

Cláudia Tatiana Correia Barbosa Pinto Ribeiro

Interação de porfirinas com
lipossomas avaliada por
espectrofotometria derivativa

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

Cláudia Tatiana Correia Barbosa Pinto Ribeiro

Interação de porfirinas com
lipossomas avaliada por
espectrofotometria derivativa

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2015

Cláudia Tatiana Correia Barbosa Pinto Ribeiro

Interação de porfirinas com lipossomas avaliada por
espectrofotometria derivativa

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para a obtenção do
grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Resumo

As porfirinas são moléculas com diversas aplicações em diferentes áreas, de entre as quais se destaca a sua utilização como agente fotossensibilizador em terapia fotodinâmica (PDT) para o tratamento do cancro. Para que esta terapia seja eficaz, o fotossensibilizador tem que se acumular no tecido tumoral em determinadas concentrações. A acumulação das porfirinas no tecido tumoral está dependente da interação destas moléculas com as membranas biológicas, pelo que se torna essencial a determinação do seu coeficiente de partição.

Este trabalho pretende comparar a interação de duas porfirinas: a tetracloreto de *meso-Tetra(4-N,N,N-trimetilanilina)* porfirina (T973) e a *meso-Tetra(4-carboxifenil)* porfirina (T790) com um modelo de membrana biológica: lipossomas de fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC). Estas moléculas apresentam diferentes características químicas nomeadamente no que diz respeito à sua carga iónica: a T973 é catiónica e a T790 é aniónica.

Os coeficientes de partição (K) lipossoma/tampão Hepes foram determinados por espectrofotometria derivativa a dois valores diferentes de pH: 7,4 e 5,8, para mimetizar as condições *in vivo*: plasma e tecido tumoral, respetivamente.

Os coeficientes de partição foram determinados por ajuste de modelos matemáticos (que têm em conta a estequiometria da interação) aos dados experimentais. Este ajuste, efetuado usando o programa Origin[®] 8.5.1, permitiu refinar matematicamente o valor de K.

Os valores de K obtidos são importantes para a escolha de um potencial agente fotossensibilizador a ser utilizado em terapia fotodinâmica para o tratamento do cancro, uma vez que este parâmetro influencia a concentração de porfirina no tecido tumoral.

Foram observados diferentes tipos de partição para as diferentes moléculas e valores de pH. Os resultados parecem apontar para a existência de uma maior interação entre a T973 e o tecido tumoral. Com base nestes resultados, a T973 apresenta-se como um promissor agente fotossensibilizador, uma vez que é solúvel no valor de pH plasmático e interage de forma forte com a membrana nos valores de pH que são normalmente apresentados pelos tumores. No entanto, é necessário a realização de mais estudos para se puderem comprovar estes resultados.

Do anexo consta o artigo submetido para publicação para a revista *Medical Chemistry Research*, com o título “Porphyrin Interaction with the Membrane: the use of membrane models to elicit the diverse partition in normal and neoplastic tissue” que contém parte dos resultados obtidos neste trabalho.

Abstract

Porphyrins are molecules with applications in different fields, mainly in health sciences, for their use as light sensitizing agents in photodynamic therapy for cancer treatment. For this therapy to be effective, the light sensitizing agent needs to accumulate in the tumor tissue in certain concentrations. Porphyrins accumulation in tumoral tissue is dependent on the interaction of this molecule with biological membranes, therefore the determination of its partition coefficient is needed.

This work intends to compare the interaction of two porphyrins: the meso-Tetra(4-N,N,N-trimethylanilinium) porphine tetrachloride (T973) and the meso-Tetra(4-carboxyphenyl) porphine (T790) with a biological membrane model: egg yolk phosphatidylcholine liposomes. These molecules show different chemical characteristics: the T973 is cationic and the T790 is anionic.

The liposome/Hepes buffer partition coefficients (K) were determined by derivative spectrophotometry at two different pH values: 7,4 and 5,8, to mimic *in vivo* conditions: plasma and tumour tissue, respectively.

The partition coefficients were determined by fitting mathematical models (which take into account the stoichiometry of the interaction) to the experimental data. This setting was performed by using the Origin[®] 8.5.1 program. It allowed to mathematically refine the K value.

The obtained K values are important in choosing a potential light sensitizing agent for photodynamic therapy, considering this parameter influences the porphyrin concentration in tumoral tissue.

Different types of partition were observed for different molecules and pH values. The results seem to indicate the existence of a greater interaction between the T973 and the

tumour tissue. Based on these results, T973 appears to be a promising light sensitizing agent, since it is soluble at plasma pH and strongly interacts with the membrane at the pH values normally presented by tumours. However, more research and studies must be carried on in order to confirm these results.

Agradecimentos

*“(...) Há gente que fica na história
Da história da gente (...)”
(Chuva – Mariza)*

À Professora Doutora Carla Matos, com quem tive o orgulho e o privilégio de colaborar, agradeço por me ter aberto as portas da investigação, por todos os desafios e estímulos para a realização deste projeto. Pela sua disponibilidade, partilha de conhecimentos e amabilidade. Por ter acreditado nas minhas capacidades!

Ao Miguel, ao Pedro e ao Ricardo do Cerlab pela inestimável paciência e ajuda sempre demonstrados.

Ao Carlos, um agradecimento muito especial, pelo amor, carinho e apoio diários e pela transmissão de confiança e força em todos os momentos.

Ao Bruno e ao André pelo apoio, amizade, companheirismo e boa disposição. Considero-me uma privilegiada em ter-vos como irmãos!

Aos meus amigos, em especial à Mafalda Fonseca, Mafalda Soares, Ana Rita Monteiro, Alexandra Carvalhais e Catarina Gomes por me terem acompanhado no meu percurso e pela partilha de bons momentos!

Aos Meus Pais, um muito obrigada especial por não terem desistido nunca e terem acreditado que tudo poderia acabar bem! A vós, Pai e Mãe, dedico todo este projeto!

Índice

| | |
|--|----|
| Resumo | 5 |
| Abstract..... | 7 |
| Agradecimentos | 9 |
| Índice | 10 |
| Índice de Figuras | 12 |
| Índice de Tabelas | 14 |
| Lista de Abreviaturas..... | 15 |
| I.Introdução..... | 17 |
| II. Porphirinas e Terapia Fotodinâmica..... | 19 |
| 1. Porphirinas – características gerais | 19 |
| 2. Terapia Fotodinâmica | 20 |
| i. Fotossensibilizadores | 22 |
| 3. Porphirinas como Agentes Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica..... | 24 |
| III. Lipossomas | 26 |
| 1. Classificação dos lipossomas | 27 |
| 2. Preparação dos lipossomas | 28 |
| IV. Coeficiente de Partição..... | 31 |
| 1. Determinação dos coeficientes de partição lipossoma/água..... | 31 |
| V. Espectrofotometria Derivativa..... | 33 |
| VI. Materiais e Métodos | 34 |
| 1. Materiais e Reagentes | 34 |
| 2. Preparação dos lipossomas de EPC | 34 |
| 3. Condições experimentais | 35 |
| VII. Resultados | 37 |
| 1. Determinação dos coeficientes de partição da T973 | 37 |

| | |
|--|----|
| 2. Determinação dos coeficientes de partição da T790 | 43 |
| VIII. Discussão dos Resultados | 48 |
| IX. Conclusão | 51 |
| X. Bibliografia | 52 |
| XI. Anexo | 60 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. - Estrutura química da T973 (A) e da T790 (B) | 18 |
| Figura 2.1. – Estrutura geral do núcleo porfírico | 19 |
| Figura 2.2. – Sistema de Numeração proposto pela IUPAC | 20 |
| Figura 2.3. – Esquema das fases da terapia fotodinâmica | 22 |
| Figura 2.4. – Mecanismo de atuação do fotossensibilizador | 23 |
| Figura 3.1. - Estrutura geral de um lipossoma | 26 |
| Figura 3.2. – Classificação dos lipossomas | 28 |
| Figura 3.3. – Método de hidratação do filme lipídico | 29 |
| Figura 4.1. – Representação esquemática do processo de extrusão | 35 |
| Figura 5.1. – Espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 7,4, na ausência e na presença de lipossomas | 37 |
| Figura 5.2. - Espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 5,8, na ausência e na presença de lipossomas | 38 |
| Figura 5.3. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 7,4, na ausência e na presença de lipossomas | 39 |
| Figura 5.4. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 5,8, na ausência e na presença de lipossomas | 39 |
| Figura 5.5. – Espectros de absorvância de soluções contendo lipossomas de EPC, a pH 7,4 | 40 |
| Figura 5.6. – Segunda derivada dos espectros de absorvância de soluções | 40 |

contendo lipossomas de EPC, a pH 7,4

Figura 5.7. – Ajuste do modelo matemático, equação 2, usando os valores da 41
derivada da intensidade de absorvância a 424 nm da T973 em tampão Hepes,
pH 7,4

Figura 5.8. – Ajuste do modelo matemático, equação 3, usando os valores da 42
derivada da intensidade de absorvância a 424 nm da T973 em tampão Hepes,
pH 5,8

Figura 5.9. – Espectros de absorvância da T790 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) 43
em tampão Hepes, pH 7,4, na ausência e na presença de lipossomas

Figura 5.10. – Espectros de absorvância da T790 (de concentração ≈ 3 44
 $\mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 5,8, na ausência e na presença de lipossomas

Figura 5.11. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T790 (de 45
concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 7,4, na ausência e na
presença de lipossomas

Figura 5.12. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T790 (de 45
concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 5,8, na ausência e na
presença de lipossomas

Figura 5.13. – Ajuste do modelo matemático, equação 3, usando os valores da 46
derivada da intensidade de absorvância a 427 nm da T790 em tampão Hepes,
pH 7,4

Figura 5.14. – Ajuste do modelo matemático, equação 2, usando os valores da 46
derivada da intensidade de absorvância a 433 nm da T790 em tampão Hepes,
pH 5,8

Índice de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1. – Propriedades de um fotossensibilizador ideal | 24 |
| Tabela 2 – Valores dos coeficientes de partição (K) da T973 determinados entre tampão Hepes (pH 7,4 e 5,8) e lipossomas de EPC obtidos por espectrofotometria derivativa utilizando diferentes modelos matemáticos | 43 |
| Tabela 3 – Valores dos coeficientes de partição (K) da T790 determinados entre tampão Hepes (pH 7,4 e 5,8) e lipossomas de EPC obtidos por espectrofotometria derivativa utilizando diferentes modelos matemáticos | 47 |

Lista de Abreviaturas

| | |
|-------------------------------|--|
| A | Derivada da absorvância |
| Abs | Absorvância |
| | Derivada da intensidade da absorvância calculada quando toda a |
| A _{m1} | porfirina está a interagir com a membrana na estequiometria de 1:1 |
| | Derivada da intensidade da absorvância calculada quando toda a |
| A _{m2} | porfirina está a interagir com a membrana na estequiometria de 1:2 |
| At | Derivada da intensidade da absorvância total |
| | Derivada da intensidade da absorvância da solução de porfirina |
| A _w | sem lípido |
| C ₁ | Concentração de qualquer espécie molecular na fase 1 |
| C ₂ | Concentração de qualquer espécie molecular na fase 2 |
| cm | Centímetro |
| dm ³ /mol | Decímetro cúbico por mol |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EPC | Fosfatidilcolina de gema de ovo |
| Eq. | Equação |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GUV | “Giant Unilamellar Vesicles” – Vesículas Unilamelares Gigantes |
| Hepes | Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfónico |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogénio |
| HO [·] | Radicais Hidroxilo |
| IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| K | Coeficiente de partição |
| | Coeficiente de partição quando a porfirina interage com a |
| K ₁ | membrana na estequiometria de 1:1 |
| | Coeficiente de partição quando a porfirina interage com a |
| K ₂ | membrana na estequiometria de 1:2 |

| | |
|-----------------------------|---|
| K_{OA} | Coeficiente de partição determinado no sistema octanol/água |
| [L] | Concentração de lipossomas de EPC |
| logD | Coeficiente de distribuição |
| LUV | “Large Unilamellar Vesicles” - Vesículas Unilamelares Grandes |
| mg/mL | Miligrama por mililitro |
| mL | Mililitro |
| MLV | “Multilamellar Vesicles “ - Vesículas Multilamelares |
| mmol/dm ³ | Milimoles por decímetro cúbico |
| mol/dm ³ | Moles por decímetro cúbico |
| NaCl | Cloreto de Sódio |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| nm | Nanómetro |
| nm/min | Nanómetro por minuto |
| ¹ O ₂ | Oxigénio singleto |
| ³ O ₂ | Oxigénio molecular |
| O ₂ ⁻ | Iões superóxido |
| PDT | Terapia Fotodinâmica |
| pH | Potencial de Hidrogénio |
| pKa | Constante de acidez |
| ROS | Espécies Reativas de Oxigénio |
| SUV | “Small Unilamellar Vesicles” – Vesículas Unilamelares Pequenas |
| T790 | <i>meso-Tetra</i> (4-carboxifenil) porfirina |
| T973 | Tetracloroeto de <i>meso-Tetra</i> (4- <i>N,N,N</i> -trimetilanelina) porfirina |
| UV/Vis | Ultravioleta/Visível |
| λ | Comprimento de onda |
| $\lambda_{\text{máx}}$ | Comprimento de onda máximo |
| μm | Micrómetro |
| $\mu\text{mol/dm}^3$ | Micromoles por decímetro cúbico |
| $\mu\text{S cm}^{-1}$ | Microsiemens por centímetro |

Introdução

O termo porfirina deriva do grego *porphura* que significa “pigmento púrpura”. As porfirinas são compostos macrocíclicos tetrapirrólicos cuja existência é fundamental para a vida. Dos seus derivados naturais mais importantes destacam-se o grupo heme e as clorofilas (Milgrom, 1997).

As porfirinas são também utilizadas como antifúngicos (Zheltukhina *et al.*, 2012) e antibacterianos (Sagir *et al.*, 2012) e como agentes fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica (PDT) para o tratamento de neoplasias. Esta terapia consiste em introduzir a porfirina no tecido tumoral e irradiá-la com um feixe de luz de comprimento de onda apropriado. Deste processo resulta a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), que destroem o tecido tumoral (Ethirajan *et al.*, 2011).

Para que esta terapia seja efetiva, o fármaco tem que se acumular no tecido tumoral em determinadas concentrações. Essa concentração de fármaco é dependente das suas características lipófilas, do seu grau de ionização, do pH do meio e da sua capacidade de interagir com as membranas biológicas. As porfirinas acumulam-se seletivamente nas células tumorais e a sua capacidade de atravessar a membrana celular e alcançar o DNA e outros alvos intracelulares parece dever-se a uma simples partição entre os meios aquoso e lipídico (Man *et al.*, 2011).

Sendo a interação da porfirina com a célula cancerígena um importante passo no processo descrito anteriormente, é muito importante a caracterização da interação da molécula com a membrana celular. Esta interação tem sido historicamente avaliada pela determinação do coeficiente de partição octanol/água (K_{OA}). Atualmente, este parâmetro tem tendência a ser substituído pela partição entre água e modelos simplificados da biomembrana como os lipossomas. Os lipossomas apresentam uma estrutura de membrana semelhante à celular, mas são mais fáceis de preparar e mais reprodutíveis e têm vindo a ser utilizados para estudar a interação de fármacos com a membrana (Esteves *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2012).

Os estudos da interação de porfirinas com modelos de membrana são normalmente realizados utilizando técnicas espectroscópicas, pois as porfirinas apresentam boas características espectrais devido ao seu extenso sistema de elétrons π deslocalizados. O método mais usado é a fluorimetria (Mojziso *et al.*, 2007; Neto e Tabak, 2012), mas a espectrofotometria UV/Vis tem vindo a ser uma alternativa (Matos *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012).

Com este trabalho pretende-se determinar os coeficientes de partição (K) de duas porfirinas, tetracloreto de *meso-Tetra(4-N,N,N-trimetilanilina)* porfirina (T973) e *meso-Tetra(4-carboxifenil)* porfirina (T790), com um modelo de membrana: os lipossomas formados por fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) por espectrofotometria derivativa, uma técnica que tem sido usada com sucesso noutros estudos (Florindo *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2012). Esta determinação foi realizada a dois valores diferentes de pH: 7,4 e 5,8 para simular as condições *in vivo*, plasma e tecido tumoral, respetivamente. Pretende-se ainda seleccionar entre uma porfirina catiónica (T973) e uma aniónica (T790), a melhor candidata para ser seletivamente capturada por tumores ácidos e poder, eventualmente, ser utilizada como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica.

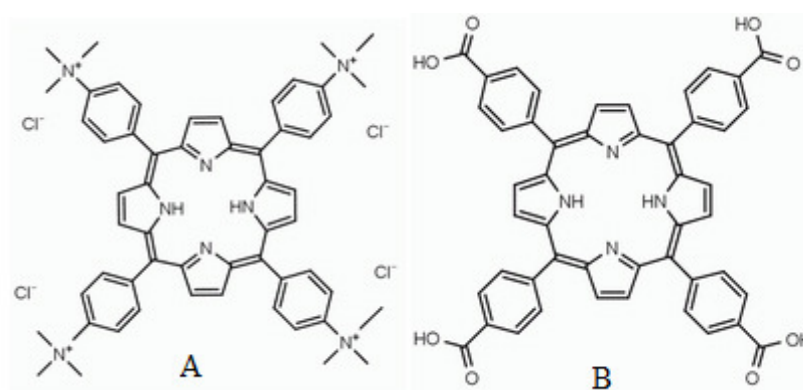


Figura 1.1. - Estrutura química da T973 (A) e da T790 (B) [Retirado de (Frontier Scientific)]

Porfirinas e Terapia Fotodinâmica

1. Porfirinas – características gerais

As porfirinas são compostos orgânicos macrocíclicos cujo núcleo base é constituído por quatro anéis pirrólicos unidos entre si por pontes metínicas (figura 2.1.).

