

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE FÍSICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

**Análise comparativa da eficiência fotodinâmica de
fotossensibilizadores em sua forma base livre e
formando complexados com zinco**

LAIS ALONSO

GOIÂNIA
2014

LAIS ALONSO

**Análise comparativa da eficiência fotodinâmica de
fotossensibilizadores em sua forma base livre e
formando complexados com zinco**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação do Instituto de Física da
Universidade Federal de Goiás como requisito
para obtenção do título de Mestre em Física.**

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves

**GOIÂNIA
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

A455a Alonso, Lais.
Análise comparativa da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores em sua forma base livre e formando complexados com zinco [manuscrito] / Lais Alonso. - 2014.

viii, 59 f. : il., figs, tabs.

Orientador: Prof. Dr. Pablo José Gonçalves;
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Física, 2014.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Fotodinâmica 2. Fotoquimioterapia 3. Terapiafotodinâmica 4. Sinal fluorescente I. Título.

CDU: 53:543.48

Agradecimentos

- ✓ À minha mãe Silvana Zimbaldi Alonso e ao meu pai Antonio Alonso, pelo amor, incentivo e confiança. Eu não chegaria até este estágio da minha vida se não fosse por eles;
- ✓ Novamente ao meu pai que além das funções paternas, foi amigo, professor, e meu maior estímulo;
- ✓ À minha irmã Letícia Alonso, pelo carinho e amizade que sempre me deu força;
- ✓ Ao professor Dr. Pablo José Gonçalves pela oportunidade, paciência e por todos os ensinamentos científicos durante a realização deste trabalho;
- ✓ A todos os professores do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG), por terem me proporcionado desenvolvimento e crescimento intelectual durante o curso;
- ✓ À Universidade Federal de Goiás (UFG) e ao Instituto de Física pelas oportunidades;
- ✓ À CAPES pela bolsa de pesquisa.

"Nunca deixe o medo de errar impedir que você jogue"

Albert Einstein

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	3
	1.1. Terapia Fotodinâmica.....	3
	1.2. Eritrócito humano.....	7
	1.3. Hemólise.....	8
	1.4. Espécies reativas de oxigênio.....	9
	1.5. Seroalbumina.....	10
	1.6. Coeficiente de partição.....	11
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
	3.1. Materiais	14
	3.1.1. Moléculas Orgânicas	14
	3.2. Técnicas experimentais.....	16
	3.2.1. Modelo fotofísico	16
	3.2.2. Espectrofotômetro	17
	3.2.3. Espectroscopia de fluorescência.....	20
	3.3. Metodologia.....	22
	3.3.1. Preparação e marcação de eritrócitos e avaliação da foto-hemólise	22
	3.3.2. Avaliação da peroxidação lipídica.....	24
	3.3.4. Cálculo do coeficiente de partição.....	22
	3.3.5. Cálculo da degradação da BSA	25
	3.3.5. Análise estatística	26
4	RESULTADOS	27
	4.1. Coeficiente de partição	27
	4.2. Ação hemolítica dos fotosensibilizadores.....	28
	4.3. Peroxidação lipídica	34
	4.4. Degradação de BSA.....	37
5	DISCUSSÕES.....	40
6	CONCLUSÕES.....	45
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	47
8	APÊNDICE A	48
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Lista de Abreviaturas

PDT : Terapia fotodinâmica
TPPS: porfirina meso-tetrasulfonatofenil
TMPyP: porfirina meso-tetrametilpiridil
PPIX: protoporfirina IX
FS: fotossensibilizadores
Ftalo: carboxiftalocianina
FS: fotossensibilizador
MO: moléculas orgânicas
MDA: malondialdeído
BSA: albumina de soro bovino
EROs: espécies reativas do oxigênio
DP: desvio padrão

Lista de Figuras

Figura 1- Diagrama esquemático da ação fotodinâmica do FS. Adaptado da referência [15].

Figura 2- Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos [20].

Figura 3- Esquema de cadeia de reações que levam a peroxidação lipídica.

Figura 4- Anel característico de todas as porfirinas.

Figura 5- Moléculas orgânicas utilizadas no trabalho.

Figura 6- Diagrama de Perrin-Jablonski com os tempos característicos dos processos de excitação eletrônica e emissão.

Figura 7- Diagrama esquemático do espectrofotômetro.

Figura 8- Diagrama esquemático espectrofluorímetro.

Figura 9- Combinação do malondialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico forma uma molécula com absorvância conhecida.

Figura 10- Espectros de absorvância da Zn TMPP no butanol e na água

Figura 11- Espectros de absorvância (480-750 nm) de hemoglobina liberada na hemólise causada pela irradiação em presença da protoporfirina IX em função de diferentes tempos de irradiação.

Figura 12- Ajuste sigmoidal da curva de percentual de ação hemolítica para a protoporfirina em função do tempo.

Figura 13- Gráfico de correlação $T_{1/2}$ vs $\text{Log } P_{O/W}$ e ajuste linear. Os símbolos indicados com x se referem aos dados dos FS contendo Zinco. Equação: $\text{Log } P_{O/W} = -1,952 - 0,053 T_{1/2}$.

Figura 14- Gráfico de correlação $T_{1/2}$ vs $\text{Log } P_{O/W}$ e ajuste linear para os FS sem Zinco. Equação: $\text{Log } P_{O/W} = -0,115 - 0,145 T_{1/2}$.

Figura 15- Gráfico da percentagem de hemólise em função do tempo de irradiação causada pelo FS Zn-TMPP em PBS com e sem azida sódica.

Figura 16- Gráfico do percentual de hemólise (linha vermelha) comparado com a formação de MDA (linha preta) em suspensão de eritrócitos irradiada na presença do FS Zn Ftalo.

Figura 17- Gráfico de correlação entre os $T_{1/2}$ de hemólise e de formação de MDA. Equação: $T_{1/2} (\text{MDA}) = 9,061 + 1,006 T_{1/2} (\text{hemólise})$.

Figura 18- Intensidade do sinal fluorescente da BSA a 10 μM + TMPP 10 μM para vários tempos de irradiado (Painel superior) e decaimento do sinal fluorescente em função do tempo de irradiação (Painel inferior).

Figura 19- Curvas de decaimento da intensidade do sinal fluorescente da BSA a 10 μM + 10 μM de FS como função do tempo de irradiado.

Figura 20- Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA em membrana de eritrócito irradiada por 40 minutos sem FS (Controle) e com o FS PPIX.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros de hemólise em suspensão de eritrócitos (2% de hematócrito em PBS e temperatura ambiente) causada por irradiação (lâmpada halógena de 200 mW/cm^2) e presença de 25 μM de porfirinas e coeficiente de partição de cada FS. Todos os valores são média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Tabela 2: Concentração máxima de MDA formada (em nanomolar) e tempo para formação de 50% da máxima concentração de MDA ($T_{1/2}$) em suspensão de eritrócito a 10% de hematócrito, em PBS e temperatura ambiente, produzida por irradiação com lâmpada halógena de 200 mW/cm^2 e presença de 25 μM de MO.

Tabela 3: Constante de decaimento temporal do sinal de fluorescência da BSA a 10 μM em PBS devido à irradiação com lâmpada halógena de 200 mW/cm^2 na presença de moléculas orgânicas (10 μM).

Tabela 4: Parâmetro de RPE desdobramento hiperfino máximo ($2A_{//}$) do marcador de spin 5-DSA em membrana de eritrócito. A suspensão de eritrócito foi irradiada com e sem a presença de vários FS.

RESUMO

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma técnica que tem sido cada vez mais utilizada no tratamento de câncer. Consiste em introduzir um fotossensibilizador (FS) no tecido cancerígeno e irradiá-lo com luz na faixa do visível. Visando um tratamento de PDT mais eficaz, atualmente existem vários estudos da eficiência desses FS. Neste trabalho, estudamos a eficiência fotodinâmicas de sete FS: meso-tetrasulfonatofenil, meso-tetrametilpiridil e carboxiftalocianinas em suas formas de base livre bem como metaladas com átomo de zinco em seu anel central e a protoporfirina IX. Eritrócitos em suspensão no hematócrito de 2 ou 10%, tratados ou não com 25 μM do FS, foram expostos à luz de uma lâmpada halógena e medido o tempo necessário para se obter 50% de hemólise ($T_{1/2}$). Para examinar se a eficiência fotodinâmica está relacionada com a afinidade do FS por membrana, realizamos medidas do coeficiente de partição octanol/água ($P_{O/W}$) de cada FS. Nossos resultados indicaram que os FS estudados foram muito hidrofílicos e demonstraram uma tendência para maior eficiência fotodinâmica os FS com maior $\text{Log } P_{O/W}$. Para compreender melhor o mecanismo de ação dos FS avaliamos o grau de peroxidação lipídica nas membranas de eritrócito irradiado com FS, medindo a formação de malondialdeído (MDA) e encontramos uma correlação entre o índice de peroxidação e potencial hemolítico. A capacidade dos FS degradarem proteínas foi avaliada usando albumina de soro bovino (BSA), monitorando o sinal fluorescente desta proteína em solução e sob a irradiação na presença do FS.

ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a technique that has been increasingly used in cancer treatment. It consists in introduce a photosensitizer (PS) in cancerous tissue and irradiate it with light in the visible range. Targeting a more effective treatment of PDT, currently there are several studies on the efficacy of these PS. In this work, we studied the photodynamic efficiency seven PS: meso-tetrametilpiridil, meso-tetrasulfonatofenil and carboxifitalocianinas with their base free or metallated with zinc atom in its center ring and protoporphyrin IX. Erythrocytes suspended in 2 to 10% hematocrit were treated with or without 25 μM of PS were exposed to light from a halogen lamp, and measured the time required to obtain 50 % hemolysis ($T_{1/2}$). To examine whether the photodynamic efficiency is related to the affinity of PS by membrane, we performed measurements of the octanol/water partition coefficient ($P_{O/W}$) of each PS. Our results indicated that the PS studied were very hydrophilic and showed a trend for greater photodynamic efficiency the PS with higher Log $P_{O/W}$. To better understand the mechanism of action of the studied PS the degree of lipid peroxidation in erythrocyte membranes irradiated with PS was assessed by measuring the formation of malondialdehyde (MDA) and a correlation between the rate of peroxidation and hemolytic potential was found. The ability of PS to degrade proteins was assessed using bovine serum albumin (BSA), monitoring the fluorescent signal of this protein into solution and under irradiation in the presence of PS.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Terapia Fotodinâmica

O câncer é hoje um dos principais problemas de saúde pública mundial. Dados epidemiológicos do INCA [1] apontam as neoplasias malignas como uma das maiores causas de morte do mundo. Em termos patológicos, o câncer é o desenvolvimento de novos clones celulares com atividade proliferativa superior às das células vizinhas e com caráter de invasão e destruição tecidual adjacente acentuada [2].

O tratamento básico para os vários tipos de câncer consiste na eliminação dos tecidos neoplásicos através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma associação destas três modalidades terapêuticas. A decisão na escolha da modalidade terapêutica depende da extensão, estadiamento tumoral, relação com estruturas anatômicas anexas, envolvimento de cadeia linfática, idade e cooperação do paciente, além do subtipo histológico de lesão [3].

Tendo como base o cenário atual das possibilidades terapêuticas para o tratamento do câncer, estudos têm demonstrado a utilização da Terapia Fotodinâmica (PDT - “*Photodynamic Therapy*”) como alternativa para o tratamento de lesões neoplásicas [4-5]. A grande vantagem na utilização desta terapia está em sua baixa toxicidade provocada ao organismo tanto pelo fármaco que é não citotóxico no escuro quanto pela fonte de irradiação, que emprega luz visível. Além disso, existe uma relativa seletividade dos fármacos empregados, o que acarreta uma redução nos efeitos colaterais observados pós-tratamento em comparação com as outras modalidades terapêuticas. Na perspectiva da saúde coletiva, a aplicação da PDT tem despertado grande interesse pelo seu custo operacional inferior quando comparado com o de tratamentos tradicionalmente utilizados como a cirurgia e quimioterapia, pois pode ser realizada em ambiente ambulatorial, dispensando em alguns casos as internações hospitalares [6].

Históricamente, o uso de FS em seres humanos data do Egito Antigo, onde há 4.000 anos, tratava-se vitiligo combinando-se a ingestão de plantas e exposição a luz solar. O sucesso do tratamento era resultado de uma reação fotoquímica, mediada por psoralenos presentes na planta [7]. Estudos sistemáticos das reações de FS foram iniciados apenas no final do século XIX por Oscar Raab que investigou o efeito dos

corantes eosina e acridina sobre uma cultura de paramécios (protozoários), percebendo que, em presença de luz, os microorganismos eram inativados [7]. O que Raab reportou era o princípio de uma nova modalidade clínica para o tratamento do câncer e outras moléstias, conhecida como Terapia Fotodinâmica.

A técnica de PDT vem sendo utilizada para o tratamento de câncer, doenças de pele, como a leishmaniose cutânea, tratamento de infecções microbianas [8-9], e tratamentos antifúngicos [10].

O mecanismo de ação da PDT baseia-se na combinação de três elementos: uma molécula orgânica fotossensibilizadora (FS), a luz visível e o oxigênio molecular (que normalmente está presente nos tecidos e meio reacional). Após a administração do FS é necessário um tempo de espera para que ocorra o devido acúmulo na região alvo bem como a incorporação da molécula pelas células, o que pode durar de algumas horas até dois dias [11]. Em seguida, é efetuada a irradiação do alvo com luz visível, cujo comprimento de onda empregado depende do FS empregado e do alvo específico. Visando uma maior penetração nos tecidos vivos, tem sido empregadas fontes de luz, geralmente laser e *LEDs* (diodos emissores de luz), emitindo do vermelho até o infravermelho próximo. Entretanto, existem relatos sobre o uso de fontes de lâmpadas halógenas cuja emissão abrange praticamente toda a região visível espectro eletromagnético [12].

Em uma aplicação intravenosa, as moléculas FS se ligam às lipoproteínas, que consistem em um conjunto de proteínas e lipídeos, arranjados de forma a otimizar o transporte dos lipídeos e fármacos pelo plasma. Como a quantidade de receptores dessas lipoproteínas se encontra em maior concentração nas células neoplásicas do que nas normais, tem-se um acúmulo maior de FS nas células cancerígenas [11]. Tem sido demonstrado que as macromoléculas podem se acumular preferencialmente em tumores sólidos, uma vez que os tecidos tumorais são caracterizados por aumentada permeabilidade e retenção (efeito EPR), devido a uma maior permeabilidade microvascular às macromoléculas de circulação e drenagem linfática prejudicada [13-14].

A Figura 1 apresenta um diagrama esquemático ilustrando os processos fotofísicos de um FS típico durante a ação fotodinâmica. Ao absorver um fóton de energia adequada, a molécula FS que se encontra no estado fundamental singleto (S_0) sofre uma transição para o estado singleto excitado (S_1). Em seguida, a molécula irá relaxar para estados de menor energia, onde seu decaimento pode ocorrer por vários

processos. Dentre eles a sua passagem direta para o estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), podendo ocorrer através de processos radiativos (fluorescência) e não radiativos (relaxação vibracional). Em outro processo não radiativo, envolvendo inversão de spin eletrônico, ocorre a formação de estados tripleto pela relaxação $S_1 \rightarrow T_1$, cujo processo é chamado por cruzamento intersistemas. A formação deste estado é um ponto crucial para a ação fotodinâmica.

Na presença de outras moléculas vizinhas ou estruturas biológicas, a transferência de elétrons quando o FS se encontra no estado excitado pode acarretar a formação de radicais livres, esse processo é conhecido como reação do tipo I. No processo de decaimento do estado tripleto para o fundamental ($T_1 \rightarrow S_0$) pode ocorrer transferência de sua energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse processo é o principal responsável pela ação fotodinâmica.

