

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA**

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE
DIFERENTES FTALOCIANINAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Guilherme Pires Amaral

Santa Maria, RS, Brasil

2013

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DIFERENTES FTALOCIANINAS

Guilherme Pires Amaral

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica

Orientador: Prof. Dr. Félix Alexandre Antunes Soares

Co-orientador: Prof. Dr. Robson Luiz Puntel

Santa Maria, RS, Brasil

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação
de Mestrado

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE
DIFERENTES FTALOCIANINAS

elaborada por

Guilherme Pires Amaral

como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Biológicas: Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA



Félix Alexandre Antunes Soares, Dr. (UFSM)

(Presidente/Orientador)



Ricardo Brandão, Dr. (UFSM)



Rodrigo de Souza Balk, Dr. (UNIPAMPA)

Santa Maria 22 de fevereiro de 2013

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer a Deus, acima de tudo, pela sua constante presença em meus pensamentos e intenções.

À minha família, meu pai Guilherme Ribeiro Amaral, minha mãe Marli Goreti Pires Amaral, meu irmão Murilo Pires Amaral, minhas avós Geni Maria de Ávila Pires e Virgínia Ribeiro do Amaral, tias e amigas queridas Olga, Maria Aparecida De Ávila Pires, Claudia do Amaral, Dioli Ribeiro e Nelsa aos demais membros da família pelo apoio incondicional em todos os momentos de dificuldades e também pela comemoração e alegria em cada conquista.

Ao meu orientador, Félix Alexandre Antunes Soares pela amizade, oportunidade, compreensão, acolhimento, incentivo e orientação na realização dos meus trabalhos. Agradeço-o por compartilhar os conhecimentos sobre bioquímica e pela disponibilidade de tempo. Além de minha eterna gratidão e amizade, admiro-o pelos seus conhecimentos e dedicação ao seu trabalho.

Ao meu co-orientador, Robson Luiz Puntel pela amizade, cordialidade, oportunidade, disponibilidade de tempo, compreensão e pela co-orientação no desenvolvimento de meus trabalhos. Além de minha gratidão, admiro-o pelos seus conhecimentos e dedicação ao seu trabalho.

Aos colegas do laboratório do Prof. Félix: Nelson, Fernando, Sílvio, Rômulo, Edovando, Juliano, Cíntia, Aline, Letícia, Marina, Tássia, Naiani, Bruna, Priscila, Flávia, Guilherme B., Guilherme T.

Aos ex-colegas Michele Hinerasky da Silva, Jéssica Bridi, Rafael de Lima Portella, Thiago Lugokenski, Rodrigo Balk, Glaecir Dias, Gustavo Orione Puntel, Daiana da Silva, Cristiane Lenz Dalla Corte e Dirleise Colle.

A todos os colegas e ex-colegas citados acima, agradeço pela imensurável amizade, apoio, compreensão, fraternidade, incentivo, além de toda a ajuda na realização de pesquisas, com ideias, trabalho, boa vontade e dedicação.

Eu admiro-os profundamente pelos seus conhecimentos, caráter e dedicação ao trabalho.

Aos professores (as) Roselei, Cristina, Gilson, João, Nilda, Estér, Ricardo e demais professores do PPGBTOX agradeço imensamente por toda amizade e colaboração nos mais diversos momentos.

Agradeço aos colegas dos demais laboratórios, pela amizade, camaradagem e colaboração em inúmeras oportunidades.

Um agradecimento especial às amigas e aos amigos, Francielli Vieira, Bruna Occai, Kelli Azzolin e Rafael Ferreira que partiram desse plano, precoce e repentinamente, mas que sempre terão um lugar especial em nossas lembranças e corações. Que Deus os abençoe!

Aos funcionários (as) Elvadir, Rinaldo, entre outros, pela dedicação e competência com que realizam os seus trabalhos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica pela possibilidade de realização deste curso.

A CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A alegria de ver e entender é o mais perfeito dom da natureza

(Albert Einstein)

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE DIFERENTES FTALOCIANINAS

AUTOR: GUILHERME PIRES AMARAL

ORIENTADOR: PROF. DR. FÉLIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ROBSON LUIZ PUNTEL

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2013.

O estresse oxidativo está envolvido na etiologia de diversas doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes, câncer, e doenças neurodegenerativas. A partir desta perspectiva, nós avaliamos as possíveis capacidades antioxidantes de cinco diferentes ftalocianinas (PCs), consistindo de 4 metaloftalocianinas e uma ftalocianina simples, a fim de explorar, pela primeira vez, as possíveis capacidades antioxidantes desses compostos. Os resultados mostram que todas as PCs testadas neste estudo possuem uma significativa atividade antioxidante no ensaio de peroxidação lipídica, fornecendo proteção contra a indução de dano oxidativo induzido por nitroprussiato de sódio em sobrenadantes de homogenatos de fígado, cérebro e rins de camundongos. Comparado ao controle induzido, as PCs foram geralmente mais eficientes em reduzir os níveis de malondialdeído em todos os ensaios de peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio; a ordem decrescente de eficiência foi a seguinte: manganês-PC (melhor eficiência) > cobre-PC > ferro-PC > zinco-PC (pior eficiência). Além disso, os compostos cobre-Pc e manganês-Pc exercem um efeito protetor significativo em ensaios de degradação da desoxirribose, quando empregando soluções de Fe^{2+} , $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, e H_2O_2 . Em conclusão, todas as PCs testadas aqui mostraram ser compostos promissores para futuras investigações *in vivo*.

Palavras-chave: antioxidante, peroxidação lipídica, desoxirribose, ftalocianina, metaloftalocianina.

ABSTRACT

Master Dissertation

Graduation Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

THE STUDY ABOUT ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DIFFERENT PHTHALOCYANINES

AUTHOR: GUILHERME PIRES AMARAL

ADVISOR: FÉLIX ALEXANDRE ANTUNES SOARES

CO-ADVISOR: ROBSON LUIZ PUNTEL

Date and Place of the Defense: Santa Maria, 22th February 2013

Oxidative stress is believed to be involved in the etiology of several chronic diseases, including cardiovascular disease, diabetes, cancer, and neurodegenerative disorders. From this perspective, we have evaluated the possible antioxidant capacities of five different phthalocyanines (PCs), consisting of four metallophthalocyanines (MPCs) and one simple phthalocyanine (PC) in order to explore, for the first time, the potential antioxidant activities of these compounds. Our results show that all PCs tested in this study have significant antioxidant activity in lipid peroxidation assay, providing protection from sodium nitroprusside-induced oxidative damage to supernatant from the homogenized liver, brain, and kidney of mice. Compared to the noninduced control, the PCs were generally more efficient in reducing malondialdehyde levels in all assays on lipid peroxidation induced by sodium nitroprusside; the order of decreasing efficiency was as follows: manganese-PC (better efficiency) > copper-PC > iron-PC > zinc-PC > PC (worst efficiency). Furthermore, the copper-PC and manganese-PC compounds exerted a significant protective effect in deoxyribose degradation assays, when employing Fe^{2+} , $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, and H_2O_2 solutions. In conclusion, all PCs tested here were shown to be promising compounds for future in vivo investigations, because of their potential antioxidant activities in vitro.

LISTA DE ABREVIATURAS

ER - Espécies reativas

ERO - Espécies reativas de oxigênio

ERN – Espécies reativas de nitrogênio

NPS – Nitroprussiato de sódio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

O₂^{•-} - Superóxido

(OH[•]) – Radical hidroxil

ROO[•] - Radical peroxil

¹O₂ – Oxigênio singlete

F²⁺ - cátion bivalente de Ferro

NADPH - nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato

PCs - Ftalocianinas

TFD - Terapia fotodinâmica

TC - Terapia catalítica

TSD – Terapia sonodinâmica

BHT - hidroxitolueno butilado

BHA - hidroxianisol butilado

TBHQ - terc-butil-hidroquinona

OG - Galato de octilo

NDGA - ácido Nordihidroguaiaretico

SOD – Soperóxido dismutase

CAT – Catalase

GSH – Glutathiona reduzida

GSSG – Glutathiona oxidada

GPx – Glutathiona peroxidase

GR – Glutathiona reductase

G6PD – Glicose-6-fosfato desidrogenase

ON – óxido nítrico

M – substituinte metálico

CH₃-O- - Grupo metoxi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivo Específico	25
3. DESENVOLVIMENTO	26
Artigo: THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DIFFERENT PHTHALOCYANINES	
Abstract.....	28
Introdução	28
Materiais & Métodos	29
Resultados	31
Discussão.....	33
Conclusão	34
Referências bibliográficas	34
4. CONCLUSÕES	36
4.1 Conclusão Geral	36
4.2 Conclusões Específicas.....	36
5. PERSPECTIVAS.....	38
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO**, está descrito uma sucinta revisão bibliográfica sobre os temas trabalhados nesta dissertação.

O **DESENVOLVIMENTO** da dissertação está apresentado sob a forma de um artigo publicado na revista Toxicology in vitro o qual se encontra alocado no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados, Conclusão e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo.

Os itens **CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS** são encontrados no final desta dissertação e apresentam interpretações e comentários gerais sobre a investigação desenvolvida.

As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações que aparecem no item **INTRODUÇÃO** uma vez que o artigo científico contém as suas próprias referências.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem crescido o interesse no desenvolvimento de estudos no âmbito do estresse oxidativo devido ao conhecimento de que inúmeras patologias e o próprio envelhecimento de seres humanos e animais podem decorrer desse processo (Lambeth, 2007). Dessa forma, baseado em estudos prévios de considerável relevância, pode-se apontar as espécies reativas (ER) como um dos principais agentes causadores do estresse oxidativo (Halliwell, 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007; Lambeth, 2007).

Dessa maneira, nesse estudo foram desenvolvidos experimentos com a finalidade de investigar o potencial antioxidante de diferentes ftalocianinas como uma alternativa viável no combate ao estresse oxidativo.

1. 1. Estresse oxidativo e suas implicações

Entre as ER, ganham destaque as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente), por se tratarem das ER encontradas com maior frequência ou concentração nos processos de estresse oxidativo (Alderton, 2001; Valko, 2004).

As ER podem ser encontradas frequentemente na forma de radicais livres (RL), os quais correspondem a um grupo de espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons isoladamente ocupando apenas um orbital atômico ou molecular, como exemplo o radical hidroxil (OH^\cdot) e superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$); ou ainda na forma não radicalar como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode facilmente gerar radicais livres ou causar dano oxidativo (Halliwell, 2011; Halliwell e Gutteridge, 2007).

Dessa forma, devido à importância dessas espécies na etiologia de muitas doenças, torna-se relevante destacar que as ERO e ERN podem ser geradas de diferentes formas, por mecanismos endógenos ou exógenos. Entre os mecanismos exógenos ou ambientais, encontram-se a exposição a diferentes tipos de irradiação como a ultra-violeta, raios X ou ainda raios gama (Valko *et al.*, 2004); além disso a exposição ambiental pode apresentar outros perigos como a poluição atmosférica, a qual pode conter um grande número de

agressores capazes de desencadear a geração de ER, como exemplo os metais ferro, cobre, cromo, cobalto, cádmio, arsênio e níquel (Valko et al., 2004).

Somado a isso, ainda existe um considerável número de fatores endógenos capazes de gerar ER, tomando como exemplo a ação de neutrófilos e macrófagos em processos inflamatórios, a regulação de várias enzimas (NADPH oxidase, hemeoxigenase 1, xantina oxidase, óxido nítrico sintase, etc.) ou ainda reações envolvendo o transporte de elétrons nas mitocôndrias, entre outras (Halliwell, 2006).

Nesse contexto, cabe compreender que as ER, especialmente os radicais livres, podem causar dano a macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA, ou ainda causar um desequilíbrio redox nas vias de sinalização de células normais (Griffiths, 2002; Valko *et al.*, 2006). Dessa maneira, o dano aos constituintes celulares, acumulados durante o ciclo de vida de seres humanos e animais, representa um papel chave no desenvolvimento da senescência celular e apoptose (Valko *et al.*, 2006), e na etiologia de grande número de patologias associadas à idade como desordens neurológicas (Alzheimer, Parkinson, etc.), ou aterosclerose, artrite, complicações diabéticas e câncer (Griffiths, 2002). Somado a isso, é importante destacar que as ER estão diretamente relacionadas com o início da oncogênese, uma vez que podem causar mutações ao DNA devido aos elevados níveis de lesões a essa estrutura, o que são frequentemente identificadas em diversos tipos de tumores (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Além disso, cabe destacar que o processo de estresse oxidativo pode apresentar variações de acordo as particularidades de cada órgão ou tecido, uma vez que um mesmo agente indutor de dano pode se acumular e conseqüentemente agir de forma desigual em diferentes regiões dos organismos de mamíferos (Gabriel *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2007).

