

ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DA PORFIRINA CATIÔNICA MESO-TETRAKIS (N-METIL-4-PIRIDIL) (TMPyP) EM PRESENÇA DE MICELAS IÔNICAS DE CTAB, SDS E HPS

SPECTROSCOPIC STUDIES OF CATIONIC MESO-TETRAKIS (4-N-METHYL-PYRIDINIUMYL) PORPHYRIN (TMPyP) IN THE PRESENCE OF IONIC MICELLES OF CTAB, SDS AND HPS

Tania Toyomi Tominaga¹, Dilcelli Soares², Marcelo Antonio Dal Santos², José Caetano Zurita da Silva², Christiane Philippini Ferreira Borges^{2*}

¹ Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO, Departamento de Física, Guarapuava, PR, Brasil

^{2*} Autor para contato: Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Campus em Uvaranas, Departamento de Química e Laboratório Interdisciplinar de Materiais Cerâmicos - CIPP, Ponta Grossa, PR, Brasil; (42) 220-3062 e 220-3151; e-mail: cpborges@uepg.br

Recebido para publicação em 21/09/2004

Aceito para publicação em 19/10/2004

RESUMO

O estudo das porfirinas e compostos semelhantes como drogas terapêuticas tem crescido nos últimos anos devido a algumas de suas propriedades: alta afinidade pelos tecidos tumorais, atividade fotodinâmica, alta fotoestabilidade e intensa absorção espectral onde os tecidos biológicos são relativamente transparentes. Neste trabalho, analisou-se a interação da porfirina catiônica meso-tetrakis (N-metil-4-piridil), TMPyP, com os detergentes N-hexadecil-N,N,dimetil-3-amônio-1-propanosulfato, HPS, brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB, e dodecil sulfato de sódio, SDS, na forma de micelas, utilizando-se absorção ótica na região do ultravioleta e do visível. Foram realizados experimentos para determinação de pK em meio aquoso e em acetato-fosfato na presença e ausência dos surfactantes. Os espectros obtidos foram analisados utilizando o algoritmo "Convex Constraint Algorithm" (CCA). Observou-se um equilíbrio em duas etapas envolvendo as espécies H_4TMPyP^{6+} , H_2TMPyP^{4+} e $TMPyP^{2+}$, estando o pK_1 abaixo de 1,5 e o pK_2 aparecendo acima de 12,5. O valor do pK_1 foi alterado devido à presença de micelas de SDS demonstrando uma interação porfirina-micela. A análise dos resultados experimentais apresentados indicou que a interação da porfirina aquo-solúvel TMPyP com os detergentes investigados é predominantemente decorrente de interações Coulombianas.

Palavras-chave: TMPyP, SDS, CTAB, HPS, pK

ABSTRACT

The importance of porphyrins and related compounds as therapeutic drugs has increased significantly over the last years. They have high affinity and toxicity for tumor tissues, high photostability, photodynamic activity, intense absorption in a spectral region where biological tissues are relatively transparent (around 600 nm). In the present work, optical absorption was used to study the interaction of cationic meso-tetrakis (4-N-methyl-pyridiniumyl)porphyrin (TMPyP) with HPS, CTAB and SDS. The surfactant concentrations were above their critical micelle concentration (cmc). The pH titration experiments were performed in order to determine the pK value of porphyrin, in an aqueous solution, and in acetate-phosphate, with or without surfactants. The absorption spectra obtained were analyzed by using the convex constraint algorithm (CCA). A two-step equilibrium involving H_4TMPyP^{6+} , H_2TMPyP^{4+} and $TMPyP^{2+}$ species was observed, then two pK values were determined. The pK_1 value was below 1,5 and the pK_2 value was above 12,5. The presence of micelles of SDS induced a decrease in the pK_1 value, indicating its interaction with porphyrin. In the presence of HPS and CTAB, no significant pK value changes were observed. Analyses of experimental data show that the interaction is significantly modulated by electrostatic factors.

