comparative Account. *Biophysical Journal*, Volume 88, 1300-1310, February 2005.

SMITH, K.; YANG, J-J.; LI, Z.; WEEKS, I.; WOODHEAD, S. Synthesis and properties of novel chemiluminescent biological probes: 2- and 3-(2-Succinimidylloxycarbonyl)ethylphenyl acridinium esters. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 203, 72-79, 2009.

SMITH, K.; LI, Z.; YANG, J-J.; WEEKS, I.; WOODHEAD, S. Synthesis and properties of novel chemiluminescent biological probes: substituted 4-(2-succinimidylloxycarbonyl)ethylphenyl 10-methylacridinium-9-carboxylate trifluoromethanesulphonate. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 132, 181-191, 2000.

SOTOMAYOR, M.D.P.T., DIAS, I.L.T., LANZA, M.R.V., MOREIRA, A.B., KUBOTA, L.T. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Química Nova*, vol.3, n.7, 1755-1774, 2008.

VAREJÃO, N.; ALMEIDA, M.S.; CICCIO, N.N.T.; ATELLA, G.C.; COELHO, L.C.B.B.; CORREIA, M.T.S.; FOGUEL, D. Heterologous expression and purification of a biologically

active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochimica et Biophysica Acta*, 1804: 1917–1924, 2010.

WEEKS, I.; BEHESHTI, I.; McCAPRA, F.; CAMPBELL, A.K.; WOODHEAD, S. Acridinium Esters as High-Specific-Activity Labels in Immunoassay. *Clinical Chemistry*, vol. 29, N° 8, 1983.

WOODHEAD, J.S.; WEEKS, I. Chemiluminescence immunoassay. *Pure & Appl. Chem.*, vol. 57, N° 3, PP. 523-529, 1985.

XIAO-JING, M.; SHANG-YOU, X.; JIAN-CHAO, W.; YAN-LIE, W., ZHI-NING, X. Synthesis and Spectroscopic Properties of Acridinium-9-sulfonamides. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, v. 37, n.7, p. 970-974, 2009.

YIN, D.; CUI, D.; GAO, F.; HE, R.; HE, Y.; LIU, Y.; SHEN, D.; WU, M. A rapid and sensitive chemiluminescent immunoassay of total thyroxin with DMAE.NHS-labeled, J. *Immunoassay Immunochem.* 29: 257–265, 2008.

ZHAO, L.; SUN, L.; CHU, X. Chemiluminescence immunoassay. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 4, 2009.

ANEXOS

DERIVADO DE ACRIDINA COMO REVELADOR LUMINESCENTE PARA
IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES (IP-81)

RELATÓRIO DESCRITIVO

5

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se à síntese de derivado de acridina luminescente (IP-81), produção de conjugado com biomoléculas por meio da ligação com IP-81, e aplicação do conjugado obtido na identificação e/ou diferenciação de tecidos neoplásicos ou sadios.

Antecedentes da Invenção

Existe um interesse e demanda crescentes por marcadores fluorescentes para uso na marcação e detecção de materiais biológicos. Marcadores fluorescentes são geralmente estáveis, sensíveis e uma ampla faixa de métodos são agora disponíveis para a marcação de biomoléculas. Tipicamente, o espectro de emissão de um marcador fluorescente é uma propriedade característica do composto e a intensidade de tal emissão serve para detectar materiais marcados com tais moléculas fluorescentes.

As acridinas são compostos heterocíclicos contendo aminas secundárias ou terciárias dentro do sistema de anéis que possuem a habilidade de interagir com outros componentes. Por isso, esses compostos podem ser aplicados em diversas áreas como diagnóstico e terapêutica. Entre as características apresentadas por esses compostos, de particular interesse é sua habilidade para interagir com radiação

Ultravioleta-Visível (UV-Vis) por causa de uma absorção relativamente forte de radiação ultravioleta e emissão de radiação na região do visível. Como resultado, derivados de acridina podem ser potencialmente usados como sensores espectrais ou como marcadores fluorescentes. Acridonas eletronicamente excitadas também ocorrem quando oxidantes fortes, por exemplo, peróxido de hidrogênio em meio alcalino reagem com tais compostos. Esses processos abrem possibilidades para o uso dessas entidades como indicadores quimiluminescentes ou parte de sondas fluorescentes.