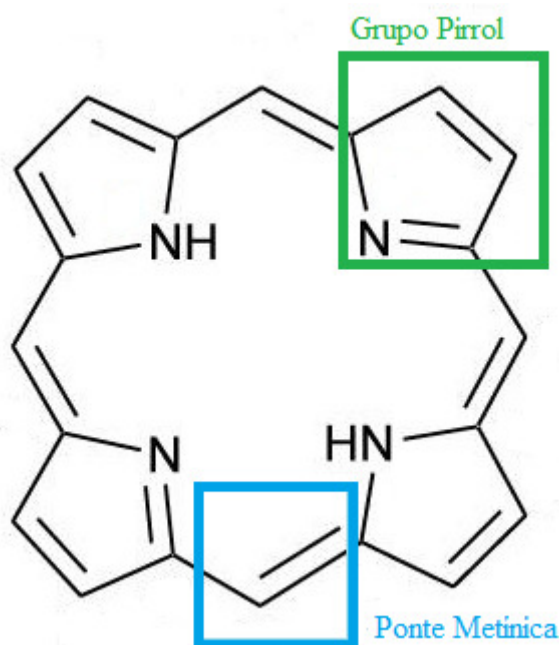


Figura 2.1. – Estrutura geral do núcleo porfírico [Adaptado de (Josefsen e Boyle, 2012)]

O estudo das porfirinas iniciou-se com Kuster em 1912, mas foi Hans Fischer, em 1929, que teve sucesso na síntese do grupo heme, tendo sido premiado com o Prémio Nobel da Química no ano de 1930. Este cientista alemão propôs a primeira nomenclatura para o núcleo porfírico. No entanto, com a síntese de novas porfirinas, cada vez mais complexas, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) teve necessidade de complementar o sistema anteriormente proposto. Assim, os vinte e quatro átomos pertencentes ao anel macrocíclico foram numerados de 1 a 24 e os hidrogénios ligados aos átomos de azoto numerados de N-21 e N-23 (Milgrom, 1997).

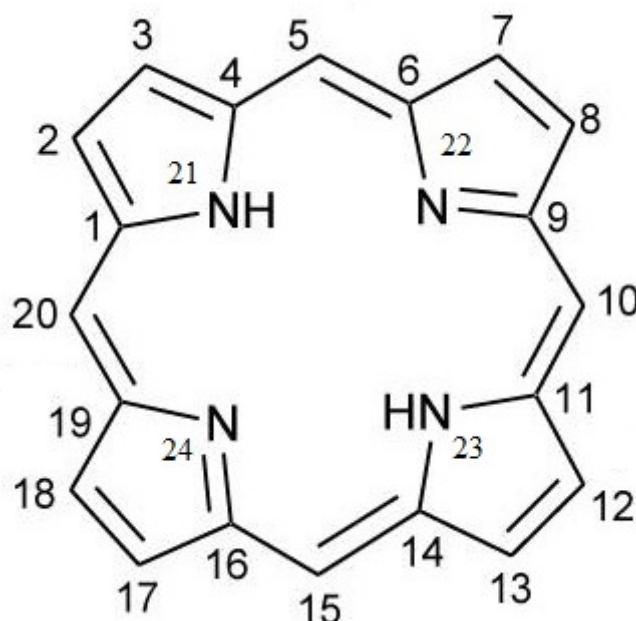


Figura 2.2. – Sistema de Numeração proposto pela IUPAC [Adaptado de (Josefsen e Boyle, 2012)]

Normalmente, distinguem-se três posições: as α (1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19), as *meso* (5, 10, 15 e 20) e as β (2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e 18). Se os hidrogénios das posições meso e/ou das posições β estão substituídos por outros átomos ou grupos químicos, o composto resultante é denominado de porfirina (Josefsen e Boyle, 2012).

Estes compostos apresentam um extenso sistema de eletrões π deslocalizados, o que lhes confere a capacidade de absorver luz, pelo que têm sido utilizados como agentes fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica para o tratamento de neoplasias (Ethirajan *et al.*, 2011; Josefsen e Boyle, 2012; Sternberg *et al.*, 1998).

2. Terapia Fotodinâmica

O primeiro registo de “fototerapia” remonta às antigas civilizações egípcias, mas estes conhecimentos foram perdidos durante séculos. Só nos finais do século XIX e inícios dos século XX, Neils Finsen e seus colaboradores viriam a desenvolver a terapia fotodinâmica, o que valeu a Finsen o Prémio Nobel da Medicina, em 1903. No entanto, só em 1995, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou o uso do primeiro

fotossensibilizador (Photofrin[®]) para tratar certos tipos de cancro (Castano *et al.*, 2004; Dolmans *et al.*, 2003).

A terapia fotodinâmica é usada clinicamente com variadas aplicações entre as quais se destacam: tratamento de diversos tipos de tumores, diagnóstico, profilaxia antes e após a remoção cirúrgica de tumores, tratamento da degeneração macular da retina, psoríase, verrugas, arteriosclerose e infeções fúngicas e bacterianas (Machado, 2000; Simplicio *et al.*, 2002; Sternberg *et al.*, 1998). No entanto, a sua maior área de aplicação é o tratamento do cancro.

O principal objetivo desta terapia é a destruição localizada do tecido neoplásico, quer para tumores de origem benigna, quer para tumores de origem maligna. Apresenta efeitos secundários menos agressivos do que os tratamentos convencionais, como a radioterapia e a quimioterapia, sendo menos invasiva e menos tóxica, permitindo uma melhor recuperação por parte do doente. No entanto, a fotossensibilização cutânea é a sua principal limitação (Josefsen e Boyle, 2012; Nyman e Hynninen, 2004).

A terapia fotodinâmica é um processo que envolve várias fases (representado na figura 2.3.) onde:

- (1) O fotossensibilizador é administrado ao paciente (por via sistémica ou tópica) na ausência de luz;
- (2) Aguarda-se um intervalo de tempo suficiente para que o fotossensibilizador se acumule no tecido tumoral;
- (3) O fotossensibilizador é ativado por luz visível de um comprimento de onda específico, que coincide com o comprimento de onda de absorção máxima do fotossensibilizador;
- (4) O fotossensibilizador ativado reage com o oxigénio molecular originando *in situ* espécies reativas de oxigénio (ROS) que destroem as células tumorais.

O sucesso e a seletividade da PDT está relacionado com a acumulação do fotossensibilizador no tecido neoplásico, mantendo intacto o tecido saudável. Esta seletividade está relacionada com a afinidade do fotossensibilizador para o tecido

tumoral e pela capacidade de se conseguir ativar o fotossensibilizador apenas nesse tecido. As respostas biológicas ao fotossensibilizador dão-se apenas nos locais expostos à luz (Dolmans *et al.*, 2003; Josefsen e Boyle, 2012; Sharman *et al.*, 1999).

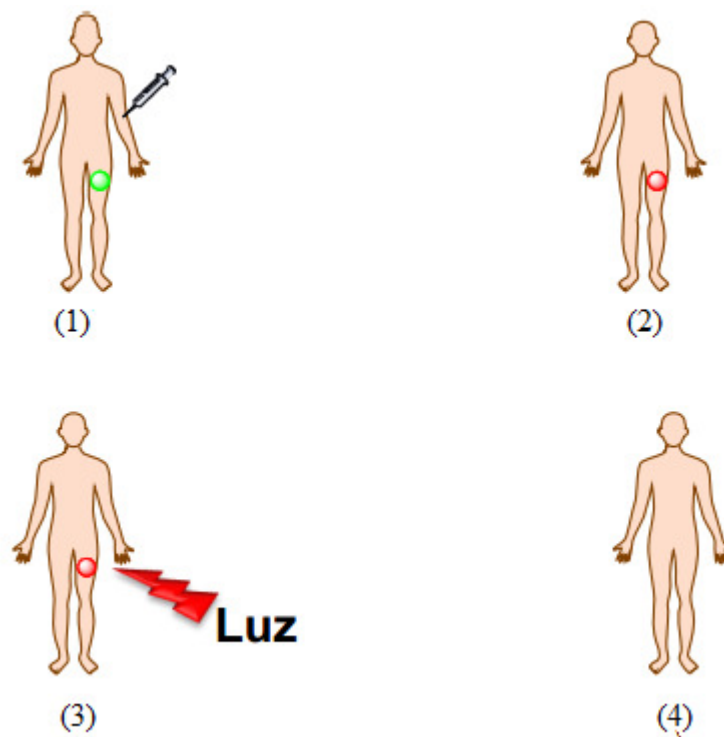


Figura 2.3. – Esquema das fases da terapia fotodinâmica [Adaptado de (Bastos *et al.*, 2012)]

i. Fotossensibilizadores

O fotossensibilizador é a molécula que, quando excitada pela energia da luz, utiliza essa energia para induzir reações fotoquímicas produzindo agentes citotóxicos que levam à morte celular e destruição do tecido tumoral (figura 2.4.) (Josefsen e Boyle, 2012).

Apenas quando o fotossensibilizador está no seu estado excitado pode interagir com o oxigénio molecular ($^3\text{O}_2$) para produzir ROS, tais como oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$), radicais hidroxilo (HO^\cdot), aniões superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que são agentes citotóxicos. Estas espécies interagem com componentes celulares como lípidos insaturados, resíduos de aminoácidos e ácidos nucleicos, causando danos que resultam

em apoptose ou necrose. Estes danos são limitados à área circundante (cerca de 20 nm) onde o fotossensibilizador excitado se encontra.

O oxigénio singlete (ROS predominante) é responsável por iniciar uma série de reações com biomoléculas, incluindo resíduos de aminoácidos como o triptofano, lípidos insaturados como o colesterol e bases dos ácidos nucleicos como a guanina (Bonnett e Martínez, 2001; Castano *et al.*, 2004; Nyman e Hynninen, 2004; Sharman *et al.*, 1999; Sternberg *et al.*, 1998).

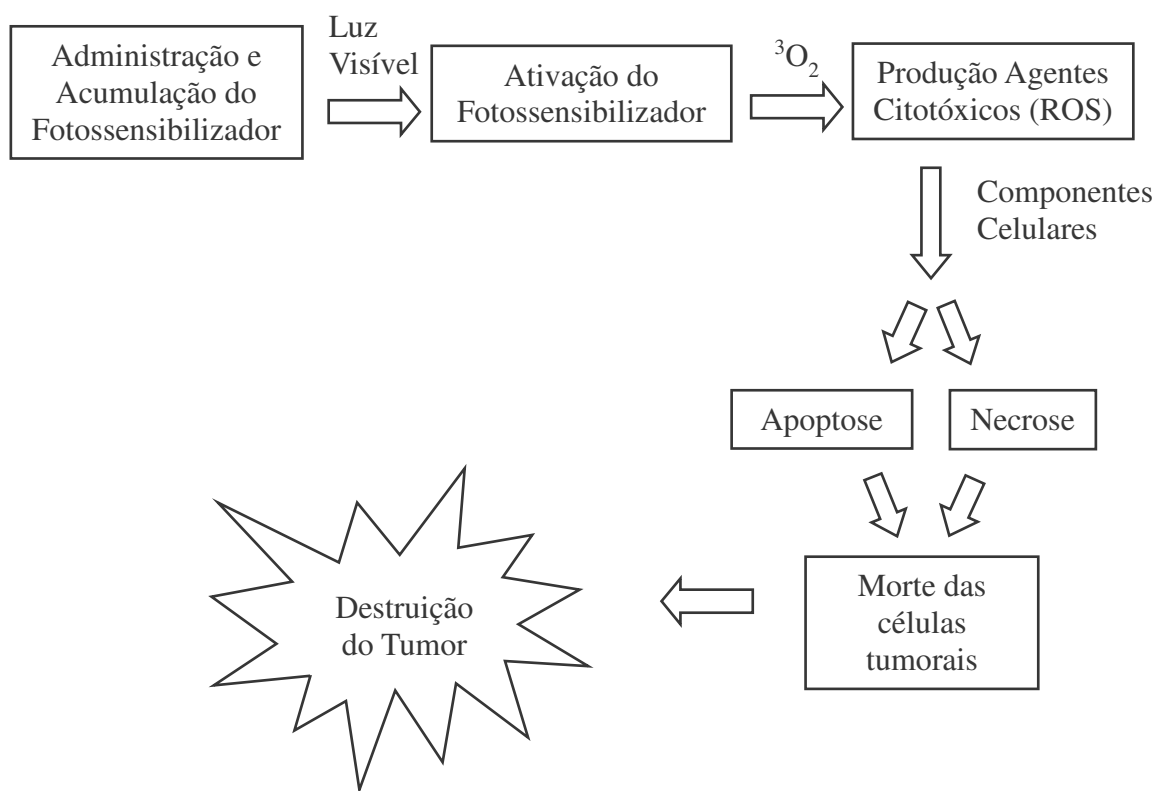


Figura 2.4. – Mecanismo de atuação do fotossensibilizador [Adaptado de (Josefsen e Boyle, 2012)]

Conforme já referido, as principais características dos fotossensibilizadores são a capacidade de se acumularem preferencialmente no tecido tumoral e produzirem agentes citotóxicos para induzir a morte do tecido tumoral onde se acumulou (Sharman *et al.*, 1999). No entanto, existem outras propriedades que o fotossensibilizador ideal deve apresentar (ver tabela 1.).

Tabela 1. – Propriedades de um fotossensibilizador ideal (Allison *et al.*, 2004; Jori, 1996; Sharman *et al.*, 1999)

| Propriedades de um fotossensibilizador ideal |
|--|
| Físico-Químicas <ul style="list-style-type: none">✓ Alta pureza química✓ Alto coeficiente de extinção molar no visível✓ Baixa tendência à agregação em meio aquoso |
| Fotofísicas <ul style="list-style-type: none">✓ Longo tempo de semi-vida no estado tripleto✓ Alto rendimento de geração de oxigênio singleto e espécies reativas de oxigênio |
| Farmacológicas <ul style="list-style-type: none">✓ Direcionamento seletivo e eficiente para o tecido tumoral✓ Eliminação rápida do organismo✓ Baixa toxicidade sistêmica |
| Fototerapêuticas <ul style="list-style-type: none">✓ Destruição seletiva e eficiente de células tumorais✓ Ausência de efeitos adversos✓ Toxicidade mínima no escuro e citotoxicidade apenas na presença de luz✓ Ausência de potencial mutagênico e carcinogênico |

A eficácia da terapia fotodinâmica no tratamento de tumores é multifatorial e está dependente do tipo de fotossensibilizador, da sua concentração e localização, da dose de luz exposta, do tempo decorrido após a administração do fotossensibilizador e da disponibilidade de oxigênio (Dolmans *et al.*, 2003).

3. Porfirinas como Agentes Fotossensibilizadores em Terapia Fotodinâmica

As porfirinas e derivados são compostos que apresentam características que os tornam potenciais fotossensibilizadores, tais como serem agentes cromóforos fotossensíveis aos comprimentos de onda na faixa dos 630 nm, apresentarem alto rendimento quântico no estado excitado, gerando quantidades significativas de oxigênio no estado singleto e terem baixa toxicidade na ausência de luz para as células dos mamíferos (Josefsen e Boyle, 2012; Perussi, 2007).

As porfirinas são conhecidas como a primeira geração de fotossensibilizadores que foi aprovada e comercializada. Alguns exemplos são Photofrin[®], Photosan[®], Photocan[®].

O Photofrin[®] foi o primeiro fotossensibilizador aprovado pela FDA para uso clínico em terapia fotodinâmica para tratamento de neoplasias da bexiga. Atualmente, encontra-se aprovado por várias autoridades de saúde de diversos países e para uso em diversos tipos de cancro, como pulmão e esófago. Apesar deste fármaco representar um importante passo nas pesquisas de tratamentos alternativos à quimioterapia e radioterapia, uma vez que os seus efeitos secundários são menores, apresenta algumas limitações como: fraca absorção na região da janela terapêutica, limitando a eficácia da terapia; a sua eliminação é bastante lenta, o que resulta numa prolongada fotossensibilidade do tecido irradiado, levando a que o paciente necessite de permanecer protegido da luz durante vários dias; apresenta baixa seletividade para o tecido tumoral e tem baixo coeficiente de extinção molar, o que faz com que seja necessário a administração de doses elevadas para se obter uma resposta satisfatória (Castano *et al.*, 2004; Sharman *et al.*, 1999).

A investigação levou ao desenvolvimento de fotossensibilizadores com maior eficácia, surgindo a segunda geração. Esta segunda geração é constituída por derivados das porfirinas como clorinas, ftalocianinas e naftalocianinas. Estes fotossensibilizadores também já estão aprovados e comercializados, sendo exemplos Visudyne[®] e Photosense[®]. Estes compostos apresentam algumas vantagens relativamente aos de primeira geração, sendo de salientar o facto de serem mais puros, melhores geradores de oxigénio singleto, apresentarem uma elevada absorção aos comprimentos de onda onde há máxima transmitância de luz pelos tecidos, apresentarem maior seletividade para tecidos tumorais e rápida eliminação do organismo (Allison *et al.*, 2004; Josefsen e Boyle, 2012; Sharman *et al.*, 1999).

Atualmente, estão em estudo uma terceira geração de fotossensibilizadores focada em estratégias de direcionamento, tais como fotossensibilizadores acoplados a anticorpos e fotossensibilizadores veiculados em nanotransportadores (Hudson *et al.*, 2005; Josefsen e Boyle, 2012; Malatesti *et al.*, 2006).