Key words: TMPyP, SDS, CTAB, HPS, pK

Introdução

As porfirinas e seus derivados constituem uma classe de moléculas que desempenham papéis vitais no funcionamento de muitos sistemas bioquímicos tais como, fotossíntese, transferência de elétrons na cadeia respiratória e transporte e armazenamento de oxigênio (White *et al.*, 1968). Das várias aplicações das porfirinas e derivados, uma das mais significativas é a sua utilização na Medicina. O estudo das porfirinas e compostos semelhantes como drogas terapêuticas tem crescido nos últimos anos graças a algumas de suas propriedades: alta afinidade pelos tecidos tumorais, atividade fotodinâmica, alta fotoestabilidade e intensa absorção espectral em região na qual os tecidos biológicos são relativamente transparentes (em torno de 600 nm) (Bonnett, 1995; Kessel, 1984; Dougherty 1993; Hamblin, 1994; Dickson, 1995; Borissevitch *et al.*, 1996). Por essas propriedades as porfirinas possuem aplicações na Medicina: correção da desordem do metabolismo do heme, tratamento de psoríasis, ateromas, infecções bacterianas e virais, detecção de câncer por fluorescência, terapia fotodinâmica (TFD) (também conhecida como PDT, sigla de photodynamic

therapy).

A primeira geração de agentes fototerapêuticos, baseada em misturas de derivados porfirínicos, tem-se mostrado eficiente no tratamento de tumores de diversas procedências, malignos ou não. Esses agentes tendem a concentrar-se seletivamente no tecido lesado por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido. Sabe-se que a seletividade decorre da associação do agente fototerapêutico com as lipoproteínas do plasma, as quais o transportam para as células anormais, visto que essas células possuem um número muito grande de receptores de lipoproteínas de baixa densidade (Machado, 2000). Desse modo, incidindo-se luz de comprimento de onda de 630 nm, via fibra ótica, ocorre a fotossensibilização dessas porfirinas que interagem com as moléculas de oxigênio transferindo energia, assumindo uma forma ativa, podendo oxidar qualquer outro composto, provocando uma reação em cadeia que destrói as células cancerosas (Simplicio *et al.*, 2002). Atualmente, a terapia fotodinâmica é utilizada na detecção e no delineamento de lesões por fluorescência (Machado, 2000). Essa terapia já está sendo utilizada no Brasil, por exemplo, em pacientes no Hospital Sírio-Libanês, em São Paulo. Outras aplicações

envolvem o tratamento de psoríasis, ateromas, infecções bacterianas e virais (Kessel, 1984; Cannon, 1993).

As membranas, além da função de barreira que separa dois tipos de meio, são sistemas funcionais onde ocorrem fenômenos de penetração, transporte, diferenciação morfológica, entre outros (Stryer, 1992; Lehninger, 1995). Devido à complexidade das membranas biológicas, utilizam-se modelos mais simples, como detergentes na forma de micelas, para um estudo inicial de um grande número de fenômenos que ocorrem nas membranas, a fim de obter informações da interação de drogas com as membranas celulares (Borissevitch *et al.*, 1995; Song *et al.*, 1998; Collins-Gold, 1988; Lomax, 1993; Kalyanasundaram, 1987; Tominaga, 1997). O estudo da interação de porfirina com membranas e outros componentes do tecido e do sangue são importantes porque, em geral, as drogas são introduzidas através da corrente sanguínea em concentrações relativamente altas e podem provocar efeitos colaterais.

Estudos mostraram que as porfirinas altamente hidrofóbicas são capazes de penetrar na região lipídica de membranas, e as moderadamente hidrofóbicas distribuem-se preferencialmente nas partes polares de membranas ricas em proteínas (Ricchelli *et al.*, 1993). Embora estudos mostrem que as porfirinas polares se distribuem nos compartimentos aquosos, sendo desprezível sua ligação com membranas celulares (Ricchelli *et al.*, 1986), foram observadas interações de porfirinas sintéticas solúveis em água com micelas iônicas (Kadish *et al.*, 1991).

Uma vez que o estudo das propriedades espectroscópicas das porfirinas nas micelas pode dar subsídios importantes para a compreensão da interação das porfirinas com as membranas biológicas, e da relação dessa interação com a ação farmacológica, neste trabalho, determinou-se os pKs da porfirina catiônica *meso*-tetrakis (N-metil-4-piridil), TMPyP, na ausência e na presença de micelas de brometo de cetiltrimetilamônio, CTAB, dodecil sulfato de sódio, SDS, e N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato, HPS.

