

### 3.3 Interação das porfirinas TPPS<sub>4</sub> e TMPyP com frações de membrana de células "ghost" de eritrócitos.

Neste estudo foram avaliadas as mudanças nas propriedades espectrais da porfirina TPPS<sub>4</sub> e TMPyP devido à sua interação com frações de membrana de células *ghost* e a influência dessa interação no processo de agregação/desagregação da porfirina.

A células *ghost* de eritrócitos foram utilizadas com o objetivo de estudar a interação das porfirinas com um sistema mais próximo ao sistema biológico real.

#### 1. Absorção Ótica

O espectro de absorção da TPPS<sub>4</sub> em pH 6.85 é apresentado na Figura 3.59. A adição de frações de membrana de células *ghost* na solução induz somente a uma fraca diminuição da intensidade dos máximos de absorção. Entretanto, a presença de NaCl na solução leva não somente à redução das bandas de absorção como também a um deslocamento das bandas para maiores comprimentos de onda, em relação à porfirina monomérica livre, o que é semelhante ao efeito do sal na ausência das células *ghost*.

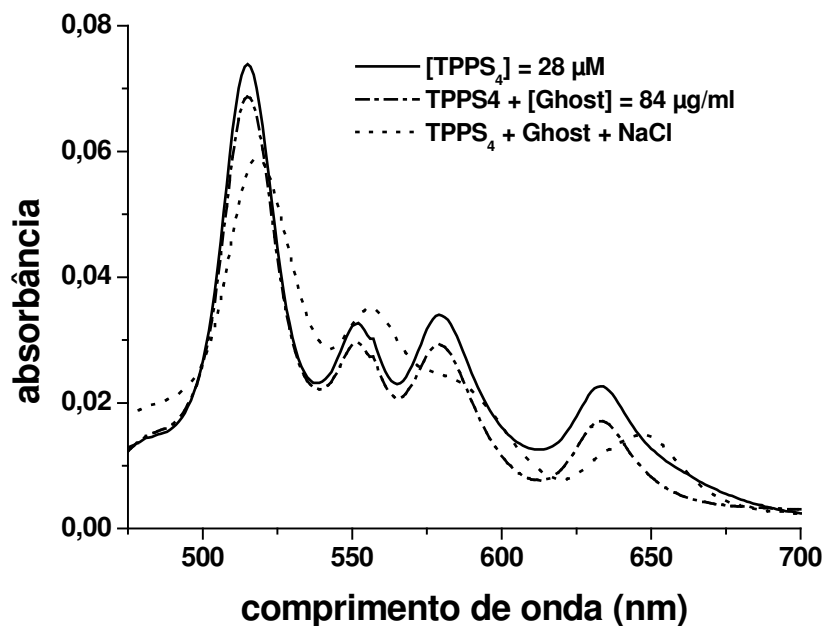


Figura 3.59) Mudanças no espectro de absorção de [TPPS<sub>4</sub>] = 28 µM em pH 6.85 na presença e na ausência de [Ghost] = 84 µg/ml e [NaCl] = 0.4 M.

Para a TPPS<sub>4</sub> em pH 4.0, na ausência de NaCl, a adição de frações de membrana na solução leva à redução das bandas de absorção características para a porfirina biprotonada, acompanhada pelo surgimento de bandas que são características para a forma desprotonada da TPPS<sub>4</sub> (Figura 3.60).

