

# Caracterização de Ftalocianinas de Zinco Conjungada com Micelas Poliméricas para uso em Terapia fotodinâmica

Viviane Silva da Matta  
*Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Biomédica  
Centro de Engenharia, Modelagem e  
Ciências Sociais Aplicadas  
Universidade Federal do ABC  
São Bernardo do Campo, Brazil*

Ana Paula Romani  
*Engenharia Biomédica  
Centro de Engenharia, Modelagem e  
Ciências Sociais Aplicadas  
Universidade Federal do ABC  
São Bernardo do Campo, Brazil*

Harki Tanaka  
*Engenharia Biomédica  
Centro de Engenharia, Modelagem e  
Ciências Sociais Aplicadas  
Universidade Federal do ABC  
São Bernardo do Campo, Brazil*

Tiago Ribeiro de Oliveira  
*Engenharia Biomédica  
Centro de Engenharia, Modelagem e  
Ciências Sociais Aplicadas  
Universidade Federal do ABC  
São Bernardo do Campo, Brazil  
ORCID: 0000-0002-6931-8397*

**Resumo** — As ftalocianinas de zinco (FC-Zn) são macromoléculas aromáticas candidatas a fotossensibilizadores em aplicações clínicas da terapia fotodinâmica (TFD). O fato de possuírem alta capacidade de transferência eletrônica e significativa indução de espécies reativas de oxigênio (EROS), fazem das ftalocianinas e seus derivados um agente de grande interesse na literatura. Contudo, uma série de desafios ainda limitam o amplo uso desse tipo de molécula em aplicações clínicas de TFD. Dentre estes, destacam-se algumas de suas características físico-químicas que induzem a um processo de agregação em meio aquoso e reduzem significativamente a produção de oxigênio singlete local. Neste sentido, nosso trabalho investigou, por espectroscopia de absorção óptica e fluorescência, o comportamento da organização molecular em meio aquoso de três compostos de carbóxi-ftalocianinas dispersos em presença de soluções micelares poliméricas (Pluronic®F127, PoloxamerP123 e Ultraric-PE62) e com variação na razão massa/volume (1%, 2% e 5%). As três carbóxi-ftalocianinas analisadas diferiam nos grupos substituintes: C5H11, H e CH3. Os resultados espectroscópicos indicaram que as ftalocianinas, na presença das três soluções micelares encontram-se em estados de organização caracterizados como majoritariamente monomérico, sendo a solução de carbóxi-ftalocianinas não esterificada dispersa em PoloxamerP123 (1%) a preparação com maior presença de monômeros. Os ensaios de fluorescência indicam que o modo de organização molecular influenciou o rendimento quântico de fluorescência. Assim, baseado em nossos resultados conclui-se que todas as ftalocianinas associadas a micelas poliméricas apresentam potencial para uso em terapia fotodinâmica, sendo a formulação de Pluronic®F127 com maior rendimento de emissão fluorescente. Por isso, torna-se essencial a determinação do rendimento quântico de oxigênio singlete de cada formulação.

**Palavras-chave** — Ftalocianinas, Micelas poliméricas, Fluorescência, Terapia fotodinâmica (TFD).

## I. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que utiliza-se de luz laser para induzir a geração de oxigênio siglete em local de interesse clínico [6]. A TFD tem sido empregado no tratamento de tumores, artrites e diferentes doenças de pele. No caso específico dos tumores, a

TFD tem se mostrado muito promissora, uma vez que o tratamento por meio dessa técnica pode ser seletivo, atingindo apenas as células tumorais, além de ser não-invasivo [6].

O princípio de atuação da TFD combina luz laser de baixa intensidade com a indução de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). A disponibilidade local de oxigênio e agentes fotossensibilizadores (FS), corante não tóxico e fotossensível, pode produzir citotóxicos, tal como oxigênio singlete, por absorção de energia luminosa e foto-excitação por transferência de energia [13].