Esse comportamento deve-se, em maior parte, pelas características metabólicas distintas de cada órgão ou tecido, como exemplo as existentes entre o cérebro, fígado e rins; ou ainda associada ao aporte antioxidante endógeno de cada tecido que pode apresentar uma maior ou menor eficiência

antioxidante de acordo com as características do agente pro-oxidante presente (Gabriel *et al.*, 2013; Rosa *et al.*, 2007).

1. 2. Antioxidantes

Devido ao perigo que o estresse oxidativo representa para os seres humanos e animais, torna-se de suma importância a utilização de sistemas de defesa endógenos e exógenos para manter as ER em níveis fisiológicos e assim garantir a integridade das estruturas celulares. Dessa forma, para realizar essa proteção de forma eficiente os organismos dos seres em questão fazem uso de estruturas conhecidas como antioxidantes que são moléculas as quais protegem um alvo biológico contra danos oxidativos (Halliwell e Gutteridge, 2007).

A rede antioxidante em mamíferos é complexa e interligada, funcionando para diminuir os níveis de ER através de diversas formas (Al-Jaber *et al.*, 2011). Contudo, para uma melhor compreensão, os antioxidantes estão divididos, de forma geral, neste estudo, pela sua origem endógena (enzimáticos e não enzimáticos) ou exógena (naturais ou sintéticos).

1. 2. 1. Antioxidantes endógenos

Em mamíferos, a maior parte da capacidade antioxidante total das células e tecidos é constituída pela síntese de antioxidantes endógenos. Dessa maneira, pode-se resumir a ação dessas substâncias de acordo com seus principais mecanismos de ação, entre os quais se encontra a capacidade de inibir a formação de ER ou atuar ativamente na neutralização das mesmas, ou ainda como quelantes de metais que poderiam agir como pro-oxidantes, entre outras possibilidades, etc. (Kancheva, 2009; Pokorný, 2007).

O sistema antioxidante endógeno de mamíferos, para melhor compreensão, está dividido nesse estudo em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.

1. 2. 1. 1. Antioxidantes enzimáticos

As defesas enzimáticas, em mamíferos, podem ser divididas em defesas primária e secundária. Dessa maneira, é possível apontar como exemplo de defesas primárias algumas enzimas que impedem a formação ou neutralizam as ER, entre as quais se destacam a glutaciona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) (Lefer, 2000; Smith, 2000). A primeira pode reduzir peróxidos; a segunda converte ativamente H_2O_2 em H_2O e O_2 (Ferreira, 2009; Flora, 2009). E por fim, a superóxido dismutase (SOD) possui como principais isoformas a CuZnSOD (SOD1, localizada no espaço intermembrana mitocondrial) e a MnSOD (SOD2, localizada na matrix mitocondrial). Essa enzima, entre outras funções, pode converter $\text{O}_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 como um substrato para a CAT (Rahman, 2007) (Figura 1).

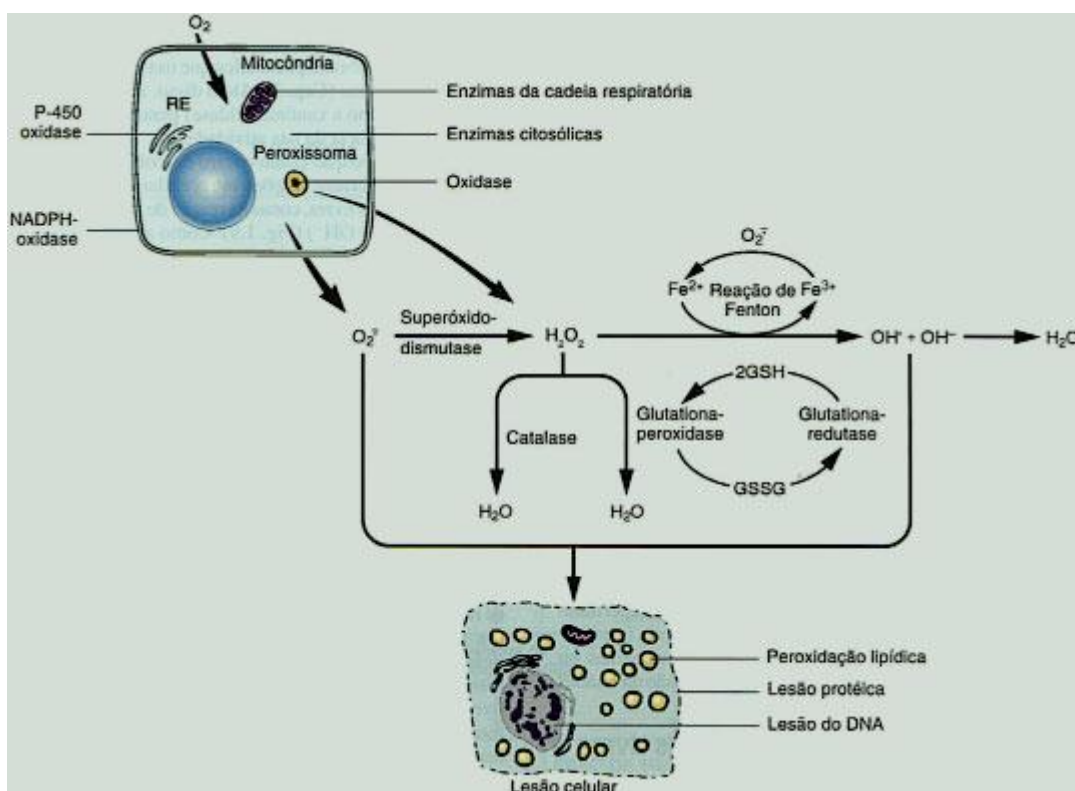


Figura 1: Esquema demonstrando a geração de algumas ER ($\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2) e os possíveis danos que elas podem gerar (peroxidação lipídica, lesão protéica e dano ao DNA). Além de apresentar a ação desintoxicante de algumas defesas antioxidantes endógenas (superóxido dismutase, catalase e glutaciona reduzida, ou seja, a GSH) (Albas et al., 2010).

A defesa enzimática secundária é representada, de maneira geral, por enzimas que não neutralizam as ER diretamente, no entanto, possuem papéis de apoio aos outros antioxidantes endógenos. Nesse contexto, pode-se tomar como exemplo a GR e a G6PD. A primeira reduz a glutatona a partir da sua forma oxidada (GSSG) até a sua forma reduzida (GSH), dessa maneira a tornando novamente disponível para continuar neutralizando mais radicais livres (Krishnaiah *et al.*, 2011) (Figura 1). A G6PD, por sua vez, cria um ambiente redutor ao regenerar NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato) (Ratnam, 2006).

1. 2. 1. 2. Antioxidantes não-enzimáticos

Existem diversos antioxidantes não-enzimáticos de origem endógena que desempenham funções de grande importância no adequado controle do estresse oxidativo, ajudando a manter as ER em níveis basais. Dessa forma, entre essas defesas podemos destacar como principais a GSH, a vitamina A, o ácido úrico e a coenzima Q10, entre diversos outros.

A GSH pode atuar regenerando outros antioxidantes como a vitamina C ou ainda neutralizando RL (Steenvoorden, 1997).

A vitamina A possui uma atividade antioxidante bem conhecida devido a sua capacidade de agir sobre radicais peroxil (ROOH^{\cdot}), neutralizando-os e evitando dessa forma o dano oxidativo decorrente da ação desses radicais (Jee, 2006).

O ácido úrico desempenha o seu papel de antioxidante atuando como “scavenger” de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e de OH^{\cdot} , e dessa maneira pode prevenir o rompimento dos eritrócitos ao evitar a peroxidação das estruturas celulares causada pela presença dessas ER (Kand'ár, 2006).

A coenzima Q_{10} , por sua vez, impede a formação de radicais lipídicos, além de possuir a capacidade de regenerar a vitamina E (Turunen, 2004).

1. 2. 2. Antioxidantes exógenos

Quando a geração de ER excede a capacidade de defesa dos sistemas antioxidantes endógenos, torna-se de grande relevância a utilização de antioxidantes exógenos, que podem ser de origem natural, principalmente oriundos de plantas, ou de origem sintética, para evitar o desenvolvimento de diversas patologias previamente exemplificadas (Halliwell, 2009).

Para facilitar o entendimento, os antioxidantes exógenos estão divididos nesse estudo de acordo com sua origem natural ou sintética.

1. 2. 2. 1. Antioxidantes naturais

O ácido ascórbico (vitamina C) inclui dois compostos com atividade antioxidante: ácido L-ascórbico e ácido L-desidroascórbico e ambas as formas podem ser absorvidas no trato gastrointestinal e agir de maneira eficaz na eliminação do radical superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, oxigênio singlete e óxido de nitrogênio (Barros, 2011). Além disso, essa vitamina atua ativamente na regeneração do tocoferol, devolvendo o seu potencial antioxidante (Halpner *et al.*, 1998).

O tocoferol (vitamina E) exerce sua ação diretamente sobre os radicais peroxil através da doação de um hidrogênio, e assim originando radicais tocoferoxil que não apresentam reatividade. Dessa forma, ao transformar um radical peroxil em um radical inofensivo, a vitamina E previne a peroxidação lipídica das estruturas celulares (Burton, 1990).

Os flavonóides constituem um grupo de compostos antioxidantes dos quais fazem parte antocianinas, isoflavonoides, flavononas e flavonas. As propriedades antioxidantes dos flavonóides são conferidas pelos grupos hidroxil fenólicos ligados a estruturas em anel e que podem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio, supressores de oxigênio singlete, “scavengers” de radicais superóxido e mesmo como quelantes de metais. Eles também ativam enzimas antioxidantes, reduzem os radicais α -tocoferol, inibem as oxidases e aumentam os níveis de ácido úrico e moléculas de baixo peso molecular (Procházková, 2011; Rice-Evans C.A., 1996).

Os ácidos fenólicos geralmente apresentam atividade antioxidante como quelantes de metais e “scavengers” de RL, atuando principalmente sobre os radicais hidroxil e peroxil, ânions superóxido e peroxinitritos (Krimmel, 2010; Terpinc, 2011).

Os carotenóides estão divididos em dois grupos conhecidos como carotenóides hidrocarbonados (carotenos) e carotenóides oxigenados; e ambos os grupos podem formar compostos que se ligam aos radicais livres, os neutralizando (Paiva, 1999).

O zinco pode induzir a produção de metalotioneínas que atuam principalmente como “scavengers” de radical hidroxil. Além disso, o zinco desempenha um papel essencial na estrutura da SOD1 para que esta possa desempenhar sua atividade antioxidante adequadamente (Prasad, 2004).

O selênio pode ser encontrado nas formas orgânicas (selenocisteína e selenometionina) e inorgânicas (selenito) no corpo humano. Assim como o zinco ele não age diretamente sobre os RL, mas é uma parte indispensável da maioria das enzimas antioxidantes (metaloenzimas, glutathione peroxidase, tioredoxina redutase), que não teriam nenhum efeito sem ele (Tabassum, 2010).

1. 2. 2. 2. Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos geralmente são desenvolvidos com a finalidade de apresentarem atividade antioxidante semelhante ou melhor do que a geralmente demonstrada pelos antioxidantes naturais. Além disso, os antioxidantes sintéticos são geralmente incorporados em alimentos para os proteger contra a oxidação e assim aumentar o tempo de estocagem, sem alterar a qualidade do alimento (Carocho e Ferreira, 2013)

Entre os antioxidantes sintéticos mais utilizados pode-se tomar como exemplos os seguintes (Figura 3):

O BHT (hidroxitolueno butilado) e BHA (hidroxianisol butilado) que atualmente representam os antioxidantes químicos mais utilizados. Contudo, esses antioxidantes podem apresentar em cães um aumento da

carcinogenicidade e danos hepáticos (Carocho e Ferreira, 2013; Joung et al., 2004).