A patente US2004/0191792, intitulada “Acridone derivatives as labels for fluorescence detection of target materials”, de 30 de setembro de 2004, descreve a produção e aplicação de novos derivados de acridona com tempos de meia vida fluorescente característicos, onde o tempo de vida fluorescente é entendido como o tempo em que a molécula permanece no seu estado excitado após sofrer excitação por uma fonte de energia eletromagnética. Estas moléculas podem ser usadas como reveladores por meio da ligação com moléculas alvo. Esta série de derivados de acridona apresenta diferentes tempos de meia vida, mas iguais comprimentos de onda de excitação e de emissão que permitem aplicações multiparamétricas no mesmo ensaio. No entanto, a aplicação descrita para as moléculas produzidas se restringe à identificação diferencial dos analitos de interesse em análise simultânea por meio da ligação prévia com o revelador, como, por exemplo, em eletroforese.

Já a patente US 2010/0099077 intitulada “Stable acridinium esters with fast light emission”, de 22 de abril de 2010, descreve ésteres de acridina quimiluminescentes com rápida emissão de luz e estabilidade hidrolítica quando

comparados com aqueles utilizados no estado da técnica atual. Tais ésteres não apresentam perda de suas características quando conjugados com anticorpos, podendo ser empregados em imunoenaios. Porém, a invenção se restringe às propriedades quimiluminescentes dos compostos produzidos, sendo que tais moléculas podem ser também valiosas em ensaios fluorescentes. Além disso, esta invenção limita o uso dos derivados de acridina quimiluminescentes à imunoenaios.

Além do uso para produção de compostos empregados em testes diagnósticos, como imunoenaios, a acridina é utilizada para síntese de medicamentos, como antitumorais. Nesse sentido, a patente PI0203747-5, intitulada “Moléculas com atividade antitumoral e processo para sua obtenção”, de 12 de maio de 2004, mostra a utilização da acridina para síntese de moléculas com propriedades terapêuticas, mas não analisam suas propriedades fluorescentes que podem ser exploradas na área de diagnóstico de várias doenças.

Uma aplicação de éster de acridina quimiluminescente é conseguida pela ligação deste a uma classe de proteínas denominadas lectinas que reconhecem especificamente carboidratos livres ou ligados. O conjugado lectina-éster de acridina é adequado para diferenciação entre tecidos neoplásicos malignos ou benignos e tecidos saudáveis, devido uma modificação do padrão de expressão de carboidratos nestes tecidos. Isso mostra que os derivados de acridina são moléculas potenciais para técnicas diagnósticas que empregam tecidos, além de validar os carboidratos como marcadores de células cancerosas.

Os marcadores tumorais são biomoléculas produzidas pelas células cancerosas ou pelo organismo devido à presença do tumor em quantidades significativamente

maiores ou menores que em tecidos normais. Biomoléculas tumor-específico podem ser ativamente secretadas ou produzidas por células tumorais ou liberadas na circulação de pacientes por causa da necrose e apoptose no ambiente tumoral.

A patente US 2011/0045494 A1, intitulada “Cancer detection methods and techniques”, de 24 de fevereiro de 2001, descreve um método de detecção da enzima CYP1B1 em pacientes com câncer. O método descreve essa enzima como um marcador tumoral universal e emprega técnicas, como espectrometria de massa, para detecção do produto produzido após administração oral do substrato específico para enzima citada. O produto da enzima é excretado na urina dos pacientes investigados. Nesse caso, a invenção descredencia uma gama de marcadores tumorais já estabelecidos e que são de valor para diagnóstico e prognóstico do câncer, como os carboidratos, que podem consideravelmente estar alterados nas células tumorais. Além do mais, a invenção usa técnicas de alto custo para identificação do produto produzido pela enzima CYP1B1, o que dificulta a inserção do método na rotina.