O oxigênio molecular em seu estado fundamental tripleto (3O_2), serve como um bom receptor de energia para o FS quando ele relaxa para o estado fundamental. Neste processo, o FS transfere parte de sua energia para o oxigênio formar seu estado excitado, o oxigênio singlete (1O_2). O oxigênio singlete é uma espécie muito reativa do oxigênio e que pode provocar a formação de novas séries de espécies radicalares [15], as quais podem gerar a peroxidação de membrana biológica e oxidação de biomoléculas assim provocando a morte do tecido tumoral via necrose ou apoptose [16]. Os processos que seguem esta via são chamados de reações do tipo II, e geralmente corresponde a grande parte da ação fotodinâmica.

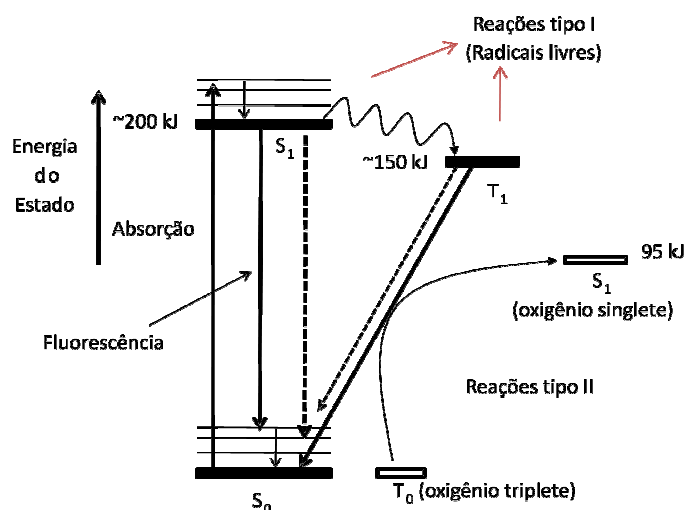


Figura 1- Diagrama esquemático da ação fotodinâmica de um fotossensibilizador típico. Adaptado da referência [15].

A administração intravenosa do FS tem algumas desvantagens, pois através do sangue o FS se espalha por todo o corpo e células saudáveis são inevitavelmente atingidas durante o tratamento. Considerando que o FS pode demorar alguns dias para ser expelido do corpo, há a necessidade do paciente se proteger da luz por no mínimo duas semanas após a aplicação do FS [17]. Outra limitação para o tratamento de PDT de forma intravenosa é a dificuldade encontrada pela luz para penetrar no corpo atingindo tumores mais profundos.

Para doenças que se encontram na superfície da pele essa desvantagem é contornada pela aplicação direta (tópica) do FS na pele, o que torna a PDT ainda mais seletiva. Neste tipo de aplicação, o tempo de espera para a absorção do FS pela célula é em geral de apenas algumas horas e o paciente só precisa proteger da luz o local tratado. Este procedimento já vem sendo comumente empregado e apresenta alta eficiência [17].

Uma completa avaliação da atividade fotodinâmica de moléculas com potencial de aplicação em PDT pode fornecer valiosas informações sobre suas características fotofísicas bem como pode auxiliar a explicar seus mecanismos de ação. Nesse sentido, diferentes estratégias vêm sendo propostas. Os efeitos da PDT em células podem ser previamente analisados realizando experimentos de irradiação das células cancerígenas em cultura e avaliando o potencial citotóxico dos FS. Existe interesse em determinar a toxicidade que o FS provoca na membrana celular, onde poderia ser induzida a peroxidação lipídica e oxidação protéica devido ao ataque de EROs. Uma maneira é utilizar as células do sangue como modelo, as quais são mais fáceis de serem isoladas e manipuladas.

No presente projeto, escolhemos avaliar um conjunto de moléculas orgânicas (MO) que envolvem porfirinas e ftalocianinas. As porfirinas são moléculas frequentemente empregadas na PDT e apresentam comprovada ação fotodinâmica. Escolhemos avaliar duas porfirinas que apresentam caráter aniônico (*meso*-tetrasulfonatofenil, TPPS) e catiônico (*meso*-tetrametilpiridil, TMPP). As ftalocianinas possuem uma maior absorção na região do vermelho que as porfirinas e têm se destacado como FS de segunda geração. Neste trabalho avaliaremos moléculas carboxiftalocianinas. Tanto as moléculas de porfirinas quanto ftalocianinas permitem a incorporação de átomos metálicos em seu anel central o que pode mudar consideravelmente suas propriedades fotofísicas e sua ação fotodinâmica. Dessa forma, além de avaliar as amostras sem a presença de átomos centrais, na forma de base livre,

avaliamos na sua forma de complexo metálico onde temos a presença de átomos de zinco em seu anel central. E por fim, outro derivado de porfirina que foi estudado neste trabalho foi a protoporfirina IX que pode ser produzida de forma endógena ao corpo através de um composto conhecido como ALA (molécula hidrofílica e de baixo peso molecular que é convertido enzimaticamente em PPIX) [18].

Para estudar a ação fotodinâmica desses compostos foram avaliados neste trabalho os efeitos da irradiação sobre os eritrócitos humanos e seu potencial hemolítico, a lipofílicidade, a degradação de proteínas (albumina) e a peroxidação lipídica. Esses temas serão abordados com mais detalhes nas próximas seções.

1.2. Eritrócito humano

Os eritrócitos são as células mais abundantes do corpo humano cuja principal função é transportar oxigênio e dióxido de carbono. Possuem um formato de disco bicôncavo (Figura 2), sendo seu principal conteúdo citoplasmático a hemoglobina (aproximadamente 95%), a qual contém o ferro no centro de seu anel porfirínico no estado reduzido, o que permite a ligação reversível do oxigênio, além de facilitar a troca do gás carbônico produzido pelos pulmões [19].

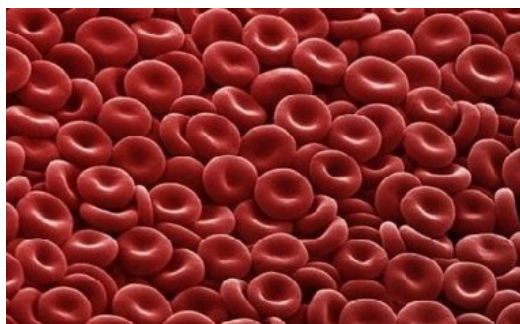


Figura 2- Micrografia eletrônica de varredura de eritrócitos humanos [20].

Os eritrócitos são originados na medula óssea e apresentam algumas características bem interessantes, e destacamos algumas delas: não possuem núcleo, ribossomos e mitocôndrias e assim não possuem capacidade de divisão celular, síntese de proteínas e reações oxidativas mitocondriais [19]. Devido a sua relativa simplicidade quando comparada a outras células, os eritrócitos têm sido intensamente estudados, pois sua membrana representa um modelo clássico de membrana celular. Dodge e

colaboradores [21] mostraram a possibilidade de se obter a membrana isolada do eritrócito (*ghost*), o que possibilitou o estudo detalhado de suas características estruturais. A membrana do eritrócito consiste em uma bicamada lipídica composta por 49,2% de proteínas (p/p), 43,6% de lipídios e 7,2% de carboidratos [22].

1.3. Hemólise

A hemólise é o termo utilizado para descrever a liberação de hemoglobina através da ruptura da membrana plasmática da hemácia [23]. Quando em pequenas proporções, a hemólise é um processo normal do organismo. Cerca de 0,8 a 1% do total das hemácias do organismo são hemolisadas diariamente. E esse processo de quebra é, em geral, compensado pela produção de novas hemácias [23]. Há várias maneiras de causar hemólise, a forma mais comum é utilizando água destilada, pois a concentração de soluto no meio aquoso é menor que no interior da hemácia gerando pressão osmótica. Neste processo, por afinidade ao soluto, devido à redução no potencial químico, a água é arrastada para o interior da hemácia até rompê-la.

Há moléculas que podem causar hemólise e seus potenciais hemolíticos têm sido amplamente utilizado para comparar suas capacidades de agressão à membrana plasmática que é uma das formas da molécula ser citotóxica. Recentemente, o potencial hemolítico de terpenos e da miltefosina (compostos com atividade leishmanicida) foi utilizado em no laboratório de biofísica da UFG no estudo do potencial citotóxico destes compostos [24-25]. O potencial hemolítico também tem sido muito utilizado para avaliar a peroxidação lipídica [26]. A membrana do eritrócito é particularmente sensível ao dano oxidativo, devido ao seu alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, e, portanto, representa um sistema importante para estudar os efeitos de estresse oxidativo [26].

Para comparar a eficiência fotodinâmica dos FS um procedimento que pode ser utilizado é avaliar a hemólise causada por um FS quando submetido a uma fonte de irradiação, o que provocaria a foto-hemólise. Neste processo os eritrócitos são irradiados na presença do FS e o grau de hemólise em diferentes tempos de irradiação é avaliado.

1.4. Espécies reativas de oxigênio

Os produtos provenientes do decaimento energético do FS podem ser radicais livres bem como oxigênio singlete. Os radicais livres são átomos ou moléculas que possuem um elétron desemparelhado, de modo que a energia de ligação do elétron ao átomo ou molécula é bem pequena e o elétron fica praticamente livre. Desta forma, os radicais livres são muito instáveis, altamente reativos e com tempo de meia vida curto [27]. A abstração ou ganho de um elétron por uma molécula não radical pode convertê-la em espécie radical. Para atingir a estabilidade, essas moléculas precisam adquirir ou perder elétrons e, portanto, reagem com a maioria dos compostos vizinhos [28].

Os radicais livres originados por reações da molécula de oxigênio são chamadas EROs, sendo os radicais mais importantes em estudos que envolvem sistemas biológicos. Este termo é uma denominação coletiva, não só para radicais livres como também substâncias capazes de reagir quimicamente e gerá-los. As EROs que apresentam maior relevância nos sistemas biológicos são: radical superóxido, radical hidroperoxila, radical hidroxila, radical alcóxila, radical peróxila, oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e ozônio [19].

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das EROs. Porém, a membrana celular é um dos mais atingidos decorrendo na peroxidação lipídica. Esta acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, provocando a perda da seletividade e da troca iônica e a formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular [29]. O vazamento de eletrólitos causado pela peroxidação leva a uma redução no potencial de membrana que em consequência resulta na perda do potencial de membrana mitocondrial interna, e esta na passagem da água do espaço entre membranas para a matriz mitocondrial, levando à ruptura da organela e consequente liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma [30].

Como mostra na Figura 3 a peroxidação lipídica é iniciada por espécies reativas de oxigênio, tais como os radicais hidroxila ($\dot{\text{O}}\text{H}$), alcóxil ($\text{LO}\dot{\text{O}}$) e o peróxil ($\text{LOO}\dot{\text{O}}$), os quais podem abstrair um átomo de hidrogênio do grupo metileno de um ácido graxo insaturado, formando um radical centrado no carbono que se combina com oxigênio para formar o radical peróxil-ácido graxo que por sua vez é capaz de abstrair outro átomo de hidrogênio dando continuidade ao processo de propagação [31]. A peroxidação lipídica se propaga até que um antioxidante como a vitamina E doando um

hidrogênio seja capaz de parar a reação em cadeia ou então até que dois radicais lipídicos se aniquilam um ao outro pela formação do peróxido cíclico (LOOL). Entretanto, este último passo só ocorre quando a concentração de radicais lipídicos é suficientemente grande para haver uma probabilidade maior deles se encontrarem na membrana [31].

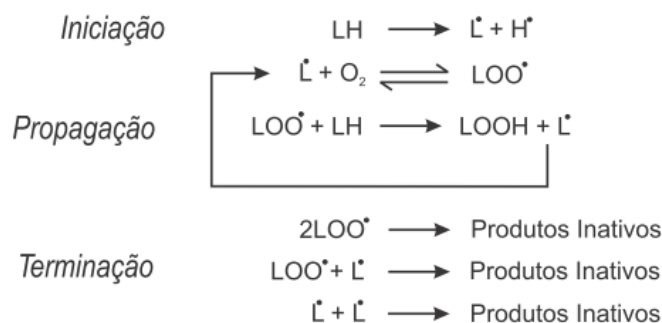


Figura 3- Esquema de cadeia de reações que levam a peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica provoca a perda de fluidez da membrana celular e vazamento de eletrólitos [31,32]. A rigidez de membrana associada à peroxidação lipídica tem sido avaliada por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) de marcadores de spin [33-36] e pela espectroscopia de sondas fluorescentes [37-38], ambas as técnicas demonstrando confiabilidade na detecção da ocorrência de peroxidação lipídica. O método mais utilizado para detectar peroxidação lipídica se baseia no marcador de peroxidação malondialdeído (MDA), o qual é um produto da peroxidação [39]. Este marcador forma complexo com o ácido tiobarbitúrico (TBA) que tem absorção característica [40].

1.5. Seroalbumina

A Seroalbumina é a principal e mais abundante proteína do plasma sanguíneo (concentração típica de 50 mg/ml). Sintetizada no fígado, tem função transportadora (as propriedades ligantes, como proteína de transporte, incluem afinidades por ácidos graxos, metais e íons, hormônios endógenos e substâncias exógenas ao sangue), além de manutenção da pressão osmótica e controle do pH. A estrutura da Seroalbumina é

altamente conservada em várias espécies de mamíferos, sendo a homologia entre a albumina de soro bovino (BSA) e a albumina de soro humano (HSA) de 76% [41-42].

Como a BSA é de mais fácil acesso, ela tem sido utilizada para investigar a foto-oxidação de biomoléculas através dos FS [43]. Quando excitada (absorve em aproximadamente 279 nm), evidencia fluorescência intrínseca da proteína com uma banda bem definida em 340 nm, que pode ser atribuída à combinação da fluorescência dos aminoácidos triptofano, tirosina e fenilalanina, presentes na cadeia protéica. Conforme os aminoácidos da BSA são foto-oxidados sua banda de fluorescência em 340 nm diminui de intensidade [43-44].

O fato da albumina ser abundante no plasma sanguíneo e ter um papel eficiente na distribuição de moléculas pelo corpo, desperta o interesse pela investigação da ligação de fármacos com essa proteína. Vários estudos têm focado a interação de FS com a albumina não só para examinar a capacidade do FS alterar a conformação da proteína mas também a sua habilidade em se ligar a ela [43,45].

1.6. Coeficiente de partição

Para examinar a eficiência fotodinâmica do FS um importante fator a conhecer é sobre sua interação ou afinidade com os compartimentos do sistema biológico. A interação do FS com membrana está relacionada com a partição do FS na membrana celular e a interação FS-proteína também é dependente do balanço lipofílico-hidrofílico do FS. Na prospecção de novos FS é importante conhecer em que compartimento da célula o ataque pelos radicais livres é mais eficiente e se os radicais sendo formados no interior da membrana celular provocariam uma destruição mais eficiente. Um dos objetivos do presente trabalho foi investigar se a eficiência hemolítica do FS aumenta com a quantidade de FS que vai para o interior da membrana do eritrócito. Esta quantidade é proporcional ao coeficiente de partição K do FS na membrana, o qual é dado pela equação: $K = c_M/c_A$, onde c_M é a concentração do composto na membrana e c_A no meio aquoso. Entretanto, este coeficiente é de difícil medição porque é necessário medir o volume de membrana e o número relativo de moléculas do composto que entram na membrana. Devido a esta dificuldade, o coeficiente de partição octanol/água

($P_{O/W}$) tem sido muito utilizado como uma estimativa de K [46]. Assim, o parâmetro $\text{Log } P_{O/W}$ tem sido usado como avaliação da lipoflicidade de um composto, ou de sua afinidade por membrana. Compostos com $\text{Log } P_{O/W}$ positivo são considerados de caráter lipofílico e certamente têm grande afinidade por membranas [46].