O TBHQ (terc-butil-hidroquinona) conhecido por estabilizar e preservar o frescor, valor nutritivo, sabor e cor de produtos alimentares de origem animal (Carocho e Ferreira, 2013; Joung et al., 2004).

O OG (Galato de octilo) é considerado seguro para utilização como um aditivo alimentar, porque após o consumo ele é hidrolisado em ácido gálico e octanol, que são encontrados em muitas plantas e não representam uma ameaça para a saúde humana (Carocho e Ferreira, 2013; Joung *et al.*, 2004).

O NDGA (ácido Nordihidroguaiaretico) apesar de ser um antioxidante alimentar é conhecido por causar a doença cística renal em roedores (Evan e Gardner, 1979).

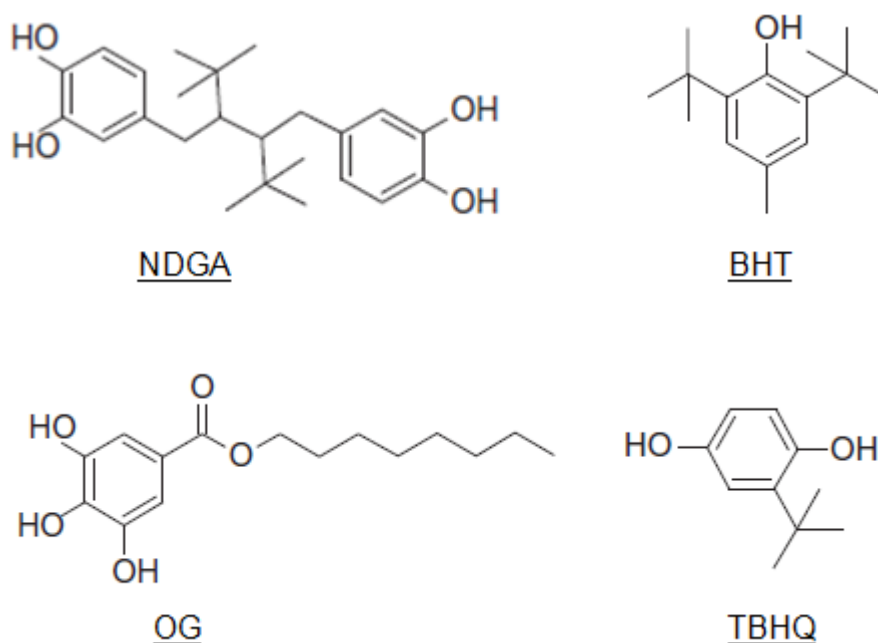


Figura 2. Estrutura de antioxidantes sintéticos rotineiramente adicionados a alimentos: NDGA (ácido Nordihidroguaiaretico); OG (Galato de octilo); BHT (hidroxitolueno butilado) e TBHQ (terc-butil-hidroquinona) (Carocho e Ferreira, 2013).

1. 3. Ftalocianinas

Dessa forma, para aumentar as possibilidades do uso clínico de antioxidantes torna-se de grande relevância o adequado estudo de novos

compostos que possam apresentar propriedades antioxidantes viáveis para a prevenção ou tratamento de patologias oriundas do estresse oxidativo.

Assim, nessa dissertação é apresentado um estudo sobre as possíveis atividades antioxidantes de 5 compostos conhecidos genericamente como ftalocianinas (“phthalocyanines”), as quais até o momento têm sido exploradas majoritariamente como pigmentos, sensibilizantes, e com diversas outras aplicações, porém com poucas propriedades antioxidantes conhecidas (Josefsen e Boyle, 2012).

A síntese da estrutura molecular das ftalocianinas sem substituintes e de base livre (sem metal central) foi realizada acidentalmente em 1907, pelos cientistas Braun e Tcherniac (Braun e Tcherniac, 1907). Também acidentalmente, em 1927, os pesquisadores Diesbach e Von der Weid realizaram, pela primeira vez, a síntese de uma ftalocianina metálica ou metaloftalocianina (De Diesbach e Von Der Weid, 1927). Desde então, esses compostos são conhecidos como excelentes materiais funcionais devido as suas diversas aplicações (Zhong et al., 2010).

As ftalocianinas (PCs) são compostos de coordenação macrocíclicos, altamente conjugados, constituídos por 4 anéis isoindóis. Além disso, cada um desses anéis é formado pela fusão de 1 anel benzênico (6 carbonos) com 1 anel pirrol (4 carbonos e 1 nitrogênio) (Figura 3) (Josefsen e Boyle, 2012). Essa estrutura básica das PCs confere a elas uma particular aromaticidade, com a formação de um sistema π conjugado, com 18 elétrons que dão origem a bandas de absorção, com comprimentos de onda entre 400 e 700 nm e que determinam suas principais propriedades físico-químicas (Esenpinar et al., 2011; Zhou et al., 1996).

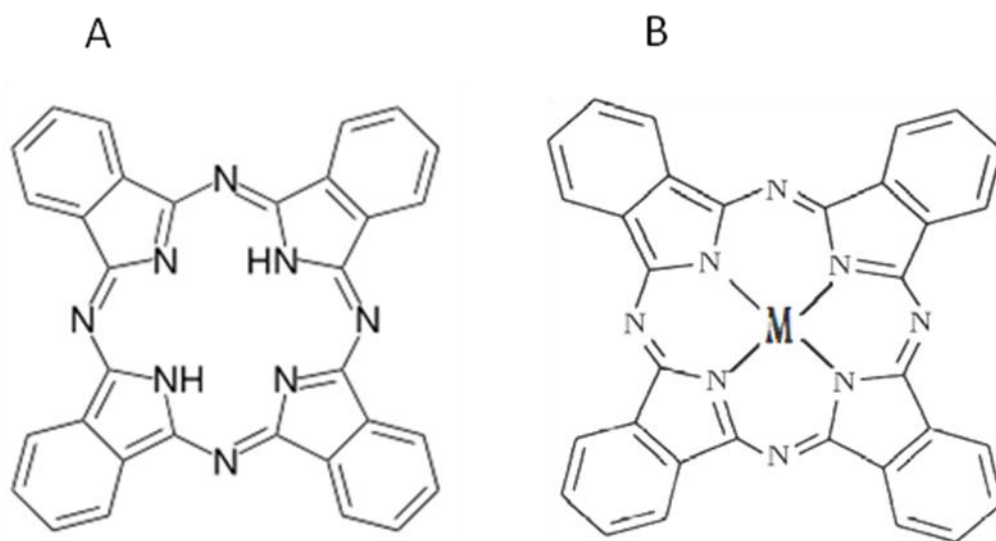


Figura 3. Representação da estrutura básica de ftalocianinas sem ou com substituinte metálico (M) em sua cavidade central (A e B, respectivamente).

As PCs são altamente estáveis e capazes de incluir mais de 70 íons de metais e não metais em sua cavidade central, sendo denominadas metaloftalocianinas no primeiro caso (Figura 3B) (Esenpinara et al., 2013; Milowska e Gabryelak, 2008). Dessa forma, as PCs são geralmente sintetizadas com um átomo metálico coordenado em sua cavidade central para prevenir a agregação entre as moléculas e para permitir o aumento de suas propriedades fotoquímicas (Esenpinara et al., 2013).

Elas têm sido estudadas em detalhes por muitos anos, especialmente considerando suas propriedades como estabilidade térmica extremamente alta, resistividade química, condutividade elétrica, fotocondutividade, atividade catalítica e capacidade corante (Lokesh e Adriaens, 2013; Zhong et al., 2010). Essas propriedades as permitem ter diversas aplicações na área industrial e de materiais de ciência (Zhong et al., 2010).

Dessa forma, as PCs são utilizadas amplamente como pigmentos e corantes para superfícies metálicas, tecidos, plásticos e revestimentos em geral, ou ainda em feixes de impressoras laser e fotocópias (Zhong et al., 2010). De fato, quase 25% de todos os pigmentos orgânicos artificiais são derivados das ftalocianinas (Heugebaert et al., 2012).

Além disso, esses compostos apresentam relevantes aplicações como cristais líquidos, substâncias eletrocromicas e eletrocatalisadores, sensores de gases, semicondutores, filmes de Langmuir–Blodgett, entre diversas outras aplicações (Biyıklıoğlu et al., 2010; Esenpınar et al., 2011).

As PCs possuem ainda diversas aplicações na química medicinal, sendo usados como antibióticos, inibidores de isoenzimas da ciclooxigenases (COX-2) e trombina, etc (Heugebaert et al., 2012).

Em acréscimo ao que foi exposto torna-se importante destacar que determinado grupo de PCs podem ser utilizadas no tratamento contra o câncer de três principais formas: 1) Terapia catalítica (Braun e Tcherniac), na qual algumas PCs podem atuar como catalizadores, juntamente com um substrato adequado para gerar ER e através delas atacar e destruir as células tumorais (Dougherty et al., 1998); 2) Terapia sonodinâmica (TSD) envolvendo PCs com propriedades sonosensibilizadoras, fazendo uso da capacidade que algumas PCs possuem de gerar ER quando estimuladas por ultrason em frequências específicas (Milowska e Gabryelak, 2008); 3) Através da terapia fotodinâmica (TFD), algumas PCs que fazem parte da segunda geração de fotossensibilizantes e que, dessa forma, possuem absorção luminosa acima de 630 nm, permitem uma ação mais efetiva sobre tumores, além de serem utilizadas ainda no combate a fungos, vírus, etc (Al-Raqa, 2008; Yslas et al., 2007).

Até o presente momento, existe um número muito reduzidos de estudos que demonstrem a existência de propriedades antioxidantes relacionadas a estrutura das PCs. Contudo, em uma recente publicação descobriu-se que algumas PCs quando combinadas a um grupo metoxi (CH₃-O-), formam um derivado capaz de apresentar significantes propriedades antioxidantes *in vitro* (Agirtas et al., 2013).

Além disso, é razoável inferir que seja de suma importância a descoberta de compostos sintéticos que possuam relevantes propriedades antioxidantes, com o menor número possível de efeitos colaterais; uma vez que para se isolar antioxidantes exógenos de origem natural em escala industrial, seria necessária uma quantidade significativa de matéria prima (plantas), o que

poderia gerar um desequilíbrio ambiental caso não ocorresse um adequado manejo das plantas de interesse (Corrêa et al., 1998).

Somado a isso, o desenvolvimento de novos antioxidantes sintéticos como as PCs, e que possam ser usados pela população em doses seguras é de grande importância, pois uma boa parte dos antioxidantes sintéticos atualmente adicionados a dieta podem não ser totalmente seguros a longo prazo como são os casos do BHT e do NDGA (Carocho e Ferreira, 2013), entre outros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o possível potencial antioxidante de 5 diferentes ftalocianinas *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Analisar o efeito *per se* das PCs sobre a peroxidação lipídica basal em homogenatos de cérebro, fígado e rins de camundongos.
- ✓ Avaliar o efeito das PCs na prevenção da peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio (NPS) em homogenatos de fígado, cérebro e rins de camundongos;
- ✓ Analisar a capacidade protetora das PCs (as PCs que apresentarem melhor efeito nos ensaios envolvendo tecidos) diante de um dano oxidativo induzido por Fe^{2+} , H_2O_2 ou $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ em desoxirribose.
- ✓ Mensurar a atividade antioxidante das PCs contra a geração de ER induzida por NPS no ensaio de $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ em homogenatos de cérebro, fígado e rins de camundongos;
- ✓ Determinar a atividade “scavenger” de óxido nítrico (ON) desempenhada pelas PCs.
- ✓ Verificar a atividade “scavenger” de radical DPPH exercida pelas PCs.

3. DESENVOLVIMENTO

O desenvolvimento que faz parte desta dissertação está apresentado sob a forma de artigo científico. Os itens Materiais e Métodos, Resultados, Discussão dos Resultados e Referências Bibliográficas, encontram-se no próprio artigo. O artigo encontra-se na formatação de publicação da revista científica *Toxicology in vitro*.

ARTIGO: THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DIFFERENT PHTHALOCYANINES.