Materiais e Métodos

Na realização deste trabalho, utilizou-se a porfirina catiônica, cloreto de *meso*-tetrakis (N-metil-4-piridil), TMPyP, da Calbiochem, cuja estrutura molecular está apresentada na Figura 1.

Os surfactantes dodecil sulfato de sódio (SDS) e N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amônio-1-propano-sulfonato (HPS), ambos da Sigma, e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) da Riedel de Haën foram utilizados sem purificações prévias. Todas as soluções foram preparadas em água destilada e deionizada, e as medidas foram realizadas em temperatura de 20°C. Em todos os experimentos, foram utilizadas soluções frescas de porfirinas e surfactantes.

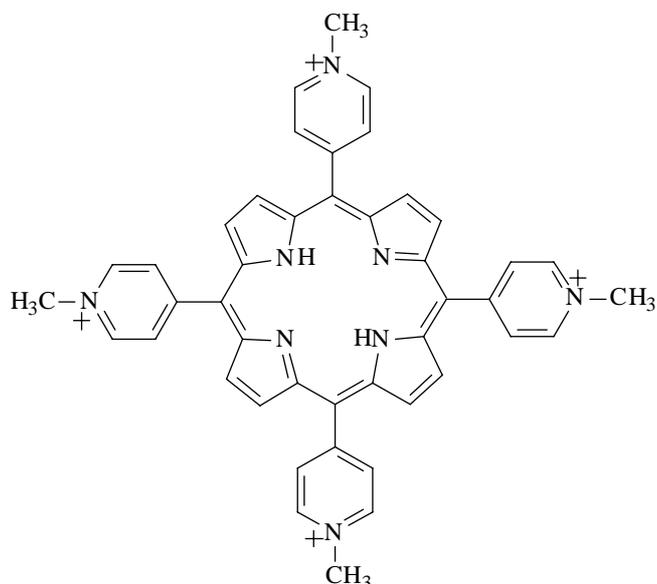


Figura 1 - Estrutura da porfirina catiônica TMPyP.

Para determinação dos pKs foram realizadas titulações das soluções da porfirina em função do pH em solução aquosa, em solução acetato-fosfato 20 e 250 mmol/L, na ausência e na presença de micelas de SDS, HPS e CTAB. O pH das soluções foi variado

de 0,5 a 14,0, utilizando-se soluções estoque de NaOH e HCl, tomando-se medidas a cada 0,5 unidade de pH. Os espectros de absorção na região ultravioleta e visível, analisados na faixa de 350 a 700 nm, foram obtidos em um espectrofotômetro Cary 100 Varian, utilizando-se uma cubeta de quartzo, com duas faces polidas e caminho ótico $l = 1,00$ cm. Assegurou-se que a absorbância das porfirinas fosse menor que 1,0 na banda de Soret. As medidas de pH das soluções foram realizadas em um pHmetro Digimed equipado com eletrodo de vidro de Ag/AgCl.

Nos experimentos em presença de surfactantes, as concentrações de surfactantes utilizadas foram maiores que a concentração micelar crítica, *cmc*, para garantir a completa interação porfirina-micela. Os valores das *cmcs* dos surfactantes estão apresentados na Tabela 1. Foram utilizadas concentrações de 40 mmol/L para SDS e 20 mmol/L para CTAB e HPS.

Tabela 1 - Valores de concentração micelar crítica dos detergentes SDS, HPS e CTAB.

surfactantes	cmc (mol/L)
SDS	$8,0 \times 10^{-3}$
HPS	$5,0 \times 10^{-5}$
CTAB	$9,2 \times 10^{-4}$

Os espectros de absorção obtidos foram analisados utilizando o algoritmo “Convex Constraint Algorithm” (CCA), que permitiu a decomposição de um conjunto de espectros em espectros bases que correspondem a diferentes formas no equilíbrio em função do pH. (Perczel *et al.*, 1992; Borissevitch *et al.*, 1996).

Os valores de pKs das porfirinas na ausência e na presença de micelas foram determinados através do ajuste dos dados utilizando-se a função sigmoideal. Para cada experimento, foram realizados pelo menos três titulações independentes e os resultados apresentados representam a média dos dados obtidos.

