

# **ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR, ATIVIDADE CATALÍTICA E POTENCIAL OXIDANTE DE COMPOSTOS PORFIRÍNICOS BASEADOS EM FERRO e MANGANÊS**

Jéssica Aparecida da Silva Pereira<sup>1</sup>; Gerson Profeta de Souza<sup>2</sup>; Wagner Alves de Souza Judice<sup>3</sup>; Katia Cristina Ugolini Mugnol<sup>4</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: jsa\_pereira@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: gerson.profeta@hotmail.com<sup>2</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: wagnerjudice@gmail.com<sup>3</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: kcum@uol.com.br<sup>4</sup>

Área de Conhecimento: Bioquímica

Palavras-chave: Porfirinas, Radicais Livres, Catepsina B, Enzimologia

## **INTRODUÇÃO**

Porfirinas são moléculas de origem natural ou sintética, de coloração forte, que apresentam estrutura química formada por um anel macrocíclico aromático composto de quatro resíduos do tipo pirrol, ligado a um grupo metal em transição, o qual é diretamente responsável pelo seu comportamento (OKURA, 2000; KOOLMAN, 2005; MONTANARI, 1998). Suas propriedades catalíticas permitem com que tenham uma vasta aplicação que partem da terapia anti-tumoral até o tratamento de resíduos em efluentes. A capacidade antitumoral de diferentes metaloporfirinas costuma estar associada ao seu potencial de gerar oxigênio singlete quando submetidas à irradiação, o que explica sua associação ao processo de terapia fotodinâmica anti-neoplásica. Além disso, porfirinas baseadas em ferro e manganês são citadas como agentes em potencial no combate ao câncer, principalmente de pele, do tipo não-melanoma, sendo muitas delas utilizadas como fotossensibilizadores. Outro fator atrativo se dá pelo fato destas serem absorvidas cerca de 20 vezes mais por células tumorais do que por células saudáveis, além da capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio que em contato com a membrana da célula cancerosa promovem danos biológicos que podem ir da alteração ou perda da função celular, até sua morte, o que ocorre mais frequentemente (PIVETTA, 2000). Dentre as porfirinas contendo ferro, existem vários trabalhos envolvendo a classe das meso-tetrakis porfirinas, que vêm sendo empregadas em diferentes estudos envolvendo atividade catalítica, terapia fotodinâmica dentre outros fatores. Com base nos dados apresentados na literatura, torna-se interessante não somente a investigação dos efeitos destas moléculas sobre linhagens celulares normais e tumorais como também o estudo destes sobre enzimas envolvidas no processo de metástase como a catepsina B, bem como sua atividade antimicrobiana.

## **OBJETIVOS**

Investigar o potencial oxidante e catalítico das porfirinas FeTDC(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>)PP e MnTDC(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>Na<sup>+</sup>)PP frente a sistemas-modelo de membrana, substratos enzimáticos, peróxidos e aldeídos e seu efeito sobre células normais em cultura e cepas bacterianas.

## **METODOLOGIA**

Para estudos da atividade catalítica das porfirinas baseadas em ferro e manganês foram empregadas leituras espectrofotométricas no UV-vis para verificação de mudanças espectrais na presença e ausência de peróxidos e aldeídos.

No estudo de inibição da atividade enzimática foram empregadas medidas por espectrofluorimetria a 37°C (espectrofluorímetro *Hitachi F-2500*). Utilizou-se tampão acetato de sódio 100mM, EDTA 5mM, pH 5,5 em espectrofluorímetro *Hitachi F-2500*, a 37°C, adicionou-se 1 µL da enzima catepsina B e 5 mM de DTT para efetuar ativação da mesma. Em seguida foi adicionado o substrato fluorogênico *Z-FR-MCA* de modo que este apresentasse concentração de 18,14 µM na cubeta, atingindo a velocidade máxima da reação, para o monitoramento da atividade enzimática. Posteriormente adicionou-se concentrações crescentes de inibidor até a estabilização no decaimento da atividade. As amostras foram submetidas ao comprimento de onda de excitação de 360 nm e o produto da hidrólise foi mensurado em comprimento de onda de emissão de 480 nm. Com os dados coletados, foram calculados os valores de IC<sub>50</sub> utilizando o *software* Grafit, versão 5.0. Os compostos porfirínicos foram submetidos aos ensaios cinéticos para determinação do mecanismo de ação e consequentemente obtenção dos valores de *K<sub>i</sub>*. O mecanismo com que estes compostos atuam inibindo a catepsina B pôde ser analisado através do método de Michaelis-Menten e de Lineweaver-Burk.

Para a avaliação do potencial lipoperoxidativo das duas formas de porfirina foi construído sistema biomimético de membrana (lipossomos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardiolipina) e este exposto a diferentes concentrações de cada uma delas. O efeito oxidativo foi medido pela quantificação de malondialdeído empregando análise espectroscópica segundo Bauer e Aust.

Para estudo dos efeitos de cada composto porfirínico sobre células foram empregadas culturas de célula de músculo liso de aorta de coelho em meio DMEN suplementado que, expostas às diferentes porfirinas tiveram a viabilidade celular mensurada por método de exclusão de Azul de Tripán.