Artigo científico publicado na revista Toxicology in vitro, 2012

THE ANTIOXIDANT PROPERTIES OF DIFFERENT PHTHALOCYANINES

Guilherme Pires Amaral, Gustavo Orione Puntel, Cristiane Lenz Dalla Corte, Fernando Dobrachinski, Rômulo Pillon Barcelos, Luiza Lena Bastos, Daiana Silva Ávila, João Batista Teixeira Rocha, Edegar Ozorio da Silva, Robson Luiz Puntel, Félix Alexandre Antunes Soares

Toxicology in Vitro, 2012, Published online, 26 (2012) 125–132

Doi: 10.1016/j.tiv.2011.10.006



The antioxidant properties of different phthalocyanines

Guilherme Pires Amaral^a, Gustavo Orione Puntel^b, Cristiane Lenz Dalla Corte^a, Fernando Dobrachinski^a, Rômulo Pillon Barcelos^a, Luiza Lena Bastos^a, Daiana Silva Ávila^b, João Batista Teixeira Rocha^a, Edegar Ozorio da Silva^a, Robson Luiz Puntel^b, Félix Alexandre Antunes Soares^{a,*}

^a Departamento de Química, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Campus UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Campus Uruguaiana, Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA, BR-472 Km 7, Uruguaiana 97500-970, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 April 2011
Accepted 8 October 2011
Available online 17 October 2011

Keywords:

Antioxidant
Lipid peroxidation
Deoxyribose
Phthalocyanine
Metallophthalocyanine

ABSTRACT

Oxidative stress is involved in the etiology of several chronic diseases, including cardiovascular disease, diabetes, cancer, and neurodegenerative disorders. From this perspective, we have evaluated the possible antioxidant capacities of five different phthalocyanines (PCs), consisting of four metallophthalocyanines (MPCs) and one simple phthalocyanine (PC) in order to explore, for the first time, the potential antioxidant activities of these compounds. Our results show that all PCs tested in this study have significant antioxidant activity in lipid peroxidation assay, providing protection from sodium nitroprusside-induced oxidative damage to supernatant from the homogenized liver, brain, and rim of mice. Compared to the non-induced control, the PCs were generally more efficient in reducing malondialdehyde levels in all assays on lipid peroxidation induced by sodium nitroprusside; the order of approximate decrease in efficiency was as follows: manganese-PC (better efficiency) > copper-PC > iron-PC > zinc-PC > PC (worst efficiency). Furthermore, the copper-PC and manganese-PC compounds exerted a significant protective effect in deoxyribose degradation assays, when employing Fe^{2+} , $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, and H_2O_2 solutions. In conclusion, all PCs tested here were shown to be promising compounds for future in vivo investigations, because of their potential antioxidant activities in vitro.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Phthalocyanines (PCs) are macrocyclic complexes whose π systems (bonds in which the atomic orbitals overlap in parallel, forming an electron density cloud above and below the internuclear axis) (Graham Solomons and Fryhle, 2001; Pine et al., 1982) are delocalized over an arrangement of conjugated carbon and nitrogen atoms, providing for their unique chemical and physical properties (Fig. 1) (Leznoff and Lever, 2004; Mckeown, 1998). Due to the significance of the structural component of the π system in PCs, studies on the nature of the π system and attempts to modulate it have been intensively investigated (Day et al., 1975;

Svetlana et al., 1996). Many of the properties of PCs are highly dependent on the extent of intermolecular π - π stacking interactions between the planar faces of the macrocycles. PCs as metal complexes, generated by replacement of the hydrogen atoms in the central cavity, are usually called metallophthalocyanines (MPCs), and these central metal ions play a critical role in regulating the properties of MPCs (Hanack et al., 2001). Thus, since the structural arrangement of MPCs is determined by the size and location of the metal ion center, in relation to the mean plane of the aromatic PC ligand, several conformations have been described (Barthel et al., 2002).

PCs and related macrocycles are of great interest due to the variety of interesting optoelectronic and coordination properties they display (Beltrán et al., 2004; Leznoff and Lever, 2004; Mckeown, 1998; Mitzel et al., 2004), and they serve as active components in several diverse fields (Cook and Mater, 1996; Emmelius et al., 1989). The applicability of these complexes has been investigated in different areas, especially in materials science (de la Torre et al., 1998; Farren et al., 2002; Loosli et al., 2005; Mizuguchi and Matsumoto, 1999; Nazeeruddin et al., 1998; Pandey and Herman, 1998; Sies, 1985) and in therapeutic medicine (Pandey and Herman, 1998); examples include photodynamic therapy (PDT) and catalytic therapy (CT). They are also emerging modalities for

Abbreviations: PCs, phthalocyanines; MPCs, metallophthalocyanines; simple PC, 29H, 31-phthalocyanine; CuPC, copper(II) phthalocyanine; MnPC, manganese(II) phthalocyanine; ZnPC, zinc phthalocyanine; FePC, iron(II) phthalocyanine; SNP, sodium nitroprusside; PDT, photodynamic therapy; CT, catalytic therapy; ROS, reactive oxygen species; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; DMSO, dimethyl sulfoxide; MDA, malondialdehyde; S1, supernatant fraction; $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate; DCF, 2,6-dichloroindophenol sodium salt hydrate; NO, nitric oxide; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; TCA, trichloroacetic acid; TBA, thiobarbituric acid; RS, reactive species; BSA, bovine serum albumin.

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 9522; fax: +55 55 3220 8978.

E-mail address: felix_antunes_soares@yahoo.com.br (F.A.A. Soares).

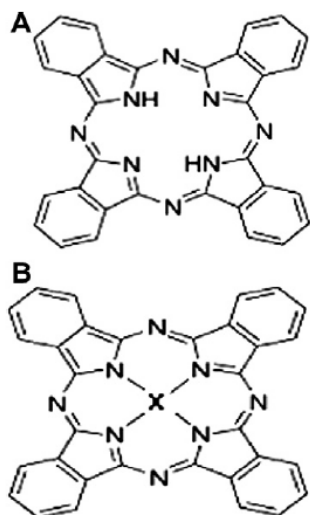


Fig. 1. The chemical structure of phthalocyanine (PC) (A). The chemical structures of MPCs [copper(II) phthalocyanine (CuPc), manganese(II) phthalocyanine (manganese-nPc), zinc phthalocyanine (zinc-PC), iron(II) phthalocyanine (iron-PC)] were obtained by replacing X by one of the following metals: Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , and Fe^{2+} , respectively (B).

the treatment of neoplastic and non neoplastic diseases such as cancer, skin disorders, and macular degeneration. Photodynamic therapy involves the administration of a photosensitizing drug (PCs) and its subsequent activation by light to produce reactive oxygen species and/or free radicals that selectively destroy target cells (Dougherty et al., 1998; Hasan et al., 2002).

Catalytic therapy (CT) is a cancer treatment modality that employs a transition metal complex as a catalyst and a second molecule as a substrate. Catalytic therapy is similar to photodynamic therapy (PDT), and is another approach to cancer treatment (Dougherty et al., 1998). This radiation-based approach for the treatment of solid malignancies involves the systemic or local administration of a photosensitizing agent (PCs), followed by irradiation with an appropriate wavelength of visible light. Photodynamic therapy has proved to be successful in the treatment of a broad range of diverse solid tumors; however, its use is limited to tissues and areas accessible to light or light-producing devices (Brown et al., 2004; Juzeniene et al., 2006; Triesscheijn et al., 2006). In contrast, CT is potentially a more versatile cancer treatment modality, which, although also based on the generation of reactive oxygen species (ROS), uses a combination of substrate molecules and a catalyst in place of light irradiation (Feofanov et al., 2000). Mechanisms underlying the anti-tumor action of CT are similar to X-ray therapy and PDT cancer treatments, in that CT's actions are dependent on the production of ROS, which subsequently induces oxidative degradation of critical cellular molecules and organelles (Fuchs et al., 2000; Heck et al., 2004, 2003; Plaetzer et al., 2005). However, until the present study, there have not been any studies depicting the possible antioxidant properties of the PCs.

It is important to consider that biomolecular reactions involving free radicals, and their relationship with oxidative stress, have been the subject of a multitude of scientific investigations, and this research consistently tops the list of current topics in health and medicine (Balentine, 1982; Ji, 1995). Oxidative stress is related to an imbalance between the production of reactive species and the strength of the antioxidant defenses, which can result in several impairments of cell function, culminating in cell death (Grune et al., 2001; Scott, 1997). It has been suggested that when exacerbated, oxidative stress, which is present during normal cell metabolism, is involved in the etiology of several chronic diseases, including

cardiovascular disease, diabetes, cancer, and neurodegenerative disorders (Grune et al., 2001; Scott, 1997). On the other hand, antioxidant intake has emerged as an alternative therapeutic approach for several pathological conditions related to oxidative damage in the biological systems responsible for normal cell functions (Scott, 1997; Simic and Karel, 1980).

Antioxidant defenses belong to two major groups: (1) those preventing the initiation of a peroxidative chain reaction, and (2) those slowing down the progression of a peroxidative chain reaction (Puntel et al., 2009; Simic and Karel, 1980). Research focused on the elucidation of the antioxidant and therapeutic properties of new chemical compounds have been continuously performed by our research group (de Avila et al., 2006; de Lima Portella et al., 2008; Puntel et al., 2009). Consistent with this line of research progress, we have conducted the present studies on the antioxidant potential of PCs, as well as the elucidation of the mechanisms of action of the PCs.

Thus, considering the relevance of oxidative stress in medicine in general, and the increasing interest in PCs compounds in particular, our research group is concerned with the elucidation of possible antioxidant potentials for five different PCs. To elucidate their potential use as antioxidant compounds, we have performed the present in vitro study which analyzed four MPCs and one PC.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Oxidant agents including hydrogen peroxide, and FeSO_4 were obtained from local suppliers. PCs [29H, 31-phthalocyanine (PC), copper(II) phthalocyanine (copper-PC), manganese(II) phthalocyanine (manganese-PC), zinc phthalocyanine (zinc-PC), iron(II) phthalocyanine (iron-PC)], sodium nitroprusside (SNP), the purity of each compound is respectively 98%, 97%, 90%, $\geq 90\%$, 90% and 99–102%, and other reagents were supplied by Sigma–Aldrich Chemical.

2.2. Animals

Untreated 40 adult male Swiss albino mice 50–60 days old, weighing 25–35 g, were used. These mice were obtained from our own breeding colony. The animals were maintained in an air conditioned room (20–25 °C) under a 12 h light/dark cycle, and with water and food provided ad libitum. All experimental procedures were conducted according to guidelines of the Committee of Care and Use of Experimental Animal Research of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

2.3. Assays with tissue homogenates

2.3.1. Tissue preparation

Mice were sacrificed by cervical dislocation, and the liver, kidneys, and brain were quickly removed, placed on ice, and homogenized in 10 volumes of cold, Tris buffer (10 mM, pH 7.4). The homogenates were centrifuged at $4000\times g$ at 4 °C for 10 min to yield a low-speed supernatant fraction (S1) for each tissue (liver, kidney and brain) that was used for SNP-induced lipid peroxidation and $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ assays.

2.3.2. SNP-induced lipid peroxidation assay

The antioxidant effect of the PCs was evaluated against production of SNP (5 μM)-induced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), using vehicle, dimethyl sulfoxide (DMSO), or PCs (1–100 μM). The S1 was pre-incubated for 1 h at 37 °C in a buffered medium with the PCs in the presence or absence of SNP. TBARS formation was determined spectrophotometrically at 532 nm,

using malondialdehyde (MDA) as a standard, according to Ohkawa et al. (1979). In this work we used the SNP as a mechanism of toxicity, in a concentration of 5 μM according to previously described (Puntel et al., 2009). In fact, sodium nitroprusside (SNP) is a good chemical inducer of lipid peroxidation in mice tissues (Rauhala et al., 1998), since it release in a short-lasting time NO. in tissue preparations.

2.3.3. Not-induced lipid peroxidation assay

The antioxidant effect of the PCs was evaluated against basal production of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), using vehicle, dimethyl sulfoxide (DMSO), or PCs (1–100 μM). The S1 was pre-incubated for 1 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a buffered medium with the PCs. TBARS formation was determined spectrophotometrically at 532 nm, using malondialdehyde (MDA) as a standard, according to Ohkawa et al. (1979).

