

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Identificação e propriedades físico-químicas da clorofilina cúprica de sódio e da
clorina cúprica e₆**

Luciana Tedesco Yoshime

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez

São Paulo
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Nutrição Experimental

**Identificação e propriedades físico-químicas da clorofilina cúprica de sódio e da
clorina cúprica e₆**

Luciana Tedesco Yoshime

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez

São Paulo
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Y65i Yoshime, Luciana Tedesco
Identificação e propriedades físico-químicas da clorofilina
cúprica de sódio e da clorina cúprica e6 / Luciana Tedesco
Yoshime. -- São Paulo, 2011.
144p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição
Experimental

Orientador : Marquez, Ursula Maria Lanfer

1. Bioquímica dos alimentos 2. Biodisponibilidade : Nutrição
experimental I. T. II. Marquez, Ursula Maria Lanfer, orientador.

641.1 CDD

Luciana Tedesco Yoshime

**Identificação e propriedades físico-químicas da clorofilina cúprica de sódio e da
clorina cúprica e₆**

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof^a. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez
Orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico essa Tese ao meu marido Carlos Eduardo Andrade Chagas (in memoriam), com todo o meu amor e gratidão, por tudo o que vivemos juntos.

AGRADECIMENTOS

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

Este espaço é dedicado a todos que fizeram parte da minha vida. Certamente, não conseguirei expor todo o meu carinho e gratidão à essas pessoas com palavras, mas faço questão de agradecer:

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Ursula M. Lanfer Marquez, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa. Mas sobretudo, pela convivência, carinho, respeito e principalmente, pelo aprendizado diário que levarei para toda a vida.

A minha amiga Tathyana C. Tumolo Ribeiro, que foi minha tutora, professora de química e principalmente, pela amizade que cultivamos durante todo esses anos, e só com ela conseguimos superar as dificuldades e concretizar esse trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Análise de Alimentos, Rosa Maria Cerdeira Barros, pela amizade e carinho desde o mestrado e que só cresceu durante todos esses anos. Ao técnico, Elias da Silva Araújo, que em pouco tempo tornou-se um amigo querido e um professor de química exemplar.

Ao meu marido, Carlos Eduardo Andrade Chagas (*in memoriam*), por todos esses anos de amizade em compreender meus momentos mais difíceis, e companheirismo em todos os outros felizes que dividimos nestes 12 anos. Muito do que sou hoje eu devo a você, meu amor.

Aos meus pais, Tokinobu Yoshime e Nilcéa Tedesco Yoshime, a quem devo toda a minha gratidão por me apoiarem e incentivarem desde sempre no caminho que escolhi. Pelos valores e ideais que carrego e por todo o amor que eu sempre tive. Sou eternamente grata.

Ao meu irmão, Alex Tedesco Yoshime e minha avó Izaltina Saraiva Tedesco, pelo carinho, pelo amparo, e principalmente, por fazerem parte da minha vida.

A minha amiga, Illana Louise P. Melo, que desde o mestrado me ouve, ajuda, aconselha, segura minhas lágrimas e compartilha das minhas alegrias. Foram tantos momentos que passamos juntas que os sentimentos mal posso expressar em palavras, mas levarei comigo para sempre.

A minha amiga, Isabel Louro Massaretto, pelos ensinamentos sobre bioquímica e sobre a vida, da filosofia aos princípios humanos. Principalmente pela amizade de me aceitar como sou.

As minhas amigas, Diana Rezende, pelo carinho, pelas lições de vida, e por compartilhar comigo a sua serenidade e amor pelo próximo. A Fabiana Kawassaki Hirashima, pelas conversas, conselhos e muitas risadas. A Natasha Galvão, que apesar da pouca idade, tem valores preciosos e teve comigo muito carinho. A Cristina de S. C. I. Pascual, pelo carinho durante todos esses anos. Obrigada meninas, por tudo, e principalmente, por tornarem os dias mais difíceis em dias amenos.

A minha amiga e oficiosa IC, Flavia Labonia Garbin, que teve a iniciativa de me ajudar, que compartilhou das minhas angústias e frustrações, acima de tudo, esteve ao meu lado no momento mais difícil e nos mais divertidos também. Obrigada por ser quem é, sincera e ao mesmo tempo carinhosa e atenciosa.

Ao meu amigo e IC, Gabriel F. Silva Padilha, por me ouvir, ajudar, me fazer rir e me ensinar um pouco de farmacologia e físico-química. Você trouxe alegria nos momentos mais difíceis e foi profissional quando necessário.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, Aline Moura Cruz, Andréa S. Horita, Adriane A. Machado de Melo, Alexandre Bera, Alexandre de C. Libanore, Alexandre Vieira dos Santos, Bianca R. De Souza, Davi F. Sampaio Meira, Ellen Soares de Souza, José Augusto G. Sattler, Karine Zetune, Renato J. de Sousa, Simone A. dos S. C. Faria, Vanilda A. S. Arruda, Wisllenny Souza, pelas risadas, cafés, almoços, comemorações e principalmente, por tornarem meus dias mais alegres.

As amigas que conheci no Laboratório de Lípidos, Ana Mara de O. e Silva; Claudimar de J. Oliveira, Lucília R. De Oliveira, Milessa da S. Afonso e Paula da C. Garcia, pelo auxílio na eutanásia dos animais, sem vocês eu não teria conseguido realizar o projeto piloto. E mais recentemente, a Fernanda B. Shinagawa e Fernanda C. Santana pela alegria e acolhida de sempre.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Elaine M. Ychico e Jorge A. de Lima, pelo auxílio e paciência.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Cleo, Edilson, Monica e Roberta, pelo auxílio e atenção.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

À FAPESP pelo auxílio financeiro fundamental para a realização deste estudo.

“Tudo o que temos que decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”.

J. R. R. Tolkien

SUMÁRIO

	Pág.
Resumo	xii
<i>Abstract</i>	xiii
Lista de Figuras	xiv
Lista de Tabelas	xvii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xix
PREFÁCIO	01
INTRODUÇÃO	04
CAPÍTULO I – CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO	09
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivo Específicos	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 Amostras	19
3.2 Análise elementar	19
3.3 Cálculo da pureza pela %Cu e razão Cu/N	20
3.4 Razão entre as bandas Soret e Q do espectro de absorção	22
3.5 Separação e identificação da CuChl por HPLC/MS-MS	22
3.5.1 Coluna C ₁₈ , metodologia proposta por Scotter e colaboradores (2005)	23
3.5.2 Coluna C ₁₈ , metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000)	24
3.5.3 Coluna C ₃₀ , metodologia proposta por Mortensen e Geppel (2007)	24
3.6 Avaliação da estabilidade térmica	25
3.6.1 Análise por HPLC	25
3.6.2 Cálculo da cinética de degradação e meia-vida	26
3.7 Determinação dos valores de pK _a	27
3.8 Titulação base-ácido e espectrofotométrica	28
3.9 Análise estatística	29
4. RESULTADOS	30
4.1 Análise elementar	30
4.2 Avaliação da pureza das amostras de CuChl	32
4.2.1 Porcentagem de pureza em relação aos elementos Cu e N	32

4.2.2 Razão Soret/Q e sua relação com a pureza das amostras de CuChl	33
4.3 Separação e identificação da CuChl por HPLC/MS-MS	35
4.3.1 Metodologia proposta por Scotter e colaboradores (2005) utilizando uma coluna C ₁₈	36
4.3.2 Metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000) utilizando uma coluna C ₁₈	37
4.3.3 Metodologia proposta por Mortensen e Geppel (2007) utilizando uma coluna C ₃₀ por HPLC-MS/MS	40
4.4 Avaliação da estabilidade térmica da CuChl	46
4.4.1 Análise por HPLC	46
4.4.2 Cinética de degradação e meia-vida	47
4.5 Determinação dos valores de pK _a	50
5. DISCUSSÃO	57
5.1 Sobre a composição química da CuChl	57
5.2 Cinética de degradação térmica	65
5.3 Valores de pK _a e sua relação com a lipofilicidade da CuChl	66
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS	71
CAPÍTULO II – CLORINA CÚPRICA E6	78
1. INTRODUÇÃO	79
2. OBJETIVOS	85
2.1 Objetivo geral	85
2.2 Objetivo Específicos	85
3. MATERIAL E MÉTODOS	86
3.1 Amostra	86
3.2 Separação e identificação da CuCe6 por HPLC/MS-MS	86
3.3 Cinética de degradação e meia-vida	87
3.4 Determinação dos valores de pK _a	88
3.5 Determinação do coeficiente de partição em sistema 1-octanol/tampão	88
3.6 Incorporação da CuCe6 em lipossomas em função do pH	90
3.7 Interação entre CuCe6 e albumina do soro bovino (BSA)	93
3.8 Extração da CuChl do soro de animais com base na interação CuCe6-BSA	94
3.8 Análise estatística	96
4. RESULTADOS	98
4.1 Separação e identificação da CuCe6 por HPLC/MS-MS	98

4.2 Quantificação da CuCe6	99
4.3 Cálculo da cinética de degradação e meia-vida	102
4.4 Determinação dos valores de pK_a	104
4.5 Determinação do coeficiente de partição em sistema 1-octanol/tampão	105
4.6 Incorporação da CuCe6 em lipossomas em função do pH	106
4.7 Interação entre a CuCe6 e BSA	109
4.8 Extração da CuChI do soro de animais com base na interação CuCe6-BSA	110
5. DISCUSSÃO	113
5.1 Sobre a composição química	113
5.2 Sobre as propriedades físico-químicas e a interação com a BSA	114
7. CONCLUSÕES	123
7. REFERÊNCIAS	124
APÊNDICES	128
1. Identificação da CuChI do soro sanguíneo por espectrofotometria	129
REFERÊNCIAS	136
ANEXOS OBRIGATÓRIOS	136
A. Aprovação da comissão de ética em experimentação animal	138
B. Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado e Doutorado	139
C. Ficha do aluno	140
D. Currículo Lattes	142

RESUMO

YOSHIME, L.T.Y. Identificação e propriedades físico-químicas da clorofilina cúprica de sódio e da clorina cúprica e₆. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos - área de concentração: Nutrição Experimental) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A clorofilina cúprica de sódio (CuChl) é um corante semissintético derivado da clorofila. Quimicamente é constituído de diversas clorinas, em especial a clorina cúprica e₄ (CuCe4), a clorina cúprica e₆ (CuCe6), e possíveis clorinas e porfirinas não cúpricas em proporções variáveis. Além do seu uso como corante alimentar, são atribuídas atividades biológicas à CuChl, tais como, antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante. Em decorrência destes potenciais efeitos benéficos, sua comercialização sob a forma de suplementos é crescente. Todavia, curiosamente, informações sobre a absorção e biodisponibilidade da CuChl são escassas. Além disso, até o momento nenhum estudo avaliou o impacto da composição da CuChl em sua bioatividade e eficácia. Assim, o presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar quimicamente duas amostras de CuChl (Sigma® e Chr. Hansen®) e o padrão de CuCe6 (Frontier Scientific®). Para tanto, empregou-se técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, determinou-se a lipofilicidade em modelos miméticos de membrana, cinética de degradação e avaliou-se a interação CuCe6/BSA. A análise elementar da CuChl resultou em teores de cobre total inferiores aos recomendados pela *United States Pharmacopeia (U.S.P.)*. Os elementos (CHN) e a razão Cu/N não foram coerentes com os valores teóricos da molécula de CuChl. Apenas uma amostra de CuChl apresentou razão Soret/Q dentro dos valores preconizados pela *U.S.P.* A titulação base-ácido da CuCe6 revelou dois valores de pK_as (10,62 e 6,41) que foram similares para as amostras de CuChl. A determinação de log *P* da CuCe6 mostrou que a hidrofobicidade é máxima em pH 3 (log *P* = 1,49±0,09) e sua hidrofilicidade ocorre em pHs > 7. Esse comportamento foi confirmado nos ensaios de incorporação em lipossomas em função do pH. A degradação térmica da CuChl (25 a 95 °C) avaliada por HPLC foi drástica a partir de 75 °C. A energia necessária para que ocorra a degradação da CuChl e CuCe6 é E_a = 16,1 e 9,3kcal/mol, respectivamente. A meia-vida a 35 °C é de 6 horas para a CuChl e 2 horas e meia para a CuCe6. A separação mais eficiente dos componentes da CuChl por HPLC foi conseguida utilizando coluna C₃₀ e a identificação dos principais constituintes CuCe6, CuCe4 e a clorina cúprica p₆ (CuCp6), ocorreu por HPLC/MS-MS. No estudo da ligação entre CuCe6 e proteína BSA foram obtidos os valores de K_D = 0,38 ± 0,07 μM, K_A = 3,3 ± 0,28 x 10⁶ M⁻¹ e número de sítios de ligação ~1 (N = 0,75 ± 0,09), indicativo de alta afinidade entre a clorina e a proteína. Assim, o comportamento químico dos principais componentes da CuChl e sua interação com os componentes do soro tornaram inviáveis a identificação e quantificação destas moléculas em ensaios *in vivo*. Os resultados aqui apresentados servem de subsídio para o desenvolvimento de outras pesquisas que visem o estudo específico da associação e dissociação da CuChl em material biológico.

Palavras-chave: clorofilina cúprica de sódio. clorina cúprica e₆. composição. degradação. propriedades físico-químicas.

Este estudo foi financiado pela FAPESP (Processo n°. 2009/52229-6)

ABSTRACT

YOSHIME, L.T.Y. Identification and physicochemical properties of sodium copper chlorophyllin and copper chlorin e₆. Thesis (D. Sc in Food Science – area of concentration: Experimental Nutrition) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

Sodium copper chlorophyllin (CuChl) is a semisynthetic derivative of chlorophyll dye. It is composed chemically by several chlorins, especially copper chlorin e₄ (CuCe₄), copper chlorin e₆ (CuCe₆), and possible others no copper porphyrins and chlorins in different proportions. In addition to its use as a food coloring, CuChl may have interesting biological effects as antimutagenic, anticarcinogenic and antioxidant. Because of these potential benefits, its use as a dietary supplement is increasing. However, information on the absorption and bioavailability of CuChl is scarce. Furthermore, no studies have evaluated the impact of CuChl composition in its bioactivity and efficacy. Thus, the present study aimed to identify and chemically characterize two samples of CuChl (Sigma[®] and Hansen[®]) and the standard of CuCe₆ (Frontier Scientific[®]). Chromatographic and spectrometric techniques as well as mimetics models membrane were used. The CuCe₆/BSA interaction was also evaluated. The elemental analysis of CuChl showed that the total copper content of it was smaller than the one recommended by United States Pharmacopeia (USP). The elements (CHN) and the ratio Cu / N were not consistent with the theoretical values of the molecule CuChl. Only one CuChl sample showed Soret / Q ratio within the range recommended by USP. The acid-base titration of CuCe₆ revealed two pK_as values (10.62 and 6.41), which were similar for CuChl samples. The log *P* determination of CuCe₆ showed that its hydrophobicity is maximal at pH 3 (log *P* = 1.49 ± 0.09) and its hydrophilicity occurs at pH > 7. These results were confirmed using the incorporation into liposomes assay in function of pH. Using HPLC, it was observed that thermal degradation of CuChl (25 to 95 °C) hardly occurred from 75 °C. The energy necessary for CuChl and CuCe₆ degradation is E_a = 16.1 and 9.3 kcal/mol, respectively. The half-life at 35°C for CuChl and CuCe₆ is 6 hours and 2 ½ hours, respectively. A more efficient separation of the CuChl components by HPLC was achieved using a C₃₀ column while its major constituents CuCe₆, CuCe₄ and copper chlorin p₆ (CuCp₆) were identified by HPLC / MS-MS. In binding analysis of CuCe₆ and BSA, it was observed K_D = 0.38 ± 0.07 mM, K_A = 3.3 ± 0.28 x 10⁶ M⁻¹, and number of binding sites ~ 1 (N = 0.75 ± .09), indicating high affinity between BSA and chlorine. Thus, due to the chemical characteristics of the main components of CuChl and their interaction with serum components the identification and quantification of these molecules in vivo is unviable. Future studies should investigate the association and dissociation of CuChl in biological samples.

Keywords: sodium copper chlorophyllin. copper chlorin e₆. composition. degradation. Physicochemical properties.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura da clorofila e de dois principais componentes da CuChl, a clorina cúprica e ₆ e clorina cúprica e ₄ .	p. 05
CAPÍTULO I – CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO		
FIGURA 2	(A) Relação entre a % de derivados não-cúpricos e a relação Cu/N, com base em tabela apresentada no estudo de Chernomorsky (1993). (B) Porcentagem de pureza da amostra com a %Cu determinada quantitativamente, com base nos valores experimentais do estudo de Chernomorsky e colaboradores (1997b).	p. 21
FIGURA 3	Espectros de absorção das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) na faixa de concentração de 13 a 30 µM nos comprimentos de onda de 380 a 780 nm.	p. 34
FIGURA 4	Cromatograma da amostra de CuChl (Sigma) em PDA (A); seguido dos espectros de absorção dos picos identificados como clorina cúprica e ₆ (A ₁ e A ₂) e clorina cúprica e ₄ (A ₃).	p. 36
FIGURA 5	(A) Cromatogramas sobrepostos da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) em PDA. Espectros de absorção da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) e os picos identificados como clorina cúprica e ₆ (A ₁ e A ₂) e clorina cúprica e ₄ (A ₃)	p. 38
FIGURA 6	(A) cromatograma em PDA (408nm) e (B) fluorescência da CuChl (Sigma e Chr. Hansen), segundo a metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).	p. 41
FIGURA 7	(A) Espectro de massas da CuCe ₆ ; (B) espectro MS/MS do fragmento com relação m/z 656,7.	p. 43
FIGURA 8	(A) Espectro de massas da CuCp ₆ ; (B) espectro MS/MS do fragmento com relação m/z 642,9.	p. 44
FIGURA 9	(A) Espectro de massas da isoCuCe ₄ ; (B) espectro MS/MS do fragmento com relação m/z 568,7.	p. 45
FIGURA 10	Cromatogramas sobrepostos (PDA 405nm) das amostras de CuChl da marca Sigma (A), Chr. Hansen (B) em diferentes temperaturas de aquecimento. Metodologia segundo Egner e colaboradores 2000.	p. 47
FIGURA 11	Linearização da equação que descreve a cinética de degradação de primeira ordem da Clorofilina cúprica de sódio em diversas temperaturas (35, 45, 55 e 65°C).	p. 48
FIGURA 12	Determinação da energia de ativação a partir das constantes de degradação térmica da CuChl.	p. 49

FIGURA 13	Variação do pH de uma solução aquosa de CuChl em função da concentração do pimento.	p. 51
FIGURA 14	Curva de titulação da CuChl [0,2mg/mL] da Sigma (A), Chr. Hansen (B), com HCl 0,01 M.	p. 52
FIGURA 15	Deslocamento da absorção máxima nas banda Soret e Q de uma amostra de CuChl (Sigma) em função do pH.	p. 54
FIGURA 16	Processo reversível da acidificação e alcalinização da CuChl (Sigma), segundo seu espectro de absorção.	p. 55
FIGURA 17	(A) Amostra de CuChl [0,2 mg/mL] em 100 mL de água em meio ácido (pH ~3,5). (B1) Solução de CuChl em meio ácido com adição de clorofórmio:metanol (30 mL) e (B2) solução de CuChl em meio alcalino com adição de clorofórmio:metanol (30 mL).	p. 55
FIGURA 18	Catabólitos originados da degradação da molécula de clorofila, com a abertura do anel tetrapirrólico (adaptado de PRUŽINSKÁ et al., 2003).	p. 58
FIGURA 19	Estrutura química das principais clorinas da CuChl, clorina cúprica e ₄ , isoclorina cúprica e ₄ , clorina cúprica e ₆ e clorina cúprica p ₆ .	p. 62

CAPÍTULO II – CLORINA CÚPRICA e₆

FIGURA 1	Estruturas dos principais componentes encontrados na CuChl. Fonte: Tumolo e Lanfer-Marquez (2012).	p. 79
FIGURA 2	Esquema das possíveis vias de absorção da CuChl. Figura extraída de Ferruzzi e Blakeslee (2007).	p. 81
FIGURA 3	Esquema de um lipossoma multilamelar.	p. 92
FIGURA 4	Fluxograma da extração da CuChl do soro sanguíneo, segundo metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000).	p. 95
FIGURA 5	Passo a passo da extração do soro contaminado com CuChl, segundo metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000).	p. 96
FIGURA 6	(A) Cromatograma em PDA (408nm) da CuCe ₆ . (B) Espectro de massas da CuCe ₆ com relação m/z 656, segundo a metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).	p. 98
FIGURA 7	Cromatogramas do padrão de CuCe ₆ em água (A) e MeOH (B) no t ₀ e t ₂₄ , segundo metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).	p. 100
FIGURA 8	Linearização da equação que descreve a cinética de degradação de primeira ordem para a reação da CuCe ₆ em	p. 102

	diversas temperaturas (35, 45, 55 e 65°C).	
FIGURA 9	Determinação da energia de ativação a partir das constantes de degradação térmica da CuCe6.	p. 103
FIGURA 10	Curva de titulação da CuCe6 [0,2mg/mL] com HCl 0,01 M.	p. 104
FIGURA 11	Valores de $\log P$ em função do pH da CuCe6, obtidos em sistema 1-octanol/tampão, segundo sua hidrofobicidade ($\log P > 0$) e hidrofiliçidade ($\log P < 0$).	p. 106
FIGURA 12	Porcentagem de incorporação da CuCe6 em lipossomas de lecitina de soja em função do pH.	p. 107
FIGURA 13	Variação da fluorescência (λ_{exc} 280nm e λ_{em} 340nm) da proteína BSA, devido à ligação com moléculas de CuCe6 adicionadas em concentração entre 0,015 e 4,537 μ M.	p. 108
FIGURA 14	Constante de ligação da CuCe6 à proteína BSA.	p. 109
FIGURA 15	Intensidade de fluorescência da BSA em função da concentração de CuCe6; os valores foram extrapolados até a supressão total para estimar a concentração de CuCe6 que provoca este efeito.	p. 110
FIGURA 16	Cromatogramas por HPLC da CuChI (A) e das fases orgânica e aquosa da extração da CuChI do soro sanguíneo (B).	p. 111
APENDICE		
FIGURA 1	Extração da CuChI de amostra de soro na presença de sulfato de amônio.	p. 129
FIGURA 2	Teste de extração de amostra de soro contaminado com ChI-Cu e adição de NaOH, e adições subsequentes de solventes orgânicos e surfactante.	p. 130
FIGURA 3	Soro contaminado com ChI-Cu e adição de HCl e CTAB 1mM e 0,1mM (A e B , respectivamente) e seu branco (soro com HCl e CTAB) (C); ChI-Cu em água (D); soro contaminado com ChI-Cu e adição de NaOH e CTAB 1 mM e 0,1mM (E e F , respectivamente) e seu branco (soro com NaOH e CTAB) (G).	p. 131
FIGURA 4	Espectros de absorção da CuChI em soro sanguíneo e em água.	p. 133

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

TABELA 1	Valores teóricos das massas dos elementos C, H, Cu, N, Na e O e suas respectivas porcentagens relativas, calculados a partir da fórmula química $C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$ presente no rótulo da CuChl (Sigma).	p. 30
TABELA 2	Porcentagem relativa dos elementos químicos C, H, e N, da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) obtidos pela análise elementar, considerando a fórmula química teórica ($C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$) e o limite estabelecido pela <i>U.S.P.</i> (2007).	p. 31
TABELA 3	Porcentagem dos elementos químicos Cu, Cu_{livre} , $Cu_{quelado}$ e Na da CuChl (Sigma e Chr. Hansen), obtidos pela análise elementar, fórmula química teórica ($C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$) e limite estabelecido pela <i>U.S.P.</i> (2007).	p. 32
TABELA 4	Cálculo da razão Cu/N e a porcentagem de derivados não cúpricos e a $\%Cu_{total}$ e sua relação com a %Pureza, calculada a partir dos valores experimentais, com base na FIGURA 2 .	p. 33
TABELA 5	Valores das absorvâncias das bandas Soret e Q de soluções de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) em tampão fosfato pH 7,5 em diferentes concentrações.	p. 35
TABELA 6	Componentes da CuChl e seus valores de λ_{max} , tempo de retenção (TR) obtidos pela separação por HPLC e detecção em PDA, conforme dados da literatura.	p. 39
TABELA 7	Relação dos valores de λ_{max} , tempos de retenção (TR) e identificação dos prováveis componentes da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) separados por HPLC, segundo metodologia preconizada por Egner e colaboradores (2000).	p. 40
TABELA 8	Relação entre os tempos de retenção e λ_{max} dos prováveis compostos separados por HPLC com detecção PDA, segundo a metodologia de Mortensen e Geppel (2007).	p. 42
TABELA 9	Valores de λ_{max} , tempo de retenção (TR), área (mAU) e massa (m/z) dos principais componentes da CuChl (Sigma e Chr. Hansen), comparadas com os valores de outras amostras, descritas por Mortensen e Geppel, 2007, obtidos na separação por HPLC e detecção PDA e identificação por HPLC-MS/MS	p. 46
TABELA 10	Cálculo da meia-vida em minutos da CuChl a partir da temperatura ($^{\circ}C$) e da constante de velocidade (k)	p. 49
TABELA 11	Valores de pK_a s e pHs nos pontos de inflexão das curvas de titulação das amostras comerciais de CuChl (Sigma e Chr. Hansen).	p. 53

CAPÍTULO II – CLORINA CÚPRICA E6

TABELA 1	Valores de λ_{\max} , tempo de retenção (TR), área (mAU) e massa (m/z) da CuCe6 obtidos na separação por HPLC e detecção PDA e HPLC/MS-MS, segundo a metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).	p. 99
TABELA 2	Valores de λ_{\max} , tempo de retenção (TR), área (mAU) e prováveis componentes da amostra de CuCe6 nos t_0 e t_{24} em água e metanol, comparados aos valores da literatura (MORTENSEN; GEPPEL, 2007), obtidos na separação por HPLC.	p. 101
TABELA 3	Cálculo da meia-vida em minutos da CuCe6 a partir da temperatura (°C) e a constante de velocidade (k).	p. 104
TABELA 4	Valores de pKas e pHs nos pontos de inflexão das curvas de titulação do padrão de CuCe6.	p. 105
TABELA 5	Tempo de retenção (TR), área e porcentagem de recuperação dos principais componentes da CuChl extraídos do soro sanguíneo na fase orgânica e na fase aquosa da extração, em comparação com uma solução padrão de CuChl.	p. 112

APÊNDICE

TABELA 1	Valores de λ_{\max} da CuChl em água e do pigmento em soro sanguíneo.	p. 133
-----------------	---	--------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB ₁	Aflatoxina B ₁
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (albumina serica bovina)
C	Carbono
Ce ₆	Clorina e ₆
Ce ₄	Clorina e ₄
Cp ₆	Clorina p ₆
Cu	Cobre
CuCe ₄	Clorina cúprica e ₄
CuCe ₆	Clorina cúprica e ₆
CuChl	Clorofilina cúprica de sódio
CuCp ₆	Clorina cúprica p ₆
E _a	Energia de ativação
H	Hidrogênio
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC/MS	<i>High Performance Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrometria de Massas)
HSA	<i>Human serum albumin</i> (albumina serica humana)
isoCuCe ₄	Isoclorina cúprica e ₄
MeOH	Metanol
N	Nitrogênio
Na	Sódio
O	Oxigênio
pk _a	Constante de dissociação
TR	Tempo de retenção
U.S.P.	<i>United States Pharmacopeia</i>

PREFÁCIO

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

A clorofilina cúprica de sódio é um pigmento derivado da clorofila, ao qual vem sendo atribuídas algumas atividades biológicas. É apresentada na forma comercial como um composto de várias clorinas, entre elas as clorinas cúpricas e6 e e4. O grupo de pesquisa do Laboratório de Análise de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob a orientação da Profa. Dra. Ursula M. Lanfer Marquez, observou em um estudo anterior que ratos Wistar alimentados com ração contendo 3% de clorofilina cúprica de sódio apresentavam em seu material biológico menor presença da clorina cúprica e6 (GOMES et al., 2009).

Dessa forma, surgiram duas hipóteses, ou a estabilidade da clorina cúprica e₆ era menor que a da clorina cúprica e₄, ou, durante o processo de absorção a clorina cúprica e₆ era acumulada, degradada ou convertida a outros metabólitos não identificados (GOMES et al, 2009).

Assim, surgiu inicialmente este projeto intitulado: “Caracterização da clorofilina cúprica de sódio e avaliação de sua absorção, estabilidade e distribuição em estudo com ratos” (FAPESP nº 2009/52229-6; CEEA/FCF nº 04/2009 – **ANEXO A**). O objetivo era avaliar os parâmetros da cinética de absorção da clorofilina cúprica de sódio, e dois de seus principais

componentes, a clorina cúprica e_4 e clorina cúprica e_6 , administradas isoladamente por gavagem a ratos Wistar.

Considerando a existência de apenas um estudo na literatura em que a clorofilina cúprica de sódio foi extraída e identificada em material biológico (EGNER et al., 2000), partimos do pressuposto de que esta seria a forma mais viável de identificar os principais componentes da clorofilina cúprica de sódio no nosso estudo.

Respaldado deste protocolo, foi realizado um projeto piloto. Porém, ao iniciarmos o processo de extração da clorofilina em amostras de soro dos animais (EGNER et al., 2000), verificamos que a recuperação dos pigmentos do material biológico, era ineficaz.

Além disso, observamos que a clorina cúprica e_6 degrada ao longo do tempo. Este fato foi constatado ao quantificar esta clorina a partir da construção de uma curva de calibração por HPLC, para qual foram necessários 26 horas. Observamos ainda que a melhor coluna de separação e identificação da clorofilina e de seus principais componentes por HPLC/MS-MS, não era a coluna C_{18} , a que possui maior citação na literatura.

Para finalizar, a empresa Frontier Scientific (Logan, Utah – USA), fornecedora dos padrões de clorinas cúprica e_4 e e_6 , suspendeu a produção em agosto de 2010 por encontrar dificuldade na purificação destes componentes.

Estes fatos inviabilizaram a condução da proposta original deste projeto, dessa forma, a presente tese foi elaborada no sentido de responder as seguintes perguntas:

- Qual a melhor coluna a ser utilizada na separação e identificação por HPLC/MS da CuChl? A coluna C₁₈, a mais citada na literatura, ou a coluna C₃₀?
- Qual a porcentagem de recuperação da clorina cúprica e₆ do material biológico segundo o método de extração preconizado por Egner e colaboradores (2000)?
- Existe interação entre a clorina e o material biológico que impediria a extração do pigmento? Esta interação dificulta sua quantificação?
- As propriedades físico-químicas da CuChl, poderiam interferir na absorção e biosponibilidade da substância?
- Qual a velocidade de degradação da clorofilina cúprica de sódio e da clorina cúprica e₆, um dos seus principais componentes?

Até o momento, não há respostas disponíveis na literatura para estes questionamentos. Esperamos que a partir dos resultados encontrados, novos estudos *in vitro* ou *in vivo* sejam elaborados para contribuir com melhor entendimento do comportamento e bioeficácia da clorofilina cúprica de sódio e ao menos de um de seus componentes, a clorina cúprica e₆.

INTRODUÇÃO

A clorofilina cúprica de sódio (CuChl) é produzida a partir de extratos contendo a clorofila natural. Para tanto, o extrato é inicialmente tratado com hidróxido de sódio, o que resulta na hidrólise das duas ligações éster da molécula da clorofila, transformando-a num diácido. Um dos grupos liberados após o processo é o fitol, e como consequência, a molécula resultante adquire solubilidade em água. Ocorre ainda, o rompimento do anel isocíclico *E* da clorofila, que dá origem a um terceiro grupo ácido. Em seguida, o átomo de Mg^{2+} central da clorofila é substituído por H^+ em meio ácido e a molécula pode formar um complexo estável na presença de átomos de cobre, zinco ou ferro (KEPHART, 1955; HUMPHREY, 1980). Estas modificações, conferem à CuChl a propriedade de ser hidrossolúvel e possuir maior estabilidade química quando comparada à clorofila, que é lipossolúvel.

Devido ao processo de transformação da clorofila, a CuChl resultante é uma mistura de vários compostos, denominados clorinas (ácidos carboxílicos), sendo as principais as clorina cúprica e_6 (CuCe6) e clorina cúprica e_4 (CuCe4), além de outras clorinas e porfirinas não cúpricas. A **FIGURA 1** apresenta as estruturas químicas da clorofila natural e duas principais clorinas cúpricas que compõem a CuChl. (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007; MORTENSEN; GEPPEL, 2007).

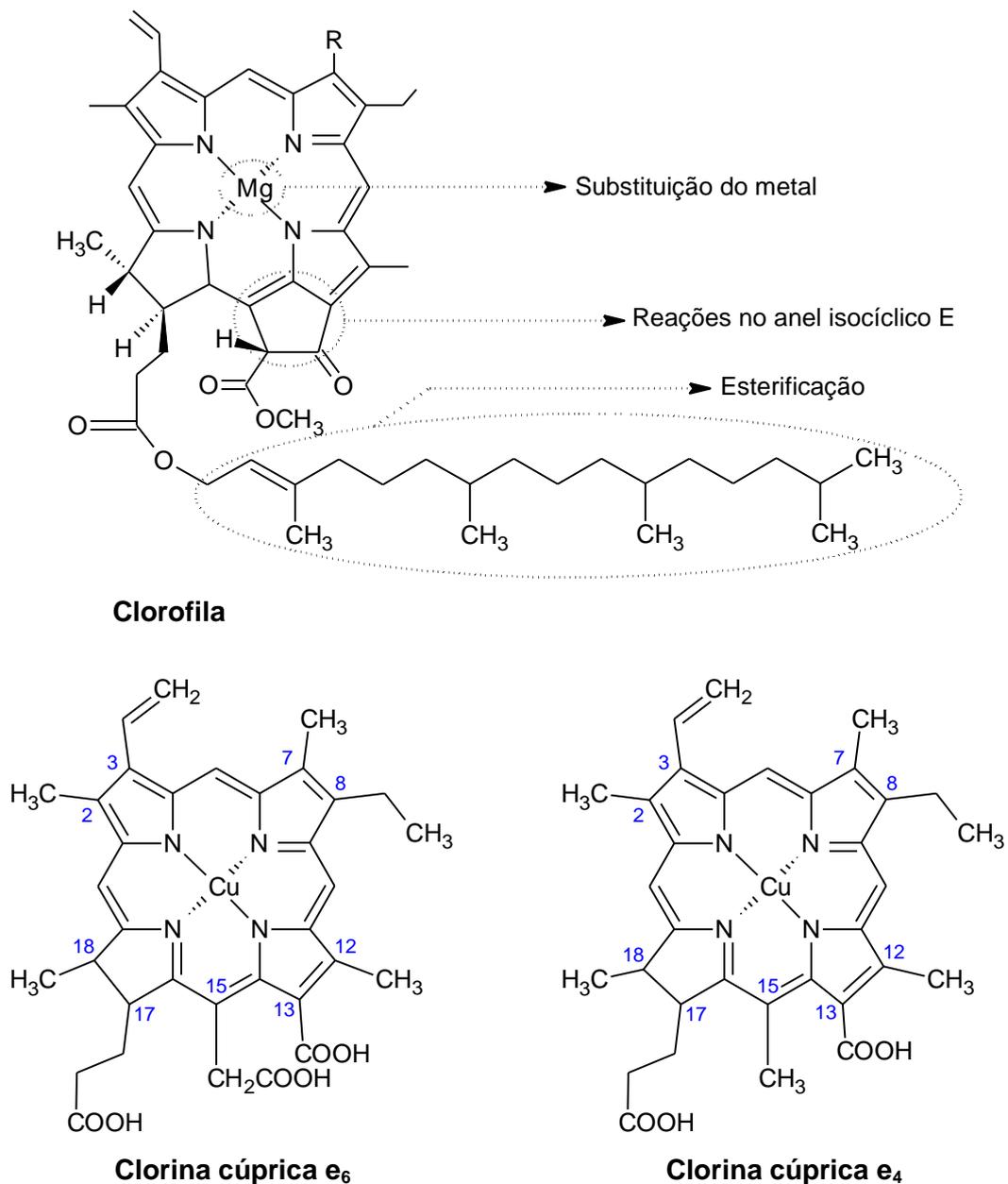


FIGURA 1. Estrutura da clorofila e de dois principais componentes da CuChl, a clorina cúprica e₆ e clorina cúprica e₄.

Todavia, outros estudos indicam que a composição da CuChl pode ser ainda mais complexa (SATO et al., 1986; INOUE, et al., 1994; CHERNOMORSKY et al., 1997a; FERRUZZI; SCHWARTZ, 2005; MORTENSEN; GEPPEL, 2007), pois além dos principais componentes

previamente mencionados, há em menor quantidade, rodina cúprica g_7 e feoforbídeo cúprico a (INOUE et al., 1994).