Na avaliação do potencial antimicrobiano dos compostos empregaram-se as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que, devidamente isoladas e semeadas em meios seletivos foram então transferidas para meio de de Müeller Hinton onde adicionaram-se discos de papel de filtro embebidos com os compostos porfirínicos nas concentrações de 1 µM e 100µM, com verificação após 24 horas de incubação a 37°C da formação de halo inibitório.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As porfirinas baseadas em ferro e manganês apresentaram diferente comportamento frente a peróxidos e aldeídos, sendo a primeira capaz de sofrer oxidação e redução respectivamente na sua presença. Em contrapartida, ambas apresentaram a capacidade de inibir catepsina B. Observou-se que a concentração necessária para reduzir a atividade desta em 50 % (IC<sub>50</sub>) variou entre 1,43 nM e 1,95 nM para os compostos a base de manganês e ferro, respectivamente. Visto que as porfirinas de ferro e manganês testadas possuem grande quantidade de anéis aromáticos na estrutura, realizaram-se ensaios para confirmar se os resultados observados se devem de fato à inibição da Catepsina B ou se poderiam ser um evento associado ao efeito desses anéis na supressão da fluorescência. Foi observado que a supressão de fluorescência nas concentrações de porfirina testadas é insignificante face ao percentual observado como agentes inibitórios da Catepsina B. Na avaliação dos mecanismos de inibição foi constatado que tanto a porfirina baseada em ferro quanto a em manganês apresentam a mesma afinidade tanto pela enzima livre quanto com o complexo biomolecular ES (enzima-substrato), estabelecendo dessa forma  $\alpha=1$ , o que define que este composto atua como um inibidor não-competitivo linear simples.

Além da interessante atividade inibitória sobre catepsina B, as porfirinas testadas quando sobre células em cultura demonstraram diferentes ações. A porfirina baseada em

ferro promoveu a morte celular, enquanto que a baseada em manganês não demonstrou efeitos deletérios às células. Isso demonstra que porfirinas de mesma estrutura, mas com diferentes metais em sua estrutura, podem ter um papel contrário, sendo este metal um modulador de suas ações. Paralelamente ao que foi observado para as células em cultura, o efeito lipoperoxidativo das porfirinas sobre sistema biomimético de membrana mitocondrial também foi distinto entre elas. A porfirina baseada em ferro gerou danos aos lipídios do lipossomo construído, detectado pelo aumento na concentração de malondialdeído na solução, enquanto que a porfirina baseada em manganês promoveu proteção à oxidação espontânea desses mesmos lipídios, porém não foi capaz de protegê-los da oxidação induzida por sulfato ferroso.

De modo similar, a porfirina baseada em ferro demonstrou discreta atividade bactericida sobre os microorganismos testados quando na maior concentração testada (100  $\mu\text{M}$ ), enquanto que a de manganês não apresentou esta atividade em nenhuma das concentrações testadas.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir deste estudo permitem confirmar a importância do metal na estrutura porfirínica como um modulador de suas propriedades e aplicações. Enquanto a porfirina baseada em ferro apresenta potencial pró-oxidante frente a sistemas biomiméticos de membrana e capacidade óxido-redutora frente a peróxidos e aldeídos, a porfirina de mesma estrutura geral porém baseada em manganês atua como antioxidante em sistema lipossomal e não responde significativamente à ação de peróxidos e aldeídos. Enquanto a porfirina de ferro promove danos e morte celular *in vitro*, a porfirina de manganês não promove nenhum desses efeitos. O mesmo acontece sobre microorganismos, conferindo potencial antimicrobiano à porfirina de ferro e não à de manganês. Particularmente com relação ao emprego destas duas porfirinas como possíveis inibidores de catepsina B, os resultados foram promissores para ambos, tanto qualitativamente em seu poder inibidor quanto quantitativamente, no baixíssimo valor de  $\text{IC}_{50}$  encontrados, valor este que demonstra que pequeníssimas quantidades desses compostos exercem alto poder de inibição desta enzima envolvida em processos metastáticos tumorais. Este estudo, em particular, será ampliado já que é importante sua aplicação farmacológica para o desenvolvimento de novas drogas com potencial antimetastático.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

MONTANARI, M.L.C.; MONTANARI, C.A.; PILÓ-PELOSO, D. Sistemas Transportadores de Drogas. *Rev. Quím. Nova*, Belo Horizonte, v. 21, n. 4, p. 470-476, 1998.

SOTOMAYOR, M.P.T.; KUBOTA, L.T. Enzymeless biosensors: uma nova área para o desenvolvimento de sensores amperométricos. *Rev. Quím. Nova*, São Paulo, v.25, n. 1, p. 123-128, 2002.

MUGNOL, K.C.U.; MARTINS, M.V.A.; NASCIMENTO, E.C.; NASCIMENTO, O.R.; CRESPILO, F.N.; ARANTES, J.T.; NANTES, I.L. Interaction of  $\text{Fe}^{3+}$ -meso-tetrakis (2,6-dichloro-3-sulfonatophenyl). *Theor Chem Acc*, São Paulo, v. 130, n. 4, p.829–837, 2011.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Rev. Methods in Enzymol*, New York, v. 52, n. 1, p. 302-310, 1978.