2.3.4. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ assay

S1 was used for the 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) oxidation assay to evaluate levels of RS (reactive species). S1, in Tris buffer (10 mM, pH 7.4) was incubated with different PCs at concentrations of 1, 5, 10, 50, and 100 μM at 37 $^{\circ}\text{C}$. After 1 h, aliquots were removed, $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (7 μM) was added to the medium, and incubation was continued for 1 h in the dark. Fluorescence was determined using 488 nm for excitation and 520 nm for emission. A standard curve was created using increasing concentrations of 2,6-dichloroindophenol sodium salt hydrate (DCF) incubated in parallel (Pérez-Severiano et al., 2004). The results were analyzed as a percentage value in relation to the control group.

2.3.5. Protein determination

The protein content was determined according to Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.4. Assays without tissue homogenates

2.4.1. Nitric oxide (NO) scavenging assay

The scavenging of NO was assessed by incubating SNP (5 mM, in potassium buffer) with different PC concentrations at 25 $^{\circ}\text{C}$. After 120 min, 0.5 mL of incubation solution was sampled and mixed with 0.5 mL of Griess reagent (Green et al., 1981), and the absor-

bance was measured at 550 nm. The amount of nitrite was calculated using different concentrations of sodium nitrite. A curve of sodium nitrite, constructed in the presence of the PCs in order to verify interaction with nitrite, depicted no interference of PCs with the color development after addition of Griess reagent. The values were compared to a control to determine the percentage of inhibition of nitrite reaction with Griess reagent, depicted by the PCs, as an index of the NO scavenging activity (Marcocci et al., 1994).

2.4.2. DPPH. radical scavenging activity assay

The measurement of a PC's scavenging activity against the radical (DPPH.) was performed in accordance with Choi et al. (2002). Briefly, 85 μM DPPH. was added to a medium containing different PCs concentrations. The medium was incubated for 30 min at room temperature, and the decrease in absorbance measured at 518 nm depicted the scavenging activity of the PCs against DPPH. (Puntel et al., 2009). The values are expressed as percentage of inhibition of DPPH. absorbance in relation to the control values without the PCs.

2.4.3. Deoxyribose degradation assay

The deoxyribose degradation assay was performed according to Puntel et al. (2005). Briefly, the reaction medium was prepared containing the following reagents at the final concentrations indicated: PCs (concentrations indicated in the figures), deoxyribose (3 mM) ethanol (5%), potassium phosphate buffer (0.05 mM, pH 7.4), FeSO_4 (50 μM), and H_2O_2 (500 μM). Solutions of FeSO_4 and H_2O_2 were made prior to use. Reaction mixtures were incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min and stopped by the addition of 0.8 mL of trichloroacetic acid (TCA) 2.8%, followed by the addition of 0.4 mL of thiobarbituric acid (TBA) 0.6%. Next, the medium was incubated at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min and the absorbance was recorded at 532 nm (Gutteridge, 1981; Halliwell and Gutteridge, 1981). Standard curves of MDA were made for each experiment to determine the MDA generated by the deoxyribose degradation. The values are expressed as a percentage of control values (without PCs).

2.5. Statistical analysis

Statistical significance was assessed by one-way ANOVA, followed by the Student–Newman–Keuls test for post-hoc

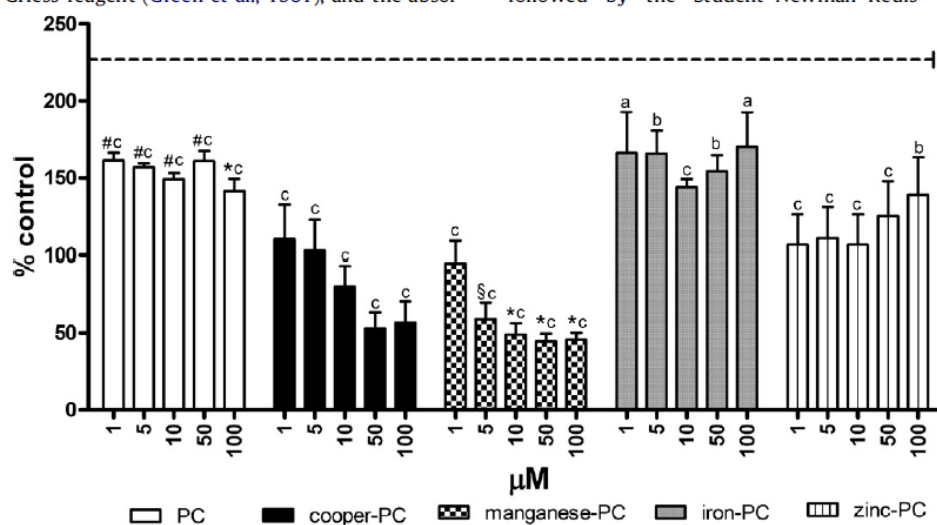


Fig. 2. Effect of PC (phthalocyanine), cooper-PC (copper(II) phthalocyanine), manganese-PC (manganese(II) phthalocyanine), iron-PC (iron(II) phthalocyanine), and zinc-PC (zinc phthalocyanine) on the SNP (sodium nitroprusside)-induced lipid peroxidation assay, in S1 from mouse liver. Values are expressed as % of control not induced, 36.6 nmol MDA/mg protein (C). [#] $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, compared to control induced (–) by SNP (5 μM). Data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). ^{*} $p < 0.05$, [§] $p < 0.001$, compared to control not induced by Student–Newman–Keuls test for post-hoc comparison.

comparison and two-way ANOVA. Results were considered statistically significant at values of $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$.

3. Results

3.1. The chemical structures of PCs

The chemical structure of a PC is shown in Fig. 1A. The chemical structures of MPCs (copper-PC, manganese-PC, zinc-PC, and iron-PC) were obtained by replacing X with one of the following metals: Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , or Fe^{2+} , respectively (Fig. 1B).

3.2. SNP-induced lipid peroxidation assay

The PC significantly decreased the SNP-induced lipid peroxidation in liver, kidney, and brain tissues of mice at concentrations ranging from 1 to 100 μM (Figs. 2–4, respectively).

Similarly, cooper-PC (Figs. 2–4), and manganese-PC (Figs. 2–4) significantly decreased SNP-induced lipid peroxidation in liver, kidney, and brain at all tested concentrations (1–100 μM). Moreover, the manganese-PC was able to decrease the lipid peroxidation to levels lower than those of the controls, both in liver, and brain tissues (Figs. 2 and 4, respectively).

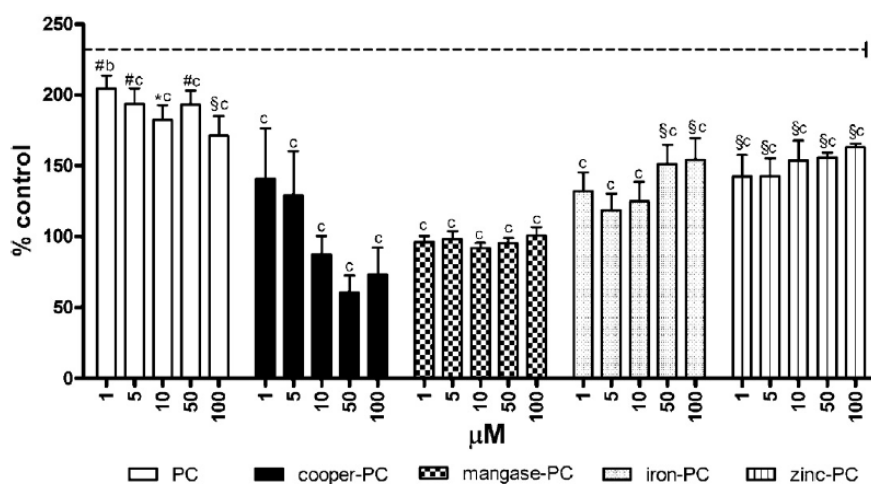


Fig. 3. Effect of PC (phthalocyanine), cooper-PC (copper (II) phthalocyanine), manganese-PC (manganese(II) phthalocyanine), iron-PC (iron(II) phthalocyanine), and zinc-PC (zinc phthalocyanine) on the SNP (sodium nitroprusside)-induced lipid peroxidation assay, in S1 from mouse kidney. Values are expressed as % of control not induced, 36.6 nmol MDA/mg protein. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, compared to control induced (–) by SNP (5 μM). Data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). [#] $p < 0.05$, [§] $p < 0.001$, compared to control not induced by Student–Newman–Keuls for post-hoc comparison.

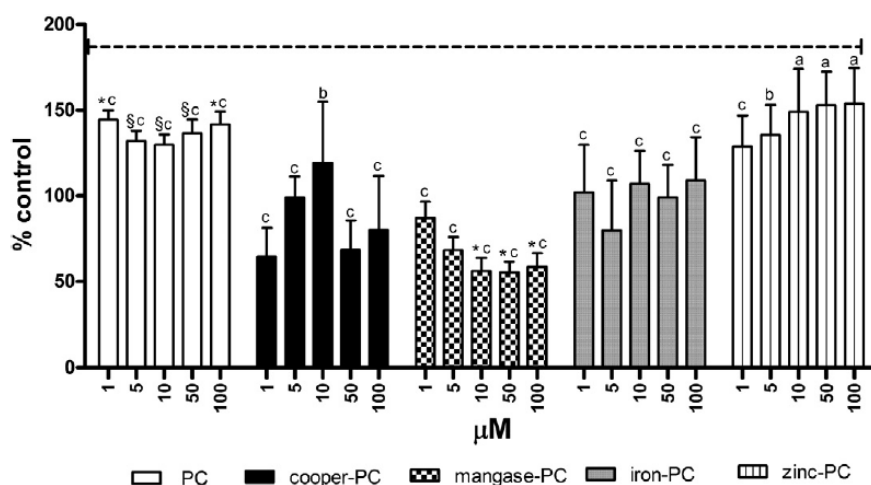


Fig. 4. Effect of PC (phthalocyanine), cooper-PC (copper(II) phthalocyanine), manganese-PC (manganese(II) phthalocyanine), iron-PC (iron(II) phthalocyanine), and zinc-PC (zinc phthalocyanine) on the SNP (sodium nitroprusside)-induced lipid peroxidation assay, in S1 from mouse brain. Values are expressed as % of control not induced, 36.6 nmol MDA/mg protein. ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.001$, compared to control induced (–) by SNP (5 μM). Data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). [#] $p < 0.05$, [§] $p < 0.001$, compared to control not induced by Student–Newman–Keuls test for post-hoc comparison.

The iron-PC at the same concentrations (1–100 μM) significantly decreased the SNP-induced lipid peroxidation in liver, kidney, and brain tissues of mice (Figs. 2–4, respectively) to the control levels. However, in kidney, the iron-PC at 50 and 100 μM , was not able to achieve the control levels.

The zinc-PC, at all tested concentrations, significantly decreased the SNP-induced lipid peroxidation in liver, kidney, and brain tissues of mice (Figs. 2–4 respectively) to the control levels. However, in kidney, the zinc-PC was less effective.

In the liver, manganese-PC and copper-PC induced lipid peroxidation levels that were significantly lower than that of PC at concentrations of 1, 5, 10, 50, and 100 μM (Fig. 2). Iron-PC and zinc-PC in the liver demonstrated no significant difference compared to PC at all concentrations used in this study (Fig. 2). In the liver, manganese-PC demonstrated reduction of SNP-induced lipid peroxidation levels that was lower than that of iron-PC at concentrations of 1, 5, 10, 50, and 100 μM (Fig. 2).