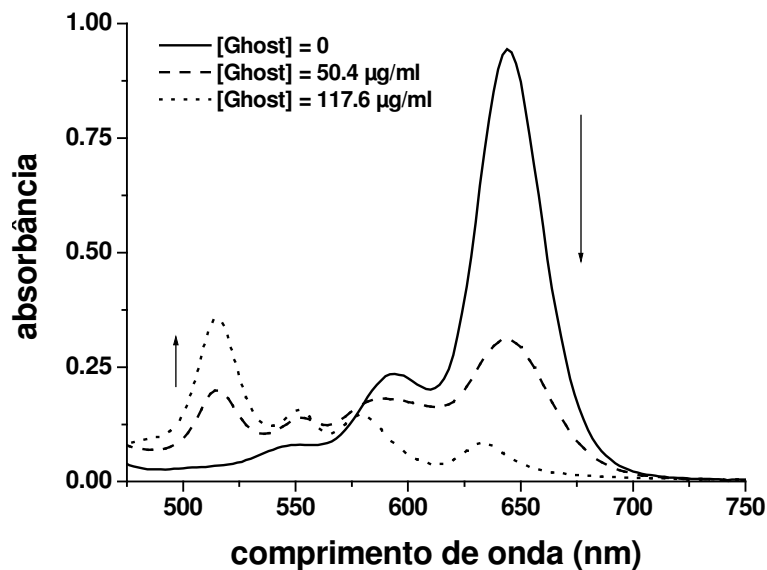


Figura 3.60) Mudanças no espectro de absorção de [TPPS<sub>4</sub>] = 28 µM em pH 4.0 na presença de frações de membranas.

Podemos atribuir as mudanças observadas na presença de frações de células *ghost* em meio ácido à desprotonação da TPPS<sub>4</sub> devido a sua ligação com a membrana. A completa desprotonação da porfirina ocorre quando o conteúdo de células *ghost* na solução é igual ou superior a 84 µg/ml.

Na presença de NaCl em pH 4.0 a adição de frações de membranas produz uma redução na intensidade das bandas de absorção do agregado, caracterizadas por  $\lambda = 491$  e  $707$  nm, acompanhada por um aumento na intensidade das bandas de absorção dos monômeros na forma desprotonada ligada (Figura 3.61).

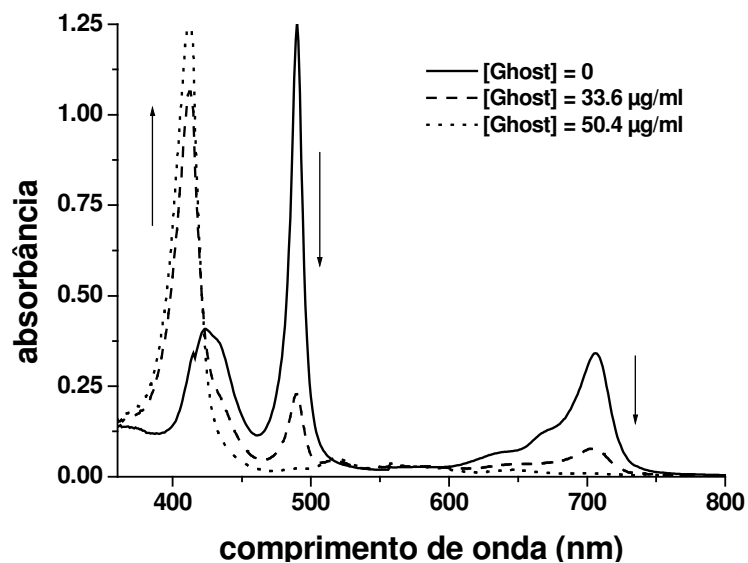


Figura 3.61) Mudanças no espectro de absorção de  $[TPPS_4] = 28 \mu\text{M}$  em pH 4.0 na presença  $[\text{NaCl}] = 0.4 \text{ M}$  e de frações de membranas.

Deste modo, podemos concluir que a ligação da  $TPPS_4$  com a membrana é responsável pela desagregação e desprotonação da porfirina.

A desagregação da  $TPPS_4$  estimulada pelas frações de membranas não é um processo imediato. Nas Figuras 3.62 e 3.63 são apresentadas as mudanças espectrais em função do tempo relacionadas à desagregação da  $TPPS_4$  induzida pela interação com as células *ghost*.