Independente da sua composição, a utilização da CuChI como corante alimentício é permitida em diversos países da Europa (CE, 1995) e no Brasil (ANVS, 2008). Nos Estados Unidos da América (EUA) o seu emprego é assegurado pela *Food and Drug Administration* (FDA) desde 2002, quando a empresa *Kraft Food Inc.* realizou uma petição para utilização deste corante em bebidas cítricas. Além disso, o FDA permite a utilização da CuChI como corante em produtos de higiene bucal e em cosméticos.

Anteriormente a esta aprovação, a CuChI já era empregada na medicina alternativa como cicatrizante e desodorizante para pacientes ostomizados (FDA, 2002; SUDAKIN, 2003). Mais recentemente, estudos experimentais descreveram alguns efeitos biológicos da CuChI como, por exemplo, atividade antimutagênica, anticarcinogênica, antioxidante e radioprotetora (CHERNOMORSKY et al., 1999; KAMAT et al., 2000; KUMAR, et al., 2001; CASTRO, et al., 2009; TUMOLO; LANFER-MARQUEZ, 2012).

Devido à crescente utilização da CuChI pela indústria farmacêutica e a sugestão de que esta substância possui atividade biológica relevante, torna-se necessária uma melhor caracterização dos diferentes componentes deste corante. Neste sentido, é importante considerar que as propriedades físico-químicas da molécula são cruciais na sua interação com sistemas biológicos e que as modificações estruturais devido à protonação e desprotonação podem influenciar algumas propriedades determinantes à sua absorção celular, tais como carga e lipofilicidade (WIKE-HOOLEY et al., 1985; TANNOCK; ROTIN, 1989; MARTIN; JAIN, 1994; ČUNDERLÍKOVÁ, et al., 2004).

Recentemente, dois estudos identificaram uma pequena quantidade da CuCe6 no soro de humanos após a ingestão de clorofilina cúprica de sódio (EGNER et al., 2000) e também em cultura de células, num ensaio da digestão *in vitro* (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007). Estes autores sugerem que este pigmento pode ser degradado, acumulado pelas células intestinais ou bioconvertido, porém não há nenhum estudo que tenha investigado a possível agregação da CuCe6 ao HSA ou ao BSA, que possa justificar sua baixa concentração plasmática.

Diante o exposto, não existem dados consistentes a respeito da biodisponibilidade e ações sistêmicas da CuChl. Além disso, os trabalhos que avaliaram a atividade biológica desta substância não consideram a composição do corante e nem a interação de seus componentes com proteínas transportadoras no soro. Atualmente, não se conhece o componente ou os componentes responsáveis pela atividade biológica observada e se eles atuam isoladamente ou combinados.

Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar e caracterizar quimicamente duas amostras comerciais de CuChl (**CAPÍTULO I**). Para tanto, foram utilizadas técnicas de cromatografia e espectrofotometria. Além disso, um dos principais componentes da CuChl, a CuCe6, foi caracterizada conforme a sua lipofilicidade em modelos miméticos de membrana, equilíbrio de protonação e sua interação com o BSA (**CAPÍTULO II**).

Os resultados obtidos neste estudo visam elucidar o comportamento da CuChl em diferentes meios e contribuir para que futuros ensaios *in vivo* ou *in*

vitro sejam coerentes e que possam indicar se os efeitos biológicos observados são causados por um de seus componentes ou pela interação entre eles.

CAPÍTULO I

IDENTIFICAÇÃO E PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DA CLOROFILINA CÚPRICA DE SÓDIO

Neste capítulo, utilizou-se técnicas espectrofotométricas e cromatográficas para caracterizar e identificar os principais componentes da clorofilina cúprica de sódio, além de avaliar a sua estabilidade térmica e determinar os valores de pK_a . O ensaio de caracterização química foi por análise elementar em comparação com a fórmula teórica do corante. A separação e identificação dos principais componentes da CuChl por HPLC foi realizada em colunas C₁₈ e C₃₀. A degradação térmica foi avaliada pelos parâmetros cinéticos da reação pelo método isotérmico (equação de *Arrhenius*), e o grau de ionização foi avaliado segundo a constante de dissociação (pK_a).

1. INTRODUÇÃO

Há muitos anos a clorofila e seus derivados semi-sintéticos são utilizados como corantes verdes e em diversas aplicações alimentares e na medicina alternativa. A clorofilina cúprica de sódio (CuChl) é comercializada na forma de pó ou líquido. Na Europa, esta substância é utilizada como corante para doces, sorvetes, sobremesas, queijos e pepinos em conserva; sendo aprovada também no Brasil como corante para fins alimentícios (ANVS, 2008). Nos Estados Unidos o seu emprego é limitado a componente de creme dental e como aditivo em bebidas cítricas (FDA, 2002).

Além de seu uso como corante, a CuChl é utilizada na medicina alternativa há mais de 50 anos. Destacam-se, como alguns efeitos, sua participação no processo da cicatrização, propriedade anti-inflamatória, controle sobre a formação de oxalato de cálcio no tratamento de cálculo renal, combate a odores corporais, fecal e urinário de pacientes geriátricos ostomizados (KEPHART, 1955).

Contudo, nos últimos 15 anos, a ação quimiopreventiva, radioprotetora, antioxidante e antimutagênica foi atribuída a este pigmento e vêm ganhando a atenção dos pesquisadores (NEGRAES et al., 2004; FERRUZZI e BLAKESLEE, 2007). Assim, dentre os diversos quelatos metálicos (Zn e Mg), a CuChl é a mais estudada e vem ganhando notoriedade também pelos seus efeitos biológicos (CHERNOMORSKY, 1994; FERRUZZI et al, 2002; CASTRO et al, 2009). Estas propriedades incentivaram a comercialização da CuChl como suplemento alimentar.

Os estudos mostram que a CuChl possui atividade antioxidante contra o estresse oxidativo e espécies reativas de oxigênio (ROS). Dentre os estudos *in vitro*, foi descrito que a CuChl possui atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica mitocondrial e microsomal em fígado de ratos (SATO et al., 1984).

Além disso, Sato e colaboradores (1986) investigaram a atividade antioxidante da CuChl e de seus dois principais componentes, a isoclorina cúprica e_4 (isoCuCe4) e a clorina cúprica e_6 (CuCe6). Estas duas substâncias isoladas inibiram a formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e apresentaram atividade antioxidante oito vezes superior em comparação à CuChl.

Outros estudos ressaltam que a CuChl pode desempenhar um papel positivo na proteção contra os danos ao DNA induzido por radiação gama e que a ação do corante é dependente de sua concentração (KUMAR et al., 1999).

Endossando os trabalhos anteriores, outro estudo (KAMAT; BOLOOR; DEVASAGAYAM, 2000) investigou a capacidade antioxidante da CuChl em experimentos *in vivo* e *ex vivo* contra lesões induzidas por cinco agentes diferentes (radiação gama, fotossensibilização, ascorbato Fe^{2+} , NADPH-ADP- Fe^{3+} e 2,2 azobis amidinopropano (AAPH)). Os resultados demonstraram que até mesmo em baixa concentração, a CuChl foi eficaz em atenuar as lesões induzidas por estes agentes. Além disso, esta substância apresentou efeito contra a formação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e desativação da enzima superóxido dismutase (SOD).

Os estudos até agora descritos enfatizam a atividade antioxidante da CuChl *in vitro*. Porém, quando injetada em ratos, a CuChl atuou tanto como pró-oxidante quanto antioxidante, fato este que foi descrito como dependente da concentração e do tempo (KUMAR et al., 2004). Segundo este estudo, o efeito pró-oxidante observado após 48 horas, ocorreu possivelmente devido à ação dos metabólitos da CuChl. Portanto, a partir destes relatos os autores alertam que são necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* desses compostos que são classificados como antioxidantes (KUMAR et al., 2004).

Na década de 1980, surgiram comparações da CuChl com vitaminas (β -caroteno, vitamina C e E) que possuem atividade antimutagênica. Nesse sentido, foi realizado um estudo que envolvia extratos vegetais (ricos em β -caroteno e vitamina E) e a CuChl. O corante verde inibiu a formação de adutos dos compostos mutagênicos 3-metilcolantreno e benzo[a]pireno com o DNA (LAI; BUTLER; MATNEY, 1980), e, este processo foi acelerado na presença de altas concentrações da CuChl (TACHINO et al., 1994). O mesmo efeito de inibição foi observado quando a CuCe6 isolada diminuiu a formação de um metabólito do benzo[a]pireno (ARIMOTO et al., 1995).

Em 1989, Ong e colaboradores observaram, por meio de estudos *in vitro*, que a CuChl é um antimutagênico mais eficiente que o retinol, β -caroteno, vitamina C e E contra cinco mutágenos, como o benzo[a]pireno e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Porém, foi verificado por Chernomorsky e colaboradores (1997b) que a CuChl pode ser um antimutagênico ou um promotor do tumor quando administrada após o

tratamento com a substância mutagênica. Aparentemente, o fator determinante, segundo os autores, foi a concentração utilizada.

A partir desses estudos, em 1995, Breinholt e colaboradores realizaram o primeiro estudo *in vivo* da CuChl em peixes (trutas arco-íris). Os autores observaram que a CuChl presente na água desempenhava um papel importante na redução da hepatocarcinogênese nos animais, pela inibição da formação de adutos da aflatoxina B1 (AFB₁) com o DNA (BREINHOLT et al., 1999).

O primeiro estudo clínico dos efeitos quimiopreventivos da CuChl foi realizado em voluntários chineses, escolhidos por apresentar um alto risco de desenvolver carcinoma hepático devido à ingestão de alimentos contaminados naturalmente por aflatoxina (EGNER et al., 2000; 2001; 2003). Foi administrado um comprimido de CuChl (100mg) três vezes ao dia aos indivíduos participantes e os resultados indicaram uma redução de 50% na excreção urinária de aflatoxina-N⁷-guanina (biomarcador) em comparação com o grupo controle (EGNER et al., 2001; 2003). Não houve casos de toxicidade ou relatos de efeitos adversos resultantes da ingestão de CuChl, mas foi observado que tanto as fezes dos pacientes bem como o soro sanguíneo apresentaram coloração verde (EGNER et al., 2000; 2001; 2003).

Recentemente, Jubert e colaboradores (2009) realizaram um estudo de farmacocinética com a AFB₁, foi observado que a CuChl pode limitar a disponibilidade da aflatoxina ingerida por humanos, fato este que corrobora o estudo com os voluntários chineses (EGNER et al., 2000).

Dessa forma, os estudos demonstram que a CuChl pode apresentar atividade antimutagênica e quimiopreventiva, tanto em sistemas *in vitro*, quanto *in vivo*. Porém, a sua eficácia parece depender da dose utilizada e da sua interação com o composto tóxico. Um estudo *in vivo* recente sobre a atividade anticlastogênica da CuChl, mostrou que o efeito protetor do corante só ocorre em níveis tóxicos em camundongos (GROSSI et al., 2012).

Portanto, a composição da CuChl desempenha um papel importante nos efeitos biológico, e a variação na composição dos derivados de clorina pode influenciar qualitativamente e quantitativamente a bioatividade da CuChl (CHERNOMORSKY et al., 1997b).

Apesar dos promissores efeitos biológicos, existe uma preocupação quanto à inocuidade da CuChl, uma vez que a sua ingestão na forma de suplemento alimentar, como vem sendo comercializada, tende a ser significativamente superior em relação ao uso como corante. Até o momento, vale a pena ressaltar que nenhum estudo avaliou o potencial toxicológico da CuChl utilizada como suplemento. Portanto, devido à tendência de um consumo crescente de CuChl, motivado pela divulgação de efeitos benéficos para a saúde, torna-se necessária uma reavaliação da segurança e inocuidade deste pigmento (TUMOLO; LANFER-MARQUEZ, 2012).

Além disso, a composição dos produtos comerciais da CuChl é variável, pois, além dos principais constituintes (CuCe4 e CuCe6) o corante pode apresentar ainda, com menor predominância, a rodina cúprica g₇, feoforbídeo cúprico a e outras porfirinas (INOUE et al., 1994; FERRUZZI et al., 2002; MORTENSEN; GEPPEL, 2007).

Esta variabilidade na composição da CuChl é em função do vegetal utilizado e do processo de obtenção do corante. Dessa forma, os componentes da CuChl podem afetar a bioatividade e eficácia em estudos *in vivo* e *in vitro*, pois ainda não se sabe a que elemento atribuir esses efeitos. Além disso, é um desafio a identificação e quantificação dos seus principais constituintes, portanto, é fundamental o estabelecimento de critérios e protocolos analíticos para que haja uma correta caracterização deste pigmento (SCHOEFS, 2002; 2004).

Nesse sentido, a separação dos derivados da clorofilina por HPLC acoplado à técnica de espectrometria de massas (MS) pode ser uma ferramenta importante para a identificação dos seus componentes (VAN BREEMEN; CANJURA; SCHWARTZ, 1991). Nos trabalhos realizados até o momento, foram utilizados para a separação dos componentes preferencialmente técnicas de cromatografia líquida (HPLC) empregando colunas de fase reversa C₁₈, seguida pela utilização mais recente da coluna C₃₀ (SCHOEFS, 2004; MORTENSEN; GEPPEL, 2007).

O primeiro estudo por HPLC que detectou a presença das clorinas provenientes do pigmento em material biológico utilizou a coluna C₁₈ (EGNER et al., 2000), assim como a maioria dos estudos que identificaram a CuChl em matriz alimentícia (FERRUZZI; FAILLA; SCHWARTZ, 2001; SCOOTER et al., 2005; GANDUL-ROJAS; ROCA; GALLARDO-GUERRERO, 2012).

Apenas um estudo utilizou uma coluna C₃₀ no acoplamento das técnicas HPLC/MS-MS para separar e identificar os componentes da CuChl de cinco amostras comerciais, (MORTENSEN; GEPPEL, 2007). Os resultados

mostraram uma grande variação quali e quantitativamente dos constituintes das amostras, e evidenciaram que em algumas há ausência de rodina cúprica g_7 e a presença de muitos derivados de porfirina. Além disso, os autores relatam que alguns dos principais constituintes identificados nas amostras estudadas diferem daqueles encontrados em outros trabalhos, como a clorina cúprica e_4 e o feoforbídeo cúprico a , levantando a questão quanto a correta identificação da composição das clorofilinas cúpricas de sódio disponíveis comercialmente.

Apesar de alguns estudos confirmarem a variabilidade na composição química de lotes de CuChl comercialmente disponíveis, não foi realizada nenhuma caracterização das amostras utilizadas em estudos *in vivo* e *in vitro*, nos quais se procuram evidenciar os efeitos biológicos. Fato este de suma importância, pois a variação da composição da CuChl também pode estar correlacionada com a variação dos resultados encontrados nos trabalhos que envolvem a atividade biológica da CuChl.

Dessa forma, o presente estudo foi conduzido a fim de quantificar a porcentagem dos elementos químicos (carbono, hidrogênio, nitrogênio, sódio e cobre) de duas amostras comerciais de CuChl, bem como, separar e identificar seus principais componentes por HPLC/MS-MS, avaliando sua estabilidade em função da temperatura e do tempo. Além disso, buscou-se avaliar as características físico-químicas de equilíbrio de protonação (pK_a). Esta investigação é fundamental para compreender o efeito da clorofilina cúprica de sódio em ensaios *in vivo* e *in vitro*, uma vez que ainda não existem estudos que determinam quem é responsável pelos efeitos biológicos descritos na literatura:

o corante, algum de seus componentes, o sinergismo entre eles, ou ainda algum produto de degradação da clorofilina.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar quimicamente duas amostras comerciais de clorofilina cúprica de sódio (Chr. Hansen e Sigma).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a composição elementar (carbono, hidrogênio e nitrogênio) e dos elementos químicos sódio e cobre da clorofilina cúprica de sódio;
- Avaliar a pureza das amostras de clorofilina cúprica de sódio pela razão Cu/N, e das bandas espectrais Soret/Q;
- Comparar três metodologias de separação e identificação dos principais componentes de clorofilina cúprica de sódio por HPLC/MS-MS utilizando duas colunas cromatográficas (C₁₈ e C₃₀);
- Avaliar a degradação térmica da CuChl por HPLC e calcular a cinética de degradação;
- Avaliar o equilíbrio químico de protonação (pK_a).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Neste estudo, foram utilizadas amostras de clorofilina cúprica de sódio comerciais (CuChl) da marca Sigma (C6003, lote 026K1091, produzido em 2006, fórmula molecular $C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$) e da marca Chr.Hansen (lote do fabricante 60-60-57, produzido em 2008), gentilmente cedida pela empresa.

3.2 Análise elementar

Foram analisadas pela Central Analítica IQ/USP as amostras de CuChl (Sigma e Chr.Hansen) quanto à porcentagem de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N). Foi utilizado o equipamento da marca Perkin-Elmer CHN 2400, onde 100 mg de amostra sofreu combustão ($\pm 925^\circ\text{C}$) na presença de oxigênio puro, os experimentos foram realizados em duplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem relativa dos elementos na amostra.

A determinação do cobre total (Cu_{total}) e do sódio (Na) foi realizada por espectroscopia de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), pelo equipamento Spectro Ciros CCD, onde 100 mg das amostras foram atomizadas em plasma, em duplicata.

Também foi realizado o teste para a determinação de cobre livre (Cu_{livre}). Para tanto, 100 mg de CuChl em água (75 mL) permaneceu em agitação por

três minutos. O pH da solução foi ajustado para 3,0 com ácido clorídrico (HCl) 1N e, em seguida foi transferida para um frasco de 100 mL. A solução foi filtrada, descartando-se os primeiros 10 mL, e o filtrado límpido foi analisado por ICP-AES. O Cobre quelado (Cu_{quelado}) foi calculado pela diferença entre a % de Cu_{total} e Cu_{livre} (U.S.P, 2007).

Os resultados foram comparados com as descrições e monografias publicadas por órgãos de fiscalização, a *United States Pharmacopeia* (U.S.P) (2007) e a Comissão da Comunidade Européia (1995).

3.3 Cálculo da pureza pela %Cu e razão Cu/N

Chernomorsky (1993) demonstrou que existe uma relação entre a razão de Cu/N e a quantidade de derivados não-cúpricos (**FIGURA 2A**). A razão $Cu/N = 1,1$ (porcentagem teórica do Cu/N: $8,77 / 7,73$ a partir da fórmula molecular da CuChl) é obtida para compostos totalmente cupro-complexados.

Posteriormente, o mesmo grupo estabeleceu uma relação entre a pureza e a porcentagem de $cobre_{\text{total}}$ das amostras comerciais de CuChl (**FIGURA 2B**). A partir dos resultados obtidos no estudo (CHERNOMORSKY et al., 1997b), os autores contruíram um gráfico de %Pureza em função da %Cu a fim de que a equação da reta ($\%Pureza = -0,047 + 10,9\%Cu$) fosse aplicada à qualquer amostra de CuChl comercial.

Com base nesses trabalhos e a partir das porcentagem de Cu e N obtidas pela análise elementar foram estimadas a porcentagem de derivados não cúpricos e a pureza das amostras.

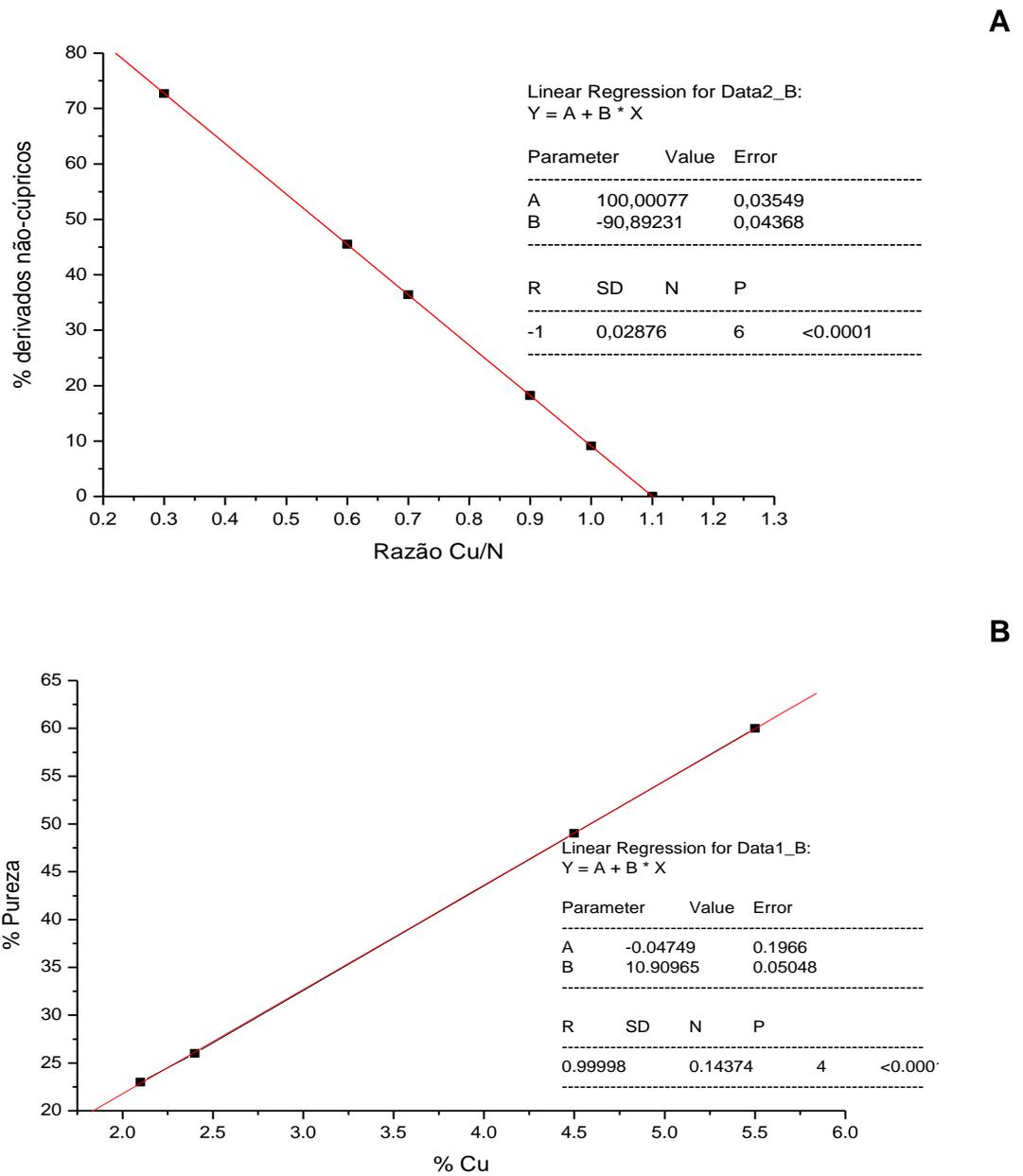


FIGURA 2. (A) Relação entre a % de derivados não-cúpricos e a relação Cu/N, com base em tabela apresentada no estudo de Chernomorsky (1993). (B) Porcentagem de pureza da amostra com a %Cu determinada quantitativamente, com base nos valores experimentais do estudo de Chernomorsky e colaboradores (1997b).

3.4 Razão entre as bandas Soret e Q do espectro de absorção

A pureza das amostras de CuChl foi determinada por outro parâmetro, relacionado com as medidas espectrofotométricas das absorbâncias em 405 nm (ASoret) e 628 nm (AQ), ou seja, razão as denominadas bandas Soret/Q, segundo o protocolo sugerido por CHERNOMORSKY e colaboradores (1997a).

De acordo com as recomendações da *U.S.P.*, foram preparadas soluções estoque de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) [10 µg/mL] em tampão fosfato 0,15 M pH 7,5 (fosfato dibásico de sódio:fosfato monobásico de potássio 21:4). A varredura do espectro de absorção foi realizada na faixa de 300 a 750 nm em cubeta com caminho óptico de 1 cm, em espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV 2401-PC. Os resultados obtidos foram utilizados para calcular a razão entre a banda Soret (405 nm) e a banda Q (628 nm) e estimar a pureza da amostra (CHERNOMORSKY et al., 1997a).

3.5 Separação e identificação da CuChl por HPLC/MS-MS

Foram testadas duas metodologias que utilizaram uma coluna C₁₈ para separar os componentes da CuChl por HPLC (EGNER et al., 2000; SCOTTER et al., 2005) e uma metodologia com uma coluna C₃₀ (MORTENSEN; GEPPEL, 2007) para separar e identificar a CuChl por HPLC/MS-MS.

Todas as análises por HPLC foram realizadas no equipamento da marca Shimadzu (modelo Class-M10A), software Class-VP032, equipado com duas

unidades de bombeamento de solventes (LC-10Advp), injetor automático (SIL-M10Avp), forno com controle de temperatura (CTO-10Svp), detector UV-Vis com arranjos de fotodiodos (PDA) (SPD-M10Avp), e detector de fluorescência (RF-10AXL).

3.5.1 Coluna C18, metodologia proposta por Scotter e colaboradores (2005)

A separação da CuChl foi realizada de acordo com a técnica descrita por Scotter e colaboradores (2005), para determinação da CuChl em matriz alimentar. Foi utilizada uma coluna Vydac ODS (C₁₈) 300 Å, 250 x 4,6 mm, 5 µm um gradiente de eluição com duas fases móveis: fase móvel A: metanol/acetato de amônio 1M (80:20, v/v) e fase móvel B: metanol:acetona (60:40, v/v): 100% A até 100% B durante 30 minutos de modo linear, mantido 30 minutos em 100%B, com fluxo de 1 mL/min. O tempo de corrida foi de 50 minutos. Foram injetados 50 µL da amostra de CuChl (Sigma) [0,2 mg/mL] solubilizadas em metanol:tampão fosfato 0,01 M pH 7,5 (80:20, v/v). A separação foi acompanhada por detecção em PDA em comprimentos de onda de 405 x 8nm; 626 x 8nm e 650 x 40nm e detecção por fluorescência com $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 640 \text{ nm}$.

3.5.2 Coluna C18, metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000)

Neste método foram adotados os procedimentos e as condições descritas por Egner e colaboradores (2000) para a separação dos componentes da CuChl em material biológico. Foi utilizada uma coluna Vydac ODS (C₁₈) 300 Å, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm e duas fases móveis: fase móvel A: metanol/água (80:20 v/v) contendo 1% ácido acético (v/v) e fase móvel B: metanol, com gradiente de eluição inicial de 40% B, de 0-20 minutos 80% B, 20-30 minutos 90% B, 30-40 minutos 100% B, 40-60 minutos 100% B, com fluxo de 1 mL/minuto. O tempo de corrida foi de 60 minutos. Foram injetados 50 µL de cada amostra de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) [0,2 mg/mL] solubilizada na fase móvel A. A separação foi acompanhada por detecção em PDA em comprimentos de onda de 405 e 626nm e fluorescência com $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 640 \text{ nm}$.

3.5.3 Coluna C30, metodologia proposta por Mortensen e Geppel (2007)

O método utilizado por Mortensen e Geppel (2007) separou e identificou por HPLC/MS cinco amostras comerciais de CuChl. Neste estudo, foi empregada uma coluna C₃₀ da marca YMC, 250 mm x 4,6 mm, 3 µm, à 30 °C e duas fases móveis: fase móvel A: metanol:água:ácido acético (90:10:0,5, v/v), e fase móvel B: tert-butil metil éter:metanol:ácido acético (100:10:0,5, v/v). Gradiente de eluição utilizado: 0-50% B em 30 minutos, 50-100% B em 10 minutos, 100% B por 5 minutos e 100-0% B em 5 minutos, com fluxo de 1

mL/min. O tempo de corrida foi de 86 minutos. Foram injetados 10 μ L das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) [0,4 mg/mL] solubilizadas em metanol, e a separação foi acompanhada por detecção em PDA em comprimentos de onda de 406 x 8nm; 408 x 8nm e detecção por fluorescência $\lambda_{\text{excitação}} = 400 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 640 \text{ nm}$.

Realizou-se também uma análise complementar por HPLC/MS-MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas) no Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica do IQ/USP. O equipamento utilizado foi um analisador tipo íon trap LC-MS/MS(n) com ionização por electrospray (ESI) – Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus seguindo as condições cromatográficas descritas por Mortensen e Geppel (2007).

3.6 Avaliação da estabilidade térmica

3.6.1 Análise por HPLC

A metodologia utilizada para análise cromatográfica foi aquela descrita no item **3.5.2**. Foi avaliada a estabilidade térmica da CuChl (Sigma) em solução aquosa [0,2mg/mL] a temperatura ambiente (25°C), e aquecimento em banho maria até as temperaturas atingirem 35, 45, 55, 65, 75, 85 e 95°C. O experimento foi conduzido em tubos de ensaio protegidos da luz.

3.6.2 Cálculo da cinética de degradação e meia-vida

A determinação da cinética de degradação envolveu a análise da ordem de reação, energia de ativação (E_a) (FERRUZZI e SCHWARTZ, 2005) e constante da velocidade de reação (k).

Neste trabalho, a ordem de reação foi determinada para o método espectrofotométrico por meio da obtenção de representação gráfica, plotando o logaritmo da absorbância em função do tempo (segunda ordem).

A cinética da degradação térmica da CuChI foi avaliada nas temperaturas de 35, 45, 55 e 65°C. Aproximadamente 1 mg de CuChI foi solubilizada em 100 mL de água Milli-Q, em seguida, foi realizada a leitura do espectro de absorção em 406 nm em cubeta com caminho óptico de 1 cm, em espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV 2401-PC, acoplado a um forno com temperatura controlada (CPS – Controller).

Para os cálculos da constante de velocidade e energia de ativação, foram utilizadas as seguintes equações:

$$\ln \frac{(A_t - A_\infty)}{(A_0 - A_\infty)} = -kt \quad \text{Eq. (1)}$$

, onde:

\ln = logaritmo natural da constante da velocidade

A_t = absorbância no tempo t

A_∞ = absorbância após a reação ter acontecido

A_0 = absorbância no tempo igual a zero

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E_a}{R}\right) \left(\frac{1}{T}\right) \quad \text{Eq. (2)}$$

, onde:

$\ln k$ = coeficiente angular

$\ln A$ = coeficiente linear

E_a = Energia de ativação

R = constante da lei dos gases ($8,314472 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T = temperatura

O tempo para que a metade da quantidade do composto se decomponha é referido como meia-vida da reação, calculando-se pela equação:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad \text{Eq. (3)}$$

, onde:

$t_{1/2}$ = meia-vida

$\ln 2 = 0,693$

k = constante de velocidade

3.7 Determinação dos valores de pK_a

O estudo da variação do pH em função da concentração de CuChI (Sigma) foi obtido com uma diluição de uma solução aquosa de concentração inicial conhecida [0,195 mg/mL], até atingir a concentração final de 0,0069mg/mL, por meio da adição de alíquotas de água Milli-Q. Para a leitura foi utilizado um pH-metro digital série B474, Micronal.

Afim de se obter informações sobre o comportamento da CuChl em diferentes pHs e de identificar a eventual agregação do pigmento em diferentes condições experimentais, calculou-se os valores de pK_a s das amostras da marca Sigma e Chr. Hansen, com base na titulação potenciométrica da CuChl.

Foram preparadas soluções de CuChl (Sigma e Chr, Hansen) [0,2 mg/mL] em 10 mL de água Milli-Q. A titulação base-ácido foi feita com uma solução de HCl 0,01 M. A leitura do pH foi realizada por meio de um pH-metro digital da marca Micronal série B474 de três casas decimais, e a temperatura monitorada a $25,5 \pm 0,3$ °C.

3.8 Titulação base-ácido e espectrofotométrica

Na titulação espectrofotométrica foi realizada com uma solução de CuChl (Sigma) preparada em água na concentração 0,2 mg/mL. Na cubeta a solução foi diluída para 0,022 mg/mL. O volume inicial de leitura foi de 3mL e a absorbância foi corrigida para cada leitura após a adição de HCl 0,01M de acordo com a equação:

$$Abs\ corrigida = \left(\frac{volume\ total}{volume\ inicial} \right) \times (abs\ observada)$$

Os pHs das soluções da leitura espectrofotométrica foram de: 9,37, 8,72, 7,42, 6,20, 4,20 e 3,65.

Para titulação base-ácido foi utilizada solução de HCl 0,01M, utilizando para leitura um pH-metro digital série B474, Micronal. Temperatura média dos experimentos $25,5 \pm 0,3$ °C. Uma amostra 0,25mg de CuChl (Sigma) foi

preparada em 25 mL de água, com pH inicial 7,09, sendo que 15 mL dessa amostra foi transferida para um béquer e 10 µL de HCl 2M foi adicionado a ela, cujo pH diminui para 2,89. Em seguida, 10 µL de NaOH 1M e 10 µL de NaOH 4M, foram utilizado para realcalinizar a amostra para pH = 11,17. Os espectros de absorção máxima, de cada solução em diferentes pHs, foram determinados em espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV 2401-PC.

3.9 Análise estatística

Todas as análises estatísticas, bem como os gráficos, foram realizadas no programa OriginPro em sua versão 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation). Os resultados encontram-se apresentados como média \pm desvio padrão (DP) adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Análise elementar

A porcentagem relativa dos elementos químicos da amostra de CuChl (Sigma) foi calculada considerando a massa molecular de 724,15 g/mol, que corresponde à fórmula química $C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$ que consta no rótulo da embalagem (**TABELA 1**). Os valores descritos serviram de comparação com as porcentagens encontradas na análise elementar de amostras de CuChl realizada experimentalmente.

TABELA 1. Valores teóricos das massas dos elementos C, H, Cu, N, Na e O e suas respectivas porcentagens relativas, calculados a partir da fórmula química $C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$ presente no rótulo da CuChl (Sigma).

C₃₄		H₃₁		Cu		N₄		Na₃		O₆	
Massa (g/mol)	%	Massa (g/mol)	%	Massa (g/mol)	%	Massa (g/mol)	%	Massa (g/mol)	%	Massa (g/mol)	%
408,36	56,39	31,25	4,31	63,55	8,78	56,02	7,74	68,97	9,52	96,00	13,26

Massa molecular da CuChl: 724,15 g/mol = 100%

Na **TABELA 2** estão apresentados os resultados da análise elementar das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) para os elementos C, H e N, seguido da porcentagem teórica calculada a partir da fórmula química presente no rótulo e o padrão de qualidade recomendado pela *U.S.P.* Observou-se que as porcentagens de C das amostras de CuChl estão de acordo com o valor calculado a partir dos dados constantes nos rótulos. Porém, as porcentagens de H encontradas nas duas amostras são maiores do que o valor teórico

calculado. A porcentagem do elemento N é menor em relação a porcentagem teórica, porém ainda atende o parâmetro estabelecido pela *U.S.P.* Vale ressaltar que quanto aos três elementos, somente a porcentagem de N possui recomendação da *U.S.P.*

TABELA 2. Porcentagem relativa dos elementos químicos C, H, e N, da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) obtidos pela análise elementar, considerando a fórmula química teórica ($C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$) e o limite estabelecido pela *U.S.P.* (2007).

Amostra	% C	% H	% N
Sigma	57,12 ± 0,09	6,08 ± 0,17	4,37 ± 0,13
Chr. Hansen	56,10 ± 0,03	6,19 ± 0,01	5,07 ± 0,01
Fórmula química	56,39	4,31	7,74
<i>U.S.P.</i>	-	-	> 4,0

A porcentagem de Cu, Cu_{livre} , $Cu_{quelado}$ e Na estão apresentados na **TABELA 3**, seguidos pela porcentagem teórica da fórmula química e os limites estabelecidos pela *U.S.P.* As porcentagens de Cu_{total} nas amostras (Sigma e Chr. Hansen) foram semelhantes entre si, mas correspondem aproximadamente a apenas 50% do valor teórico calculado (**TABELA 1**), e também, abaixo do limite mínimo estipulado pela *U.S.P.* (2007). Quanto à $\%Cu_{livre}$, os valores das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) estão de acordo com o limite estabelecido pela *U.S.P.* A partir da diferença entre o Cu_{total} e Cu_{livre} foi calculada a porcentagem de $Cu_{quelado}$, e os resultados são compatíveis com as recomendações da *U.S.P.* (2007). Em relação à porcentagem de sódio (Na), observa-se que apenas a amostra da Sigma é inferior (3,88%) ao limite entre 5 a 7% estabelecidos pela *U.S.P.* (2007). Porém, ambas as amostras encontram-se abaixo da porcentagem teórica.

TABELA 3. Porcentagem dos elementos químicos Cu, Cu_{livre}, Cu_{quelado} e Na da CuChl (Sigma e Chr. Hansen), obtidos pela análise elementar, fórmula química teórica (C₃₄H₃₁CuN₄Na₃O₆) e limite estabelecido pela U.S.P. (2007).

Amostra	% Cu	% Cu livre	% Cu quelado*	% Na
Sigma	4,04 ± 0,05	0,012 ± 0,001	4,03	3,88 ± 0,01
Chr. Hansen	4,05 ± 0,03	0,027 ± 0,002	4,02	5,87 ± 0,01
Fórmula química	8,78	-	-	9,52
U.S.P.	> 4,25	< 0,25	> 4,00	5 – 7

* % Cu quelado calculado por diferença (% Cu - % Cu livre).