Resultados e discussão

Determinação de pK em solução homogênea

Alguns dos espectros obtidos na titulação da porfirina catiônica TMPyP em acetato-fosfato 20 mmol/L em função do pH na faixa de pH de 0,5 até 7,0 e de 7,0 até 14,0 estão apresentados nas Figuras 2a e 2b, respectivamente. Observa-se que tanto a acidificação (Figura 2a) quanto a alcalinização (Figura 2b) da solução de porfirina resultaram em um deslocamento espectral para comprimentos de onda maiores. Observa-se também a presença de um ponto isobéstico em 432 nm quando se diminui o pH da solução, e um outro ponto isobéstico em 436 nm quando se aumenta o pH da solução. Isso sugere a existência de três espécies na faixa de pH de 0,5 a 14,0.

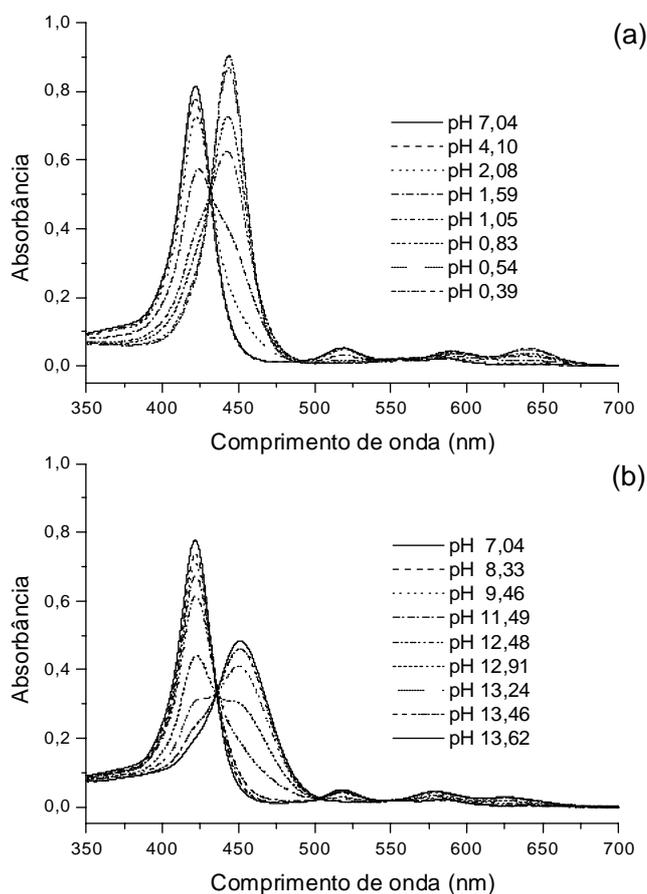


Figura 2 - Espectros de absorção na região visível e ultravioleta da porfirina TMPyP em acetato-fosfato 20 mmol/L em função do pH (a) na faixa de pH de 0,5 até 7,0 (b) na faixa de pH de 7,0 até 14,0.

As porfirinas catiônicas piridínio substituídas, quando em meio neutro, apresentam dois prótons nos nitrogênios pirrólicos, estando na forma de base livre (H_2P). Em meio ácido, a porfirina pode ser protonada por até dois H^+ , formando as espécies monoprotonada (H_3P^+) e diprotonada (H_4P^{2+}). Geralmente, as porfirinas apresentam coloração violeta quando protonadas, mas algumas porfirinas meso substituídas, entre elas a TMPyP, apresentam coloração verde na forma ácida. Esse comportamento é explicado pelas interações entre o anel piridil e o sistema π do macrociclo. Devido às interações de van der Waals e Coulombianas envolvidas, o anel perde a sua planaridade com a inserção do primeiro próton, aumentando as interações entre o substituinte meso e o anel porfirínico, originando a coloração verde. A nova configuração da molécula facilita a entrada do segundo próton (Liegel, 1996; Pasternack *et al.*, 1976). A determinação das duas constantes de protonação separadamente só é conseguida a partir do acompanhamento das bandas Q isoladamente. Analisando-se a região na banda de Soret, pode-se determinar somente a constante de ionização total da espécie diprotonada à base livre (Liegel, 1996).