III

Lipossomas

Os lipossomas, do grego *lipos* (gordura) e *sôma* (corpo), são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas dispostas de forma concêntrica, separadas por compartimentos aquosos que foram descobertos por Bangman e seus colaboradores na década de 60 do século XX (Bangham e Horne, 1964; Bangham *et al.*, 1965; Lasic, 1988).

Os lipossomas podem ser preparados a partir de misturas lipídicas anfifílicas naturais (fosfolípidos e colesterol) ou a partir de lípidos sintéticos. Os lípidos anfifílicos são compostos por um grupo hidrófilo, usualmente designado por cabeça polar e por uma parte não polar designada de cauda hidrófoba, que apresentam a capacidade de formar bicamadas e de se organizar em estruturas esféricas fechadas (figura 3.1.) (Lasic, 1988; Matos, 2001; Matos e Moutinho, 2011).

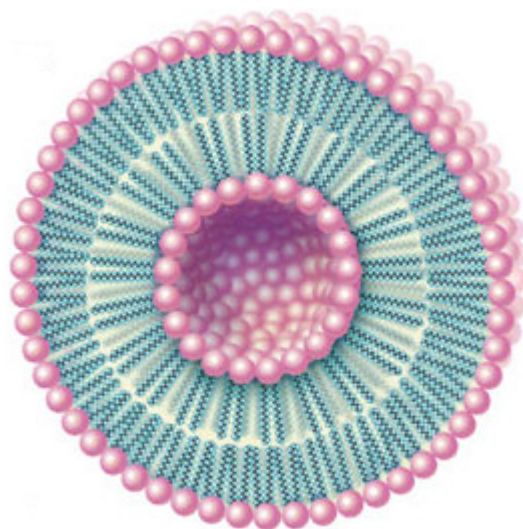


Figura 3.1. - Estrutura geral de um lipossoma [Adaptado de (Encyclopædia Britannica Inc., 2015)]

Os lípidos mais frequentemente utilizados na preparação de lipossomas são fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, esfingomiéline e fosfatidilcolina, pois tendem a

formar uma bicamada estável em solução aquosa. Dentro destes, a fosfatidilcolina ou lecitina (do grego *lekithos* (gema de ovo)) destaca-se mais, uma vez que é o maior componente das membranas naturais e apresenta grande estabilidade perante variações de pH e concentração de eletrólito no meio (Matos, 2001; Matos e Moutinho, 2011).

Os lipossomas são importantes modelos biomiméticos, uma vez que são compostos pelos mesmos constituintes das membranas biológicas e formam uma estrutura semelhante a estas (Matos, 2001).

Estas estruturas são também utilizadas como veículos para a libertação de fármacos e ingredientes ativos existindo várias formulações em fase de ensaios clínicos e mesmo algumas já comercializadas (El Maghraby *et al.*, 2008; Svenson, 2014).

1. Classificação dos lipossomas

Conforme já referido, os lipossomas são vesículas esféricas formadas por uma ou mais bicamadas lipídicas separadas por compartimentos aquosos. O tamanho e número de camadas dos lipossomas depende principalmente do método de produção utilizado.

Lipossomas com tamanhos entre 500 e 5000 nm são denominados por vesículas multilamelares (“Multilamellar Vesicles”, MLV). Cada MLV consiste em várias camadas lipídicas dispostas concêntricamente, entre as quais se dispõe uma fração do meio aquoso.

Os lipossomas formados por uma única camada lipídica denominam-se por vesículas unilamelares grandes (“Large Unilamellar Vesicles”, LUV) e o seu diâmetro varia, dependendo da fonte bibliográfica, entre os 100 e 500 ou 800 nm.

As vesículas unilamelares pequenas (“Small Unilamellar Vesicles”, SUV) apresentam também uma só camada lipídica e diâmetro entre os 20 e 100 nm.

Existem ainda as vesículas unilamelares gigantes (“Giant Unilamellar Vesicles”, GUV) que também apresentam uma única camada lipídica e diâmetro superior a 1 μm (Matos e Moutinho, 2011).

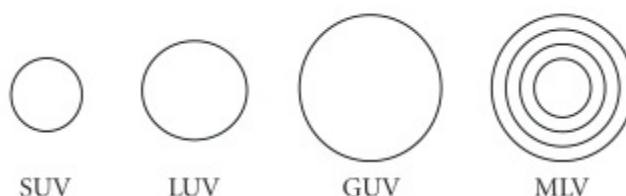


Figura 3.2. – Classificação dos lipossomas [Adaptado de (Mishra *et al.*, 2011)]

2. Preparação dos lipossomas

O processo clássico de preparação de lipossomas denomina-se por método de hidratação do filme lipídico (Bangham e Horne, 1964; Bangham *et al.*, 1965; Lasic, 1988).

Este método compreende várias fases (figura 3.3.):

1. Dissolução do lípido em solventes orgânicos;
2. Evaporação do solvente orgânico em rotação permanente, por forma a espalhar o lípido nas paredes do balão o mais fina e homoganeamente possível;
3. Obtenção do filme lipídico seco;
4. Hidratação do filme lipídico, através da adição de uma solução tampão;
5. Agitação vigorosa em vortex para a formação de MLV;
6. Utilização de métodos mecânicos (sonicação ou extrusão) para diminuir o tamanho dos lipossomas, produzindo-se LUV ou SUV

Este processo de preparação pode sofrer algumas variações, nomeadamente quanto ao solvente orgânico utilizado, à possível adição de esferas de vidro, à forma de secagem do lípido e aos parâmetros de agitação (Lasic, 1993).

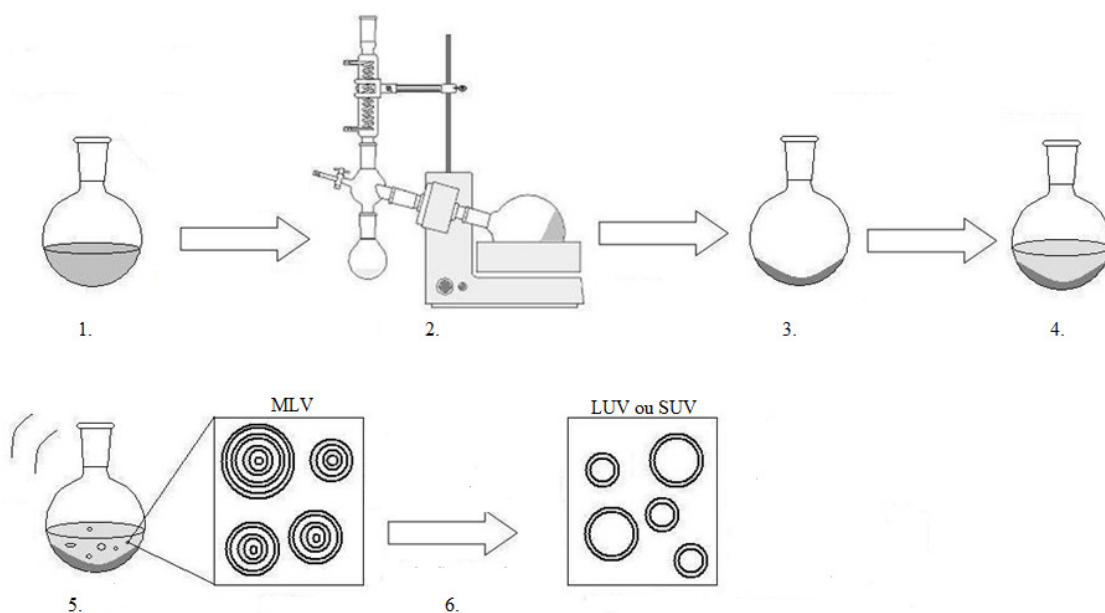


Figura 3.3. – Método de hidratação do filme lipídico [Adaptado de (Lopes *et al.*, 2013)]

Para a obtenção de dispersões homogêneas de LUV ou SUV a partir de dispersões de MLV podem utilizar-se métodos mecânicos, eletrostáticos ou químicos. Os métodos mecânicos são os mais utilizados, nomeadamente a sonicação, a extrusão e o homogeneizador/microfluidificador (Lasic, 1998).

A sonicação, que foi o primeiro método a ser utilizado, pode ser efetuada em banho de água ou com uma sonda de titânio. A força de cavitação resultante faz com que se dê a colisão entre os MLV e a sua divisão em tamanhos menores, originando os LUV ou SUV. Este processo pode ser prejudicial a vários compostos, inclusivé aos lípidos. A utilização do banho de água é o processo menos agressivo, mas requer um tempo mais prolongado de sonicação (Matos, 2001; Matos e Moutinho, 2011).

A extrusão baseia-se na passagem forçada das dispersões de MLV através de filtros de diâmetro de poro bem definido sob pressão de um gás inerte. É necessário realizar várias passagens através do filtro para se homogeneizar o tamanho dos lipossomas. Este processo faz decrescer o número de camadas lipídicas e, normalmente, após 10 passagens pelo filtro, os lipossomas são predominantemente unilamelares. O diâmetro final dos lipossomas está condicionado pelo tamanho de poro do filtro utilizado e pelas características do lípido, sendo difícil conseguir lipossomas com diâmetros inferiores a 50-60 nm (Lasic, 1993; Matos, 2001; Matos e Moutinho, 2011).

Para se utilizar os lipossomas como modelos biomiméticos é necessário que estes sejam bem definidos. Os LUV têm maior interesse prático, uma vez que apresentam uma única membrana e possuem um volume de solução aquosa razoavelmente grande no seu interior, enquanto que os SUV apresentam uma elevada curvatura o que leva a anormalidades no empacotamento dos lípidos, tornando-os muito suscetíveis à degradação na presença de moléculas biológicas (Hope *et al.*, 1985; Matos, 2001).

Coeficiente de Partição

O coeficiente de partição (K) de um soluto é definido como a razão, no equilíbrio, entre as concentrações do soluto em duas fases imiscíveis por entre as quais o soluto pode partilhar (Katz e Diamond, 1974).

O coeficiente de partição é uma constante definida por:

$$K = \frac{C_2}{C_1} \quad (\text{Eq. 1})$$

em que, C_1 e C_2 são as concentrações de qualquer espécie molecular nas duas fases em equilíbrio uma com a outra, desde que os coeficientes de atividade se mantenham constantes. Esta definição assume que não existem interações soluto/soluto significativas nem interações soluto/solvente fortes (Leo *et al.*, 1971).

1. Determinação dos coeficientes de partição lipossoma/água

Como as membranas biológicas, de natureza fosfolipídica, constituem barreiras desde o local de administração do fármaco até ao compartimento plasmático, as características de lipossolubilidade deste são fundamentais para a sua ação terapêutica.

Tradicionalmente, utiliza-se o sistema octanol/água para a determinação do coeficiente de partição (K_{OA}). Os resultados obtidos com este sistema de solventes apresentam uma boa correlação com a capacidade dos compostos atravessarem as biomembranas e, por consequência, com a sua atividade biológica. Esta metodologia é, ainda hoje, aplicada em variadas áreas (Hansch e Dunn, 1972; Leo *et al.*, 1971; Matos *et al.*, 2012).

No entanto, ao longo do tempo, foram-se evidenciando falhas no sistema de partição octanol/água, optando por se realizar a determinação do coeficiente de partição entre

lipossomas e água. Os lipossomas apresentam-se como um modelo mais real de uma membrana biológica devido à sua estrutura em bicamada. Para além disso, o seu manuseamento é mais fácil e reprodutível do que a utilização de células ou tecidos animais (Ferreira *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2005; Matos, 2001; Matos *et al.*, 2012).

Espectrofotometria Derivativa

A espectrofotometria derivativa é uma técnica analítica de grande utilidade em análise quantitativa e qualitativa de espectros compostos por bandas sobrepostas ou distorcidas por interferências (Hager, 1973).

Esta técnica possibilita melhor resolução de sinais espectrais, uma vez que evidencia detalhes espectrais e facilita a determinação de $\lambda_{\text{máx}}$. Permite também a resolução de bandas sobrepostas e o desdobramento dos espectros, bem como facilita a detecção de picos afetados pela presença de impurezas, diminuindo ou anulando interferências espectrais (O'Haver, 1979).

Pode ser usada em espectrofotometria UV/Vis, infravermelho, absorção atômica, emissão em chama e fluorimetria (Rojas *et al.*, 1988).

A desvantagem desta técnica é a diminuição da razão sinal/ruído, mais acentuada com o aumento da ordem de derivação, o que pode ser atenuado com a regularização (“smoothing”) dos espectros derivados (Rojas *et al.*, 1988).

Neste trabalho o uso da espectrofotometria derivativa permitiu a determinação dos coeficientes de partição das porfirinas T973 e T790 entre lipossomas de EPC e o meio aquoso a vários valores de pH.

Materiais e Métodos

1. Materiais e Reagentes

As porfirinas, tetracloreto de *meso-Tetra(4-N,N,N-trimetilanilina)* porfirina (T973) e *meso-Tetra(4-carboxifenil)* porfirina (T790) foram adquiridas à Frontier Scientific (Logan, UT).

A fosfatidilcolina de gema de ovo (EPC) e o Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-etanossulfónico) foram adquiridas à Sigma (St. Louis, MO). A EPC foi adquirida na forma de solução na concentração de 100 mg/mL em clorofórmio/metanol (9:1).

Todos os reagentes foram usados sem qualquer tratamento prévio.

As soluções foram preparadas com tampão Hepes (10 mmol/dm^3 , $I = 0,1 \text{ mol/dm}^3$ (NaCl), pH = 7,4 e pH = 5,8 ajustado com NaOH). O pH das soluções foi controlado com um potenciômetro (inoLab pH Level 1).

Água bidesionizada (condutividade inferior a $0,1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) purificada por sistema Milipore[®] foi utilizada ao longo do trabalho experimental.

2. Preparação dos lipossomas de EPC

Os lipossomas foram preparados pelo método clássico de hidratação do filme lipídico (Bangham e Horne, 1964; Bangham *et al.*, 1965; Lasic, 1988), processo representado na figura 3.3. do capítulo III. A quantidade necessária de EPC foi evaporada à secura num balão de vidro, sob corrente de azoto, em rotação permanente por forma a espalhar a EPC nas paredes do balão o mais fina e homogeneamente possível. Após a secura, o filme lipídico foi pesado e hidratado com o volume de tampão Hepes adequado por forma a obter-se uma concentração final de aproximadamente 5 mmol/dm^3 . Após

hidratação, os MLV foram formados por agitação forte em vortex, em presença de algumas esferas de vidro. Os lipossomas obtidos foram sujeitos ao processo de extrusão por forma a diminuir o seu diâmetro e aumentar a homogeneidade de tamanhos. A extrusão foi efetuada num extrusor (10 mL Lipex™ Thermobarrel Extruder, Northern Lipids, Inc., Vancouver, Canada) em corrente de azoto. Usaram-se filtros de policarbonato de diâmetro de poro de 100 nm (Nucleopore Corp., Pleasanton, CA, USA). Para preparar LUV com diâmetro aproximado de 100 nm, a solução de lipossomas foi extrudida 10 vezes, originando no final uma solução de aspeto mais homogéneo.

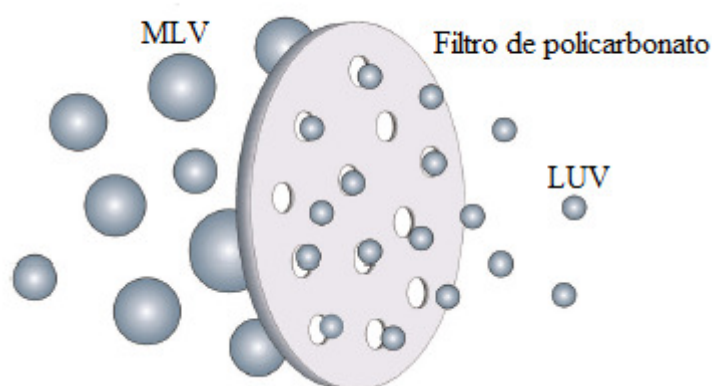


Figura 4.1. – Representação esquemática do processo de extrusão [Adaptado de (Raemdonck *et al.*, 2014)]

3. Condições experimentais

Os coeficientes de partição (K) foram determinados a pH 5,8 e 7,4. A cada valor de pH foram preparadas duas séries de soluções de lipossomas por diluição rigorosa da solução concentrada: uma série de soluções de concentrações crescentes de lipossomas (variando entre 0 e aproximadamente 5 mmol/dm³) sem fármaco adicionado (brancos) e outra série com as mesmas concentrações de lipossomas e uma concentração fixa de porfirina (aproximadamente 3 μmol/dm³). As soluções foram deixadas no escuro e no frigorífico durante 24 horas.

Foram preparadas ‘soluções mãe’ de porfirina a partir da dissolução do fármaco em pó no tampão apropriado ou em etanol.

As porfirinas estudadas apresentam diferenças na sua solubilidade em água: a T973 é hidrossolúvel aos dois valores de pH estudados e a T790 é solúvel em água a pH 7,4 e insolúvel a pH 5,8.

Se a porfirina era solúvel em água, a ‘solução mãe’ era preparada usando tampão Hepes; se era insolúvel em água, a ‘solução mãe’ era preparada em etanol (tendo o cuidado de assegurar que a concentração de etanol na solução final se encontra abaixo de 2%).

Os espectros de absorvância de todas as soluções, registados entre 360 nm e 500 nm, foram obtidos num espectrofotómetro de duplo feixe (Perkin Elmer, Lambda 25), equipado com software UV WinLab V2.85 para aquisição dos dados, em intervalos de 1 nm, utilizando células de quartzo de 1 cm de percurso ótico, a uma velocidade de varrimento de 240 nm/min. Todos os espectros foram obtidos utilizando tampão Hepes no segundo compartimento.