2 OBJETIVOS

O presente projeto de pesquisa tem como objetivos gerais estudar a eficiência fotodinâmica e mecanismo de ação de diversos fotossensibilizadores (FS) em eritrócitos. Particularmente, duas porfirinas e uma ftalocianina, em sua forma base livre e formando complexos metálicos com átomos de zinco em seu anel central. Também foi avaliada a protoporfirina IX uma molécula já empregada em Terapia Fotodinâmica (PDT).

Como objetivos específicos, podemos destacar:

1. Avaliar o potencial hemolítico das moléculas orgânicas (MO) sob irradiação de luz visível. A capacidade hemolítica dos FS será obtida através do tempo de irradiação necessário para ocorrência de 50% de hemólise ($T_{1/2}$) e outros parâmetros como: H_{\min} , hemólise com FS no escuro; H_{\max} , hemólise máxima atingida; dx, inclinação da curva sigmoideal.
2. Obter o coeficiente de partição octanol-água das MO e verificar se há correlação entre afinidade por membrana e potencial hemolítico.
3. Avaliar a peroxidação lipídica induzida pelas MO na suspensão de eritrócito devido à irradiação de luz visível na presença do FS e investigar se a peroxidação está correlacionada com o efeito hemolítico.
4. Determinar a constante de velocidade do decaimento do sinal fluorescente da albumina do soro bovino (BSA) causado pela ação do FS sob irradiação visível.
5. Avaliar os resultados obtidos comparando o efeito das moléculas em sua forma base livre e efeito da presença de átomos de zinco no seu anel central.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Moléculas Orgânicas

Moléculas orgânicas são ricas em carbono e hidrogênio que se unem por ligações covalentes. Essas moléculas podem ser sintetizadas por seres vivos, ou seja, produzidas dentro das células com ajuda de enzimas. Quando na molécula de um composto orgânico houver outro elemento químico além de carbono e hidrogênio, sua polaridade pode mudar, alterando também suas afinidades com outras moléculas. Estas interações podem ser investigadas através de diferentes técnicas espectroscópicas.

Algumas moléculas orgânicas têm propriedades de peroxidação, pois são instáveis em presença de luz e de peróxidos. Essas moléculas são conhecidas como FS e têm sido utilizadas em PDT, dentre elas estão as porfirinas e as ftalocianinas.

As porfirinas são compostos orgânicos nitrogenados que apresentam ligações metil e são organizadas na forma cíclica por quatro anéis pirrólicos fundidos, como mostrado na Figura 4. As porfirinas têm a propriedade de se combinarem prontamente com metais, formando as metaloporfirinas [47]. É sob esta forma que os pigmentos pirrólicos exercem as suas funções mais importantes nos organismos vivos. Praticamente todos os metais têm possibilidade de se combinarem *in vitro* com os átomos de nitrogênio centrais das porfirinas.

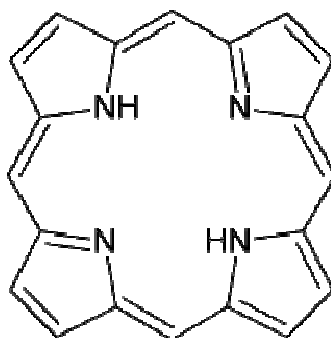


Figura 4- anel característico de todas as porfirinas.

Neste trabalho foram investigadas as porfirinas: aniônica *meso*-tetrasulfonatofenil (TPPS) e catiônica *meso*-tetrametilpiridil (TMPP), em sua forma de base livre bem como metaladas com átomo de zinco em seu anel central. Também foi empregado um outro derivado de porfirina, a protoporfirina IX (PPIX). A PPIX é um composto aromático planar, derivado da porfirina, constituída por quatro unidades pirrólicas arranjadas simetricamente e ligadas umas as outras por pontes metina. As porfirinas e a PPIX possuem uma forte banda de absorção no espectro do visível, em aproximadamente 400 nm, denominada Banda Soret e outros picos menores que são chamados de Banda Q: 510, 545, 580, 630, 670 e 700 nm. Embora os picos das bandas Q sejam 10 a 40 vezes menores que o pico em 400, muitos estudos em PDT são conduzidos usando fonte de luz no espectro da luz vermelha entre 620 e 635 nm, que proporciona maior penetração no tecido [11, 48]. As estruturas dessas moléculas estão apresentadas na Figura 5.

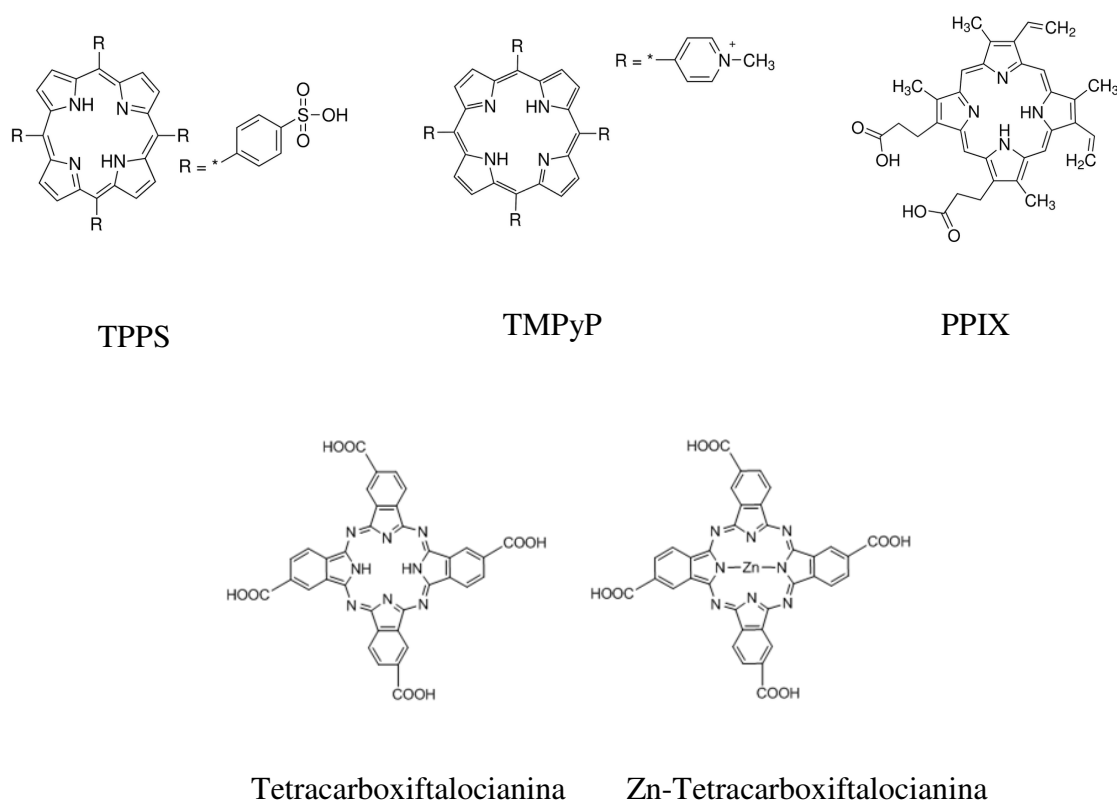


Figura 5- Moléculas orgânicas utilizadas neste trabalho.

As ftalocianinas, conhecidas como FS de segunda geração, consistem de compostos orgânicos cuja estrutura inclui um anel constituído por oito átomos de nitrogênio e oito de carbono unidos mediante ligações duplas. Apresentam intensa absorção na faixa de 600 – 710 nm, alta eficiência em formação de estado tripleto e oxigênio singleto [49]. Assim como as porfirinas, suas propriedades fotofísicas são fortemente dependentes do íon do metal central. Neste trabalho foram também investigadas as ftalocianinas com grupo carboxi em sua forma base livre e complexada com zinco em seu anel central.

3.2. Técnicas experimentais

3.2.1. Modelo fotofísico

Os processos fotofísicos envolvidos no presente trabalho podem ser descritos através de um diagrama de energia conhecido por diagrama de Perrin-Jablonski, conforme apresentado na Figura 6. No equilíbrio termodinâmico, uma molécula se encontra no estado fundamental singleto (S_0). Ao absorver um fóton de energia apropriada ela pode sofrer uma transição para o estado singleto excitado (S_1). Em seguida, ela relaxa para estados de menor energia, onde seu decaimento pode ocorrer por vários processos. Dentre eles a sua passagem direta para o estado fundamental ($S_1 \rightarrow S_0$), ou através de cruzamento intersistemas no qual ocorre passagem para o estado tripleto do FS ($S_1 \rightarrow T_1$). A energia perdida pela molécula pode ser de duas formas: decaimento radiativo e não radiativo. O processo de decaimento radiativo é a perda de energia pela emissão de um fóton, a fluorescência ($S_1 \rightarrow S_0$) quando envolvem apenas estados singletos e fosforescência quando envolve a transição do tripleto para singleto fundamental ($T_1 \rightarrow S_0$) [50]. Os processos não radiativos, geralmente, são mais comuns, onde ocorre relaxação vibracional, ou formando o estado tripleto T_1 , via cruzamento intersistemas.

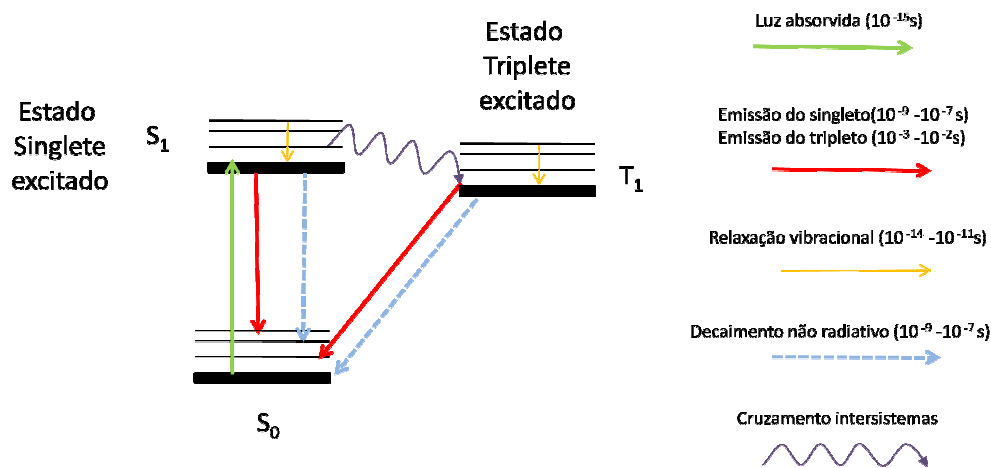


Figura 6- Diagrama de Perrin-Jablonski com os tempos característicos dos processos de excitação eletrônica e emissão.

Para avaliar os processos fotofísicos de absorção e emissão fluorescentes técnicas espectroscópicas tais como a espectroscopia de absorção UV/Vis e a de fluorescência se mostram técnicas valiosas. Na próxima seção apresentaremos uma breve discussão sobre elas.

3.2.2. Espectrofotômetro

Quando uma radiação contínua passa através de um material transparente, uma parte da radiação pode ser absorvida. Como resultado da absorção de energia, átomos ou moléculas passam de um estado de menor energia para um estado de maior energia. No caso da espectroscopia UV/Vis, as transições que resultam na absorção da radiação eletromagnética nessa região do espectro são transições entre níveis de energia eletrônicos.

A relação entre a intensidade de luz que chega na amostra e a intensidade de luz que sai da amostra é dada pela lei de Beer [50]:

$$I = I_0 e^{-\alpha l}, \quad (1)$$

onde I_0 é a intensidade da luz que chega na amostra, I é a intensidade que atravessa a amostra, α é o seu coeficiente de absorção e l é o comprimento do caminho percorrido.

A absorvância (A) de uma amostra pode ser expressa pelo logaritmo inverso da transmitância ($T= I/I_0$):

$$A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right). \quad (2)$$

Comparando as duas expressões seguintes concluímos que:

$$A = \alpha l \log(e) = 0,43\alpha l. \quad (3)$$

A lei de Beer-Lambert relaciona a absorvância com a concentração molar (c) da amostra:

$$A = \varepsilon cl, \quad (4)$$

onde ε é o coeficiente de absorção molar. Esta é uma relação muito útil na área de espectroscopia, pois exhibe uma relação direta entre a absorvância de uma amostra com sua concentração. Dito de uma forma prática, uma vez conhecida o coeficiente de absorção para um dado comprimento de onda e o caminho ótico, a medida da absorção de uma amostra pode fornecer a concentração da amostra em estudo.

Além de ser empregado para obter a concentração de uma amostra, o espectro de absorvância de uma molécula revela quais as frequências que transmitem maior energia para a molécula em estudo. Além disso, ele também permite estudar alterações e interações com outras moléculas e/ou estruturas.

O espectrofotômetro é um instrumento empregado para monitorar a luz transmitida ou absorvida por uma determinada amostra em função do comprimento de onda (ou frequência) na região ultravioleta/visível e infravermelho próximo. Um diagrama esquemático representando seu princípio de funcionamento é apresentado na Figura 7. Neste diagrama, um feixe de luz proveniente de uma fonte de radiação é colimado por uma fenda estreita e ao passar por um monocromador, constituído por elemento dispersor, tem um dado comprimento de onda selecionado. Este feixe monocromático será direcionado para a amostra em estudo e a fração transmitida será coletada por um detector. Por sua vez, o detector gera um sinal elétrico proporcional à intensidade do feixe. Através da obtenção da transmitância para um conjunto de comprimentos de onda um espectro de absorvância pode ser obtido.

Durante a rotina experimental é coletado e armazenado o espectro de absorvância de uma solução contendo apenas o solvente para ser tomado como referência, ou linha de base. Este espectro é armazenado no *software* do equipamento e

automaticamente subtraído do espectro de absorbância das amostras, garantindo assim, que o solvente não influencie nos valores das medidas das moléculas diluídas.

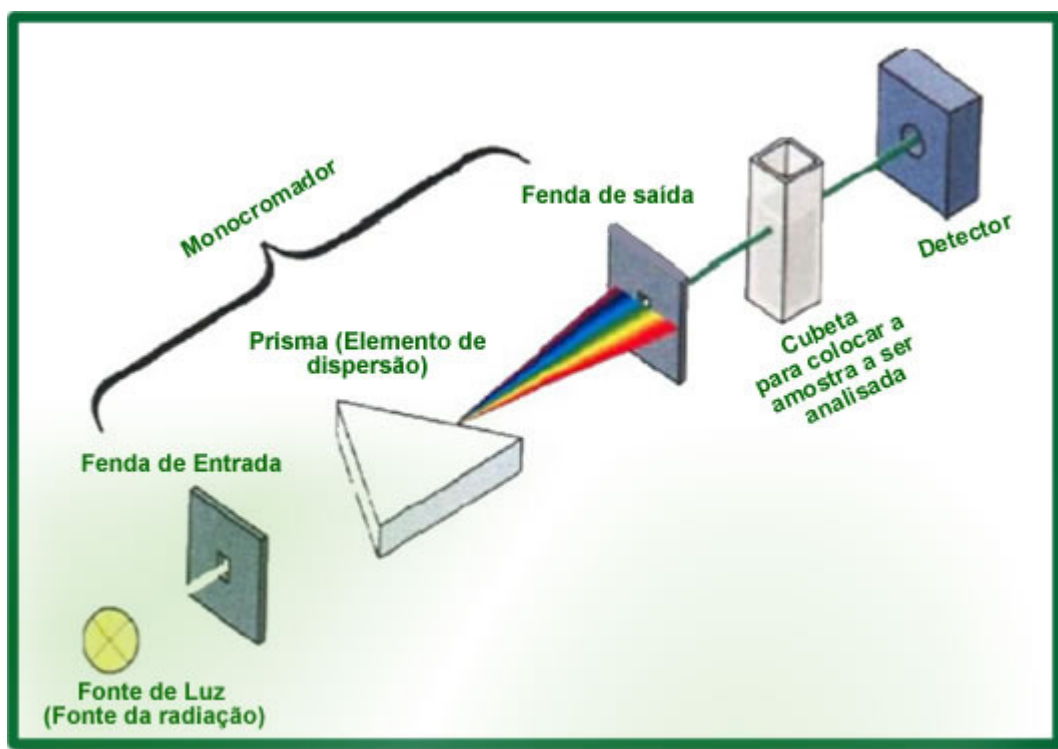


Figura 7- Diagrama esquemático do espectrofotômetro.