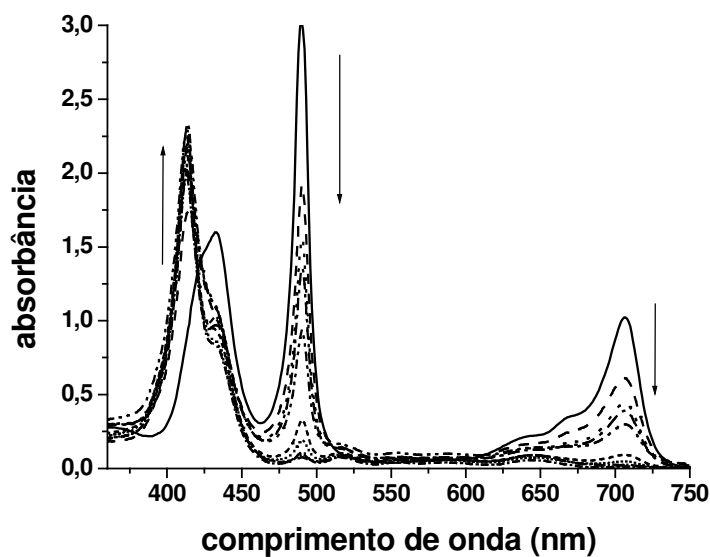


Figura 3.62) Mudanças no espectro de absorção de  $[TPPS_4] = 28 \mu\text{M}$  em pH 4.0 na presença  $[\text{NaCl}] = 0.4 \text{ M}$  e de  $[\text{Ghost}] = 16 \mu\text{g/ml}$ .

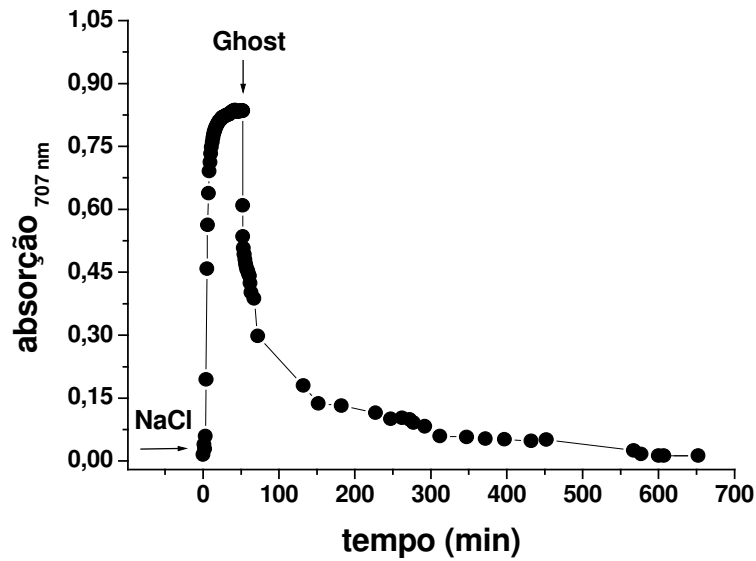


Figura 3.63) Mudanças na absorção em  $\lambda = 707 \text{ nm}$  de  $[\text{TPPS}_4] = 28 \mu\text{M}$  em pH 4.0 na presença  $[\text{NaCl}] = 0.4 \text{ M}$  e de  $[\text{Ghost}] = 16 \mu\text{g/ml}$  em função do tempo.

A dinâmica de desagregação é dependente da concentração de frações de membrana na solução e pode ser relativamente lenta, como mostrado na Figura 3.63.

Para TMPyP, a adição de frações de membrana na solução induz somente a uma diminuição da absorção. Este efeito é mais pronunciado na presença de NaCl, conforme mostra a Figura 3.64.

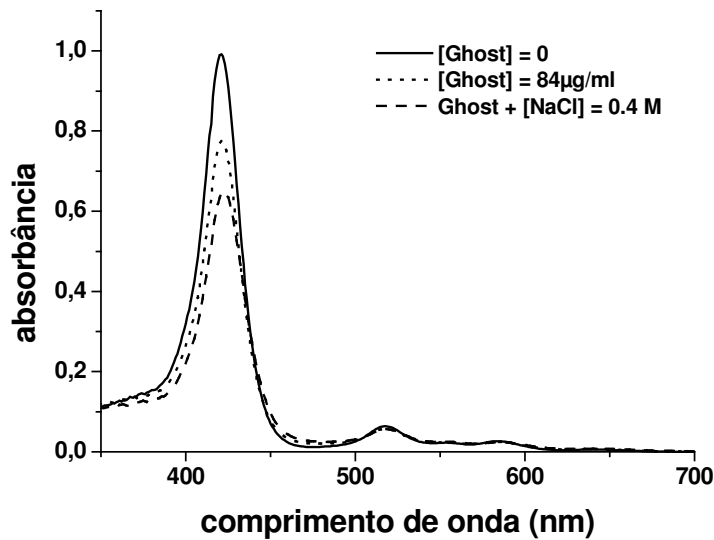


Figura 3.64) Mudanças no espectro de absorção de  $[\text{TMPyP}] = 22 \mu\text{M}$  em pH 6.85 na ausência e na presença de  $[\text{Ghost}] = 84 \mu\text{g/ml}$  e de  $[\text{NaCl}] = 0.4 \text{ M}$ .

