

UTILIZAÇÃO DA ESPECTROSCOPIA RAMAN PARA A ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DA ZINCO FTALOCIANINA OCTA-BROMADA

Machado, A.H.A.¹, Braga, F.M.P.², Lobo, A. O.³, Martin, A. A.³, Pelisson, M.M.M.⁴, Beltrame-Jr, M.⁴, Pacheco-Soares, C.², Silva, N.S.¹

¹Laboratório de Biologia Celular & Tecidual – IP&D – UNIVAP. E-mail: nsoares@univap.br

²Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Intracelulares – IP&D – UNIVAP. E-mail: cpsoares@univap.br

³Laboratório de Espectroscopia Vibracional Biomédica – IP&D – UNIVAP. E-mail: amartin@univap.br

⁴Laboratório de Síntese Orgânica – IP&D – UNIVAP. E-mail: beltrame@univap.br

Resumo - A espectroscopia FT-Raman vem sendo comumente utilizada pela indústria farmacêutica para a análise de uma variedade de materiais. O objetivo do presente trabalho é analisar a ocorrência de alterações na concentração da Zinco Ftalocianina Octa-bromada antes e após filtração. Para tal experimento, a Zinco Ftalocianina Octa-bromada (concentração 1mM) foi analisada em um Sistema FT-Raman no Infravermelho 1064 nm. Tal análise é de extrema importância, já que o agente fotossensibilizante utilizado para o tratamento fotodinâmico deve estar estéril no momento da interação com a cultura celular ou com amostras in vivo para que não haja contaminação. Através da análise dos espectros, observou-se que não ocorreram significantes diferenças vibracionais ou espectrais entre o grupo filtrado e não-filtrado, podendo concluir que a concentração final não foi alterada.

Palavras-chave: Ftalocianinas, Espectroscopia Raman, Terapia Fotodinâmica.

Área do Conhecimento: III – Engenharias.

Introdução

Terapia fotodinâmica é uma modalidade terapêutica promissora no campo da medicina (KAPSOKALYVAS et al., 2005). A TFD induz citotoxicidade através da geração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SACZKO et al., 2005).

Entre os mais promissores fotossensibilizantes de segunda geração estão as ftalocianinas (NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004), as quais vêm atraindo muita atenção há décadas devido ao fato de possuírem excelentes propriedades fotoquímicas (LIU et al., 2004), demonstrando excelente localização tumoral e alta eficiência fotodinâmica (FERREIRA et al., 2004; CEBURKOV; GOLLNICK, 2000).

A espectroscopia FT-Raman é baseada no espalhamento inelástico de luz, na qual fótons espalhados trocam energia com a amostra. Comumente, o fóton espalhado perde energia para um modo vibracional da molécula da amostra, levando a uma troca de frequência. A luz de excitação utilizada no FT-Raman está na região infravermelha próxima (YAN et al., 1999). Desde seu descobrimento em 1927, seus efeitos vem atraindo atenção, sendo utilizado como uma

poderosa técnica espectroscópica com diversas aplicações práticas (KNEIPP et al., 1999).

O objetivo do presente trabalho é analisar a ocorrência de alteração na concentração da Zinco Ftalocianina Octa-bromada antes e após filtração.

Materiais e Métodos

Preparo da amostra: A Zinco Ftalocianina Octa-bromada ($ZnPcBr_8$) foi desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica – IP&D/UNIVAP. A solução estoque foi diluída para uma concentração final de 1mM em DMSO (Dimethyl Sulfoxide). Após esta diluição o fotossensibilizante foi dividido em 2 grupos, o primeiro denominado não-filtrado e o segundo filtrado, onde o fotossensibilizante foi esterilizado por filtração através de filtro Millipore (0.22 μ m - Millipore, Bedford, MA, USA). Ambos os grupos foram colocados em um tubo capilar, cujo fundo foi fechado por aquecimento.

Instrumentação: Sistema FT-Raman no Infravermelho 1064 nm. O espectrômetro FT-Raman (BRUKER RFS/100) utiliza um laser de Nd:YAG com comprimento de onda de 1064 nm, e um interferograma para calcular a transformada de

Fourier. Para a coleta dos espectros, as amostras foram posicionadas no porta amostra. Como parâmetros para aquisição a potência do laser incidente na amostra foi ajustada em 25 mW e foram utilizados 300 scans, com um tempo aproximado de 4 minutos por espectro coletado, foram coletados espectros de 3 pontos da superfície de cada amostra. Para a análise dos resultados foi realizada a média aritmética dos três pontos coletados por amostra. O gráfico foi realizado no programa Microcal Origin 7.0.