A segunda derivada dos espectros e a sua regularização (“smoothing”) foram calculados matematicamente utilizando o programa computacional Origin[®] 8.5.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

Os coeficientes de partição foram determinados por ajuste de modelos matemáticos (que têm em conta a estequiometria da interação) aos dados experimentais. Este ajuste, efetuado usando o programa Origin[®] 8.5.1, permitiu refinar matematicamente o valor de K.

VII

Resultados

Devido à sua estrutura química única, as porfirinas exibem solvatocromismo quando dissolvidas em solventes com polaridade diferente. Esta característica foi usada neste trabalho para determinar a quantidade de porfirina que passa do meio aquoso para o meio membranar, funcionando os lipossomas como modelo das membranas biológicas.

1. Determinação dos coeficientes de partição da T973

As figuras 5.1. e 5.2. mostram os espectros de absorvância de luz ultravioleta/visível (UV/Vis) obtidos para a T973, em tampão HEPES a pH 7,4 e a pH 5,8, respectivamente, na presença de lipossomas de EPC em concentração crescente.

Na figura 5.1. verifica-se um aumento na intensidade de absorvância da porfirina à medida que aumenta a concentração de lipossomas.

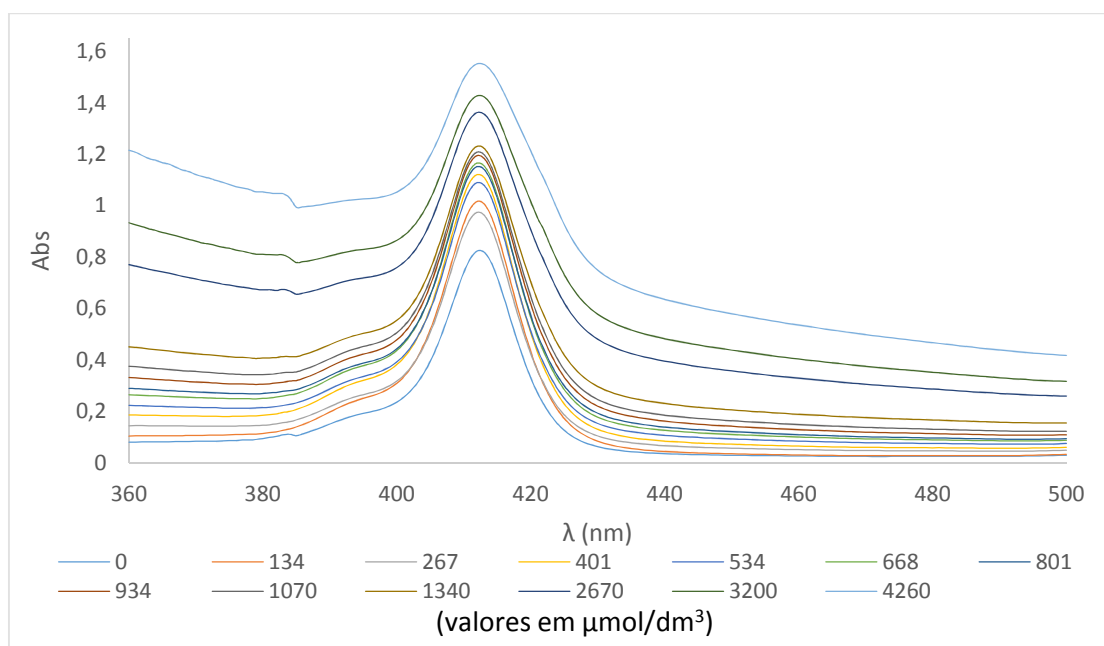


Figura 5.1. – Espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão HEPES, pH 7,4, na ausência e na presença de lipossomas

Na figura 5.2. verifica-se uma diminuição na intensidade de absorvância até à concentração de lipossomas de $912 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$ e um aumento na intensidade de absorvância para concentrações de lipossomas superiores.

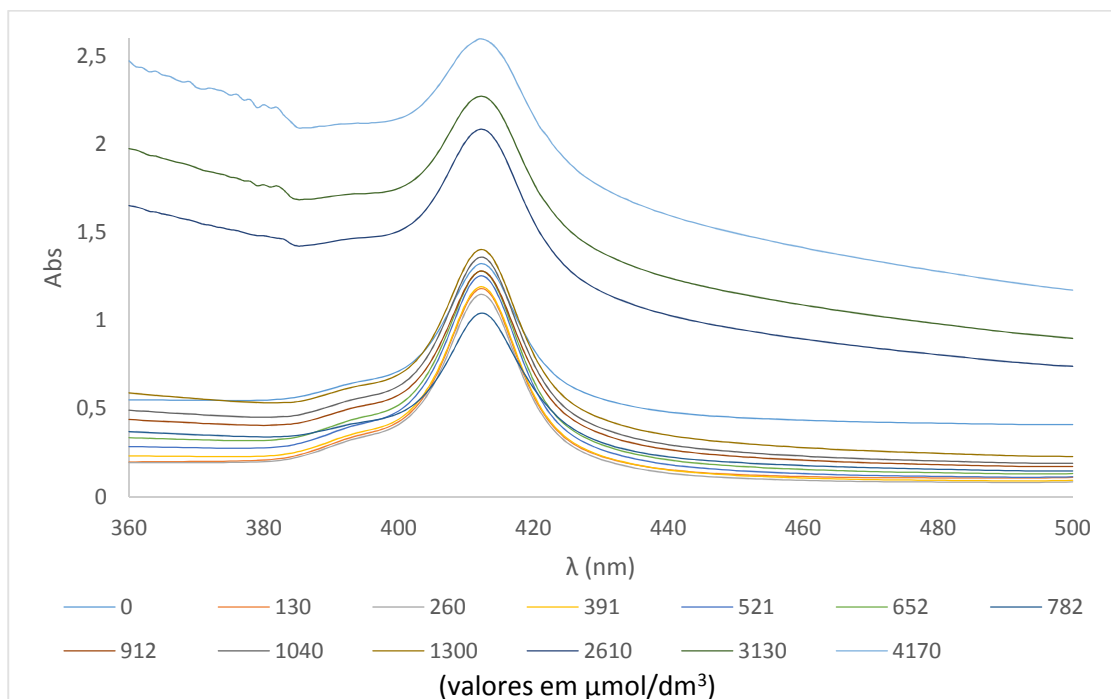


Figura 5.2. - Espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão HEPES, pH 5,8, na ausência e na presença de lipossomas

As figuras 5.3. e 5.4. mostram a segunda derivada dos espectros de absorvância da T973 a pH 7,4 (figura 5.3.) e a pH 5,8 (figura 5.4.) em soluções contendo concentrações crescentes de lipossomas, evidenciando-se as mesmas características espectrais observáveis nos espectros de ordem zero.

Na segunda derivada dos espectros, o $\lambda_{\text{máx}}$ (424 nm) desloca-se até cerca de 2-3 nm para valores superiores com o incremento da concentração de lipossomas (desvio batocrômico), à medida que a fração molar de fármaco ligado aumenta. Os desvios para o vermelho são geralmente indicativos da diminuição da polaridade do meio envolvente da molécula. A presença de pontos isobésticos são indicativos de que a porfirina em estudo se encontra na solução em pelo menos duas formas espectralmente distintas, a forma livre e a forma ligada (Castro *et al.*, 2001; Kitamura e Imayoshi, 1992; Kitamura *et al.*, 1995; Matos, 2001; Matos *et al.*, 2012; Omran *et al.*, 2001).

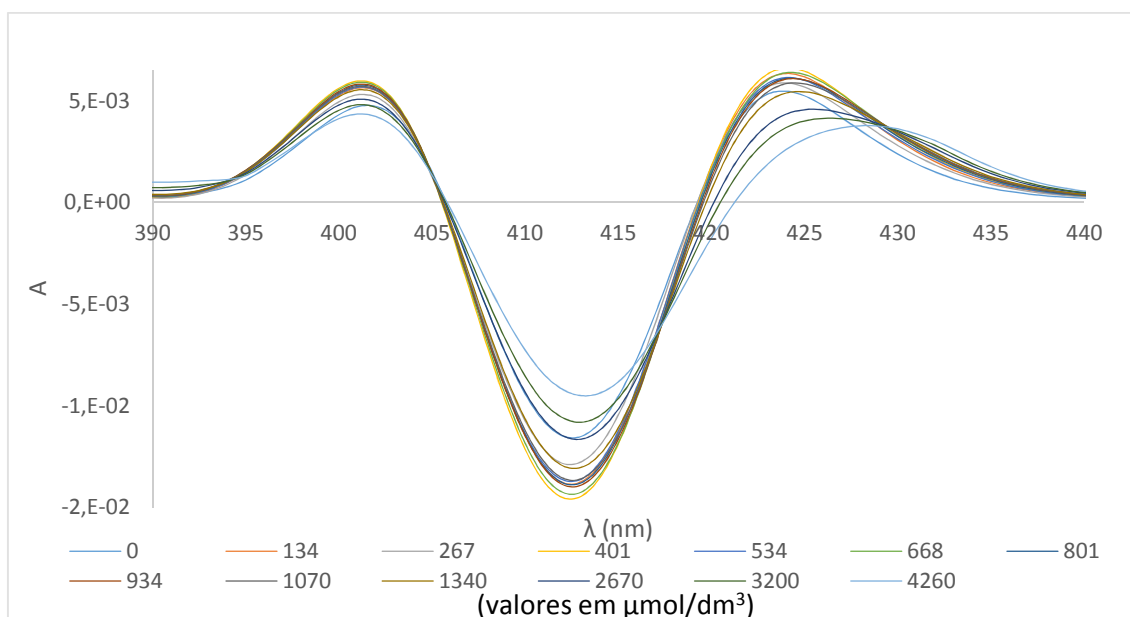


Figura 5.3. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão HEPES, pH 7,4, na ausência e na presença de lipossomas

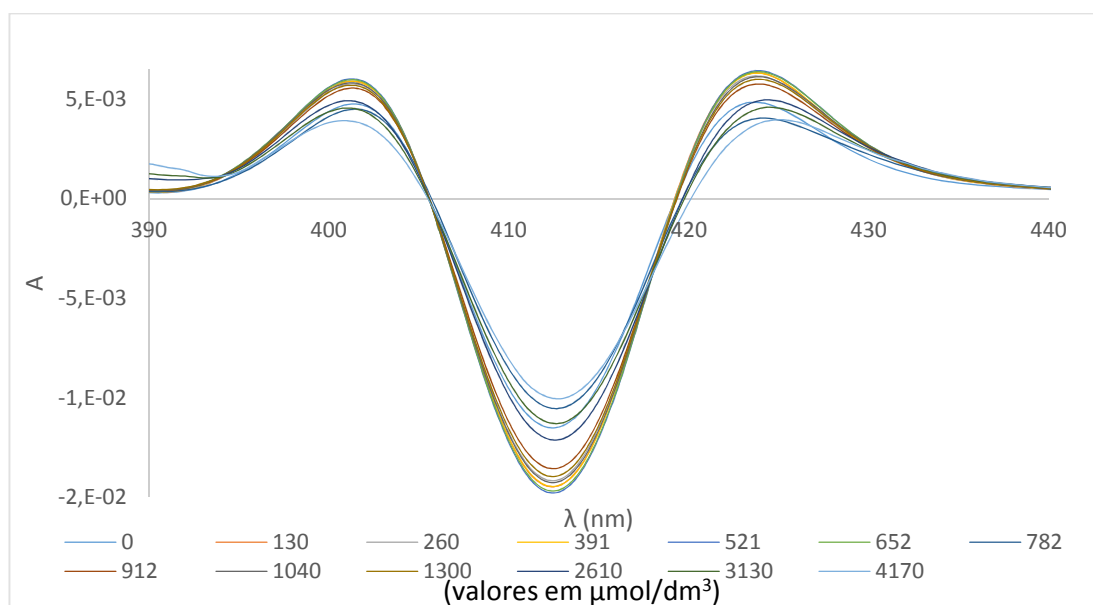


Figura 5.4. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T973 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão HEPES, pH 5,8, na ausência e na presença de lipossomas

A utilização da derivada dos espectros fornece uma representação mais limpa, diminui as interferências e enfatiza as características espectrais. A sua utilização evita a necessidade de subtração dos brancos, uma vez que o mesmo tratamento matemático aplicado aos espectros dos brancos resulta na sua anulação nas zonas espectrais onde se trabalhou (figuras 5.5. e 5.6.).

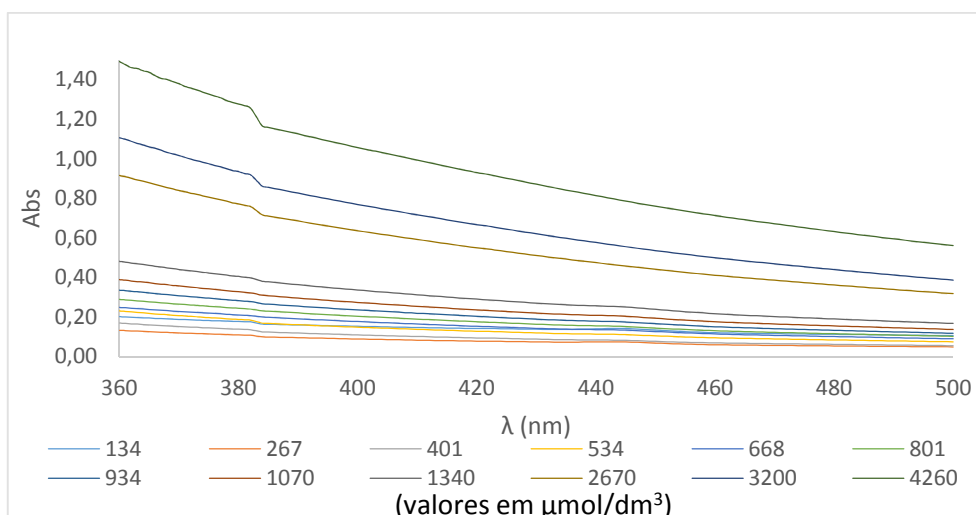


Figura 5.5. – Espectros de absorvância de soluções contendo lipossomas de EPC, a pH 7,4

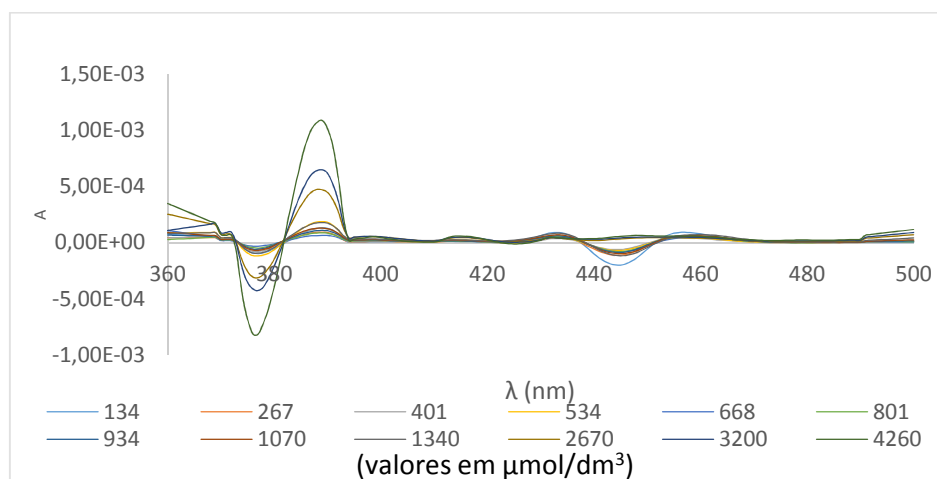


Figura 5.6. – Segunda derivada dos espectros de absorvância de soluções contendo lipossomas de EPC, a pH 7,4

Os resultados da T973 em tampão Hepes, a pH 7,4 mostram que a curva A (correspondente à segunda derivada da absorvância) versus [L] (concentração de lipossomas de EPC) tem uma forma hiperbólica, tendendo para um mínimo que corresponde à absorvância de uma solução em que 100% da T973 se encontra ligada aos lipossomas (ver figura 5.7.). A derivada da intensidade da absorvância pode ser relacionada com o coeficiente de partição através da seguinte expressão (Castro *et al.*, 2001; Matos, 2001; Matos *et al.*, 2012):

$$A_t = \frac{A_w + A_{m1}K[L]}{1+K[L]} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde A_t , A_{m1} e A_w são a derivada da intensidade da absorvância total (solução de porfirina contendo os lipossomas), a derivada da intensidade da absorvância calculada quando toda a porfirina está a interagir com a membrana e a derivada da intensidade da absorvância da solução da porfirina sem lípido, respetivamente, K é o coeficiente de partição e $[L]$ é a concentração de lipossomas de EPC. Esta expressão diz respeito a uma estequiometria de 1:1 entre a T973 e os lipossomas de EPC.