## 2. Fluorescência

Como mostrado anteriormente, o espectro de fluorescência da TPPS<sub>4</sub> em pH 7.0 é caracterizado por uma banda centrada em 642 nm com um ombro em 701 nm. A adição de frações de membrana na solução altera pouco o perfil da banda de emissão e praticamente não muda a sua intensidade. Entretanto, a adição de NaCl na solução contendo as membranas muda a forma do espectro e provoca o deslocamento da banda de emissão para 662 nm (Figura 3.65).

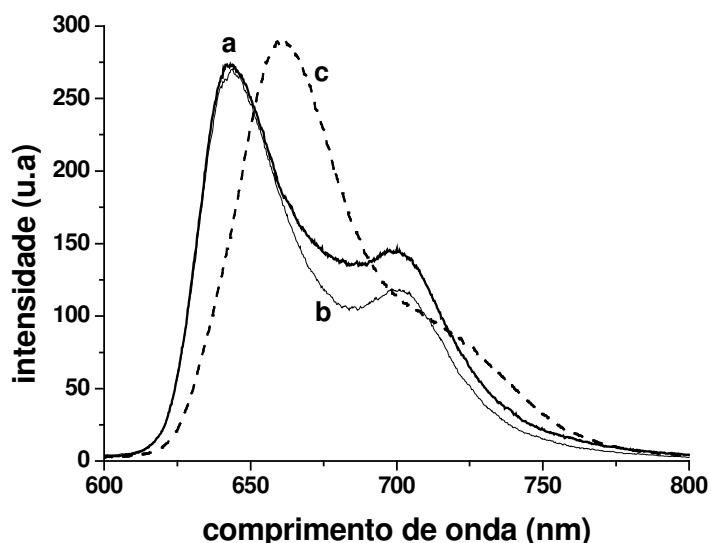


Figura 3.65) Mudanças no espectro de fluorescência de [TPPS<sub>4</sub>] = 28 µM em pH 6.85 (a); na presença de [Ghost] = 84 µg/ml (b); na presença de Ghost e [NaCl] = 0.4 M.

O rendimento quântico de fluorescência é alterado de 0.16 (que é característico para o monômero livre) para 0.154 na presença de células ghost e para 0.12 na presença do sal e células ghost.

As análises de fluorescência estática foram acompanhadas das medidas do tempo de vida de emissão ( $\tau_{fl}$ ). Para TPPS<sub>4</sub> em pH 6.85  $\tau_{fl} = (10 \pm 0.04)$  ns e praticamente não é alterado na presença de células ghost ( $10.6 \pm 0.05$ ). A adição de NaCl na presença ou na ausência de células ghost reduz  $\tau_{fl}$  para  $(9.3 \pm 0.07)$  ns. De um modo geral, podemos verificar que a ligação da porfirina com a membrana biológica em pH 6.85 na ausência de NaCl altera pouco as propriedades do estado excitado singleto da TPPS<sub>4</sub>, enquanto que na presença do sal ocorre a

mudança no espectro de fluorescência, indicando uma mudança na forma da porfirina ou no ambiente em que ela se encontra.

Em pH 4.0 a porfirina biprotonada TPPS<sub>4</sub> possui um espectro de emissão caracterizado por uma banda centrada em 671 nm (Figura 3.66). A adição de frações de membrana na solução leva a uma redução na intensidade de emissão acompanhada pela mudança na forma do espectro. A banda de emissão é deslocada para 645 nm e apresenta um ombro em torno de 705 nm, que é característico para a forma desprotonada de TPPS<sub>4</sub>. Este processo satura quando o conteúdo de células ghost presente na solução é igual ou maior que 84 µg/ml. A adição de NaCl neste sistema provoca o deslocamento do máximo de emissão para 662 nm.