Estudos conduzidos por Pasternack em meio aquoso, analisando a banda de Soret e as bandas Q, mostraram que a porfirina catiônica TMPyP apresenta duas transições na faixa de pH de 0 a 14. A primeira devido à transição da forma diprotonada, H_4TMPyP^{6+} , para base livre, H_2TMPyP^{4+} , e a segunda transição da forma H_2TMPyP^{4+} para a forma desprotonada, $TMPyP^{2+}$. Essa última transição provoca uma mudança de coloração acima do pH 14, formando a espécie desprotonada que apresenta espectro com banda de Soret centrada em 450 nm e bandas no visível em 577 e 623 nm (Pasternack *et al.*, 1972).

Com base nos resultados apresentados na literatura e nos resultados obtidos nesse trabalho propõe-se um equilíbrio na faixa de pH de 0,5 a 14,0 como mostra o esquema descrito a seguir:



Portanto, o conjunto de espectros experimentais apresentados nas Figuras 2a e 2b foi analisado

considerando-se como sendo resultante da combinação linear de três componentes puras: a espécie diprotonada, a base livre e a desprotonada. O resultado da análise dos espectros de absorção utilizando-se o algoritmo “Convex Constraint Algorithm” (CCA) estão apresentados nas Figuras 3a, 3b e 3c.

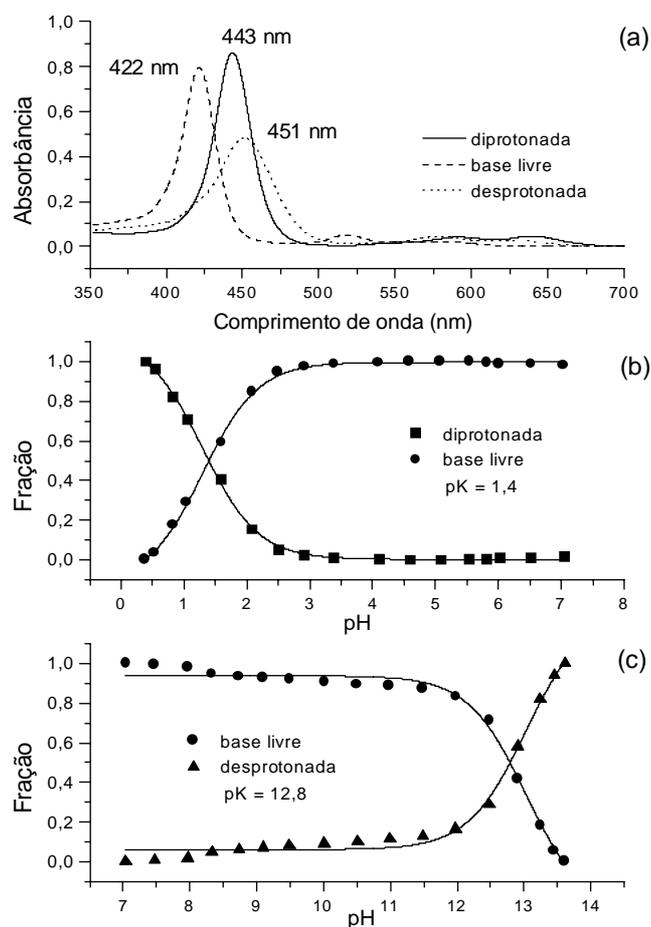


Figura 3 - (a) Componentes da deconvolução dos espectros óticos da porfirina TMPyP em acetato-fosfato 20 mmol/L; (b) Frações das componentes em função do pH na faixa de pH de 0,5 até 7,0; (c) Frações dessas componentes em função do pH na faixa de pH de 7,0 até 14,0.

Na Figura 3a estão representados os espectros de absorção das espécies. O espectro com banda de Soret centrada em 443 nm foi atribuído à forma diprotonada (H_4TMPyP^{6+}), o espectro centrado em 422 nm foi atribuído à espécie base livre (H_2TMPyP^{4+}), e o centrado em 451 nm foi atribuído à forma despro-

tonada (TMPyP²⁺). As contribuições das três componentes em cada espectro experimental em função do pH estão representadas nas Figuras 3b e 3c.

O ajuste dos dados experimentais utilizando-se uma função sigmoïdal, permitiu a obtenção dos valores de pK para as transições da primeira para a segunda espécie (pK₁) e da segunda espécie para a terceira (pK₂). Os valores de pKs obtidos em acetato-fosfato 20 mmol/L foram pK₁ = 1,4 e pK₂ = 12,8.

