

POTENCIAL PRÓ-OXIDANTE DE PORFIRINAS BASEADAS EM FERRO E ZINCO SOBRE SISTEMAS-MODELO DE MEMBRANA

Aline Luiza da Silva¹; Jéssica de Lima Nunes²; Kátia Cristina Ugolini Mugno³.

Estudante do Curso de Biologia (Bacharelado); e-mail:lineluiza@hotmail.com¹

Estudante do Curso de Biologia (Bacharelado); e-mail:je_lhy3@hotmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:katiac@umc.br³

Área de conhecimento: Bioquímica

Palavras-chave: Porfirinas, Antimicrobiano, Pró-oxidante, Sistemas-modelo de membrana.

INTRODUÇÃO

As porfirinas são definidas como uma grande classe de moléculas purpuras ou fortemente coradas de origem natural ou sintética, constituindo-se de macrociclos tetrapirrólicos que se ligam a um metal de transição como Manganês, Zinco e Ferro os quais modulam suas propriedades⁽¹⁾. Essas moléculas exercem papel importante em diferentes sistemas biológicos e têm várias aplicações já demonstradas em áreas que vão do controle do câncer à degradação de compostos fenólicos em efluentes⁽²⁾. Uma das mais importantes aplicações das porfirinas e metaloporfirinas se dá na medicina. Derivados porfirínicos têm sido empregados como fotossensibilizadores na Terapia Fotodinâmica (TFD) devido a propriedades como alta fotossensibilização, alta afinidade por tecidos tumorais e toxicidade relativamente baixa⁽³⁾. Estudos realizados utilizando porfirinas contendo íons de zinco e ferro revelam que estes fotossensibilizadores atuam gerando oxigênio singlete na presença de luz e causando danos ao DNA. A presença de zinco promove uma forte associação da porfirina ao DNA via interações coordenativas e eletrostáticas com os grupos fosfatos⁽⁴⁾. Quando submetidas ao processo de fotoexcitação às moléculas de porfirina geram radicais livres que promovem danos biológicos que podem ir da alteração ou perda da estrutura e função celular até à sua morte⁽⁴⁾. Tendo em vista os potenciais pró-oxidantes das metaloporfirinas que promovem a oxidação de membranas biológicas, existem estudos que descrevem que estes compostos possuem potencial antimicrobiano, sendo utilizados na Terapia fotodinâmica antimicrobiana como fotossensibilizadores capazes de alterar a permeabilidade da parede bacteriana em micro-organismos que apresentam resistência a antimicrobianos convencionais. Esse processo consiste no dano a membrana celular externa que permite que o fotossensibilizador se incorpore a membrana citoplasmática, onde a ação fotodinâmica é eficaz⁽⁵⁾.

OBJETIVO

Testar o potencial antimicrobiano da porfirina ZnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP e de suas similares baseadas em ferro e manganês sobre micro-organismos de microbiota normal e patogênica, na presença e na ausência de estímulo de geração de radicais livres por irradiação luminosa (luz branca e luz ultra-violeta) e seu efeito sobre células aderentes em cultura.