4.2 Avaliação da pureza das amostras de CuChl

Alguns estudos apontam que a pureza das amostras de CuChl está relacionada com a %Cu_{total}, relação de Cu/N e as bandas Soret e Q do espectro de absorção (Razão Soret/Q) (CHERNOMORSKY , 1993; CHERNOMORSKY et al., 1997^b; BREINHOLT *et al.* 1995).

4.2.1 Porcentagem de pureza em relação aos elementos Cu e N

A partir dos resultados da análise elementar, foram obtidas as porcentagens de Cu e N (**TABELA 2** e **TABELA 3**). Os valores encontrados foram posicionados no gráfico, conforme estudo prévio (CHERNOMORSKY, 1993; 1997^b) em que os autores demonstraram que existe uma relação entre valores da razão de Cu/N e a quantidade de derivados não-cúpricos e a porcentagem de Cu e a pureza da clorofilina.

Na **TABELA 4** é apresentada a razão Cu/N e sua relação com a porcentagem de derivados não cúpricos e a %Cu e a pureza das amostras de

CuChl. O valor teórico da razão Cu/N é de 1,1 e as amostras de CuChl apresentaram valores abaixo do esperado: 0,92 (Sigma) e 0,79 (Chr. Hansen). Portanto, cerca de 84,3 % (Sigma) e 72,2 % (Chr.Hansen) correspondem a compostos cúpricos nas amostras de CuChl.

Quanto a porcentagem de Cu_{total} e sua relação com a pureza, os resultados obtidos foram de 43,93 % (Sigma) e 44,10 % (Chr. Hansen), aproximadamente a metade do valor teórico (96%) da CuChl.

TABELA 4. Cálculo da razão Cu/N e a porcentagem de derivados não cúpricos e a % Cu_{total} e sua relação com a %Pureza, calculada a partir dos valores experimentais, com base na **FIGURA 2.**

CuChl	Razão Cu/N	% derivados cúpricos	% Cu_{total}	% Pureza
Sigma	0,92 ± 0,09	84,3	4,04 ± 0,05	43,93
Chr. Hansen	0,79 ± 0,03	72,2	4,05 ± 0,03	44,10
Teórico	1,1	100*	8,77	~ 96

* compostos totalmente cupro-complexados.

4.2.2 Razão Soret/Q e sua relação com a pureza das amostras de CuChl

Esta análise foi realizada empregando diferentes concentrações (13 a 30 μ M) de cada uma das amostras de CuChl (Sigma e Chl. Hansen) e os espectros de absorção para cada concentrações estão apresentados na **FIGURA 3.**

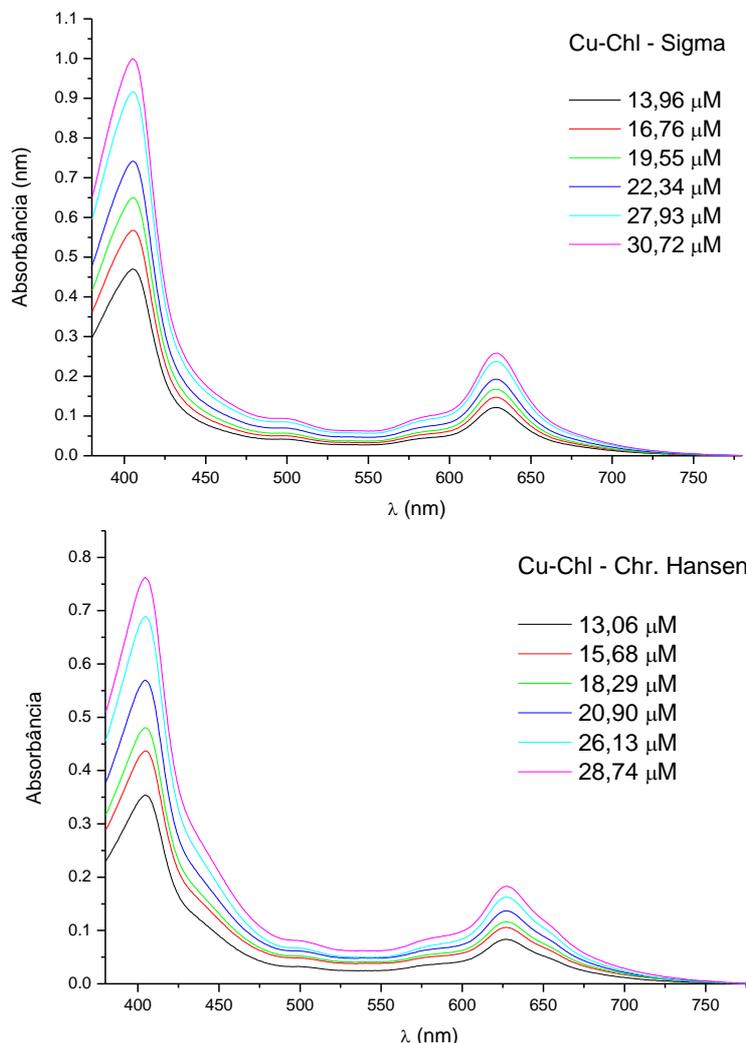


FIGURA 3. Espectros de absorção das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) na faixa de concentração de 13 a 30 μM nos comprimentos de onda de 380 a 780 nm.

Os espectros de absorção foram similares aos descritos para a CuChl cupro-complexada, com absorbância característica em 405 nm e 628 nm (CHERNOMORSKY et al., 1997a; SCOTTER et al., 2005). Os valores das absorbâncias nas cinco concentrações de CuChl de cada amostra (Sigma e Chr. Hansen), bem como a razão Soret/Q, estão apresentados na **TABELA 5**. O valor médio da razão Soret/Q da amostra da Sigma foi de $\sim 3,87$ e encontra-se dentro dos limites estabelecidos pela *U.S.P* (3,0 a 3,9). Em contrapartida, a

amostra da Chr. Hansen apresentou valor médio de 4,18, superior à faixa recomendada.

TABELA 5 – Valores das absorvâncias das bandas Soret e Q de soluções de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) em tampão fosfato pH 7,5 em diferentes concentrações.

[Sigma] μM	A _{Soret}	A _Q	Razão Soret/Q	[Chr.Hansen] μM	A _{Soret}	A _Q	Razão Soret/Q
13,96	0,4699	0,1213	3,87	13,06	0,3536	0,0833	4,24
16,76	0,5671	0,1470	3,86	15,68	0,4368	0,1057	4,13
19,55	0,6495	0,1673	3,88	18,29	0,4802	0,1162	4,13
22,34	0,7412	0,1923	3,85	20,90	0,5693	0,1367	4,16
27,93	0,9152	0,2372	3,86	26,13	0,6890	0,1627	4,23
30,72	0,9993	0,2581	3,87	28,74	0,7614	0,1828	4,17
Média			3,87	Média			4,18

4.3 Separação e identificação da CuChl por HPLC/MS-MS

Foram comparadas duas metodologias de separação por HPLC que utilizam coluna C₁₈ (EGNER et al., 2000; SCOTTER et al., 2005) e uma terceira que empregam uma coluna C₃₀ (MORTENSEN; GEPPEL, 2007). O primeiro método testado foi descrito por Scotter e colaboradores (2005) o qual separou os principais componentes da CuChl em bebidas. O segundo método descrito por Egner e colaboradores (2000) difere do primeiro apenas em relação a fase móvel e foi utilizado para identificação do corante em material biológico.

O terceiro método testado foi descrito por Mortensen e Geppel (2007) e utilizou uma coluna C₃₀ na separação e identificação dos principais componentes presentes em cinco amostra de CuChl por HPLC/MS-MS.

4.3.1 Metodologia proposta por Scotter e colaboradores (2005) utilizando uma coluna C18

A **FIGURA 4A** apresenta o perfil cromatográfico obtido por HPLC da separação da CuChl (Sigma). Observa-se que em aproximadamente cinco minutos houve a separação de dois picos que apresentaram o mesmo espectro de absorção máxima em 408 nm e 630 nm (**FIGURA 4A₁** e **4A₂**), típicos da CuCe6. Em onze minutos, foi identificada a CuCe4, segundo seu espectro de absorção em 408 nm e 628 nm (**FIGURA 4A₃**).

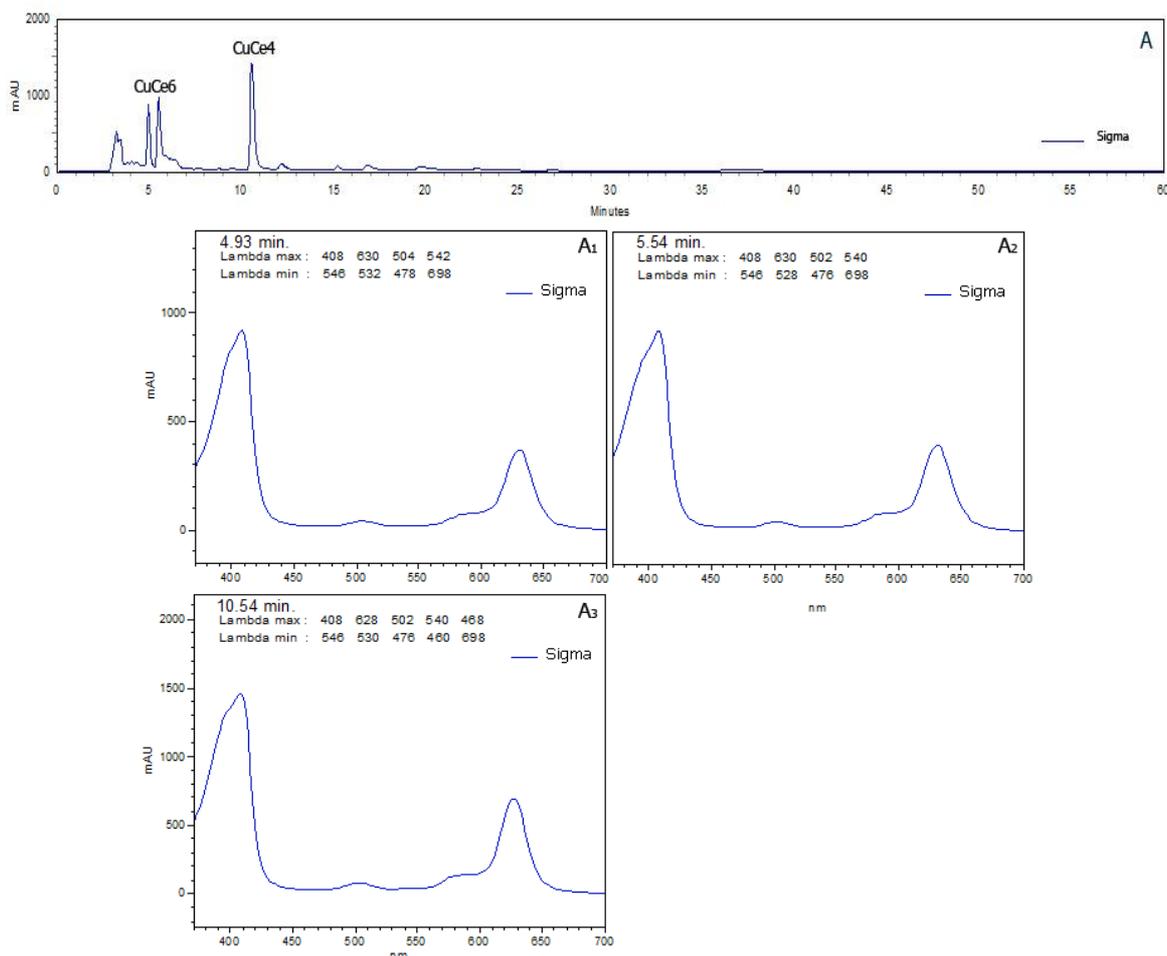


FIGURA 4. Cromatograma da amostra de CuChl (Sigma) em PDA (**A**); seguido dos espectros de absorção dos picos identificados como clorina cúprica e₆ (**A₁** e **A₂**) e clorina cúprica e₄ (**A₃**).

Dessa forma, a metodologia descrita por Scotter e colaboradores (2005) não foi adequada na separação e identificação de um dos principais componentes da ChChl, a CuCe6.

4.3.2 Metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000) utilizando uma coluna C₁₈

Na **FIGURA 5** são apresentados os cromatogramas das amostras de CuChl (Sigma e Chr.Hansen). Observa-se que uma separação incompleta em 8,30 e 8,60 minutos para ambas as amostras. O espectro de absorção máxima em 8,30 minutos foi de 408,633 nm (Sigma) e 407,632 nm (Chr. Hansen), característicos da CuCe6 (**FIGURA 5A₁**). Em aproximadamente 8,60 minutos o espectro de absorção foi de 406,638 nm (Sigma) e 406,638 nm (Chr.Hansen), típico de uma clorina cúprica p₆ (CuCp6) (**FIGURA 5A₂**). A identificação da CuCe4 ocorreu segundo seu tempo de retenção em 13,40 minutos e espectro de absorção de 405 e 626nm (**FIGURA 5A₃**).

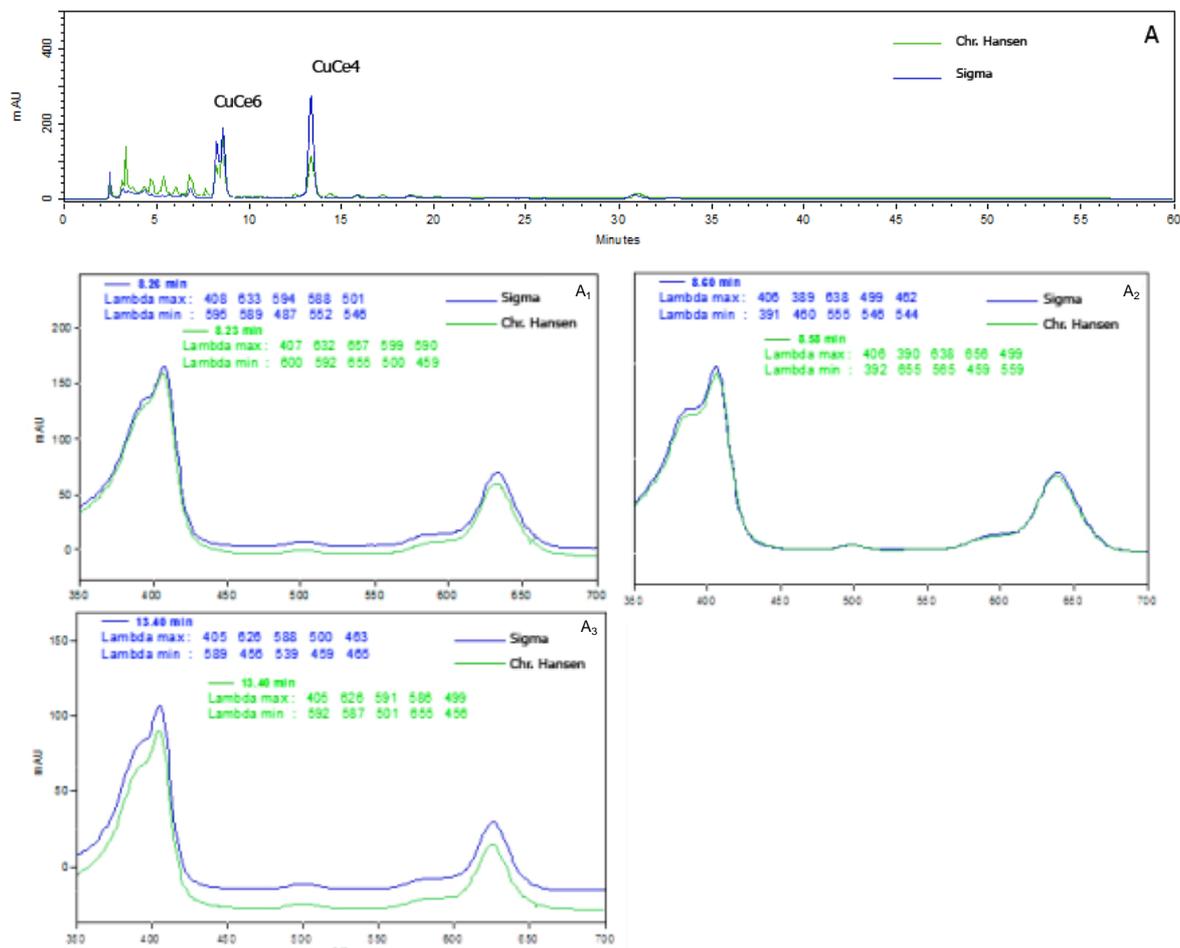


FIGURA 5. (A) Cromatogramas sobrepostos da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) em PDA. Espectros de absorção da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) e os picos identificados como clorina cúprica e₆ (A₁ e A₂) e clorina cúprica e₄ (A₃)

A partir dos cromatogramas obtidos pela separação das amostras de CuChl (Sigma e Chr.Hansen), foram identificados os principais picos segundo o tempo de retenção e espectro de absorção máxima (λ_{max}), a partir dos dados disponíveis na literatura (**TABELA 6**).

TABELA 6. Componentes da CuChl e seus valores de λ_{\max} , tempo de retenção (TR) obtidos pela separação por HPLC e detecção em PDA, conforme dados da literatura.

Componente	λ_{\max}	TR (min)
Clorina e ₆	404,660 ^(a)	4,2 ^(a)
	404,642,660 ^(b)	7,3 ^(b)
Purpurina cúprica 7	427,657 ^(b)	12,2 ^(b)
Rodina cúprica g ₇	430,614 ^(b)	12,7 ^(b)
	436,622 ^(c)	---
	438,623 ^(d)	---
Clorina e ₄	402,660 ^(a)	5,5 ^(a)
Rodina não-cúprica	429,656 ^(b)	13,7 ^(b)
Clorina cúprica e ₆	408,632 ^(a)	5,4 ^(a)
	408,635 ^(b)	15 ^(b)
	407,633 ^(c)	---
	408,634 ^(d)	---
	406,634 ^(e)	4,5 ^(e)
	nd	30 (em 626nm) ^(f)
Clorina cúprica p ₆	407,639 ^(b)	15,7 ^(b)
Isoclorina cúprica e ₄	406,627 ^(b)	20,1 ^(b)
Clorina cúprica e ₄	408,632 ^(a)	7,4 ^(a)
	410,634 ^(b)	---
	404,626 ^(c)	---
	404,627 ^(d)	---
	406,628 ^(e)	8,5 ^(e)
	404,626 ^(f)	39 (em 626 nm) ^(f)
Clorina cúprica e ₄ etil éster	404,626 ^(f)	47 (em 626 nm) ^(f)
Feoforbídeo cúprico a	424,654 ^(a)	17 ^(a)
	401,423,653 ^(c)	---
	402,424,654 ^(d)	---
	422,657 ^(e)	13,9 ^(e)
Pirofeoforbídeo cúprico a	404,422,653 ^(b)	29,8 ^(b)
Porfirina cúprica	404 ^(b)	38 ^(b)

Referência. (a) Scotter *et al.* (2005) ; (b) Mortensen e Geppel (2007) utilizando coluna C₃₀; (c) Inoue *et al.* (1994) ; (d) Ferruzzi *et al.* (2002) ; (e) Chernomorsky *et al.* (1997a); (f) Egner *et al.* (2000).

Na **TABELA 7** estão apresentados os tempos de retenção, os comprimentos de onda de absorção máxima dos principais picos das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) e a identificação de seus possíveis componentes em comparação com os dados da literatura (**TABELA 6**). Dessa forma, a amostra de CuChl (Sigma) apresentou três componentes majoritários,

a CuCe6, a CuCp6 e a CuCe4. A amostra da Chr. Hansen, revelou um maior número de componentes, dentre eles a Ce6, a CuCe6, a CuCp6, CuCe4, e ainda uma possível rodina ou purpurina.

TABELA 7. Relação dos valores de λ_{\max} , tempos de retenção (TR) e identificação dos prováveis componentes da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) separados por HPLC, segundo metodologia preconizada por Egner e colaboradores (2000).

Amostra	TR (min)	λ_{\max} observado	Provável componente
Sigma	8,26	408,633	Clorina cúprica e ₆ (CeCe6)
	8,60	406,638	Clorina cúprica p ₆ (CuCp6)
	13,40	405,626	Clorina cúprica e ₄ (CuCe4)
Chr. Hansen	3,34	404,641,657	Clorina e ₆ (Ce6)
	5,38	428,654	Rodina ou purpurina
	6,82	437,623	Rodina cúprica g ₇
	8,23	407,632	Clorina cúprica e ₆ (CuCe6)
	8,58	406,638	Clorina cúprica p ₆ (CuCp6)
	13,40	405,626	Clorina clorina e ₄ (CuCe4)

4.3.3 Metodologia proposta por Mortensen e Geppel (2007) utilizando uma coluna C30 por HPLC-MS/MS

Na **FIGURA 6** encontram-se os cromatogramas sobrepostos das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) em PDA (**FIGURA 6A**) e fluorescência (**FIGURA 6B**), empregando a metodologia proposta por Mortensen e Geppel (2007), que utilizaram uma coluna C₃₀. Em ambas amostras (Sigma e Chr. Hansen) foram indentificados os principais componentes: a CuCe6, CuCp6 e CuCe4. Além disso, a detecção por fluorescência (**FIGURA 6B**) mostrou alguns picos resultantes da presença de

compostos não-cúpricos na amostra de CuChl da Chr.Hansen, o mesmo não foi observado na amostra da Sigma.

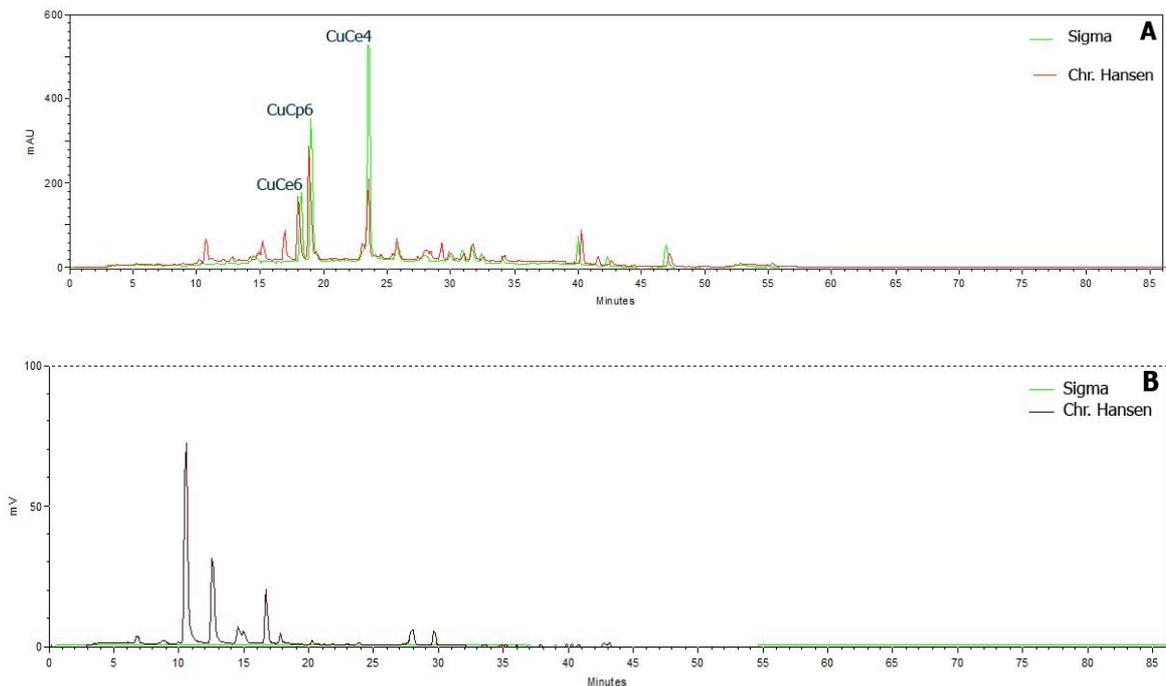


FIGURA 6. (A) Cromatograma em PDA (408nm) e (B) fluorescência da CuChl (Sigma e Chr. Hansen), segundo a metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).

Os principais componentes da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) obtidos pela separação por HPLC, estão apresentados na **TABELA 8**, e foram identificados com base nos tempo de retenção e nos comprimentos de onda de máxima absorção descrito na literatura.

TABELA 8. Relação entre os tempos de retenção e λ_{\max} dos compostos separados por HPLC com detecção PDA, segundo a metodologia de Mortensen e Geppel (2007).

Amostra	tempo de retenção (min)	λ_{\max} observado (nm)	Composto provável
Chr. Hansen	16,91	429,656	Rodina não-cúprica
	18,06	409,633	Clorina cúprica e ₆
	18,90	407,639	Clorina cúprica p ₆
	23,45	406,627	Isoclorina cúprica e ₄
	33,93	404,422,652	Pirofeoforbídeo cúprico a
	39,86	405	Porfirina cúprica
Sigma	18,19	408,634	Clorina cúprica e ₆
	19,01	407,639	Clorina cúprica p ₆
	23,67	407,627	Isoclorina cúprica e ₄
	34,33	404,423,652	Pirofeoforbídeo cúprico a
	40,16	405	Porfirina cúprica

A confirmação da identidade dos principais componentes (CuCe6, CuCp6 e CuCe4) da CuChl foi obtida por LC-MS/MS, cujos espectros de massas são apresentados nas **FIGURAS 7, 8 e 9**, respectivamente.

A **FIGURA 7A** apresenta o espectro de massas da CuCe6 identificada a partir do pico base com relação massa/carga (m/z) 656,2. Os picos próximos a este são provavelmente picos isotópicos devido a presença de ⁶⁵Cu e ¹³C. A fragmentação do pico com relação m/z 656,2 (**FIGURA 7B**) resulta na presença de um pico com m/z 612,1, obtido pela perda de um grupo carboxila com massa 44. O pico correspondente a m/z 568,2 é à perda de massa de dois grupos carboxila ($m/z = 88$), provavelmente aqueles ligados ao C13 do anel porfirínico e ao grupo $-CH_2$ ligado ao C15 do mesmo anel.

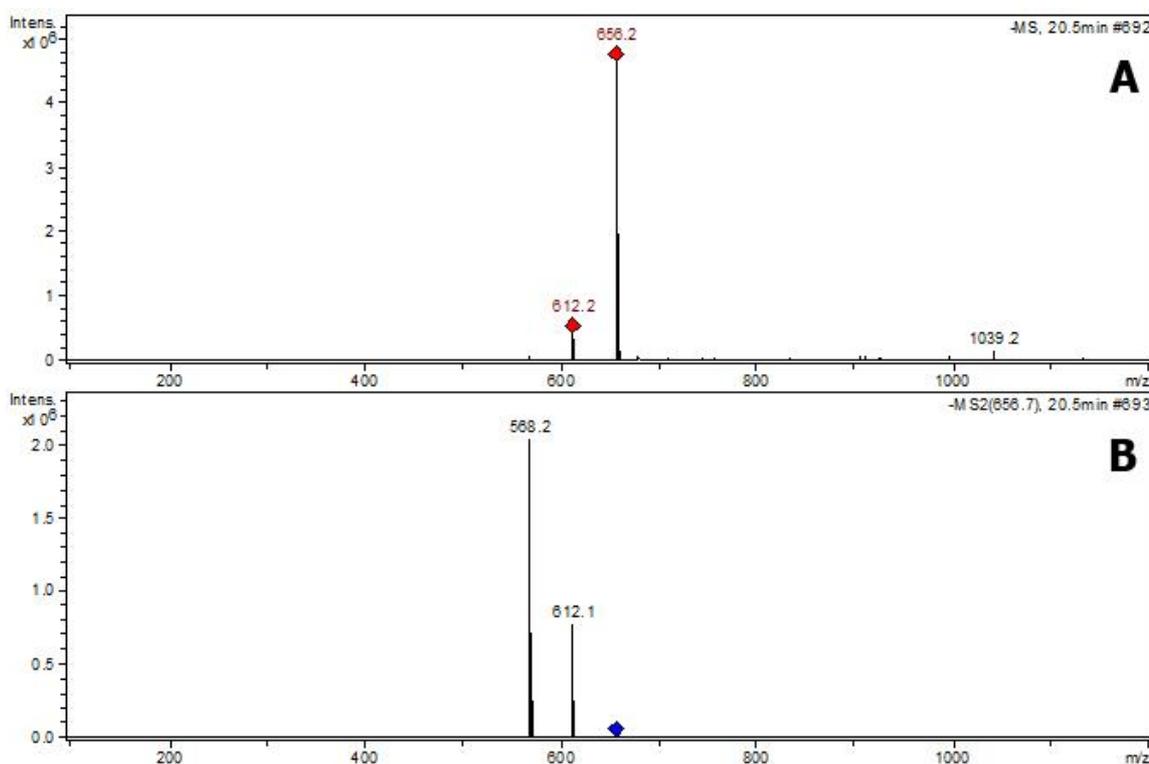


FIGURA 7. (A) Espectro de massas da CuCe6; (B) espectro MS/MS do fragmento com relação m/z 656,7.

A **FIGURA 8** apresenta o espectro de massas da CuCp6 identificada a partir do pico base com relação massa/carga (m/z) 642,2. A fragmentação do pico com m/z 642,9 fornece dois fragmentos, um deles m/z = 598,2 e outro 624,1 indicativo da perda de um grupo com m/z = 44, uma carboxila. Sendo que m/z = 624,1 indica a perda de um grupo com m/z = 18, provavelmente uma molécula de água, resultando na molécula de purpurina cúprica 18 (MORTENSEN; GEPPEL, 2007).

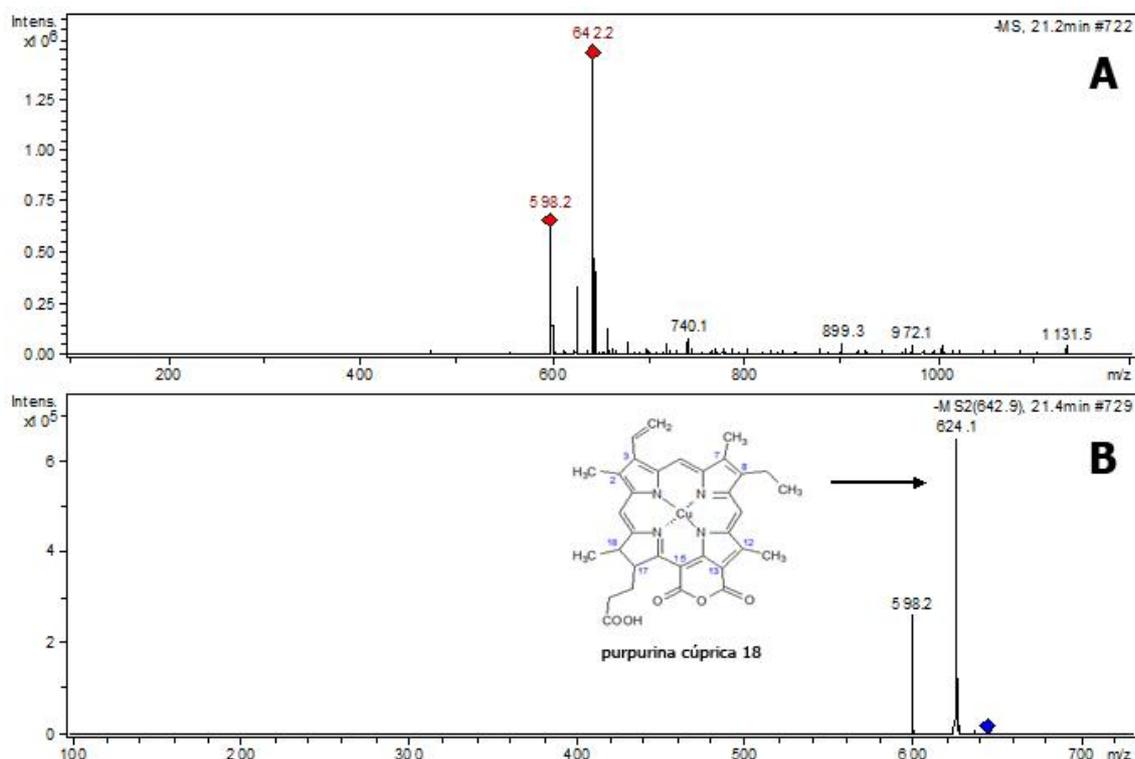


FIGURA 8. (A) Espectro de massas da CuCp6; (B) espectro MS/MS do fragmento com relação m/z 642,9.

A **FIGURA 9** apresenta o espectro de massas da CuCe4, identificada a partir do pico base com relação m/z = 568,3. O fragmento com relação m/z 612,3 na **FIGURA 9A** possui massa equivalente tanto à da isoclorina cúprica e₄ quanto a clorina cúprica e₄. O fragmento com relação m/z = 568,3 indica a perda de um grupo carboxila, o qual está presente nas duas moléculas.

Ao analisar o espectro MS/MS do fragmento com m/z 568,7 (**FIGURA 9B**) observa-se a presença dos fragmentos com m/z = 553,2, 524,2 e 481,1. Esses picos estão relacionados com a perda de um grupo -CH₂ com m/z = 14, ligado ao C15 do anel de isoclorina cúprica e₄ (resultando no fragmento m/z = 553,2), da perda da segunda carboxila (m/z = 524,2) e da perda simultânea dos grupos -CH₂CH₂COOH ligado ao C17 e -CH₂ ligado ao C15 do anel, totalizando uma perda de m/z = 87 (fragmento correspondente a m/z = 481,1).

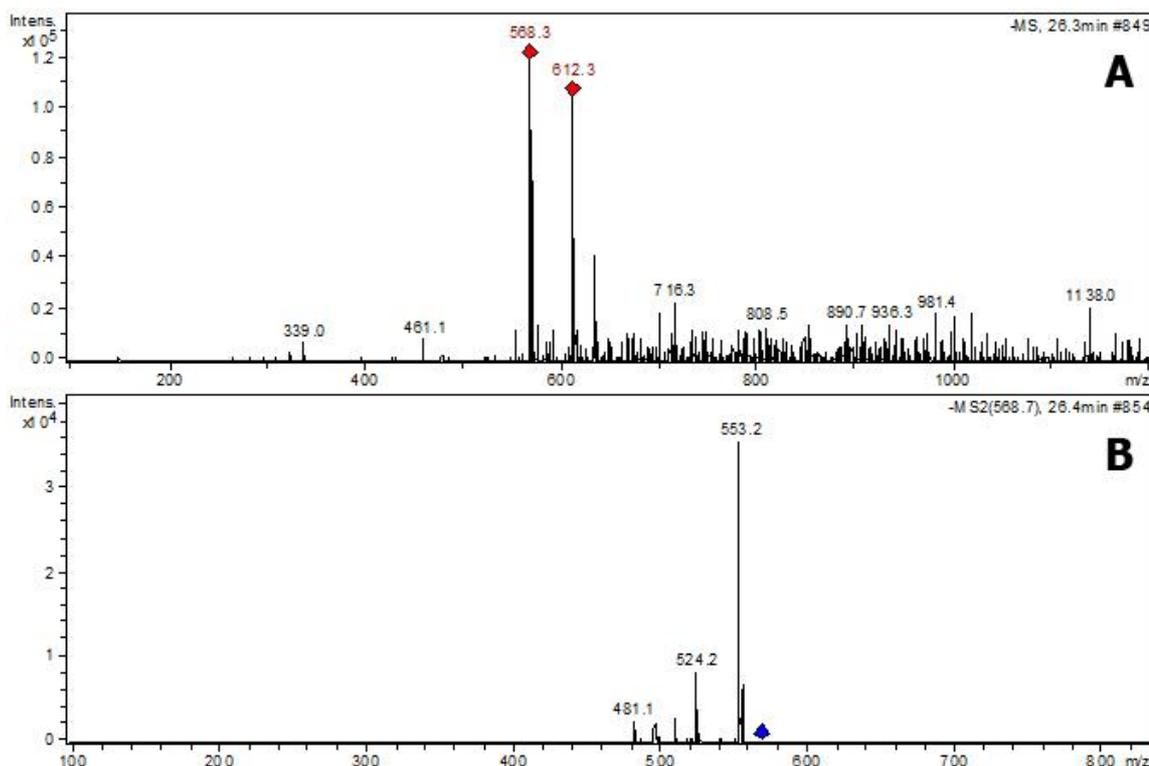


FIGURA 9. (A) Espectro de massas da isoCuCe4; (B) espectro MS/MS do fragmento com relação m/z 568,7.

A compilação dos dados para melhor visualização e confirmação dos principais componentes da CuChl eluídos por HPLC/MS-MS segundo seu tempo de retenção, espectros de absorção e de massas encontra-se na **TABELA 9**. Observa-se que os tempos de retenção das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen) variam ~3 minutos em comparação com os tempos encontrados por Mortensen e Geppel (2007). Em relação aos $\lambda_{\text{máx}}$, tanto a CuCp6 quanto a isoCuCe4 são similares aos valores da literatura. Da mesma forma, a identificação dos componentes em relação a massa (m/z) são comparáveis aos valores já descritos, confirmando a identidade dos compostos.