O comportamento dessa porfirina em função do pH também foi analisado em solução aquosa obtendo-se pK₁ = 1,0 e pK₂ = 13,0. Em solução acetato-fosfato 250 mmol/L cujos resultados foram pK₁ = 1,5 e pK₂ = 12,7. Pode-se verificar pequenas alterações quando comparamos os pKs obtidos em água com os obtidos em solução acetato-fosfato. Os valores de pKs, para ambas as transições, não tiveram mudanças significativas quando se aumentou a concentração da solução acetato-fosfato, mostrando que nessas condições o aumento da força iônica não influencia o valor do pK.

Determinação de pK em presença de micelas

Com o intuito de avaliar o efeito das micelas nos valores de pKs da porfirina TMPyP, realizaram-se titulações em função do pH em concentração fixa, tanto da porfirina como dos surfactantes. As mudanças espectrais das diferentes formas existentes no equilíbrio permitiram determinar os valores de pKs na presença das diversas micelas utilizadas e, assim avaliar os deslocamentos dos pKs devido a interação com as micelas. A dependência da absorção da porfirina TMPyP com o pH foi estudado na presença de CTAC (20 mmol/L), de SDS (40 mmol/L) e de HPS (20 mmol/L). Essas concentrações de surfactantes foram utilizadas de modo que houvesse a formação de micelas e para garantir a completa interação porfirina-micela.

Em experimentos realizados em presença de SDS em função do pH, verificou-se a interação da por-

firina com as micelas de SDS, a qual foi responsável por mudanças nos valores de pKs. Na análise espectrofotométrica na faixa de pH 2,0 a 14,0, observa-se que na presença de micelas de SDS, só está presente uma espécie de porfirina: a base livre. Abaixo de pH 1,0, começa-se a observar algumas alterações no espectro de absorção, principalmente na região das bandas Q, indicando o início da protonação, no entanto o experimento não permitiu a determinação precisa do valor do pK₁, devendo o seu valor estar próximo de 0,0.

A diminuição do valor de pK₁ com relação ao obtido em acetato-fosfato indica que a porfirina interage com a micela de SDS, e que essa interação protege a porfirina dificultando sua protonação. Esse efeito pode ser explicado por fatores eletrostáticos, a micela de SDS é carregada negativamente, o que dificultaria a protonação da porfirina. Também, deve-se considerar a alteração na distribuição de carga do anel porfirínico ocasionada pela interação porfirina-micela.

Acima de pH 7,0 observa-se somente a presença da espécie base livre, não sendo observada a transição em pH alcalino (pK₂), isso sugere que na presença de SDS essa transição deve ocorrer em pHs muito altos, não sendo possível observá-la experimentalmente pelo método utilizado.

Com relação aos experimentos realizados para analisar o comportamento da porfirina em presença do surfactante zwitteriônico HPS vemos que, comparando-se os resultados obtidos em presença de micelas de HPS com os obtidos em solução acetato-fosfato, não se observou mudanças significativas na forma dos espectros. Observou-se uma pequena variação no valor de pK₁, um deslocamento negativo com pK₁ = 0,8 e nenhuma variação no valor de pK₂, como mostram os gráficos apresentados na Figura 4. Portanto, o comportamento de protonação e desprotonação da porfirina praticamente não se altera com relação ao observado em acetato-fosfato, indicando pequena interação da porfirina com as micelas de HPS.