Alguns espectrofotômetros utilizam feixes duplos produzidos através de espelhos semitransparentes, sendo que um feixe passa através da amostra enquanto o outro feixe passa pela referência, e a comparação entre a intensidade destes dois feixes produz a leitura final do equipamento. Isto elimina problemas como flutuação na fonte.

Como fonte de luz geralmente utiliza-se uma lâmpada de tungstênio para a região do visível e infravermelho e uma lâmpada de deutério para a região do ultravioleta. A troca entre as lâmpadas de deutério e tungstênio é feita em torno de 360 nm [51].

Para a seleção do comprimento de onda efetuado no monocromador podem ser empregados tanto prismas quanto grades de difração. Diferentes comprimentos de onda (λ) têm velocidades diferentes através da matéria, sendo que quanto menor o comprimento de onda maior o desvio angular. Usando um prisma móvel juntamente com lentes adequadas e uma fenda, consegue-se selecionar comprimentos de onda com precisão de até 1 nm. Já a grade de difração nada mais é do que uma superfície contendo muitas fendas dispostas regularmente para refletir a luz. A interferência desta luz

refletida permite selecionar os comprimentos de onda de forma semelhante ao descrito para o prisma.

A cubeta é o recipiente onde a solução para as medidas é colocada e pode apresentar diferentes caminhos óticos. Sua característica fundamental é a transparência à região da radiação empregada. No caso da radiação UV utiliza-se quartzo ou sílica fundida, enquanto que na região do visível podem ser utilizados materiais mais baratos como o vidro ou plásticos [51].

O espectrofotômetro utilizado foi o da PG Instruments (England), modelo T80+, alocado no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da UFG.

3.2.3. Espectroscopia de fluorescência

O fenômeno da fluorescência se dá pelo decaimento radiativo de uma molécula excitada num processo $S_1 \rightarrow S_0$, onde após ser excitada, a molécula relaxa para o estado fundamental emitindo fótons. Através da emissão fluorescente de uma molécula, ou do seu espectro de fluorescência, podemos investigar várias propriedades e comportamento de uma substância, avaliar interações com outras estruturas ou processos que ali ocorram. O espectrofluorímetro estático nos permite uma espectroscopia de fluorescência por excitação contínua, na qual podem ser obtidos parâmetros fluorescentes como os espectros de emissão e de excitação, rendimento quântico e anisotropia.

A Figura 8 apresenta um diagrama esquemático de um espectrofluorímetro, onde uma fonte de luz contínua emite um feixe que atinge o monocromador de excitação que transmitindo luz seletivamente em um estreito intervalo de comprimento de onda. O feixe de luz selecionado atravessa fendas ajustáveis que controlam sua intensidade e atinge assim a amostra, excitando as moléculas. A fluorescência emitida é coletada por um monocromador posicionado à 90° em relação ao feixe de luz de excitação para que seja eliminado qualquer tipo de luz espalhada (a luz que não foi absorvida). A fotomultiplicadora recebe o feixe fluorescente, amplifica o sinal e cria uma voltagem proporcional à intensidade emitida [52-53].

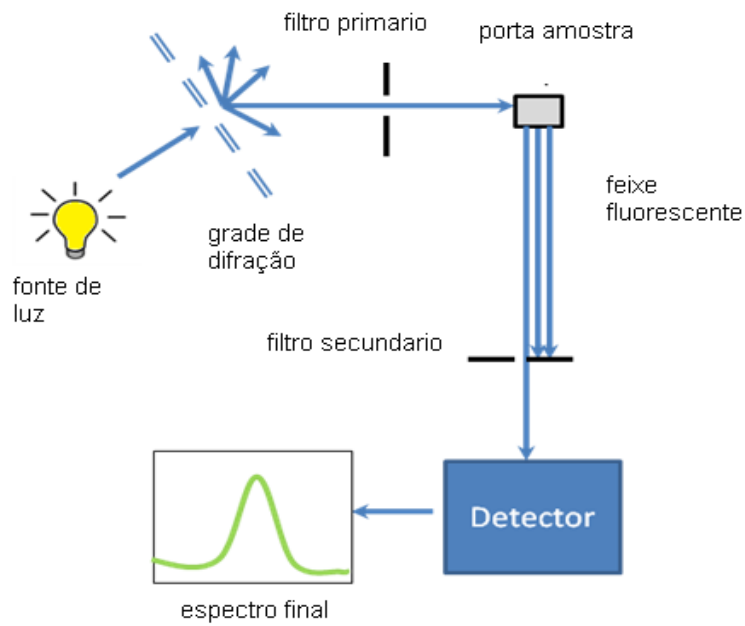


Figura 8- Diagrama esquemático espectrofluorímetro.

O espectrofluorímetro pode ser usado em sistemas biológicos que não possuem o fenômeno da fluorescência. Neste caso, usa-se uma sonda fluorescente que tenha afinidade com o meio biológico que se quer estudar. Neste trabalho pretendemos fazer avaliações na albumina do soro bovino (BSA) que já possui um sinal de fluorescência intrínseco.

O espectrofluorímetro utilizado foi o (Fluorolog FL3-221; Horiba Jobin Yvon Inc) e gentilmente cedido pelo Grupo de Ciências dos Materiais.

3.3. Metodologia

3.3.1. Cálculo do coeficiente de partição

O coeficiente de partição solvente orgânico/água foi medido usando o método do “*shake-flask*” que se baseia na determinação direta da partição das concentrações em equilíbrio de um composto em um sistema bifásico. As concentrações de FS em ambas as fases foram determinadas com base nos espectros da região UV-Vis [54].

Como as solubilidades dos FS estudados no octanol foram muito baixas, ou seja, os coeficientes de partição octanol/água foram muito pequenos, nós medimos o coeficiente de partição dos FS em butanol/água ($\text{Log } P_{B/W}$), onde foram mais solúveis e, então, calculamos os valores correspondentes no sistema octanol/água usando uma curva de calibração descrita na equação 7 [54]. Como ocorre uma pequena penetração da água no butanol e do butanol na água, um frasco contendo um volume similar tanto de água Milli-Q como de butanol foi agitado por 24 h por um agitador magnético, para promover a saturação das soluções. Mantendo o frasco em repouso por um período de 2 h a separação das fases ocorreu naturalmente. A água Milli-Q saturada com butanol foi utilizada para diluir o FS a 25 μM em um pequeno volume de água saturado (2 mL) e a seguir foi adicionado 2 mL de butanol saturado com água. O frasco contendo a mistura foi agitado no vórtex por 1 minuto e em seguida foi medido o espectro de absorção UV-Vis de ambas as fases.

O coeficiente de partição butanol/água foi calculado da seguinte forma:

$$P_{B/W} = \frac{C_B}{C_W} \times \frac{V_W}{V_B}, \quad (5)$$

onde C_B é a absorção do composto no butanol, C_W é a absorção do composto na água, V_B é o volume do butanol e V_W o volume da água. Como colocamos o mesmo volume de água e butanol (2 mL), e como o valor da concentração pode ser encontrado na equação 4, a expressão fica da seguinte forma:

$$P_{B/W} = \frac{A_B}{A_W} \times \frac{\epsilon_W}{\epsilon_B} \quad (6)$$

Para converter o Log $P_{B/W}$ no sistema octanol/água (Log $P_{O/W}$) foi usada a equação [54]:

$$\text{Log}P_{B/W} = (1,55 \times \text{Log}P_{O/W}) - 0,54. \quad (7)$$

A equação acima foi obtida pelo melhor ajuste da curva Log $P_{O/W}$ vs Log $P_{B/W}$ de compostos padrões com Log $P_{O/W}$ já conhecidos [54].

3.3.2. Preparação e marcação de eritrócitos e avaliação da foto-hemólise

O sangue utilizado neste trabalho foi coletado na hora por pessoa técnica, sendo utilizado sangue de três doadores. Foram diluídos 5 ml de sangue em 15 ml de tampão fosfato salino (PBS, 5 mM de fosfato, 150 mM NaCl, pH 7,4), distribuídos em vários eppendorfs e centrifugados a 150xg e 4°C por 10 minutos. Depois que o sobrenadante, plasma e células brancas de cada eppendorf foram retirados cuidadosamente e descartados, o volume foi completado com o mesmo tampão. Esses eppendorfs foram centrifugados novamente com três repetições do processo e depois de descartar o sobrenadante pela terceira vez, diluímos os eritrócitos no mesmo tampão até a concentração de 40% de hematócrito.

Para obter a condição final da amostra com uma concentração de 25 μM do FS na suspensão de hemácia com hematócrito de 2%, esta suspensão foi diluída mais 20 vezes. Assim, colocamos 1.275 μl de tampão, 75 μl da suspensão de eritrócito (40%) e 150 μl de porfirina diluída a 250 μM no tampão, as hemácias foram mantidas na geladeira por uma hora (garantindo um tempo de captação do FS pela membrana).

As amostras contendo os eritrócitos e os FS foram colocadas em um béquer de 2 cm de diâmetro e irradiadas individualmente, usando a luz de uma lâmpada halógena de 150 W a uma irradiância 200 mW/cm^2 sendo que o tempo de irradiação foi variado entre 1 e 90 minutos. Para uma melhor homogeneidade do sangue durante a irradiação, foi utilizado um agitador magnético e um pequeno imã.

O FS pode provocar a peroxidação na membrana do eritrócito levando ao rompimento desta membrana, resultando na foto-hemólise e liberação da hemoglobina na solução. Desta forma, logo após a irradiação, as amostras foram centrifugadas a 300xg e 4°C por 15 minutos para separar a hemoglobina, da parte residual do eritrócito que se precipita ao ser centrifugada (membranas, e outros conteúdos citoplasmáticos). A

foto-hemólise foi avaliada através do monitoramento das bandas de absorção da hemoglobina que teria sido liberada e se encontra no sobrenadante. O espectro de absorção da hemoglobina é bem conhecido na literatura e é constituído por duas bandas bem definidas em 540 e 576 nm.

3.3.3. Avaliação da peroxidação lipídica

Para verificar se houve peroxidação lipídica na foto-hemólise, o sobrenadante do processo descrito na seção anterior também foi utilizado no teste de TBARS (espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA)). Trata-se de um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico (TBA) com os produtos finais da peroxidação. Um dos principais produtos formados no processo de peroxidação é o malondialdeído (MDA), um aldeído com três átomos de carbonos e de baixo peso molecular [55]. Neste ensaio uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA para formar um complexo de cor rosa (MDA-TBA), o qual apresenta absorvância óptica máxima em comprimento de onda $\lambda = 532$ nm. Esta reação ocorre pelo ataque nucleofílico envolvendo o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MDA, seguida por uma reação similar com uma segunda molécula de TBA (Figura 9). A velocidade da reação depende da temperatura, pH e concentração de TBA [56].

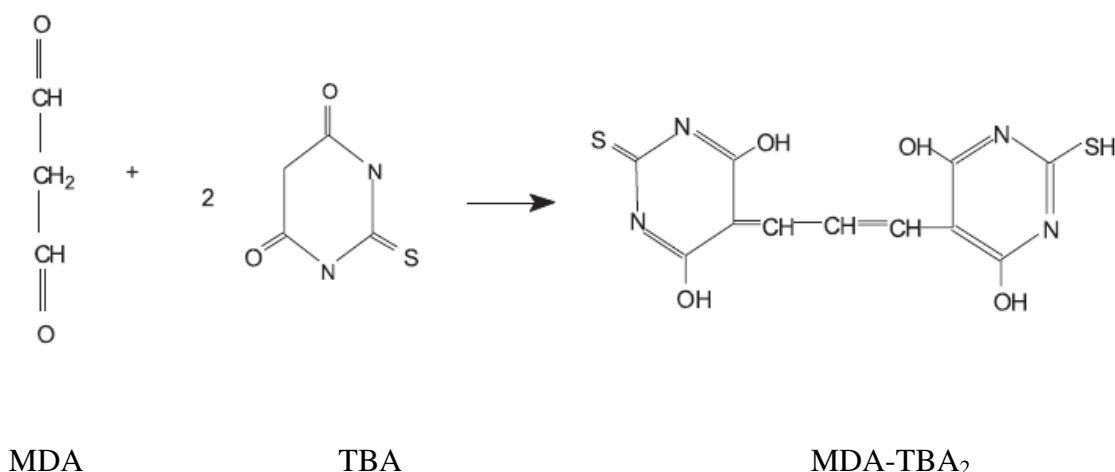


Figura 9- combinação do malondialdeído com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico forma uma molécula com absorvância conhecida.

O ensaio de TBARS foi realizado seguindo o protocolo descrito por Gilbert e col. [40]. Adicionou-se ao sobrenadante da foto-hemólise 10% (p/v) de ácido tricloro-

acético (TCA) e centrifugou-se a 300xg por 10 min a 25°C. O TCA reage com as substâncias da solução (principalmente com a hemoglobina) permitindo que estas precipitem ao serem centrifugadas, deixando assim, permanecer o MDA no sobrenadante. Retirou-se 1 ml do sobrenadante e adicionou-se 1 ml de TBA (1% TBA (p/v) em 0,05 M de NaOH) em um tubo de ensaio.

A solução reagente foi aquecida em banho maria a 95°C por 30 min e resfriada rapidamente. Adicionou-se 2 ml de butanol na solução e após agitação do tubo de ensaio a absorbância do butanol foi medida em 453 e 532 nm. As concentrações de MDA foram calculadas através da subtração de 20% da absorbância a 453 nm da absorbância a 532 nm (para evitar espalhamento de resíduos citoplasmáticos do eritrócito) e com este resultado a concentração foi obtida usando um coeficiente de extinção molar $\epsilon = 1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [40]. A concentração de MDA é geralmente na faixa dos nano a micromolar, sendo proporcional à quantidade de peroxidação lipídica que ocorreu na membrana celular.

3.3.4. Cálculo da degradação da BSA

A BSA e o FS foram diluídos em PBS, ambos em uma concentração de 10 μM , em um volume de 6 mL. Depois de deixar 1 hora incubando na geladeira, a solução foi colocada em um béquer padronizado e irradiado, usando a luz de uma lâmpada halógena de 150 W a uma irradiância de 120 mW/cm^2 , por 40 minutos. A cada intervalo de 5 minutos, uma alíquota foi retirada e medida no espectrofluorímetro e no espectrofotômetro [43].

Para o cálculo da constante de degradação da BSA foi feito um gráfico da intensidade do sinal de fluorescência da BSA (340 nm) em função do tempo de irradiação e feito um ajuste exponencial da curva:

$$I = I_0 e^{-kt}, \quad (8)$$

onde I é a intensidade de fluorescência, I_0 é a intensidade de fluorescência da solução no escuro, t é o tempo e k é a constante de degradação da amostra.

3.3.5. Análise estatística

Alguns de nossos dados foram expressos como a média \pm desvio padrão (DP) a partir de pelo menos três experimentos independentes. Os dados foram comparados através de análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey para diferenças estatisticamente significativas com $P < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Coeficiente de partição

Na Figura 10 apresentamos o espectro de absorção da porfirina ZnTMPP em butanol e em água, para obter o coeficiente partição representado pelo $\text{Log } P_{O/W}$. Como mencionado na seção de Materiais e Métodos (seção 3.3.1), as moléculas orgânicas estudadas neste trabalho mostraram-se muito hidrofílicas, que nos forçou a usar butanol no lugar do octanol para facilitar a dissolução das moléculas e determinar o coeficiente de partição. A conversão para o sistema octanol/água foi obtida utilizando uma curva de calibração conforme descrito na seção 3.3.1.