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos compostos fotossensibilizadores com propósitos de diagnóstico e terapia. Dentre eles, pode-se destacar as ftalocianinas. As ftalocianinas são estruturas análogas às porfirinas, que são macromoléculas aromáticas de ocorrência natural e desempenham papel vital em sistemas biológicos. Apesar de apresentarem similaridades, as ftalocianinas não ocorrem naturalmente como as porfirinas

As ftalocianinas apresentam duas bandas de absorção típicas, as quais podem ser observadas por meio da espectroscopia na região do ultravioleta visível (UV-Vis). A primeira e mais energética é conhecida como banda B ou de "Soret" que absorve na região entre 275-389 nm. A banda B está relacionada com as transições dos níveis  $\pi$  mais profundos com o orbital molecular de menor energia desocupado (LUMO) [3]. A outra banda é conhecida como banda Q que absorve na região entre 600-720 nm e suas transições eletrônicas estão relacionadas ao estado fundamental  $\pi$ -orbital molecular de maior energia ocupado ( $\pi$ -HOMO) e o primeiro estado excitado ( $\pi^*$ -LUMO) [4].

Um fato importante das ftalocianinas é a sua hidrofobicidade, pois essa propriedade em meio aquoso leva à auto agregação e em muitos casos a uma subsequente precipitação. As macroestruturas reduzem drasticamente a capacidade dos compostos de gerar oxigênio singlete. Os efeitos da agregação, devido à conjugação do macrociclo da ftalocianina, é um grande desafio a ser superado. Assim como os surfactantes, os polímeros são utilizados como estratégia para reduzir a agregação das ftalocianinas em solventes aquosos, fazendo com que os problemas fotofísicos e

fotoquímicos sejam minimizados. Por isso, as micelas poliméricas ganharam especial interesse e têm sido amplamente investigadas no uso clínico, uma vez que apresentam considerável biocompatibilidade e uma especificidade quando falamos de carreadores de fármacos.

Por isso, considerando o contexto apresentado, o objetivo do presente trabalho foi investigar o comportamento físico-químico de moléculas derivadas de ftalocianinas de zinco: carbóxi-ftalocianinas esterificadas (Fig. 1 – composto 1) e carbóxi-ftalocianinas não esterificadas (Fig. 1 – compostos 2 e 3), na presença de sistemas carreadores constituídos de micelas poliméricas, com intuito de avaliar a viabilidade das referidas moléculas como fotossensibilizantes em aplicações de TFD.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### A. Materiais

Foram utilizados, sem tratamento prévio, os seguintes reagentes: Pluronic®F127 12600 g.mol<sup>-1</sup> (BASF), PoloxamerP123 5750 g.mol<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich), ULTRARIC®PE62 2500 g mol<sup>-1</sup> (OXITENO), dimetilsulfóxido P.A. 99,9% (Sigma-Aldrich), etanol P.A. 99,5% (Sigma-Aldrich).

Os derivados de ftalocianinas de zinco (carbóxi-ftalocianinas, esterificadas e não esterificadas) foram sintetizadas e caracterizadas pelo Dr. Francisco Batista do Nascimento durante o período de doutorado em Ciência e Tecnologia Química na Universidade Federal do ABC [1].

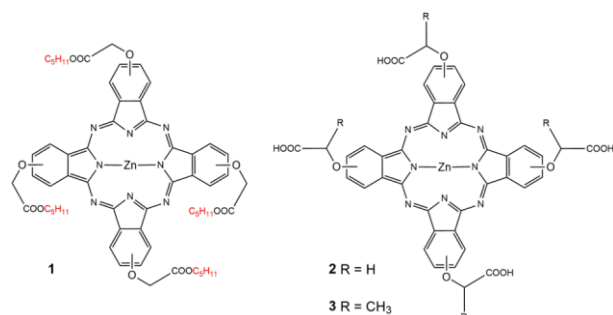


Figura 1. Moléculas derivadas de ftalocianinas de zinco: carbóxi-ftalocianinas esterificadas (composto 1) e carbóxi-ftalocianinas não esterificadas (compostos 2 e 3).