TABELA 9. Valores de λ_{\max} , tempo de retenção (TR), área (mAU) e massa (m/z) dos principais componentes da CuChl (Sigma e Chr. Hansen), comparadas com os valores de outras amostras, descritas por Mortensen e Geppel, 2007, obtidos na separação por HPLC, detecção PDA e identificação por HPLC-MS/MS.

Amostras	TR (min)	Área (mAU)	λ_{\max} (nm)	Massa (m/z)	Componente
Diversas*	15,0	-	408, 635	657, 613, 569, 521, 495	
Sigma	18,2	2298751	408, 634	656, 612, 568	CuCe6
Chr. Hansen	18,0	2585395	409, 633	656, 612, 568	
Diversas*	15,7	-	407, 639	643, 625, 599, 555, 507, 495	
Sigma	19,0	5478290	407, 639	642, 624, 598	CuCp6
Chr. Hansen	18,5	6345341	407, 639	642, 624, 598	
Diversas*	20,1	-	406, 627	613, 569, 521, 495	
Sigma	23,6	9373417	407, 627	612, 568, 553	isoCuCe4
Chr. Hansen	23,4	3179986	407, 627	612, 568, 553	

* Mortensen e Geppel (2007) compararam cinco amostras comerciais de CuChl. No artigo não consta a área (mAU) dos componentes.

4.4 Estabilidade térmica da CuChl

4.4.1 Análise por HPLC

A **FIGURA 10** apresenta os resultados da análise da estabilidade térmica da CuChl (Sigma e Chr. Hansen) a 25, 85 e 95°C utilizando a metodologia preconizada por Egner e colaboradores (2000) com separação por HPLC. Observa-se que a amostra de CuChl (Sigma) (**FIGURA 10A**) apresentou drástica degradação dos componentes CuCe6 e CuCe4 com o aquecimento. Concomitante, em aproximadamente 30 minutos foi identificado

um composto cujo espectro de absorção apresenta uma única na banda na região Soret (403nm), característico de uma porfirina.

A amostra de CuChl (Chr. Hansen) (**FIGURA 10B**) foi mais estável em relação ao seu componente CuCe4 do que a CuCe6, apresentando também, um pico de maior intensidade em 30 minutos após o aquecimento, característica semelhante a amostra da Sigma.

Com o intuito de facilitar a visualização, optou-se por não demonstrar nos cromatogramas (**FIGURA 10**) o comportamento das amostras a 35, 45, 55, 65 e 75°C, pois as variações drásticas ocorreram a 85 e 95°C.

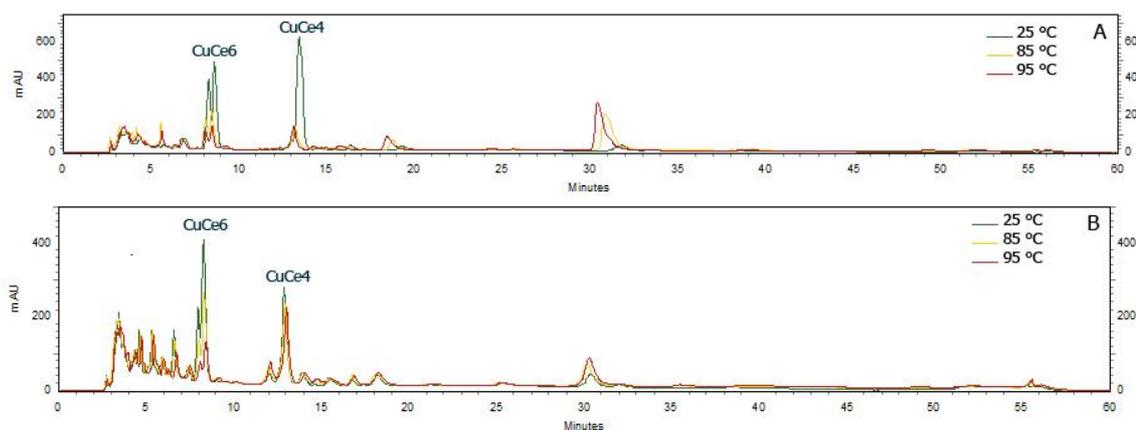


FIGURA 10. Cromatogramas sobrepostos (PDA 405nm) das amostras de CuChl da marca Sigma (**A**), Chr. Hansen (**B**) em diferentes temperaturas de aquecimento. Metodologia por HPLC preconizada por Egnér e colaboradores 2000.

4.4.2 Cinética de degradação e meia-vida

A avaliação da cinética química e da ordem das reações determinam o perfil de degradação de uma substância e como elas são influenciadas por fatores como solvente, pressão e temperatura (FLORENCE e ATTWOOD,

2011). A ausência de dados cinéticos envolvendo a degradação da clorofilina cúprica foi decisivo na escolha da temperatura como fator a ser estudado.

As constantes de velocidade de reação foram determinadas por meio dos coeficientes angulares da reta de acordo com a equação de primeira ordem. A **FIGURA 11** apresenta as curvas de degradação térmica da amostra de CuChI, submetidas as temperaturas de 35, 45, 55 e 65 °C, bem como os respectivos valores da constante de velocidade de degradação (k) e os coeficientes de correlação angular (R^2).

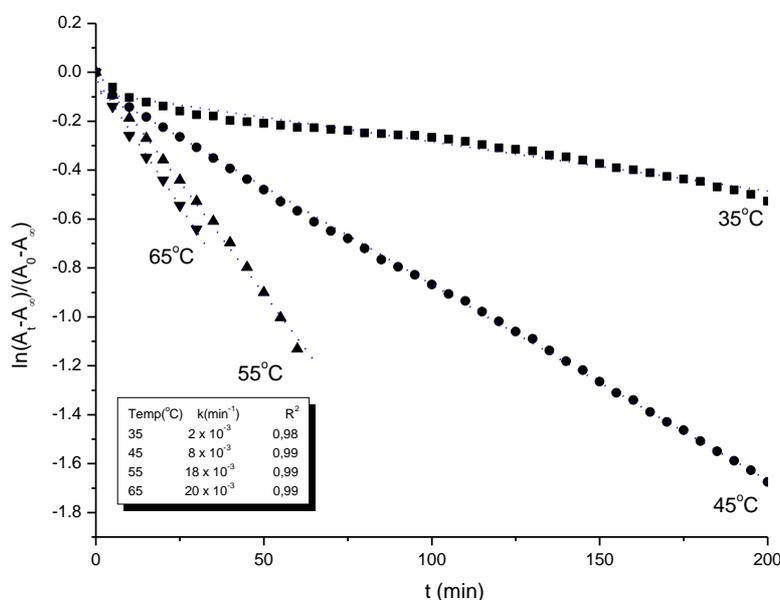


FIGURA 11. Linearização da equação que descreve a cinética de degradação de primeira ordem da Clorofilina cúprica de sódio em diversas temperaturas (35, 45, 55 e 65°C).

A partir dos valores de k, foi construído o gráfico do logaritmo natural de k em função do inverso da temperatura para determinar a energia de ativação (E_a) da reação, segundo a Equação de *Arrhenius* (**FIGURA 12**).

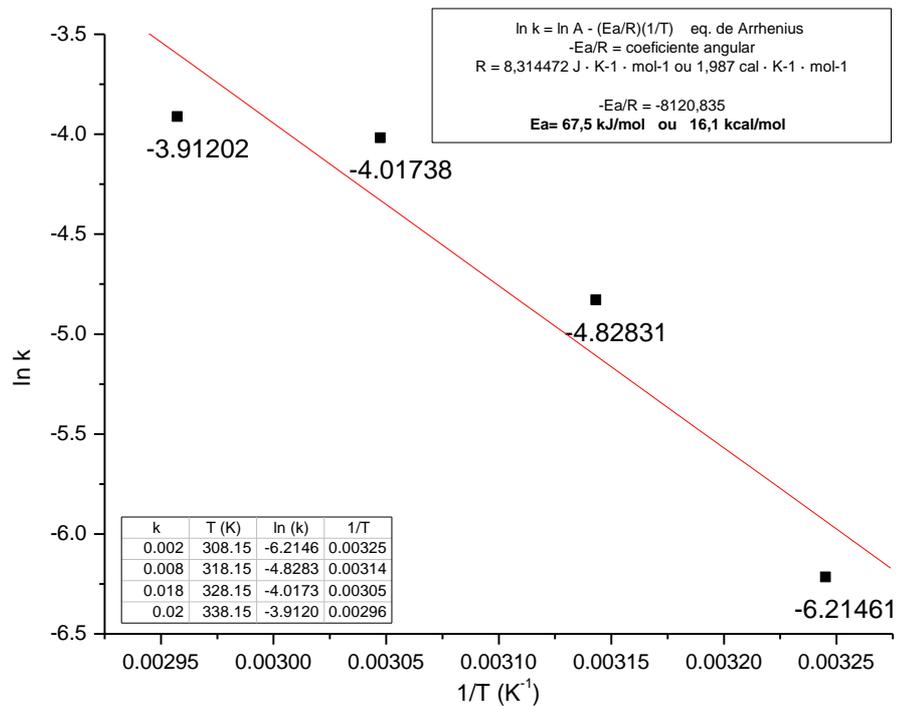


FIGURA 12. Determinação da energia de ativação a partir das constantes de velocidade de degradação térmica da CuChl.

De acordo com o gráfico, a E_a da CuChl é de 67,5 kJ/mol ou 16,1 kcal/mol, sendo esta a energia mínima necessária para que se inicie o processo de degradação do pigmento.

Outro fator que está diretamente correlacionado com a constante de velocidade para uma reação de primeira ordem é a meia-vida da substância (**TABELA 10**).

TABELA 10. Cálculo da meia-vida em minutos da CuChl a partir da temperatura (°C) e a constante de velocidade (k).

Temperatura (°C)	k	Meia-vida (min)
35	0,002	345,50
45	0,008	86,63
55	0,018	38,50
65	0,020	34,65

A partir da determinação das constantes de velocidade de degradação da CuChl foi possível verificar a meia-vida do pigmento em diferentes temperaturas, sendo observada a degradação a partir de 45°C.

4.5 Determinação dos valores de pK_a

A avaliação das características físico-químicas de derivados de clorofila consideram as propriedades de equilíbrio ácido-base e estabilidade do componente metálico ao tratamento ácido. Estes fatores são determinantes para a avaliação da lipofilicidade do composto em sistema 1-octanol/água e sua distribuição em membranas (GEROLA et al., 2011), afetando sua absorção e disponibilidade.

Inicialmente, com o intuito de elucidar o comportamento da CuChl comercial frente a variações de concentração, foi realizado um estudo do pH da amostra em função da adição de alíquotas de água, ocorrendo a diluição da amostra.

A **FIGURA 13** apresenta a construção do gráfico realizado por meio dos resultados da variação de pH em função da adição de água à uma solução de CuChl [0,195 mg/mL]. A clorofilina em concentrações ~0,2 mg/mL possui um caráter básico, porém, a diluição da solução leva à diminuição do pH. A partir do ajuste dos pontos experimentais realizados pelo programa Origin Pro 8.5, verificou-se uma função exponencial, com equação:

$$y = y_0 + A \times e^{\frac{-x}{t}} \quad (\text{Eq. 4})$$

, onde:

$$y_0 = 9,9098$$

$$A = -3,14$$

$$t = 0,0418.$$

Dessa forma, a partir de uma solução de CuChI de concentração conhecida, pode-se prever o valor de seu pH utilizando esta equação. Assim, considerando uma solução de CuChI de concentração 0,08 mg/mL, estima-se o valor de pH = 8,63.

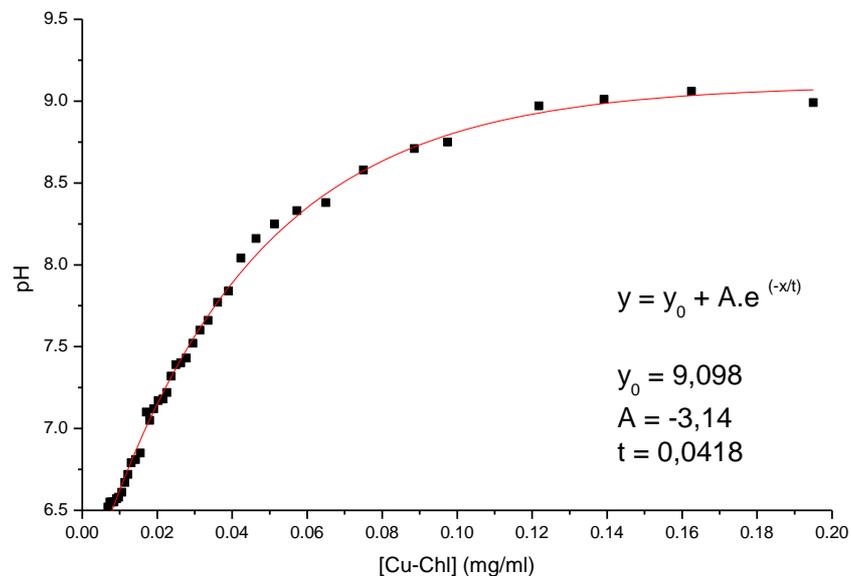


FIGURA 13. Variação do pH de uma solução aquosa de CuChI em função da concentração do pigmento.

Com o intuito de elucidar o comportamento da CuChI frente à variação de pH, foi realizado um experimento de titulação base-ácido com soluções de CuChI (Sigma e Chr. Hansen) e CuCe6, na concentração de 0,2 mg/mL.

A **FIGURA 14** apresenta os valores de pH nos pontos de maior inflexão na curva (C e E), obtidos a partir de gráficos de derivada primeira e derivada

segunda (HARRIS, 2008) no programa Origin Pro 8.5. Entre o ponto A, no início da titulação, e o ponto C encontrar-se uma região em que a variação de pH é mínima (ponto B), onde o $\text{pH} = \text{pK}_{a2}$. O segundo ponto em que o $\text{pH} = \text{pK}_{a1}$ encontra-se entre os pontos C e E.

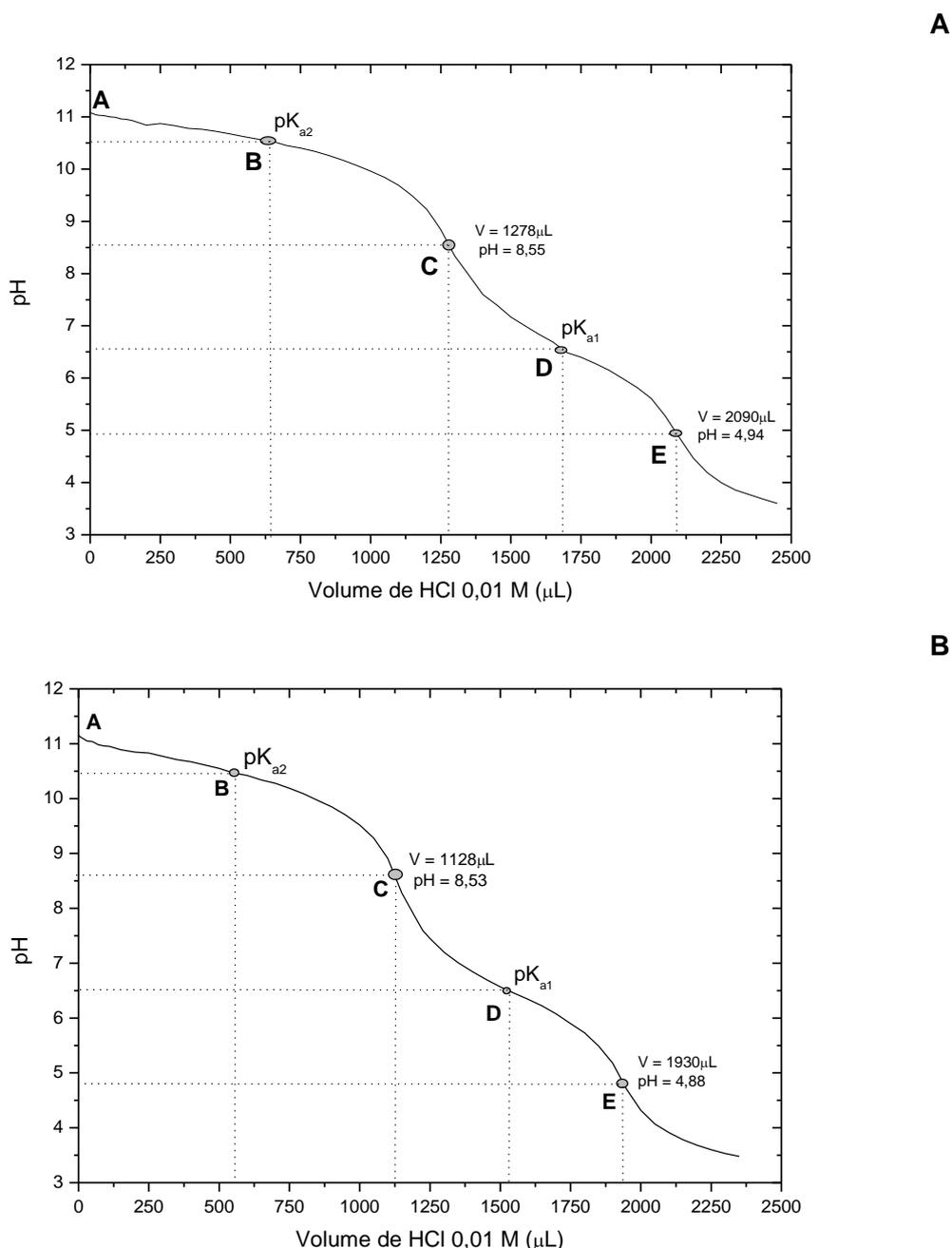


FIGURA 14. Curva de titulação da CuChl [0,2mg/mL] da Sigma (A), Chr. Hansen (B) com HCl 0,01 M.

Dessa forma, verificou-se que os valores de pK_a s são semelhantes para as duas amostras comerciais de Cu-Ch, conforme **FIGURA 14A** e **14B**. Na **TABELA 11** encontram-se os resultados dos valores de pK_{a1} , pK_{a2} , pH do 1º ponto de inflexão e do pH do 2º ponto de inflexão das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen). As amostras apresentaram dois pK_a s, o primeiro em pH ~6,5 e o segundo em pH ~10,5, bem como os pontos de inflexão da curva, no primeiro ponto em pH ~8,5 e o segundo ponto em pH ~4,9.

TABELA 11. Valores de pK_a s e pHs nos pontos de inflexão das curvas de titulação das amostras comerciais de CuChl (Sigma e Chr. Hansen).

Amostra	pK_{a1}	pK_{a2}	pH 1º ponto de inflexão	pH 2º ponto de inflexão
Sigma	6,53	10,54	8,55	4,94
Chr. Hansen	6,50	10,45	8,53	4,88

Na **FIGURA 15** estão apresentados os espectros da CuChl (Sigma) em diferentes pHs (9,37, 8,72, 7,42, 6,20, 4,20 e 3,65), obtidos pela titulação espectrofotométrica. A acidificação da amostra reflete-se na diminuição da absorvância da molécula e num deslocamento no comprimento de onda de absorção máxima para o azul (banda Soret) em 5 nm e para o vermelho (banda Q) em 8 nm. Essa variação no espectro de absorção em pH ácido indica a agregação das moléculas de CuChl.

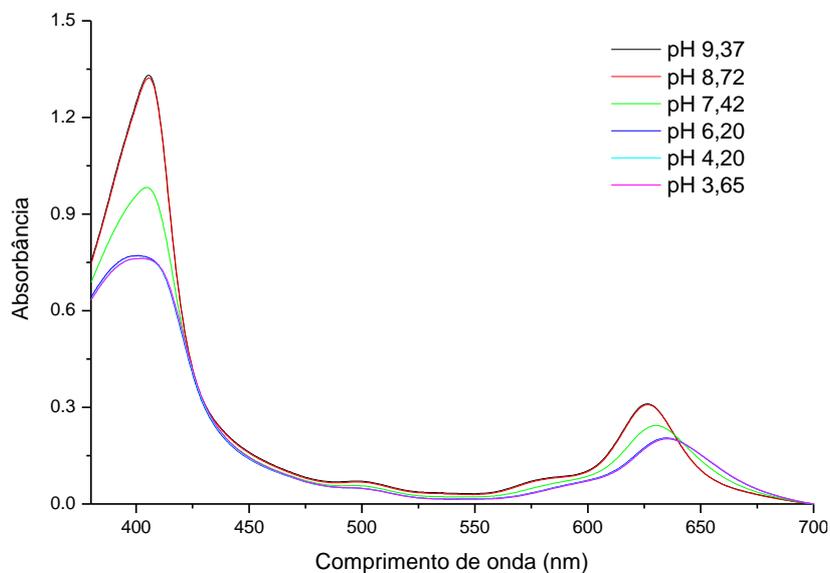


FIGURA 15. Deslocamento da absorção máxima nas banda Soret e Q de uma amostra de CuChl (Sigma) em função do pH.

Entretanto, a agregação das molécula de CuChl que ocorre em pH ácido é reversível em pH alcalino. Observa-se que tal comportamento é demonstrado em experimentos de acidificação e realcalinização de uma amostra de CuChl.

A **FIGURA 16** apresenta o processo reversível da acidificação e alcalinização da CuChl [0,01mg/mL]. Uma solução de CuChl em água (pH 7,0), foi acidificada com HCl até pH = 2 e posteriormente alcalinizada até pH = 11, observa-se a diminuição na absorvância da amostra e deslocamento das bandas Soret e Q; a adição de NaOH a essa amostra indica a reversão da agregação, com o perfil do espectro comparado àquele obtido inicialmente.

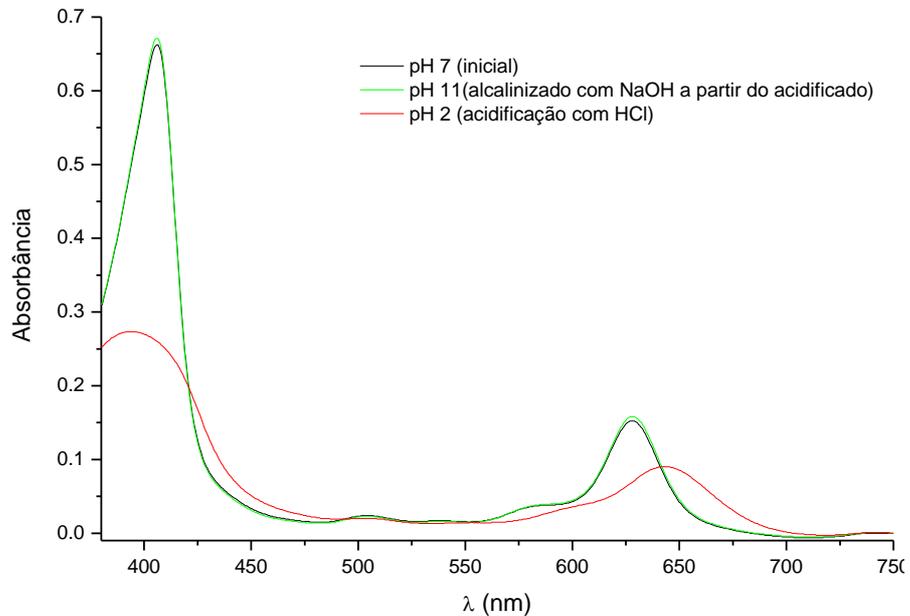


FIGURA 16. Processo reversível da acidificação e alcalinização da CuChl (Sigma), segundo seu espectro de absorção.

Este processo pode ser visualmente exemplificado na **FIGURA 17**. Observa-se a tendência de agregação da CuChl em uma solução aquosa de [0,2mg/mL] em meio ácido (pH ~3,5) (**FIGURA 17A**). Adicionando-se à essa solução uma mistura de clorofórmio/metanol ocorreu a partição do pigmento (**FIGURA 17 B1**), o qual migrou para a fase do solvente orgânico. Com a adição de NaOH, o pigmento migrou para a fase aquosa alcalina (**FIGURA 17 B2**).

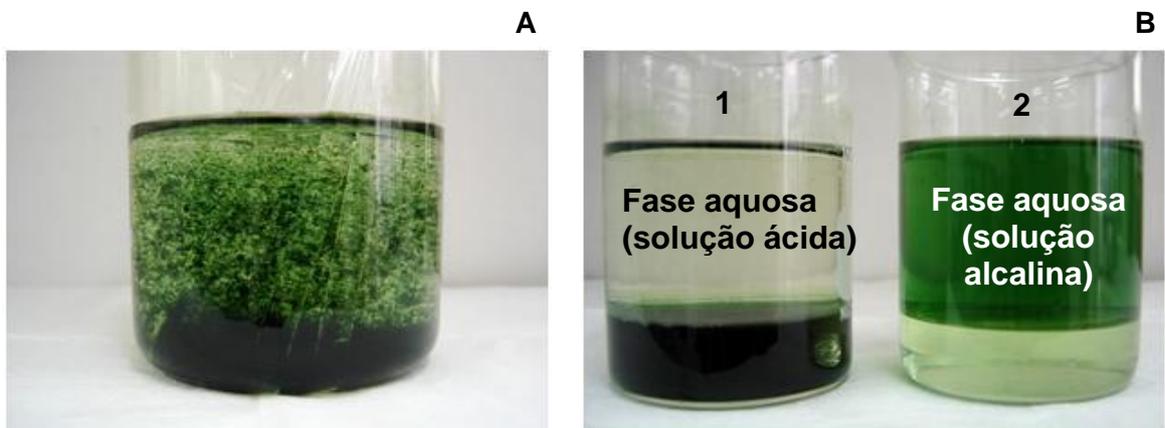


FIGURA 17. (A) Amostra de CuChl [0,2 mg/mL] em 100 mL de água em meio ácido (pH ~3,5). (B1) Solução de CuChl em meio ácido com adição de clorofórmio:metanol (30 mL) e (B2) solução de CuChl em meio alcalino com adição de clorofórmio:metanol (30 mL).

Portanto, esses foram os indícios de que seriam necessários mais estudos sobre o comportamento da CuChl em diferentes meios, antes dos estudos em sistema biológico. Para tanto, foram determinados os coeficientes de partição ($\log P$) em sistema 1-octanol/tampão do padrão de CuCe6 (**CAPÍTULO II**), um dos principais componentes da CuChl.

5. DISCUSSÃO

5.1 Sobre a composição química da CuChl

O processo para obtenção da CuChl envolve várias etapas, cujo produto final é amplamente divulgado como tendo a fórmula molecular $C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$. Não há métodos de identificação e quantificação oficiais estabelecidos, mas, existem monografias publicadas pela *U.S.P* (2007) e pela Comissão da Comunidade Européia (1995), que descrevem as características da CuChl.

Geralmente, o cálculo experimental dos elementos químicos de uma fórmula molecular podem variar em $\pm 0,3$ quando comparado aos valores teóricos da molécula (HARRIS, 2008). Com isso, verificamos que a partir da análise elementar das amostras de CuChl (Sigma e Chr. Hansen), o resultado para o elemento Hidrogênio (H) foi maior que a porcentagem teórica, e em contrapartida, os elementos Cobre (Cu), Nitrogênio (N) e sódio (Na) estavam em menor porcentagem que os valores teóricos calculados (**TABELA 2 e 3**).

Esta variação observada em relação aos valores experimentais e teóricos da CuChl pode ser explicada por algumas hipóteses. De acordo com a Comissão Européia (1995), a CuChl pode ser obtida de variedades de plantas comestíveis, gramíneas e urticáceas. Portanto, a presença de metabólitos de degradação da própria molécula de clorofila presente na matéria-prima pode resultar nessa variação de composição. Esses metabólitos podem ser

originados da abertura do anel porfirínico da clorofila, entre os anéis A e B por meio da ação de enzimas ou pela etapa não-enzimática que resulta em catabólitos não fluorescentes (**FIGURA 18**).

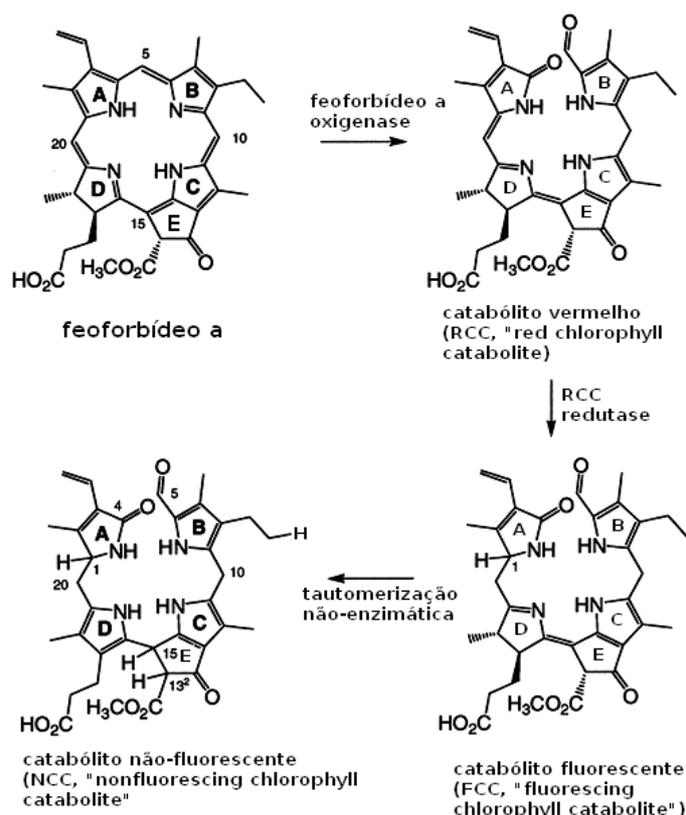


FIGURA 18. Catabólitos originados da degradação da molécula de clorofila, com a abertura do anel tetrapirrólico (adaptado de PRUŽINSKÁ et al., 2003).

Dessa forma, é a partir do feoforbideo a que são gerados os compostos derivados da abertura do anel tetrapirrólico. O feoforbideo a é um produto de degradação da clorofila a, obtido pela ação enzimática da magnésio-dequelatase (substituição do átomo de magnésio no centro do anel por dois de hidrogênio) e da clorofilase (perda do grupo fitol).

Sendo assim, a eventual presença de catabólitos que apresentam o anel tetrapirrólico clivado explica alguns fatores. A clivagem do anel não permitiria a entrada do átomo de Cu^{2+} , tendo como consequência a menor porcentagem do

elemento em relação ao valor teórico; ou, a clivagem propicia a oxigenação desses catabólitos e que dessa forma, seriam responsáveis pela maior porcentagem de oxigênio nas amostras.

Além disso, há possibilidade de que nem todos os componentes estejam na forma de sal sódico, pois os valores de Na encontrados experimentalmente (3,88% Sigma e 5,87% Chr. Hasen) são menores aos valores calculados pela fórmula teórica (9,52%). Este fato também explicaria a maior quantidade de H nos valores experimentais do que nos valores teóricos. Portanto, pode-se considerar que a fórmula geral teórica da CuChI não se aplica às amostras analisadas.

Quanto aos teores de Cu_{total} os resultados das amostras (4,04% Sigma e 4,05% Chr. Hansen) são semelhantes entre si, mas estão abaixo do valor teórico (8,78%) e também do limite mínimo ($>4,25\%$) estipulado pela *U.S.P* (2007). Valores inferiores ao estipulado pela *U.S.P.* também foram observados por Pratt e colaboradores (2006), cuja amostra apresentava 3,69% de Cu_{total} . Porém os teores de Cu_{livre} (0,012% Sigma e 0,027% Chr.Hansen) e $Cu_{quelado}$ (4,03% Sigma e 4,02% Chr. Hansen) estão de acordo com as exigências ($<0,25\%$ Cu_{livre} e $>4,00\%$ $Cu_{quelado}$) da *U.S.P.* (2007).

Os nossos resultados sugerem que há possibilidade de clorinas não-cúpricas na amostra de CuChI, ou ainda, que há a presença de catabólitos com o anel pirrólico clivado, impedindo a inserção do átomo de cobre durante o processo de obtenção da CuChI, como já foi mencionado anteriormente.

Ainda, em relação aos elementos químicos presentes na fórmula molecular da ChChI, existem estudos (CHERNOMOSRKY et al., 1997a;

BREINHOLT et al., 1995) que correlacionam a porcentagem de Cu_{total} , a razão entre os elementos Cu/N e a razão entre as bandas Soret e Q do espectro de absorção, com a pureza das amostras de CuChl. Quanto à porcentagem de Cu_{total} e sua relação com a pureza (**FIGURA 2B**), de acordo com os resultados de Chernomorsky e colaboradores (1997a) pode-se obter um gráfico de %Pureza em função da %Cu e cuja equação da reta é %*Pureza* = $-0,047 + 10,9 \times \%Cu$. Com base nesse critério, as amostras de CuChl apresentam 43,93 % (Sigma) e 44,10 % (Chr.Hansen) de pureza (**TABELA 4**).

A outra estimativa de porcentagem de pureza proposta pelos autores (CHERNOMORSKY et al., 1997a; BREINHOLT et al., 1995) é obtida pela razão entre as porcentagens teóricas dos elementos Cu (8,78%) e N (7,74%) cujo valor é igual 1,1. Quanto mais próximo deste valor, maior a presença de clorina cúpricas na amostra de CuChl (**FIGURA 2A**). Os resultados experimentais mostraram que, tanto a porcentagem de cobre quanto a porcentagem de N, estão abaixo dos valores teóricos. Com isso, a razão Cu/N foi inferior a 1,1, e assim, concluímos que há componentes que não estão cupro-complexados nas amostra de CuChl (Sigma e Chr. Hansen).

Outro método utilizado para predizer a pureza da amostra de CuChl, corresponde à razão entre as bandas Soret e Q do espectro de absorção (CHERNOMORSKY et al., 1997a). Os autores demonstraram que, quanto menor a pureza da amostra maior é a razão entre as bandas Soret/Q. Os resultados da razão Soret/Q para a amostra da Sigma (3,87), apresentados na **TABELA 5**, são condizentes com os valores descritos na literatura de 3,0 a 3,9 (CHERNOMORSKY et al., 1997a). Porém o resultado da razão Soret/Q da

CuChI da marca Chr. Hansen (4,18) foi superior aos limites estabelecidos pela *U.S.P* (3,0 a 3,9), demonstrando menor pureza da amostra.

Sendo assim, sugere-se que tanto a análise elementar, quanto o método espectrofotométrico não devem ser utilizados, isoladamente, para predizer a pureza de uma amostra de CuChI, havendo necessidade do desenvolvimento de uma metodologia adequada para quantificar os vários componentes que constituem a clorofilina cúprica.

Dessa forma, tornou-se indispensável a separação dos principais componentes da CuChI por HPLC. Inicialmente foi testada a metodologia descrita por Scotter e colaboradores (2005) com coluna C₁₈ em fase reversa. Por esse protocolo não foi possível distinguir os dois compostos com tempo de retenção (TR) de aproximadamente cinco minutos, que possuíam o mesmo espectro de absorção (**FIGURA 4**). Em seguida, foi utilizada a metodologia preconizada por Egner e colaboradores (2000), que também emprega a coluna C₁₈. O resultado foi uma separação inadequada de dois compostos em aproximadamente oito minutos de eluição (**FIGURA 5**), que também impediu a distinção dos principais componentes da CuChI.

Portanto, o emprego de metodologias que utilizam a coluna C₁₈ para a separação dos elementos da CuChI pode levar a interpretações equivocadas. Os componentes que não foram separados com o uso desta coluna, por possuírem tempos de retenção próximos, são dois dos principais compostos das amostras, e devem ser corretamente separados e identificados.

Outro método empregado para a separação da CuChI por HPLC foi o descrito por Mortensen e Geppel (2007), utilizando uma coluna C₃₀, com perfil

mais seletivo do que a coluna C₁₈. Essa metodologia mostrou-se eficiente em separar em aproximadamente 18 minutos de eluição dois componentes, a CuCe6 e a CuCp6, além da isoCuCe4 em aproximadamente 23 minutos (**FIGURA 6A**).

Além disso, pela detecção de fluorescência (**FIGURA 6B**), nota-se a presença de compostos não-cúpricos nas amostras da Chr. Hansen. Este fato é respaldado pelo conceito que compostos cúpricos não apresentam fluorescência, pois, após atingir o estado excitado, a clorofilina contendo Cu²⁺ complexado tem decaimento não-radioativo, e não há fluorescência (BECKER; ALLISON, 1963). Este resultado corrobora com os valores encontrados entre a razão Cu/N e os valores espectrofotométricos (razão Soret/Q), que indicavam a presença de elementos não cúpricos na amostra de CuChl da marca Chr.Hansen.

Quanto a separação e identificação dos principais componentes das amostras de CuChl por HPLC-MS/MS, somente, com o emprego de uma coluna de maior seletividade foi possível distinguir as estruturas químicas das clorinas cúpricas e₆ e p₆, que diferem somente pelo grupo ligado ao C15; e a clorina cúprica e₄ da isoclorina cúprica e₄ (**FIGURA 19**).