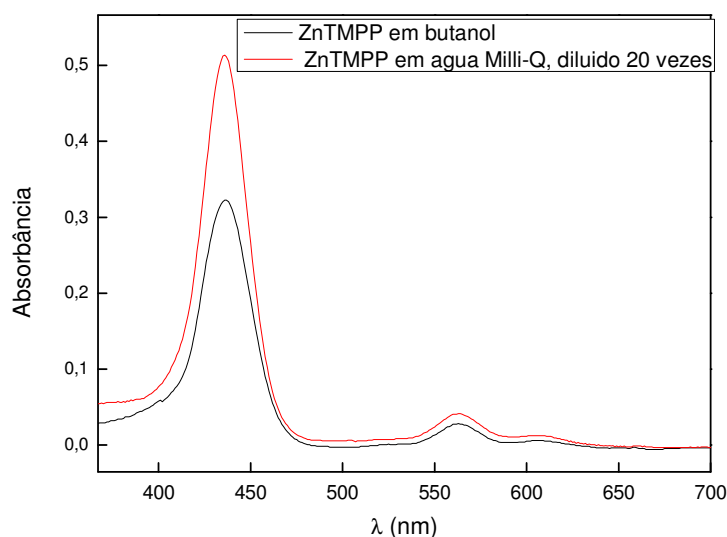


Figura 10 - Espectros de absorbância da Zn TMPP no butanol e na água.

O valor do $\text{Log } P_{O/W}$ obtido para cada FS está apresentado na Tabela 1 (próxima seção), onde os valores são a média e desvio padrão de três experimentos independentes. Observando que estes valores são negativos constatamos sua baixa lipofílicidade. Porque de acordo com a equação (6) vemos que quando a absorção na água é maior que no butanol, o valor de $P_{B/W}$ vai ser menor que 1 e o $\text{Log } P_{B/W}$ vai ser negativo.

A comprovação e validade dos nossos resultados podem ser confirmadas ao compararmos o valor do $\text{Log } P_{O/W}$ obtido por Engelmann e col. para a TMPP ($-3,06 \pm 0,09$) [57], que é muito próximo ao valor encontrado em nosso trabalho ($-3,4 \pm 0,1$). Isto mostra a consistência dos dados que obtivemos e mostra a validade do método empregado.

4.2. Ação hemolítica dos fotosensibilizadores

Nesta seção apresentamos o estudo da ação hemolítica dos FS avaliados. Como descrito na seção 3.3.2, a peroxidação na membrana do eritrócito provocada pelo FS leva ao rompimento da membrana, resultando na hemólise e liberação da hemoglobina na solução. Desta forma, podemos estudar e quantificar tal processo monitorando a intensidade das bandas de absorção da hemoglobina liberada. A Figura 11 mostra os espectros de absorbância da hemoglobina liberada pela foto-hemólise em função do tempo de irradiação, para o caso dos eritrócitos tratados com a protoporfirina IX.

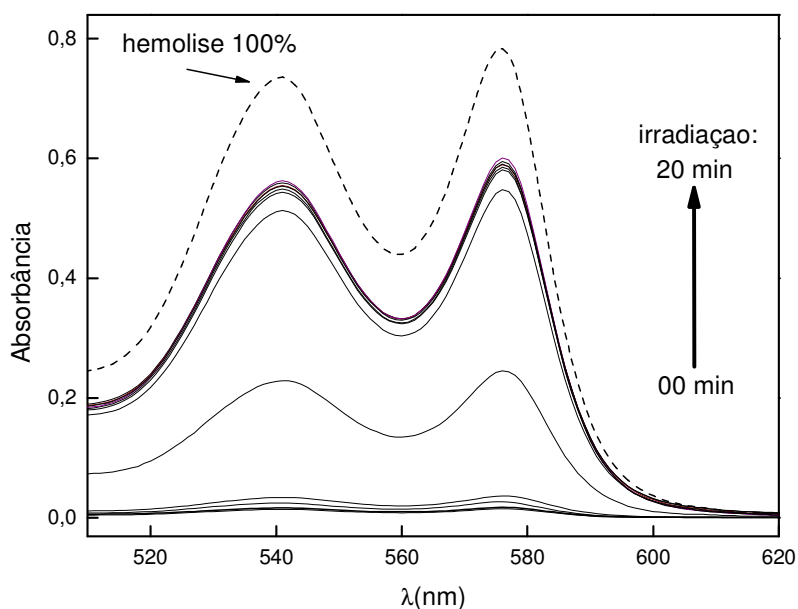


Figura 11 - Espectros de absorbância da hemoglobina liberada pela foto-hemólise causada pela irradiação em presença da protoporfirina IX em função de diferentes tempos de irradiação.

O máximo grau de hemólise (100%), ou hemólise total, apresentada na Figura 11 foi obtido suspendendo os eritrócitos em água milli-Q ao invés da solução salina tamponada. Este procedimento provoca a ruptura das membranas de eritrócitos liberando toda a hemoglobina contida na célula. O valor da absorbância nessa condição fornece a máxima hemólise.

A partir dos espectros foram calculadas as porcentagens de hemólise para cada tempo de irradiação. Para o cálculo foi tomada a banda de absorção em 540 nm, de onde foi subtraído o valor da absorção de uma amostra controle, a qual permaneceu no escuro, sem irradiação. Esse valor foi dividido pelo valor da absorbância da amostra sob condição de hemólise total e multiplicada por 100%. Cabe destacar que esse procedimento também poderia ser aplicado para a banda em 576 nm e que deve gerar resultado semelhante.

Pela Figura 11 pode-se observar uma banda de absorção pouco intensa da hemoglobina, quando a suspensão de eritrócito foi mantida no escuro, tanto na presença quanto na ausência da porfirina. Esse fato parece indicar a ocorrência de um certo percentual de hemólise, mesmo no escuro e na ausência dos FS. Sob pequenos intervalos de irradiação (2 e 4 minutos) essas bandas continuam com baixa intensidade, mas começam aumentar a partir de 6 minutos de irradiação e atingem uma saturação após um intervalo de 10 min, conforme representado na Figura 12, onde mostramos o valor da absorbância do pico da hemoglobina centrado em 540 nm em função do tempo de irradiação. O efeito da luz sobre os eritrócitos na ausência das porfirinas foram avaliados por sua irradiação durante 90 minutos, onde pôde-se observar um pequeno percentual de hemólise (1-2%).

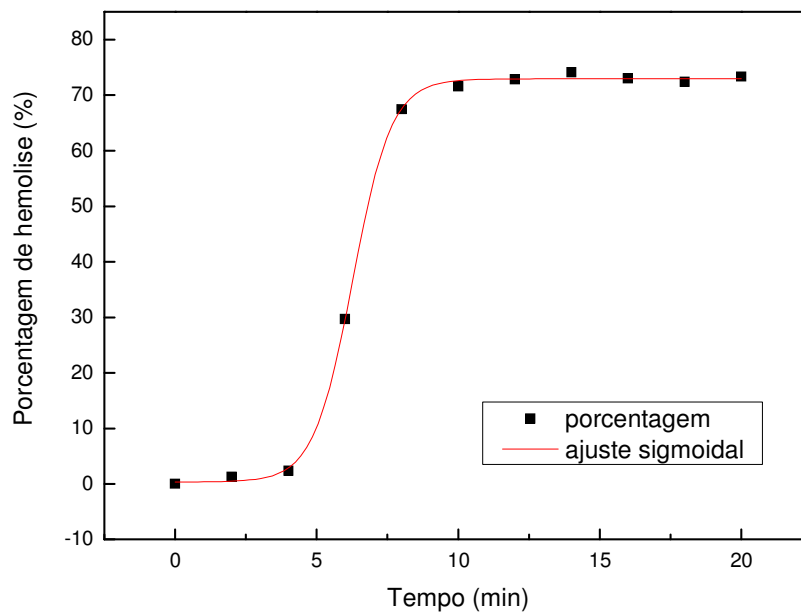


Figura 12- Ajuste sigmoidal da curva de percentual hemolítico para a protoporfirina IX em função do tempo de irradiação.

Sobre a curva do gráfico de percentual hemolítico foi realizado o ajuste sigmoidal (Boltzmann) apresentado no gráfico da Figura 12 e dado pela equação 9.

$$y = H_{\max} + \frac{(H_{\min} - H_{\max})}{1 + e^{(x - T_{1/2})/dx}}, \quad (9)$$

Onde $T_{1/2}$ é o tempo para 50% de hemólise, H_{\min} é a hemólise com FS no escuro, H_{\max} é a hemólise máxima atingida e dx é a inclinação da curva sigmoidal. No caso da protoporfirina IX apresentado na Figura 11, o tempo necessário para 50% de hemólise foi $T_{1/2} = 6,3$ minutos, as percentagens de hemólise mínima e máxima atingidas foram 0,3 e 72,9%, respectivamente. A inclinação da curva sigmoidal está apresentado na Tabela 1 juntamente com os parâmetros de todas as moléculas estudadas.

Tabela 1

Parâmetros de hemólise em suspensão de eritrócitos (2% de hematócrito em PBS e temperatura ambiente) causada por irradiação (lâmpada halógena de 200 mW/cm²) e presença de 25 µM de porfirinas e coeficiente de partição de cada FS. Todos os valores são média e desvio padrão de três experimentos independentes.

Amostra	T _{1/2} (min)	H _{min} (%)	H _{máx} (%)	dx	Log P _{O/W}
Carboxifitalocianina	17±1 (A)*	0,4±0,1	95±1 (A)	0,1±0,1	-2,8±0,2 (A)
Zn-carboxifitalocianina	2±1 (B)	0,4±0,4	90±3 (AB)	0,2±0,3	-2,7±0,2 (A)
TPPS	25±2 (C)	2,0±3,0	72±6 (BC)	1,0±1,0	-4,0±0,1 (B)
ZnTPPS	29±5 (C)	2,0± 2,0	80±13 (ABC)	2,0± 2,0	-2,9±0,2 (A)
PPIX	6±1 (BD)	0,3±0,1	73±6 (BC)	0,7±0,1	-0,9±0,2 (C)
TMPP	25±4 (C)	1,8±0,3	65±5 (C)	0,4±0,4	-3,4±0,1 (AB)
ZnTMPP	10±1 (D)	2,5±1,7	76±5 (ABC)	0,2±0,1	-3,0±0,1 (A)

Parâmetros: T_{1/2}, tempo para 50% de hemólise; H_{min}, hemólise com MO no escuro; H_{máx}, hemólise máxima atingida; dx, inclinação da curva sigmoidal; Log P, proporcional ao coeficiente de partição.

*Significância estatística: em cada coluna, os dados que não são indicados com letras maiúsculas em comum são significativamente diferentes com P < 0,05. Não há diferença significativa entre os parâmetros H_{min} e dx das amostras.

Com base nos valores da Tabela 1, foi feito um gráfico da correlação entre T_{1/2} e o Log P_{O/W}. Como mostrado na Figura 13:

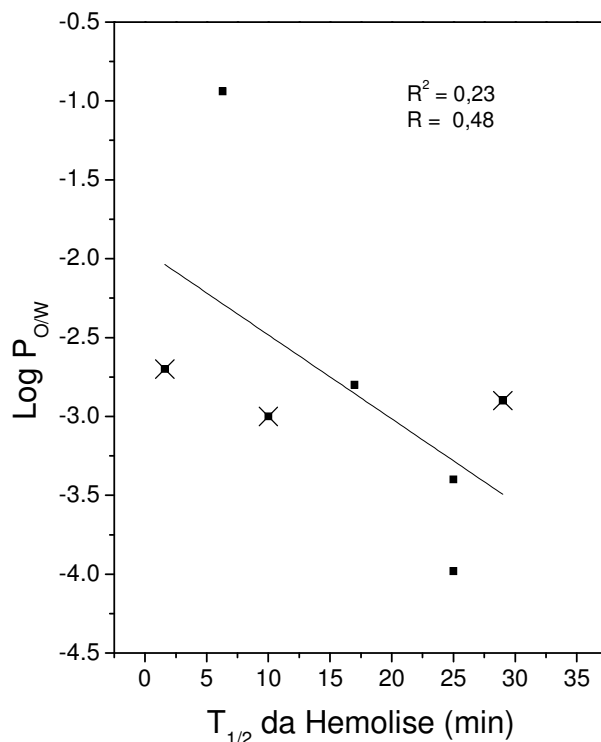


Figura 13- Gráfico de correlação $T_{1/2}$ vs $\text{Log } P_{O/W}$ e ajuste linear. Os símbolos indicados com x se referem aos dados dos FS contendo Zinco. Equação: $\text{Log } P_{O/W} = -1,952 - 0,053 T_{1/2}$.

Nota-se do gráfico da Figura 12 que a correlação foi fraca com um coeficiente $R = 0,48$ e que os FS contendo o zinco não seguiram o mesmo comportamento dos outros FS. Os valores de $\text{Log } P_{O/W}$ dos FS com zinco foram semelhantes, mas os valores de $T_{1/2}$ muito diferentes. Por isso foi realizada uma nova análise contendo apenas os dados dos FS na sua forma base livre, sem zinco (Figura 14). Neste caso, o coeficiente de correlação foi maior com $R^2 = 0,93$, sugerindo que entre os FS, na sua forma base livre, os mais agressivos aos eritrócitos são aqueles com maior afinidade por membrana. Assim, a PPIX que foi FS mais lipofílico, também foi o FS na forma base livre que teve a maior eficiência foto-hemolítica.

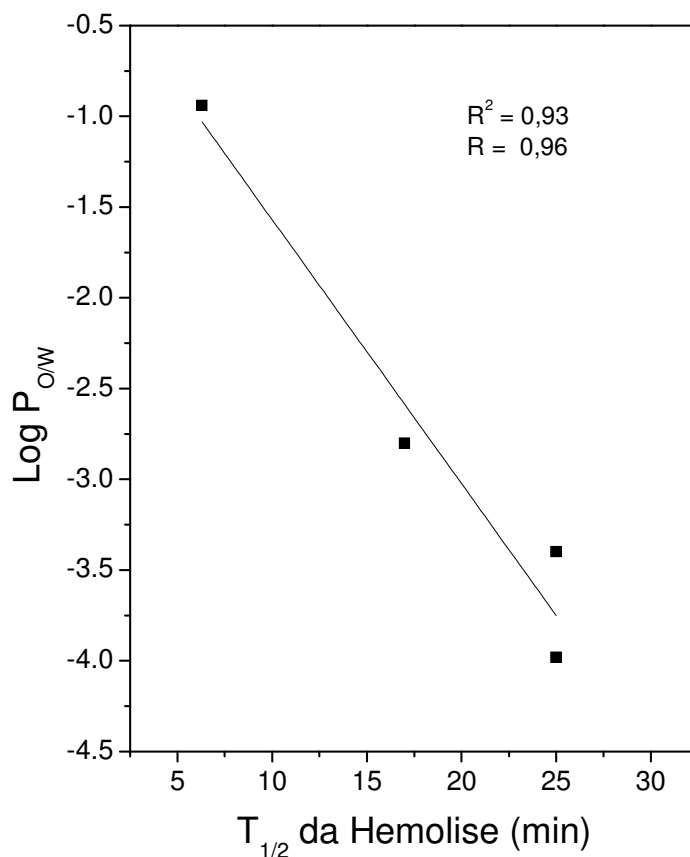


Figura 14- Gráfico de correlação $T_{1/2}$ vs $\text{Log } P_{ow}$ e ajuste linear para os FS sem Zinco. Equação: $\text{Log } P_{ow} = -0,115 - 0,145 T_{1/2}$.

