

ESTUDO DA SÍNTESE E CITOTÓXICIDADE DE UMA TETRANITRO-FTALOCIANINA DE ZINCO COM POTENCIAL USO EM FOTOTERAPIA

***Emanoel Pedro de Oliveira Silva¹, Maria Angélica Gargione Cardoso²,
Marco Antonio de Oliveira³, Josane Mittmann³, Milton Beltrame Jr.¹***

¹ Laboratório de Síntese Orgânica - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D – Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos – São Paulo – Brasil.

² Laboratório de Imunologia - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D – Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos – São Paulo – Brasil.

³ Laboratório de Parasitologia e Biotecnologia - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – IP&D – Universidade do Vale do Paraíba – São José dos Campos – São Paulo – Brasil

epos@univap.br, magcard@univap.br, oliveirama@univap.br, mittmann@univap.br, beltrame@univap.br

Resumo- A terapia fotodinâmica (TFD) tem-se mostrado uma modalidade clínica promissora para o tratamento de tumores e muitas outras doenças. A terapia consiste na excitação um fotossensibilizante por uma fonte de luz para a produção espécies reativas de oxigênio (EROs) em presença do oxigênio molecular. O presente estudo visa à síntese, caracterização da tetra-nitro ftalocianina de zinco (PcZn4NO₂) e a toxicidade frente à linhagem de macrófagos J774. A caracterização da PcZn4NO₂ foi feita por espectroscopia no infravermelho e na absorção do visível, onde apresentou sinais característicos de ftalocianinas. Quando testado em célula J774, utilizando método colorimétrico MTT, apresentou uma alta citotoxicidade mesmo no escuro e em baixas concentrações. A caracterização da tetra-nitro ftalocianina de zinco apresentou características de um bom agente fotossensível, contudo, a citotoxicidade observada nos ensaios em macrófagos J774, o seu uso na terapia fotodinâmica não é adequado. Várias alternativas podem ser empregadas para diminuir a citotoxicidade apresentada pela PcZn4NO₂, como por exemplo: substituição de seus grupos NO₂, conjugação com proteínas séricas e/ou uso de lipossomas.

Palavras-chave: Ftalocianinas, Terapia Fotodinâmica, Citotoxicidade.

Área do Conhecimento: Engenharia Química

Introdução

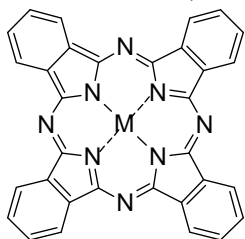
A terapia fotodinâmica (TFD) tem-se mostrado uma modalidade clínica promissora para o tratamento de tumores e muitas outras doenças (MACHADO *et al.*, 2008). A terapia consiste na excitação um fotossensibilizante por uma fonte de luz para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em presença do oxigênio molecular (ÇAMUR, AHSEN, DURMUS, 2011). O fotossensibilizante no seu estado fundamental é excitado ao estado singlete, podendo fluorescer e retornar ao seu estado fundamental, ou realizar um cruzamento intersistemas para o mais baixo estado triplete, onde ocorre a transferência da energia para o oxigênio triplete, que se torna excitado ao estado singlete gerando os EROs que podem reagir com diferentes moléculas, como: lipídios, proteínas e ácidos nucleicos desencadeando processos que levam a morte celular (GADNER *et al.*, 2010; DUTTA *et al.*, 2011).

A excitação do fotossensibilizador depende do comprimento de onda no qual a luz é absorvida, esse fenômeno é geralmente muito seletivo e a eficiência da absorção difere entre as substâncias. Os sistemas biológicos apresentam substâncias

capazes de absorver luz, tais como a melanina e a hemoglobina, que absorvem a luz na região do espectro azul e verde (MILANIĆ *et al.*, 2011). Assim, para a eficiência da TFD sob o aspecto fotofísico, o fotossensibilizador deve ser fotoquimicamente ativo e com alta eficiência de absorção na porção do espectro denominada “janela terapêutica”, que compreende a faixa do vermelho ao infravermelho próximo (600-900nm) (XU *et al.*, 2009; FARAHI *et al.*, 2010). Além desses aspectos, um bom fotossensibilizador deve ser seletivo, predominantemente ao tecido alvo em comparação com os tecidos normais; não deve ser tóxico na ausência de luz e agir eficientemente, produzindo estados tripletes excitados com tempo de vida longo (OCHSNER, 1997).