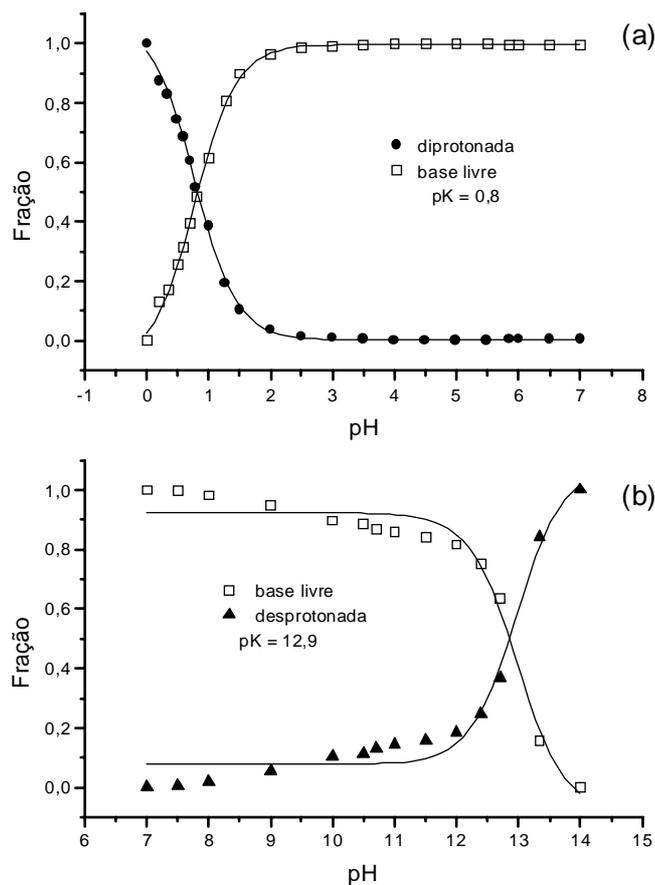


Figura 4 - Frações das componentes da deconvolução dos espectros óticos da porfirina TMPyP em acetato-fosfato 20 mmol/L em presença de 20 mmol/L de HPS em função do pH (a) faixa de pH de 0,5 a pH 7,0 (b) faixa de pH de 7,0 até 14,0.

Nos experimentos realizados em presença do surfactante catiônico CTAB em solução acetato-fosfato 20 mmol/L, não foram observadas mudanças mensuráveis nos valores pKs em relação aos dados obtidos em solução acetato-fosfato, indicando que não há interação entre as micelas de CTAB e a porfirina.

Portanto, analisando os dados obtidos na presença dos três surfactantes estudados pode-se observar que há deslocamento do valor de pK quando micelas de SDS e HPS estão presentes. Há um deslocamento maior em presença de micelas aniônicas de SDS, do que em presença do surfactante zwitteriônico de HPS indicando uma interação mais efetiva da porfirina com essas micelas. Os deslocamentos de pKs observados podem ser explicados através de um con-

siderável efeito das cargas superficiais das micelas na estrutura eletrônica da porfirina, e indicam uma interação maior com as micelas de SDS do que com micelas de HPS. A falta de interação entre a porfirina estudada e a micela catiônica CTAB pode ser atribuída à repulsão Coulombiana que ocorre entre a micela positiva e a porfirina, também carregada positivamente.

Conclusão

Os resultados obtidos mostram que a porfirina catiônica TMPyP é melhor incorporada em micelas aniônicas (SDS) que em micelas catiônicas (CTAB). Portanto, embora a solubilização de porfirinas em regiões apolares de micelas deva-se, geralmente, a interações hidrofóbicas não-específicas, quando ambas as moléculas são carregadas, a interação é modulada, significativamente, por fatores eletrostáticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. G. D. Fasman pela gentileza de ter fornecido o programa CCA para análise dos espectros óticos.

LIMAC/CIPP/UEPG pela utilização do espectrofotômetro Cary 100 - Varian.

CNPq / PIBIC e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS

- BONNETT, R. Photosensitizers of the porphyrins and phtalocyanine series for photodynamic therapy. **Chem. Soc. Rev.** p.19-33, 1995.
- BORISSEVITCH, I. E.; TOMINAGA, T. T.; IMASATO, H.; TABAK, M. Fluorescence and optical absorption study of interaction of two water soluble porphyrins with bovine serum albumin. The role of albumin and porphyrins aggregation. **Journal of Luminescence.** v.69, p.65-76, 1996.
- BORISSEVITCH, I. E.; BORGES, C. P. F.; YUSHMANOV, V.E.; TABAK, M. Localization of dipyrromethane molecules in ionic micelles: effect of micelle and drug charges, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1238, p. 57-62, 1995
- CANNON, J. B. Pharmaceuticals and drug delivery aspects of heme and porphyrin therapy. **J. Pharm. Res.**, v. 82, p. 435-446, 1993.