Os espectros de absorção foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Vis Cary 60 (Agilent). Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos no espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse (Agilent). Os tempos de vida de fluorescência ( $\tau$ ) foram obtidos no Espectrômetro de Fluorescência e Tempo de Vida FluoTime 300 da PicoQuant.

### B. Métodos

Preparação das micelas poliméricas: As soluções dos copolímeros Pluronic®F127, PoloxamerP123 e ULTRARIC®PE62 foram preparadas nas concentrações 1%, 2% e 5% (massa/volume). Após pesar a quantidade apropriada do copolímero foi adicionado o tampão fosfato, sob agitação magnética branda, até a completa dissolução do sistema polimérico. Todo o procedimento foi feito a temperatura ambiente. Finalizado o processo, a amostra ficou em repouso por 24 horas [2].

Utilizando uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm em temperatura ambiente. Os tempos de vida ( $\tau$ ) foram obtidos utilizando-se a técnica de tempo correlacionado de contagem de único fóton (Time Correlated Single Photon Counting Setup - TCSPC). Os decaimentos foram analisados pelo software de análise de decaimento de fluorescência global FluoFit da PicoQuant (PicoQuant FluoFit Global Fluorescence Decay Analysis Software). O procedimento numérico para se obter os melhores ajustes dos valores de  $\tau$  foi baseado no algoritmo de Marquardt-Levenberg, o qual associa a qualidade dos ajustes ao valor de chi-quadrado reduzido ( $\chi^2$ ), que por sua vez, tem um limite teórico de 1,0. Os valores mais próximos de 1,0 indicam um ajuste adequado, embora, em alguns casos valores de até 1,3 são aceitáveis sob certas condições, assim como alguns valores menores do que 1,046.

Após o preparo das soluções micelares, em cada uma delas foi adicionada uma alíquota das soluções estoque das ftalocianinas (compostos 1, 2 e 3 na concentração de 1,0x10<sup>-4</sup> mol. L<sup>-1</sup> em DMSO), de modo que a concentração final dos compostos 1, 2 e 3 em meio micelar fosse cerca de 1,0x10<sup>-6</sup> mol. L<sup>-1</sup>.

Em seguida, as amostras foram submetidas à agitação magnética branda por cerca de 60 minutos. No caso das soluções micelares na concentração de 5% (massa/volume), o período de agitação magnética foi de 120 minutos.

Posteriormente, foram colocados 2,0 mL das soluções de estudo (soluções micelares contendo os compostos 1, 2 e 3) em um par de celas de quartzo, sendo que na cela de referência foi colocada apenas a solução micelar. Em seguida, foram registrados os comprimentos de onda máximos de absorção e os valores das absorvâncias. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

As medidas de intensidade de emissão e de decaimento de fluorescência foram realizadas com as mesmas soluções de estudo (soluções micelares contendo os compostos 1, 2 e 3) das medidas de absorção. Em celas de quartzo de fluorescência (com 1 cm de caminho óptico) foram colocados 2,0 mL das referidas soluções de estudo e, em seguida, registrou-se as intensidades de emissão e os decaimentos de fluorescência. Todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente.

## III. RESULTADOS

A ZnPc apresenta uma intensa banda Q em torno de 670 nm e uma banda mais larga e menos definida próxima de 300 nm [8]. A adição de grupos substituintes nas posições periféricas da ZnPc pode influenciar muitas de suas propriedades. Os substituintes periféricos tendem a aumentar a distância entre os anéis macrocíclicos planares que transportam os elétrons  $\pi$  e, portanto, facilitam o processo de solvatação da molécula. Solventes orgânicos tendem a reduzir a agregação das ZnPcs enquanto que solventes aquosos favorecem a formação de agregados.

### A. Medidas de absorção no UV-Vis das ftalocianinas em meio micelar

Na Figura 2 apresenta-se os espectros de absorção UV-VIS representativos dos compostos 1, 2 e 3 em meio micelar na concentração massa/volume de 1%. No meio micelar PoloxamerP123, os referidos compostos derivados exibiram

maior valor de absorbância, indicando maior presença de monômeros. Nessa figura, observa-se que os compostos 2 e 3 possuem um comportamento similar em relação a posição das bandas B e Q. Contudo, o composto 1 se comportou de forma distinta aos demais. Este comportamento anômalo, do composto 1, foi também observado nos outros dois meios micelares investigados.