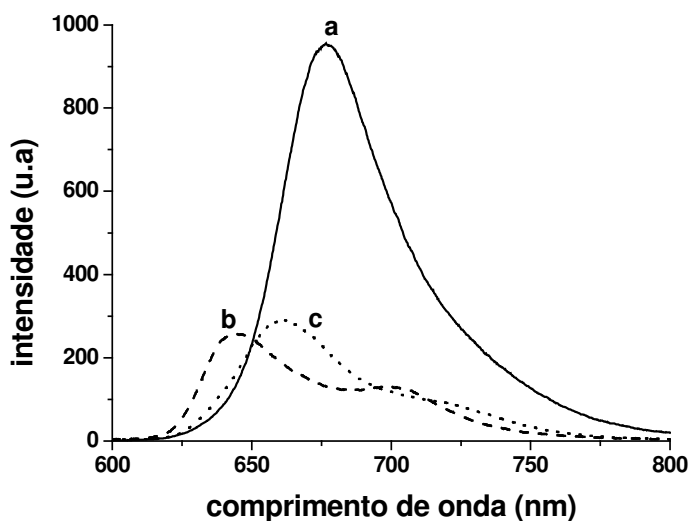


Figura 3.66) Mudanças no espectro de fluorescência de [TPPS<sub>4</sub>] = 28 µM em pH 4.0 (a); na presença de [Ghost] = 118 µg/ml (b); na presença de Ghost e [NaCl] = 0.4 M (c).

Neste caso, o rendimento quântico de emissão de fluorescência ( $\phi_{fl}$ ) é fortemente alterado. Em solução aquosa TPPS<sub>4</sub> em pH 4.0 possui  $\phi_{fl} = 0.27$ . Este valor é reduzido para 0.18 na presença de células ghost. O tempo de vida de emissão foi alterado de 4 ns (em pH 4.0) para 9.4 ns na presença das células ghost. Nós atribuímos estas mudanças à desprotonação da porfirina devido a sua ligação com a membrana. Na presença de NaCl e células ghost  $\phi_{fl}$  foi reduzido ainda mais,  $\phi_{fl} = 0.12$  e o tempo de vida da fluorescência diminuiu para 8.4 ns.

Para a porfirina TMPyP a interação com as células ghost não produz fortes alterações no espectro de emissão, salvo uma pequena redução na intensidade de fluorescência (Figura 3.67).

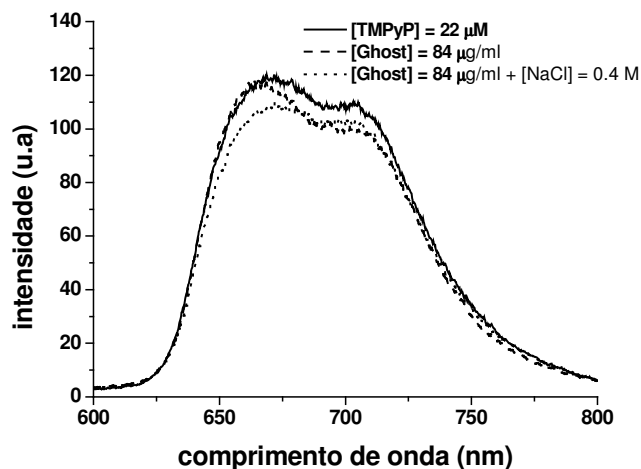


Figura 3.67) Mudanças no espectro de fluorescência de  $[TMPyP] = 22 \mu M$  em pH 6.85 na ausência e na presença de  $[NaCl] = 0.4 M$  na presença de frações de membranas.

O tempo de vida de emissão praticamente não sofre alterações na presença de células ghost:  $\tau_{fl} = (4.5 \pm 0.05) ns$  e  $\tau_{fl} = (4.7 \pm 0.06) ns$  na ausência e na presença das células, respectivamente. A adição de NaCl na solução reduz ainda mais o tempo de vida para  $4.1 \pm 0.07 ns$  na presença das frações de membrana.

### **Discussão**

De um modo geral a interação entre TPPS<sub>4</sub> ou TMPyP com as frações de membrana não estimula a formação de agregados das porfirinas. Pelo contrário, na presença de frações de células, a porfirina inicialmente agregada na presença de NaCl retorna à forma monomérica desprotonada, mostrando a ligação da porfirina com a membrana celular. A dinâmica deste processo é dependente da concentração das frações de membranas. Os dados de fluorescência da TPPS<sub>4</sub> em ambos os pHs mostram o aparecimento de uma nova banda de emissão em 662 nm, observada no sistema TPPS<sub>4</sub> + Ghost + NaCl. Nos atribuímos esta banda à TPPS<sub>4</sub> na forma monomérica, penetrada na membrana.