

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

Aline Luiza da Silva<sup>1</sup>; Jéssica de Lima Nunes<sup>2</sup>; Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Kátia Cristina Ugolini Mugnol<sup>3</sup>.

Estudante do Curso de Biologia (Bacharelado); e-mail:lineluiza@hotmail.com<sup>1</sup>

Estudante do Curso de Biologia (Bacharelado); e-mail:je\_lhy3@hotmail.com

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:katiac@umc.br<sup>3</sup>

Área de conhecimento: Bioquímica

Palavras-chave: Porfirinas, Antioxidante, 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<sup>(1)</sup>. 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<sup>(2)</sup>.

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<sup>(3)</sup>. Estudos realizados utilizando porfirinas contendo o íon 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<sup>(4)</sup>. Quando submetidas ao processo de foto-excitação 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<sup>(4)</sup>. Especificamente na terapia fotodinâmica seu papel está diretamente relacionado ao seu potencial pró-oxidante enquanto em outros sistemas pode exercer papel inverso, agindo como anti-oxidante. Com base nos dados apresentados na literatura, torna-se interessante analisar seu comportamento como agente pró-oxidante ou antioxidante frente a sistemas que mimetizem estruturas biológicas que costumam ser alvo de espécies radicalares, como é o caso das membranas citoplasmáticas e mitocondriais.

## OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi estudar o potencial pró-oxidante ou antioxidante de porfirinas baseadas em ferro e em zinco utilizando sistemas-modelo de membrana, na presença e na ausência de irradiação luminosa.

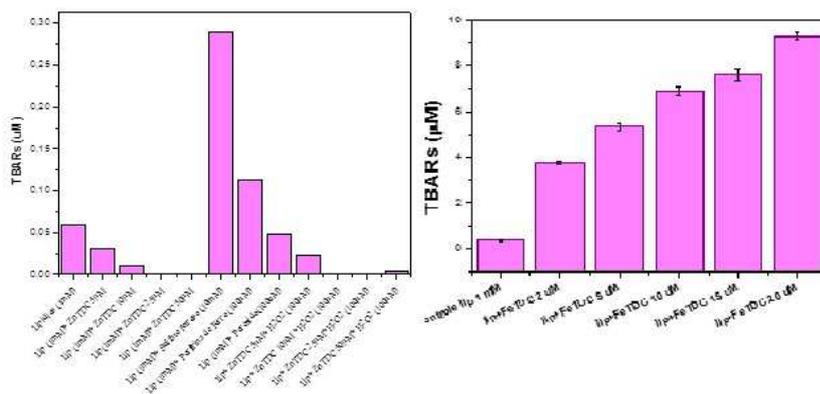
## METODOLOGIA

Os compostos porfirínicos baseados em zinco (ZnTDC(SO<sub>3</sub>-Na<sup>+</sup>)PP) e em ferro (FeTDC(SO<sub>3</sub>-Na<sup>+</sup>)PP), foram submetidos a estudos de atividade catalítica frente a peróxidos e aldeídos e de avaliação do potencial de geração de radicais livres em sistemas modelo de membrana mitocondrial. Para estudar a atividade catalítica por espectroscopia no UV-vis preparou-se solução com os compostos porfirínicos a 10 μM, em tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,4. As amostras foram submetidas a leituras cinéticas por 3600 segundos, tendo adição de agentes redutores e oxidantes após 30 segundos do início da corrida cinética. Os dados extraídos foram analisados no programa Origin 8.0, onde avaliou-se a capacidade de cada porfirina em doar e receber elétrons mediante desvios bem caracterizados nas bandas Soret e bandas Q. Foi avaliado potencial lipoperoxidativo de cada uma das porfirinas mensurado pelo método de TBARs de Buege e Aust modificado <sup>(5)</sup>. Para isto, realizou-se preparo de lipossomos constituídos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e cardioplipina (50, 30 e 20% respectivamente) como sistemas biomiméticos de membrana mitocondrial, aos quais foram adicionadas diferentes concentrações de cada uma das porfirinas e seus efeitos analisados quando as amostras foram mantidas no escuro, sob irradiação de luz branca ambiente e luz ultra-violeta de comprimento de onda 254 nm. A quantificação de MDA gerado realizada por espectrofotometria no UV-vis revela a oxidação lipídica, uma vez que quanto maior os níveis desta maiores são os níveis de MDA produzidos.

## RESULTADOS/DISCUSSÃO:

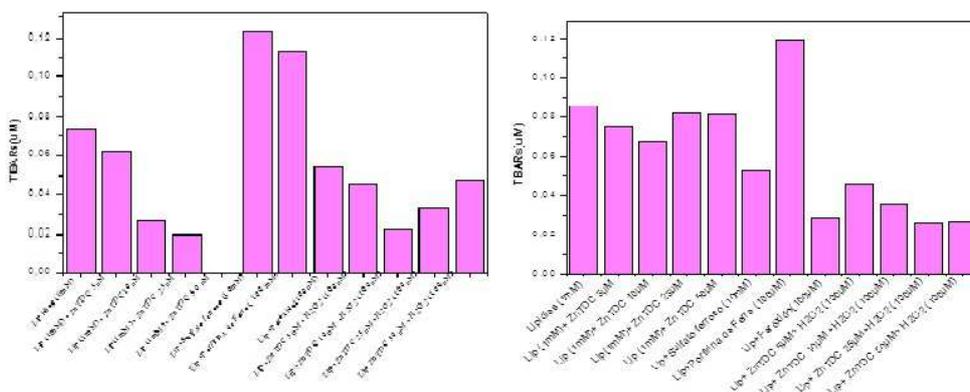
A presença do zinco garante à porfirina um espectro característico, com um único pico de alta intensidade de absorvância em 424 nm enquanto que a presença de ferro confere à porfirina um espectro com pico de absorção em 412 nm. Os testes espectroscópicos de atividade catalítica demonstraram que ambas respondem diferentemente à ação de agentes oxidantes e redutores, sendo a porfirina de ferro responsiva a estes enquanto a de zinco não. De forma análoga, as porfirinas apresentam efeitos diferentes sobre sistema modelo de membrana. Testada em ambiente escuro, a porfirina de ferro promove oxidação lipídica enquanto que a de zinco atua como antioxidante, diminuindo a geração de MDA, como mostram as figuras 1A e 1B. Especificamente para porfirina de zinco foram realizados testes adicionais de atividade antioxidante em sistemas aos quais foram adicionados sulfato ferroso (controle positivo alto) e peróxido de hidrogênio. Na presença deste último, a porfirina, no escuro, também mostrou potencial de proteção à oxidação lipídica e, similarmente à condição sem o peróxido, concentração-dependente.