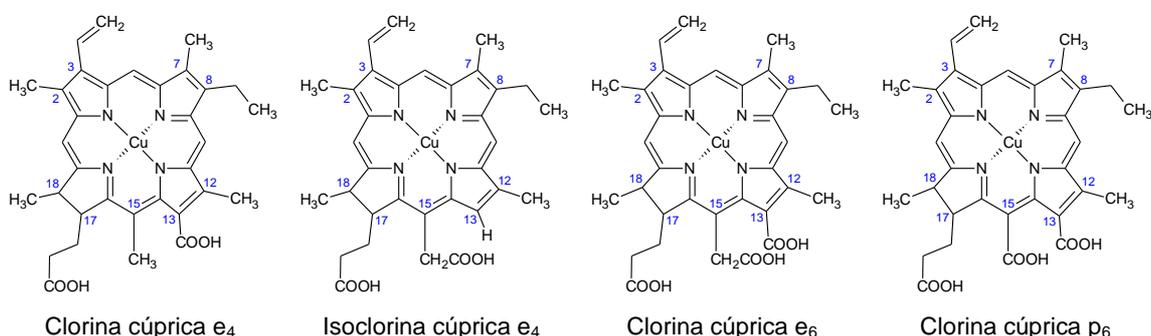


FIGURA 19. Estrutura química das principais clorinas da CuChl: clorina cúprica e₄, isoclorina cúprica e₄, clorina cúprica e₆ e clorina cúprica p₆.

Dessa forma, a CuCe6 foi identificada pelo pico base com relação m/z 656,2 (**FIGURA 7**). Os picos adjacentes a este são picos isotópicos devido à presença de ^{65}Cu e ^{13}C . A fragmentação do pico com relação m/z 656 (**FIGURA 7B**) demonstrou a presença de um pico com m/z 612,1, obtido pela perda de um grupo carboxila com massa 44, além de um pico com m/z 568,2, que corresponde à perda da massa de dois grupos carboxila ($m/z=88$), provavelmente aqueles ligado ao C13 do anel profirínico e ao grupo $-\text{CH}_2$ ligado ao C15 (**FIGURA 19**). A distinção entre a CuCp6 e CuCe6 ocorreu pelo espectro de massa do fragmento de relação m/z de 642,2 (**FIGURA 8A**). O espectro ms/ms do pico com m/z 642,9 indica dois fragmentos, um deles de $m/z = 598,2$ o qual indica a perda de um grupo carboxila com $m/z = 44$. O outro fragmento com $m/z=624,1$ indica a perda de um grupo com $m/z = 18$. Os autores Mortensen e Geppel (2007) também reportaram esse tipo de fragmentação e o atribuem à perda de uma molécula de água da CuCp6, levando à formação do anidrido purpurina cúprica 18 (**FIGURA 8B**) (LEE, 1993; HYNNINEN, 1973).

A confirmação do terceiro principal componente da CuChl, a isoCuCe4 e sua distinção da CuCe4, foi realizada a partir do espectro MS/MS do fragmento de relação $m/z = 612,3$ (**FIGURA 9A**), sendo este valor próximo da massa das duas moléculas. Além disso, o fragmento com relação $m/z = 568,3$ indica a perda de um grupo carboxila, presente em ambas. Porém, a partir do espectro do fragmento com $m/z = 568,7$, verifica-se dois fragmentos $m/z = 553,2$ e $m/z = 481,1$. O primeiro fragmento (553,2) pode surgir pela perda de um grupo $-\text{CH}_2$ com $m/z = 14$, ligado ao C15 do anel da isoCuCe4, bem como a perda da

segunda carboxila resultando no fragmento com $m/z = 524,2$. Em seguida a perda simultânea dos grupos $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ligado ao C17 e $-\text{CH}_2$ ligado ao C15, totalizam a perda de $m/z = 87$ (fragmento $m/z=481$).

Devido a descarboxilação do C17 ser menos favorável do que a descarboxilação do grupo $-\text{CH}_2\text{COOH}$ do C15 ou do grupo $-\text{COOH}$ do C13 do anel (HYNNINEN, 1991), a abundância desse fragmento é menor que a verificada para os demais.

Dessa forma, o acoplamento das técnicas LC-MS/MS permitiu identificar os principais componentes das amostras da CuChl comercial, a CuCe6, a CuCp6 e a isoCuCe4. A ausência da CuCp6 em outros trabalhos da literatura pode ser em decorrência da baixa seletividade da coluna C₁₈ empregada por outros autores. Entretanto, a presença da CuCp6 é muito provável em uma amostra de CuChl, pois sua rota de síntese é diferente daquela que origina a CuCe6, daí a ausência do grupo $-\text{CH}_2$. A clorina p₆ pode ser obtida a partir de um produto de degradação da clorofila *a* denominado purpurina 18, tanto é possível, que pode-se obter a clorina p₆ a partir da purpurina 18 metil éster, que por sua vez é obtida da clorofila *a*.

Em relação a estabilidade por temperatura analisadas por HPLC, ocorreu a mesma problemática de separação que foi verificada utilizando a coluna C₁₈ sob as condições propostas por Egner e colaboradores (2000). Apesar disso, foi detectado durante os experimentos que os principais componentes da CuChl degradam drasticamente à temperaturas acima de 75 °C (**FIGURA 10**).

5.2 Cinética de degradação térmica

A degradação térmica foi avaliada, pela constante de velocidade de degradação estimada por ensaio espectrofotométrico (**FIGURA 11**). Quanto maior a temperatura utilizada, menor o tempo de exposição da amostra no qual se observa a perda da absorvância da solução de CuChl em água (indicativo de degradação). Além disso, o cálculo das constantes de velocidade (k) possibilitou a determinação da E_a (energia de ativação), indicando que 16,1 kcal/mol foram necessários para que ocorresse a reação de decomposição térmica da CuChl. Esse valor é próximo do encontrado por Ferruzzi e Schwartz (2005), que foi de 13,3 kcal/mol.

Portanto, a degradação térmica da CuChl tem efeito sobre sua composição, evidenciada pela diminuição da absorção em 406 nm, influenciando negativamente a atividade biológica do corante presente nas formulações, se estas forem submetidas à altas temperaturas. Esta degradação também pode afetar a aplicação do corante na indústria, pois, nos Estados Unidos da América a CuChl é utilizada, tanto na forma líquida como em pó, em suplementos alimentares. Enquanto que na Europa e na Ásia o corante está presente em alimentos e bebidas, que sofrem processamento térmico (FERRUZZI e SCHWARTZ, 2005).

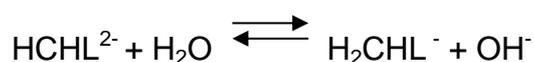
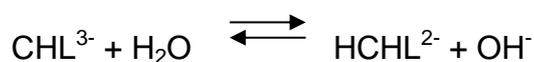
Além disso, o cálculo da meia-vida do corante em diferentes temperaturas, reforça a observação de que há degradação da amostra acima de 35°C (**TABELA 10**).

5.3 Valores de pK_a e sua relação com a lipofilicidade da CuChl.

A ação de uma substância com propriedade terapêutica é dependente de suas interações com sistemas biológicos e de fatores relacionados com sua estrutura química e, conseqüentemente, de suas propriedades físico-químicas. Dentre as propriedades mais importantes para o estabelecimento da atividade biológica, estão a ionização e hidrofobicidade da substância (TAVARES, 2004).

A partir do estudo da variação do pH em função da concentração da solução de CuChl (**FIGURA 13**), foi possível concluir que quanto mais concentrada é a solução, maior é o seu caráter básico, e que o pH da solução decresce com a diluição da amostra.

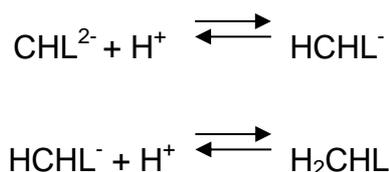
O conhecimento sobre o pH da solução pode ser discutido em termos do equilíbrio que se estabelece na molécula de CuChl em solução aquosa. Considerando que a molécula de CuChl é tricarboxilada e apresenta-se na forma sódica, os ânions carboxilato (grupos carboxila desprotonados), fazem com que a molécula se comporte como uma base fraca. Dessa forma, três equações de equilíbrio podem ser consideradas:



, onde CHL^{3-} é a forma totalmente desprotonada e H_3CHL é a forma totalmente protonada. HCHL^{2-} e H_2CHL^- são as formas intermediárias protonadas, com um e dois grupos carboxila protonados, respectivamente.

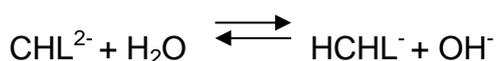
Provavelmente, em altas concentrações as moléculas de CuChl em solução atingem um estado de maior estabilidade permanecendo desprotonadas ou parcialmente protonadas com a ocorrência de ligações de hidrogênio intramolecular. Em baixas concentrações, a forma mais estável pode ser aquela em que há a protonação parcial, mas com a formação de ligações hidrogênio intermoleculares.

No experimento de titulação base-ácido das soluções de CuChl (Sigma e Chr-Hansen), considerou-se a clorofilina como uma base fraca poliprótica, sendo titulada com ácido forte (HCl). Pelo menos duas reações de titulação podem ser escritas, considerando-se a forma diprótica:

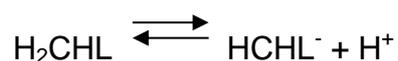


Dessa forma, para assegurar que em uma solução a maior parte das moléculas está na forma desprotonada, adicionou-se à 10 mL dessa solução [0,2 mg/ML] alíquotas de NaOH . O volume final sofreu variação de apenas 30 μL , portanto a titulação foi iniciada com 10,03 mL.

A adição de OH^- a essa solução desloca o equilíbrio no sentido de formação da espécie desprotonada:



As curvas de titulação (**FIGURA 14**) obtidas demonstram que no ponto *A* no início da titulação, a maior parte das moléculas de CuChl está desprotonada. Com a adição de ácido iniciou-se a protonação e quando $\text{pH} = \text{pK}$ (ponto *B*) obteve-se o valor de $\text{pK}_{a2} = \sim 10,4$ (região tamponante). Prosseguindo com a titulação houve um ponto de inflexão na curva (ponto *C*), $\text{pH} \sim 8,5$, que corresponde à forma intermediária HCHL^- . Nesta região há uma grande variação de pH , portanto com o menor poder tamponante. A titulação prosseguiu até uma região em que as variações de pH foram novamente pequenas, indicando uma nova região tamponante (ponto *D*) onde foram encontradas concentrações iguais das formas HCHL^- e H_2CHL , uma parcialmente protonada e outra totalmente protonada, com $\text{pK}_{a1} = \sim 6,5$. O ponto *E* é o segundo ponto de inflexão, com $\text{pH} = \sim 4,8$, onde predominou a forma ácida H_2CHL e o pH está relacionado à sua reação de dissociação.



A adição de ácido na solução fez o pH diminuir até que em $\text{pH} = 3,48$ ocorreu a precipitação da CuChl. A única menção à titulação de CuChl encontrada na literatura foram as variações no pH estudadas por House e Schnitzer (2008) em um sistema composto por prata coloidal e clorofilina cúprica. Os resultados desse estudo apresentam uma região na curva de titulação com ponto de inflexão em 6,1, com a completa protonação da clorofilina ocorrendo em torno de $\text{pH} 4,7$.

As moléculas de clorina presentes nas amostras de CuChl possuem ainda outros grupos de protonação, como um terceiro grupo carboxila e

também a protonação dos nitrogênios do anel tetrapirrólicos. Entretanto, a falta do terceiro ou quarto pK_a nos experimentos de titulação pode ser decorrente da protonação do nitrogênio em meio muito ácido com a liberação do Cu^{2+} complexado, ou então, se dois grupos carboxila tornarem-se estarem protonados em pK_a s semelhantes.

Esses resultados são condizentes com a titulação espectrofotométrica da CuChl, pois a variação na absorbância da molécula acompanhada do deslocamento para o azul da banda Soret e deslocamento para o vermelho da banda Q (**FIGURA 15**) é um comportamento característico de agregação das moléculas em meio ácido devido à protonação. Essa propriedade de agregação está relacionada com o caráter porfirínico da molécula da CuChl (UCHOAFERNANDES, 2007).

O presente estudo possibilitou a correlação entre a concentração e o pH da solução de CuChl (**FIGURA 13**), bem como, a estimativa da presença das moléculas protonas ou desprotonadas em função do pH (**FIGURA 14**). Esses resultados são importantes para a compreensão da lipofilicidade da CuChl. A forma neutra das moléculas, geralmente, é mais lipossolúvel e difunde-se por meio das membranas biológicas por processo passivo, o qual depende da concentração e do coeficiente de partição da molécula. A forma ionizada é absorvida pelo processo ativo e tem sua distribuição condicionada ao seu pK_a e ao pH do meio (TAVARES, 2004). Além disso, a lipofilicidade da CuChl em determinados pHs pode estar associada aos efeitos tóxicos e terapêuticos e a fenômenos de bioacumulação em tecidos.

6. CONCLUSÕES

A fórmula teórica da clorofilina cúprica de sódio presente no rótulo do produto ($C_{34}H_{31}CuN_4Na_3O_6$), não corresponde aos valores encontrados experimentalmente nas duas amostras analisadas (Sigma e Chr. Hansen). A diferença entre os valores teóricos da molécula e o experimental, indica a presença de compostos não cúpricos, pelos resultados obtidos do cálculo da pureza considerando a porcentagem de cobre, razão Cu/N e Soret/Q, principalmente nas amostras da Chr. Hansen.

A presença de compostos não cúpricos foi confirmada pela emissão de fluorescência na análise de separação e identificação dos principais componentes da CuChl por HPLC-MS/MS. O acoplamento das técnicas cromatográficas utilizando uma coluna de separação C_{30} , possibilitou a identificação de três principais componentes: a CuCe6, a CuCp6 e a isoCuCe4.

Sob aquecimento, as moléculas presentes nas amostras de CuChl sofrem alterações em sua estrutura, podendo afetar negativamente sua atividade biológica. A degradação é pronunciada a partir de $45^{\circ}C$, de acordo com as constantes de velocidade estimadas.

Os valores de pK_{as} das amostras de CuChl (Sigma e Chr.Hansen) indicam que abaixo do pK 6,5 há predominância da forma protonada das moléculas, ocasionando, maior afinidade CuChl-membranas. Portanto, deve-se considerar que abaixo desse valor a lipofilicidade da CuChl por estar associada tanto aos efeitos tóxicos quanto aos terapêuticos, e a fenômenos de bioacumulação em tecidos.

7. REFERÊNCIAS

- ANVS . Regulamento técnico sobre atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasil. Resolução RDC 64 de 16 de setembro de 2008.
- ARIMOTO, S.; KAN-YAMA, K.; RAI, H.; HAYATSU, H. Inhibitory effect of hemin, chlorophyllin and related pyrrole pigments on the mutagenicity of benzo[a]pyrene and its metabolites. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 345, n. 3-4, p. 127-135, 1995.
- BECKER, R. S.; ALLISON, J. B. Metalloporphyrins. Electronic spectra and nature of perturbations. I. Transition metal ion derivatives. **Journal of Physical Chemistry**. v. 67, p.2662-2669, 1963.
- BREINHOLT, V.; HENDRICKS, J.; PEREIRA, C.; ARBOGAST, D.; BAILEY, G. Dietary chlorophyllin is a potent inhibitor of aflatoxin B₁ hepatocarcinogenesis in rainbow trout. **Cancer Research**, v. 55, n. 1, p. 57 -62, 1995.
- BREINHOLT, V.; ARBOGAST, D.; LOVELAND, P.; PEREIRA, C.; DASHWOOD, R.; HENDRICKS, J.; BAILEY, G. Chlorophyllin Chemoprevention in Trout Initiated by Aflatoxin B₁ Bath Treatment: An Evaluation of Reduced Bioavailability vs. Target Organ Protective Mechanisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 158, n. 2, p. 141-151, 1999.
- CASTRO, D. J.; LÖHR, C. V.; FISCHER, K. A.; WATERS, K. M.; WEBB-ROBERTSON, B-J. M.; DASHWOOD, R. H. BAILEY, G. S. Identifying efficacious approaches to chemoprevention with chlorophyllin, purified chlorophylls and freeze-dried spinach in a mouse model of transplacental carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 30, n. 2, p. 315 -320, 2009.
- CE . Directive 95/45/CE da Comissão que estabelece os critérios de pureza específicos dos corantes que podem ser utilizados nos géneros alimentícios. Comissão da Comunidade Europeia – 26 de julho de 1995.
- CHERNOMORSKY, S. Chlorophyllin copper complex: quality control. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 44, n. 4, p. 235-238, 1993.
- CHERNOMORSKY, S. Variability of the composition of chlorophyllin. **Mutation Research - Mutation Research Letters**, v. 324, n. 4, p. 177-178, 1994.

- CHERNOMORSKY, S.; RANCOURT, R.; SAHAI, D.; PORETZ, R. Evaluation of commercial chlorophyllin copper complex preparations by liquid chromatography with photodiode array detection. **Journal of AOAC International**, v. 80, n. 2, p. 433-435, 1997a.
- CHERNOMORSKY, S.; RANCOURT, R.; VIRDI, K.; SEGELMAN, A.; PORETZ, R. D. Antimutagenicity, cytotoxicity and composition of chlorophyllin copper complex. **Cancer Letters**, v. 120, p. 141-147, 1997b.
- CHERNOMORSKY, S.; SEGELMAN, A.; PORETZ, R. D. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 19, n. 5, p. 313-322, 1999.
- ČUNDERLÍKOVÁ, B.; KAALHUS, O.; ČUNDERLÍK, R.; MATEĀSIK, A.; MOAN, J.; KONGSHAUG, M. pH-dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers. **Photochemistry and photobiology**, v. 79, n. 3, p. 242–247, 2004.
- EGNER, P. A.; STANSBURY, K. H.; SNYDER, E. P.; ROGERS, M. E.; HINTZ, P. A.; KENSLER, T. W. Identification and characterization of chlorin e₄ ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 9, p. 900-906, 2000.
- EGNER, P. A.; WANG, J. B.; ZHU, Y. R.; ZHANG, B-C.; WU, Y.; ZHANG, Q-N.; QIAN, G-S.; KUANG, S-Y.; GANGE, S. J.; JACOBSON, L. P.; HELZLSOUER, K. J.; BAILEY, G. S.; GROOPMAN, J. D.; KENSLER, T. W. Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin–DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 25, p. 14601, 2001.
- EGNER, P. A.; MUÑOZ, A.; KENSLER, T. W. Chemoprevention with chlorophyllin in individuals exposed to dietary aflatoxin. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 523-524, n. 0, p. 209-216, 2003.
- FDA. Listing of color additives exempt from certification: Sodium copper chlorophyllin. US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services Federal Register. 2002.
- FERRUZZI, M. G.; FAILLA, M. L.; SCHWARTZ, S. J. Assessment of degradation and intestinal cell uptake of carotenoids and chlorophyll derivatives from spinach puree using an in vitro digestion and caco-2 human

- cell model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 2082-2089, 2001.
- FERRUZZI, M. G.; FAILLA, M. L.; SCHWARTZ, S. J. Sodium copper chlorophyllin: in vitro digestive stability and accumulation by caco-2 human intestinal cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2173-2179, 2002.
- FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S. J. Thermal degradation of commercial grade sodium copper chlorophyllin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7098-7102, 2005.
- FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2007.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios químicos em farmácia**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 690p, 2011.
- GANDUL-ROJAS, B.; ROCA, M.; GALLARDO-GUERRERO, L. Detection of the color adulteration of green table olives with copper chlorophyllin complexes (E-141ii colorant). **LWT - Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 311-318, 2012.
- GEROLA, A. P.; TSUBONE, T. M.; SANTANA, A.; OLIVEIRA, H. P. M.; HIOKA, N.; CAETANO, W. Properties of chlorophyll and derivatives in homogeneous and microheterogeneous systems. **The Journal of Physical Chemistry. B**, v. 115, n. 22, p. 7364-7373, 2011.
- GOMES, B. B.; BARROS, S. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; SILVA, V. V.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Bioavailability of dietary sodium copper chlorophyllin and its effect on antioxidant defence parameters of Wistar rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2003-2010, 2009.
- GROSSI, M. R.; BERNI, A.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MOLESSO, P.; SHIVNANI, A. A.; PAPERESCHI, C.; NATARAJAN, A. T.; PALITTI, F. A comparative study of the anticlastogenic effects of chlorophyllin on N-methy-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) or 7,12-dimethylbenz (α) anthracene (DMBA) induced micronuclei in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology Letters**, v. 214 (3), p. 235-242, 2012.

- HARRIS, D.C. **Análise Química Quantitativa**. 7ª ed., LTC Editora, 2008, p. 213-214.
- HOUSE, P. G.; SCHNITZER, C. S. SERRS and visible extinction spectroscopy of copper chlorophyllin on silver colloids as a function of pH. **Journal of colloid and interface science**, v. 318, n. 2, p. 145–151, 2008.
- HUMPHREY, A. M. Chlorophyll. **Food Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 57-67, 1980.
- HYNNINEN, P. H. Chlorophylls. IV. Preparation and purification of some derivatives of chlorophylls a and b. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 27, p. 1771-1780, 1973.
- INOUE, H.; YAMASHITA, H.; FURUYA, K.; NONOMURA, Y.; YOSHIOKA, N.; LIB, S. Determination of copper(II) chlorophyllin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 679, n. 1, p. 99-104, 1994.
- JUBERT, C.; MATA, J.; BENCH, G.; DASHWOOD, R. PEREIRA, C.; TRACEWELL, W.; TURTELTAUB, K.; WILLIAMS, D.; BAILEY, G. Effects of Chlorophyll and Chlorophyllin on Low-Dose Aflatoxin B1 Pharmacokinetics in Human Volunteers. **Cancer Prevention Research**, v. 2, n. 12, p. 1015 - 1022, 2009.
- KAMAT, J. P.; BOLOOR, K. K.; DEVASAGAYAM, T. P. Chlorophyllin as an effective antioxidant against membrane damage in vitro and ex vivo. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1487, n. 2-3, p. 113-127, 2000.
- KEPHART, J. C. Chlorophyll derivatives: their chemistry, commercial preparation and uses. **Economic Botany**. v.9, p.3-38, 1955.
- KUMAR, S. S.; CHAUBEY, R. C.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; PRIYADARSINI, K. I.; CHAUHAN, P. S. Inhibition of radiation-induced DNA damage in plasmid pBR322 by chlorophyllin and possible mechanism(s) of action. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 425, n. 1, p. 71-79, 1999.
- KUMAR, S. S.; DEVASAGAYAM, T. P. A.; BHUSHAN, B.; VERMA, N. C. Scavenging of reactive oxygen species by chlorophyllin: An ESR study. **Free Radical Research**, v. 35, n. 5, p. 563-574, 2001.

- KUMAR, S. S.; SHANKAR, B.; SAINIS, K. B. Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1672, n. 2, p. 100-111, 2004.
- LAI, C.-N.; BUTLER, M. A.; MATNEY, T. S. Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 77, n. 3, p. 245-250, 1980.
- LEE, S. H.; JAGEROVIC, N.; SMITH, K. M. Use of the chlorophyll derivative, purpurin-18, for syntheses of sensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of the Chemical Society**, p. 2369-2377, 1993.
- MARTIN, G. R.; JAIN, R. K. Noninvasive measurement of interstitial pH profiles in normal and neoplastic tissue using fluorescence ratio Imaging microscopy. **Cancer Research**, v. 54, n. 21, p. 5670-5674, 1994.
- MORTENSEN, A.; GEPPEL, A. HPLC–MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 419-425, 2007.
- NEGRAES, P. D.; QUINZANI JORDÃO, B.; PIMENTA VICENTINI, V. E.; MANTOVANI, M. S. The mutagenic potentiator effect of chlorophyllin by the HGPRT assay. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 1, p. 147-149, 2004.
- ONG, T.; WHONG, W. Z.; STEWART, J. D.; BROCKMAN, H. E. Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in Salmonella typhimurium strain TA98. **Mutation Research**, v. 222, n. 1, p. 19-25, 1989.
- Origin 8.5.0 SR1. **OrigingLab Corporation**. Versão 8.5 for Windows. Northampton, 2010. CD-ROM.
- PRATT, M. M.; REDDY, A. P.; HENDRICKS, J. D.; PEREIRA, C.; KENSLER, T. W.; BAILEY, G. The importance of carcinogen dose in chemoprevention studies: quantitative interrelationships between, dibenzo[a,l]pyrene dose, chlorophyllin dose, target organ DNA adduct biomarkers and final tumor outcome. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 3, p. 611-624, 2006.
- PRUŽINSKÁ, A.; TANNER, G.; ANDERS, I.; ROCA, M.; HÖRTENSTEINER, S. Chlorophyll breakdown: Pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron–sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15259-15264, 2003.

- SATO, M.; IMAI, K.; KIMURA, R.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. VI Effect of its administration on mitochondrial and microsomal lipid peroxidation in rat. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, p. 716-722, 1984.
- SATO, M.; FUJIMOTO, I.; SAKAI, T.; AIMOTO, T.; KIMURA, R.; MURATA, T. Effect of sodium copper chlorophyllin on lipid peroxidation. IX On the antioxidative components in commercial preparations of sodium copper chlorophyllin. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 6, p. 2428-2434, 1986.
- SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 11, p. 361-371, 2002.
- SCHOEFS, B. Determination of pigments in vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 217-226, 2004.
- SCOTTER, M. J.; CASTLE, L.; ROBERTS, D. Method development and HPLC analysis of retail foods and beverages for copper chlorophyll (E141[i]) and chlorophyllin (E141[ii]) food colouring materials. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 12, p. 1163-1175, 2005.
- SUDAKIN, D. L. Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review. **Clinical Toxicology**, v. 41, n. 2, p. 195-204, 2003.
- TACHINO, N.; GUO, D.; DASHWOOD, W. M.; YAMANE, S.; LARSEN, R. DASHWOOD, R. Mechanisms of the in vitro antimutagenic action of chlorophyllin against benzo[a]pyrene: Studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 308, n. 2, p. 191-203, 1994.
- TANNOCK, I. F.; ROTIN, D. Acid pH in Tumors and Its Potential for Therapeutic Exploitation. **Cancer Research**, v. 49, n. 16, p. 4373-4384, 1989.
- TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.
- TUMOLO, T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Copper chlorophyllin: a food colorant with bioactive properties? **Food Research International**, v. 46 (2), p. 451-459, 2012.

UCHOA-FERNANDES, A. **Síntese, caracterização e fotoativação de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e de clorofilina**, 2007. São Paulo, SP, Brasil: Universidade de São Paulo.

U. S. P. United States Pharmacopeia. Ketoconazole. Version 1.0. For Windows. Rockville: Enigma, 2007. CD-ROM. Produzido por US Pharmacopeia

VAN BREEMEN, R. B.; CANJURA, F. L.; SCHWARTZ, S. J. Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1452–1456, 1991.

WIKE-HOOLEY, J. L.; VAN DEN BERG, A. P.; VAN DER ZEE, J.; REINHOLD, H. S. Human tumour pH and its variation. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, v. 21, n. 7, p. 785-791, 1985.

CAPÍTULO II

CLORINA CÚPRICA e₆

Neste capítulo, enfatizou-se o estudo da CuCe₆, um dos principais componentes da CuChl. Utilizaram-se técnicas espectrofotométricas e cromatográficas para avaliar a sua estabilidade térmica, determinar os valores de pK_a , sua lipofilicidade e a interação com a proteína. A separação e identificação da CuCe₆ por HPLC foi realizada em uma coluna C₃₀. A degradação térmica foi avaliada pelos parâmetros cinéticos da reação pelo método isotérmico (equação de *Arrhenius*), e o grau de ionização foi avaliado pela constante de dissociação (pK_a). A lipofilicidade foi avaliada por meio da estimativa do $\log P$ em sistema 1-octanol/tampão e pela incorporação em modelo mimético de membrana. A interação da CuCe₆ com a BSA foi avaliada por meio da supressão de fluorescência da proteína frente à alíquotas crescentes da clorina cúprica.

1. INTRODUÇÃO

A clorofilina cúprica de sódio (CuChI) é um pigmento formado por várias clorinas (**FIGURA 1**), sendo as principais a clorina cúprica e₆ (CuCe6) e a clorina cúprica e₄ (CuCe4) (EGNER et al., 2000; FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007; TUMOLO; LANFER-MARQUEZ, 2012).

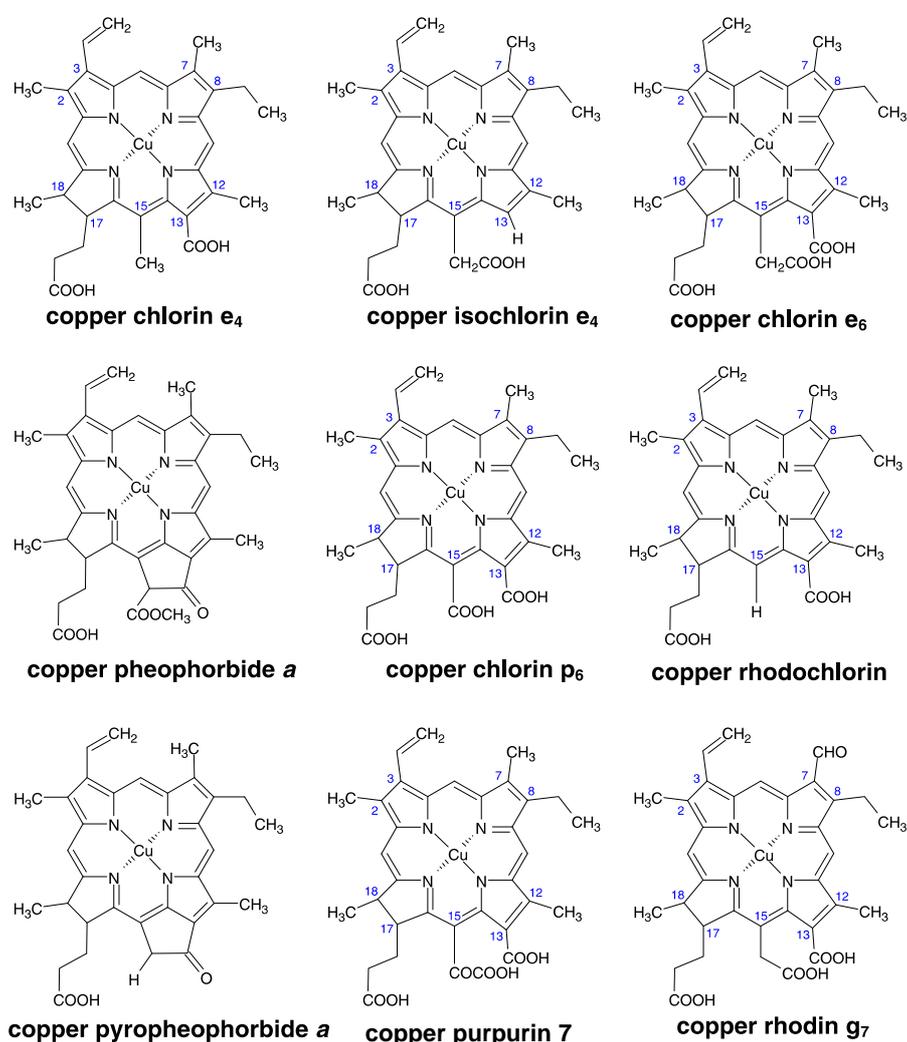


FIGURA 1. Estruturas dos principais componentes encontrados na CuChI. Fonte: Tumolo e Lanfer-Marquez (2012).

Os primeiros estudos de absorção da clorofila e clorofilina foram realizados nas décadas de 1940 e 1950. Estes compostos foram administrados oralmente em ratos e foi observada, pela primeira vez, a dispersão desses pigmentos no soro, em órgãos como o fígado, baço, coração, rim, pulmão, além da pele e linfonodos (HENDERSON; LONG, 1941; HARRISON et al., 1954).

A absorção da clorofilina voltou a ser estudada apenas 50 anos mais tarde e vários foram os esforços para elucidar o seu processo de absorção *in vivo*. A maior dificuldade a respeito do entendimento do processo de absorção da CuChl é a complexidade da molécula, que é formada por um conjunto de clorinas que abrangem uma vasta gama de polaridade, e que podem sofrer modificações químicas durante a passagem pelo trato gastrointestinal (FERRUZZI; BLAKESLEE, 2007).

Dessa forma, a atividade biológica da CuChl pode estar relacionada com um, ou vários componentes de maior absorção ou ainda um metabólito. Neste sentido, Ferruzzi e colaboradores (2002) realizaram um estudo *in vitro* para avaliar a estabilidade da CuChl durante a digestão gástrica e intestinal. Dentre os principais componentes da amostra, os autores observaram que a CuCe4 mostrou maior estabilidade quando comparada a CuCe6, que foi degradada em mais de 90% em produtos não identificados. A estabilidade da CuCe4 durante a simulação *in vitro* e sua assimilação efetiva por células Caco-2 sugerem que esse componente ou seus metabólitos são efetivamente absorvidos pelo intestino humano.

Outro fator relevante para o entendimento da absorção da CuChl foi o estudo *in vivo* realizado por Egner e colaboradores (2000), no qual os indivíduos

consumiam 300 mg de CuChl por dia, com a finalidade de observar o seu efeito anticarcinogênico. Este foi o estudo que forneceu a primeira comprovação de que a clorina é absorvida em algum grau por humanos, já que a CuCe4 e o etil éster da CuCe4 foram identificados no soro dos participantes. No entanto, como a CuCe6 não foi encontrada, e os autores sugerem que houve degradação deste componente durante a digestão ou absorção.

Um esquema sobre o comportamento da CuChl no processo de digestão e absorção (**FIGURA 2**) foi sugerido por Ferruzzi e Blakeslee (2007). De acordo com os autores, há uma degradação significativa da CuCe6 e predominância da etil éster da CuCe4 no processo de absorção do corante. Segundo o estudo, a absorção intestinal dos derivados da CuChl pode ocorrer por transporte facilitado seguido ou não de efluxo para o lúmen, fato este ainda não comprovado. Outra hipótese da via de absorção considera que os metabólitos da Cu-Chl que passariam do enterócito para a circulação.

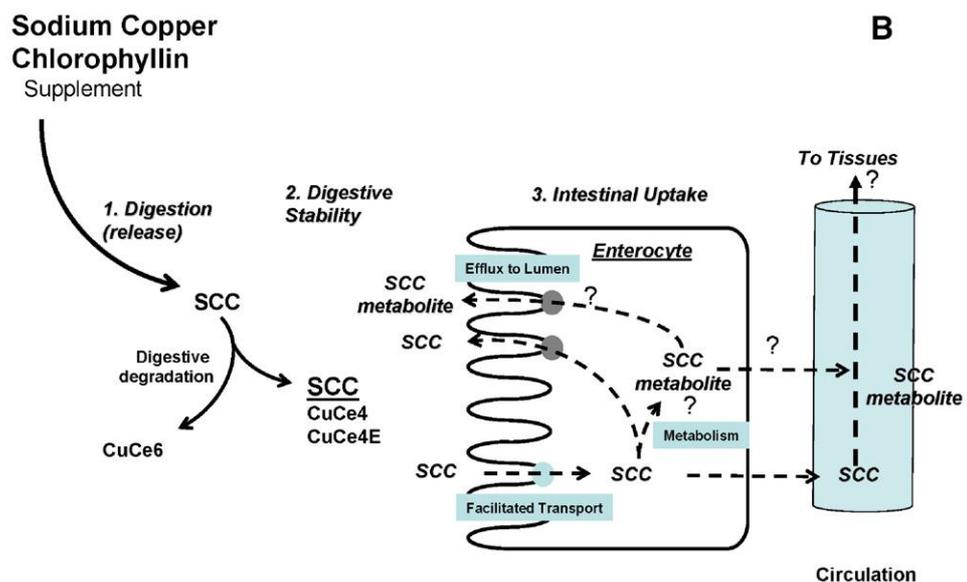


Figura 2. Esquema das possíveis vias de absorção da CuChl. Fonte: Ferruzzi e Blakeslee (2007).

Recentemente, num estudo com ratos foi avaliada a absorção de CuChI e sua distribuição em diferentes tecidos (GOMES et al., 2009). Os autores identificaram a CuCe₄ no soro, no fígado e nos rins; e ausência de CuCe₆ no soro e nos tecidos (fígado e rim), que poderia estar relacionada à não-absorção, à degradação ou interação da CuCe₆ com outros componentes da dieta. Estes resultados estão em conformidade com os observados por Egner e colaboradores (2000), porém são necessários mais estudos em modelos celulares, para que sejam elucidados os fatores que favorecem a absorção, biodisponibilidade e a bioatividade dos componentes da CuChI.

A escassez de informações na literatura a respeito do comportamento das clorinas cúpricas é um fator limitante para o entendimento da sua absorção. Em contrapartida, desde os anos 80 são realizados estudos com as clorinas não cúpricas e suas propriedades físico-químicas (SHI et al., 2011).

Esses estudos possibilitaram o conhecimento de que o padrão de clorina e₆ (Ce₆) pode apresentar uma mistura de vários compostos instáveis, e que o processo de degradação está relacionado com impurezas e presença de outros componentes, como a clorina e₄ (ISAKAU et al., 2007; JUZENIENE, 2009).