A utilização de carboidratos para diagnóstico do câncer é demonstrada na patente US2004/0132118 intitulada “Method of diagnosing breast cancer” de 08 de julho de 2004, descreve um método diagnóstico para câncer de mama. O método descreve o uso de carboidratos em amostras preparadas de tecidos humanos de mama, leite, soro ou plasma, pela identificação da expressão de GalNAc β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1 \rightarrow no terminal não redutor da cadeia ligada ao aminoácido Asparagina. De acordo com o método diagnóstico da invenção, modificações na expressão de carboidratos em células do câncer de mama podem ser utilizadas não só para diagnóstico, mas também para gradação dos níveis de malignidade e prognóstico

pós-cirurgia. Nessa invenção, a identificação do carboidrato de interesse dá-se por meio de lectina específica para o carboidrato supracitado. Nesse caso, as lectinas são conjugadas com a enzima peroxidase e posteriormente reveladas com diaminobenzidina, que é uma substância comprovadamente neurotóxica. Além do
5 risco à saúde, essa metodologia necessita do uso de peróxido de hidrogênio, que em tecidos com câncer estão comprovadamente em níveis elevados, o que atrapalha ou aumenta falsamente a marcação por esse tipo de metodologia.

Nesse mesmo sentido, a patente PI 0503991-6 A “Técnica histoquímica para diagnóstico auxiliar quantitativo de neoplasias baseada na luminescência de lectinas
10 conjugadas com compostos luminescentes” de 29 de maio de 2007, descreve um método para análise de biópsias de tecidos suspeitos de neoplasias benignas e/ou malignas, através do emprego de lectinas conjugadas com compostos luminescentes, em particular compostos orgânicos de terras raras. Tal invenção aponta o potencial da técnica criada para diagnóstico de neoplasias humanas e animais, no entanto o
15 exemplo utilizado para validar o método inventado não inclui os derivados de acridina que são fortemente luminescentes e demonstram alta sensibilidade de detecção.

Nota-se pelo exposto que a maior parte dos derivados de acridina luminescentes produzida é utilizada, quase que exclusivamente, em imunoenaios, enquanto técnicas de identificação tecidual como as citadas anteriormente empregam,
20 na maioria das vezes, enzimas (peroxidase) ou compostos luminescentes que não são derivados da acridina.

Dessa forma, o objetivo da presente invenção é: (i) descrever a síntese de um derivado de acridina (IP-81), (ii) suas propriedades luminescentes, (iii) sua ligação com

biomoléculas adequadas e (iv) aplicação na identificação e/ou diferenciação de tecidos neoplásicos ou sadios. Vale ressaltar que a aplicação é conseguida pela ligação do composto produzido com biomoléculas, como por exemplo, lectina ou anticorpo, que reconhecem determinada molécula alvo no tecido analisado, pois o processo de conjugação não modifica as propriedades luminescentes do derivado de acridina nem tampouco a especificidade da biomolécula de reconhecimento.

O conjugado produzido servirá para análise de tecidos na técnica de histoquímica por meio da análise em microscopia de fluorescência ou qualquer outro aparelho capaz de detectar a luminescência do IP-81. Isto eliminará os riscos à saúde trazidos por substâncias como diaminobenzidina e proporcionará maior acurácia à identificação das estruturas pesquisadas, visto a maior sensibilidade do marcador fluorescente produzido. Assim, os produtos ora propostos por essa invenção se diferenciam dos atualmente empregados na técnica de histoquímica.

15 Descrição da Invenção

Numa primeira modalidade preferida, descreve-se a rota sintética utilizada para obter o IP-81 luminescente, onde a partir de acridina-9-carboxialdeído (AC-2) e dimetilmalonato obtém-se o 2-Acridin-9-ylmethylene-malonic acid dimethyl Ester (IP-81), em meio benzênico e morfolina como catalisador, não se restringindo apenas a este solvente e catalisador, respectivamente. Depois de sintetizado, o IP-81 é submetido à conjugação com uma biomolécula, como proteínas, ácidos nucleicos, enzimas, carboidratos ou outras biomoléculas adequadas para ligação, obtendo-se o conjugado biomolécula-IP81, com posterior aplicação em técnica de histoquímica e avaliação da luminescência emitida.

Para preparação do IP-81, todos os reagentes necessários à síntese são colocados sob agitação em condensador com temperatura igual ou superior a 100 °C. As etapas são acompanhadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD), HPLC ou outra técnica adequada para verificação da formação do produto desejado. Em seguida, O IP-81 é purificado da mistura reacional por cromatografia tipo “flash” em sílica gel 60, com formação de cristais. Porém, não se restringindo apenas a este método de purificação.