Como fotossensibilizadores de segunda geração, as ftalocianinas possuem propriedades fotofísicas vantajosas e uns grandes números de estudos demonstram seu potencial para a TFD (ZHU *et al.*, 2006). As ftalocianinas são pigmentos tetraazoindólicas análogas às porfirinas com forte absorção na faixa de espectro luminoso vermelho (670-780nm), cuja estrutura molecular pode ser modificada, inserindo-se ligantes periféricos e/ou axiais, bem como metais entre quatro nitrogênios centrais (Figura 1), com extensa área de

aplicação: industrial, tecnológica e médica (MARGARONE *et al.*, 1996; HOPPER, 2000, OGUNSIPE, NYOKONG, 2005; ÇAMUR, AHSEN, DURMUS, 2011).



M = Al, Ge, Si, Sn, Zn

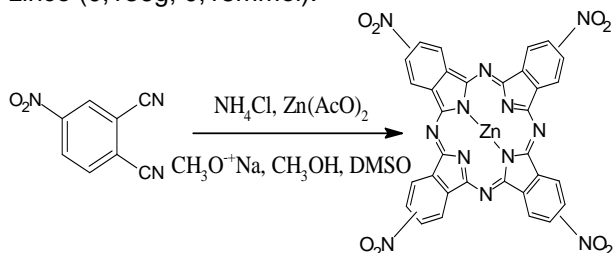
Figura 1: Estrutura molecular das ftalocianinas

O presente trabalho propõe-se a preparação e análise de uma nova ftalocianina de zinco substituída e a avaliação de sua citotoxicidade, visando a síntese de moléculas de alta eficiência para o uso em Terapia Fotodinâmica.

Metodologia

Os reagentes 4-nitroftalonitrila e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos da ACROS®. Cloreto de amônio, Acetato de zinco foram obtidos da Sigma Aldrich®. O metóxido de sódio foi preparado através da reação de metanol com sódio metálico. As análises no espectro UV foram feitas no (PERKINELMER, LAMBDA 25) (300-900nm). Foram obtidos espectros de absorção no infravermelho, em transmitância, em estado sólido. Utilizou-se o espectrofotômetro infravermelho Spectrum GX da Perkin Elmer, no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , para a obtenção dos espectros.

Para a preparação da tetra-nitro ftalocianina de zinco (PcZn4NO_2) foi adicionado ao balão (2,6g, 15mmol), cloreto de amônia (0,875g, 16mmol), acetato de zinco (0,715g, 3,9mmol), hidróxido de sódio (0,6g, 15mmol), metóxido de sódio (0,1g, 1,85mmol) e dimetilsulfóxido (7,5mL). A reação foi mantida em refluxo à 180°C e agitação constante por 4 horas sob atmosfera de N_2 . Em seguida a mistura reacional foi lavada com etanol e água por repetidas vezes. O produto sólido foi dissolvido em acetona e concentrado por rotaevaporação, resultado no composto tetranitroftalocianina de zinco (0,136g; 0,18mmol).



Esquema 1: Preparação da tetra-nitro ftalocianina de zinco.

A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos de retículo-sarcoma da linhagem celular murina J774. As células foram mantidas em garrafas de cultura de 25 cm^3 (BD Falcon, France) em meio RPMI (suplementado com 10% SFB e de 1% antibiótico) a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 .