METODOLOGIA

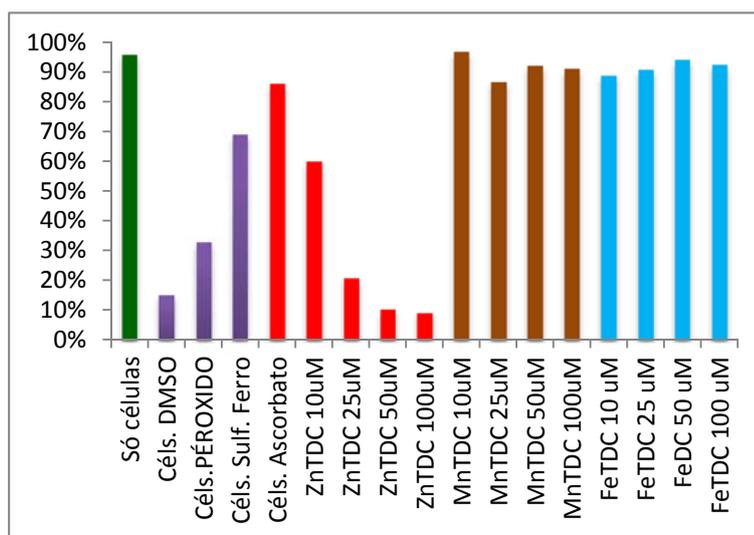
Para realização dos testes de potencial antimicrobiano foram utilizadas as porfirinas de zinco em concentrações crescentes (10, 25, 50 e 100 μM) preparadas em solução tampão fosfato de sódio 5 mM pH 7,4. Para efeito controle, utilizaram-se as porfirinas de ferro e manganês a 100 μM , preparadas na mesma solução tampão. Estes compostos porfirínicos foram submetidos a estudos de atividade antimicrobiana em meio sólido Agar Mueller Hinton e meio líquido TSA. As soluções foram incorporadas a discos de difusão previamente autoclavados à temperatura de 121°C por 20 minutos e posteriormente tratados com 50 μl de cada um dos compostos porfirínicos, e com antibióticos seletivos. Foi realizado o teste de discos de difusão modificada (BAUER *et al.*, 1966) no meio sólido Agar Mueller Hinton em três condições de luz: na ausência de irradiação luminosa, sob iluminação natural com luz branca e incidência direta de luz ultravioleta em comprimento de onda 354 nm. Nos testes sob presença de irradiação luminosa os discos de difusão foram submetidos à exposição prévia à fonte de luz específicas (branca ou UV) por 30 minutos e posteriormente colocados sobre o ágar sólido. As placas semeadas e contendo os discos específicos, em cada uma das três condições de exposição à luz, foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após incubação as placas foram fotografadas e os halos de inibição medidos com régua milimetrada. Para realização do teste em meio líquido TSA prepararam-se suspensões com as cepas bacterianas, dessa suspensão, foi transferida uma alíquota de 100 μL para tubos contendo 1 mL de meio TSA e adicionou-se 100 μL da porfirina de zinco nas concentrações crescentes de 10, 25, 50 e 100 μM . Outra sequência de tubos com mesmo meio de cultura recebeu 100 μL de porfirinas de ferro e manganês com concentração de 100 μM . Os tubos foram separados em dois grupos: os submetidos à irradiação no ultravioleta, e os submetidos à exposição à luz branca ambiente, ambos com tempo de exposição de 30 minutos. Decorrido o tempo de irradiação, realizou-se a homogeneização das soluções que a seguir foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C. O crescimento bacteriano foi determinado em função da turvação do meio detectado em espectrofotômetro Multispec Shimadzu a 625 nm. Realizou-se também testes de viabilidade celular frente aos compostos porfirínicos, para esse estudo dos efeitos de cada composto porfirínico sobre células foram empregadas culturas de célula de músculo liso de aorta de coelho (MLAC). Foi efetuado o teste de viabilidade celular por exclusão do Azul de Tripán que se baseia no fato de que células vivas mantêm sua capacidade de excluir o corante adicionado já que sua maquinaria metabólica permanece ativa. Em contrapartida as células mortas, que perderam essa propriedade, tornam-se coradas em azul pela internalização do corante azul. Células vivas (não coradas) e células mortas (coradas em azul) foram contadas e a partir dos resultados foi calculada a viabilidade celular para cada uma das placas dos grupos basal, controle e teste, sendo o grupo basal (só células) utilizado como grupo referência para o cálculo percentual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Nos testes realizados com os micro-organismos foram utilizados como controle positivo de atividade antimicrobiana discos contendo antibióticos específicos para cada uma das bactérias. Utilizou-se ampicilina 10 μg como controle para *E.coli*, gentamicina 120 μg para *P.aeruginosa* e penicilina 10 μg para *S. aureus*, além dos controles com tetraciclina 30 μg e ciprofloxacina 5 μg que são utilizados como antibióticos para as três cepas de bactérias utilizadas. Os resultados obtidos para os três tipos bacterianos utilizando as porfirinas de zinco, ferro e manganês nas concentrações já descritas e na presença de luz ambiente branca em meio sólido Agar Mueller Hinton e meio líquido TSA demonstram