Resultados

O gráfico 01 apresenta o Espectro Raman da Zinco Ftalocianina Octa-bromada na concentração 1mM não-filtrada.

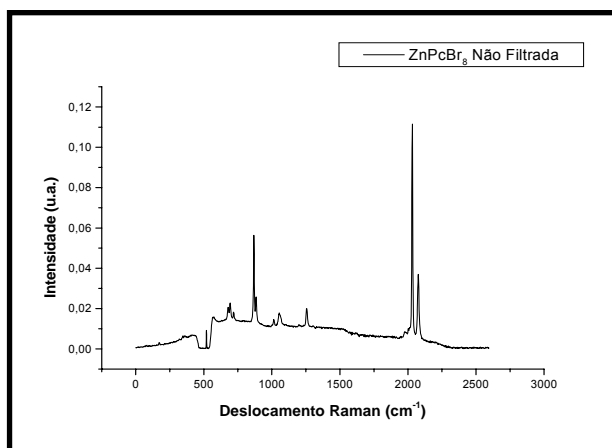


Gráfico 01: Espectro Raman (sistema FT-Raman 1064nm) da ZnPcBr₈ não-filtrada.

O gráfico 02 apresenta o Espectro Raman da Zinco Ftalocianina Octa-bromada na concentração 1mM filtrada.

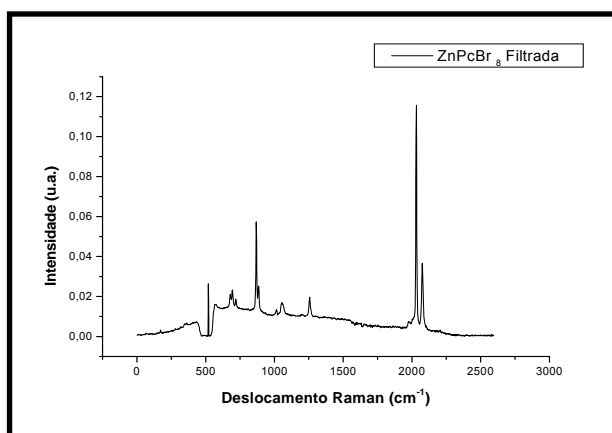


Gráfico 02: Espectro Raman (sistema FT-Raman 1064nm) da ZnPcBr₈ filtrada.

O gráfico 03 apresenta a sobreposição dos dois Espectros Raman da Zinco Ftalocianina Octa-bromada na concentração 1mM, o de coloração preta representa o espectro da ftalocianina não-filtrada e o de coloração vermelha representa o espectro da ftalocianina filtrada.

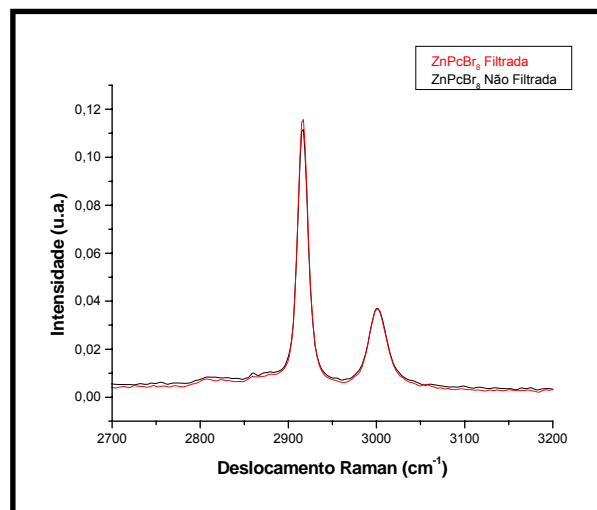


Gráfico 03: Espectro Raman (sistema FT-Raman 1064nm) da ZnPcBr₈ filtrada x não filtrada.

De acordo com os gráficos (01, 02 e 03) pode-se observar que não ocorreu modificações significantes na concentração da Zinco Ftalocianina Octa-bromada antes e após filtragem, observando-se que a intensidade do pico e o deslocamento permaneceram constantes.

Discussão

Um dos fatores fundamentais para a eficácia da Terapia fotodinâmica é a utilização da concentração e do tempo ideal de incubação do fotossensibilizante tanto in vivo quanto in vitro. Diversos estudos em busca de concentrações ideais vêm sendo realizados, como por exemplo os estudos de Machado et al., (2005), no qual foi pesquisada a concentração cuja ftalocianina em estudo possuísse respostas toleráveis de aceitação de viabilidade celular em cultura de células CHO-K1.

A espectroscopia FT-Raman vem sendo comumente utilizada pela indústria farmacêutica para a análise de uma variedade de materiais (FINDLAY; BUGAY, 1998).