**Figura 1** -Teste de TBARs em membrana lipídica constituída de PCb 50% PEb 30% CLb 20% a 1 mM em tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,4. **A**-utilizando a porfirina ZnTDC em 5 μM, 10 μM, 25μM ,50 μM. **B**- utilizando FeTDC em 2 μM, 5 μM, 10 μM, 15 μM e 20 μM.Estas leituras foram realizadas em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm.



Em experimentos anteriores a este projeto, constatou-se que a porfirina de zinco, quando submetida à irradiação de luz branca (ambiente), gera espécies radiculares que afetam sua própria estrutura. Estes radicais livres, demonstrados por ressonância paramagnética eletrônica (EPR), causam um *bleaching* (branqueamento) da porfirina de zinco, observado na análise por espectroscopia no Uv-vis. Esse mesmo efeito não ocorre para a porfirina baseada em ferro. Nesta condição, os resultados obtidos no teste de liperoxidação com as amostras expostas à irradiação de luz branca, foi possível determinar que, apesar do potencial antioxidante da porfirina de zinco permanecer ele é menor do que o observado para a porfirina no escuro (figura 2). Quando ao sistema é incorporado o peróxido de hidrogênio a porfirina ainda diminui o dano oxidativo quando comparado ao controle só com peróxido, porém este também é diminuído em relação à condição no escuro e não tem um padrão concentração-dependente. Já na presença de irradiação com luz ultra-violeta (254 nm) a porfirina baseada em zinco não mostrou qualquer efeito protetor à oxidação lipídica (Figura 2B) na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio, sendo que os resultados quantitativos nesta última condição não têm como serem comparados à condição no escuro já que o peróxido de hidrogênio por si só, quando da irradiação ultra-violeta, diminuiu a oxidação lipídica em relação à amostra controle só com lipossomos.

**Figura 2-**Teste de TBARs em membrana lipídica constituída de PCb 50% PEb 30% CLb 20% a 1 mM em tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,4, utilizando a porfirina ZnTDC em 5 µM, 10 µM, 25µM ,50 µM. **A-** com irradiação de luz branca. **B-** com irradiação de luz uv Estas leituras foram realizadas em espectrofotômetro utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm



## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos foi possível demonstrar que o metal presente no anel porfirínico define propriedades da porfirina e modifica seu perfil frente a compostos oxidantes e redutores, bem como em seu potencial como agentes antioxidantes. Em porfirinas de mesma estrutura geral, porém uma com ferro e outra com zinco como metal, como as que testamos, nota-se que enquanto a primeira age efetivamente como agente oxidante de lipídios mitocondriais, a segunda atua como um efetivo antioxidante na ausência da luz. Respondem também diferentemente a agentes oxidantes e redutores, conforme observado nos testes cinéticos, sendo que a porfirina baseada em ferro tem mudanças espectrais indicativas de mudança do estado de oxidação do metal na

presença destes, enquanto a porfirina baseada em ferro não responde a esta interferência. Sofre, entretanto, mudanças estruturais e funcionais significativas pela simples irradiação com luz branca, tanto na presença quanto na ausência de oxigênio, que foram atribuídas à sua capacidade de gerar espécies radicalares nesta condição. Estes radicais gerados, entretanto, não afetaram negativamente os lipídios constituintes do sistema biomimético empregado, não atuaram como agentes pró-oxidantes, porém por mecanismos ainda a desvendar inibiram a capacidade da porfirina em atuar como agente antioxidante. Constata-se portanto, que as duas porfirinas testadas, de mesma estrutura geral porém com centros metálicos distintos, apresentam diferentes probabilidades de utilização, moduladas também, no caso da baseada em zinco, pelo tipo de irradiação luminosa a que é ou não submetida, o que abre interessantes possibilidades para novos estudos.

### REFERÊNCIAS

<sup>1</sup> KOOLMAN, J.; RÖHM, K-H. **Bioquímica, texto e atlas**. São Paulo, 3. ed., Editora Artmed, p. 6-29, 2005.

<sup>2</sup> BUEGE, J.A., AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation**. *Methods in Enzymol*, 52, p.302-310, 1978.

<sup>3</sup> 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.

<sup>4</sup> BONNETT, R. **Chemical Aspects of Photodynamic Therapy**. London: Gordon and Breach Science Publisher, 2000.

<sup>5</sup> BUEGE, J.A., AUST, S.D. **Microsomal lipid peroxidation**. *Methods in Enzymol*, 52, p.302-310, 1978.

**AGRADECIMENTOS:** A Professora Dr.<sup>a</sup> Kátia Cristina Ugolini Mugnol pela orientação e dedicação ao projeto. Ao CNPQ pela bolsa concedida.