O rendimento da reação foi de 33,4%, ponto de fusão do IP-81 132-134°C, peso molecular 321. O produto purificado foi submetido a análises de cristalografia, espectroscopia de IV, MS e RMN ^1H e ^{13}C , tais técnicas confirmam a estrutura química proposta para o IP-81 que está mostrada na Figura 1.

Numa segunda modalidade preferida, a presente invenção descreve as propriedades luminescentes do IP-81. De forma geral, a avaliação das propriedades luminescentes do IP-81 é feita solubilizando o composto em acetonitrila, ou em qualquer outro solvente em que o composto mostre solubilidade, como Dimetilformamida (DMF) ou Dimetilsulfóxido (DMSO), e verificação da absorção em espectrofotômetro UV-Vis por varredura. Em seguida, para obtenção dos espectros de emissão, utilizam-se os picos de absorção (tabela 1) como comprimentos de onda de excitação em espectrofluorímetro. Por meio da fixação do comprimento de onda de excitação, a emissão é varrida por uma faixa selecionada de acordo com o composto analisado. Para obtenção dos espectros de excitação, é fixado o comprimento de onda de emissão e faz-se a varredura da excitação. O isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi

utilizado como padrão nos testes realizados. Os dados referentes a cada composto analisado estão presentes na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros utilizados na espectroscopia de luminescência

Composto	Solvente	λ Excitação (nm)	Varredura (nm)	Banda de Excitação	Banda de Emissão	Resposta	Sensibilidade
IP-81	Acetonitrila	360	380-600	5 nm	10 nm	Média	Alta
IP-81	DMF	360	380-600	5 nm	5 nm	Média	Alta
IP-81	DMSO	360	380-600	5 nm	10 nm	Média	Alta
IP-81	Metanol	360	380-600	2,5 nm	5 nm	Média	Alta
FITC	Acetonitrila	495	510-550	5 nm	10 nm	Média	Alta
FITC	Tampão PBS	495	510-550	2,5 nm	2,5 nm	Média	Média
FITC	DMSO	495	510-550	5 nm	5 nm	Média	Alta
FITC	Metanol	495	510-550	2,5 nm	2,5 nm	Média	Alta
ConA-IP81	PBS	360	380-600	5 nm	10nm	Média	Alta
ConA-FITC	PBS	495	510-550	5 nm	5 nm	Média	Média

5

O IP-81 mostra fluorescência em todos os solventes testados, inclusive quando diluído em tampão fosfato de sódio 0,01 M contendo NaCl 0,15 M (PBS). A Figura 2 mostra o espectro de emissão do IP-81 em acetonitrila concentração $1,55 \times 10^{-5}$ M quando excitado em 360 nm, porém o composto mostra excitação em outros
 10 comprimentos de onda e este perfil de excitação varia de acordo com o solvente utilizado e concentração da solução analisada. Na figura 2 podem ser visualizados os espectros de absorção, excitação e emissão do IP-81.

A Alta sensibilidade é comum para praticamente todos os métodos luminescentes e não é extraordinário ter limites de detecção mesmo em níveis sub-
 15 picomolar. Além disso, a intensidade *versus* pontos de calibração de concentração

pode ser linear por várias ordens de magnitude de concentração. A figura 3 mostra a curva de calibração do IP-81 diluído em tampão PBS com linearidade e intensidade, em baixas concentrações, características de compostos luminescentes.

Na terceira modalidade preferida, tem-se a conjugação do IP-81 a biomoléculas de interesse. Visto que o IP-81 possui grupos ésteres, ele pode se ligar a determinadas biomoléculas, como lectina, por meio de um processo de conjugação. A ligação de moléculas ligantes, tais como lectina ou outras proteínas, a derivados de acridina já é bem estabelecida e esse processo é comumente chamado de reação de conjugação e a proteína marcada é chamada de conjugado. Tipicamente, no caso das proteínas, um grupo reativo, no marcador, reage com uma amina da proteína para formar uma ligação amida.