In addition, manganese-PC decreased the levels of lipid peroxidation in the liver at concentrations of 5, 10, 50, and 100 μM as

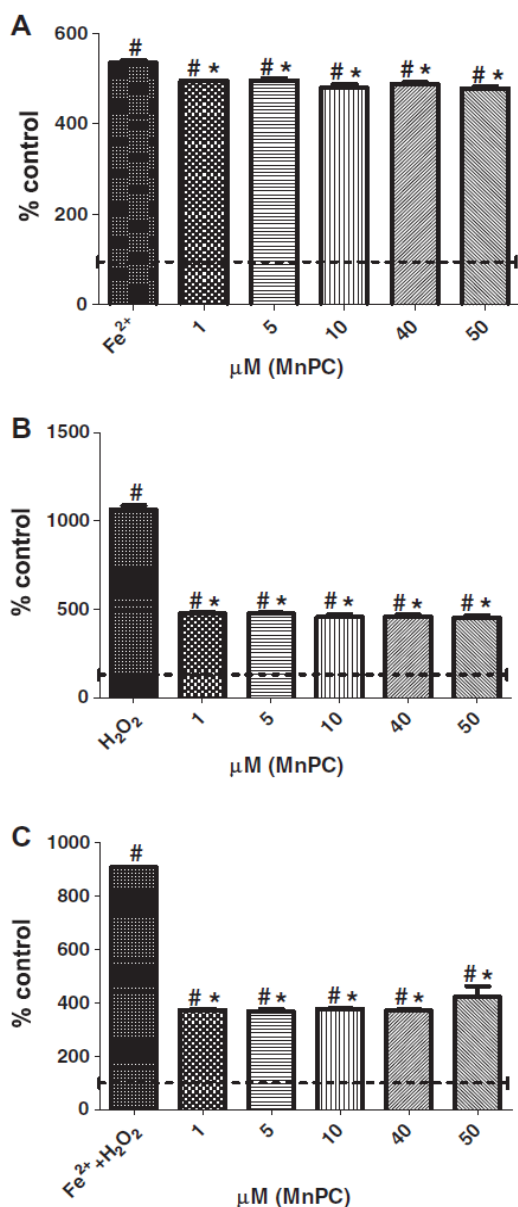


Fig. 5. Effect of manganese-Pc (manganese(II) phthalocyanine) on deoxyribose degradation assay. Values are expressed as % of control not induced, 0.94 $\mu\text{M/g}$ deoxyribose (—). * $p < 0.001$, compared to control induced by Fe^{2+} 50 μM (A), H_2O_2 500 μM (B), and Fe^{2+} 50 μM plus H_2O_2 500 μM (C). Data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). # $p < 0.001$, compared to control not induced by Student–Newman–Keuls test for post-hoc comparison.

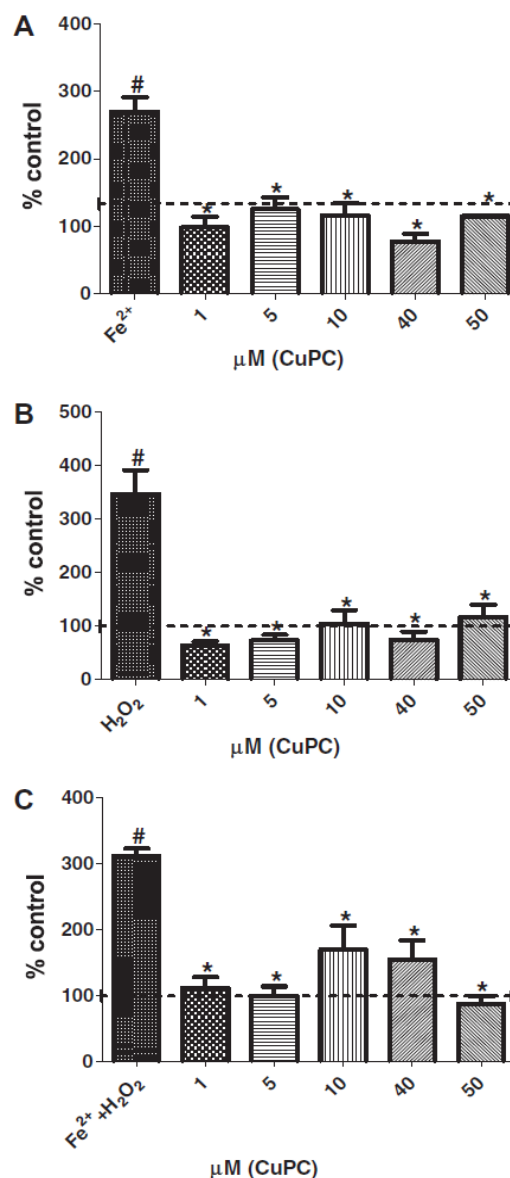


Fig. 6. Effect of copper-Pc (copper(II) phthalocyanine) on deoxyribose degradation assay. Values are expressed as % of control not induced, 0.94 $\mu\text{M/g}$ deoxyribose (—). * $p < 0.001$, compared to control induced by Fe^{2+} 50 μM (A), H_2O_2 500 μM (B), and Fe^{2+} 50 μM plus H_2O_2 500 μM (C). Data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). # $p < 0.001$, compared to control not induced by Student–Newman–Keuls test for post-hoc comparison.

compared with that of zinc-PC (Fig. 2). Copper-PC induced lower levels of lipid peroxidation in the liver at concentrations of 5, 10, 50, and 100 μM than iron-PC did (Fig. 2). In addition, copper-PC induced lower levels of lipid peroxidation in the liver at concentrations of 50 and 100 μM than zinc-PC did. There was no significant difference between copper-PC and manganese-PC in the liver at the concentrations used in this study (Fig. 2). At a concentration of 5 μM , iron-PC induced lipid peroxidation levels that were lower than that of zinc-PC (Fig. 2, $p < 0.05$).

In the kidney, PC increased levels of lipid peroxidation at concentrations of 1, 5, 10, 50, and 100 μM as compared to that of manganese-PC (Fig. 3). PC also increased levels of lipid peroxidation in the kidney at concentrations of 1 and 5 μM as compared to that of iron-PC, and demonstrated no difference compared to that of zinc-PC (Fig. 3, $p < 0.05$).

There was no significant difference between copper-PC and manganese-PC in the kidney at the concentrations used in this study (Fig. 3). In the kidney, copper-PC effected lower levels of lipid peroxidation than iron-PC did at concentrations of 50 and 100 μM (Fig. 3, $p < 0.05$).

In addition, copper-PC induced lower levels of lipid peroxidation in the kidney at concentrations of 10, 50, and 100 μM than zinc-PC did (Fig. 3). Manganese-PC induced no significant difference in the kidney in relation to that of iron-PC and zinc-PC (Fig. 3). There was no difference between iron-PC and zinc-PC (Fig. 3, $p < 0.05$).

In the brain, PC induced higher levels of lipid peroxidation compared to that of copper-PC and manganese-PC. There was no significant difference between PC compared to iron-PC and zinc-PC (Fig. 4, $p < 0.05$).

In the brain, manganese-PC effected lower levels of lipid peroxidation than zinc-PC did at concentrations of 5, 10, 50, and 100 μM , and at 10 μM compared to that of copper-PC (Fig. 4). Iron-PC resulted in no significant difference in the brain in relation to manganese-PC, zinc-PC, and copper-PC (Fig. 4). Compared to zinc-PC, copper-PC induced lower levels of lipid peroxidation in the brain at concentrations of 1, 50, and 100 μM (Fig. 4, $p < 0.05$).

3.3. Not-induced lipid peroxidation assay

The manganese-PC (Figs. 7 and 8) significantly decreased the basal lipid peroxidation in liver and brain at all tested concentrations (1–100 μM). Moreover, the manganese-PC was able to decrease the

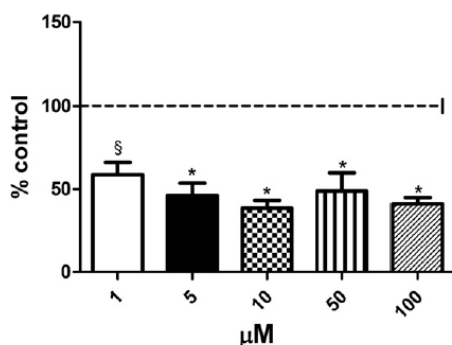


Fig. 7. Effect of manganese-PC (manganese(II) phthalocyanine) on the not-induced lipid peroxidation assay, in S1 from mouse liver. Values are expressed as % of control (—), 36.6 nmol MDA/mg protein. Data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.01$, § $p < 0.001$, compared to control by Student–Newman–Keuls test for post-hoc comparison.

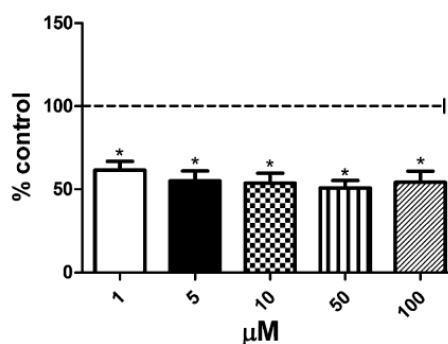


Fig. 8. Effect of manganese-PC (manganese(II) phthalocyanine) on the not-induced lipid peroxidation assay, in S1 from mouse brain. Values are expressed as % of control (—), 36.6 nmol MDA/mg protein. Data are presented as the mean \pm S.E.M. ($n = 3$). * $p < 0.01$, compared to control by Student–Newman–Keuls test for post-hoc comparison.

lipid peroxidation to levels lower than those of the controls, both in liver, and brain tissues (Figs. 7 and 8, respectively).

The PC, copper-PC, Zinc-PC, and iron-PC did not show any antioxidant effects in basal-lipid peroxidation (data not shown).

3.4. $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, nitric oxide (NO) scavenging and DPPH, radical scavenging activity assays

The PC and MPCs did not show any antioxidant effects in tests involving $\text{H}_2\text{DCF-DA}$, nitric oxide (NO) scavenging and DPPH, radical scavenging activities (data not shown).

3.5. Deoxyribose degradation assay

We evaluated the effect of manganese-PC and copper-PC in the assay for degradation of deoxyribose, because these two compounds showed better results when tested in SNP-induced lipid peroxidation, compared to PC, zinc-PC, and iron-PC.

The manganese-PC (1–50 μM) significantly decreased the deoxyribose degradation induced by H_2O_2 (Fig. 5B), however it was less able to reduce the Fe-induced deoxyribose degradation (Fig. 5A). Additionally, the manganese-PC effect against $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$ -induced deoxyribose degradation (Fig. 5C) was at the same magnitude as seen for Fe^{2+} alone, indicating that manganese-PC interferes with H_2O_2 without affecting Fe^{2+} chemistry.

In contrast, the copper-PC (1–50 μM) significantly decreased the deoxyribose degradation induced by Fe^{2+} or H_2O_2 alone, however, it showed no additional protective effect in the Fenton reaction ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$) (Figs. 6A–C, respectively).

4. Discussion

In the current study, our research group investigated and clarified the antioxidant properties of four different MPCs and a PC, because of the relevance of these compounds in the contexts of oxidative stress, disease etiology, and for the progress of medicine (Balentine, 1982; Ji, 1995). The experiments performed in this study revealed a significant antioxidant capacity of PCs against lipid peroxidation induced by SNP in all tested tissues (Figs. 2–4). Results from the present study showed more significant antioxidant effects in trials using copper-PC and manganese-PC (Figs. 2–4, respectively). Additionally, lipid peroxidation assays revealed that iron-PC and zinc-PC have less significant antioxidant effects in kidney samples (Fig. 3, respectively) compared with samples

of liver and brain (Figs. 2 and 4, respectively). Thus, we believe that some chemical change should have occurred in the extruded iron-PC and zinc-PC complexes, due to biological metabolism of the kidney enzymes, by mechanisms not yet known.

On the other hand, the PC and the MPCs did not prevent RS formation, as indicated by the H₂DCF-DA assay, at all concentrations tested (data not shown). This particular assay corresponds to a nonspecific assay, where generated RS oxidizes H₂DCF-DA, resulting in the generation of a fluorescent sub-product (Pérez-Severiano et al., 2004), whose production was not prevented by the presence of a PC, or by the presence of the various MPCs employed in the study. Nevertheless, manganese-PC and copper-PC showed antioxidant effects in the deoxyribose degradation assay (Figs. 5 and 6, respectively), thereby justifying the continuation of this study after the antioxidant results against lipid peroxidation induced by SNP were determined (Figs. 2–4).

Similar to the findings in the SNP-induced lipid peroxidation, manganese-PC and copper-PC decreased oxidative stress induced by solutions of Fe²⁺, H₂O₂, and Fe²⁺ + H₂O₂ in the deoxyribose degradation assay (Fig. 5A–C, and Fig. 6A–C, respectively). However, manganese-PC did not show antioxidant effects as expressive as those found in SNP-induced lipid peroxidation (Figs. 2–4), although it had a significant antioxidant effect in the deoxyribose degradation assay (Fig. 5). We believe that further studies are necessary to understand this matter.