Assim, outros estudos físico-químicos foram realizados para assegurar a utilização da Ce₆. Dentre eles, a variação do pH que está relacionada à propriedades importantes, como solubilidade, lipofilicidade e estabilidade. E, a determinação do pK_a que possui relevância pelo fato de tecidos tumorais possuírem pH microlocal inferior aos sadios (ČUNDERLÍKOVÁ et al., 1999).

Além disso, o conhecimento de que as clorinas ligam-se com alta afinidade à proteínas (FALK, 1961) foram cruciais na realização de alguns

estudos que demonstraram que a clorofila e a CuChl se ligam à albumina do soro humano (HSA) (OUAMEUR et al., 2005) e que a clorofilina magnésica se liga à albumina de soro bovino (BSA) (WANG et al., 2010). Outros trabalhos mostraram também a associação de clorinas não cúpricas, dentre elas a clorina p₆ (Cp₆), com a BSA (DAS et al., 2005; BOSE; DUBE, 2006), e que a associação entre a clorina e₆ (Ce₆) e a albumina do soro humano (HSA) (RINCO et al., 2009) é dependente do pH do meio (MOJZISOVA et al., 2007).

Sob esta ótica, atualmente, os dados sobre o comportamento físico-químico da Ce₆ é bem estabelecido, ao contrário das principais clorinas cúpricas presentes na CuChl, as clorinas cúprica e₆ (CuCe₆), e₄ (CuCe₄) e p₆ (CuCp₆).

A hipótese de que a degradação da CuCe₆ possa ser decorrente da metabolização da CuChl não é bem estabelecida, bem como seu transporte, sua absorção e sua biodisponibilidade.

Portanto, estudos sobre as clorinas majoritárias da CuChl são necessários para a melhor compreensão de sua atividade biológica. Deve-se considerar que as propriedades físico-químicas dessas moléculas são fundamentais na sua interação com sistemas biológicos, e que as modificações devido à protonação e desprotonação podem influenciar sua lipofilicidade, fatores esses que são determinantes na absorção celular.

Dessa forma, o presente estudo foi conduzido visando a separação e identificação da CuCe₆ por HPLC/MS-MS, a avaliação da sua cinética de degradação térmica, o cálculo de pK_a, o estudo de sua lipofilicidade por meio do cálculo de log *P*, a incorporação em modelos miméticos de membranas e a

ligação da CuCe6 à BSA. Espera-se que os resultados obtidos possam contribuir para futuros ensaios *in vivo* ou *in vitro*, que envolvam a CuCe6, e também, elucidar se este componente é responsável pelo efeito bioativo designado às clorofilinas cúpricas ou se há sinergismo entre os compostos presentes nas amotras.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Caracterizar uma amostra de clorina cúprica e₆ e suas propriedades físico-químicas.

2.2 Objetivos específicos

- Separar e identificar a amostra de clorina cúprica e₆ por HPLC/MS-MS;
- Avaliar a degradação térmica da clorina cúprica e₆ por espectrofotometria e cálculo da constante de velocidade de degradação;
- Estimar os valores de pK_a da molécula;
- Avaliar a lipofilicidade por meio do cálculo de log *P* da clorina cúprica e₆ em sistema 1-octanol/tampão;
- Avaliar a lipofilicidade em função da incorporação da clorina cúprica e₆ em modelos miméticos de membranas, em função do pH;
- Avaliar a associação entre a CuCe6 e BSA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostra

Foi utilizado o padrão de clorina cúprica e₆ (CuCe6) (lote LY09-2674) da empresa *Frontier Scientific* (Longan, Utah – Estados Unidos da América).

3.2 Separação e identificação da CuCe6 por HPLC/MS

A separação do padrão de CuCe6 seguiu o protocolo estabelecido por Mortensen e Geppel (2007), no qual os autores identificaram os componentes de cinco amostras de CuChl por HPLC/MS-MS (MORTENSEN; GEPPEL, 2007). O equipamento de HPLC utilizado foi o mesmo modelo descrito anteriormente (item **3.5 – CAPÍTULO I**). Foi utilizada uma coluna C₃₀ da marca YMC, 250 mm x 4,6 mm, 3 µm, à 30 °C e duas fases móveis: fase móvel A: metanol:água:ácido acético (90:10:0,5, v/v), e fase móvel B: tert-butil metil éter:metanol:ácido acético (100:10:0,5, v/v). Gradiente de eluição utilizado: 0-50% B em 30 minutos, 50-100% B em 10 minutos, 100% B por 5 minutos e 100-0% B em 5 minutos, com fluxo de 1 mL/min. Tempo de corrida 86 minutos. Foram injetados 10 µL da CuCe6 [0,4 mg/mL] solubilizadas em metanol, e a separação foi acompanhada por detecção em PDA em comprimentos de onda de 406 x 8nm; 408 x 8nm e detecção por fluorescência $\lambda_{\text{excitação}} = 400$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 640$ nm.

Realizou-se, também, uma análise complementar por HPLC/MS-MS (Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas) no Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica do IQ/USP. O equipamento utilizado foi um analisador tipo íon trap LC-MS/MS(n) – Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus, seguindo as condições cromatográficas descritas por Mortensen e Geppel (2007).

Para a análise quantitativa da CuCe6 foi necessária a construção de uma curva de calibração. Os procedimentos de linearidade foram iniciados com seis diluições da solução estoque de CuCe6 (0,2mg/mL) em metanol, injetadas em triplicata nas concentrações de 0,007; 0,008; 0,010; 0,020; 0,040; 0,200 mg/mL. O experimento também foi conduzido utilizando uma solução estoque de CuCe6 (0,2mg/mL) em água, nas mesmas concentrações utilizadas para metanol.

3.3 Cinética de degradação e meia-vida

O estudo da cinética de degradação envolveu a análise da ordem de reação, energia de ativação (E_a) e constante da velocidade de reação (k) (FERRUZZI e SCHWARTZ, 2005).

A cinética da degradação térmica da CuCe6 foi avaliada nas temperaturas de 35, 45, 55 e 65°C. Aproximadamente 1 mg de CuCe6 foi solubilizado em 100 mL de água Milli-Q (FERRUZZI; SCHWARTZ, 2005) e, após atingir a temperatura estabelecida, foi realizada a leitura do espectro de absorção em 406 nm em cubeta com caminho óptico de 1 cm, em

espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV 2401-PC, acoplado a um forno com temperatura controlada (CPS – Controller).

Para os cálculos da constante de velocidade e energia de ativação, foram utilizados as mesmas equações descritas no item **3.6.2.** do **CAPÍTULO I.**

3.4 Determinação dos valores de pK_a

Visando o estudo do comportamento da CuCe6 em diferentes pHs, bem como identificar a eventual agregação do pigmento em diferentes condições experimentais, foram estimados os valores de pK_as da molécula com base em uma titulação potenciométrica.

Foram preparadas soluções de CuCe6 (0,2 mg/mL) em 10 mL de água Milli-Q. A titulação base-ácido foi feita com uma solução de HCl 0,01 M. A leitura do pH foi realizada por meio de um pH-metro digital da marca Micronal série B474 de três casas decimais, e a temperatura monitorada a $25,5 \pm 0,3$ °C.

3.5 Determinação do coeficiente de partição em sistema 1-octanol/tampão

O estudo de partição da CuCe6 em 1-octanol/tampão para o cálculo do log *P* resulta em informações sobre o comportamento hidrofílico/hidrofóbico da clorina, mimetizando um ambiente de membrana biológica (POOLE; POOLE, 2003).

Foram utilizados tampão citrato (ácido cítrico e citrato de sódio) 10 mM para as faixas de pH 3 a 6 e tampão Tris (Synth) 10 mM para os pHs 7 e 8. Volumes iguais de tampão e de 1-octanol foram agitados em temperatura ambiente por 24 horas, após a saturação, as fases foram recolhidas por meio de um funil de separação. O padrão de CuCe6 (0,5 mg) foi solubilizado em 50 mL de *n*-octanol saturado (0,5 mg/50 mL). Uma alíquota (5 mL) desta solução foi transferida para um tubo tipo Falcon ao qual foi adicionada a mesma quantidade (5 mL) de tampão Tris (os experimentos foram realizados em pHs de 3 a 8). O conteúdo foi agitado vigorosamente em vórtex por cinco minutos e submetido à centrifugação a 4000 rpm, 20 °C por 10 minutos.

Foram realizadas as leituras espectrofotométricas da solução do padrão de CuCe6 em água satura, da solução da CuCe6 particionada e da água saturada, nos comprimentos de onda de 350 a 750 nm, em em espectrofotômetro da marca Shimadzu, modelo UV 2401-PC.

O log *P* foi obtido pela relação:

$$P = \frac{[\text{solute}]_{\text{oct}}}{[\text{solute}]_{\text{tamp}}} \text{ ou } P = \frac{C_{\text{org}}}{C_{\text{aq}}} = \frac{\text{Abs}_{\text{org}}}{\text{Abs}_{\text{aq}}} \quad (\text{Eq. 1})$$

, onde:

P = partição;

[solute]_{oct} = concentração do composto em octanol;

[solute]_{tamp} = concentração do composto em tampão;

*C*_{org} = concentração a partir da absorbância, na fase orgânica (**Eq. 2**);

*C*_{aq} = concentração a partir da absorbância, na fase aquosa (**Eq. 2**);

Abs_{org} = absorbância na fase orgânica,

Abs_{aq} = absorbância na fase aquosa.

Quando a leitura da CuCe6 foi efetuada nas duas fases (1-octanol e tampão), a concentração da clorina foi dada pela relação:

$$C = \frac{Abs}{\epsilon \times b} \quad (\text{Eq. 2})$$

, onde:

C = concentração da CuCe6 na fase orgânica ou aquosa;

ϵ = 30.450 M⁻¹cm⁻¹ na fase orgânica e 51.814 M⁻¹cm⁻¹ na fase aquosa da CuCe6, determinados experimentalmente.

O log P também pode ser obtido pela relação das absorbâncias com leitura apenas da fase aquosa (**Eq. 3**) ou apenas da fase orgânica (**Eq. 4**):

$$P = \frac{(Abs_{antes} - Abs_{depois})}{Abs_{depois}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Ou,

$$P = \left(\frac{Abs_{depois}}{Abs_{antes} - Abs_{depois}} \right) \quad (\text{Eq. 4})$$

, onde:

Abs_{antes} = absorbância da amostra antes da partição,

Abs_{depois} = absorbância após a partição.

3.6 Incorporação da CuCe6 em lipossomas em função do pH

Para as análises de incorporação da CuCe6 em lipossomas, foram preparados 6 filmes lipídicos em tubos de ensaio por meio da solubilização de

11 mg de lecitina de soja (Sigma) em 1 mL de clorofórmio, seguido da evaporação deste solvente com um fluxo de nitrogênio, para a formação do filme lipídico. Os filmes foram solubilizados em 2 mL de tampão correspondente a cada pH de interesse, utilizando tampão citrato 10mM para os pHs 3, 4, 5 e 6 e tampão Tris 10 mM para os pH 7 e 8. Em seguida, os filmes foram agitados no vórtex, até a completa solubilização.

O conteúdo do tubo de ensaio (filme solubilizado) foi separado em duas alíquotas de 800 µL que foram armazenadas em tubos Eppendorf (duplicata). O conteúdo dos tubos foi agitado por um minuto e meio a 1400 rpm, utilizando o agitador de tubos e placas Eppendorf Mixmate. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm a 24 °C em centrífuga da marca Eppendorf, modelo 5415R. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se 800 µL do respectivo tampão de trabalho. O procedimento de agitação, centrifugação e descarte do sobrenadante foi repetido por três vezes, para que ao final restassem apenas vesículas grandes.

Em seguida, foram adicionados 800 µL do tampão e 100 µL da solução de CuCe6 [1mg/mL] ao precipitado. O conteúdo foi agitado e incubado por 30 minutos ao abrigo da luz, e, ao final centrifugado por 15 minutos a 13000 rpm, a 24 °C. O sobrenadante foi separado do precipitado, o qual foi ressuspensão com 800 µL do tampão, em outro microtubo Eppendorf. Às duas fases foram adicionados 100 µL de Triton X100 10%, e agitados no Eppendorf Mixmate por 10 minutos a 1000 rpm. As leituras de absorvância do sobrenadante e do precipitado foram efetuadas em cubetas de vidro (com 2,5 mL do respectivo tampão e 500 µL das amostras), a 411 nm, em espectrofotômetro da marca

Shimadzu, modelo UV 2401-PC. Para o cálculo de incorporação foi utilizada a equação:

$$\%Inc = \left[\frac{Abs_p}{Abs_s + Abs_p} \right] \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

, onde:

% Inc = porcentagem de incorporação

Abs_s = absorbância do sobrenadante

Abs_p = absorbância do precipitado

A adição de Triton X-100 10% após o período de incubação foi feita para assegurar a desagregação das moléculas de CuCe6 e também para provocar o rompimento dos lipossomas com subsequente liberação das clorinas incorporadas/ligadas (UCHOA-FERNANDES, 2007).

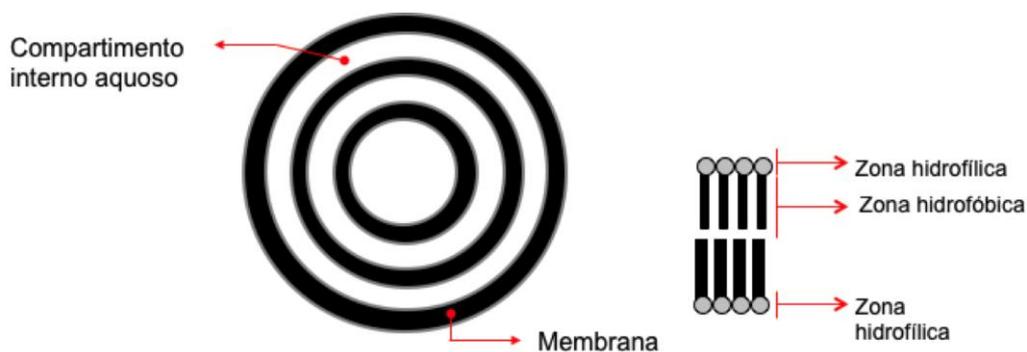


FIGURA 3. Esquema de um lipossoma multilamelar.

3.7 Interação entre CuCe6 e albumina do soro bovino (BSA)

O estudo da associação BSA-CuCe6 pela supressão da fluorescência da BSA na presença de CuCe6, resulta no número de sítios de ligação e a constante de dissociação (K_D) entre os componentes.

O ensaio foi realizado segundo metodologia proposta por Rinco e colaboradores (2009). As soluções utilizadas foram: tampão PBS (20mM Na₂HPO₄, 20mM KH₂PO₄, 150mM NaCl) pH 7,4; solução de BSA (PM= 66.462g/mol, Sigma) 0,2 μ M (6,6mg/500mL) e de CuCe6 9,12 μ M, ambas em tampão PBS. Onde, 3 mL da solução de BSA foram colocados numa cubeta de quartzo ($b = 1$ cm) e alíquotas crescentes de CuCe6 foram adicionadas, monitorando a perda da intensidade de fluorescência da proteína. A supressão quase que total da fluorescência da BSA foi obtida com a adição de 15 μ L de uma solução de CuCe6 912 μ M. O equipamento utilizado foi SPEX-Fluorog 1681 Spectrometer com cubeta de quartzo de quatro faces polidas, com fenda aberta em 5; λ_{em} 340 nm e λ_{ex} 280 nm, sendo a leitura realizada entre 310 a 450 nm. A fluorescência foi corrigida para cada leitura após a adição de CuCe6 por meio do programa OriginPro 8.5, de acordo com a equação:

$$\text{Fluorescência}_{\text{corrigida}} = \left(\frac{\text{volume total}}{\text{volume inicial}} \right) \times (\text{fluorescência}_{\text{observada}}) \quad (\text{Eq. 6})$$

Após a obtenção dos valores corrigidos, a supressão da fluorescência da proteína foi utilizada para o cálculo da constante de dissociação (K_D), em um gráfico de $\log\left(\frac{F_0-F}{F-F_\infty}\right)$ em função de $\log[Cu e_6]$, sendo que:

F_0 = fluorescência inicial do BSA,

F = fluorescência do BSA após cada adição de CuCe6,

F_∞ = fluorescência da proteína em uma solução saturada com CuCe6, onde todos os sítios de ligação estão ocupados.

$[CuCe6]$ = concentração de CuCe6.

A partir do gráfico da constante de ligação em função do $\log [CuCe6]$ foi obtido o número dos sítios de ligação a partir do coeficiente angular da reta e a constante de dissociação no equilíbrio, no intercepto $y = 0$.

3.8 Extração da CuChl do soro de animais com base na interação CuCe6-BSA

O método de extração dos componentes da CuChl do soro foi realizado conforme a metodologia descrita por Egner e colaboradores (2000).

O ensaio ocorreu a partir da contaminação do soro de ratos Wistar (400 μ L) com 80 μ L de solução aquosa de CuChl (1mg/mL). O material biológico foi acidificado com 100 μ L tampão fosfato pH 5,0 e subsequente adição de 600 μ L e solução de metanol:clorofórmio (50:50 v/v). O conteúdo foi centrifugado a 2000 rpm, a 4°C por cinco minutos no equipamento Eppendorf, modelo 5415R. As

frações obtidas foram recolhidas e para a separação por HPLC foram utilizadas as frações orgânica e aquosa, que foram previamente secas em centrifuga à vácuo e ressuspensas em metanol (**FIGURA 4**).

A metodologia utilizada por HPLC, para a separação dos principais componentes da CuChl, foi a preconizada por Mortensen e Geppel (2007), conforme item **3.5.3, CAPÍTULO I**.

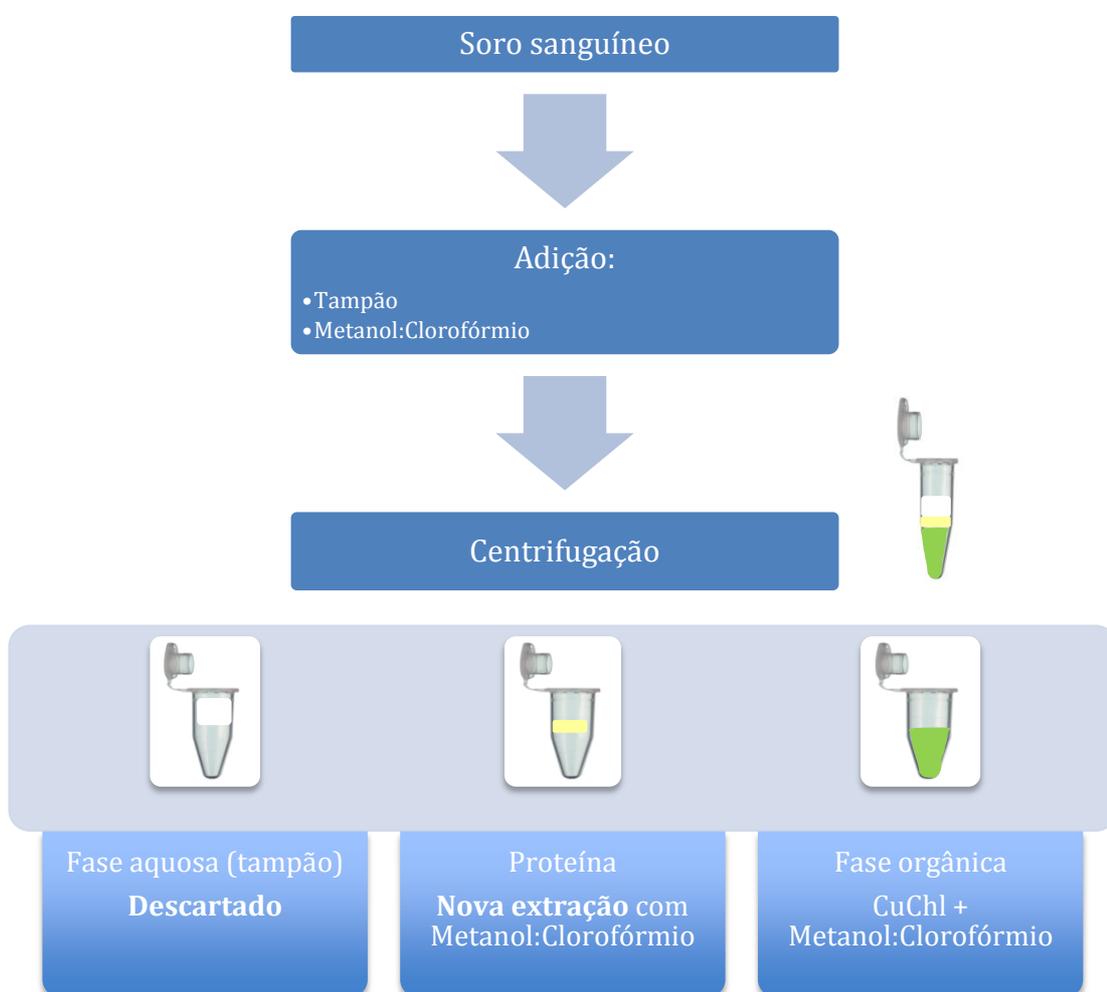


FIGURA 4. Fluxograma da extração da CuChl do soro sanguíneo segundo metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000).

Segundo o protocolo da literatura para a extração da CuChI do material biológico (EGNER et al, 2000), a fase aquosa é descartada. Entretanto, esta fase foi coletada e analisada por HPLC para a avaliação da eficiência do método frente à observação de que há interação entre a CuCe6 e a BSA. Foram adicionadas à fração de proteína, alíquotas do solvente de extração (metanol:clorofórmio). Porém, após cinco repetições não houve transferência do pigmento, da parte proteica para o solvente, conforme as imagens apresentadas na **FIGURA 5 (Passo III)**.

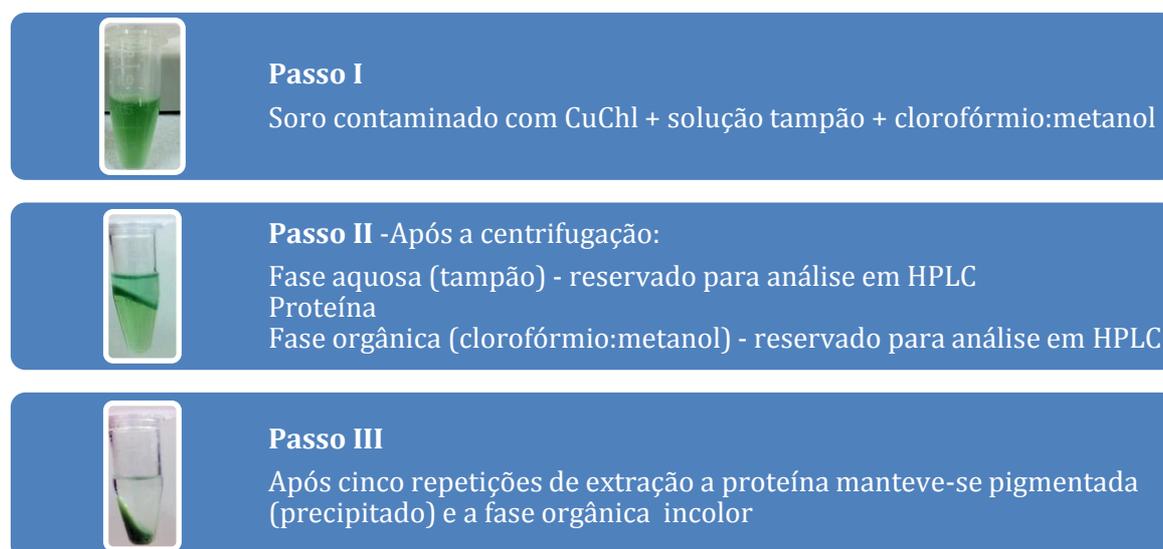


FIGURA 5. Passo a passo da extração do soro contaminado com CuChI, segundo metodologia proposta por Egner e colaboradores (2000).

3.9 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas, bem como os gráficos, foram realizadas no programa OriginPro em sua versão 8.5.0 SR1 (OriginLab Corporation). Os

resultados encontram-se apresentados como média \pm desvio padrão (DP) adotando nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Separação e identificação da CuCe6 por HPLC/MS-MS

A **FIGURA 6** apresenta o cromatograma obtido da amostra do padrão de CuCe6 em PDA (**FIGURA 6A**) e respectivo espectro de massas (**FIGURA 6B**).

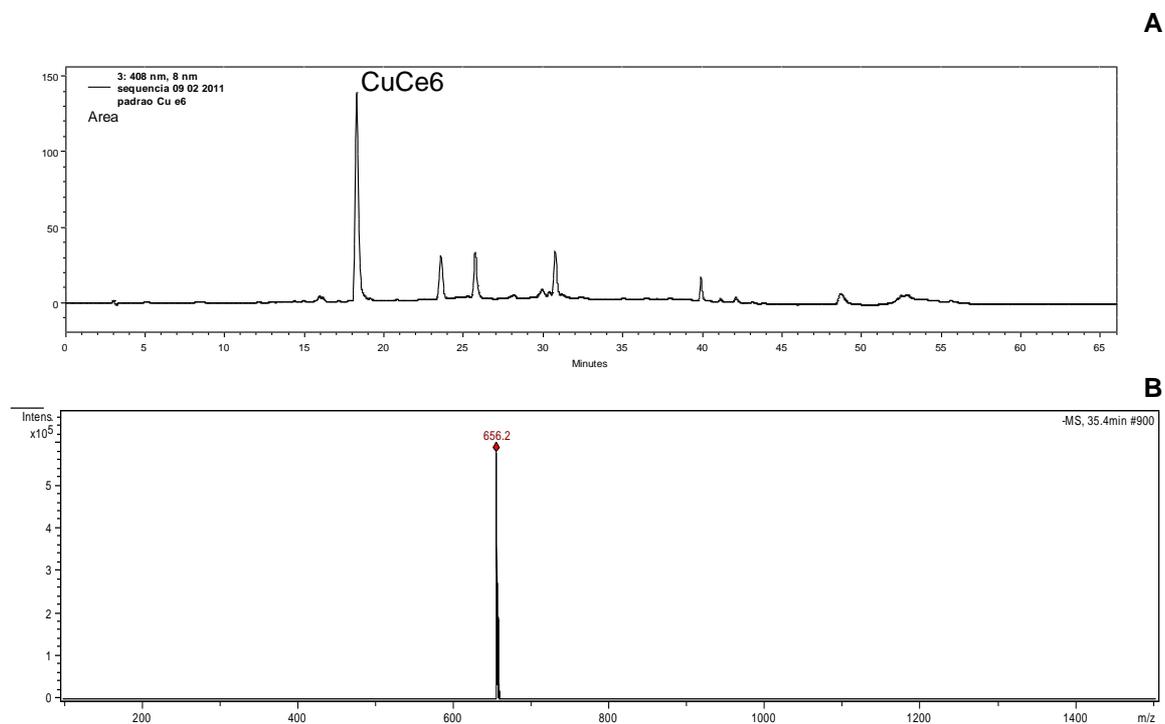


FIGURA 6. (A) Cromatograma em PDA (408nm) da CuCe6. (B) Espectro de massas da CuCe6 com relação m/z 656, segundo a metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).

A separação por HPLC evidenciou que além da CuCe6 há outros componentes presentes no padrão. Os picos eluídos foram identificados segundo o tempo de retenção e os comprimentos de onda de máxima absorção (**TABELA 1**).

TABELA 1. Valores de λ_{\max} , tempo de retenção (TR), área (mAU) e massa (m/z) da CuCe6, obtidos na separação por HPLC e detecção PDA e HPLC/MS-MS, segundo a metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).

Amostra	TR (min)	Área (mAU)	λ_{\max} (nm)	Massa (m/z)	Composto provável
CuCe6	18,29	2142598	408,634	656	Clorina cúprica e ₆
	23,57	510846	406,627	-	Isoclorina cúprica e ₄
	25,73	681133	413,643	-	-
	30,75	512070	408	-	Porfirina cúprica de clorina e ₆
	39,90	213292	405	-	Porfirina cúprica de clorina e ₄

4.2 Quantificação da CuCe6

A construção de uma curva de calibração da CuCe6 por HPLC seria importante para quantificar o componente em futuros ensaios *in vitro* ou *in vivo*. Porém, no decorrer da análise, foi observada a redução na área de absorção do padrão de CuCe6, além da presença de várias outras substâncias ao final do tempo necessário de corrida.

Na **FIGURA 7**, observa-se que o padrão de CuCe6, solubilizada em água, cujo pico correspondente elui em 18 minutos reduz em mais de 60% após 24 horas. No mesmo período, o padrão de CuCe6 solubilizado em metanol se degrada por completo.

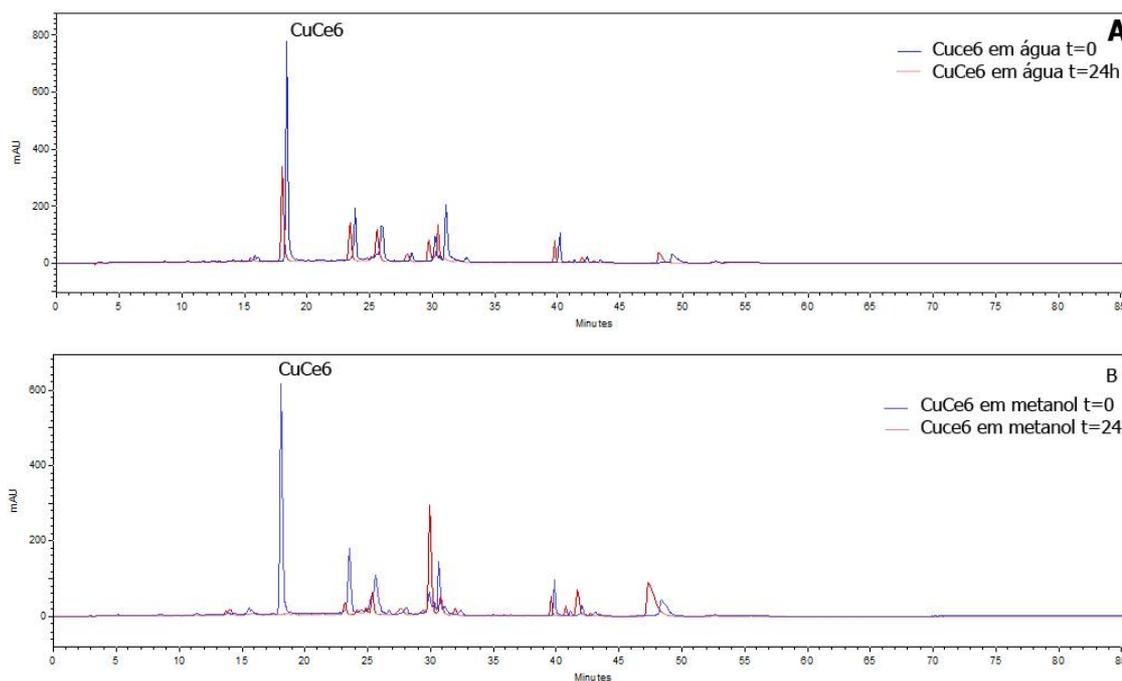


FIGURA 7. Cromatogramas do padrão de CuCe6 em água (A) e MeOH (B) no t_0 e t_{24} , segundo metodologia descrita por Mortensen e Geppel (2007).

Os resultados dos cromatogramas de separação do padrão de CuCe6 por HPLC mostram, também, que há outros componentes em sua formulação. A amostra solubilizada em água possui seis substâncias, das quais somente quatro puderam ser identificados pelo tempo de retenção e espectro de absorção, são elas a CuCe6, isoCuCe4, porfirina cúprica de clorina e₆ e porfirina cúprica de clorina e₄ (MORTENSEN; GEPPEL, 2007). Quanto ao padrão de CuCe6 que foi solubilizado em metanol, das sete substâncias, somente quatro foram identificadas segundo o tempo de retenção e espectro de absorção: CuCe6, isoCuCe4, porfirina cúprica de clorina e₆, rodoclorina cúprica e porfirina cúprica de clorina e₄.

Vale ressaltar que, o padrão de CuCe6 solubilizado em metanol apresentou em aproximadamente 30 minutos uma substância em t_{24} superior ao

t₀, porém, por falta de dados na literatura essa substância não pode ser identificada segundo seu espectro de λ_{\max} .

Para melhor visualização dos resultados, os componentes de degradação da CuCe6 no t₀ e t₂₄, em solução aquosa e em metanol, foram identificados segundo o seu tempo de retenção (TR) e espectro de absorção (**TABELA 2**).

TABELA 2. Valores de λ_{\max} , tempo de retenção (TR), área (mAU) e prováveis componentes da amostra de CuCe6 nos t₀ e t₂₄ em água e metanol, comparados aos valores da literatura (MORTENSEN; GEPPEL, 2007), obtidos na separação por HPLC.

Padrão de CuCe6	TR (min)		Área (mAU)		λ_{\max} (nm)		Provável componente
	t ₀	t ₂₄	t ₀	t ₂₄	t ₀	t ₂₄	
água	18,4	17,9	12035231	7379244	408,634	408,634	Clorina cúprica e ₆
	23,8	23,3	3222576	3251942	407,627	407,627	isoclorina cúprica e ₄
	26,0	25,5	2546044	3107390	413,644	412,644	*
	30,3	29,7	1587402	1847248	412,643	412,643	*
	31,1	30,4	3561198	2692560	408	408	Porfirina cúprica de clorina e ₆
	40,2	39,6	1033100	1114848	405	405	Porfirina cúprica de clorina e ₄
metanol	18,1	18,7	95948815	120496	408,634	‡	Clorina cúprica e ₆
	23,5	23,3	3060927	695822	407,627	406,627	isoclorina cúprica e ₄
	25,3	25,4	1037972	1252681	412,643	412,644	*
	29,9	30,0	1384054	5653286	412,642	413,640	*
	30,7	30,9	2018411	1103370	408	406	Porfirina cúprica de clorina e ₆ , Rodoclorina cúprica
	39,9	39,7	958499	700290	405	405	Porfirina cúprica de clorina e ₄
	48,4	47,4	1793486	5332752	410	410	*

* Compostos não identificados, pois os valores de λ_{\max} não estão disponíveis na literatura (MORTENSEN; GEPPEL, 2007).

‡ Não foi possível a identificação λ_{\max} .

4.3 Cálculo da cinética de degradação e meia-vida

A avaliação da cinética química e da ordem das reações determinam o perfil de degradação de uma substância e como elas são influenciadas por fatores como solvente, pressão e temperatura (FLORENCE e ATTWOOD, 2011). Entretanto, em se tratando de clorina cúpricas, existe uma carência de informações a respeito da cinética de degradação.

As constantes de velocidade de reação foram determinadas por meio dos coeficientes angulares da reta de acordo com a equação de primeira ordem (FIGURA 8).

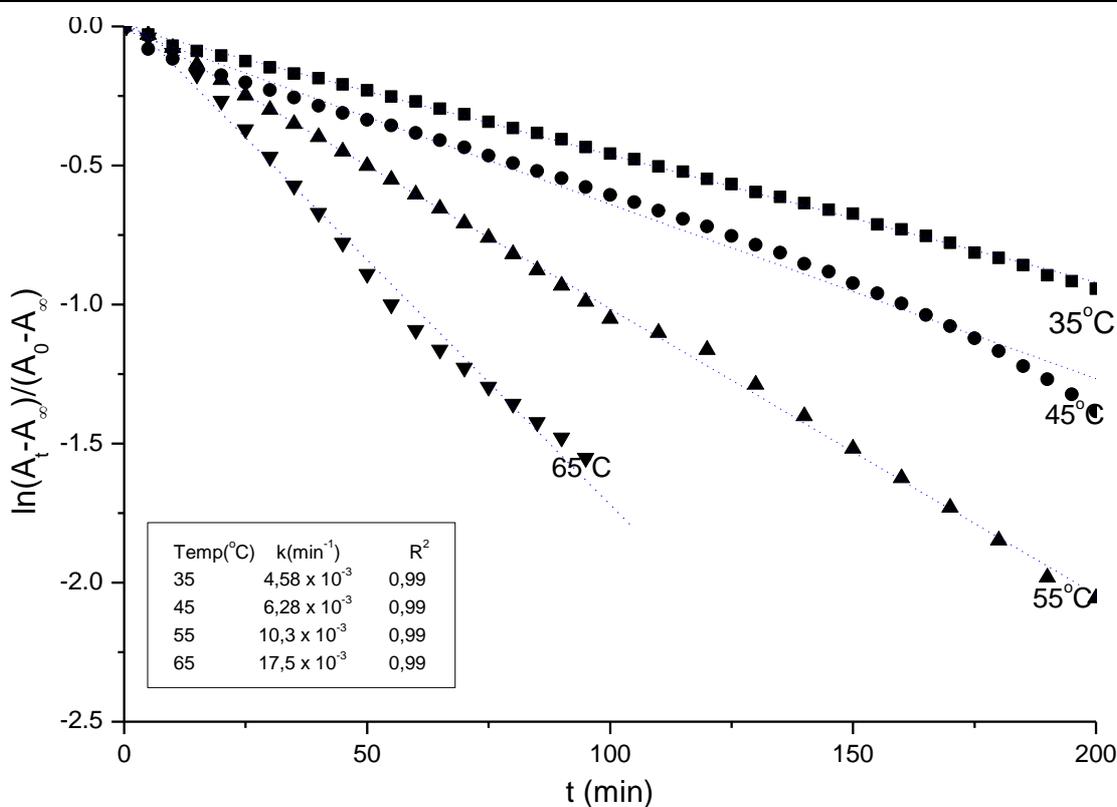


FIGURA 8. Linearização da equação que descreve a cinética de degradação de primeira ordem da CuCe6 em diversas temperaturas (35, 45, 55 e 65°C).