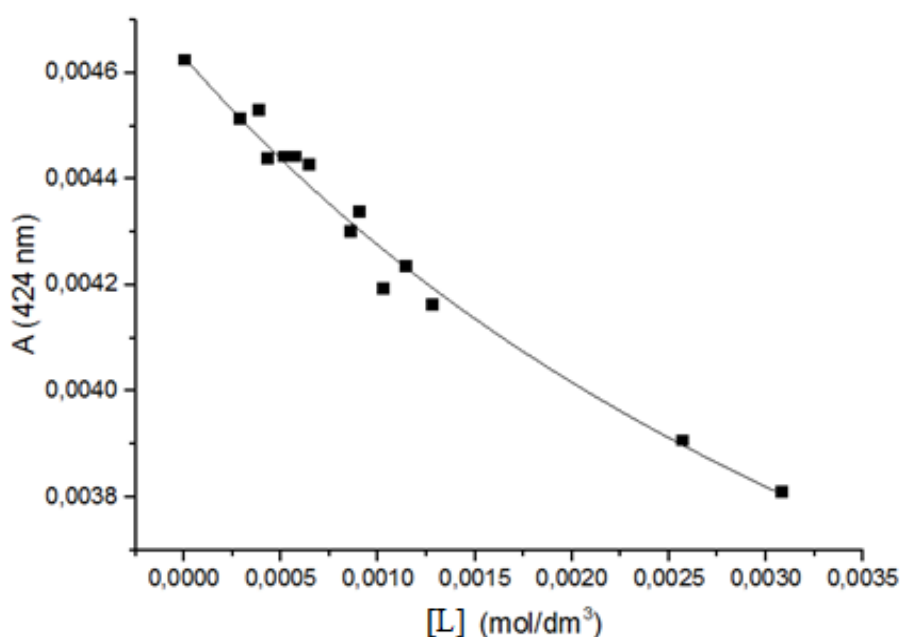


Figura 5.7. – Ajuste do modelo matemático, equação 2, usando os valores da derivada da intensidade de absorvância a 424 nm da T973 em tampão HEPES, pH 7,4

Os resultados da T973 em tampão HEPES, a pH 5,8 mostram que a curva A versus $[L]$ apresenta um tipo de interação diferente daquela que foi observada a pH 7,4 (ver figura 5.8.). Claramente, há uma alteração da interação à medida que a concentração de lipossomas de EPC aumenta. Para se proceder ao ajuste matemático destes resultados, utilizou-se um modelo matemático que engloba duas constantes de interação, K_1 e K_2 , e que é muito utilizado para determinar a interação de porfirinas com ciclodextrinas (Hamai, 2010; Hamai e Ohshida, 2004; Tablet *et al.*, 2012):

$$At = \frac{A_w + A_{m1}K_1[L] + A_{m2}K_1K_2[L]^2}{1 + K_1[L] + K_1K_2[L]^2} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde A_t , A_{m1} , A_{m2} e A_w são a derivada da intensidade da absorvância total (solução de porfirina contendo os lipossomas), a derivada da intensidade da absorvância calculada quando a porfirina está a interagir com a membrana na estequiometria de 1:1, a derivada de intensidade de absorvância calculada quando a porfirina está a interagir com a membrana na estequiometria de 1:2 e a derivada da intensidade da absorvância da solução da porfirina sem lípido, respetivamente, K_1 é o coeficiente de partição quando a porfirina interage com a membrana na estequiometria de 1:1, K_2 é o coeficiente de partição quando a porfirina interage com a membrana na estequiometria de 1:2 e $[L]$ é a concentração de lipossomas de EPC. Esta expressão diz respeito a uma estequiometria de 1:1 + 1:2 entre a T973 e os lipossomas de EPC.

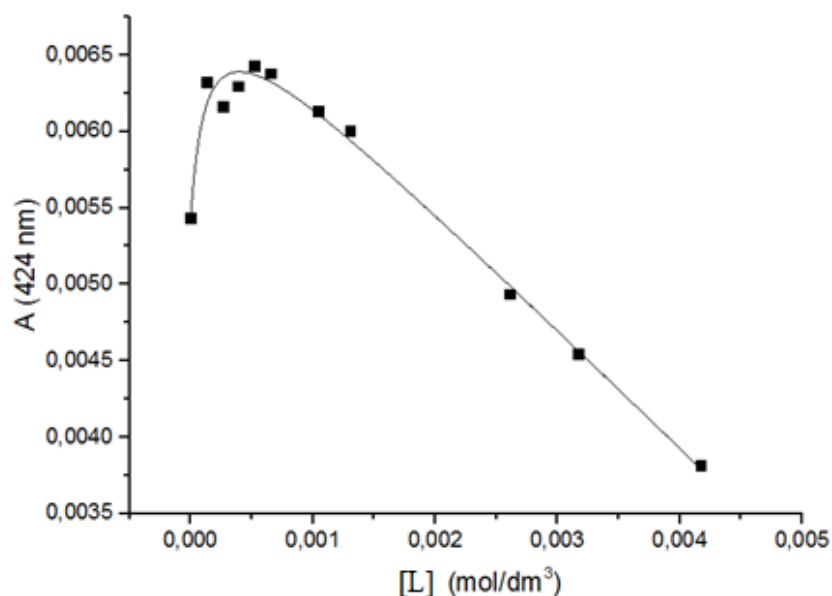


Figura 5.8. – Ajuste do modelo matemático, equação 3, usando os valores da derivada da intensidade de absorvância a 424 nm da T973 em tampão Hepes, pH 5,8

Os valores dos coeficientes de partição da T973 utilizando lipossomas de EPC como modelo biomimético a valores de pH dos tecidos normais (7,4) e tumorais (5,8), determinados por ajuste matemático dos modelos propostos anteriormente usando o programa computacional Origin[®] 8.5.1, estão na tabela 2. Os resultados são a média e o desvio padrão de pelo menos duas experiências independentes, com resultados obtidos a

partir dos valores de absorvância da segunda derivada dos espectros, a 402 nm, 412 nm e 424 nm

Tabela 2 – Valores dos coeficientes de partição (K) da T973 determinados entre tampão Hepes (pH 7,4 e 5,8) e lipossomas de EPC obtidos por espectrofotometria derivativa utilizando diferentes modelos matemáticos

| | pH = 7,4 | | pH = 5,8 | |
|------|--------------------------|----------------|--|----------------|
| | K (dm ³ /mol) | Estequiometria | K (dm ³ /mol) | Estequiometria |
| T973 | 174 ± 36 | 1:1 | K ₁ = 8430 ± 1644 K ₂ = 0,70 ± 1,43 | 1:1 + 1:2 |

2. Determinação dos coeficientes de partição da T790

As figuras 5.9. e 5.10. mostram os espectros de absorvância UV/Vis obtidos para a T790, em tampão Hepes a pH 7,4 e a pH 5,8, respectivamente, na presença de lipossomas de EPC em concentração crescente.

Nas figuras 5.9. e 5.10. verifica-se um aumento na intensidade de absorvância da porfirina à medida que aumenta a concentração de lipossomas.

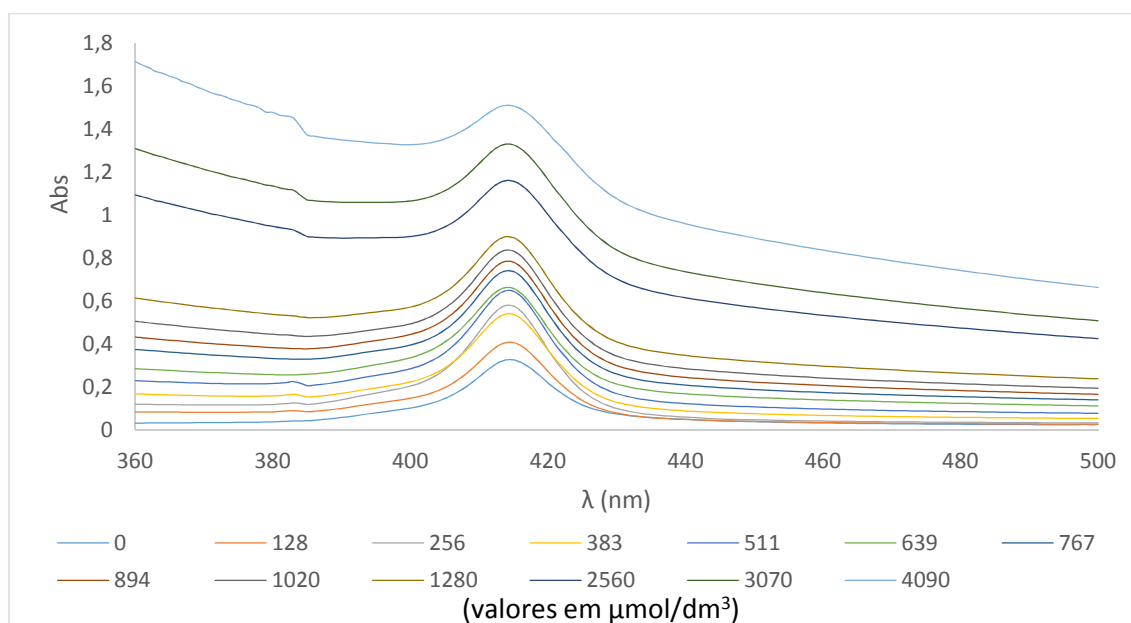


Figura 5.9. – Espectros de absorvância da T790 (de concentração ≈ 3 μmol/dm³) em tampão Hepes, pH 7,4, na ausência e na presença de lipossomas

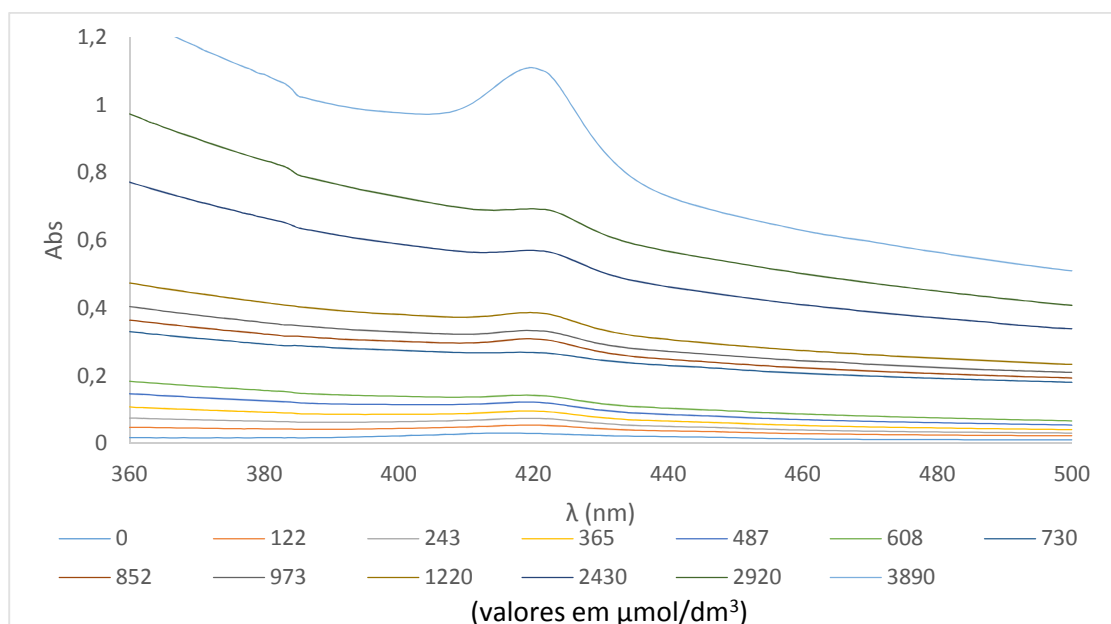


Figura 5.10. – Espectros de absorvância da T790 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão HEPES, pH 5,8, na ausência e na presença de lipossomas

As figuras 5.11. e 5.12. mostram a segunda derivada dos espectros de absorvância da T790 a pH 7,4 (figura 5.11.) e a pH 5,8 (figura 5.12.) em soluções contendo concentrações crescentes de lipossomas, evidenciando-se as mesmas características espectrais observáveis nos espectros de ordem zero.

Na segunda derivada dos espectros a pH 7,4, o $\lambda_{\text{máx}}$ (427 nm) desloca-se até cerca de 2-3 nm para valores superiores com o incremento da concentração de lipossomas (desvio batocrômico), à medida que a fração molar de fármaco ligado aumenta. Os desvios para o vermelho são geralmente indicativos da diminuição da polaridade do meio envolvente da molécula. A presença de pontos isobésticos são indicativos de que a porfirina em estudo se encontra na solução em pelo menos duas formas espectralmente distintas, a forma livre e a forma ligada (Castro *et al.*, 2001; Kitamura e Imayoshi, 1992; Kitamura *et al.*, 1995; Matos, 2001; Matos *et al.*, 2012; Omran *et al.*, 2001).

Tal como referido anteriormente, a utilização da derivada dos espectros fornece uma representação mais limpa, diminui as interferências e enfatiza as características espectrais. A sua utilização evita a necessidade de subtração dos brancos, uma vez que o mesmo tratamento matemático aplicado aos espectros dos brancos resulta na sua anulação nas zonas espectrais onde se trabalhou.

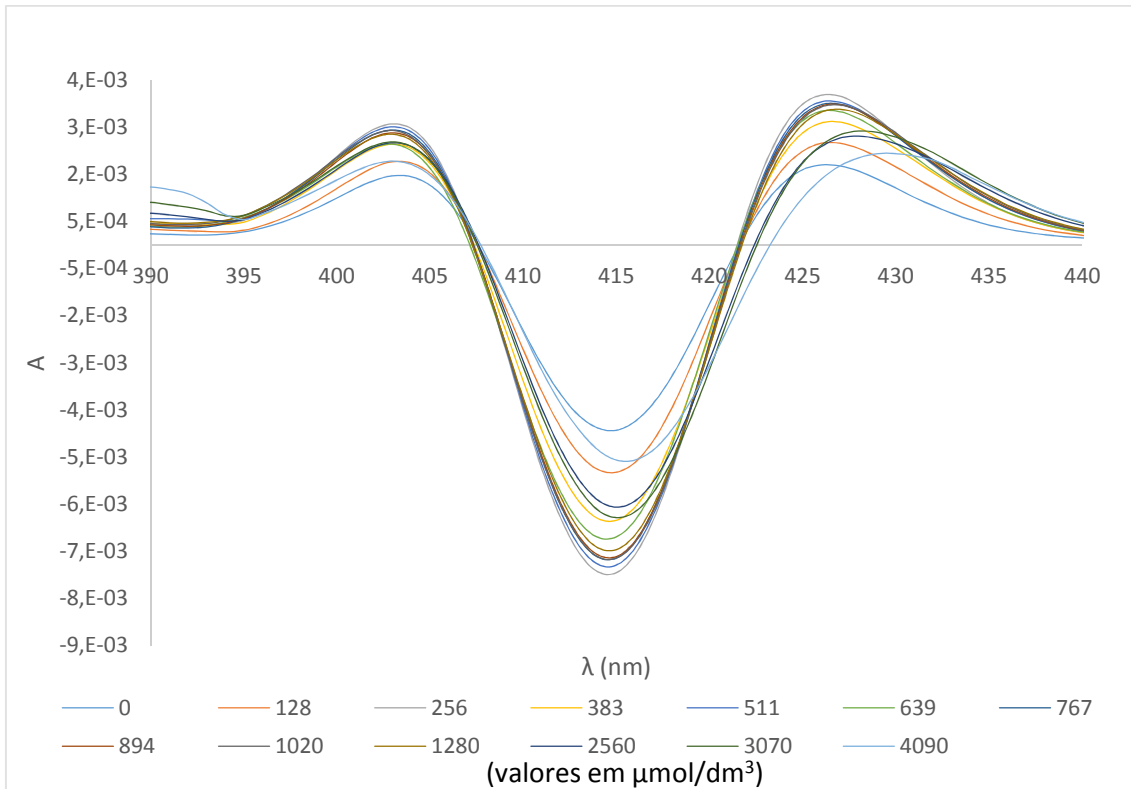


Figura 5.11. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T790 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 7,4, na ausência e na presença de lipossomas

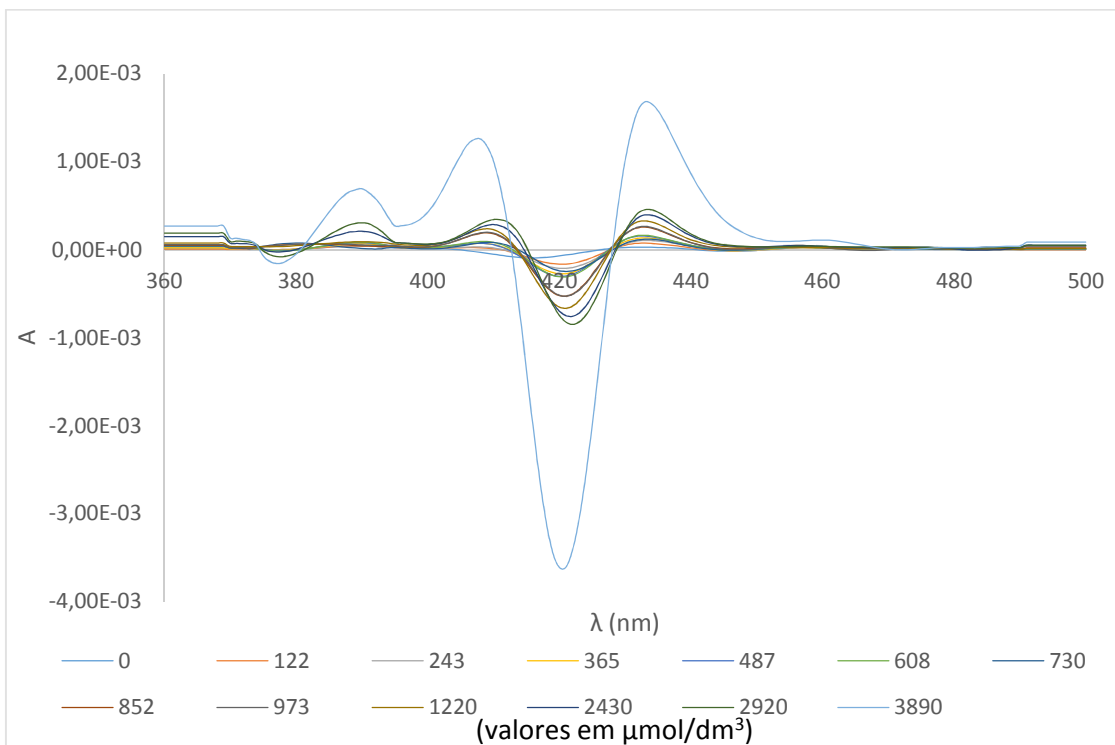


Figura 5.12. – Segunda derivada dos espectros de absorvância da T790 (de concentração $\approx 3 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$) em tampão Hepes, pH 5,8, na ausência e na presença de lipossomas

O coeficiente de partição da T790 a pH 7,4 foi determinado por ajuste do modelo matemático representado pela equação 3 (figura 5.13.), verificando-se uma estequiometria de 1:1 + 1:2 entre a T790 e os lipossomas de EPC.