Para a realização dos ensaios o cultivo foi diluído a uma concentração de 1×10^6 células. mL^{-1} . Em seguida, foram adicionados em placa de 24 poços, e incubadas por 24 horas em estufa 37°C com 5% de CO_2 . Após a adesão foi adicionada a PcZn4NO_2 nas concentrações 0,1-20 μM (em meio RPMI na ausência soro), então, incubados em estufa no escuro a 37°C com 5% de CO_2 por 60 minutos (MACHADO *et al.*, 2008). O sobrenadante foi descartado e acrescido 1mL de meio com soro, em seguida foram incubadas nas mesmas condições por 24 horas.

O número relativo de viabilidade celular foi determinado como descrito anteriormente por Oliveira *et al.* (2007) e Machado *et al.* (2007). Após o período de incubação final de 24 horas, foi então, adicionado a cada poço 20 μL de Methylthiazoletetrazolium (MTT) diluído em PBS (5mg/mL), agitados suavemente e reincubados por 4h (DUTTA *et al.*, 2006). Após o período de incubação, foi retirada a solução de MTT não transformado, adicionado DMSO e agitada vigorosamente de 10-20 minutos, seguido da leitura da densidade óptica em leitor de ELISA (570 nm) (PRIETO *et al.*, 2006). Os valores de absorbância obtidos foram transformados em porcentagem de atividade mitocondrial em relação ao controle através da seguinte fórmula:

$$\% = \frac{\text{ACT-AB}}{\text{ACC-AB}} \times 100$$

Onde, ACT e ACC são a absorbância das células tratadas e absorbância das células controles, respectivamente; AB, absorbância do banco.

Resultados

A PcZn4NO_2 apresenta boa solubilidade em acetona e *N,N*-dimetilformamida (DMF). A Figura 2 mostra o espectro infravermelho da PcZn4NO_2 . O espectro infravermelho da PcZn4NO_2 apresentou sinais em 1611, 1522, 1338, 1087, 752 e 725 cm^{-1} que são característicos das ftalocianinas e sinais em 3091, 1488, 1404, 953 e 677 cm^{-1} que são característicos de grupamento nitrosos aromáticos.

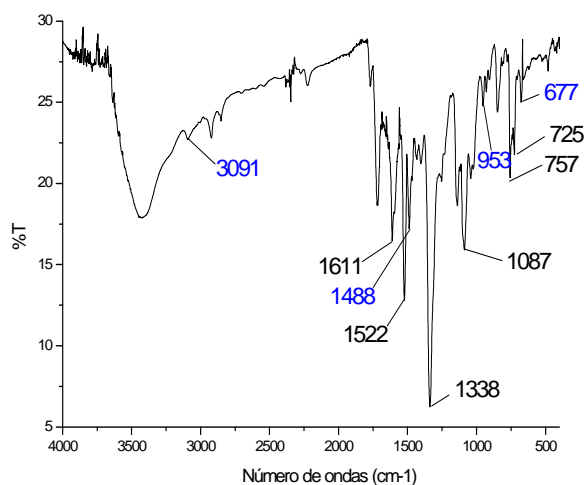


Figura 2: Espectro infravermelho da tetra-nitro ftalocianina de zinco ($PcZn_4NO_2$). Números em azul sinais característicos de grupamento N-O; Números pretos sinais característicos das ftalocianinas.

A Figura 3 mostra o espectro de absorção no visível da $PcZn_4NO_2$ e a ftalocianina de zinco tetrasulfonada ($PcZn_4SO_3H$) comercial. A $PcZn_4NO_2$ apresentou o maior sinal de absorção em 687nm enquanto a $PcZn_4SO_3H$ apresentou 691nm.

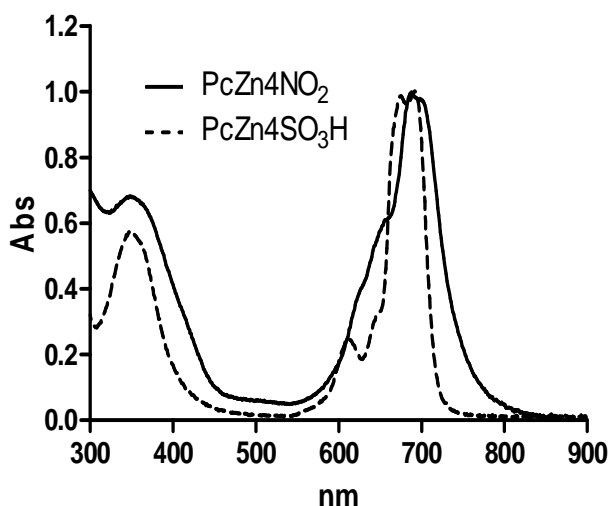


Figura 3: Espectro de absorção normalizado da $PcZn_4NO_2$ (25,8 μ M em DMF) e $PcZn_4SO_3H$ (25,8 μ M em DMF).