A partir dos valores de k, foi construído o gráfico do logaritmo natural de k em função do inverso da temperatura para determinar a energia de ativação (E_a) da reação, segundo a Equação de Arrhenius (**FIGURA 9**).

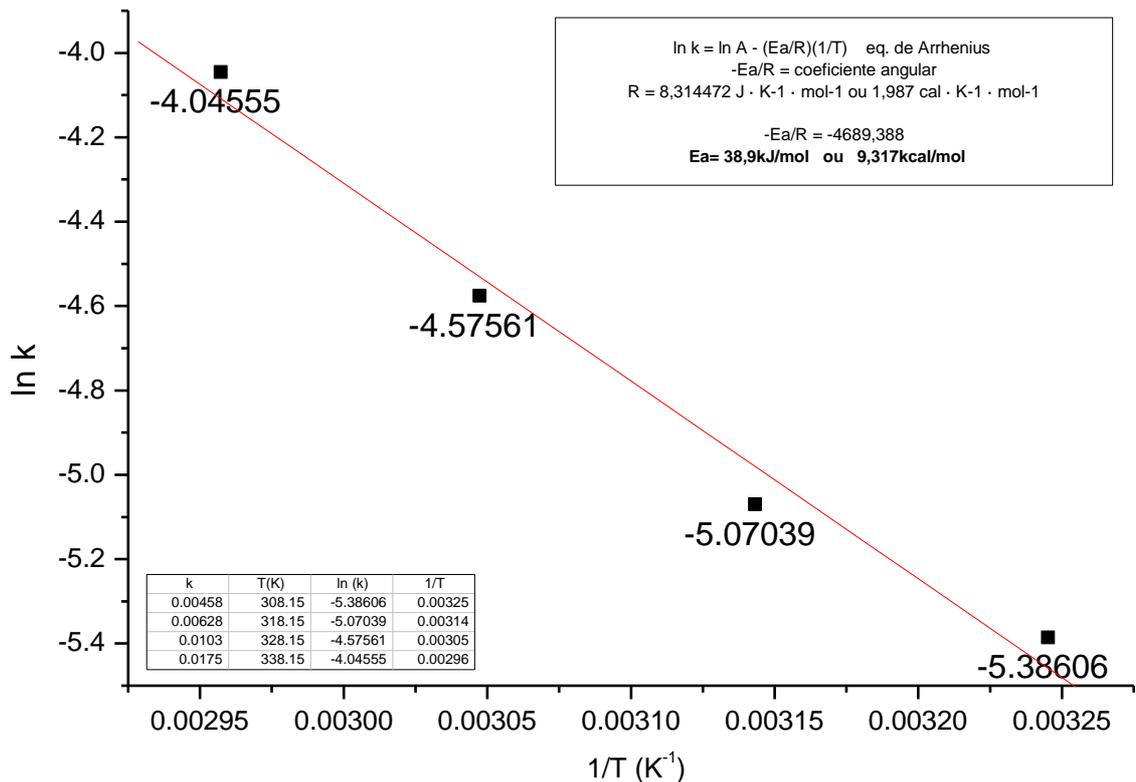


FIGURA 9. Determinação da energia de ativação a partir das constantes de degradação térmica da CuCe6.

De acordo com o gráfico, a E_a da CuCe6 é de 38,9 kJ/mol ou 9,317 kcal/mol, esta é a energia mínima necessária para que se inicie a reação de degradação do pigmento.

Outro fator que está diretamente correlacionado com a constante de velocidade para uma reação de primeira ordem, é a meia-vida da substância (**TABELA 3**).

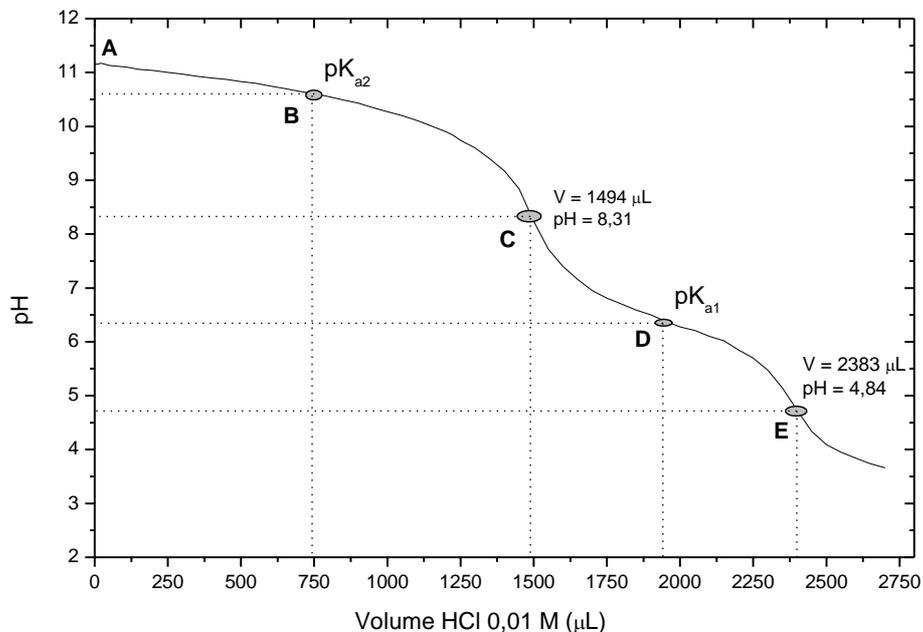
TABELA 3. Cálculo da meia-vida em minutos da CuCe6 a partir da temperatura (°C) e a constante de velocidade (k).

Temperatura (°C)	k	Meia-vida (min)
35	0,00458	151,31
45	0,00628	110,35
55	0,01030	67,28
65	0,01750	39,60

A meia-vida da CuCe6 a 35 °C foi de 151 minutos, a 55 °C a meia-vida caiu pela metade e a 65°C a meia-vida foi de apenas 39,60 minutos.

4.4 Determinação dos valores de pK_a

A **FIGURA 10** apresentam os valores de pH nos pontos de maior inflexão na curva (C e E) obtidos a partir de gráficos de derivada primeira e derivada segunda (HARIS, 2008) no programa Origin Pro 8.5.

**FIGURA 10.** Curva de titulação da CuCe6 [0,2mg/mL] com HCl 0,01 M.

Na **TABELA 4** encontram-se os resultados dos valores de pK_{a1} , pK_{a2} , pH do 1° ponto de inflexão e do pH do 2° ponto de inflexão das amostras de CuCe6. As amostras apresentaram dois pK_{a} s, o primeiro em pH ~6,4 e o segundo em pH ~10,6, bem como os pontos de inflexão da curva, no primeiro ponto o pH ~8,3 e o segundo ponto é em pH~4,8.

TABELA 4. Valores de pK_{a} s e pHs nos pontos de inflexão das curvas de titulação do padrão de CuCe6.

Amostra	pK_{a1}	pK_{a2}	pH 1° ponto de inflexão	pH 2° ponto de inflexão
CuCe6	6,41	10,62	8,31	4,84

Portanto, esses foram os indícios de que mais estudos seriam necessários para se obter informações a respeito do comportamento da CuCe6 em diferentes meios, para tanto, foram determinados o coeficiente de partição ($\log P$) em sistema 1-octanol/tampão.

4.5 Determinação do coeficiente de partição em sistema 1-octanol/tampão

O coeficiente de partição em sistema 1-octanol/tampão é um modelo simplificado que serve de subsídio para a compreensão do comportamento de substâncias em modelos mais complexos, como micelas e lipossomas (GEROLA, 2010).

A **FIGURA 11** apresenta os valores de $\log P$ em função do pH. Após a obtenção da absorbância máxima da solução, foram utilizadas as equações:

Eq.1, Eq.2, Eq.3, Eq.4 (item 3.5) para a obtenção do $\log P$. Os resultados demonstraram que a CuCe6 possui um caráter hidrofóbico nos pHs de 3 – 6, e hidrofílico nos pHs 7 e 8. Os resultados obtidos servem de subsídios para o estudo da incorporação da CuCe6 em lipossomas.

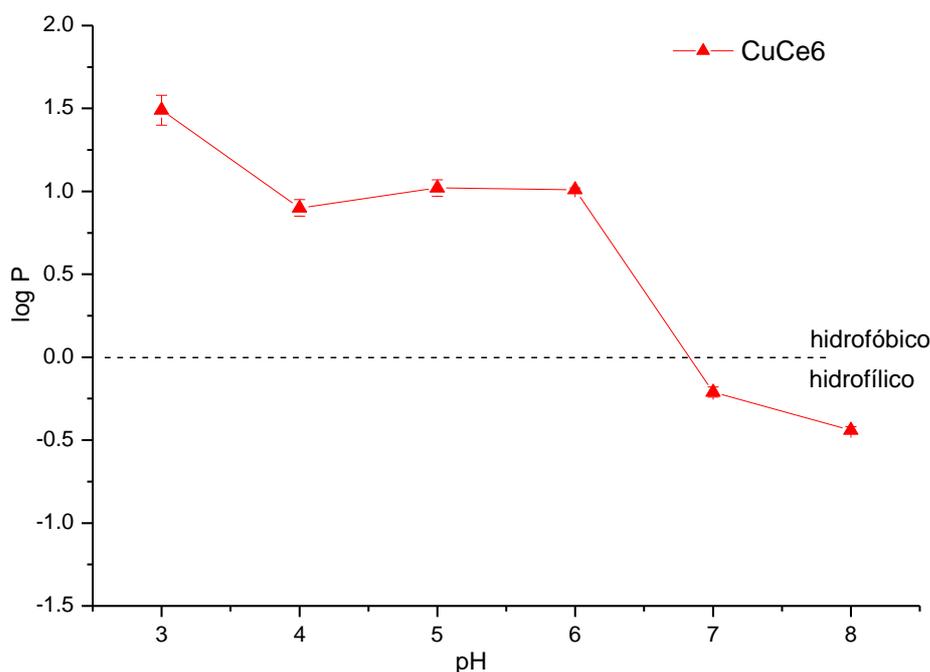


FIGURA 11. Valores de $\log P$ em função do pH da CuCe6, obtidos em sistema 1-octanol/tampão, segundo sua hidrofobicidade ($\log P > 0$) e hidrofiliicidade ($\log P < 0$).

4.6 Incorporação da CuCe6 em lipossomas em função do pH

Foi realizado o estudo da incorporação da CuCe6 em lipossomas de lecitina de soja em função do pH.

A **FIGURA 12** apresenta a porcentagem de incorporação da CuCe6 em lipossomas em função do pH. Verifica-se que as maiores porcentagens de incorporação ocorrem em pHs mais ácidos (3 -6); esses valores são condizentes

com os resultados da análise do coeficiente de partição em 1-octanol/tampão (**FIGURA 10**), faixa em que a CuCe6 apresenta um caráter hidrofóbico.

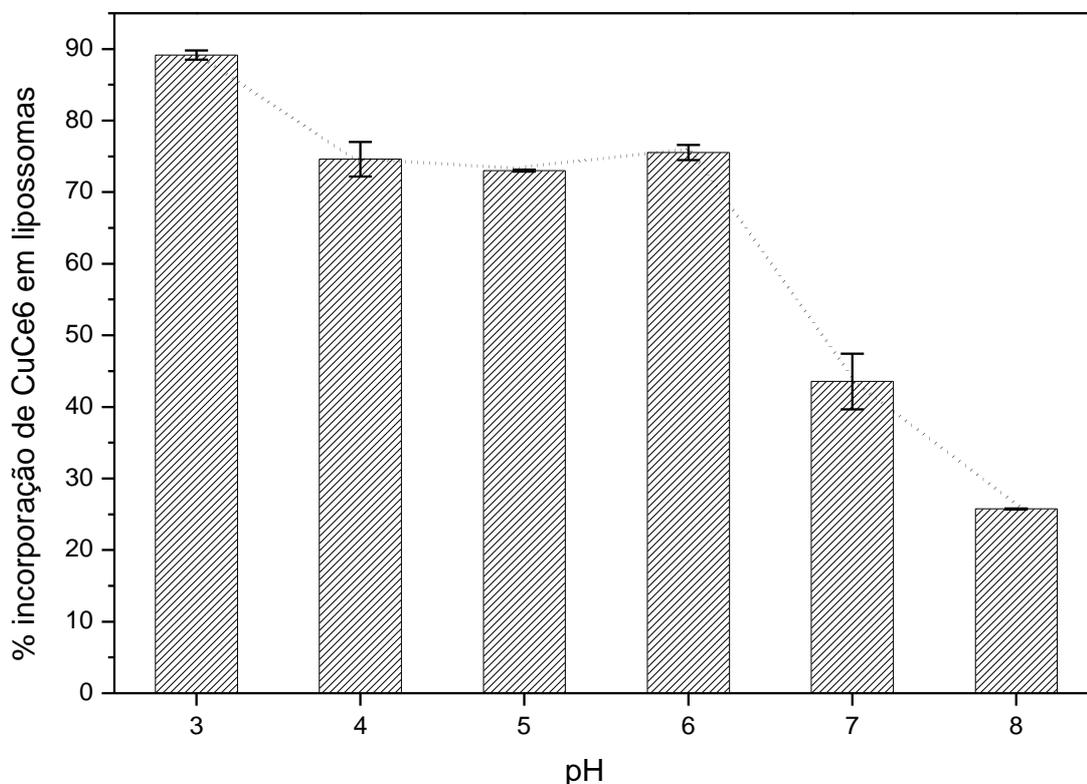


FIGURA 12. Porcentagem de incorporação da CuCe6 em lipossomas de lecitina de soja em função do pH.

4.7 Interação entre a CuCe6 e BSA

O estudo da interação entre a proteína BSA e o padrão CuCe6 foi realizado por meio de medidas de fluorescência. Moléculas porfirínicas, como as clorinas, podem ligar-se à proteínas provocando a supressão gradativa da sua fluorescência até a saturação de todos os sítios de ligação, quando a fluorescência tende a ser praticamente nula.

A **FIGURA 13** apresenta a variação dos espectros de fluorescência da proteína BSA frente a adições crescentes de CuCe6. Verifica-se que a

intensidade de fluorescência emitida pela proteína decresce com o aumento da concentração de CuCe6.

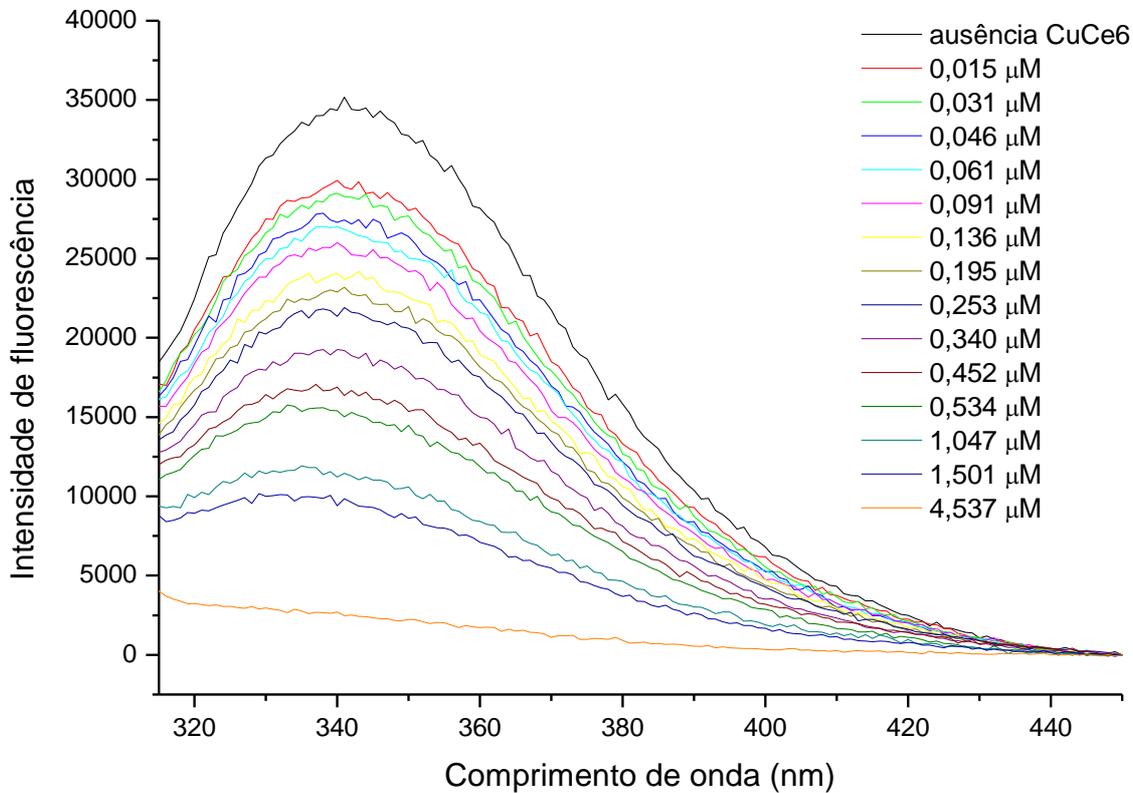


FIGURA 13. Variação da fluorescência (λ_{exc} 280nm e λ_{em} 340nm) da proteína BSA, devido à ligação com moléculas de CuCe6 adicionadas em concentração entre 0,015 e 4,537 μ M.

A **FIGURA 14** apresenta a constante de dissociação no equilíbrio (K_D) da interação BSA-CuCe6, utilizando os valores de emissão de fluorescência pela proteína após ligação com a clorina. Os resultados foram: $K_D = 0,38 \pm 0,07 \mu$ M, $K_A = 3,3 \pm 0,28 \times 10^6 M^{-1}$ e número de sítios de ligação ~ 1 ($N = 0,75 \pm 0,09$), para a ligação BSA e CuCe6.

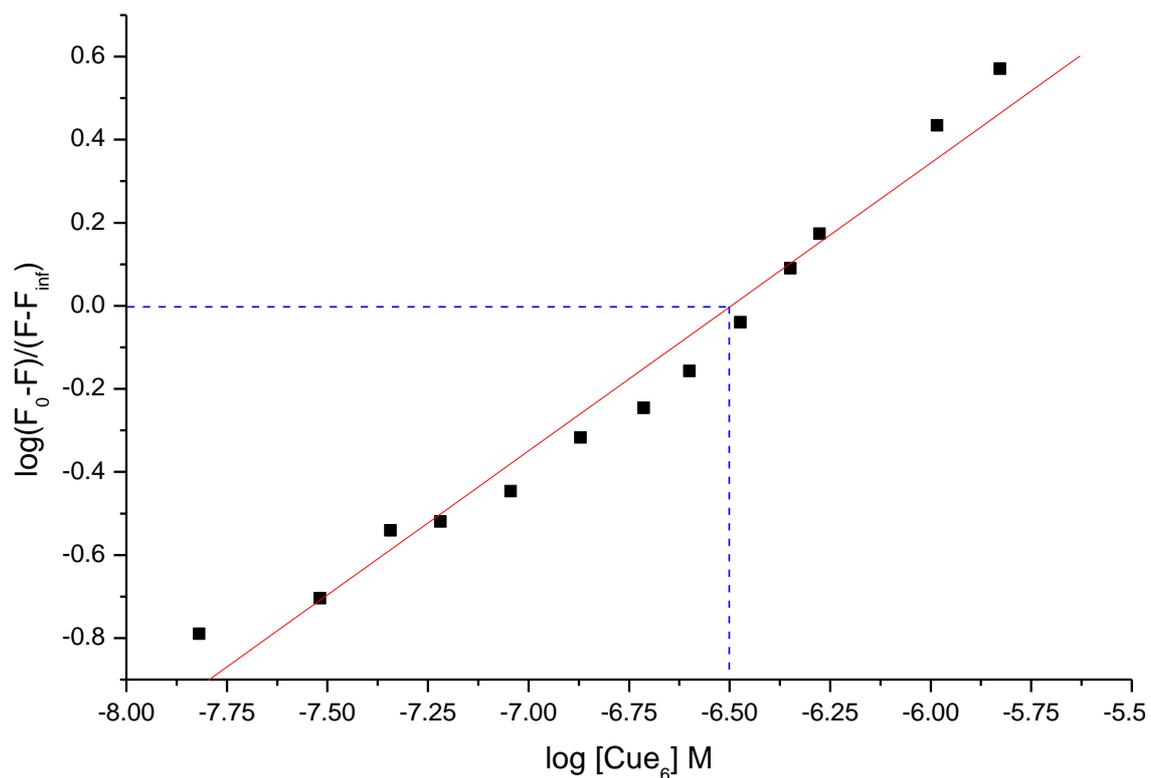


FIGURA 14. Constante de ligação da CuCe₆ à proteína BSA.

Na **FIGURA 15** está apresentada a curva de decaimento da fluorescência em função da concentração da CuCe₆. Os valores foram extrapolados para que se pudesse estimar a concentração de CuCe₆ que ocasiona na supressão total da fluorescência da BSA, sendo esse valor de $[6,2 \pm 0,3 \mu\text{M}]$.

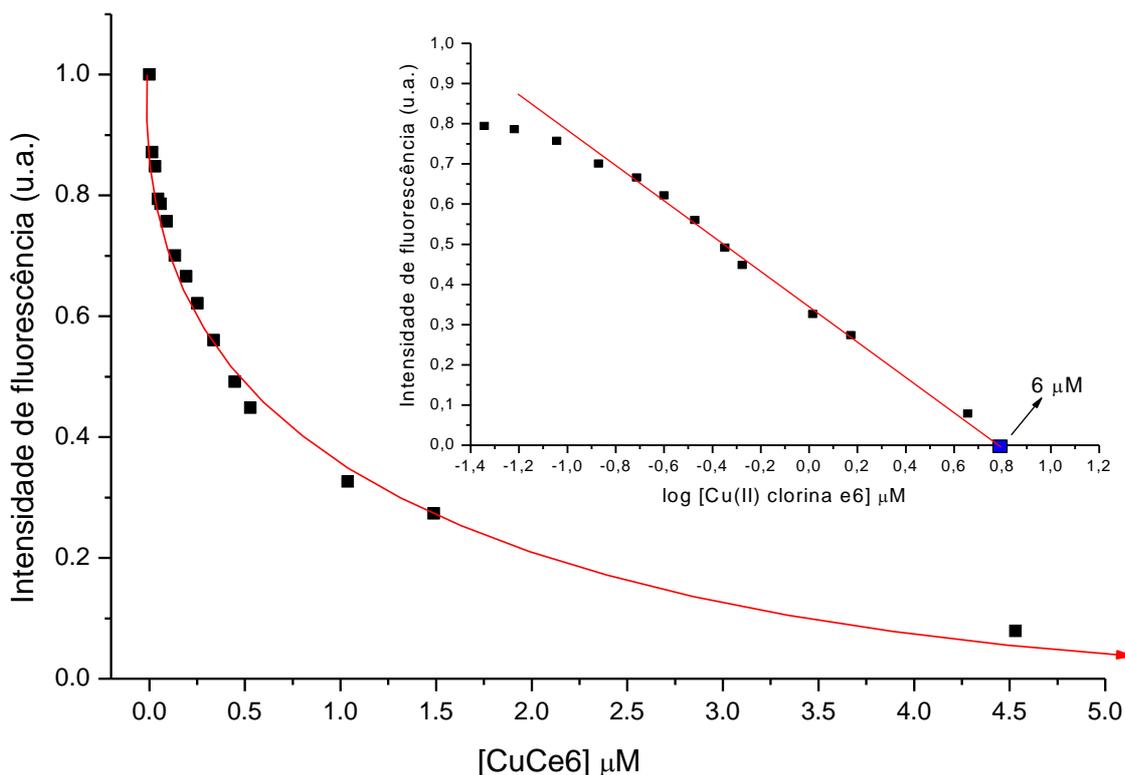


FIGURA 15. Intensidade de fluorescência da BSA em função da concentração de CuCe6, os valores foram extrapolados até a supressão total para estimar a concentração de CuCe6 que provoca este efeito.

4.8 Extração da CuChI do soro de animais com base na interação CuCe6-albumina

A observação de que a CuCe6 associa-se fortemente à proteína albumina pode explicar a ineficiência da recuperação dos compostos da CuChI do soro sanguíneo, levantando-se questionamentos aos protocolos de extração e quantificação já descritos na literatura (EGNER et al., 2000).

No cromatograma da **FIGURA 16A** são observados os picos referentes aos compostos CuCe6, CuCp6 e iso CuCe4 presentes na solução de CuChI que foi adicionada ao soro. Tais componentes também foram identificados nas fases aquosa e orgânica, empregadas na extração do pigmento do material biológico

(**FIGURA 16B**). Entretanto, verificou-se que a presença desses compostos é majoritária na fase aquosa, a qual é descartada segundo o protocolo de Egner e colaboradores (2000). A fase orgânica, a qual é empregada por esses autores para a identificação e quantificação das clorinas cúpricas no soro, retêm apenas uma pequena parcela desses compostos, conforme observado na **FIGURA 16B**.

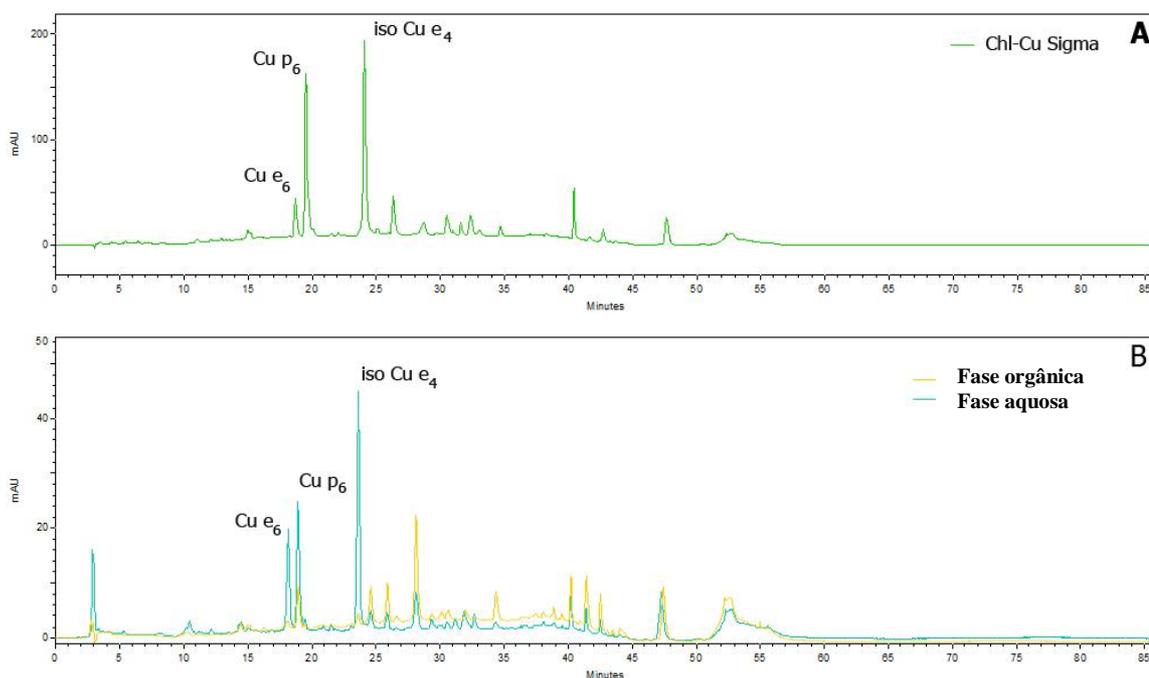


FIGURA 16. Cromatogramas por HPLC da CuChl (**A**) e das fases orgânica e aquosa da extração da CuChl do soro sanguíneo (**B**).

Na **TABELA 5** são comparados os valores da recuperação dos componentes da CuChl presente no soro, segundo o método de extração do pimento presente no material biológico (EGNER et al., 2000).

TABELA 5. Tempo de retenção (TR), área do pico e porcentagem de recuperação dos principais componentes da CuChI extraídos do soro sanguíneo na fase orgânica e na fase aquosa da extração, em comparação com uma solução padrão de CuChI.

Pico	Amostra	TR (min)	Área	% de recuperação
CuCe6	CuChI	18,7	1.044.755	100
	Fase orgânica	18,2	129.979	12,4
	Fase aquosa	18,2	318.148	30,5
CuCp6	CuChI	19,6	2.669.574	100
	Fase orgânica	19,1	162.328	6,1
	Fase aquosa	19,0	362.768	13,6
CuCe4	CuChI	24,1	5.129.951	100
	Fase orgânica	23,7	118.650	2,3
	Fase aquosa	23,6	673.543	13,1

Considerando ambas as fases (orgânica e aquosa), a recuperação do pigmento foi de aproximadamente 50% da CuCe6, 19% da CuCp6 e 15% da isoCuCe4 em comparação com a solução de CuChI.

5. DISCUSSÃO

5.1 Sobre a composição química

O método de separação da CuCe6 por HPLC-MS/MS foi o descrito por Mortensen e Geppel (2007), que utiliza uma coluna C₃₀. Essa metodologia mostrou-se eficiente em separar e identificar em aproximadamente 18 minutos a CuCe6 com relação m/z 656,2.

Porém, quando foi necessária a construção da curva de calibração do padrão da CuCe6 por HPLC, verificou-se que o componente apresentava diversas impurezas e que ao longo da corrida cromatográfica de 86 minutos os componentes reduziam consideravelmente, impedindo a sua quantificação (**FIGURA 7**). Estes resultados corroboram com o estudo de Isakau e colaboradores (2007), que identificaram as impurezas de uma amostra de Ce6 e os seus produtos de degradação ao longo do tempo. O estudo ainda descreve que a presença da Ce4 ocorre a partir da descarboxilação da Ce6.

Este fato explica a presença da CuCe4 na amostra do padrão de CuCe6 a qual foi utilizada neste trabalho (**TABELA 2**), e corrobora com a alegação da empresa fornecedora dos padrões de clorina (*Frontier Scientific*), que descontinuou a produção do padrão de CuCe6 e alegou impossibilidade na produção da CuCe4, devido à presença de impurezas e instabilidade desses compostos.

Em decorrência dos fatos, não foi possível saber a real concentração da CuCe6 na amostra de CuChI (Sigma e Chr. Hansen).

5.2 Sobre as propriedades físico-químicas e a interação com a BSA

A degradação da CuCe6 foi avaliada pela cinética aplicada à velocidade de degradação e a E_a (energia de ativação). Os resultados demonstraram que são necessários 9,317 kcal/mol para que ocorra a decomposição CuCe6. Esse valor é menor que o da CuChI (16,1 kcal/mol) (**CAPÍTULO I, FIGURA 12**) e da CuCe4 (16,0 kcal/mol), descrito no trabalho de Ferruzzi e Schwartz (2005). Portanto, a CuCe6 é mais instável do que a CuCe4, como também do conjunto de clorinas que compõem a CuChI comercial.

Outro fator determinante para se avaliar a estabilidade da CuCe6 é a meia-vida do composto, cujos resultados demonstram que a 35°C a meia-vida é de aproximadamente três horas, a 55 °C é reduzida para apenas uma hora e a 65 °C é menos de 40 minutos.

Tanto os resultados da E_a quanto da meia-vida explicam a dificuldade na construção de uma curva de calibração utilizando o padrão da CuCe6 neste estudo, devido a degradação do corante ao longo do tempo.

Vale ressaltar que a ação de uma substância com propriedade terapêutica vai além da meia-vida, sua ação também é dependente de suas interações com sistemas biológicos e de fatores relacionados com sua estrutura química e, conseqüentemente, de suas propriedades físico-químicas. Dentre as

propriedades mais importantes para o estabelecimento da atividade biológica, estão a ionização e hidrofobicidade da substância (TAVARES, 2004).

O conhecimento sobre o pH da solução pode ser discutido em termos do equilíbrio que se estabelece na molécula de CuCe6 em solução aquosa. Considerando que a molécula de CuCe6 é tricarboxilada e apresenta-se na forma sódica, os ânions carboxilato (grupos carboxila desprotonados), fazem com que a molécula se comporte como uma base fraca.

As curvas de titulação (**FIGURA 10**) apresentam os valores de pH nos pontos de maior inflexão (ponto C e E) na curva, obtidos a partir de gráficos de derivada primeira e derivada segunda no programa OriginPro 8.5. No ponto A no início da titulação considerou-se que a maior parte das moléculas de CuCe6 está desprotonada em solução. Com a adição de ácido inicia-se a protonação e quando $\text{pH} = \text{pK}$ (ponto B) obtém-se o valor de $\text{pK}_{a2} = \sim 10,6$ (região tamponante). Prosseguindo com a titulação há um ponto de inflexão na curva (ponto C), $\text{pH} \sim 8,3$, que corresponde à forma intermediária HCHL^- . Nesta região há uma grande variação de pH, portanto com o menor poder tamponante. A titulação prossegue até uma região em que as variações de pH são novamente pequenas, indicando uma nova região tamponante (ponto D) onde são encontradas concentrações iguais das formas HCHL^- e H_2CHL , uma parcialmente protonada e outra totalmente protonada, com $\text{pK}_{a1} = \sim 6,4$. O ponto E é o segundo ponto de inflexão, com $\text{pH} = \sim 4,8$, onde predomina a forma ácida H_2CHL e o pH está relacionado à sua reação de dissociação.

Observa-se que os dois valores de pK_a s e os dois pontos de inflexão foram próximos, tanto para as CuChI (**CAPÍTULO I, FIGURA 14**) quanto para a

CuCe6 (**FIGURA 10**). Entretanto, a associação entre os resultados e a presença majoritária de CuCe6 não deve ser feita, pelo fato de que a molécula de CuChI ainda possui um terceiro grupo carboxila, além dos átomos de nitrogênio e do anel tetrapirrólico, que podem ser protonados. A falta do terceiro ou quarto pK_a nos experimentos de titulação pode ser decorrente da protonação do nitrogênio em meio muito ácido (com a liberação do Cu²⁺ complexado), ou então, se dois grupos carboxila tornarem-se protonados em pK_as.

Esses resultados são importantes para a compreensão da lipofilicidade da substância. Assim como alguns fármacos que são ácidos ou bases fracas que, quando em solução apresentam equilíbrio entre suas formas neutra e ionizada.

A forma neutra, geralmente, é mais lipossolúvel e difunde-se por meio das membranas biológicas por processo passivo, que depende principalmente da concentração e do coeficiente de partição da molécula. A forma ionizada é absorvida pelo processo ativo e tem sua distribuição condicionada ao seu pK_a e ao pH do meio (TAVARES, 2004). Além disso, a lipofilicidade dos fármacos está associada aos efeitos tóxicos e terapêuticos e a fenômenos de bioacumulação em tecidos.

Nesse sentido, os modelos mais simplificados do estudo da lipoficidade da CuCe6 em sistemas bifásicos, contendo dois solventes de diferentes polaridades (1-octanol/tampão) serve de partida para a compreensão de sistemas mais complexos, como os lipossomas. Os resultados demonstram que em pHs 3, 4, 5 e 6 a CuCe6 apresenta maior afinidade pela fase orgânica (no caso o 1-octanol) e foi observado que sua hidrofobicidade máxima ocorre em pH

3, $\log P = 1,49 \pm 0,09$. Em contrapartida, nos pHs 7 e 8 a CuCe6 apresentou um caráter hidrofílico.

Os resultados obtidos a partir da lipofilicidade da CuCe6 são semelhantes aos da clorina e₆ não cúprica (Ce6) (ČUNDERLÍKOVÁ et al., 2004). Os autores mostraram que a Ce6 é hidrofóbica em pHs menores que cinco e sua lipofilicidade diminui em pHs 6,7, 7,1 e 7,6. Os autores também destacaram que tais observações são importantes pelo fato de que esta Ce6 é estudada como um fotossensibilizador em terapia fotodinâmica, e a sua biodistribuição seletiva é determinante em tecidos doentes, cujo pH extracelular é menor do que em tecidos sadios.

Para complementar os estudos de partição em sistema 1-octanol/tampão foi realizado o ensaio da incorporação de CuCe6 em lipossomas de lecitina de soja em função do pH. Os resultados obtidos apresentaram similaridade aos valores encontrados no estudo do $\log P$. O maior porcentual de incorporação da CuCe6 em lipossomas ocorreu na faixa de pH 3 – 6, a região de maior hidrofobicidade da molécula (**FIGURA 11**).

Estes resultados demonstraram, também, a alta lipofilicidade da CuCe6 em pH 3, devido aos seus grupos carboxila que estão totalmente protonados, conforme o cálculo dos valores de pK_a (**TABELA 4**). Uma queda de 72% na incorporação foi observada entre os pHs 3 e 8, sendo que neste último pH correspondente a fração das moléculas desprotonadas.