In addition, the PC and the MPCs had no effect in the DPPH and nitric oxide (NO) radical scavenging activity assays, (data not shown), which excludes the possibility that these PC compounds possess scavenging activity against the biologically relevant radicals, NO and DPPH. Thus, we suggest that the PC and the MPCs may be acting by avoiding the generation of free radicals, or blocking the oxidative action of free radicals against the lipids present in the cells from biological samples, or against the deoxyribose moiety. Furthermore, these PCs compounds can act by directly degrading hydroperoxides such as H₂O₂, which is a common mechanism used by antioxidants (Scott, 1997; Simic and Karel, 1980).

We believe that the mechanism of action of the PC and the MPCs is deeply related to resonance that occurs in the π system located in these structures (Leznoff and Lever, 2004; Mckeown, 1998) (Fig. 1A and B). The π systems in these compounds correspond to bonds in which atomic orbitals overlap in parallel, comprising an electron density cloud above and below the internuclear axis, for example, as in the 2p orbital of nitrogen and d orbital of metal, called a $p\pi-d\pi$ bond (Lee, 1999).

Thus, due to the fact that the copper-PC and the manganese-PC showed better antioxidant effects against lipid peroxidation induced by SNP (Figs. 2–4) compared to the PC, the iron-PC and the zinc-PC (Figs. 2–4, respectively), we hypothesize here that the relative effects found are due to a total resonance around the ring, resulting in a twist of the coordination of the metal center, thus making a bridge between the opposite sides of the structure in the MPCs. Moreover, the difference in results of one metal complex compared to another, must be a consequence of a better resonance with Cu²⁺ and Mn²⁺ in comparison to Fe²⁺ and Zn²⁺ present in the other MPC structures (Barthel et al., 2002; Day et al., 1975; Hanack et al., 2001; Leznoff and Lever, 2004; Mckeown, 1998; Svetlana et al., 1996).

Manganese-PC displayed a significant antioxidant effect per se to reduce the basal levels of lipid peroxidation in the liver and brain, which confirms the results of the SNP-lipid peroxidation assay. We can deduce that manganese-PC not only reversed the SNP-induced lipid peroxidation but also act to prevent possible oxidative stress because it was able to decrease the basal levels of oxidative stress (Figs. 7 and 8, respectively).

Comparative analysis of manganese-PC and copper-PC in the liver demonstrated a statistically similar effect in preventing lipid

peroxidation induced by SNP (Fig. 2). On the other hand, manganese-PC and copper-PC demonstrated better antioxidant activity than copper-PC, zinc-PC, and PC did in the liver, indicating that manganese-PC and copper-PC possess a better antioxidant mechanism for the prevention of SNP-induced lipid peroxidation (Fig. 2).

Copper-PC and zinc-PC in the liver presented very similar results and were superior to PC; together with the results of the other PC compounds, they support the existence of an antioxidant mechanism strongly reliant on the presence of metals in PC structure (Fig. 2).

Manganese-PC demonstrated an antioxidant activity similar to that of copper-PC, iron-PC, and zinc-PC in the liver (Fig. 3). On the other hand, copper-PC presented an antioxidant activity, prevention of lipid peroxidation, higher than that detected with the other PCs (Fig. 3). This indicates that the structure of copper PCs plays a key role in the reversal of renal cell lipid peroxidation (Fig. 3).

Copper-PC in the brain demonstrated a better antioxidant effect than PC and zinc-PC did in preventing SNP-induced lipid peroxidation (Fig. 4). In addition, manganese-PC in the brain yielded better results than zinc-PC did in the prevention of lipid peroxidation (Fig. 4). Other comparisons between PCs in the brain presented similar results, demonstrating that copper-PC and manganese-PC effected better antioxidant activities in brain structures than other PCs did, which is probably related to the presence of copper and manganese in the structure of the PCs (Fig. 4).

5. Conclusion

In conclusion, we believe that the PC and MPCs tested in this investigation deserve further attention as to their probable importance as antioxidants, especially due to the results obtained in assays of lipid peroxidation induced by SNP, lipid peroxidation not-induced and also due to the results of the deoxyribose degradation assay. In addition, our research group believes that copper-PC and manganese-PC have promising antioxidant potentials, as evidenced by the positive effects observed in comparison to the other metal complexes tested in our assays.

6. Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the FINEP research grant “Rede Instituto Brasileiro de Neurociência (IBN-Net)” # 01.06.0842-00 and the INCT for Excitotoxicity and Neuroprotection - MCT/CNPq, J.B.T.R and F.A.A.S. receive a fellowship from CNPq and Guilherme Pires Amaral, Rômulo Pillon Barcelos, Fernando Dobrashinski receive a fellowship from CAPES. Additional support was provided by FAPERGS.

References

- Balentine, J., 1982. Pathology of oxygen toxicity. New York, Academic Press.
- Barthel, M., Dini, D., Vagin, S., Hanack, M., 2002. An easy route for the synthesis of new axially substituted titanium (IV) phthalocyanines. *Eur. J. Org. Chem.* 3756, 3762.
- Beltrán, H.I., Esquivel, R., Sosa-Sánchez, A., 2004. Microwave assisted stereoselective synthesis of cis-substituted tin(IV) phthalocyanine dicarboxylates. Application as corrosion inhibitors. *Inorg. Chem.* 43, 3555–3557.
- Brown, S.B., Brown, E.A., Walker, I., 2004. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol.* 5, 497–508.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K., 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci.* 153, 1161–1168.

- Cook, M.J., Mater, J., 1996. Thin film formulations of substituted phthalocyanines. *J. Mater. Chem.* 6, 677–689.
- Day, V.W., Marks, T.J., Wachter, W.A., 1975. Large metal ion-centered template reactions. A uranyl complex of cyclopentakis (2-imino soindoline). *J. Am. Chem. Soc.* 97, 4519–4527.
- de Avila, D.S., Beque, M.C., Folmer, V., Braga, A.L., Zeni, G., Nogueira, C.W., Soares, F.A., Rocha, J.B., 2006. Diethyl 2-phenyl-2 tellurophenyl vinylphosphonate: an organotellurium compound with low toxicity. *Toxicology* 224, 100–107.
- de la Torre, G., Vazquez, P., Agullo-Lopez, F., Torres, T.J., 1998. The exciting world of nanocages and nanotubes. *Mater. Chem.* 8, 1671–1683.
- de Lima Portella, R., Barcelos, R.P., de Bem, A.F., Carratu, V.S., Bresolin, L., da Rocha, J.B., Soares, F.A., 2008. Oximes as inhibitors of low density lipoprotein oxidation. *Life Sci.* 19, 878–885.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., Peng, Q., 1998. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889–905.
- Emmelius, M., Pawlowski, G., Vollmann, H.W., 1989. Materials for Optical Data Storage. *Angewandte Chemie* 28, 1445–1471.
- Farren, C., Fitz Gerald, S., Beeby, A., 2002. The first genuine observation of fluorescent mononuclear phthalocyanine aggregates. *Chem. Commun. (Camb)* 6, 572–573.
- Feofanov, A.V., Grichine, A.I., Shitova, L.A., 2000. Confocal Raman microspectroscopy and imaging study of the raphthal in living cancer cells. *Biophys. J.* 78, 499–512.
- Fuchs, J., Weber, S., Kaufmann, R., 2000. Genotoxic potential of porphyrin type photosensitizers with particular emphasis on 5-aminolevulinic acid: implications for clinical photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 537–548.
- Graham Solomons, T.W., Fryhle, C.B., 2001. Aromatic compounds. *Organic Chemistry*. John Wiley and Sons, SP, LTC. 1, 528–563.
- Green, L.C., Wanger, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R., 1981. Analysis of nitrate and nitrite in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126, 131–138.
- Grune, T., Klotz, L., Gieche, J., Rudeck, M., Sies, H., 2001. Protein oxidation and proteolysis by the non radical oxidants singlet oxygen or peroxyxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1243–1253.
- Gutteridge, J.M.C., 1981. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependent free radical damage to amino acids and carbohydrates. *FEBS Lett.* 128, 343–346.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1981. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Lett.* 128, 347–352.
- Hanack, M., Schneider, T., Barthel, M., Shirk, J.S., Flom, S.R., Pong, R.G.S., 2001. Indium phthalocyanines and naphthalocyanines for optical limiting. *Coord. Chem. Rev.* 219, 235–258.
- Hasan, T., Moor, A., Ortel, B., 2002. Photodynamic therapy of cancer. *Cancer Med.* 489, 502.
- Heck, D.E., Gerecke, D.R., Vetrano, A.M., Laskin, J.D., 2004. Solar ultraviolet radiation as a trigger of cell signal transduction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195, 288–297.
- Heck, D.E., Vetrano, A.M., Mariano, T.M., Laskin, J.D., 2003. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J. Biol. Chem.* 278, 22432–22436.
- Ji, L.L., 1995. Oxidative stress and antioxidant response during exercise. *Radic. Biol. Med.* 6, 1079–1086.
- Juzeniene, A., Nielsen, K.P., Moan, J., 2006. Aspects of photodynamic therapy. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 25, 7–28.
- Lee, J.D., 1999. Coordination compounds. Concise inorganic chemistry. SP, editora Edgard Blücher LTDA, 99–121.
- Leznoff, C.C., Lever, A.B.P., 2004. Phthalocyanines: properties and applications. New York, VHC.
- Loosli, C., Jia, C., Liu, S.X., Haas, N., Dias, M., Levillain, E., Neels, A., Labat, G., Hauser, A., Decurtins, S., 2005. *J. Org. Chem.* 70, 4988–4992.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Marcocci, L., Maguire, J.J., Droy-Lefaix, M.T., Packer, L., 1994. The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 748–755.
- Mckeown, N.B., 1998. Phthalocyanine materials: synthesis, structure and function. Press syndicate of the University of Cambridge, Cambridge.
- Mitzel, F., Fitz, G.S., Beeby, A., Faust, R., 2004. The synthesis of arylalkyne-substituted tetrapyrrolineporphyrins and an evaluation of their potential as photosensitizers for photodynamic therapy. *Eur. J. Org. Chem.* 1136, 1142.
- Mizuguchi, J., Matsumoto, S.J., 1999. *Phys. Chem. A* 103, 614–616.
- Nazeeruddin, M.K., Humphry-Baker, R., Gratzel, M., Murrer, B.A., 1998. Efficient near IR sensitization of nanocrystalline TiO₂ films by ruthenium phthalocyanines. *Chem. Commun.*, 719–720.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Pandey, P.K., Herman, C.K., 1998. *Chem. Ind.* 18, 743.
- Pérez-Severiano, F., Rodríguez-Pérez, M., Pedraza-Chaverrí, J., Maldonado, P.D., Medina-Campos, O.N., Ortíz-Plata, A., Sánchez-García, A., Villeda-Hernández, J., Galván-Arzate, S., Aguilera, P., Santamaría, A., 2004. S-Allylcysteine, a garlic-derived antioxidant, ameliorates quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative damage in rats. *Neurochem. Int.* 45, 1175–1183.
- Pine, S.H., Hendrickson, J.B., Cram, D.J., Hammond, G.S., 1982. Substitutions at unsaturated carbon-aromatic compounds. *Organic chemistry*. In: Ricci, J., Amar, J.S., Wagley, S. (Eds.), *Chemico-biological interactions* cTokyo. McGraw-Hill international book company, pp. 596–697.
- Plaetzer, K., Kiesslich, T., Oberdanner, C.B., Krammer, B., 2005. Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. *Curr. Pharm. Des.* 11, 1151–1165.
- Puntel, G.O., de Carvalho, N.R., Gubert, P., Palma, A.S., Dalla Corte, C.L., Avila, D.S., Pereira, M.E., Carratu, V.S., Bresolin, L., da Rocha, J.B., Soares, F.A., 2009. Butane-2, 3-dionethiosemicarbazone: an oxime with antioxidant properties. *Chem. Biol. Interact.* 177, 153–160.
- Puntel, R.L., Nogueira, C.W., Rocha, J.B.T., 2005. Krebs cycle intermediates modulate thiobarbituric acid reactive species (TBARS) production in rat brain in vitro. *Neurochem. Res.* 30, 225–235.
- Rauhala, P., Khaldi, A., Mohanakumar, K.P., Chiueh, C.C., 1998. Apparent role of hydroxyl radicals on oxidative brain injury induced by sodiumnitropruside. *Free Rad. Biol. Med.* 24, 1065–1073.
- Scott, G., 1997. Antioxidants in science, technology, medicine and nutrition. Coll house, Albion Publishing.
- Sies, H., 1985. Oxidative stress. New York, Academic Press.
- Simic, M., Karel, M., 1980. Autoxidation in food and biological systems. Plenum Press, New York.
- Svetlana, V.K., Gilbert, S., Johan, E.V.L., 1996. Syntheses of trisulfonated phthalocyanines and their derivatives using boron (III) subphthalocyanines as intermediates. *J. Org. Chem.* 61, 5706–5707.
- Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J.H., Stewart, F.A., 2006. Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* 9, 1034–1044.

