

SÍNTESE DE ZINCO FTALOCIANINA CONJUGADA À ALBUMINA BOVINA COM POTENCIAL USO NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Carolina de Siqueira Gonçalves¹(PG), Maria Angélica G. Cardoso² (PQ), Milton Beltrame Jr¹ (PQ).

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, beltrame@univap.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 - A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade viável de tratamento de câncer que envolve ativação do fotossensibilizante contido no tecido tumoral, através da luz. Vários sistemas têm sido explorados, na tentativa de melhorar a absorção desses fotossensibilizantes, tais como o uso de lipossomas, proteínas séricas e anticorpos. Neste trabalho foi estudada a síntese da zinco ftalocianina ligada ao radical isotiocianato facilitando a conjugação da albumina bovina para posterior localização subcelular em culturas de células HeLa.

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

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas.

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade viável de tratamento de câncer que envolve ativação pela luz do fotossensibilizante contido no tecido tumoral. [8]. A ativação do fotossensibilizante pela luz favorece a formação de espécies radiculares derivadas do oxigênio molecular (ERO's), dando início a uma cascata de reações bioquímicas (BRASSEUR et al., 1999).

O aumento da eficácia da TFD pode ser conseguido obtendo-se uma melhor seletividade do fotossensibilizante no tecido alvo. Uma das maneiras possíveis é agregar o fotossensibilizante a ligantes como: anticorpos monoclonais, lipoproteínas, entre outros (SUTTON et al., 2002).

A eficácia das características biológicas dos fotossensibilizantes é freqüentemente determinada pela distribuição subcelular entre as células de câncer, a qual, por sua vez, depende das características estruturais e das propriedades físico-químicas do próprio fotossensibilizante.

Uma significativa desvantagem das ftalocianinas é a forte tendência de agregação em soluções, principalmente em água e solventes polares. A agregação das ftalocianinas não somente reduz sua solubilidade em soluções, mas também diminui sua fluorescência, diminuindo conseqüentemente a formação de oxigênio singlete, prejudicando a sua atividade de fotossensibilizante (VAZQUEZ et al., 2007).

O objetivo principal deste trabalho é estudar as possibilidades de síntese da zinco ftalocianina que apresente o radical isotiocianato (-N=C=S), a

fim de facilitar a agregação do fotossensibilizante a albumina bovina (Figura 1).

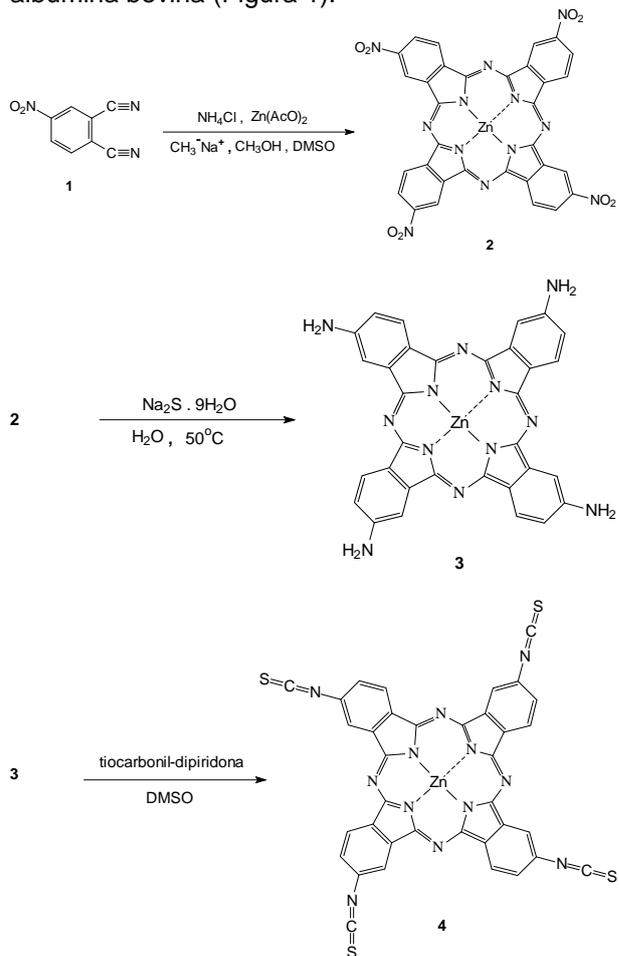


Figura 1: Síntese da zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina

Materiais e Métodos

Preparação da zinco tetra-nitro ftalocianina: para preparação da zinco tetra nitro ftalocianina foi utilizado 2,6 g nitroftalonitrila, 0,875 g cloreto de amônia, 0,715 g acetato de zinco, 0,6 g hidróxido de sódio, 0,1 g metóxido de sódio e 7,5 mL dimetilsulfóxido (DMSO). A reação foi mantida sob atmosfera de nitrogênio sob agitação constante e refluxo por 4 horas a 180 °C.

Depois do refluxo a mistura reacional foi lavada com etanol e água. O resíduo sólido foi solubilizado em acetona para facilitar a sua transferência do funil de placa sinterizada para um balão. O produto foi concentrado por rotaevaporação do solvente à pressão reduzida.