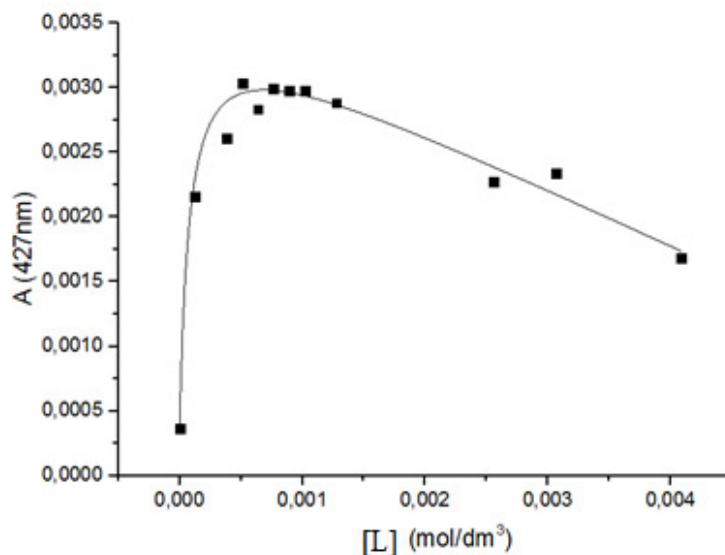


Figura 5.13. – Ajuste do modelo matemático, equação 3, usando os valores da derivada da intensidade de absorvância a 427 nm da T790 em tampão Hepes, pH 7,4

O coeficiente de partição da T790 a pH 5,8 foi determinado por ajuste do modelo matemático representado pela equação 2 (figura 5.14.), verificando-se uma estequiometria de 1:1 entre a T790 e os lipossomas de EPC.

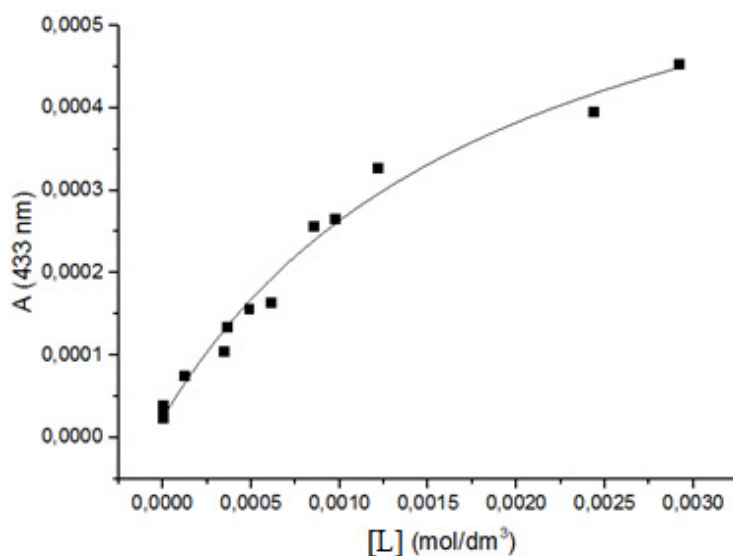


Figura 5.14. – Ajuste do modelo matemático, equação 2, usando os valores da derivada da intensidade de absorvância a 433 nm da T790 em tampão Hepes, pH 5,8

Os valores dos coeficientes de partição da T973 utilizando lipossomas de EPC como modelo biomimético a valores de pH dos tecidos normais (7,4) e tumorais (5,8), determinados por ajuste matemático dos modelos propostos anteriormente usando o programa computacional Origin® 8.5.1, estão na tabela 3. Os resultados são a média e o desvio padrão de pelo menos duas experiências independentes, com resultados obtidos a partir dos valores de absorvância da segunda derivada dos espectros, a 403 nm, 415 nm e 427 nm a pH 7,4 e 411 nm, 422 nm e 433 nm a pH 5,8.

Tabela 3 – Valores dos coeficientes de partição (K) da T790 determinados entre tampão Hepes (pH 7,4 e 5,8) e lipossomas de EPC obtidos por espectrofotometria derivativa utilizando diferentes modelos matemáticos

| | pH =7,4 | | pH = 5,8 | |
|------|--|----------------|--------------------------|----------------|
| | K (dm ³ /mol) | Estequiometria | K (dm ³ /mol) | Estequiometria |
| T790 | K ₁ = 13191 ± 2848 K ₂ = 882 ± 90 | 1:1 + 1:2 | 431 ± 80 | 1:1 |

VIII

Discussão dos Resultados

As porfirinas são compostos com elevado potencial de utilização como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica. A captura e/ou a retenção dos fotossensibilizadores pelas células ou tecidos alvo são fatores cruciais para a sua eficácia.

Um fator importante para a maior retenção das porfirinas nas células neoplásicas são os baixos valores de pH da matriz intersticial do tumor relativamente ao tecido normal.

Os valores de pH dos tumores variam entre 5,8 e 7,4, devido ao metabolismo anaeróbio e à produção de ácido láctico. Esta produção é maior nas células tumorais devido a uma alteração no mecanismo respiratório das células, provocando uma diminuição do pH (Tannock e Rotin, 1989). Este gradiente de pH entre o plasma e o tecido tumoral promove a captura seletiva de fármacos ácidos, uma vez que a protonação diminui a carga molecular global e aumenta a sua lipossolubilidade.

Tem sido descrito que as porfirinas se difundem facilmente pela membrana: numa primeira fase por difusão simples e, numa segunda fase, devido às interações hidrofóbicas com as caudas dos lípidos (Man *et al.*, 2011).

Neste trabalho, estudou-se a interação de duas porfirinas com os lipossomas: a T973 que é catiónica e a T790 que é aniónica. Os resultados mostram a existência de interação de ambas as moléculas com os lipossomas.

A solubilidade e a protonação destes compostos foi descrita por Sobczyński *et al* (2013). A T973 é hidrossolúvel aos dois valores de pH estudados e possui quatro substituintes trimetilamónio o que leva a que a molécula esteja carregada positivamente a todos os valores de pH, apresentando-se sempre na forma de catião. A protonação dos azotos imina pode acontecer, mas como os valores de pKa são de 2,3 e 3,6 é de prever

que estes grupos não estejam carregados nem a pH 5,8 nem a pH 7,4. Como o logD desta molécula é de -4,5 a pH 7, esta dissolve-se bem em água. Não foi observada agregação desta molécula por avaliação espectrofotométrica por estes autores, o que é esperado devido à carga positiva permanente e consequente repulsão eletrostática intermolecular (Sobczyński *et al.*, 2013).

A T790 é solúvel em água a pH 7,4 e insolúvel a pH 5,8. Possui quatro substituintes ácido carboxílico, com pKa de 4,2, e dois grupos imina com pKa de 6 e 6,6. A pH 7,4 é de prever que esta molécula esteja principalmente carregada negativamente (com carga 4-), enquanto que a pH 5,8 metade das moléculas podem apresentar uma ou duas cargas positivas adicionais. Há uma marcada alteração na lipofilia deste composto com a variação de pH, logD = 7,2 a pH 4 e logD = -3,8 a pH 8, daí a porfirina ser insolúvel em água a pH 5,8 e hidrossolúvel a pH 7,4 (Sobczyński *et al.*, 2013). Esta alteração parece ser devida às atrações entre as cargas negativas dos grupos periféricos e as cargas positivas do núcleo da porfirina que conduz à agregação desta molécula a pH 5,8, diminuindo a sua solubilidade e absorvância.

A interação da T973 com os lipossomas a pH 7,4 revela uma estequiometria de 1:1 e a pH 5,8 uma estequiometria de 1:1 + 1:2. Por sua vez, a interação entre a T790 e os lipossomas revela uma estequiometria de 1:1 + 1:2 a pH 7,4 e de 1:1 a pH 5,8.

A pH 7,4, verifica-se que o coeficiente de partição da T790 ($K_1 = 13191 \pm 2848 \text{ dm}^3/\text{mol}$ e $K_2 = 882 \pm 90 \text{ dm}^3/\text{mol}$) é superior ao da T973 ($K = 174 \pm 36 \text{ dm}^3/\text{mol}$).

A pH 5,8, verifica-se que o coeficiente de partição da T973 ($K_1 = 8430 \pm 1644 \text{ dm}^3/\text{mol}$ e $K_2 = 0,70 \pm 1,43 \text{ dm}^3/\text{mol}$) é superior ao da T790 ($K = 431 \pm 80 \text{ dm}^3/\text{mol}$).

Apesar dos comportamentos das duas moléculas serem diferentes e os modelos matemáticos utilizados também serem diferentes, a pH 7,4 parece haver uma maior partição com a membrana por parte da molécula T790 e a pH 5,8 a interação com os lipossomas parece ser superior para a molécula T973.

Estes resultados parecem apontar para a existência de uma maior interação entre a T973 e o tecido tumoral. Com base nestes resultados, a T973 apresenta-se como um promissor agente fotossensibilizador, uma vez que é solúvel no valor de pH plasmático e interage de forma forte com a membrana nos valores de pH que são normalmente apresentados pelos tumores. No entanto, é necessário a realização de mais estudos para se puderem comprovar estes resultados.

Conclusão

Este estudo experimental pretendeu determinar os coeficientes de partição (K) de duas porfirinas, tetracloreto de *meso-Tetra(4-N,N,N-trimetilanilina)* porfirina (T973) e *meso-Tetra(4-carboxifenil)* porfirina (T790), com um modelo de membrana: lipossomas de EPC por espectrofotometria derivativa, a dois valores diferentes de pH: 7,4 e 5,8 para mimetizar as condições *in vivo*, plasma e tecido tumoral, respetivamente e selecionar entre uma porfirina catiónica (T973) e uma aniónica (T790), a melhor candidata para ser seletivamente capturada por tumores acídicos e poder, eventualmente, ser utilizada como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica.

Os lipossomas de EPC foram utilizados como modelos biomiméticos para determinar o coeficiente de partição membrana/água, um parâmetro que influencia a concentração de porfirina no tecido tumoral. A alteração de pH em alguns tecidos tumorais, que afeta o equilíbrio de concentrações de várias espécies ácido-base, influencia significativamente a interação das porfirinas com as membranas e a capacidade de estas as atravessarem.

Os resultados parecem apontar para a existência de uma maior interação entre a T973 e o tecido tumoral. Com base nestes resultados, a T973 apresenta-se como um promissor agente fotossensibilizador, uma vez que é solúvel no valor de pH plasmático e interage de forma forte com a membrana nos valores de pH que são normalmente apresentados pelos tumores. No entanto, é necessário a realização de mais estudos para se puderem comprovar estes resultados.

Bibliografia

Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., *et al.* (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, pp. 27-42.

Bangham, A. D. e Horne, R. W. (1964). Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of Molecular Biology*, 8, pp. 660-670.

Bangham, A. D., Standish, M. M. e Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13, pp. 238-252.

Bastos, M. M., Boechat, N., Gomes, A. T. P. C., *et al.* (2012). O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. *Rev. Virtual Quim.*, 4(3), pp. 257-267.

Bonnett, R. e Martínez, G. (2001). Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 57, pp. 9513-9547.

Castano, A. P., Demidova, T. N. e Hamblin, M. R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1, pp. 279-293.

Castro, B., Gameiro, P., Lima, J. F. C., *et al.* (2001). A Fast and reliable spectroscopic method for the determination of membrane-water partition coefficients of organic compounds. *Lipids*, 36, pp. 89-96.

Dolmans, D. E. J. G. J., Fukumura, D. e Jain, R. K. (2003). Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, 3, pp. 380-387.

El Maghraby, G. M., Barry, B. W. e Williams, A. C. (2008). Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci*, 34, pp. 203-222.

Encyclopædia Britannica Inc. (2015). Liposome.[**Em linha**]. **Disponível em** <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/342910/liposome> [**Consultado em 12/02/2015**]

Esteves, F., Moutinho, C. e Matos, C. (2013). Correlation between octanol/water and liposome/water distribution coefficients and drug absorption of a set of pharmacologically active compounds. *Journal of Liposome Research*, 23, pp. 83-93.

Ethirajan, M., Chen, Y., Joshi, P., *et al.* (2011). The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 40, pp. 340-362.

Ferreira, H., Lúcio, M., De Castro, B., *et al.* (2003). Partition and location of nimesulide in EPC liposomes: a spectrophotometric and fluorescence study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, pp. 293-298.

Ferreira, H., Lúcio, M., Lima, J. L. F. C., *et al.* (2005). Interaction of clonixin with EPC liposomes used as membrane models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, pp. 1277-1287.

Florindo, C., Araújo, J. M. M., Alves, F., *et al.* (2013). Evaluation of solubility and partition properties of ampicillin-based ionic liquids. *International Journal of Pharmaceutics*, 456, pp. 553-559.

Frontier Scientific [**Em linha**]. **Disponível em** <http://frontiersci.com/default.html> [**Consultado em 29/01/2015**]

Hager, R. N. (1973). Derivative spectroscopy with emphasis on trace gas analysis. *Analytical Chemistry*, 45, pp. 1131A-1138a.

Hamai, S. (2010). Complex formation of tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin with γ -cyclodextrin, phenylalanine, and tryptophan in aqueous solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 67, pp. 471-481.

Hamai, S. e Ohshida, T. (2004). Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin and Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin in Aqueous Solutions. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*, 50, pp. 209-217.

Hansch, C. e Dunn, W. J. (1972). Linear Relationships between Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs. *J. Pharm. Sci.*, 61, pp. 1-19.

Hope, M. J., Bally, M. B., Webb, G., *et al.* (1985). Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential. *Biochim Biophys Acta*, 812, pp. 55-65.

Hudson, R., Carcenac, M., Smith, K., *et al.* (2005). The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate–monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy. *British Journal of Cancer*, 92, pp. 1442-1449.

Jori, G. (1996). Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36, pp. 87-93.

Josefsen, L. B. e Boyle, R. W. (2012). Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics. *Theranostics*, 2, pp. 916-966.

Katz, Y. e Diamond, J. M. (1974). A Method for Measuring Nonelectrolytes Partition Coefficients between Liposomes and Water. *J. Membrane Biol.*, 17, pp. 69-86.

Kitamura, K. e Imayoshi, N. (1992). Second-Derivative Spectrophotometric Determination of the Binding Constant between Chlorpromazine and β -Cyclodextrin in Aqueous Solutions. *Analytical Sciences*, 8, pp. 497-501.

Kitamura, K., Imayoshi, N., Goto, T., *et al.* (1995). Second derivative spectrophotometric determination of partition coefficients of chlorpromazine and promazine between lecithin bilayer vesicles and water. *Analytica Chimica Acta*, 304, pp. 101-106.

Lasic, D. (1988). The mechanism of vesicle formation. *Biochem. J.*, 256, pp. 1-11.

Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from Physics to Applications*, Elsevier, Amsterdam.

Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends Biotechnol*, 16, pp. 307-321.

Leo, A., Hansch, C. e Elkins, D. (1971). Partition coefficients and their uses. *Chem Rev*, 71 (6), pp. 525-552.

Lopes, S. C. D. A., Giuberti, C. D. S., Rocha, T. G. R., *et al.* (2013). Lipossomas as Carriers of Anticancer Drugs. In: Rangel, L. (Ed.) *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches*. InTech. [Em linha]. Disponível em <http://www.intechopen.com/books/cancer-treatment-conventional-and-innovative-approaches/liposomes-as-carriers-of-anticancer-drugs> [Consultado em 19/02/2015]

Machado, A. E. H. (2000). Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. *Química Nova*, 23(2), pp. 237-243.

Malatesti, N., Smith, K., Savoie, H., *et al.* (2006). Synthesis and in vitro investigation of cationic 5,15-diphenyl porphyrin-monoclonal antibody conjugates as targeted photodynamic sensitizers. *Int J Oncol.*, 28, pp. 1561-1569.

Man, D., Słota, R., Broda, M., *et al.* (2011). Metalloporphyrin intercalation in liposome membranes: ESR study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 16, pp. 173-181.

Matos, C. (2001). *Interação de Fármacos com Lipossomas - Efeito nas propriedades físico-químicas*, Porto, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Matos, C. e Moutinho, C. (2011). Lipossomas. *In: Souto, E. B. e Lopes, C. M. (Eds.) Novas Formas Farmacêuticas para Administração de Fármacos*. Porto, Edições Universidade Fernando Pessoa, pp.237-264

Matos, C., Moutinho, C. e Lobão, P. (2012). Liposomes as a Model for the Biological Membrane: Studies on Daunorubicin Bilayer Interaction. *The Journal of Membrane Biology*, 245, pp. 69-75.

Milgrom, L. R. (1997). *The Colours of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford, Oxford University Press.

Mishra, G. P., Bagui, M., Tamboli, V., *et al.* (2011). Recent applications of liposomes in ophthalmic drug delivery. *J. Drug Deliv.*, 2011:863734.

Mojzisova, H., Bonneau, S., Vever-Bizet, C., *et al.* (2007). The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: A physico-chemical approach. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768, pp. 366-374.

Neto, D. S. e Tabak, M. (2012). Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 381, pp. 73-82.