4. CONCLUSÕES

4.1 Conclusão geral

Baseando-se nos resultados obtidos nesse estudo torna-se razoável afirmar que todas as PCs aqui analisadas não apresentaram toxicidade, além de possuírem características antioxidantes relevantes referentes as particularidades de cada teste. Esses compostos testados apresentaram uma significativa proteção contra a lipoperoxidação em três distintos tecidos de camundongo diante de um agente indutor de dano oxidativo, em ensaios *in vitro*. Além disso, as MnPC e CuPC apresentaram uma significativa atividade protetora sobre a integridade da desoxirribose *in vitro* contra a ação de diferentes indutores de dano.

Dessa forma, pode-se inferir que apesar de boa parte das PCs corresponderem a compostos utilizados como pró-oxidantes em diferentes terapias contra câncer, algumas delas podem, em determinados casos, apresentar significativas propriedades antioxidantes *in vitro*, em condições as quais elas não sofram excitação e conseqüentemente não sejam capazes de gerar espécies reativas.

4.2 Conclusões específicas

De acordo com os resultados apresentados nesta dissertação podemos concluir que:

- ✓ A MnPC analisada apresentou efeito antioxidante *per se* nos ensaios de peroxidação lipídica em homogenatos de fígado e cérebro.
- ✓ Todas as PCs testadas preveniram a peroxidação lipídica induzida por NPS em fígado, cérebro e rins de camundongos, com melhores efeitos apresentados pelas MnPC e CuPC;
- ✓ As CuPC e MnPC previniram o dano oxidativo da desoxirribose diante de Fe^{2+} , H_2O_2 ou $Fe^{2+} + H_2O_2$.

- ✓ As PCs não foram capazes de apresentar efeito antioxidante significativo no ensaio de H₂DCF-DA.
- ✓ As PCs não apresentaram significativa atividade “scavenger” de ON;
- ✓ As PCs não foram capazes de exercer uma significativa ação “scavenger” de radical DPPH.

5. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, as perspectivas para trabalhos posteriores, em modelos *in vivo*, são:

- Ampliar os estudos sobre a toxicidade das PCs;
- Investigar parâmetros farmacológicos e/ou toxicológicos das PCs administradas por diferentes vias;
- Investigar o efeito das PCs sobre enzimas do sistema antioxidante, como SOD, CAT, entre outras;
- Ampliar os estudos sobre a peroxidação lipídica;
- Determinar a farmacocinética das PCs.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agirtas, M. S.; Cabir, B.; Özdemir, S. Novel metal (II) phthalocyanines with 3,4,5-trimethoxybenzyloxy-substituents: Synthesis, characterization, aggregation behaviour and antioxidant activity. *Dyes Pigm.*, (96), p. 152-157, 2013.

Al-Jaber, N. A.; Amani S. Awaad, A. S.; Moses, J. E. Review on some antioxidant plants growing in Arab world. *J. Saudi Chem. Soc.*, (15), p. 293–307, 2011.

Al-Raqa, S. Y. The synthesis and photophysical properties of novel, symmetrical hexadecasubstitued Zn phthalocyaninees and related unsymmetrical derivatives. *Dyes Pigm.*, (77), p. 259-265, 2008.

Albas, A. K.; Fausto, N.; Kumar, V. *Bases patológicas das doenças*. 8th. Elsevier medicina, 2010. 1480

Alderton, W. K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Bioch. J.*, (357), p. 593–615, 2001.

Barros, A. I. R. N. A., Nunes, F.M., Gonçalves, B., Bennett, R.N., Silva, A.P. Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chem.*, (128), p. 165–172, 2011.

Biyiklioglua, Z.; Durmus, M.; Kantekina, H. Synthesis, photophysical and photochemical properties of quinoline substituted zinc (II) phthalocyanines and their quaternized derivatives. *J. Photoch. Photob.*, (211), p. 32–41, 2010.

Braun, A.; Tcherniac, J. Über die produkte der einwirkung von acetanhydrid auf phthalamid. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, (40), p. 2709–2714, 1907.

Burton, G. W., Traber, M.G.. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu. Rev. Nutr.*, (10), p. 357–382, 1990.

Carocho, M.; Ferreira, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxic.*, (51), p. 15–25, 2013.

Corrêa, A. D.; Batista, R. S.; Quintas, L. E. M. *Plantas medicinais: do Cultivo à terapêutica*. Rio de Janeiro: Vozes, 1998.

De Diesbach, H.; Von Der Weid, E. Some salt complexes of o-dinitriles with copper and pyridine. *Helvetica Chim. Acta*, (10), p. 886-888, 1927.

Dougherty, T. J. et al. Photodynamic therapy. *J.Nat. Canc. Inst.*, (90), p. 889–905, 1998.

Esenpinar, A. A.; Durmus, M.; Bulut, M. Photophysical, photochemical and BSA binding/BQ quenching properties of quaternizable coumarin containing water soluble zinc phthalocyanine complexes. *Spect. Acta Part A: Molec. Biom. Spect.*, (79), p. 608–617, 2011.

Esenpinara, A. A.; Durmus, M.; Buluta, M. Tetra-3-[(2-diethylamino)ethyl]-7-oxo-4-methylcoumarin-substituted zinc phthalocyanines: Synthesis, characterization and aggregation effects on photophysical/photochemical properties. *J. Photoch. Photob. A: Chem.*, (213), p. 171–179, 2013.

Evan, A. P.; Gardner, K. D. Nephron obstruction in nordihydroguaiaretic acidinduced renal cystic disease. *Kidney Int*, (15), p. 7–19, 1979.

Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Abreu, R.M.V. Antioxidants in wild mushrooms. *Curr. Med. Chem.*, (16), p. 1543–1560, 2009.

Flora, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and mettaloid exposure. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, (2), p. 191–206, 2009.

Gabriel, D. et al. Effects of Subchronic Manganese Chloride Exposure on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Tissues: Oxidative Stress and Antioxidant Defenses. *Int. J. Paras.*, 2013.

Griffiths, H. R., Moller, L., Bartosz, G., Bast, A., Bertoni-Freddari, C., Collins, C., Cooke, M., Coolen, S., Haenen, G., Hoberg, A.M., Loft, S., Lunec, J., Olinski, R., Parry, J., Pompella, A., Poulsen, H., Verhagen, H., Astley, S.B., *Biom. Mol. Aspects Med.*, (23), p. 101-208, 2002.

Halliwell, B., Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*, (141), p. 312–322, 2006.

Halliwell, B., The wanderings of a free radical. *Free Rad. Biol. Med.*, (46), p. 531–542, 2009.

Halliwell, B.. Free radicals and antioxidants – quo vadis? *Trends Pharm. Scienc.*, (32), 2011.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. *Free Rad. Biol. Med.* 3rd. 1999.

Halliwell, B., Eds. *Free Rad. Biol. Medic.* Oxford University Press, Oxford University Pressed. 2007.

Halpner, A. D. et al. Protection by Vitamin C of Loss of Vitamin E in Cultured Rat Hepatocytes. *Arc. Bioch. Biophys.*, (15), p. 305–309, 1998.

Heugebaert, T. S. A.; Roman, B. I.; Stevens, C. V. Synthesis of isoindoles and related iso-condensed heteroaromatic pyrroles. *Chem. Soc. Rev.*, (41), p. 5626–5640, 2012.

Jee, J., Lim, S., Park, J., Kim, C. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, (63), p. 134–139, 2006.

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

Joung, T.; Nihei, K.; Kubo, I. Lipoxygenase inhibitory activity of octyl gallate. *J. Agric. Food Chem.*, (52), p. 3177–3181, 2004.

Kancheva, V. D. Phenolic antioxidants – radical-scavenging and chainbreaking activity: a comparative study. *Eur. J. Lipid Sc. Technol.*, (111), p. 1072–1089, 2009.

Kand'ár, R., Z'Áková, P., Muz'Áková, V. Monitoring of antioxidant properties of uric acid in humans for a consideration measuring of levels of allantoin in plasma by liquid chromatography. *Clin. Chim. Acta*, (365), p. 249–256, 2006.

Krimmel, B., Swoboda, F., Solar, S., Reznicek, G. OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products – a gamma radiolysis study. *Rad. Phys. Chem.*, (79), p. 1247–1254, 2010.

Krishnaiah, D.; Sarbatly, R.; Nithyanandam, R. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish. *Food Biop. Proc.* (8 9), p. 217–233, 2011.

Lambeth, J. D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free Rad. Biol. Med.*, (43), p. 332–347, 2007.

Lefer, D. J., Granger, D.N. Oxidative stress and cardiac disease. *Am. J. Med.*, (109), p. 315–323, 2000.

Lokesh, K. S.; Adriaens, A. Synthesis and characterization of tetra-substituted palladium phthalocyanine complexes. *D. Pigm.*, (96), p. 269-277, 2013.

Milowska, K.; Gabryelak, T. Enhancement of ultrasonically induced cell damage by phthalocyanines in vitro. *Ultras.* (48), p. 724–730, 2008.

Paiva, S. A. R., Russell, R.M. Carotene and other carotenoids as antioxidants. *J. Am. Coll. Nutr.*, (18), p. 426–433, 1999.

Pokorný, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *Eur. J. Lipid Sci. Tech.* (109), p. 629–642, 2007.

Prasad, A. S., Bao, B., Beck, F.W.J., Kuck, O., Sarkar, F.H. Antioxidant effect of zinc in humans. *Free Radic. Biol. Med.*, (37), p. 1182–1190, 2004.

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitot.*, (82), p. 513–523, 2011.

Rahman, K. Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clin. Inv. Aging*, (2), p. 219–236, 2007.

Ratnam, D. V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, N.M.V.R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J. Cont. Rel.*, (113), p. 189–207, 2006.

Rice-Evans C.A., M., N.J., Paganga, G.,. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* (20), p. 933–956, 1996.

Rosa, R. M. et al. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. *Mut. Res.*, (633), p. 35–45, 2007.

Smith, M. A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K. And Perry, G. Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Bioch. Biophys. Acta*, (1502), p. 139–144, 2000.

Steenvoorden, D. P. T., Henegouwen, G.M.J.B. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J. Photoch. Photob.* (41), p. 1–10, 1997.

Tabassum, A., Bristow, R.G., Venkateswaran, V. Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing? *Canc. Treat. Rev.*, (36), p. 230–234, 2010.

Terpinc, P., Polak, T., Šegatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N.P., Abramović, H. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. *Food Chem.*, (128), p. 62–68, 2011.

Turunen, M., Olsson, J., Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Bioch. Biophys. Acta*, (1660), p. 171–199, 2004.

Valko, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Cell. Biochem.*, (266), p. 37–56, 2004.

Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Bioch.*, (266), p. 37–56, 2004.

Valko, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Inter.*, (160), p. 1–40, 2006.

Yslas, E. I.; Durentini, E. N.; Rivarola, V. A. Zinc-(II) 2,9,6,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in photodynamic therapy *in vitro*. *Bioorg. Med. Chem.*, (15), p. 4651-4660, 2007.

Zhong, A.; Zhang, Y.; Bian, Y. Structures and spectroscopic properties of nonperipherally and peripherally substituted metal-free phthalocyanines: A substitution effect study based on density functional theory calculations. *J. Molec. Graph. Mod.*, (29), p. 470–480, 2010.

Zhou, R. et al. Phtalocyanines as sensitive material for chemical sensors. *Ap. Org. chem.*, (10), p. 557-577, 1996.