Preparação da zinco tetra-amino-ftalocianina: para preparação da zinco tetra-amino-ftalocianina foi utilizado 0,2 g de *zinco tetra-nitro-ftalocianina*: 1,0 g sulfeto de sódio nonahidratado e 5 mL de água. A mistura reacional foi mantida sob agitação constante por 5 horas a 50 °C.

O produto foi separado por centrifugação e a mistura reacional foi tratada com ácido clorídrico. O precipitado da *zinco tetra-amino-ftalocianina*: hidrocloreto foi separado por centrifugação e tratado com hidróxido de sódio, agitado por 1 hora e centrifugado para separar o produto sólido. O produto foi lavado com água, agitado e centrifugado para retirada das formas livres de hidróxido de sódio e cloreto de sódio.

Preparação da zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina: para preparação da *zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina*: foi utilizado 18,15 mg *zinco tetra-amino-ftalocianina*, 52,5 mg de tiocarbonil dipiridone e 23 mL de DMSO. A reação foi mantida sob atmosfera de nitrogênio e a mistura reacional foi submetida agitação constante por 2 horas à temperatura ambiente.

Após o término da reação, a mistura reacional foi submetida à destilação a vácuo para retirar o DMSO, adicionado acetona para a sua remoção e concentrada por rotaevaporação do produto.

Preparação do bioconjugado de zinco ftalocianina e BSA: para preparação do bioconjugado foi feita uma solução estoque 8,1 mg de zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina em 1 mL de dimetilsulfóxido (chamada solução **A**) e uma solução de 50 mg BSA em 5 mL de solução tampão fosfato pH = 7,0 (chamada solução **B**).

Para reação foi utilizado 5 mL da solução **B** (de BSA) e 760 micro litros da solução estoque **A**. A reação foi mantida por 16 horas, sob agitação constante à temperatura ambiente.

Após reação o bioconjugado foi purificado em coluna empacotada com sephadex usando como

eluente a solução tampão carbonato pH = 9,2 e concentrado por liofilização.

Resultados

Preparação da zinco tetra-nitro ftalocianina: Foi obtido um rendimento de 21% após a purificação. A caracterização foi feita por espectroscopia no infravermelho com pastilhas de KBr e apresentou os sinais em 3098, 1525, 1330, 1090. A espectroscopia no ultravioleta foi feita usando uma solução do fotossensibilizador em DMSO apresentando como sinal mais intenso uma banda de absorção em 700nm

Preparação da zinco tetra-amino-ftalocianina: Foi obtido um rendimento de 17% após a purificação. A caracterização foi feita por espectroscopia no infravermelho com pastilhas de KBr e apresentou os sinais em 3279, 1602, 1401, 1096 cm^{-1} . A espectroscopia no ultravioleta foi feita usando uma solução do fotossensibilizador em DMSO apresentando como sinal mais intenso uma banda de absorção em 742nm.

Preparação da zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina:

Foi obtido um rendimento de 40% após a purificação. A caracterização foi feita por espectroscopia no ultravioleta usando uma solução do fotossensibilizador em DMSO apresentando como sinal mais intenso uma banda de absorção em 700nm.

Discussão

O objetivo deste estudo é sintetizar uma ftalocianina que apresente uma melhor seletividade no tecido alvo, através da conjugação da zinco ftalocianina à albumina bovina.

A obtenção da zinco tetra-amino-ftalocianina ocorreu através da redução da zinco tetra-nitro-ftalocianina utilizando sulfeto de sódio nonahidratado.

No caso da zinco tetra-amino-ftalocianina o complexo de zinco parece sofrer degradação quando é esquentado na presença de solução de hidróxido de sódio.

O material de partida utilizado na preparação da zinco tetra-nitro-ftalocianina foi o 4-nitroftalonitrila de fabricação comercial (Acros Organics). A 4-nitroftalonitrila foi misturada com cloreto de amônio, acetato de zinco e metóxido de sódio para formar depois de 4 horas a zinco tetra-nitro-ftalocianina.

A zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina foi obtida a partir da reação da zinco tetra-amino-ftalocianina com o reagente tiocarbonil-dipiridona em agitação de 2 horas.

Finalmente o bioconjugado foi preparado pela reação da zinco tetra-isotiocianato-ftalocianina com uma solução da proteína. A purificação do bioconjugado foi realizada em coluna de filtração sephadex 25 utilizando tampão fosfato.

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 zinco ftalocianina à albumina bovina, pretendemos fazer estudos com a droga no meio celular e desta forma determinar a sua potencialidade na terapia fotodinâmica.

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

- ACHAR, B. N.; LOKESH, K. S. Studies on tetra-amine phthalocyanines. **Journal of Organometallic Chemistry**. 689 p. 3357- 3361, 2004.
- 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
- 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
- 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, Chlorin. And Bacterochlorin Isothiocyanates: Useful Reagents for the Synthesis of Photoactive Bioconjugates. **Bioconjugate Chemistry**. V.13, p.249-263, 2002.
- VAZQUEZ, M. S.; ORTIZ, J.; NESTEROVA, I. V.; LÁZARO F. F.; SANTOS, A. S.; SOPER, S. A.; VICENTE, G. H. Synthesis and Properties of Cell-Targeted Zn(II)- Phthalocyanine- Peptide Conjugates. **Bioconjugate Chemistry**. V.18, P 410-420, 2007.