Nyman, E. S. e Hynninen, P. H. (2004). Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 73, pp. 1-28.

O'Haver, T. C. (1979). Derivative and wavelength modulation spectrometry. *Analytical Chemistry*, 51, pp. 91A-99A.

Omran, A. A., Kitamura, K., Takegami, S., *et al.* (2001). Determination of partition coefficients of diazepam and flurazepam between phosphatidylcholine bilayer vesicles and water by second derivative spectrophotometric method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, pp. 319-324.

Perussi, J. R. (2007). Inativação fotodinâmica de microorganismos. *Quim. Nova*, 30 (4), pp. 988-994.

Raemdonck, K., Braeckmans, K., Demeester, J., *et al.* (2014). Merging the best of both worlds: hybrid lipid-enveloped matrix nanocomposites in drug delivery. *Chemical Society Reviews*, 43, pp. 444-472.

Rojas, F. S., Ojeda, C. B. e Pavon, J. M. C. (1988). Derivative ultraviolet—visible region absorption spectrophotometry and its analytical applications. *Talanta*, 35, pp. 753-761.

Sagir, T., Gencer, S., Kemikli, N., *et al.* (2012). Photodynamic activities of protoporphyrin IX and its dopamine conjugate against cancer and bacterial cell viability. *Medicinal Chemistry Research*, 21, pp. 4499-4505.

Sharman, W. M., Allen, C. M. e Van Lier, J. E. (1999). Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discovery Today*, 4, pp. 507-517.

Simplicio, F. I., Maionchi, F. e Hioka, N. (2002). Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos *Química Nova*, 25(5), pp. 801-807.

Sobczyński, J., Tønnesen, H. H. e Kristensen, S. (2013). Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related meso-porphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, pp. 100-109.

Sternberg, E. D., Dolphin, D. e Brückner, C. (1998). Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron*, 54, pp. 4151-4202.

Svenson, S. (2014). What nanomedicine in the clinic right now really forms nanoparticles? *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.*, 6 (2), pp. 125-135.

Tablet, C., Matei, J. e Hillebrand, M. (2012). The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations In: Innocenti, A. (Ed.) *Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine*. InTech. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.intechopen.com/books/stoichiometry-and-research-the-importance-of-quantity-in-biomedicine/-the-determination-of-the-stoichiometry-of-cyclodextrin-inclusion-complexes-by-spectral-methods-poss> **[Consultado em 02/10/2014]**

Tannock, I. F. e Rotin, D. (1989). Acid pH in Tumors and its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer Res.*, 49, pp. 4373-4384.

Zhang, S., Yang, L., Huo, D., *et al.* (2012). Molecular interactions of dimethyl methylphosphonate (DMMP) with metalloporphyrins: Determination of the binding mechanism by spectroscopic methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 88, pp. 137-143.

Zheltukhina, G. A., Okorochenkova, S. A., Groza, N. V., *et al.* (2012). Synthesis and antifungal properties of arginine-containing hemin derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, 21, pp. 3876-3884.

**PORPHYRIN INTERACTION WITH THE MEMBRANE: THE USE OF
MEMBRANE MODELS TO ELICIT THE DIVERSE PARTITION IN NORMAL
AND NEOPLASTIC TISSUE.**

Carla Matos¹, Cláudia Ribeiro², Lúcia R. Gomes^{1,3}

1-CEBIMED/FP-ENAS- Fernando Pessoa Energy, Environment and Health Research Unit, Rua Carlos da Maia, 296, P-4200-150 Porto, Portugal

2-Faculdade de Ciências de Saúde, Escola Superior de Saúde da UFP, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296, P-4200-150 Porto, Portugal

3-REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, P-4169-007 Porto, Portugal

Corresponding author:

Carla Matos, PhD

CEBIMED/FP-ENAS, Faculdade de Ciências de Saúde, Escola Superior de Saúde da UFP, Universidade Fernando Pessoa, Rua Carlos da Maia, 296, P-4200-150 Porto, Portugal; E-mail: cmatos@ufp.edu.pt

ABSTRACT

This work presents a comparative study of the interaction of three porphyrins: the cationic meso-Tetra(4-N,N,N-trimethylanilinium) porphine tetrachloride (T973); the anionic meso-Tetra(4-carboxyphenyl) porphine (T790); and the neutral meso-Tetra(p-hydroxyphenyl) porphine (T679) with model membranes, at two different pH values. The models for the biological membrane used were micelles of hexadecylphosphocholine and large unilamellar liposomes of egg yolk phosphatidylcholine. The liposome/buffer partition coefficients (K) were determined by derivative spectrophotometry at two different pH values (7.4 and 5.8), in order to mimic plasma and tumour tissue conditions, respectively. Different types of partition were observed for different molecules, systems and pH values. Theoretical mathematical models, which accounted for the stoichiometry of the interaction, were used to fit the experimental data and determine the value of K.

The values of K obtained are important in the choosing of a promising light sensitizing agent to be used in photodynamic therapy for cancer treatment, since this parameter governs the distribution of the drug in the organism and the amount of drug that can be found on the site of irradiation.

Keywords: Membrane; Biomimetic models; Drug interactions; Liposomes; Micelles; Photodynamic therapy.

INTRODUCTION

Porphyrin related compounds are widely spread in nature, from haemoglobin to chlorophyll, passing through vitamin B. Porphyrins are also used as antiviral, antifungal (Zheltukhina et al., 2012), or antibacterial drugs (Sagir et al., 2012) and as photosensitizing agents in photodynamic therapy, for the treatment of certain types of cancer. In this therapy, irradiation of the tumour with light at the time of its maximum drug uptake produces singlet oxygen, a cytotoxic agent, which is believed to be responsible for tumour destruction (Ethirajan et al., 2010). For it to be effective, the drug must be found in the site of irradiation in certain amounts. This drug concentration is dependent on its lipophylic characteristics, its ionization degree, the pH of the medium and its ability to interact with biological membranes. It is a known fact that porphyrins accumulate selectively in tumour cells, and their ability to cross the cell membrane and reach DNA or other intracellular targets, appears to be mainly governed by a simple partition between the aqueous and lipid media (Man et al., 2011).

The interaction of drugs with the biological membrane relays mainly on its lipophilic-hydrophilic balance, and has been historically evaluated by the determination of the octanol/water partition coefficients. Nowadays, this parameter tends to be replaced by the partition between water and more anisotropic media, such as micelles and liposomes, acting as membrane models/biomimetic systems. These consist of custom-made structures that reproduce the characteristic structural and functional features of the natural membrane, without bearing the same complexity, and thus allowing that single processes (as the drug partition) or fundamental mechanisms to be isolated.

Liposomes, structures composed of a phospholipidic membrane surrounding an inner aqueous pool, possess numerous structural characteristics of membranes but are easier to prepare and more reproducible. Therefore, they are employed in a variety of studies

concerning the drug-membrane interaction (Esteves et al., 2012; Matos et al., 2012). Phosphatidylcholines are the most used phospholipids to prepare biomimetic liposomes, since these lipids are the major constituents of the biological membrane. Micelles are structures that can also be used as membrane models. Their structure is simpler, not presenting a double layer as membranes and liposomes do; but micelles take the advantages of liposomes to another extreme: are very easy to prepare, very stable, and cause much less interference on the techniques used (namely, UV/Vis spectrophotometry) (Florindo et al., 2013).

Studies in the interaction of porphyrins with model membranes is usually performed by the use of spectroscopic techniques, a choice based mainly on the rich spectral characteristics of these molecules due to the extensive system of delocalized π electrons. Amongst the options we can find fluorimetry as the most used (Mojzisova et al, 2007; Neto and Tabak, 2012), and UV/Vis spectrophotometry (Zhang et al., 2012; Sobczyński et al., 2013).

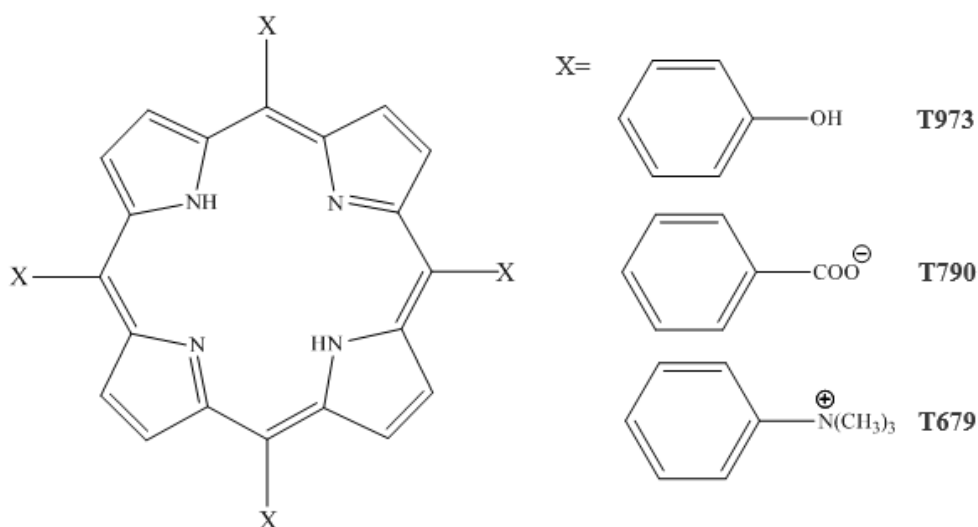


Fig. 1 Chemical structure of the porphyrins: T973: meso-Tetra(4-N,N,N-trimethylanilinium) porphine tetrachloride; T790: meso-Tetra(4-carboxyphenyl) porphine; T679: meso-Tetra(p-hydroxyphenyl) porphine

In this context, this work focuses on the determination of the partition coefficients (K) of three porphyrins, which molecular structure can be observed in figure 1: the cationic meso-Tetra(4-N,N,N-trimethylanilinium) porphine tetrachloride (T973); the anionic meso-Tetra(4-carboxyphenyl) porphine (T790); and the neutral meso-Tetra(p-hydroxyphenyl) porphine (T679) with two membrane models: liposomes composed of egg phosphatidylcholine (EPC) and micelles composed of hexadecylphosphocholine (HDPC). Both amphiphiles are constituted by a phosphate and a choline group, mimicking the most prevalent phospholipids on the cell membrane. The partition coefficients were determined by derivative spectrophotometry, a technique that has been successfully used for the same purpose in other papers (Matos et al, 2012, Florindo et al., 2013). The studies were conducted at two different pH values (7.4 and 5.8), using HEPES buffer, to simulate *in vivo* conditions (plasma and tumour tissue, respectively). The porphyrins chosen present differences in water solubility: T973 is hydrosoluble at both pH values studied, T790 is soluble at pH 7.4 and insoluble at pH 5.8, and T679 insoluble at both pH. A different behavior of partition was observed for soluble and insoluble porphyrins, so different mathematical models were used in characterizing the membrane partition.

MATERIALS AND METHODS

Porphyrins meso-Tetra(4-N,N,N-trimethylanilinium) porphine tetrachloride (T973), meso-Tetra(4-carboxyphenyl) porphine (T790) and meso-Tetra(p-hydroxyphenyl) porphine (T679) were purchased from Frontier Scientific (Logan, UT). Egg phosphatidylcholine (EPC), hexadecylphosphocholine (HDPC) and Hepes (4-(2-hydroxyethyl) piperazine-1-ethanesulfonic acid) were from Sigma (St. Louis, MO). All chemicals were used as received. Solutions were prepared with Hepes buffer (10 mmol/dm³, $I = 0.1 \text{ mol/dm}^3$ (NaCl), pH 7.4 and pH 5.8 adjusted with NaOH). Millipore double-deionised water (conductivity less than $0.1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) was used throughout the work.

Liposomes were prepared by evaporation to dryness of a lipid (EPC) solution in chloroform with a stream of nitrogen. After dryness the lipid film was weighted and suspended in a volume of Hepes buffer that would provide a final lipid concentration of 10 mmol/dm³, and the mixture was vortexed to yield multilamellar vesicles (MLV). The resultant lipid suspensions were then extruded (10 mL Lipex™ Thermobarrel Extruder, Northern Lipids, Inc., Vancouver) 10 times through polycarbonate filters (Nucleopore, Pleasanton) with a diameter pore of 100 nm, to form large unilamellar vesicles (LUV) (stock solution). Micelles were prepared by simple dilution of a weighted amount of HDPC in Hepes so that the final concentration of HDPC were 10 mmol/dm³. These stock solutions were used in the same day of preparation.

For both model systems (liposomes and micelles) a set of solutions with different EPC or HDPC concentrations (ranging from 0 to ca. 10 mmol/dm³), all with the exact same drug concentration (around 1 $\mu\text{mol/dm}^3$). In the case of water soluble compounds, the

porphyrin stock solution was prepared in the same buffer; in the case of water insoluble porphyrins, a stock solution was prepared in ethanol (care was taken to ensure the final ethanol concentration in the final solutions was below 2%). A set of “blank” suspensions (with no added drug) was prepared. Solutions were left to equilibrate in the dark for 2 hours. The spectra of all solutions were then collected in a double-beam spectrophotometer (Perkin Elmer, Lambda 25), equipped with UV WinLab V2.85 software for data acquisition, with HEPES buffer as the reference sample. Wavelength interval, scanning rate, and light path were 1 nm, 240 nm/min, and 1 cm, respectively.

RESULTS

Due to its unique chemical structure, porphyrins exhibit a striking solvatochromism when dissolved in solvents with different polarity. This characteristic was used in this work to determine the amount of drug that actually passed from the aqueous medium to the membrane medium, either the liposome or the micelle membrane, functioning in this particular case as biological membrane models. In figure 2, a successive series of derivative spectra of T973 in the presence of increasing concentrations of HDPC micelles is portrayed. In all these spectra the concentration of T973 is the same, but a remarkable alteration in the spectra can be seen, revealing the escalating interaction of the drug with the micelles. A red shift of 5 nm in the maximum peak can be observed, an indication that the molecule is passing from a more to a less polar environment. The isosbestic points are a sign that the molecule exists in two different states (bound and unbound) and that the changes in the concentrations of the two components are linearly related (Moore and Pearson, 1981).

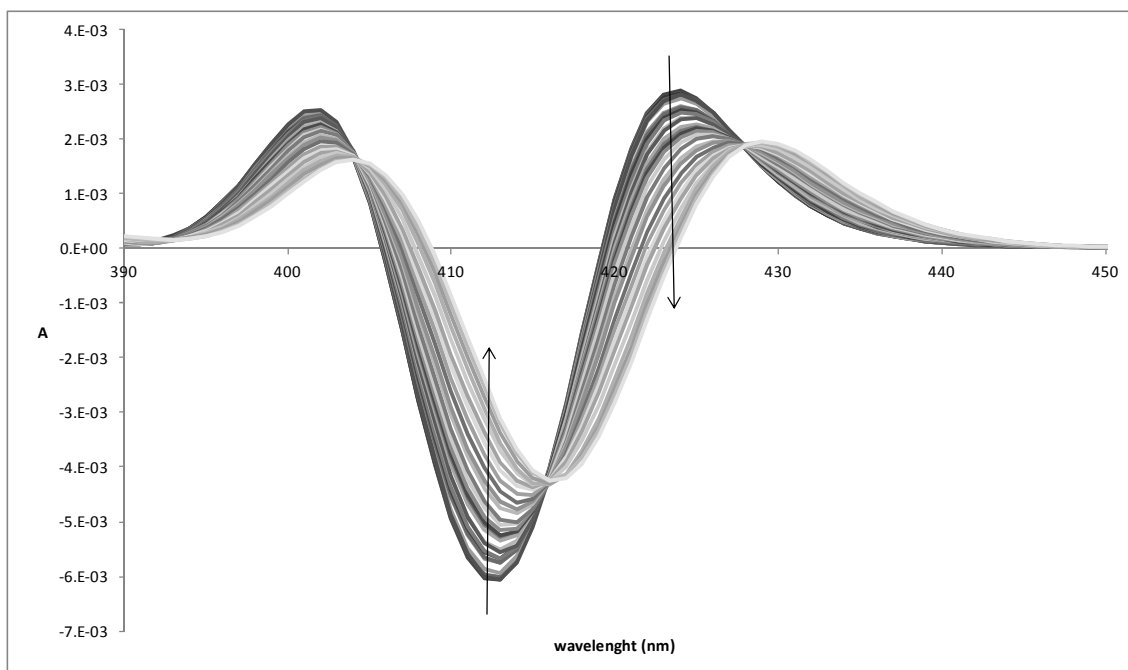
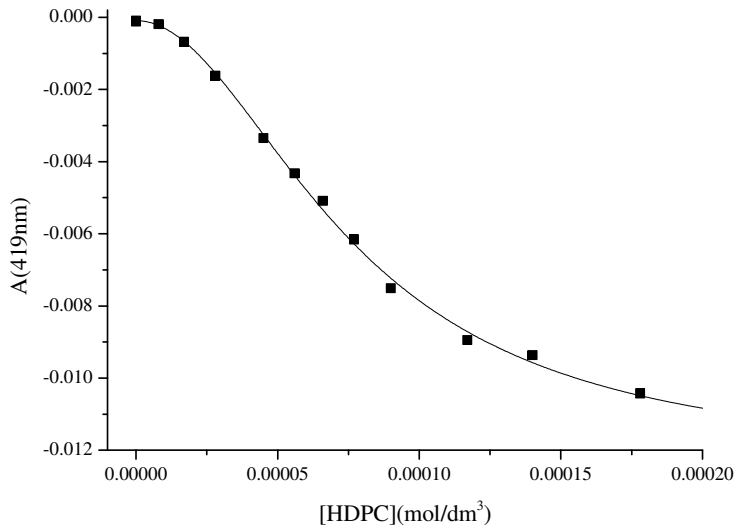
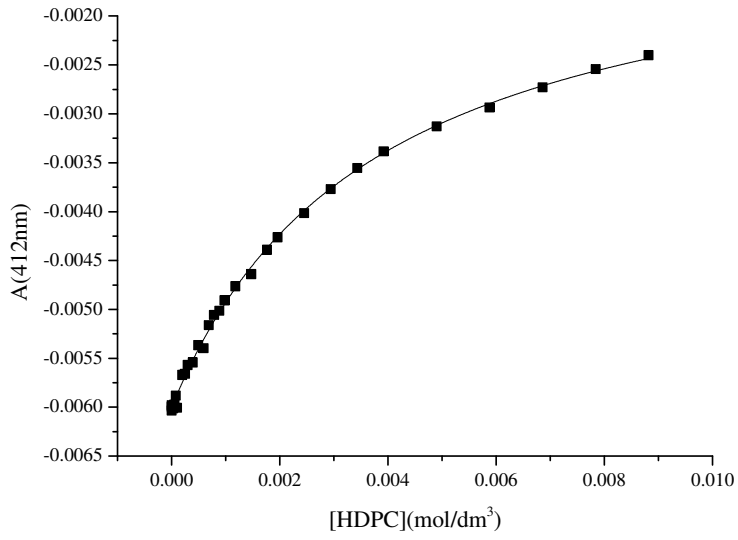


Fig. 2 Second derivative spectra of T973 in different concentrations of hexadecylphosphocholine micelles (HDPC concentrations ranging from 0 to ca. 10 mmol/dm³)

Spectral derivation provides a cleaner depiction, diminishes interferences and enhances spectral features. Its use avoided the need for blank subtraction, since the same mathematical treatment performed on blank spectra resulted on their adequate zeroing. The second derivative and spectra smoothing were achieved by the use of Origin 8.5.1, using 13 points in the derivative calculus.