Para uma melhor compreensão da hemólise causada pela irradiação, foi realizado outro teste hemolítico, onde acrescentamos 2 mM de azida sódica (NaN_3) no tampão fosfato utilizado para diluir o sangue. O restante do experimento da foto-hemólise foi realizado da mesma forma que realizada previamente, seção 3.3.2. Como exemplo, apresentamos na Figura 15 o gráfico do percentual de hemólise em função do tempo para a ZnTMPP, com tratamento normal (linha preta) onde o $T_{1/2}$ foi de aproximadamente 10 min e com tratamento com azida (linha vermelha) que o $T_{1/2}$ aumentou para aproximadamente 13 minutos. De acordo com os valores do $T_{1/2}$ para os dois tratamentos, observamos que a azida ajuda a combater o processo de hemólise.

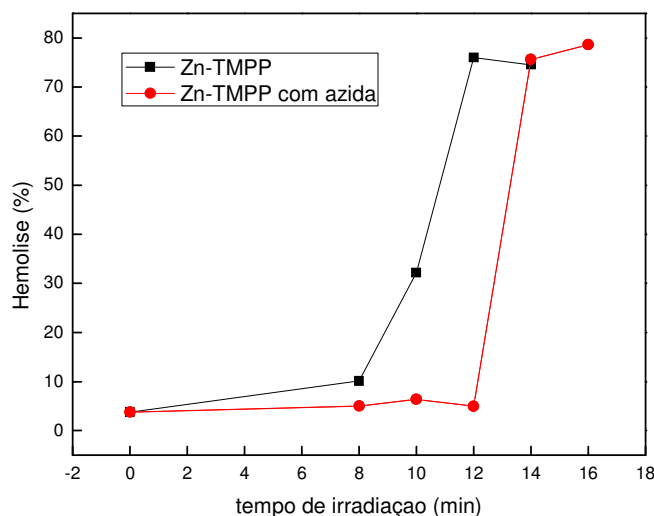


Figura 15- Gráfico da porcentagem de hemólise em função do tempo de irradiação causada pelo FS Zn-TMPP em PBS com e sem azida sódica.

4.3. Peroxidação lipídica

Quanto maior a peroxidação lipídica maior a formação de MDA (produto da peroxidação) e quando adicionamos TBA maior vai ser a banda de absorção em 532 nm, conforme mencionado na seção 3.3.3. Na Figura 16 temos duas curvas: a linha vermelha representa a porcentagem de hemólise formada pela Znftalocianina em função do tempo de irradiação e a linha preta representa a concentração de MDA em função do tempo de irradiação. O ponto azul representa a concentração de MDA quando a hemólise total é provocada com adição de água milli-Q na amostra, onde vemos que praticamente não houve peroxidação.

Podemos observar uma correlação entre a porcentagem de hemólise e formação de MDA causada pela irradiação dos eritrócitos em vários tempos, na presença da Zn ftalocianina. O valor de hemólise máxima para a Znftalocianina em quatro minutos de irradiação atingiu o pico de aproximadamente 100%, enquanto na formação de MDA é observado um pico em 12 minutos com aproximadamente 512 nM, mas em 6 minutos parece que a curva já atingiu sua saturação. Já a formação de MDA para a hemólise

causada pelo rompimento da membrana por pressão osmótica (provocada por água milli-Q) foi de apenas 16 nM, mostrando que a metodologia aplicada na determinação da formação de MDA foi eficiente na separação deste composto num sistema contendo alta concentração de hemoglobina e membrana isolada.

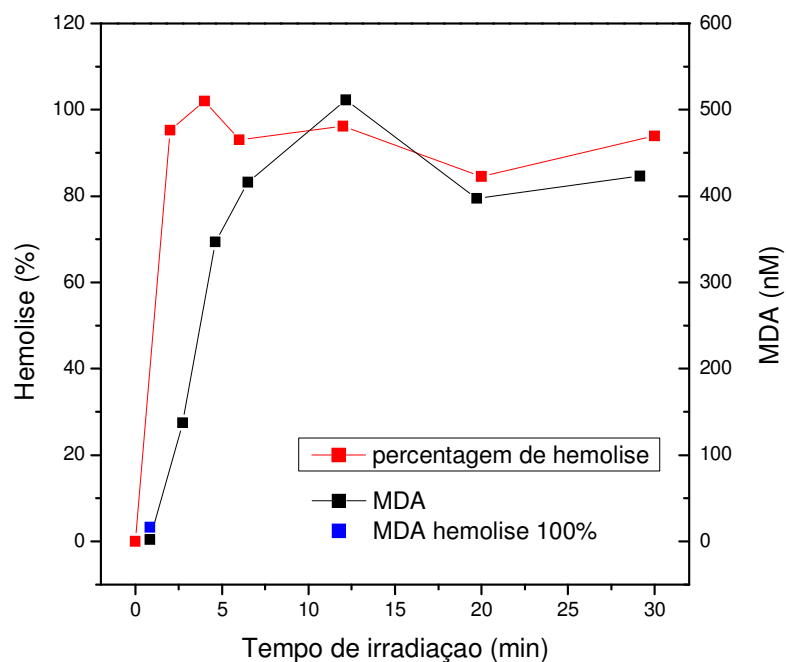


Figura 16- Gráfico do percentual de hemólise (linha vermelha) comparado com a formação de MDA (linha preta) em suspensão de eritrócitos irradiada na presença do FS Zn Ftalo.

Os dados obtidos para os outros FS estudados neste trabalho estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2

Concentração máxima de MDA formada (em nanomolar) e tempo para formação de 50% da máxima concentração de MDA ($T_{1/2}$) em suspensão de eritrócito a 10% de hematócrito, em PBS e temperatura ambiente, produzida por irradiação com lâmpada halógena de 200 mW/cm² e presença de 25 µM de MO.

Moléculas Orgânicas	[MDA] _{máx} (nM)	$T_{1/2}$ (min)	$T_{1/2}$ (min) hemólise*
Carboxifitalocianina	466	22	17±1
Zn-carboxifitalocianina	512	3	1,6±0,6
TPPS	472	44	25±2
ZnTPPS	146	36	29±5
PPIX	1075	28	6,3±0,9
TMPP	715	28	25±4
ZnTMPP	591	17	10±1

*Os valores de $T_{1/2}$ da hemólise apresentados na Tabela 1 foram colocados aqui para efeito de comparação.

A possível correlação entre os $T_{1/2}$ da hemólise e da formação de MDA também foi analisada através do gráfico apresentado na Figura 17. Agora a correlação incluindo as sete moléculas orgânicas foi relativamente boa, sendo $R^2 = 0,57$ e $R = 0,75$.

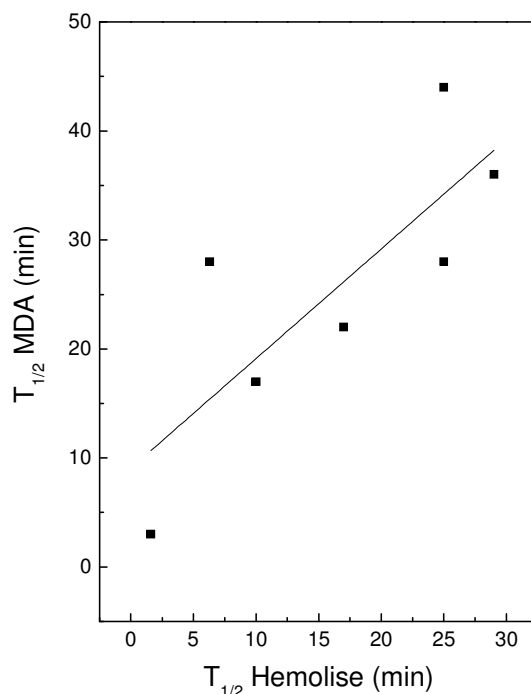


Figura 17- Gráfico de correlação entre os $T_{1/2}$ de hemólise e de formação de MDA. Equação: $T_{1/2} (MDA) = 9,061 + 1,006 T_{1/2} (hemólise)$.

Através desse gráfico, podemos concluir que a foto-hemólise causada pelos FS deste trabalho, está diretamente ligada com a sua capacidade de peroxidação lipídica.

4.4. Degradação de BSA

A membrana celular do eritrócito é formada basicamente de lipídeos e proteínas. Para compreender a interação do FS com a membrana avaliamos a peroxidação lipídica através da técnica de TBARS e a oxidação protéica através da degradação de BSA, na qual compreendemos melhor, também, a interação de FS com biomoléculas, já que a albumina é a principal proteína de transporte do FS no sangue.

A Figura 18 mostra um gráfico representativo do decaimento de sinal fluorescente da BSA com a porfirina TMPP conforme o tempo de irradiação (painel superior), e no gráfico do painel inferior está o decaimento no valor do pico de fluorescência (340 nm) como função do tempo de exposição à luz da lâmpada halógena. Fazendo um ajuste exponencial nessa curva podemos encontrar a constante de degradação, como mostrado na seção 3.3.4 de Materiais e Métodos e no caso do FS

TMPP seu valor foi de $0,088 \text{ s}^{-1}$. Os valores das constantes de degradação estão apresentados na Tabela 3 para todos os FS.

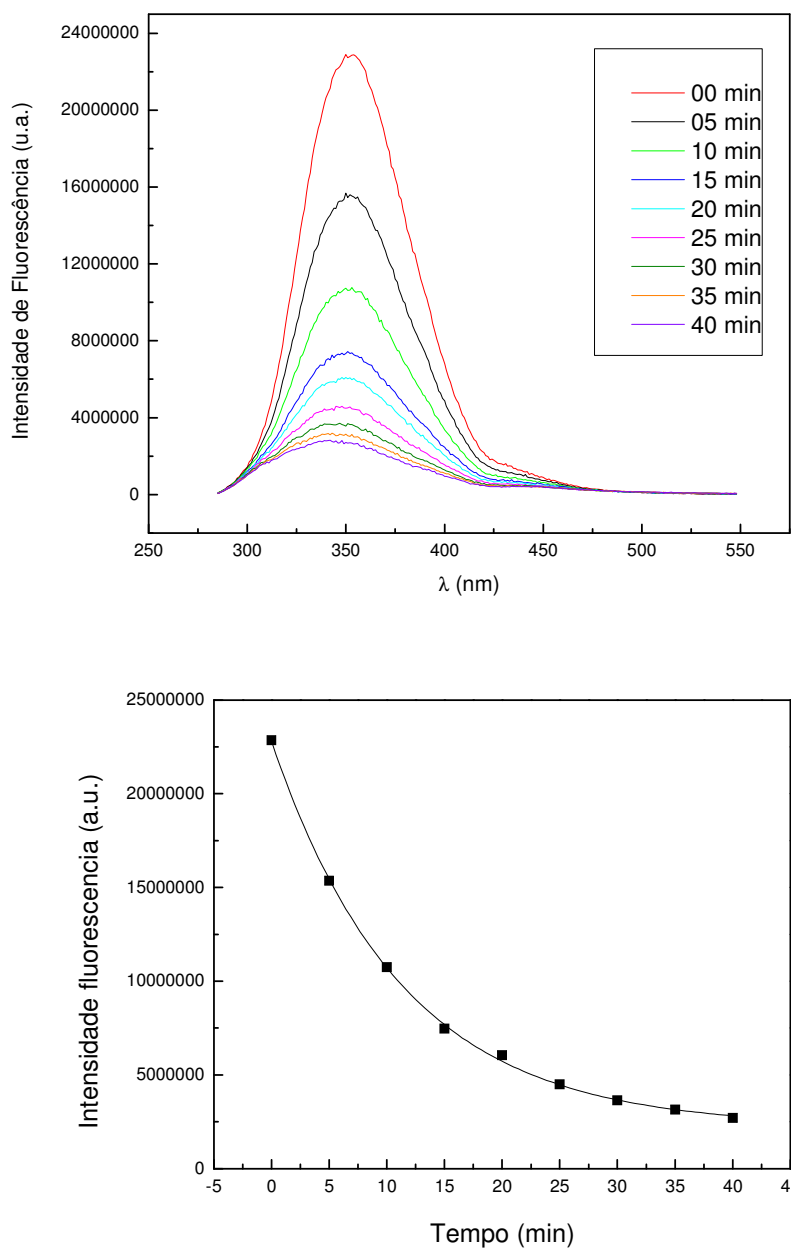


Figura 18- Intensidade do sinal fluorescente da BSA a $10 \mu\text{M}$ + TMPP $10 \mu\text{M}$ para vários tempos de irradiado (Painel superior) e decaimento do sinal fluorescente em função do tempo de irradiação (Painel inferior).

Na Figura 19 temos o decaimento exponencial do pico característico da BSA, com o tempo para as moléculas orgânicas: TMPP e TPPS em base livre e metalada com átomo de zinco em seu anel central. Através deste gráfico podemos observar que a

presença do zinco acelera a degradação de BSA e que a TPPS atinge a saturação da BSA mais rápido que a TMPP.

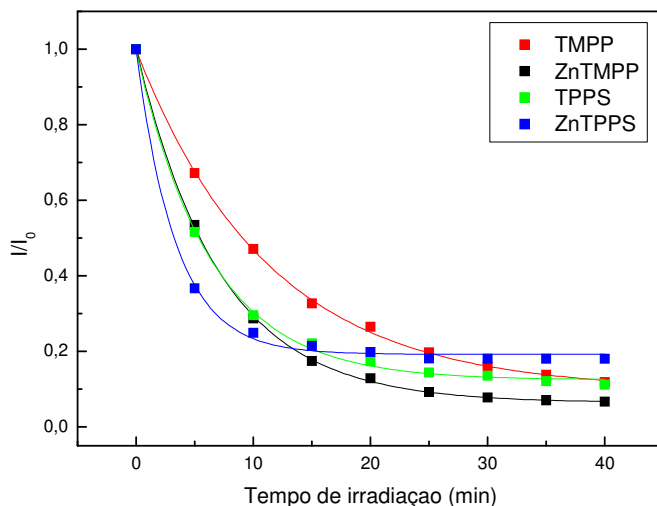


Figura 19- Curvas de decaimento da intensidade do sinal fluorescente da BSA a $10 \mu\text{M} + 10 \mu\text{M}$ de FS como função do tempo de irradiado.

Tabela 3

Constante de decaimento temporal do sinal de fluorescência da BSA a $10 \mu\text{M}$ em PBS devido à irradiação com lâmpada halógena de 120 mW/cm^2 na presença de moléculas orgânicas ($10 \mu\text{M}$).

Moléculas Orgânicas	Constante de decaimento (s^{-1})
Zn-Carboxifitalocianina	$0,092 \pm 0,007$
TPPS	$0,158 \pm 0,005$
Zn-TPPS	$0,300 \pm 0,020$
TMPP	$0,088 \pm 0,002$
Zn-TMPP	$0,140 \pm 0,002$

5 DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentadas as discussões dos valores encontrados através das diversas técnicas empregadas para uma avaliação e comparação dos FS.

Ao avaliar a lipofilicidade dos FS apresentado na seção 4.1 e Tabela 1, foi observado que os valores do Log $P_{O/W}$ de seis dos FS ficaram entre -4,0 a -2,7, que representam um caráter hidrofílico, enquanto que a protoporfirina IX (Log $P_{O/W}$ de -0,9) é a menos hidrofílica dentre elas.

Através da análise estatística feita para os valores do Log $P_{O/W}$ verifica-se que a lipofilicidade das MO: a ftalocianina base livre e metalada com zinco, a ZnTPPS, a TMPP base livre e metalada com zinco não tem diferença significativa. As MO que apresentam uma lipofilicidade diferenciada foi a TPPS que foi a mais hidrofílica e a PPIX que foi a mais lipofílica.

A introdução do átomo de zinco no anel central da ftalocianina e da TMPP não alterou significativamente o caráter hidrofílico destes FS. Contudo, no caso da TPPS a presença do metal reduziu seu caráter hidrofílico.