De forma geral, o conjugado formado pela ligação do IP-81 com a lectina *Concanavalina A* (ConA), ou qualquer outro tipo de lectina, pode ser obtido pela incubação de uma quantidade determinada da lectina com um volume desejado do IP-81 em um solvente no qual o IP-81 mostre solubilidade. A mistura pode ser incubada por tempo mínimo de 10 minutos a qualquer temperatura igual ou superior a 4 °C. Os conjugados ConA-IP81 foram caracterizados por meio de cromatografia de exclusão de tamanho; dicroísmo circular, fluorescência e teste de atividade hemaglutinante. Os resultados obtidos a partir destas técnicas indicam que a estrutura terciária da lectina não sofre alterações no processo de conjugação, mantendo sua atividade de reconhecimento de carboidratos inalterada.

O perfil de eluição da mistura de conjugação do IP-81 com ConA (Figura 4) mostra a sobreposição dos picos protéico e fluorescência, o que indica a ligação entre a proteína e o IP-81. O conjugado ConA-IP81 obtido possui espectro de emissão característico quando excitado em 360 nm, além de mostrar fluorescência equivalente ao conjugado ConA-FITC (Figura 5) quando ambos são excitados nas condições pré-determinadas para cada composto (Tabela 1), mas em mesma concentração protéica. Para averiguar se a sobreposição observada não é provocada apenas pela saída simultânea dos compostos submetidos à conjugação, a ConA e o IP-81 foram misturados e aplicados imediatamente na coluna com posterior eluição da mistura. Não houve sobreposição de fluorescência e proteína, e o pico de proteína não exibiu fluorescência quando excitado em 360 nm.

Além de manter emissão semelhante ao composto isolado, o conjugado produzido também mostra excitação nos mesmos comprimentos de onda do IP-81 isolado, o que indica que o processo de conjugação, além de não alterar a estrutura da proteína, também não modifica as propriedades luminescentes do IP-81.

Numa quarta modalidade preferida, a presente invenção apresenta a utilização do conjugado lectina-IP81 em testes de identificação e/ou diferenciação de tecidos transformados e/ou sadios humanos ou animais. A técnica de aplicação de tais sondas para identificação de carboidratos em tecidos já está bem estabelecida. Depois de ser preparado adequadamente, o tecido investigado é incubado com uma determinada quantidade de conjugado (ConA-IP81, por exemplo) suficiente para cobrir toda a área tecidual. Após o período de incubação, o tecido é lavado com tampão PBS ou

qualquer solução capaz de retirar o conjugado não ligado. Posteriormente, o tecido é analisado e as marcações protocoladas. Para assegurar que a marcação visualizada é devido ligação conjugado-tecido, é feito controle negativo com inibição prévia dos sítios de reconhecimento da lectina com o carboidrato específico que no caso da ConA

5 é a α -D-glicose.

O conjugado ConA-IP81 foi testado em tecidos normais e transformados de pele e mama. Em todos estes, há marcação, o que indica o potencial de aplicação do conjugado produzido. A análise da luminescência foi feita por meio de microscopia de fluorescência e luminômetro, o que não exclui a utilização de qualquer outro aparelho
10 capaz de detecção ou a análise da luminescência do composto. Os resultados obtidos indicam o potencial de aplicação tanto do composto produzido quanto do conjugado obtido a partir do IP81 com biomolécula desejada que seja passível de ligação.

15

20

25

REIVINDICAÇÕES

1. Processo na forma de derivado de acridina como revelador luminescente caracterizado por identificar biomarcadores em tecidos neoplásicos ou sadios, humanos ou animais.
5
2. Processo na forma de síntese de derivado de acridina (IP-81) tal como descrito na reivindicação 1 caracterizado por rota sintética iniciar-se com acridina-9-carboxialdeído (AC-2) e dimetilmalonato, com fórmula química 2-Acridin-9-ylmethylene-malonic acid dimethyl ester.
- 10 3. Produto na forma de IP-81 tal como descrito nas reivindicações 1 e 2 caracterizado por apresentar propriedades luminescentes por meio de luz emitida quando excitado em comprimento de onda desejado.
4. Produto na forma de IP-81 tal como descrito na reivindicação 3 caracterizado por apresentar luminescência em 426 nm quando excitado em 306 nm.
- 15 5. Produto na forma de IP-81 tal como descrito na reivindicação 3 caracterizado por apresentar luminescência em 426 nm quando excitado em 320 nm.
6. Produto na forma de IP-81 tal como descrito na reivindicação 3 caracterizado por apresentar luminescência em 426 nm quando excitado em 360 nm.
- 20 7. Produto na forma de IP-81 tal como descrito na reivindicação 3 caracterizado por apresentar luminescência em 426 nm quando excitado em 398 nm.
8. Produto na forma de conjugado biomolécula-IP81 tal como descrito na reivindicação 1 caracterizado por ligar-se a moléculas alvo de interesse e permitir a identificação desta ligação por meio da luz emitida pelo IP-81.
- 25 9. Produto na forma de conjugados lectinas-IP81 tal como descrito na reivindicação 8 caracterizado por serem compostos formados por quaisquer lectinas, naturais ou sintéticas, ligadas covalentemente, ou por meio de interações fracas ao IP-81, com finalidade de uso para reconhecimento de biomarcadores teciduais ou séricos.