Plotting the derivative absorbance measured in the spectral peaks versus phospholipid concentration (HDPC or EPC), a hyperbolic curve reaching a plateau can be observed (Figure 3A). The value for the critical micelle concentration (10 $\mu\text{mol/dm}^3$ (de Araujo et al., 1979)) was subtracted from each experimental HDPC concentration.

Interação de porfirinas com lipossomas avaliada por espectrofotometria derivativa



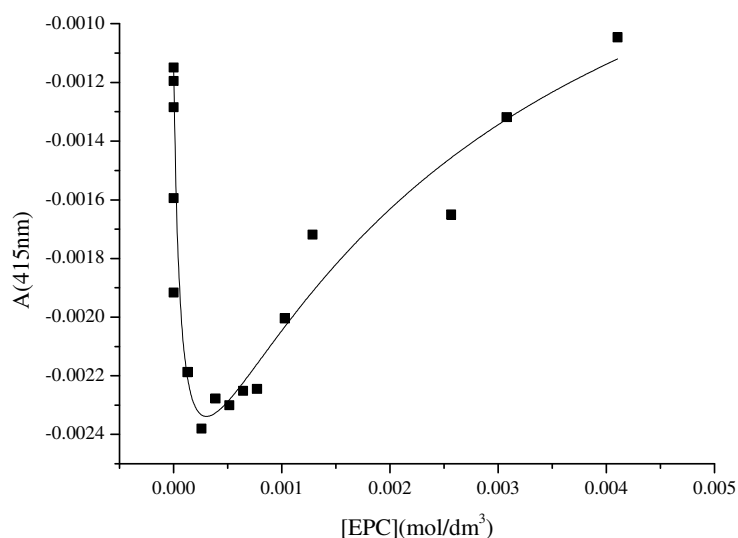


Fig. 3 Second-derivative spectrophotometric data at the maximum peak for different porphyrins in different concentrations of HDPC or EPC. a: T973 in HDPC micelles at pH 7.4; the curve represents the best fit to Eq. 1; b: T790 in HDPC micelles at pH 5.8; the curve represents the best fit to Eq. 2, with n=2; c: T790 in EPC micelles at pH 7.4; the curve represents the best fit to Eq. 3

The derivative intensities can be related with the partition coefficient by the following expression (Castro et al., 2001):

$$A_t = \frac{A_w + A_m K[L]}{1 + K[L]} \quad \text{Eq. 1}$$

where A_t , A_m and A_w are the measured total (solution of the drug containing lipid), lipid and aqueous derivative absorbance of the drug, respectively, K is the partition coefficient, $[L]$ is the lipid concentration. This expression is related to an amphiphile / porphyrin stoichiometry of 1:1.

The partition coefficients in liposome and micellar media, at normal and neoplastic tissue pH, determined by performing a non-linear fitting of the proposed mathematical model to the experimental data using the same computer program, are showed in table 1.

Table 1. Values for partition coefficients (K) between buffer (pH 7.4 and 5.8) obtained by derivative spectrophotometry using different mathematical models (eq. 1, 2, and 3). Membrane models used were micelles of HDPC and liposomes of EPC.

| | pH = 7.4 | | pH = 5.8 | |
|-------------|--|-------------------------------------|---|---------------|
| | K (dm ³ /mol) | stoichiometry | K (dm ³ /mol) | stoichiometry |
| T973 | 270 ± 21 (micelles) 174 ± 36 (liposomes) | 1:1 (eq.1) 1:1 (eq.1) | 422 ± 62 (micelles) | 1:1 (eq.1) |
| T790 | 14 775 ± 1 152 (micelles) K₁=13191 ± 2848 K₂=882 ± 90 (liposomes) | 1:1 (eq.1) 1:1 + 1:2 (eq. 3) | 1.7 x 10⁸ ± 7.1 x 10⁷ (micelles) | 1:2 (eq. 2) |
| T679 | 5.2 x 10⁹ ± 1.4 x 10⁹ (micelles) | 1:2 (eq. 2) | 2.9 x 10⁹ ± 4.1 x 10⁸ (micelles) | 1:2 (eq. 2) |

The spectra of buffer suspensions of the liposoluble porphyrins are nearly closed to zero. With the increase in HDPC micelle concentration, the absorbance increases

considerably. Nevertheless, plotting the derivative absorbance with HDPC concentration a sigmoid curve is now observed, as depicted in figure 3B.

This type of interaction reflects a different stoichiometry for the interaction, other than a simple partition of the porphyrin between the two media. The mathematical model used to interpret these data was based on the work with cyclodextrins developed by several authors (Hamai and Ohshida, 2004; Wang and Yu, 2007; Hamai, 2010; Tablet et al., 2012), included the stoichiometry of the porphyrin:HDPC interaction, n , hereafter defined as the number of lipid molecules that interact with one porphyrin molecule:

$$A_t = \frac{A_w + A_m K [L]^n}{1 + K [L]^n} \quad \text{Eq.2}$$

The partition coefficients in micellar media, determined by performing a non-linear fitting of equation 2 to the experimental data using the same computer program, revealed a stoichiometry of 1 porphyrin to 2 lipid molecules. This adjustment was performed in two steps: first, the model was fitted with the parameter n allowed to vary (with a value of $n=2$ the highest r^2 was attained); second, n was fixed as 2, and the K was fitted. Values are in Table 1. An example of the curves obtained can be observed in figure 3B.

In the case of T790 in liposomes (pH 7.4) yet another type of interaction was observed, as depicted in figure 3C. Clearly a change in interaction can be seen as the lipid concentration increases. To fit these data, a mathematical model encompassing two interaction constants, K_1 and K_2 , usually used for drug interaction with cyclodextrin, was employed (Hamai and Ohshida, 2004; Hamai, 2010; Tablet et al., 2012):

$$Abs_T = \frac{Abs_w + Abs_{m1} K_1 [L] + Abs_{m2} K_1 K_2 [L]^2}{1 + K_1 [L] + K_1 K_2 [L]^2} \quad Eq.3$$

DISCUSSION

It has been described that porphyrins diffuse into the membrane easily by simple diffusion, initially being rather evenly distributed within it, and in a second phase, owing to interactions with the flexible lipid tails, may be driven to assemble and organize into specific domains (Man et al., 2011).

The uptake and/or retention of photosensitizers by targeted cells or tissues are crucial factors for their efficiency, and the most important determinant for this selective uptake appears to be extracellular accumulation of lactic acid that results in the acidification of tumor interstitial matrix. pH values in tumors ranges from 5.8 to 7.4, due to this anaerobic metabolism and production of lactic acid (Tannock and Rotin, 1989). This pH gradient between plasma and tumor tissue promotes a selective uptake of acidic drugs, once the protonation diminishes the global molecular charge and increases its liposolubility.

We have studied the interaction of three porphyrins with the membrane: the cationic T973, the anionic T790 and the neutral T679. The results showed an interaction of all these molecules with the membrane of micelles and liposomes. The interaction with micelles was stronger, probably due its simpler structure, which facilitates the interaction. Also, due to lesser spectral interferences, the results obtained with micelles were cleaner and more reproducible. Nevertheless, both systems showed the same type of results, with the micellar system being easier to use, and so a good model in predicting the compounds interaction with the liposome, and hence with the cell membrane.

The cationic T973 is highly soluble in aqueous media for the two pH values studied (5.8 and 7.4). Sobczyński et al. (2013) have described the protonation and solubilization of these compounds. T973 has four trimethylammonium substituents that bear a positive charge at all pH values (permanent cation). Protonation of the imino nitrogens can occur, but with pKa values of 2.3 and 3.6, so we can predict these groups are not charged at pH 5.8 and 7.4. The logD for this molecule is -4.5 at pH 7, dissolving well in water. No aggregation of this molecule was observed by spectrophotometric evaluation by these authors, which is as expected due to the permanent positive charge and consequent electrostatic intermolecular repulsion (Sobczyński et al., 2013).

We have observed that the interaction of T973 with the membrane is small for both pH, a reflex that the solubility and the ionization state of this compound does not change in this pH span. The shape of absorbance vs. lipid concentration plot reveals a 1:1 stoichiometry between the porphyrin and the lipid.

T790 is water soluble at pH 7.4, but insoluble at pH 5.8. T790 has four carboxylic acid substituents, with a pKa of 4.2, and the two imino groups have pKa of 6 and 6.6. At pH 7.4 we expect this molecule to be mostly negatively charged (4^-), while at pH 5.8 half the molecules should bear one or two additional positive charges. There is a marked difference in lipophilicity with the pH for this compound ($\log D = 7.2$ at pH 4 and $\log D = -3.8$ at pH 8 (Sobczyński et al., 2013)). This seems to be attributed to intermolecular attractions between the negative charges of the peripheral groups and the positively charged porphyrin cores that conduce to aggregation of this compound at pH 5.8, decreasing its solubility and absorbance.

The interaction of T790 with the membrane at pH 7.4 was also treated as a 1:1 stoichiometry and was substantially stronger than the interaction observed for T973. At pH 5.8 an increase of the absorbance with the HDPC concentration traduces probably an

increase in solubilization, and the sigmoidal shape of absorbance vs lipid plot was adjusted with a mathematical model that revealed a stoichiometry of 1 porphyrin to 2 lipid molecules. Although the models used for the calculus were different, a much stronger interaction at pH 5.8 was observed, which would reproduce a selective uptake by a tumour.

The neutral molecule T679 was insoluble at both pH values under study ($\log D = 10.0$ at pH 7), and the interaction behavior and results obtained were similar to what observed for T790 at pH 5.8. T679 seems to interact also with a 1:2 stoichiometry and a higher interaction constant. Since protonation of the imino nitrogens shows a pKa of 4.5, at pH 5.8 around 5% of the molecules are positively charged, but this fact could hardly account for the somewhat smaller interaction constant. The interaction of T679 with the membrane appears to be very strong, but the lack of water solubility and the low specificity for tumor tissue does not make its use as a photosensitizing agent promissory. For proper pharmacokinetic and pharmacodynamic equilibria, a drug should have a suitable hydrophilic-lipophilic balance, and a common setback with porphyrins is the lack of plasma solubility (Horne and Cronjé, 2014).

The discernment that porphyrins bearing carboxylic chains are selectively up taken by tumors was described by others (Kępczyński and Ehrenberg, 2002; Bronshtein et al., 2005; Mojzisoava et al., 2006). The fact that the carboxylic groups remain charged does not seem to hindrance the insertion of the tetrapyrrole ring into the lipid environment (Bronshtein et al., 2005)

CONCLUSIONS

The experimental study described in this paper aimed to select, between a positive, a negative and a neutral porphyrin, a candidate to be selectively uploaded by acidic tumors.

The results of the partition of porphyrins with HDPC micelles are comparable with the results obtained with EPC liposomes, being the HDPC micelles easier to prepare, more stable and leading to more reliable results than the liposomes counterparts.

These membrane models were used to determine the membrane/water partition coefficient (K), an essential parameter in influencing the porphyrin concentration in the site of irradiation. The change in pH in some tumoral tissues, which affects the equilibrium concentrations of the various acid–base species, strongly influences cellular uptake of porphyrins to lipid membranes.

Our results show that T790 interacts strongly with the membrane at a pH value characteristic of tumoral tissue, and is water soluble at plasma pH, consequently showing a promising interaction profile regarding its potential use in photodynamic therapy.

The other porphyrins under investigation showed less interesting characteristics: the cationic T973 interacts poorly with the membrane and indifferently from the pH, while the neutral T679, although interacting strongly, has a poor hydrophilic-lipophilic equilibrium.

REFERENCES

Bronshtein I, Smith KM, Ehrenberg B (2005) The Effect of pH on the Topography of Porphyrins in Lipid Membranes. *Photochem Photobiol* 81: 446-451.

de Araujo PS, Rosseneu MY, Kremer JM, van Zoelen EJ, de Haas GH (1979) Structure and thermodynamic properties of the complexes between phospholipase A₂ and lipid micelles. *Biochemistry* 18 (4): 580-586.

Esteves F, Moutinho C, Matos C (2013) Correlation between octanol/water and liposome/water distribution coefficients and drug absorption of a set of pharmacologically active compounds. *J Liposome Res* 23(2): 83-93.

Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK (2011) The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* 40: 340–362.

Florindo C, Araujo JMM, Alves F, Matos C, Ferraz R, Prudêncio C, Noronha JP, Petrovski Z, Branco L, Rebelo LPN, Marrucho IM (2013). Evaluation of solubility and partition properties of ampicillin-based ionic liquids. *Int J Pharm* 456 (2): 553-559.

Hamai S (2010) Complex formation of tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin with γ -cyclodextrin, phenylalanine, and tryptophan in aqueous solution. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 67: 471–481.

Hamai S, Ohshida T (2004) Inclusion Complexes of Cyclodextrins with Tetrakis(4-carboxyphenyl)porphyrin and Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrin in Aqueous Solutions. *J Incl Phenom Macrocycl Chem* 50: 209–217.

Horne TK, Cronjé MJ (2014) Novel Porphyrazine Derivatives show Promise for Photodynamic Therapy despite Restrictions in Hydrophilicity. *Photochem Photobiol* 90: 648–658.

Kępczyński M, Ehrenberg B (2002) Interaction of Dicarboxylic Metalloporphyrins with Liposomes. The Effect of pH on Membrane Binding Revisited. *Photochem Photobiol* 76(5): 486–492.

Man D, Słota R, Broda MA, Mele G, Li J (2011) Metalloporphyrin intercalation in liposome membranes: ESR study. *J Biol Inorg Chem* 16: 173–181.

Matos C, Moutinho C, Lobão P (2012) Liposomes as a Model for the Biological Membrane: Studies on Daunorubicin Bilayer Interaction. *J Membrane Biol* 245(2): 69–75.

Mojzisoava H, Bonneau S, Vever-Bizet C, Brault D (2007) The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: A physico-chemical approach. *Biochim Biophys Acta* 1768: 366–374.

Moore JW, Pearson RG (1981) *Kinetics and Mechanism*. J. Wiley & Sons., New York.

Neto DS, Tabak M (2012) Interaction of the meso-tetrakis (4-N-methylpyridyl) porphyrin with gel and liquid state phospholipid vesicles. *J Colloid Interface Sci* 381: 73–82

Sagir T, Gencer S, Kemikli N, Abasiyanik MF, Isik S, Ozturk R (2012) Photodynamic activities of protoporphyrin IX and its dopamine conjugate against cancer and bacterial cell viability. *Med Chem Res* 21:4499–4505.

Sobczyński J, Tønnesen HH, Kristensen S (2013) Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related meso-porphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements. *Die Pharmazie* 68(2): 100-109.

Tablet C, Matei I, Hillebrand M (2012) The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations, *Stoichiometry and Research - The Importance of Quantity in Biomedicine*, Dr Alessio Innocenti (Ed.), ISBN: 978-953-51-0198-7, InTech, DOI: 10.5772/34287. Available from: <http://www.intechopen.com/books/stoichiometry-and-research-the-importance-of-quantity-in-biomedicine/-the-determination-of-the-stoichiometry-of-cyclodextrin-inclusion-complexes-by-spectral-methods-poss>. Accessed 20 June 2014.

Tannock IF, Rotin D (1989) Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer Res* 49: 4373-4384.

Wang R, Yu Z (2007) Validity and Reliability of Benesi-Hildebrand Method. *Acta Phys -Chim Sin* 23(9): 1353-1359.

Zhang S, Yang L, Huo D, Liu X, Li J, Fa H, Zhang L, C. Hou C(2012) Molecular interactions of dimethyl methylphosphonate (DMMP) with metalloporphyrins: determination of the binding mechanism by spectroscopic methods. *Spectrochim Acta A: Mol Biomol Spectrosc* 88: 137-143.

Zheltukhina GA, Okorochenkova SA, Groza NV, Arzumanyan VG, Nebolsin VE (2012) Synthesis and antifungal properties of arginine-containing hemin derivatives. *Med Chem Res* 21:3876–3884.