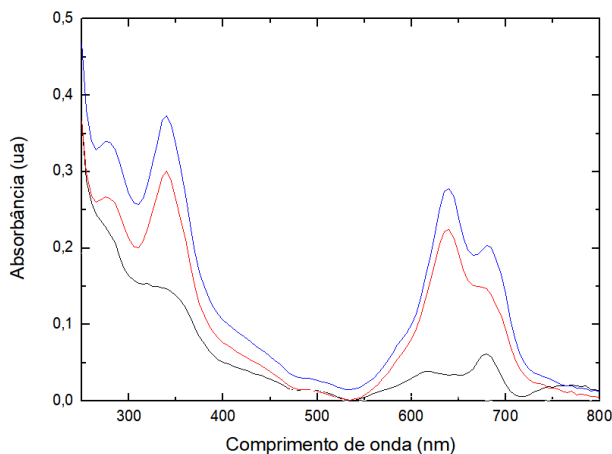


Figura 2. Espectro de absorção dos compostos 1 (—), 2 (—) e 3 (—) em meio micelar de PoloxamerP123 (1%) à temperatura ambiente.

Na presença da solução Ultraric-PE62, o perfil dos espectros de absorção se aproximara ao que seria esperado para as ftalocianinas monoméricas, embora com valores de absorbância menores ao esperado (Figura 3).

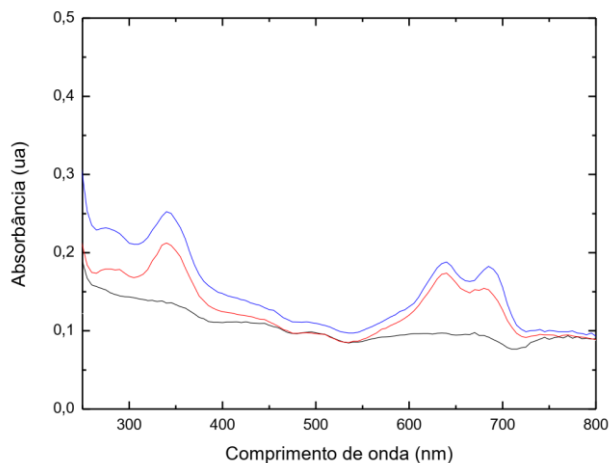


Figura 3. Espectro de absorção dos compostos 1 (—), 2 (—) e 3 (—) em meio micelar de Ultraric-PE62 (1%) à temperatura ambiente.

Os espectros de absorção dos três compostos 1 (—), 2 (—) e 3 (—) em meio micelar de Ultraric-PE62 (1%) à temperatura ambiente, em especial o composto 1, indicam a possível presença de agregados na solução polimérica. Conforme reportado anteriormente [7], o raio hidrodinâmico de micelas de P123 diminui com o aumento da concentração do copolímero. Desta forma, as micelas formadas em concentrações mais elevadas do polímero foram menores do que as produzidas em concentrações mais baixas.

### B. Medidas de emissão de fluorescência das ftalocianinas em meio micelar

As ftalocianinas apresentam emissão de fluorescência a qual é caracterizada por uma banda numa faixa de comprimento de onda entre 670-710 nm. A emissão tem sua origem a partir de um estado excitado localizado no anel tetrapirrólico [4]. Os espectros eletrônicos de emissão de fluorescência em meio micelar PoloxamerP123 dos compostos 1, 2 e 3 estão representados nas Figura 4.

