

ESTUDO DE FOTOSENSIBILIZANTES AGREGADOS A PROTEÍNAS COM POTENCIAL USO NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Carolina de Siqueira Gonçalves¹, Maria Angélica G. Cardoso², Milton Beltrame Jr¹

1. Universidade do Vale do Paraíba /Laboratório de Síntese Orgânica -Av: Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12.244-000, SJC, SP. carols.g@directnet.com.br

2. Universidade do Vale do Paraíba /Laboratório de Imunologia -Av: Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP: 12.244-000, SJC, SP. magcard@univap.br

Resumo - Na terapia fotodinâmica (TFD) uma droga fotossensibilizante, luz e oxigênio são usados para induzir a morte da célula tumoral por apoptose ou por necrose. O uso de drogas mais específicas para alvos celulares, como os tumores, tem sido objeto de estudo em alguns trabalhos onde demonstram que as drogas ligadas covalentemente a ligantes de específico reconhecimento podem aumentar sua eficiência. Exemplos desses ligantes incluem anticorpos monoclonais, hormônios, lipoproteínas entre outros. Neste trabalho foi estudada a síntese de fotossensibilizantes que possam ser ligados a proteínas para posterior estudo bioquímico com ênfase na aplicação da TFD.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, proteínas, receptor de superfície, ftalocianina.

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um processo fotoquímico que mostra interações complexas entre luz, concentração do fotossensibilizante e concentração de oxigênio (LANGMACK, 2001). A ativação do fotossensibilizante pela luz favorece a formação de espécies radicais derivadas do oxigênio molecular, dando início a uma cascata de reações bioquímicas. Essas reações resultam em danos microvasculares, morte da célula tumoral e indução de uma resposta imune inflamatória seguida, eventualmente, por necrose, apoptose ou regressão do tumor (BRASSEUR, 1999).

O aumento da eficácia da TFD pode ser conseguido obtendo-se uma melhor seletividade do fotossensibilizante no tecido alvo. Uma das maneiras seria a agregação do fotossensibilizante a ligantes como: anticorpos monoclonais, lipoproteínas, entre outros (SUTTON, 2003).

Conjugações covalentes de fotossensibilizantes a ligantes de reconhecimento específico favorecem a internalização da droga pelos receptores de superfície celular denominados de "scavenger receptor", aumentando a seletividade da TFD (BRASSEUR, 1999).

O objetivo principal deste trabalho é estudar as possibilidades de síntese de uma ftalocianina que apresente o radical amino (NH₂), a fim de facilitar a agregação do fotossensibilizante a uma molécula protéica (Figura 1).

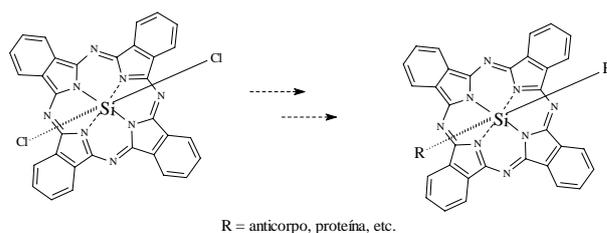


Figura 1: Exemplo de ftalocianina cujo átomo de Cloro (Cl) pode ser substituído por um radical (R) representado.

Materiais e Métodos

Preparação da nitro-ftalocianinato de zinco: para preparação da nitro-ftalocianinato de zinco foi utilizado 1,2 dicianobenzeno, nitroftalonitrila, diazabicicoundeceno (DBU), acetato de zinco e pentanol seco. A reação foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e a mistura reacional foi submetida a agitação constante e refluxo.

Após, 6 horas de refluxo, a solução foi concentrada por rotaevaporação do solvente à pressão reduzida e o produto foi armazenado.

Secagem do pentanol: Foi obtida pelo tratamento com hidreto de cálcio e posterior destilação.

Purificação: Para purificação da nitro-ftalocianinato de zinco foi utilizadas cromatografia em coluna de sílica gel e cromatografia em camada delgada (ccd).

Após purificação a droga foi rotaevaporada para a retirada dos eluentes usados na cromatografia.

Preparação da amino-ftalocianinato de silício:
 Método 1: Foi utilizado silício ftalocianina sob refluxo de amônia usando um condensador de “dedo frio” a -78°C . Após refluxo a mistura reacional foi dissolvida com metanol e rotaevaporada. Após rotaevaporação foi feito extração através de um equipamento do tipo Soxhlet.

Método 2: Foi utilizado silício ftalocianina e sódio sob refluxo de amônia usando um condensador de “dedo frio” a -78°C . Após refluxo a mistura reacional foi dissolvida com metanol e rotaevaporada. Após rotaevaporação foi feito extração através de um equipamento do tipo Soxhlet.

Resultados

Após a reação da zinco ftalocianina com nitroftalonitrila, foi obtido 241,7mg de nitro-ftalocianinato de zinco, com conseqüente extração do tipo Soxhlet, utilizando-se como solvente o tetrahydrofurano (THF), para posterior hidrogenação e obtenção do radical amino que é o nosso objetivo principal.