- 5 COLLINS-GOLD, L.C.; BARBER, D. C.; HAGAN W. J.; GIBSON, S. L.; HILF, R.; WHITTEN, D.G.. Synthetic porphyrin at interfaces: photosensitization and related reactions of atropisomers of *o*-substituted tetraphenylporphine derivatives in films, reversed micelles and membranes, **Photochemistry and Photobiology**, v. 48, n. 2, p.165-175, 1988.
- 6 DICKSON, E.F.G.; POTTIER, R.H. On the role of the protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.29, p.91-93,1995.
- 7 DOUGHERTY, T.J. Photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v.58, n.6, p.895-900, 1993.
- 8 HAMBLIN, M.R.; NEWMAN, L. On the mechanism of the tumor localizing effect in PDT. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.**, v.23, p.3-8,1994.
- 9 KADISH, K. M.; MAIYA, G. B.; ARAULLO-McADAMS, C. Spectroscopy characterization of meso-tetrakis (1-methyl pyridinium-4-yl) porphyrins, $[(\text{TMPyP})\text{H}]^{4+}$ and $[(\text{TMPyP})\text{M}]^{4+}$, in aqueous micellar media, where $\overset{\vee}{\text{M}} = \text{VO}^{2+}$, Cu (II) and Zn (II). **J. Phys. Chem.** v.95, p.427-431, 1991.
- 10 KALYANASYNDARUM, K. **Photochemistry in microheterogeneous system**. Academic Press, New York, 1987.
- 11 KESSEL, D. Porphyrin localization a new modality for detection and therapy of tumors **Biochem. Pharmacol.**, v.33, n.9, p.1389-1393, 1984.
- 12 LEHNINGER, Albert Lester. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. p. 64-67, 190-191.
- 13 LIEGEL, R.M. **Porfirinas e metaloporfirinas catiônicas aquossolúveis: síntese e caracterização de derivados benzil-piridínio substituídos**. São Paulo, 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo.
- 14 LOMAX, E. Making the Best Use of Surfactant Interactions. **Speciality Chemicals**, v. 13, n. 4, p. 223-227, 1993.
- 15 MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**. v.23, n. 2, p. 237-243, 2000.
- 16 PASTERNAK, R. F.; HUBER, P. R.; BOYD, P.; ENGASSER, G.; FRANCESCONI, L.; GIBBS, E.; FASELLA, P.; VENTURO, G. C.; HINDIS L. C. On the aggregation of meso-substituted water soluble porphyrins. **J. Am. Chem. Soc.** v.94, p.4511-4517, 1972.
- 17 PASTERNAK, R. F.; SUTIN, N. ; TURNER, D. H. Some very rapid reactions of porphyrins in aqueous solution. **J. Am. Chem. Soc.** v. 98, p. 1908-1913, 1976.
- 18 PERCZEL, A.; PARK, K.; FASMAN, G. D. Analysis of the circular-dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm - a practical guide. **Anal. Biochem.**, v. 203 (1), p. 83-93, 1992.
- 19 RICCHELLI, F.; GOBBO, S.; JORI, G.; MORENO, G. VINZENS, F.; SALET, C.; Photosensitization of mitochondria by liposome-bound porphyrins. **Photochemistry and Photobiology**, v.58, p.53-58, 1993.
- 20 RICCHELLI, F.; JORI, G.; Distribution of porphyrins in the various compartments of inilamellar liposomes of dipalmitoyl-phosphatidylcholine as probed by fluorescence spectroscopy. **Photochemistry and Photobiology**, v.44, p.151-157, 1986.
- 21 SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N.; Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002. x
- 22 SONG, X. Z.; JIA, S. L.; MIURA, M.; MA, J. G.; SHELNUTT, J. A. Electron transfer photosensitized by a tin lipoporphyrin in solution, micelles, and at water-organic solvent interfaces, **Journal of Photochemistry and Photobiology A; Chemistry**, v.113, p.233-241, 1998.
- 23 STRYER, Lubert. **Bioquímica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara / Koogan, 1992. p. 231-234.
- 24 TOMINAGA, T. T.; YUSHMANOV, V. E.; BORISSEVITCH, I. E.; IMASATO, H.; TABAK, M. Aggregation phenomena in the complexes of iron tetraphenyl porphine. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v.65, p.235-244, 1997.
- 25 WHITE, A.; HANDLER, P.; SMITH, E. L. **Principles of Biochemistry**, New York, Academic Press, 1968.