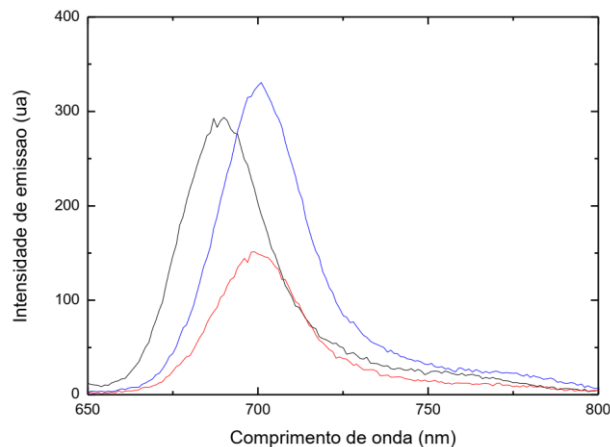


Figura 4. Espectro de emissão de fluorescência dos compostos 1 (—), 2 (—) e 3 (—) em meio micelar de PoloxamerP123 (1%) à temperatura ambiente. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 635 nm.

Nas concentrações de 1% do copolímero PoloxamerP123 observa-se que todos os compostos apresentaram um único pico. Os espectros apresentaram os máximos de emissão em torno de 700 nm. Para o composto 1 a intensidade máxima foi verificada em comprimentos de onda menores (cerca de 690 nm).

Na presença de Ultraric-PE62 (Figura 5), não foi constatada emissão fluorescente do composto 1. Fato que corrobora com os resultados de absorção obtidos anteriormente (Figura 3). A presença de grandes agregados moleculares seria a justificativa para esses achados.

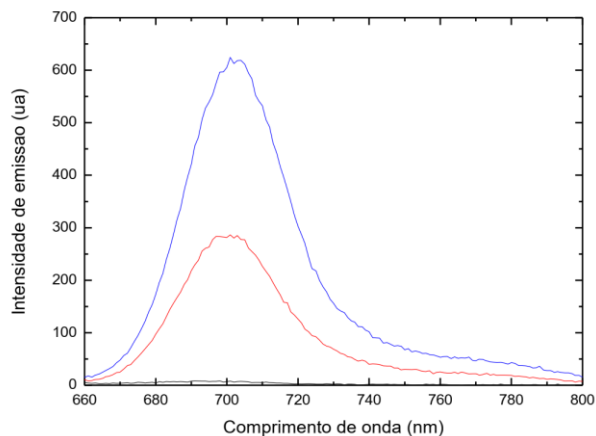


Figura 5. Espectro de emissão de fluorescência dos compostos 1 (—), 2 (—) e 3 (—) em meio micelar de Ultraric-PE62 (1%) à temperatura ambiente. O comprimento de onda de excitação utilizado foi de 635 nm.

A interação dos compostos 1, 2 e 3 com os copolímeros, em especial suas cadeias, influencia suas propriedades uma vez que irá impactar nas transições eletrônicas desses compostos.

#### IV. DISCUSSÃO

A interação entre as moléculas derivadas de ftalocianinas de zinco (compostos 1, 2 e 3) e os sistemas micelares mostrou-se dependente da estrutura das referidas moléculas assim como da composição e da concentração dos meios micelares. O composto 1 possui um substituinte éster, o qual por ser volumoso, pode acarretar um impedimento estérico da molécula, inviabilizando sua incorporação nos sistemas micelares. Adicionalmente, pode ocorrer repulsão entre os grupos ésteres e o grupo CH<sub>3</sub> do óxido de propileno presente nos copolímeros. Provavelmente esses dois fatores são responsáveis pelo comportamento do composto 1 nos meios micelares. Os compostos 2 (substituinte H) e 3 (substituinte CH<sub>3</sub>) podem apresentar uma interação entre o ácido carboxílico presente em suas moléculas com os grupos óxido de etileno presente nos copolímeros via ligação de hidrogênio. No caso do composto 2, a referida interação possui um caráter mais hidrofílico. Porém, nas duas situações a referida interação pode favorecer a incorporação dos compostos (2 e 3) nos sistemas micelares. Em relação ao efeito da concentração dos meios micelares, tem-se que em concentrações mais elevadas do copolímero pode ocorrer a formação de micelas com menor tamanho, o que poderia impactar na quantidade de moléculas dos compostos 1, 2 e 3 que seriam incorporadas. Desta forma, os resultados obtidos até o momento indicam que os compostos 2 e 3 se mostram como promissores agentes fotossensibilizantes.