Os resultados ilustrados na Figura 4 demonstram que após 24 horas da incubação, nas concentrações utilizadas, a $PcZn_4NO_2$ apresentou citotoxicidade no escuro. As concentrações mais baixas foram mais tóxicas, entretanto, com o

aumento da concentração a viabilidade também aumentava.

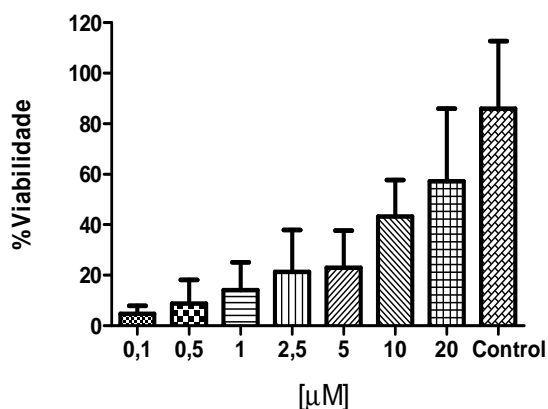


Figura 4: Representação gráfica da citotoxicidade no escuro após 24 horas de incubação com $PcZn_4NO_2$ nas concentrações 1-20 μ M.

Discussão

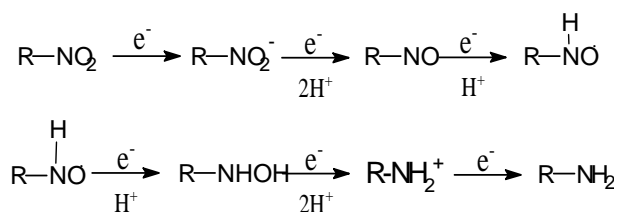
As ftalocianinas de zinco ($PcZn$) têm sido intensamente estudadas devido a configuração d^{10} de seu íon central Zn^{+2} resultando num espectro óptico que não é influenciada por bandas adicionais, possui ainda, forte absorção na região do vermelho e alto rendimento singlete e triplete conferindo grande aplicabilidade para TFD, cujo resultados foram expressivos em estudos *in vitro* e *in vivo* (LARROQUE; PELEGRIN; van LIER, 1996). Devido a sua insolubilidade na maioria dos solventes comuns, há a necessidade de modificações na estrutura molecular ou a utilização dos chamados “Drug Delivery System - DDS”, como os lipossomas, micelas poliméricas e proteínas séricas (HUANG *et al.*, 2006; SIMIONE *et al.*, 2008).

O espectro infravermelho apresentou sinais característicos dos grupamentos NO_2 , com bandas fortes entre $1661-1499cm^{-1}$ e $1389-1259cm^{-1}$ provenientes dos estiramentos assimétricos e simétricos, respectivamente (POUCHERT, 1997).

No espectro de absorção no visível, a $PcZn_4NO_2$ apresentou forte absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético, o que é característico das ftalocianinas (ROSENTHAL, 1991; SPIKES, 1986). As substituições periféricas visam aumentar a solubilidade/interação das ftalocianinas de zinco com outras moléculas, não havendo alteração no seu perfil espectral, como exemplificado na Figura 3, na comparação entre a ftalocianina sintetizada ($PcZn_4NO_2$) e a ftalocianina comercial ($PcZn_4SO_3H$).