A interação da droga terapêutica e suas biomoléculas alvo é de grande interesse tanto para a investigação acadêmica quanto para a farmacêutica (PAPPAS; SMITH; WINEFORDNER, 2000).

Os estudos de Zborowski et al., (2005) corroboram com tais informações, quando analisou as possíveis polimorfismo do maltol (3-hydroxy-2-methyl-4H-pyran-4-one, Hma).

No presente trabalho, utilizou-se a Espectroscopia FT-Raman para analisar se após filtragem a concentração da Zinco Ftalocianina Octa-bromada seria alterada. Tal análise é de extrema importância, já que o agente fotossensibilizante utilizado para o tratamento fotodinâmico deve estar estéril, no momento da interação com a cultura celular ou com amostras in vivo, para que não haja contaminação.

De acordo com os gráficos, pode-se observar que não ocorreu modificações significantes na concentração da Zinco Ftalocianina Octa-bromada antes e após filtragem, observando-se que a intensidade do pico e o deslocamento permaneceram constantes.

Conclusão

Não foram observadas significantes diferenças vibracionais ou espectrais entre o grupo filtrado e não-filtrado, podendo concluir que a concentração final não foi alterada.

Agradecimentos

FAPESP, CNPq, CAPES, UNIVAP-IP&D.

Referências

- CEBURKOV, O; GOLLNICK, H. Photodynamic therapy in dermatology. **European J. Dermatol.** V.10, n.7, p.568-576, 2000.
- FERREIRA, S.D.R.M; TEDESCO, A.C; SOUSA, G; ZÂNGARO, R.A; SILVA, N.S; PACHECO, M.T.T; PACHECO-SOARES, C. Analysis of mitochondria, endoplasmatic reticule and actin filaments after PDT with AlPcS4. **Lasers Med. Sci.** V.18, p.207-212, 2004.
- FINDLAY, W. P; BUGAY, D.E. Utilization of Fourier transform-Raman spectroscopy for the study of pharmaceutical crystal forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* V.16, p. 921-930, 1998.
- MACHADO, A.H.A; TAMIETTI, B.F.P; PELISSON, M.M.M; PACHECO-SOARES, C; BELTRAME-JÚNIOR, M; SILVA, N.S. Localização e citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada em cultura de células CHO-K1. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós Graduação, 1, 2005, São José dos Campos, SP. Anais... São José dos Campos: UNIVAP, 2005. p.120-123.
- KAPSOKALYVAS, D; DIMITRIOU, H; SKALKOS, D; KONSTANTOUDAKIS, G; FILIPPIDIS, G; STIAKAKI, E; PAPAZOGLU,T; KALMANTI, M. Does Hypericum perforatum L.extract show any specificity as photosensitizer for HL-60 leukemic cells and cord blood hemopoietic progenitors during photodynamic therapy? **Journal of Photochemistry and Photobiology B:Biological.** V.80, p.208-216, 2005.
- KNEIPP, K; KNEIPP, H; ITZKAN, I; DASARI, R.R; FELD, M.S. Ultrasensitive Chemical Analysis by Raman Spectroscopy. **Chem. Rev.** V.99, p.2957-2975,1999.
- LIU, M.O; TAI, C.H; SAIN, M.Z; HU, A.T; CHOU, F.I. Photodynamic applications of Phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.** V.165, p.131-136, 2004.
- NUNES, S.M.T; SGUILLA, F.S; TEDESCO, A.C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** V.37, p.273-284, 2004.
- PAPPAS, D; SMITH, B. W; WINEFORDNER, J. D. Raman spectroscopy in bioanalysis. **Talanta.** V.51, p.131-144, 2000.
- SACZKO, J; KULBACKA, J; CHWIKOWSKA, A; DRAG-ZALESINSKA, M; WYSOCKA, T; LUGOWSKI, M; BANAS, T. The influence of photodynamic therapy on apoptosis in human melanoma cell line. **Folia Histochemica et Cytobiologica.** V.43, n.3, p.129-132, 2005.
- YAN, B; GREMLICH, H.U; MOSS, S; COPPOLA, G.M; SUN, Q; LIU, L. A Comparison of Various FTIR and FT Raman Methods: Applications in the Reaction Optimization Stage of Combinatorial. **Chemistry. J. Comb. Chem.** V.1, p.46-54,1999.
- ZBOROWSKI, K; GRYBOS, R; PRONIEWICZ, L.M. Vibrational and computational study on maltol (3- hydroxy-2- methyl-4 h-pyran- 4-one) polymorphism. **Vibrational Spectroscopy.** V.37, p.233-236, 2005.