#### V. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados indicaram que as propriedades das moléculas de carbóxi-ftalocianinas podem sofrer diversos tipos de interação, as quais são dependentes da composição e da concentração do meio no qual se encontram. Os ensaios de fluorescência indicam que o modo de organização molecular influencia o rendimento quântico de fluorescência. Assim, baseado em nossos resultados conclui-se que a formulação de Pluronic®F127 possui maior rendimento de emissão fluorescente e maior potencial de uso clínico.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Dr. Francisco Batista do Nascimento, o qual foi responsável pela síntese e caracterização das ftalocianinas, e o Prof. Dr. Hueder Paulo Moisés de Oliveira pelo auxílio com as medidas espectroscópicas.

#### CONTATO

Prof. Dr. Tiago Ribeiro de Oliveira -  
tiago.ribeiro@ufabc.edu.br

#### REFERÊNCIAS

1. Silva, C. B., Propriedades Espectroscópicas de Ftalocianinas com diferentes ligantes e núcleo metálicos. Universidade Federal do ABC (Dissertação de Mestrado)

Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia/Química 2016.

2. Mack, J.; Kobayashi, N., Low symmetry phthalocyanines and their analogues. *Chemical reviews* 2010, 111 (2), 281-321.

3. Leznoff, C. C., *Phthalocyanines. Properties and Applications* 1989.

4. Ueno, L. T.; Jayme, C. C.; Silva, L. R.; Pereira, E. B.; Oliveira, S. M. d.; Machado, A. E., Photophysics and spectroscopic properties of zinc phthalocyanine revisited using quantum chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2012, 23 (12), 2237-2247.

5. Lamch, Ł.; Tylus, W.; Jewgiński, M.; Latajka, R.; Wilk, K. A., Location of Varying Hydrophobicity Zinc (II) Phthalocyanine-Type Photosensitizers in Methoxy Poly (ethylene oxide) and Poly (l-lactide) Block Copolymer Micelles Using <sup>1</sup>H NMR and XPS Techniques. *The Journal of Physical Chemistry B* 2016, 120 (49), 12768-12780.

6. Russo, A.; Pellosi, D. S.; Pagliara, V.; Milone, M. R.; Pucci, B.; Caetano, W.; Hioka, N.; Budillon, A.; Ungaro, F.; Russo, G., Biotin-targeted Pluronic® P123/F127 mixed micelles delivering niclosamide: A repositioning strategy to treat drug-resistant lung cancer cells. *International journal of pharmaceutics* 2016, 511 (1), 127-139.

7. Parolin, M. B.; Reason, I. J. M., Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia* 2001, 38 (2), 138-144.

8. Gol'dshleger, N.; Baulin, V.; Tsivadze, A. Y., Phthalocyanines in organized microheterogeneous systems. Review. *Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces* 2014, 50 (2), 135-172.

9. Wakaskar, R. R., Polymeric micelles for drug delivery. *Int J Drug Dev Res* 2017, 9, 1-2.

10. Van Domeselaar, G. H.; Kwon, G. S.; Andrew, L. C.; Wishart, D. S., Application of solid phase peptide synthesis to engineering PEO-peptide block copolymers for drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003, 30 (4), 323-334.

11. Amin, M. C. I. M.; Butt, A. M.; Amjad, M. W.; Kesharwani, P., Polymeric Micelles for Drug Targeting and Delivery. In *Nanotechnology-Based Approaches for Targeting and Delivery of Drugs and Genes*, Elsevier: 2017; pp 167-202.

12. Romero, M. P.; Gobo, N. R.; de Oliveira, K. T.; Iamamoto, Y.; Serra, O. A.; Louro, S. R., Photophysical properties and photodynamic activity of a novel menthol-zinc phthalocyanine conjugate incorporated in micelles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 2013, 253, 22-29.

13. Wang, Z. L., Characterizing the structure and properties of individual wire-like nanoentities. *Advanced Materials* 2000, 12 (17), 1295-1298.