Quanto à eficiência foto-hemolítica sobre o eritrócito, através da análise estatística, apresentada na Tabela 1, verifica-se que o $T_{1/2}$ da TPPS base livre e metalada com zinco e a TMPP não tem diferença significativa, sendo menos eficientes que as demais MO. Já o FS com maior $T_{1/2}$ foi a ftalocianina complexada com zinco, seguida da PPIX. A ZnTMPP e a ftalocianina base livre tem uma eficiência foto-hemolítica intermediária quando comparada com o $T_{1/2}$ dos outros FS.

A presença do zinco na TPPS não alterou significativamente o tempo de irradiação necessário para 50% de hemólise, mas aumentou a eficiência da TMPP, reduzindo o $T_{1/2}$ de 25 para 10 minutos e da ftalocianina, com uma considerável redução do $T_{1/2}$ de 17 para 2 minutos (Tabela 1). Os valores encontrados para o Log $P_{O/W}$, que esta relacionado com a afinidade por membrana, sugerem que o aumento da eficiência fotodinâmica proporcionado pelo zinco não foi devido a um aumento na afinidade da molécula pela membrana.

Analisando a possível correlação entre o parâmetro Log $P_{O/W}$ e o $T_{1/2}$ de hemólise, notamos apenas fraca correlação com um coeficiente R de 0,48 (Figura 13). Entretanto, notamos que apenas as moléculas contendo zinco não seguiam a correlação e que havia correlação para as outras quatro moléculas com R = 0,96 (Figura 14). Estes

dados experimentais indicam que para essas moléculas a eficiência fotodinâmica aumenta com a maior afinidade por membrana celular. Cavalcanti e col. (2009) [43] estudaram a foto-hemólise dos FS Photofrin®, Photogem®, Photosan® e Photodithazine®, irradiando a suspensão de eritrócito com LED de 630 nm e medindo o parâmetro $T_{1/2}$. Os autores também mediram o $\text{Log } P_{O/W}$, encontrando valores de -0,22 a +0,20. Através dos valores encontrados por Cavalcante e col. (2009), nós calculamos o coeficiente de correlação de $T_{1/2}$ versus $\text{Log } P_{O/W}$, para os derivados de porfirina utilizados por eles, que foi $R = 0,77$. Assim, os autores encontraram que para os quatro FS estudados as maiores eficiências de foto-hemólise foram das moléculas com maiores afinidades por membrana [43]. Isso pode ser explicado porque segundo Tomazini e col. [58] a solubilidade do FS, a hidro ou lipofílicidade, assim como a quantidade de cargas periféricas e o tamanho da molécula determinam a difusão do FS na célula.

Um bom FS seria um composto com forte absorção da luz na região visível do espectro eletromagnético, alto rendimento quântico de formação de estados tripletos e longo tempo de vida, o que pode facilitar uma alta eficiência de formação de oxigênio singlete (1O_2) [59]. Não deve ser tóxico na ausência da luz, teria uma maior concentração no tecido alvo e seria eliminado do corpo facilmente para evitar foto-sensibilização da pele [60-61]. Se por um lado os FS de caráter mais hidrofílico são menos eficientes devido à menor afinidade por membrana [61], por outro lado, tendo uma melhor solubilidade em água, são de mais fácil distribuição pelo corpo e também de mais fácil eliminação. A inserção de moléculas muito hidrofóbicas no organismo humano muitas vezes requer o uso de nanocarreadores e também essas moléculas podem se acumular nos tecidos aumentando o nível de toxicidade. É conhecido que a ftalocianina de zinco tem alta eficiência fotodinâmica, devido ao íon metálico central Zn (II), cuja camada d está totalmente preenchida, fazendo com que o estado tripleto da molécula tenha vida longa, o que é essencial para a geração de grande quantidade de EROs [62-63]. Segundo Lutton e col. [64] o átomo de metal central da porfirina desempenha um papel importante na determinação das propriedades fisiológicas e farmacológicas dos complexos de porfirina. Segundo Tomazini e col. a presença de um metal central e o grau de sulfonação, ou outros substituintes periféricos que aumentem a solubilidade da molécula, parecem influenciar a capacidade de fotossensibilização [58].

Pavani e col. [61] estudaram os efeitos fotodinâmicos associados à hidrofobicidade e inserção de zinco em porfirinas sobre mitocôndrias isoladas e células HeLa. A eficiência fotodinâmica foi diretamente proporcional à afinidade das porfirinas

por membrana e não houve uma boa correlação com a acumulação nas mitocôndrias. Este fato indica que a interação do FS com a membrana celular é um fator chave para alcançar maior eficiência na PDT. A presença de zinco diminuiu a interação das porfirinas com a mitocôndria, explicado pelas características particulares da membrana interna mitocondrial, e aumentou a interação com a membrana citoplasmática, levando a uma melhor eficiência fotodinâmica [61]. Em nosso trabalho a presença do zinco aumentou a eficiência fotodinâmica nas bases da ftalocianina e TMPP, mas não aumentou o caráter hidrofílico dessas bases, sugerindo que mesmo sem mudar o caráter hidrofílico destes FS, de alguma forma o zinco favoreceu a interação deles com a membrana. Uma vez que o principal causador dos danos é o oxigênio singlete, que possui um tempo de vida relativamente curto (10^{-6} a 10^{-9} s), sua eficiência é considerável quando é gerado no interior de membrana ou em sua proximidade [61]. Entretanto, este último argumento parece não ser totalmente necessário desde que o oxigênio singlete é de rápida difusão e no tempo de vida de 1 μ s pode ter um caminho livre médio de 100 nm, o que corresponde a mais de 20 vezes a espessura de uma membrana celular [65].

A PDT se baseia na formação de duas classes de EROs, uma criada através da transferência de elétrons (reação do tipo I) e a outra por transferência de energia (reação do tipo II) [14]. A transferência de elétrons para a molécula de O_2 pode produzir superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\cdot OH$) e radicais lipídicos [66]. Na reação do tipo II, a transferência de energia para o O_2 resulta na formação de oxigênio singlete (1O_2) [14]. O oxigênio singlete é considerado o mais importante formador de EROs, podendo oxidar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e alterar irreversivelmente as atividades metabólicas, resultando na morte celular [66-67]. Neste trabalho observamos que a azida sódica reduz o $T_{1/2}$ do potencial hemolítico dos FS. A azida é um inibidor da catalase que protege os eritrócitos do estresse oxidativo gerado com o peróxido de hidrogênio [24]. Tem sido demonstrado que na presença de 2 mM de azida na suspensão de eritrócito, apenas 30 μ M de H_2O_2 foi suficiente para causar hemólise, entretanto, na ausência de azida nem mesmo 10 mM de H_2O_2 causou hemólise [24]. É conhecido que a azida é um eficiente supressor de oxigênio singlete [68], de modo, em nossos experimentos este último papel foi mais importante que o de inibidor da catalase. No trabalho de Cavalcante e col. [43], também foi avaliado o efeito fotodinâmico de diferentes derivados de porfirina, com diferentes lipofilicidades, em

eritrócitos e foi demonstrado que o manitol não reduziu o $T_{1/2}$ de hemólise. Como o manitol é um inibidor de radicais livres e não inibe o oxigênio singlete [43], este resultado indica que os danos provocados pelos FS nos eritrócitos foram em grande parte devido a formação das reações do tipo II, ou seja, iniciada a partir do oxigênio singlete.

Ion e col. (2012) [69] aplicaram terapia fotodinâmica usando o sistema nanocarreador que emprega a combinação do fulereno C_{60} , PVP (um polímero solúvel em água) e TMPP em ratos Wistar subcutaneamente inoculados com Carcinoma de Walker 256. Os animais foram irradiados no comprimento de onda $\lambda = 685$ nm por 15 minutos, 24 h após a administração intraperitoneal de 10 mg do FS/kg de peso corporal. Após a PDT os índices de peroxidação lipídica e oxidação de proteína foram avaliados no plasma sanguíneo e no homogenato do tumor usando os ensaios de TBARS e carbonila de proteína (método para quantificar a oxidação de proteínas [70-71]) e encontraram um aumento em ambos os índices [69]. Gomes e col. (2013) [72] estudaram os efeitos fotodinâmicos da galatoporfirina catiônica contra duas bactérias ambientais, *Micrococcus sp.* e *Pseudomonas sp.*, que são resistentes ao estresse oxidativo induzido por UV-B. As amostras foram irradiadas com lâmpada de quartzo/halogênio e fibra ótica filtrando a faixa de 400 a 800 nm. Interessante que a formação de MDA e carbonila com 5 minutos de irradiação foi bem menor do que com 15 minutos. Em nosso trabalho foi observado um comportamento similar na formação de MDA, mostrando curva sigmoideal com o tempo de irradiação. Isso sugere que o processo oxidativo precisa de certo tempo inicial até desencadear um ataque mais pronunciado sobre as células, dando a idéia de danos acumulativos.

A formação de MDA indica a ocorrência de peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados e a membrana plasmática deve ser o maior alvo do FS [72]. Gomes e col. [72] encontraram que a formação de MDA e carbonila seguem similar dependência temporal, sugerindo que a peroxidação lipídica e oxidação de proteínas ocorrem ao mesmo tempo e ambos os componentes são atingidos pelo estresse oxidativo na membrana. Nossos resultados indicaram uma correlação entre a dependência temporal do potencial hemolítico e da formação de MDA, sugerindo que os principais efeitos dos FS estudados foram um ataque sobre a membrana dos eritrócitos. Para confirmar que os FS danificaram a membrana do eritrócito através da peroxidação lipídica, nós realizamos medições da rigidez induzida na membrana, que é um indicativo seguro da peroxidação [33-36]. Estas medidas foram realizadas usando a espectroscopia de

Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) do marcador de spin 5-doxil estearato e estão apresentadas no Apêndice A, já que neste trabalho não enfocamos o uso desta técnica.

Analisando os valores da Tabela 2, seção 4.3, verifica-se que as MO com maior formação de MDA foram a PPIX e a TMPP seguidas da ZnTMPP e Zn ftalocianina. Os FS com pouca formação de MDA foram: TPPS, ftalocianina e Zn TPPS. Já no caso da degradação de BSA, analisando os valores da Tabela 3, seção 4.4, verificou-se o contrário. As MO com menor formação de MDA foram as que tiveram uma constante de degradação de BSA maior: TPPS e ZnTPPS. Estes valores mostram que o mecanismo de ação de cada FS na foto-hemólise é diferente, alguns atacam mais através da peroxidação lipídica e outros através da oxidação protéica.

Em proteína, o oxigênio singleto degrada seletivamente o triptofano numa reação rápida. Esse aminoácido pode ser deteriorado por outras EROs, mas é particularmente sensível ao $^1\text{O}_2$, o que possibilitaria quantificar a quantidade de oxigênio singleto produzido pelo FS através de curva de calibração utilizando medidor de consumo de oxigênio e ensaio colorimétrico para detectar a degradação do triptofano [73,67]. Nossos dados sobre a degradação do sinal fluorescente da BSA, essencialmente o sinal do triptofano, indicaram que os FS estudados sob irradiação com lâmpada halógena levaram a um decaimento exponencial com o tempo de irradiação. As amostras contendo zinco aceleraram o processo (Tabela 3). No entanto, não houve correlação entre as constantes de decaimento do sinal fluorescente da BSA dos FS e seus valores de $T_{1/2}$ nos testes de hemólise, indicando que os FS mais eficientes no ataque ao eritrócito podem ser menos eficientes na degradação da BSA.

Borissevitch e col. [74] calcularam a constante de ligação de BSA com as porfirinas TPPS e TMPP para diferentes pH. Para o pH 5 a constante de ligação da TPPS e TMPP foi respectivamente: $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ e $7,3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. No pH 8,5 a constante de ligação foi $3,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para a TPPS e $1,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ para a TMPP. Em nosso trabalho a TPPS teve uma constante de degradação maior que da TMPP, este efeito deve estar associado à maior constante de ligação da TPPS à BSA do que da TMPP.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho comparamos as eficiências fotodinâmicas de sete FS em suspensão de eritrócitos irradiada com lâmpada de xenônio. Dois FS são derivados da ftalocianina, sendo um contendo zinco e outro na base livre, cinco são derivados da porfirina, sendo dois contendo zinco, dois na base livre e a protoporfirina IX. Nossos principais objetivos foram entender melhor os mecanismos de ação dos FS para provocar hemólise e investigar o efeito da presença de zinco nos FS. Nossas principais conclusões foram:

- A dependência temporal dos efeitos hemolíticos dos FS foi tipo curva sigmoideal, indicando que os efeitos oxidativos dos FS foram se acumulando ao longo do tempo e de repente houve o rompimento da membrana do eritrócito atingindo o percentual máximo de hemólise.
- Os FS Zn ftalocianina e PPIX foram os que tiveram maior eficiência foto-hemolítica.
- O coeficiente de correlação entre os $T_{1/2}$ de hemólise e $\text{Log } P_{O/W}$ dos FS foi baixo ($R = 0,48$). Entretanto, o coeficiente dos quatro FS não contendo Zinco foi bom ($R = 0,96$). Mostrando que Para os FS na base livre a eficiência fotodinâmica aumenta com a maior afinidade por membrana celular.
- O zinco aumentou muito a eficiência hemolítica dos FS na base da ftalocianina e mostrou um aumento considerável em uma das bases da porfirina (TMPP), na outra base da porfirina (TPPS) não apresentou alteração significativa.
- O coeficiente de correlação entre os $T_{1/2}$ de hemólise e formação de MDA (indicativo de peroxidação lipídica) dos FS foi bom ($R = 0,75$), indicando que o ataque dos FS ao eritrócito se deu principalmente pela peroxidação de ácidos graxos insaturados da membrana citoplasmática.
- A azida sódica aumentou os $T_{1/2}$ de hemólise, indicando que sua ação como supressor de oxigênio singlete foi mais importante de como inibidor da catalase. Este dado sugere que a formação de oxigênio singlete foi um importante formador de EROs para atacar a membrana do eritrócito.
- A peroxidação lipídica da membrana do eritrócito foi também comprovada pela técnica de RPE (Apêndice A).

- Os FS que tiveram menor formação de MDA (TPPS, Zn TPPS) foram os que tiveram as maiores constantes de degradação do BSA.
- A cinética de degradação da BSA medida pelo espectro fluorescente da BSA com excitação na região do triptofano indicou que os FS contendo zinco são mais agressivos.
- Não houve correlação entre os $T_{1/2}$ de hemólise e degradação da BSA, sugerindo que os mecanismos de degradação da BSA pelos FS não envolveram apenas a formação de EROs, mas que talvez sejam dependentes das interações dos FS com a BSA.
- Em nosso trabalho a TPPS teve uma constante de degradação de BSA maior que da TMPP, este efeito deve estar associado à maior constante de ligação da TPPS à BSA do que da TMPP.
- Algumas perguntas ficaram sem respostas, por exemplo, não há uma explicação para o período latente que os FS ficam sem causar efeito no eritrócito antes de dar início ao processo de hemólise. Outro exemplo é o fato de dois FS contendo zinco terem o efeito fotodinâmico aumentado em relação às suas bases livres, sendo que o caráter hidrofílico dessas bases não foi modificado.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Para tentar a publicação de um artigo, as medidas de formação de MDA e de degradação da BSA precisam ser repetidas mais duas vezes para realização de análise estatística.

A técnica de RPE poderia ser utilizada para medir também os danos das proteínas de membrana dos eritrócitos, usando marcador de spin específico para proteína de membrana.

A oxidação das proteínas de membrana também poderia ser medida usando o ensaio que quantifica as carbonilas de proteína.

Estes estudos poderiam ser repetidos usando outras células como os parasitos da leishmania (com vistas ao tratamento da leishmaniose cutânea), bactérias e células tumorais.