Macrófagos de retículo-sarcoma da linhagem celular murina J774 foram utilizados neste trabalho por ser um sistema modelo para o estudo da PDT (SILVA *et al.*, 2011). A $PcZn_4NO_2$ apresentou uma

alta citotoxicidade, inibindo assim, a atividade mitocondrial, mesmo nas menores concentrações. Esses resultados não foram observados em estudos anteriormente publicados com outras ftalocianinas de zinco tetra-substituídas, levando a acreditar que o grupo NO₂ da PcZn4NO₂ seja responsável perfil citotóxico apresentado (FABRIS et al., 2001; YSLAS, DURANTINI, RIVAROLA, 2007; Montanari *et al.*, 2010). Esse efeito está ligado ao processo de redução in vitro do grupo nitro e à subsequente interação dos produtos formados, a partir dessa reação, com biomoléculas essenciais (PAULAI, SERRANO, TAVARES, 2009). A completa redução do grupo nitro num grupo amino esta representado no Esquema 2.



Esquema 2: Via enzimática da redução de grupos nitro.

São três potenciais possíveis radicais livres formados, o ânion nitro (R-NO₂⁻), o hidronitróxido (R-NHO⁻) e o radical livre amino cátion (R-NH₂⁺), os quais podem ser responsáveis pela citotoxicidade celular (MORENO, DOCAMPO, 1985; PAULAI, SERRANO, TAVARES, 2009).

Conclusão

A busca por novas ftalocianinas, com melhores características a fim de aumentar sua seletividade pelo tecido alvo, solubilidade, velocidade de eliminação, eficiência na geração de oxigênio singlete, tende a contribuir cada vez mais para a descoberta de novos tratamentos de tumores através da terapia fotodinâmica. A partir da síntese e caracterização da tetra-nitro ftalocianina de zinco, apresentou características de um bom agente fotossensível, contudo, por sua alta citotoxicidade em macrófagos J774, seu uso na terapia fotodinâmica não é adequado. Várias alternativas podem ser empregadas para diminuir a citotoxicidade apresentada pela PcZn4NO₂, como por exemplo a substituição de seus grupos NO₂, conjugação com proteínas séricas e/ou uso de lipossomas.

Agradecimentos

A Prof^a Dra. Kumiko Koibuchi Sakane do Laboratório de Espectroscopia no Infravermelho –

IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, pela a obtenção do espectro no infravermelho. A Prof^a Dra. Cristina Pacheco Soares do Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares - IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, pela ajuda nas leituras de viabilidade no ELISA. A FAPESP pelo apoio financeiro e a UNIVAP pela bolsa concedida.

Referências

ÇAMUR, MERYEM, AHSEN, VEFA, DURMUS, MAHMUT. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, V. 219 n. 2-3, p. 217-227, 2011.

DUTTA S, ONGARORA BG, LI H, VICENTE MDA G, KOLLI BK, CHANG KP. Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. **PLoS One**. V. 6, n. 6, p. e20786, 2011.

FABRIS, C., VALDUGA, G., MIOTTO, G., BORSETTO, L., JORI, G., GARBISA, S., REDDI, E. Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis. **Cancer Res**. V 15, n. 61 p. 7495, 2001.

FARAH, S., MONTEMEZZANI, G., GRABAR, A. R A, HUIGNARD, JEAN-PIERRE, RAMAZ, F. Photorefractive acousto-optic imaging in thick scattering media at 790 nm with a Sn2P2S6:Te crystal. **Opt. Lett**. V. 35, n. 11, p. 1798-1800, 2010.

GARDNER D. M, TAYLOR V. M, CEDEÑO DL, PADHEE S, ROBLEDO SM, JONES MA, LASH TD, VÉLEZ ID. Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. **Photochem Photobiol**. V. 86, n. 3, p. 645-52, 2010.

HOPPER, C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. **Lancet oncol., London**, v.1, p 212–219, 2000.

HUANG, JIAN-DONG, LO, PUI-CHI, CHEN, YAN-MEI, LAI, JANICE C., FONG, WING-PING., NG, DENNIS K.P. Preparation and in vitro photodynamic activity of novel silicon(IV) phthalocyanines conjugated to serum albumins. **Journal of Inorganic Biochemistry**. V. 100, n. 5-6, p. 946-951, 2006.