que as os compostos testados não apresentaram atividade antimicrobiana. As porfirinas que utilizamos foram todas aniônicas e os artigos citados referem que as aniônicas realmente não são as melhores como supressoras de crescimento bacteriano, sejam elas baseadas em ferro ou zinco. No nosso caso nenhuma delas teve qualquer efeito sobre o crescimento bacteriano, em contraste com outras aniônicas testadas pelos autores, porém como a estrutura química das porfirinas é diferente, podemos pressupor que esta, além do próprio metal presente e do comportamento iônico, também é um fator que interfere em seu potencial antimicrobiano. Nos testes de viabilidade Os resultados obtidos permitem inferir que a porfirina baseada em zinco ZnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP, barras vermelhas no gráfico, promove diminuição da viabilidade celular e de forma concentração dependente até a concentração de 50 μM, sendo a partir deste o índice de morte celular igual ao promovido pelo controle DMSO, o mais potente agente de morte celular dentre os aqui testados. Já as porfirinas de ferro e manganês (FeTDC(SO₃⁻Na⁺)PP e MnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP), barras de cor marrom e azul claro, respectivamente, não tiveram efeitos no sistema testado, permanecendo o percentual de viabilidade celular similar ao controle negativo do experimento (só células), representado como barra verde escura no gráfico.

Figura 1- Efeitos das substâncias utilizadas como controle e das porfirinas sobre a viabilidade de células de aorta de coelho



De acordo com trabalhos consultados as porfirinas catiônicas, além de terem maior atividade antimicrobiana do que as aniônicas, também são mais citotóxicas em testes *in vitro*, confirmando o que observamos neste nosso trabalho quanto à capacidade antimicrobiana e também para a menor citotoxicidade das porfirinas de ferro e manganês. A porfirina de zinco, apesar de também não ter demonstrado potencial antimicrobiano, apresentou-se como citotóxica em concentração-dependente, o que nos leva a confirmar que o metal presente no núcleo porfirínico é um importante agente modulador das atividades deste tipo de molecular. A diferença observada na citotoxicidade induzida pela porfirina de zinco tem precedentes em artigo publicado por Pavani ⁽⁶⁾ que cita que porfirinas com zinco se ligam mais fortemente às membranas. Apesar de o zinco diminuir a hidrofobicidade de uma porfirina, o artigo referente que o zinco incorporado à porfirina permite uma coordenação do metal com os grupamentos fosfato dos fosfolipídios.

CONCLUSÃO

As porfirinas de ferro, zinco e manganês aqui testadas, provavelmente por seu caráter aniônico, não tiveram influência sobre o crescimento das bactérias gram-positivas e gram-negativas utilizadas, tornando-as inviáveis como agentes antimicrobianos mesmo quando fotoestimuladas. Entretanto, a porfirina de zinco mostrou-se citotóxica enquanto as demais não tiveram nenhum efeito significativo sobre células normais em cultura, concluindo-se que a presença do zinco na estrutura porfirínica favorece sua ligação aos fosfolipídios de membrana. A primeira fase deste projeto, contemplada na edição 2013-2104 do PIBIC-UMC, já havia demonstrado diferenças significativas na ação da porfirina de zinco se comparada à outra de igual estrutura, porém contendo ferro e, em outros trabalhos realizados em paralelo, destas duas em relação à de mesma estrutura, porém tendo manganês como núcleo metálico, comprovando-se que o metal é um agente importantíssimo na modulação das propriedades de uma porfirina e pode ser o alvo para seu controle de ação na terapia fotodinâmica entre outras aplicações.

REFERÊNCIAS

KOOLMAN, J.; RÖHM, K-H. **Bioquímica, texto e atlas**. São Paulo, 3. ed., Editora Artmed, p. 6-29, 2005.

BUEGE, J.A., AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation**. *Methods in Enzymol*, 52, p.302-310, 1978.

OLIVEIRA, M. **Arma a laser contra o câncer**. *Rev. Pesquisa Fapesp*, 74. ed., 2002. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2002/04/01/arma-a-laser-contra-o-cancer/>>. Acesso em 30 de janeiro de 2014 às 15h02.

BONNETT, R. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**. London: Gordon and Breach Science Publisher, 2000.

PAOLI, V. M. **Terapia fotodinâmica aplicada à erradicação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***: avaliação in vitro da eficiência de diferentes fármacos fotossensíveis. 2005, 200p. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2005.

Pavani, C.; Uchoa, A.F.; Oliveira, C.S.; Yamamoto, Y. e Baptista, M.S. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.8, p.233-240, 2009.