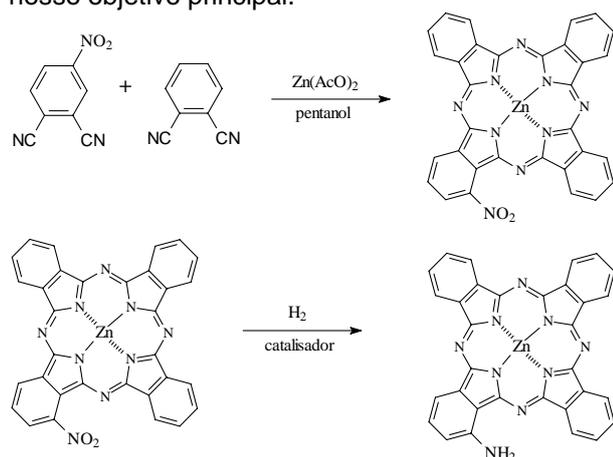


Figura 2: Os compostos 1,2 diciano benzeno e 1,2 diciano 4 nitro benzeno na presença de acetato de zinco e pentanol resultou na formação do nitro-ftalocianinato de zinco. O próximo passo será reagir o composto obtido com um catalisador para a obtenção do radical amino (NH_2)

Na reação com amônia líquida foram utilizados dois métodos para obtenção da amino-ftalocianinato de silício.

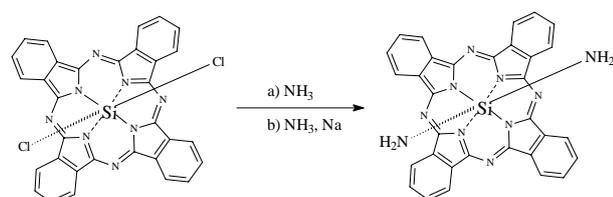


Figura 3: Reação ilustrando a obtenção do radical amino associado ao silício (Si).

No primeiro método (a), após 6 horas de refluxo e constante reposição de gelo seco, o sistema foi desligado e a mistura reacional foi dissolvida em metanol com auxílio do ultra-som e posteriormente submetida à extração do tipo Soxhlet utilizando como solvente clorofórmio. O rendimento da droga foi de 22,5 mg.

No segundo método (b), após 6 horas de refluxo e constante reposição de gelo seco, o sistema foi desligado e a mistura reacional foi dissolvida em metanol com auxílio do ultra-som e posterior extração do tipo Soxhlet.

Para purificação da amino-ftalocianinato de silício estão sendo utilizadas cromatografia em camada delgada, para posterior aplicação da cromatografia em coluna de sílica gel e obtenção do radical amino.

Discussão

O objetivo deste estudo é sintetizar uma ftalocianina que apresente uma melhor seletividade no tecido alvo, através da agregação a uma proteína.

Na preparação da nitro-ftalocianinato de zinco foi necessária a utilização de um sistema de condensador de refluxo sob atmosfera de nitrogênio, para que a mistura reacional possa ser posteriormente submetida à hidrogenação e conseqüente obtenção do radical amino, facilitando a ligação da proteína (Figura 2).

Na preparação da amino-ftalocianinato de silício, foram utilizados dois métodos, ambos com condensador de dedo frio e constante reposição de gelo seco, mantendo o sistema à -78°C .

No primeiro método a amônia condensa e reage com o radical da droga para obtenção do grupo amino (Figura 3).

No segundo método foi utilizado o sódio, que é um metal extremamente reativo, facilitando a reação entre os ligantes da droga, para obtenção do radical amino (Figura 3). Nesse caso a obtenção da amino-ftalo será imediata, já que não será necessário o processo de hidrogenação mostrado na figura 2.

Tanto para nitro-ftalocianinato de zinco como para amino-ftalocianinato de silício, foi utilizado o método de extração do tipo Soxhlet, para obtenção de uma droga mais pura, retirando-se as impurezas que dificultam as reações seguintes.

Todas os reagentes utilizados nas reações foram obtidas da empresa comercial Sigma-Aldrich.

Conclusão

O uso de proteínas conjugadas à Ftalocianina para obtenção de alvos celulares mais específicos pode ser um dos caminhos para melhorar a distribuição e absorção de fotossensibilizantes na TFD. O receptor do tipo "scavenger" encontrado em alguns tipos celulares, vem apresentando um papel importante, uma vez que apresenta sítio de ligação específico para determinadas moléculas, favorecendo a fagocitose.

Após agregação da proteína à ftalocianina, pretendemos fazer estudos celulares, para que possamos qualificar a eficácia de nosso produto de síntese.

Agradecimentos

A Fundação de amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

A Univap pelo seu apoio financeiro e incentivo.

Referências

-ALMEIDA, R. D.; MANADAS, B. J.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, C. B. Intracellular Signaling Mechanisms in photodynamic Therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**. V.1704, p.59-86, 2004.

-BRASSEUR, N.; LANGLOIS, R.; LA MADELEINE, C.; OUELLET, R.; VAN LIER, J. E. Receptor-Mediated Targeting of Phtalocyanines to Macrophages Via Covalent Coupling to Native or Maleylated Bovine Serum Albumin. **Photochemistry and Photobiology**. V.69, n.3, p. 345-352, 1999.

-GOLLNICK, S.O. Role of cytokines in photodynamic therapy- induced local and systemic inflammation. **British Journal of Cancer**. V. 88, p. 1772- 1779, 2003.

-HAMBLIN, M.R.; MILLER, J. L.; ORTEL, B. Scavenger-Receptor Targeted Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**. V.72, n.4, p.533- 540, 2000.

-LANGMACK, K.; MEHTA, R.; TWYMAN, P.; NORRIS, P. Topical photodynamic therapy at low fluence rates- theory and practice. **Journal of Photochemistry and Photobiology**. V. 60. p. 37-43, 2001).

- SUTTON, J. M.; CLARKE, O. J.; FERNANDEZ, N.; BOYLE, R. W. Porphyrin, Clorin. And Bacterochorin Isothiocyanates: Useful Reagents for the Synthesis of Photoactive Bioconjugates. **Bioconjugate Chemistry**. V.13, p.249-263, 2002.

- BROWN, S.B.; BROWN E.A.; WALKER L. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, V.5, p. 497-508, 2004