8 APÊNDICE A

A espectroscopia de RPE do marcador de spin 5-doxil estearato (5-DSA) foi utilizada para avaliar a fluidez da membrana de eritrócito. A peroxidação lipídica torna a membrana rígida [33-36], permitindo identificar se os FS utilizados neste trabalho levaram o eritrócito a este efeito.

Foi utilizado o espectrômetro de EPR E 500 da Bruker (Alemanha) alocado no Instituto de Física da UnB, equipado com a cavidade retangular de banda-X. As condições de operação foram: campo magnético, 3480 G; varredura de campo magnético, 100 G; constante de tempo, 10 μ s; tempo de varredura, 4 minutos; amplitude de modulação, 1 G e temperatura, 25°C. As amostras da suspensão de eritrócito com determinado tempo de irradiação foram introduzidas em capilares que foram selados por chama para a realização das medidas de RPE.

Na Figura 20 estão mostrados os espectros de RPE para uma amostra de controle (suspensão irradiada sem FS) e com a PPIX 40 minutos de irradiação. O parâmetro $2A_{//}$ aumenta com a redução de mobilidade ou peroxidação da membrana. A peroxidação leva a um aumento máximo de 2 G [33-36] e a presença dos FS causaram aumentos em torno de 1 G, mas somente para tempos de irradiação acima de $T_{1/2}$.

Figura 20- Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA em membrana de eritrócito irradiada por 40 minutos sem FS (Controle) e com o FS PPIX.

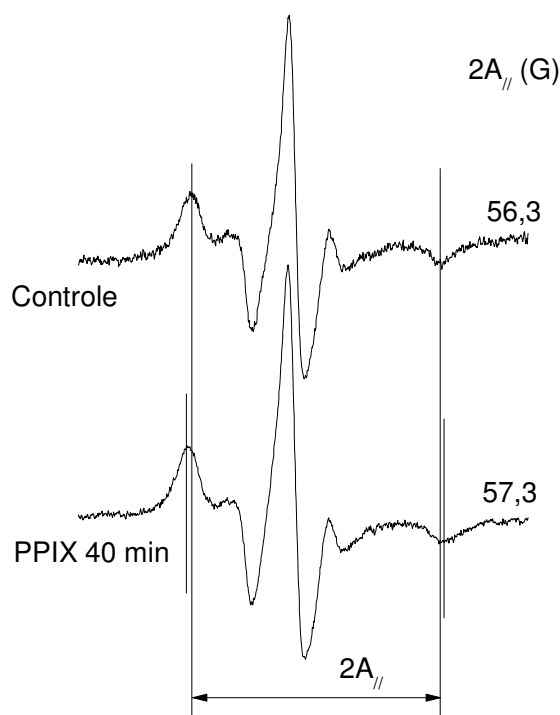


Tabela 4

Parâmetro de RPE desdobramento hiperfino máximo ($2A_{//}$) do marcador de spin 5-DSA em membrana de eritrócito. A suspensão de eritrócito foi irradiada com e sem a presença de vários FS.

Moléculas Orgânicas	Tempo (min)	$2A_{//}$ (G)
Controle (n =6)	40	56,2+0,3
Carboxiftalocianina	40	57,0
Zncarboxiftalocianina	20	57,1
TPPS	40	57,3
PPIX	30	57,0
PPIX	40	57,3
TMPP	40	57,3
ZnTMPP	30	57,2

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Instituto Nacional de Cancer.

<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. (21/03/2014)

[2] Knowles, M., Selby, P. Introduction to the cellular and molecular biology of câncer.

Oxford-Bioscience, 2005.

[3] Lung, T., Tascau, O.C., Almasan, H.A., Muresan, O. Head and neck cancer,

treatment, evolution and post therapeutic survival – Part 2: A decade's results 1993

2002. Journal of Cranio-Maxilo Surgery.35, 126-131, 2007.

[4] Biel, M.A. Photodynamic therapy treatment of early oral and laryngeal cancers.

Photochemical Photobiology. 83, 1063-1068, 2007.

[5] Chen, B., Pogue, B.W., Hoopes, J., Hasan, T. Combining vascular and cellular

targeting regimens enhances the efficacy of photodynamic therapy. International Journal

Radiation Oncology Biological Physcal. 61, 1216-1226, 2005.

[6] Hopper, C., Niziol, C., Shidhu, M. The cost- effectiveness of foscan mediated

photodynamic therapy compared with extensive palliative surgery and palliative

chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. Oral

Oncology.40, 372-382, 2004.

[7] Pierre, M.B.R., Ricci-Júnior, E., Tedesco, A.C., Bentley, M.V.L. Oleic Acid as Optimizer of the Skin Delivery of 5-Aminolevulinic Acid in Photodynamic. *Pharmaceutical Research*, 23, 360-66, 2006.

[8] Jori, G. Photodynamic therapy of microbial infections: states of the art and perspectives. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 25, 505-519, 2006.

[9] Komerik, N., Wilson, M. Factores influencing the susceptibility of Gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitizations. *Journal Applied Microbiology*.92, 618-623, 2002.

[10] Marinho, S.A. Efeito da PDT sobre culturas de *Candida* sp. E de células epiteliais: estudo in vitro. Tese de doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2006.

[11] Bastos, M.M., Boechat, N., Gomes, A.T.P.C., Neves, M.G.P.M.S., Cavaleiro, J.A.S. O uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea. *Revista virtual de química*. 257-267, 2012.

[12] Torezan, L., Niwa, A.B.M., Neto, C.F. Photodynamic therapy in dermatology: basic principles and clinical use. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 84, 445-59, 2009.

[13] Matsumura, Y., Maeda, H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS, *Cancer Research*. 46, 6387–6392, 1986.

- [14] Nishiyama N., Nakagishi Y., Morimoto Y., Lai P.S., Miyazaki K., Urano K., Horie S., Kumagai M., Fukushima S., Cheng Y., Jang W.D., Kikuchi M., Kataoka K. Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *Journal Control Release*. 133, 245-251, 2009.
- [15] DeRosa, M.C., Crutchley, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 351-371, 2002.
- [16] Ribeiro, J.N., Jorge, R.A., Silva, A.R., Flores, A.V., Ronchi, L.M., Tedesco, A.C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptófano. *Eclética química*. 32, 7-14, 2007.
- [17] Pereira, G.A., 2012. Terapia fotodinâmica. Comunicação pessoal. <http://cancerdepele.net.br/terapia-fotodinamica> (13/06/2013).
- [18] B lume, J.E., Oseroff, A.R. Aminolevulinic acid photodynamic therapy for skin cancers. *Clinics in Dermatology*. 25, 5-14, 2007.
- [19] Çimem, M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*. 309, 1-11, 2008.
- 20] Cavanagh, A. Wellcome Images, <http://images.wellcome.ac.uk/>, 2006.
- [21] Dodge, J.T., Michel, C., Hanahan, D. J. The preparation and chemical characteristic of hemoglobin-free ghosts of human erythrocyts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 100, 119-130, 1963.
- [22] Yawata, Y. Cell membrane: The red blood cell as a model. 1º Edição. ed.

Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 27-41, 2003.

[23] Johnson, A.L., Walter, R., Traduzido por Leiga, Ana Beatriz Gorini. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Atmed, 2004.

[24] Moreira, R.A., Mendanha, S.A., Hansen, D., Alonso, A. Interaction of miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 102, 1661-1669, 2013.

[25] Mendanha, S.A., Moura, S.S., Anjos, J.L.V., Valadares, M.C., Alonso, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in Vitro*. 434, 391-398, 2013.

[26] Mendanha, S.A., Anjos, J.L.V., Silva, A.H.M., Alonso, A. Electron paramagnetic resonance study of lipid and protein membrane components of erythrocytes oxidized with hydrogen peroxide. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 45, 473-481, 2012.

[27] Singh N., Rajini P. S. Antioxidant-mediated protective effect of potato peel extract in erythrocytes against oxidative damage. *Journal Chemico-Biological Interactions*. 173, 97-104, 2008.

[28] Baskin, S.I., Salem, H. *Oxidants, antioxidants, and Free Radicals*. Washington: Taylor & Francis, 1-21, 1997.

[29] Sanchez- Moreno, C. *Methods used to evaluate the free radical scavenging activity*

in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*. 8, 121-137, 2002.

[30] Grivicich, I., Regner, A., Rocha, A.B. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 53, 335-343, 2007.

[31] Gutteridge, J.M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry*. 41, 1819-1828, 1995.

[32] Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 43, 61-68, 1997.

[33] Alonso, A., Queiroz, C.S., Magalhaes, A.C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1323, 75-84, 1997.

[34] Nepomuceno, M.F., Alonso, A., Pereira, L.D.S., Tabak, M. Inhibitory effect of dipyrindamole and its derivatives on lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*. 23, 1046-1054, 1997.

[35] Queiroz, C.G.S., Alonso, A., Mares, M.G., Magalhães, A.C. Chilling-induced changes in membrane fluidity and antioxidant enzyme activities in *Coffea arabica* L. roots. *Biologia Plantarum*. 41, 403-413, 1998.

[36] Chen, L., Yang, X., Jiao, H., Zhao, B. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. *Toxicological Sciences*. 69, 149-156, 2002.

[37] Choe, M., Jackson, C., Yu, B.P. Lipid peroxidation contributes to age-related membrane rigidity. *Free Radical Biology and Medicine*. 18, 977-984, 1995.

- [38] Garcia, J.J., Reiter, R.J., Karbownik, M., Calvo, J.R., Ortiz, G.G., Tan, D.X., et al. N-acetylserotonin suppresses hepatic microsomal membrane rigidity associated with lipid peroxidation. *European Journal of Pharmacology*. 428, 169-175, 2001.
- [39] Esterbauer, H., Schaur, R.J., Zollner, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*. 11, 81-128, 1991.
- [40] Gilbert, H.S., Stump, D.D., Roth, E.F. Jr. A method to correct for errors caused by generation of interfering compounds during erythrocyte lipid peroxidation. *Analytical Biochemistry*. 137, 282-286, 1984.
- [41] Hirayama, K., et al., Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum-Albumin by Esims and Frit-Fab Lc Ms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 639-646, 1990.
- [42] Carter, D.C. and J.X. Ho, Structure of Serum-Albumin. *Advances in Protein Chemistry*. 45, 153-203, 1994.
- [43] Cavalcante, R.S., Imasato, H., Bagnato, V.S., Perussi, J.R. A combination of techniques to evaluate photodynamic efficiency of photosensitizers. *Journal Laser Physics*. 6, 64-70, 2009.
- [44] Liu, X.Z., et al., Purification, Complete Amino-Acid-Sequence and Structural Characterization of The Heat-Stable Sweet Protein, Mabinlin-Ii. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1993.
- [45] Chakrabarty, A., Mallick, A., Haldar, B., Das, P., Chattopadhyay, N. Binding interaction of a biological photosensitizer with serum albumins: a biophysical study. *Biomacromolecules*. 8, 920-927, 2007.

- [46] Collander, R. The partition of organic compounds between higher alcohols and water. *Acta Chemica Scandinavica*. 5, 774–780, 1951.
- [47] Martins e Silva, J.A. *Metabolismo das porfirinas*. Revista das ciências médicas da Universidade de Lourenço Marques, 1971.
- [48] Macdonald, I.J., Dougherty, T.J. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrin and Phthalocyanine Chemistry*. 5, 105-129, 2001.
- [49] 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*. 37, 273-284, 2004.
- [50] Peter, M.C. and J.R., Lakowicz, J.R. *Lamguir Blodgett: An introduction*. Cambridge University Press, 1996.
- [51] Lenz, G., 1997. *Métodos Fotométricos*. Comunicação pessoal.
<http://www.ufrgs.br/biofis/Bio10003/Meftfoto.pdf> (11/06/2013).
- [52] Lakowicz, J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers. 1999.
- [53] Wahl, P. Fluorescence anisotropy decay and Brownian rotational motion: Theory and application in biological systems, in *time-resolved fluorescence spectroscopy in biochemistry and biology*. 497-522. 1983.

- [54] Engelmann, F.M., Rocha, S.V., Toma, H.E., Araki, K., Baptista, M.S. Determination of n-octanol/water partition and membrane binding of cationic porphyrins. *International Journal of Pharmaceutics*. 329, 12-8, 2007.
- [55] Silva, F.A.M., Borges, M.F.M., Ferreira, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quimica Nova*. 22, 94-103, 1999.
- [56] Grotto, D. et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quimica Nova*. 32, 169-174, 2009.
- [57] Engelmann, F.M., Mayer, I., Gabrielli, D.S., Toma, H.E., Kowaltowski, A.J., Araki, K., Baptista, M.S. Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 39, 175-185. 2007.
- [58] Tomazini, M.V., Souza, C.D.S., Garcia, S.B., Tedesco, A.C. Tropical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine: evaluation of fluorescence intensity, skin absorption, skin histological and immunohistochemical changes in animal model. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 82, 2007.
- [59] Hynninen, P. H., Nyman E. S., Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 73, 1–28, 2004.
- [60] Calzavara-Pinton, P. G., Venturini, M. Sala, R. Photodynamic therapy: update 2006 - Part 1: Photochemistry and photobiology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 21, 293–302, 2007.
- [61] Pavani, C., Uchoa, A.F., Oliveira, C.S., Iamamoto, Y., Baptista, M.S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 8, 233-240, 2009.

- [62] Allen, C. M., Sharman, W. M. & Lier, J. E. V. A. N. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *Journal Porphyrin Phthalocyanines*. 5, 161–169, 2001.
- [63] Moon, H. K., Son, M., Park, J. E., Yoon, S. M., Lee, S. H., Choi, H. C. The Significant increase in the water dispersibility of zinc phthalocyanine nanowires and applications in cancer phototherapy. *Nature Publishing Group Asia Materials*. 12, 2012.
- [64] Lutton, J.D., Abraham, N.G., Kappas, A. Zinc porphyrins: Potent inhibitors of hematopoieses in animal and human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94, 1432-1436. 1997.
- [65] Lavi, A., Weitman, H., Holmes, R.T., Smith, K.M., Ehrenberg, B. The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency. *Journal Biophysics*. 82, 2101-2110, 2002.
- [66] Hamblin, M.R., Hasan, T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 3, 436-50, 2004.
- [67] Rolim, J.P., de-Melo, M.A., Guedes, S.F., Albuquerque-Filho, F.B., de Souza, J.R., Nogueira, N.A., Zanin, I.C., Rodrigues, L.K. The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 106, 40-46, 2012.
- [68] Agon, V. V., Bubb, W. A., Wright, A., Hawkins, C. L., Davies, M. J. Sensitizer-mediated photooxidation of histidine residues: Evidence for the formation of reactive side-chain peroxides. *Free Radical Biology and Medicine*. 40, 698-710, 2006.
- [69] Ion, R. M., Daicoviciu, D., Filip, A. G., Clichici, S., Muresan, A. Oxidative stress effects of fullerene-porphyrin derivatives in photodynamic therapy. *Journal Porphyrins Phthalocyanines*. 16, 870–877, 2012.

[70] Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*. 329, 23-38, 2003.

[71] González-Flecha, B., Demple, B. Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 179, 382-388, 1997.

[72] Gomes, M.C., Silva, S., Faustino, M.A., Neves, M.G., Almeida, A., Cavaleiro, J.A., Tomé, J.P., Cunha, Â. Cationic galactoporphyrin photosensitisers against UV-B resistant bacteria: oxidation of lipids and proteins by $^1(O_2)$. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 12, 262-271, 2013.

[73] Criado, S., Bertolotti, S.G., García, N.A. Kinetics aspects of the rose Bengal-sensitized photo-oxygenation of tryptophan alkyl esters. Ground state and photopromoted dye-(tryptophan derivative interactions *Journal of Photochemistry and Photobiology B*. 34, 79–86, 1996.

[74] Borissevitch, I.E., Tominaga, T.T., Imasato, H., Tabak, M. Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrin aggregation. *Journal of Luminescence*. 69, 65-76, 1996.