10. Produto na forma de conjugado *Concanavalina A* -IP81 tal como descrito na reivindicações 8 e 9 caracterizado por identificar resíduos de D-manose/D-glicose presentes nos tecidos transformados.

11. Produto na forma de conjugado *Concanavalina A* -IP81 tal como descrito na reivindicação 8, 9 e 10 caracterizado por identificar resíduos de carboidratos alvo em tecidos de câncer de mama e de pele.

DERIVADO DE ACRIDINA COMO REVELADOR LUMINESCENTE PARA BIOMARCADORES (IP-81)

RESUMO

A presente invenção refere-se à síntese do derivado de acridina (IP-81), ligação
5 deste a uma biomolécula, como proteínas, anticorpos, enzimas, ácidos nucleicos
dentre outros, para produção de um conjugado biomolécula-IP81 e posterior aplicação
em técnica de histoquímica para análise de biomarcadores em tecidos saudáveis ou
transformados.

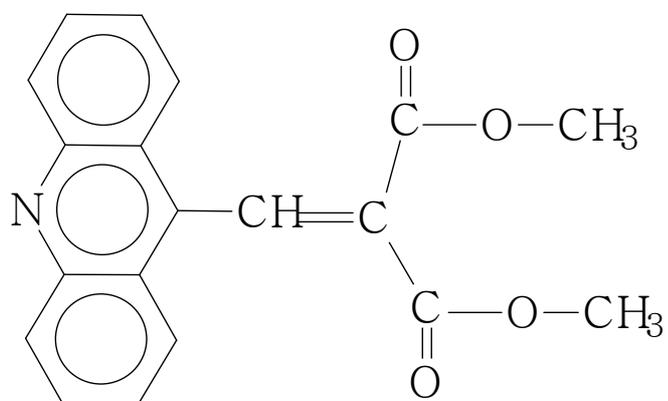
Figura 1

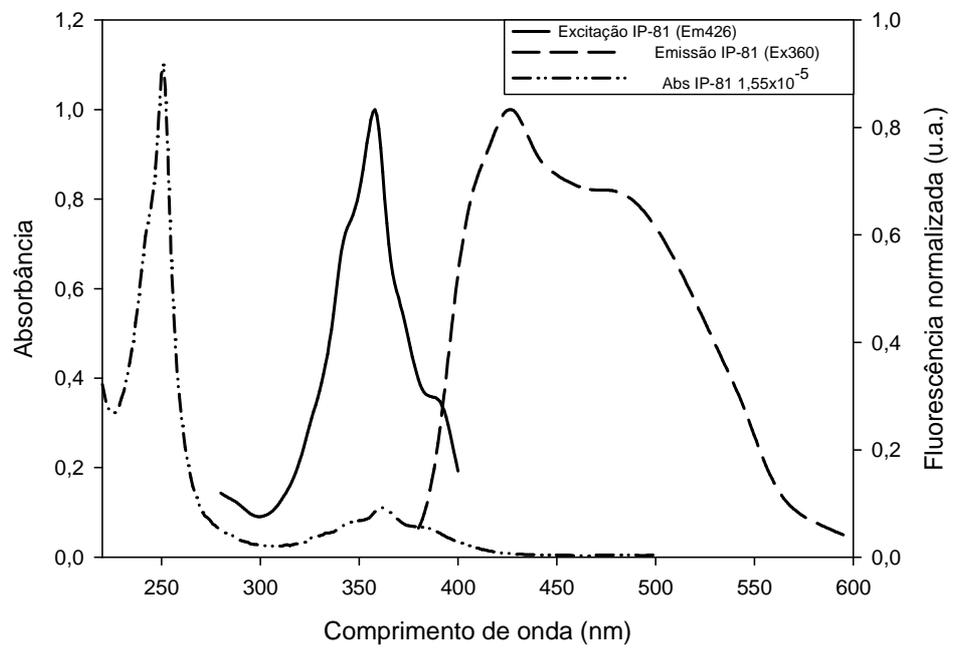
Figura 2

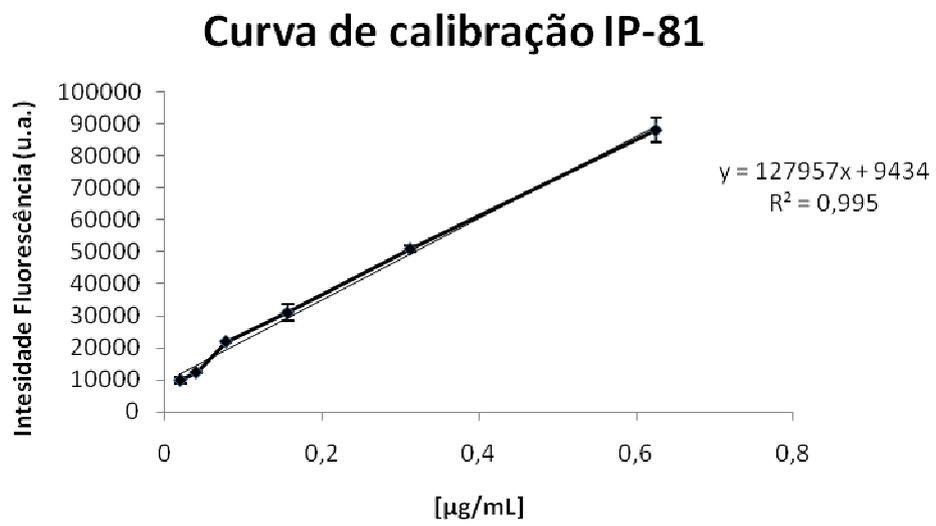
Figura 3

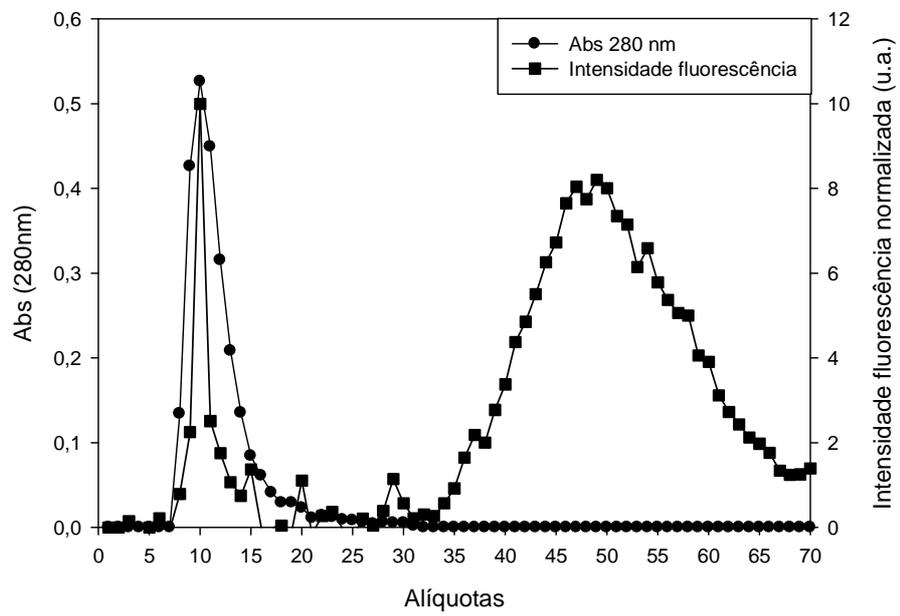
Figura 4

Figura 5