LARROQUE C., PELEGRIN, A., Van LIER, J. E.. Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: photodynamic activities in solid tumour models. **Br J Cancer**. V. 74, n.12, p. 1886–1890, 1996

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: Potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova**, V. 2, n. 23, p.237–243, 2000.

MACHADO, A. H. A. ET AL. Cytotoxicity of Octal-Bromide Zinc Phthalocyanine After Photodynamic Therapy with Different Light Sources. **Photomedicine & Laser Surgery**, v. 26, p. 455-459, 2008.

MARGARONE, P. et al. Structure-photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc phthalocyanines. **Photochem photobiol**, Oxford, v. 63, n.2, p.217–223, 1996.

MILANIČ, M., JIA, W., NELSON, J. S. and MAJARON, B. Numerical optimization of sequential cryogen spray cooling and laser irradiation for improved therapy of port wine stain. **Lasers in Surgery and Medicine**, V. 43, p.164–175, 2011.

MONTANARI, J., MAIDANA, C., ESTEVA, M. I. C. S., MORILLA, M. J., ROMERO, E. L. Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. **Journal of Controlled Release**. V 147, N. 3, p. 368-376, 2010.

MORENO, S. N., DOCAMPO, R. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. **Environ Health Perspect**. V. 64, p. 199–208, 1985.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, V. 39, n.1, p. 1-18, 1997.

OGUNSIPE, A, Nyokong, T. Photophysicochemical consequences of bovine serum albumin binding to non-transition metal phthalocyanine sulfonates. **Photochem. Photobiol. Sci.**, V.4, p. 510–516. 2005

PAULAI, F. R., SERRANO, S. H. P.; TAVARES, Leoberto Costa. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Quím. Nova**, v. 32, n. 4, 2009 .

PELISSON, M. M. M. et al. Syntheses and photochemical properties of a tribenzo-naphtho-condensed porphyrinatozinc complex. **Journal**

of Porphyrins and Phthalocyanines, v. 07, n. 7, p. 630, 2003

POUCHERT, Charles J.; Aldrich Chemical Company. The Aldrich library of FT-IR spectra. 2. ed. **Milwaukee: Aldrich Chemical Co.**, c1997. 3 v.

ROSENTHAL, I. *Phthalocyanines as photodynamic sensitizer*. **Photochem. Photobiol. N. 56, p.859-870,1991**

SILVA, A. R. A.; SIMIONI, A. R.; TEDESCO, A. C. Photophysical and Complexation Studies of Chloro-Aluminum Phthalocyanine with Beta-Cyclodextrin and Hydroxypropyl-Beta-Cyclodextrin. **J. Nanosci. Nanotech**. V. 11, n. 5, p. 4046-4055, 2011.

SIMIONI, A. R. et al. Photophysical and Photobiological Studies of a Silicon Tribenzonaphthoporphyrinato Incorporated into Liposomes for Photodynamic Therapy Use. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 3208-3215, 2008.

SPIKES, J. D. Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. **Photochem Photobiol. n° 43, p.691-699, 1986.**

XU, Y., YOUNG, M. J., BATTAGLINO, R A., MORSE, L. R., FONTANA, C. R., PAGONIS, T. C., KENT, R., SOUKOS, N. S. Endodontic Antimicrobial Photodynamic Therapy: Safety Assessment in Mammalian Cell Cultures. **Journal of Endodontics**. V. 35, n.11, p. 1567-1572, 2009.

YSLAS, E. I., DURANTINI, E. N. RIVAROLA, V. A. Zinc-(II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in photodynamic therapy in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. V. 15, n. 13, p. 4651-4660, 2007.

ZHU, Yu-Jiao, HUANG, Jian-Dong, JIANG, Xiong-Jie, SUN, Jian-Cheng. Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and in vitro photodynamic activity. **Inorganic Chemistry Communications**. V. 9, n.5, p. 473-477, 2006.