Neste sentido, outros trabalhos da literatura também encontraram o mesmo comportamento para a forma não cúprica da Cp6 e mostram que o aumento do pH do meio causa a desprotonação da molécula, e a diminuição no

pH torna a Cp₆ protonada, aumentando assim, a sua hidrofobicidade (DATTA et al., 2002; DAS et al., 2005).

Dessa forma, conforme foi observado por Margalit e Cohen (1983) a incorporação de moléculas porfirínicas nas células pode ocorrer por difusão passiva através da membrana plasmática. E ainda, mesmo que as moléculas estejam agregadas na fase aquosa, como dímeros, a presença de lipossomas desloca o equilíbrio para a desagregação, ou seja, para a forma monomérica, e conseqüente incorporação. Provavelmente, este fato também é ocasionado ao efetuar-se a adição de uma solução de CuCe₆ aos lipossomas. Portanto, em meio ácido as moléculas de CuCe₆ protonam-se e agregam-se, mas a presença dos lipossomas causa sua desagregação e incorporação.

Com base nos resultados da incorporação da CuCe₆ em membranas, pode-se dizer que a maior absorção desse componente ocorrerá em situações de pH ácido, como aquela verificada no estômago (pH~2). Se esta característica for mantida para os demais componentes cúpricos, a maior absorção da CuChl ingerida com a dieta ocorrerá nas células estomacais. Sua afinidade pelas membranas em pHs ácidos poderia explicar sua biodistribuição no organismo e sua bioatividade. Além disso, experimentos de partição na faixa de pH 7 até 7,8 poderiam ser futuramente realizados a fim de relacionar o comportamento da CuChl no pH fisiológico com a ligação em proteínas e lipoproteínas plasmáticas.

Neste sentido, tornou-se necessário avaliar a interação entre a proteína BSA e o padrão CuCe₆. Este estudo foi realizado por meio de medidas de fluorescência da proteína. Devido à presença de aminoácidos aromáticos, como o triptofano, a própria proteína mostra uma fluorescência intrínseca. Dessa

forma, as moléculas porfirínicas, como as clorinas, podem ligar-se à proteína provocando a supressão gradativa da sua fluorescência até a saturação de todos os sítios de ligação, quando a fluorescência tende a ser praticamente nula (**FIGURA 13**). Verifica-se que a intensidade de fluorescência emitida pela proteína decresce com o aumento da concentração de CuCe6, e tal efeito foi utilizado no cálculo da constante de dissociação (K_D) BSA-CuCe6 e do número de sítios de ligação (**FIGURA 14**).

Os resultados dos experimentos demonstraram os valores de $K_D = 0,38 \pm 0,07 \mu\text{M}$, $K_A = 3,3 \pm 0,28 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e número de sítios de ligação ~ 1 ($N = 0,75 \pm 0,09$), para a ligação BSA e CuCe6. Os valores obtidos estão de acordo com a literatura, em um estudo da ligação entre BSA e Ce6 (não-cúprica) mostrou constante de associação $3,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e 1 sítio de ligação (KOCHUBEEV et al., 1998). Outro estudo estima a constante de associação entre clorina p₆ e BSA em $1,62 \pm 0,27 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, com 1 sítio de ligação (BOSE et al., 2006).

Portanto, os resultados experimentais demonstraram alta afinidade entre a CuCe6 e BSA, com constante de associação da mesma ordem de grandeza dos estudos descritos na literatura para a ligação entre a Ce6 (não-cúprica) e a BSA, e com maior afinidade do que a ligação entre a BSA e a clorina p₆.

Há outros estudos que comprovam que os compostos porfirínicos, como as clorinas, ligam-se com alta afinidade às proteínas. Ouameur e colaboradores (2005) observaram que a ligação de clorofila *a* e clorofilina à albumina do soro humano (HSA) pode provocar até mesmo alterações conformacionais na proteína pela redução da quantidade de alfa hélices e aumento de estruturas beta. Os autores observaram também que, tanto a clorofila quanto a clorofilina

não estão ligadas à proteína por nenhuma interação específica, mas encontram-se associadas ao longo da cadeia da HSA. Ao contrário dos resultados obtidos para a ligação da CuCe6 com BSA, os autores obtiveram por experimentos de espectrofotometria o valor de $7 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para a constante de ligação clorofilina-HSA, portanto menor que aquela verificada para a associação entre clorinas e BSA.

Já o trabalho de Rinco e colaboradores (2009) mostra que a estrutura química da porfirina também é determinante na ligação com a proteína do soro. Os autores observaram que porfirinas com uma região hidrofóbica e outra hidrofílica ligam-se melhor à HSA do que aquelas que possuem duas regiões hidrofílicas. A porção hidrofóbica da porfirina seria necessária para direcionar a ligação porfirina-proteína, enquanto a porção hidrofílica atuaria na solubilidade da porfirina em solução. Foi o que os autores concluíram ao estudar diferentes porfirinas, entre elas a protoporfirina IX, a hematoporfirina IX e a Ce6. Para a associação HSA-clorina e₆ os autores encontraram os valores de $K_D = 0,93 \pm 0,51 \text{ } \mu\text{M}$ por anisotropia fluorescente e $K_D = 2,7 \pm 0,5 \text{ } \mu\text{M}$ por estudos de supressão de fluorescência.

De acordo com Mojzisoava e colaboradores (2007) a afinidade entre Ce6 e HSA também é dependente do pH, observando a diminuição da constante de ligação de $3,2 \pm 0,6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ em pH 8 para $0,8 \pm 0,1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ em pH 6,5, efeito que pode estar relacionado à protonação dos grupos carboxila da clorina diminuindo a formação de pontes iônicas com os resíduos básicos da proteína, desestabilizando a interação. Adicionalmente, os autores verificaram a associação da Ce6 com lipoproteínas de baixa densidade (LDL) também em

função do pH, sendo que a diminuição da afinidade entre HSA-Ce6 é acompanhada do aumento da afinidade Ce6-LDL.

Portanto, a alta afinidade entre a CuCe6 e proteínas do soro, como a BSA, estaria associada à interação inespecífica entre proteína e clorina, a exemplo do que foi observado por Wang e colaboradores (2010): alta afinidade entre a clorofilina magnésica sódica e BSA, cuja interação envolve pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas e complexações.

Existe também a diferença de afinidade entre a BSA e ao metal que a clorofilina está complexada. A constante de afinidade é similar para a ligação entre BSA e Fe-Chl e BSA e Zn-Chl, mas ligeiramente maior para a associação entre BSA e a clorofilina cúprica. Possivelmente, porque ocorre coordenação do Cu²⁺ aos átomos de oxigênio e nitrogênio da molécula de BSA (devido ao chamado efeito Jahn-Teller, o qual descreve a distorção geométrica de moléculas não-lineares diante de um estado fundamental degenerado, bastante comum em complexos hexacoordenados de Cu²⁺) (GAO et al., 2011).

Por esse motivo, a interação entre os componentes da CuChl e a proteína do soro sanguíneo impediu a completa extração do pigmento do material biológico, no momento da tentativa de se extrair o pigmento do soro de animais (**TABELA 5**). Dessa forma, para que futuros experimentos *in vivo* acerca da cinética de absorção e biodisponibilidade da ChlCu seja realizados com base na totalidade dos compostos extraídos, é primordial conhecer os tipos de interação entre as clorinas cúpricas e os componentes do soro sanguíneo para o desenvolvimento de uma metodologia de extração mais eficaz.

Até o momento, os estudos de absorção da CuChI *in vivo* não consideraram a agregação dos principais componentes às proteínas transportadoras, e que este fato levaria a conclusões equivocadas na identificação das clorinas no material biológico. Portanto, conclui-se que os resultados obtidos neste estudo possibilitam o desenvolvimento de novos projetos visando a melhor compreensão das possíveis bioatividades atribuídas à CuChI, bem como o grau de toxicidade deste complexo de clorinas e sua cinética de absorção.

7. CONCLUSÕES

A separação e identificação do padrão de CuCe6 por HPLC/MS-MS mostrou que a substância apresenta impurezas e instabilidade em relação ao tempo e temperatura.

Os resultados da incorporação da CuCe6 em lipossomas demonstram que sua absorção é facilitada em pHs <6, ou seja, a molécula possui maior lipofilicidade em meio ácido por estar totalmente protonada e favorecer sua inserção e incorporação na região hidrofóbica da membrana.

Além disso, a CuCe6 associa-se fortemente à BSA e dessa forma, até que novos protocolos para a dissociação desta ligação sejam desenvolvidos, estudos *in vivo* que administram a CuChl tornam-se inviáveis.

8. REFERÊNCIAS

- BOSE, B.; DUBE, A. Interaction of chlorin p6 with bovine serum albumin and photodynamic oxidation of protein. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 85, n. 1, p. 49–55, 2006.
- ČUNDERLÍKOVÁ, B.; GANGESKAR, L.; MOAN, J. Acid-base properties of chlorin e₆: relation to cellular uptake. **Journl of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 54, n. 1-3, p. 81-90, 1999.
- ČUNDERLÍKOVÁ, B.; KAALHUS, O.; ČUNDERLÍK, R. et al. pH-Dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers. **Photochemistry and photobiology**, v. 79, n. 3, p. 242–247, 2004.
- DAS, K.; DUBE, A.; GUPTA, P. K. A spectroscopic study of photobleaching of Chlorin p6 in different environments. **Dyes and Pigments**, v. 64, n. 3, p. 201-205, 2005.
- DATTA, A.; DUBE, A.; JAIN, B.; TIWARI, A.; GUPTA, P. K. The Effect of pH and Surfactant on the Aggregation Behavior of Chlorin p6: A Fluorescence Spectroscopic Study¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 5, p. 488-494, 2002.
- EGNER, P. A.; STANSBURY, K. H.; SNYDER, E. P.; ROGERS, M. E.; HINTZ, P. A.; KENSLER, T. W. Identification and characterization of chlorin e₄ ethyl ester in sera of individuals participating in the chlorophyllin chemoprevention trial. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, n. 9, p. 900-906, 2000.
- FALK, J. E. Chromatography of porphyrins and metalloporphyrins. **Journal of Chromatography A**, v. 5, n. 0, p. 277-299, 1961.
- FERRUZZI, M. G.; FAILLA, M. L.; SCHWARTZ, S. J. Sodium Copper Chlorophyllin: In Vitro Digestive Stability and Accumulation by Caco-2 Human Intestinal Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 7, p. 2173-2179, 2002.
- FERRUZZI, M. G.; SCHWARTZ, S. J. Thermal Degradation of Commercial Grade Sodium Copper Chlorophyllin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 18, p. 7098-7102, 2005.

- FERRUZZI, M. G.; BLAKESLEE, J. Digestion, absorption, and cancer preventative activity of dietary chlorophyll derivatives. **Nutrition Research**, v. 27, n. 1, p. 1-12, 2007.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **PRINCÍPIOS QUÍMICOS EM FARMÁCIA**. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. 690p.
- GAO, J.; WANG, Z.; WANG, J. et al. Spectroscopic studies on interaction and sonodynamic damage of metallochlorophyllin (Chl-M (M= Fe, Zn and Cu)) to protein under ultrasonic irradiation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 79, n. 5, p. 849–857, 2011.
- GEROLA, A. P. **Estudos físico-químicos de derivados de clorofila em sistemas homogêneos e micro-heterogêneos: aspectos fotofísicos, fotodinâmicos e fotoativantes sobre micro-organismos.**, 2010. Dissertação, Universidade Estadual de Maringá.
- GOMES, B. B.; BARROS, S. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; SILVA, V. V.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Bioavailability of dietary sodium copper chlorophyllin and its effect on antioxidant defence parameters of Wistar rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2003-2010, 2009.
- HARRISON, J. W. E.; LEVIN, S. E.; TRABIN, B. The safety and fate of potassium sodium copper chlorophyllin and other copper compounds. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 43, p. 722-737, 1954.
- HENDERSON, H. J.; LONG, E.R. Accumulation of chlorophyll pigments in visceral organs and their elimination. **Proc. Soc. Exp. Biol.** v.48, p. 438-9, 1941.
- ISAKAU, H.; TRUKHACHEVA, T.; PETROV, P. Isolation and identification of impurities in chlorin e₆. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 45, n. 1, p. 20–29, 2007.
- JUZENIENE, A. Chlorin e₆-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 6, p. 94-96, 2009.
- KOCHUBEEV, G. A.; FROLOV, A. A.; ZEN'KEVICH, E. I.; GURINOVICH, G. P. [Characteristics of complex-formation of chlorine e₆ with human and bovine serum albumins]. **Molekuliarnaia Biologiia**, v. 22, n. 4, p. 968-975, 1988.

MARGALIT, R.; COHEN, S. Studies of hematoporphyrin and hematoporphyrin derivative equilibria in heterogeneous systems. Porphyrin-liposome binding and porphyrin aqueous dimerization. **Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes**, v. 736, p.163-170, 1983.

MOJZISOVA, H.; BONNEAU, S.; VEVER-BIZET, C.; BRAULT, D. The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e₆ among plasma proteins and membranes: a physico-chemical approach. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1768, n. 2, p. 366–374, 2007.

MORTENSEN, A.; GEPPEL, A. HPLC–MS analysis of the green food colorant sodium copper chlorophyllin. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 3, p. 419-425, 2007.

Origin 8.5.0 SR1. OringLab Corporation. Versão 8.5 for Windows. Northampton, 2010. CD-ROM.

OUAMEUR, A. A.; MARTY, R.; TAJMIR-RIABI, H. A. Human serum albumin complexes with chlorophyll and chlorophyllin. **Biopolymers**, v. 77, n. 3, p. 129-136, 2005.

POOLE, S. K.; POOLE, C. F. Separation methods for estimating octanol-water partition coefficients. **Journal of Chromatography B**, v. 797, n. 1-2, p. 3–19, 2003.

RINCO, O.; BRENTON, J.; DOUGLAS, A. et al. The effect of porphyrin structure on binding to human serum albumin by fluorescence spectroscopy. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 208, n. 2-3, p. 91-96, 2009.

TAVARES, L. C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 631–639, 2004.

TUMOLO, T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties? **Food Research International**, v. 46 (2), p. 451-459, 2012.

UCHOA-FERNANDES, A. **Síntese, caracterização e fotoatividade de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e de clorofilina**, 2007. São Paulo, SP, Brasil: Universidade de São Paulo.

WANG, J.; LIU, L.; LIU, B. et al. Spectroscopic study on interaction of bovine serum albumin with sodium magnesium chlorophyllin and its sonodynamic damage under ultrasonic irradiation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 1, p. 366-374, 2010.

APÊNDICES

1. Identificação da CuChl do soro sanguíneo por espectrofotometria	p. 129
REFERÊNCIAS	p. 136

1. Identificação da CuChI do soro sanguíneo por espectrofotometria

Frente aos resultados obtidos, buscou-se propor um novo procedimento de extração da CuChI do soro sanguíneo. Os teste foram conduzidos, afim de testar algumas condições que pudessem desfazer o complexo proteína-CuChI.

A princípio, foi testada a adição de sulfato de amônio com o intuito de promover a precipitação da proteína do soro sanguíneo, possibilitando a eventual liberação da CuChI do material biológico (**FIGURA 1**).

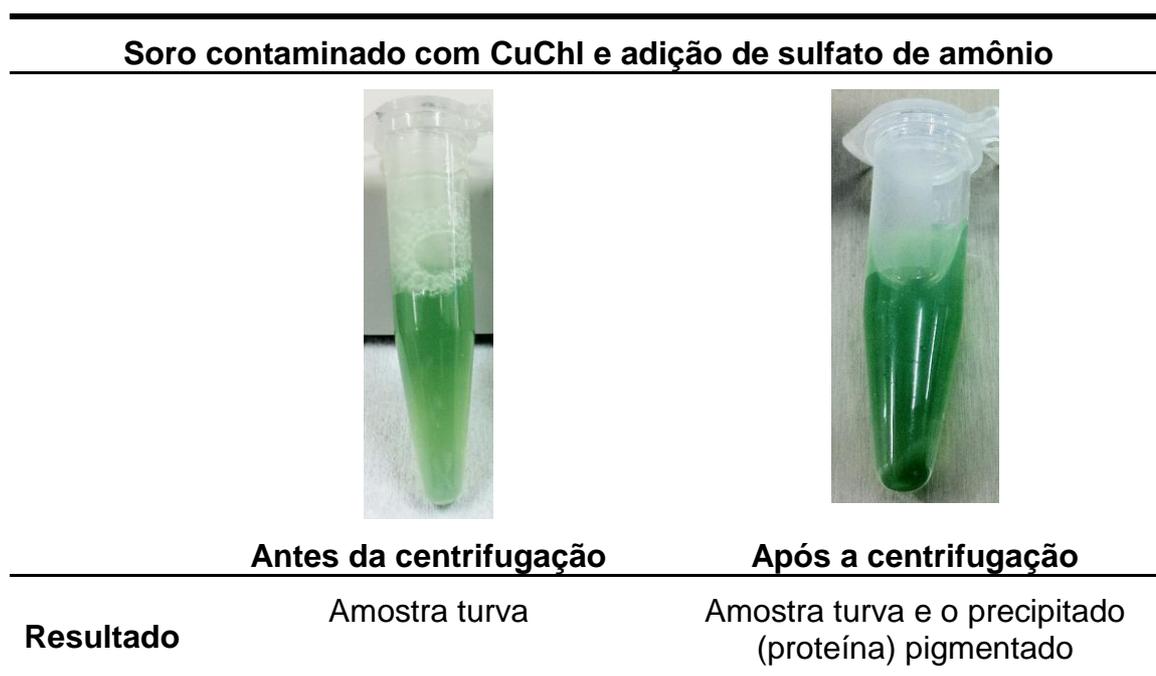
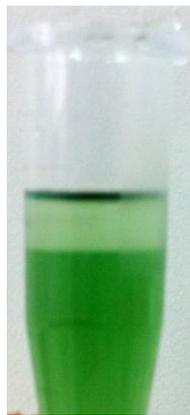


FIGURA 1. Extração da CuChI de amostra de soro na presença de sulfato de amônio.

A adição do sal de sulfato de amônio ao soro contaminado com CuChI resultou na precipitação da proteína, porém não houve total liberação do pigmento uma vez que o precipitado possuía coloração verde intensa.

A seguir, realizou-se um teste de modificação do pH com a adição de NaOH 4M (**FIGURA 2**). Esperava-se que esta alcalinização da amostra promovesse a dissociação de uma parte da CuChI ligada à albumina pelo fato desta proteína (pI 4,5 – 5,0) estar com cargas negativas neste meio, e as moléculas de clorina cúprica da CuChI estarem desprotonadas, portanto negativamente carregadas. Essa modificação nas moléculas conseqüentemente poderiam alterar a interação proteína:CuChI, quebrando suas interações. Uma vez dissociada a CuChI da proteína, esta poderia ser precipitada por adição de solventes, como o hexano e a acetona, cuja finalidade é quebrar as ligações hidrofóbicas de sua molécula. A adição de Triton X-100, um surfactante não-iônico e não-desnaturante, poderia reduzir as possíveis interações hidrofóbicas da proteína com a CuChI, o que favoreceria sua extração do meio.

Soro contaminado com ChI-Cu e adição de NaOH



Adição de Hexano e
Centrifugação



Adição de Acetona e
centrifugação



Adição de Triton
X-100
e
centrifugação

Resultado	Duas fases pigmentadas	Formou película pigmentada	Turvou; solução com aspecto de gel
------------------	------------------------	----------------------------	------------------------------------

FIGURA 2. Teste de extração de amostra de soro contaminado com ChI-Cu e adição de NaOH, e adições subsequentes de solventes orgânicos e surfactante.

De acordo com os resultados da **FIGURA 2**, nenhum desses tratamentos promoveu a completa dissociação da CuChI da proteína, tampouco favoreceu sua extração. Como observado, a adição de hexano formou uma solução bifásica esverdeada, enquanto a adição de acetona provocou a formação de uma película juntamente com uma solução de coloração verde. A adição de surfactante aumentou a turbidez do soro sanguíneo contaminado com CuChI.

Após estes resultados insatisfatórios, foi realizada a modificação do pH da amostra com a adição de NaOH seguido da adição do surfactante catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), e também pela adição de HCl com posterior adição desse surfactante. Novamente, esperava-se que a variação do pH alterasse as interações entre a proteína e a CuChI e a adição de um surfactante iônico auxiliasse nessa dissociação, além de desagregar as moléculas de CuChI. Os resultados obtidos são mostrados na **FIGURA 3**.

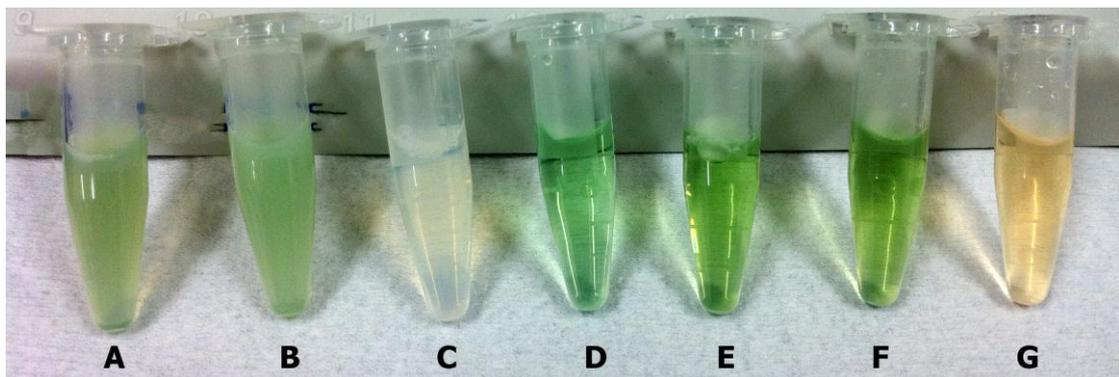


Figura 3. Soro contaminado com ChI-Cu e adição de HCl e CTAB 1mM e 0,1mM (**A** e **B**, respectivamente) e seu branco (soro com HCl e CTAB) (**C**); ChI-Cu em água (**D**); soro contaminado com ChI-Cu e adição de NaOH e CTAB 1 mM e 0,1mM (**E** e **F**, respectivamente) e seu branco (soro com NaOH e CTAB) (**G**).

A adição de HCl e CTAB turvou as soluções (**FIGURA 3A e B**) e a precipitação da proteína ainda ligada ao corante (CuChI) após a centrifugação, portanto sem dissociá-la. Já a adição de NaOH e CTAB aumentou a solubilidade das amostras (**FIGURA 3E e F**), provavelmente por alterar as interações entre a CuChI desprotonada e a proteína com carga líquida negativa, além de favorecer a quebra de possíveis interações hidrofóbicas entre ambas pela adição de CTAB. Sendo este surfactante catiônico, sua presença poderia auxiliar na desagregação das moléculas de CuChI. A concentração micelar crítica (c.m.c.) do CTAB é aproximadamente 0,94mM, portanto em uma solução na qual existam espécies de clorinas desprotonadas, ou seja negativamente carregadas, a presença de monômeros do surfactante catiônico (concentração 0,1mM) pode favorecer a interação clorina-surfactante estabilizada por interações eletrostáticas. Na presença de concentrações do surfactante superior à c.m.c. (por exemplo, 1mM), a formação desses complexos é principalmente favorecida por interações hidrofóbicas (MISHRA et al., 2005). Porém, com nenhum destes tratamentos houve a completa dissociação da CuChI ligada à proteína, nem a precipitação desta. Com isso, foi possível apenas a identificação qualitativa da presença da CuChI nas amostras, por espectrofotometria.

A **FIGURA 4** mostra os espectros de absorção obtidos na leitura das amostras de CuChI em água (**FIGURA 3D**), soro com NaOH e CTAB 1mM (**FIGURA 3E**) e soro com NaOH e CTAB 0,1mM (**FIGURA 3F**), utilizando como branco o soro sanguíneo sem CuChI (**FIGURA 3G**).

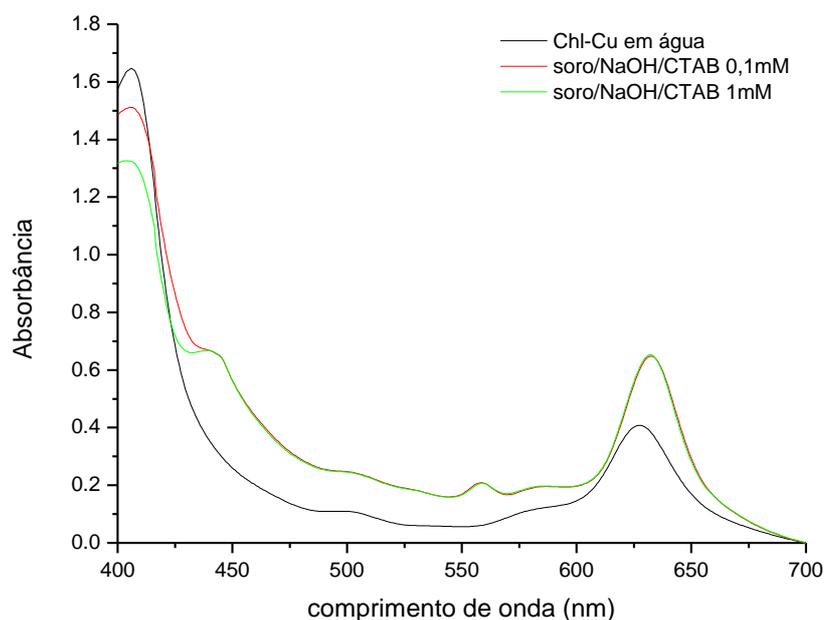


FIGURA 4. Espectros de absorção da CuChl em soro sanguíneo e em água.

De acordo com a **FIGURA 7**, há uma pequena variação na absorção máxima na banda Soret (406 nm) quando comparadas as amostras de CuChl no soro na presença de CTAB e a amostra de Chl-Cu em água. Observa-se também um deslocamento de 4 nm na banda de absorção Q, e maior absorbância das amostras de CuChl no soro do que da CuChl em água, nesta banda. Pode-se comparar os λ_{\max} da CuChl presente na amostra biológica aos λ_{\max} da amostra de CuChl preparada em água na **TABELA 2**.

TABELA 1. Valores de λ_{\max} da CuChl em água e do pigmento em soro sanguíneo.

Amostra	Absorbância (nm)	
	Soret (406nm)	Q (628nm)
Chl-Cu em água	1,647	0,408
Chl-Cu em soro e CTAB 0,1mM	1,511	0,648 (632nm)
Chl-Cu em soro e CTAB 1mM	1,323	0,653 (632nm)

O deslocamento nas bandas de absorção das clorinas pode ser explicado pela interação com o surfactante, que já foi reportada na literatura entre clorina p_6 e CTAB, com deslocamento de 401 nm para 405 nm (banda Soret) e de 655 nm para 665 nm (banda Q) (DATTA et al., 2002). Já o aparecimento de uma banda de absorção em 558 nm, na amostra biológica, pode estar associada à própria interação da CuChl com os componentes do soro, já que a presença de CTAB não ocasiona o aparecimento desta banda.

A adição de NaOH e CTAB não provocou a dissociação da CuChl da proteína e por conseguinte não propiciou a total extração do corante do soro sanguíneo, porém tornou possível a identificação qualitativa da CuChl na amostra biológica, por meio de uma solução límpida e com absorção próxima à da CuChl em água. Como citado anteriormente, a alta afinidade entre os componentes da CuChl e as proteínas do soro parece estar associada à uma interação inespecífica, a exemplo do que foi observado por Wang e colaboradores (2010).

Dessa forma, apesar dos diversos experimentos visando a identificação e a quantificação da CuChl presente em um material biológico, os resultados obtidos até o momento referem-se somente à identificação da CuChl no soro por espectrofotometria.

Há necessidade de maiores conhecimentos sobre os tipos de interações da CuChl com a albumina e mesmo outras proteínas tissulares a nível químico, para que isto propicie o desenvolvimento de procedimentos mais adequados para a extração e quantificação da Chl-Cu em material biológico e a avaliação das suas bioatividades. A continuidade dessa pesquisa pode ser objeto de um

novo projeto com a demanda de pesquisadores com conhecimento químico, físico-químico e bioquímico.

REFERÊNCIAS

- DATTA, A.; DUBE, A.; JAIN, B.; TIWARI, A.; GUPTA, P. K. The Effect of pH and Surfactant on the Aggregation Behavior of Chlorin p6: A Fluorescence Spectroscopic Study¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 75, n. 5, p. 488-494, 2002.
- MISHRA, P. P. BHATNAGAR, J.; DATTA, A. The interplay of hydrophobic and eletrostatic effects in the surfactante-indecided aggregation/deaggregation of chlorin p6. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, p. 24225-24230, 2005.
- WANG, J.; LIU, L.; LIU, B. et al. Spectroscopic study on interaction of bovine serum albumin with sodium magnesium chlorophyllin and its sonodynamic damage under ultrasonic irradiation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 75, n. 1, p. 366-374, 2010.

ANEXOS OBRIGATÓRIOS

A. Aprovação da comissão de ética em experimentação animal	p. 138
B. Informações para os membros de bancas julgadoras de Mestrado e Doutorado	p. 139
C. Ficha do aluno	p. 140
D. Currículo Lattes	p. 142

A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Assistência Técnica Acadêmica



Ofício CEEA/FCF nº 04 /2009

São Paulo, 19 de fevereiro de 2009.

Ilmo(a) Sr(a).
Luciana Tedesco Yoshime
Orientador(a): Profa. Dra. Úrsula M. Lanfer Marquez
FBA

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da FCF/USP, em reunião realizada em 16 de fevereiro de 2009, **APROVOU** o projeto "Caracterização da clorofilina cúprica de sódio e avaliação de sua absorção, estabilidade e distribuição em estudos com rato" (Protocolo CEEA nº 206), apresentado por Vossa Senhoria.

A CEEA sugere a redução, se possível, do período de jejum para 8 horas.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Lígia Ferreira Gomes
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal
CEEA/FCF/USP

B

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO****Faculdade de Ciências Farmacêuticas**
Secretaria de Pós-Graduação**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.
 - 2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
 - 4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

Ficha do Aluno

14/02/13 01:29

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9132 - 5255790/1 - Luciana Tedesco Yoshime

Email: yoshime@usp.br
Data de Nascimento: 17/08/1978
Cédula de Identidade: RG - 27.423.195-5 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Nutricionista - Universidade Católica de Santos - São Paulo - Brasil - 2002
Mestrado: Mestre em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2007

Curso: Doutorado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Nutrição Experimental
Data de Matrícula: 15/10/2008
Início da Contagem de Prazo: 15/10/2008
Data Limite: 14/02/2013
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ursula Maria Lanfer Marquez - 15/10/2008 até o presente. E.Mail: lanferum@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 15/10/2012
Prorrogação: 120 dias
Período de 15/10/2012 a 12/02/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 10/04/2012
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Doutorado em 15/10/2008
Prorrogação em 05/10/2012
Matrícula de Acompanhamento em 12/02/2013

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 12/02/2013

Impresso em: 14/02/13 01:29:14

9132 - 5255790/1 - Luciana Tedesco Yoshime

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5874-5/1	Química e Análise dos Alimentos Lipídicos	28/10/2008	08/12/2008	60	4	90	A	N	Concluída
FBA5728-2/9	Aprimoramento Didático	02/04/2009	29/04/2009	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
NHA5705-2/2	Fundamentos da Biologia Molecular Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	05/05/2009	08/06/2009	60	4	100	A	N	Concluída
BMB5816-1/4	Princípios Gerais de Experimentação Animal no Departamento de Fisiologia e Biofísica (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/08/2009	18/08/2009	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5896-6/1	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição II	02/09/2009	10/11/2009	30	2	87	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBA0413 Alimentos e Nutrição I, ministrada aos alunos de graduação do curso em Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Universidade de São Paulo) (1)	01/02/2010	30/06/2010	-	3	0	-	-	-
HEP5800-1/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2010	11/05/2010	90	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBA5728-2/11	Aprimoramento Didático	20/04/2010	17/05/2010	60	4	87	A	N	Concluída
HEP5762-4/5	Estatística não Paramétrica (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	18/05/2010	01/07/2010	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
HNT5739-1/4	Experimento com Alimentos (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	14/03/2011	23/05/2011	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5814-5/1	Toxicologia Aplicada aos Alimentos	25/04/2011	18/05/2011	75	0	0	-	N	Turma cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	20	20	20
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	20	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 26/11/2010.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 12/02/2013

Impresso em: 14/02/13 01:31:21



Luciana Tedesco Yoshime

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3480818012223101>

Última atualização do currículo em 18/03/2012

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em Nutrição pela Universidade Católica de Santos (2001), especialização em Saúde, Nutrição e Alimentação Infantil (2003) e mestrado em Ciências dos Alimentos pela Universidade de São Paulo (2007). Tem experiência na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos, com ênfase em Ciência de Alimentos (Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Luciana Tedesco Yoshime
Nascimento 17/08/1978 - São Paulo/SP - Brasil
CPF 159.058.118-06

Formação acadêmica/titulação

- 2008** Doutorado em Ciências dos Alimentos.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Caracterização da clorofila cúprica de sódio e avaliação de sua estabilidade, absorção e distribuição em estudos com ratos
 Orientador: Ursula Maria Lanfer Marquez 
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2005 - 2007** Mestrado em Ciências dos Alimentos.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Caracterização Nutricional do Mangarito (Xanthosoma mafaffa Schott), Ano de obtenção: 2007
 Orientador: Marilene De Vuono Camargo Penteadó 
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2002 - 2003** Especialização em Saúde, Nutrição e Alimentação Infantil.
 Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP, São Paulo, Brasil
 Título: Indicadores de contaminação microbiológica em mamadeiras de chás, preparadas no domicílio e destinadas a crianças atendidas em unidade básica de saúde.
 Orientador: Tania Benigna de Moraes
 Bolsista do(a): Fundação do Desenvolvimento Administrativo
- 1998 - 2001** Graduação em Nutrição.
 Universidade Católica de Santos, UNISANTOS, Santos, Brasil
 Título: Estado Nutricional e Condições Sócio Econômicas Ambientais de Crianças de uma Escola Municipal de Santos
 Orientador: Renata Doratioto Albano

Formação complementar

- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Linguagem universal para inferências científicas.
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF/USP, Brasil
- 2010 - 2010** Curso de curta duração em Bioestatística na era da Bioinformática.
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF/USP, Brasil
- 2006 - 2006** Extensão universitária em Atualização em Rotulagem de Alimentos.
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF/USP, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Operação no Sistema de Cromatografia Líquida.
 Scientific Instruments Co do Brasil, SINC, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2008 - Atual** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Aluno de Pós-graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicado exclusiva
- 2005 - 2007** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Aluno de Pós-graduação , Carga horária: 40, Regime: Dedicado exclusiva

Atividades

- 02/2010 - 06/2010** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

- Estágio:*
Monitora da disciplina Alimentos e Nutrição I junto ao Programa de Auxílio ao Ensino (PAE)
- 02/ 2006 - 06/ 2006** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
- Estágio:*
Monitora da disciplina Fiscalização de Alimentos junto ao Programa de Auxílio ao Ensino (PAE)
- 07/ 2005 - 11/ 2005** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
- Estágio:*
Monitora da disciplina Química e Bioquímica de Alimentos junto ao Programa de Auxílio ao Ensino (PAE)

2. Universidade Católica de Santos - UNI SANTOS

Vínculo institucional

1998 - 2001 Vínculo: Estudante, Enquadramento funcional: Aluno de graduação, Carga horária: 25, Regime: Parcial

Atividades

2000 - 2000 Estágio, Curso de Nutrição

Estágio:
Monitora da disciplina de Bromatologia e Composição dos Alimentos

Projetos

Projetos de pesquisa

2009 - 2011 Caracterização da clorofila cúprica e avaliação de sua absorção, estabilidade e distribuição em estudos com ratos

Descrição: A clorofila cúprica de sódio (Chl-Cu) é um corante alimentar mais estável e mais barato do que a clorofila natural. Quimicamente é constituído de diversas clorinas, em especial a Cu(II)clorina e4 e Cu(II)clorina e6. Além de corante vem sendo empregado na medicina popular como cicatrizante, desodorizante para pacientes ostomizados, entre outros. Porém, nos últimos 15 anos as pesquisas com este pigmento estão focalizando efeitos biológicos, tais como atividade anti-mutagênica, anti-carcinogênica, antioxidante e radioprotetora. Todavia, até o momento, a maioria destes estudos foi realizada in vitro ou em tecidos isolados e são raros os trabalhos in vivo, de modo que informações sobre a sua biodisponibilidade e ações sistêmicas são praticamente inexistentes. Apenas recentemente foi confirmado que a Cu(II)clorina e4 pode ser absorvida por humanos, tendo sido identificada no plasma, fígado e rins de ratos, após ensaio de intervenção dietética, mas ainda não existem informações sobre a farmacocinética da sua absorção. A Cu(II)clorina e6, não é absorvida o que faz supor que este componente seja menos estável durante a passagem pelo trato gastrointestinal, ou que seja absorvido pelos enterócitos e em seguida degradado, sem atingir a corrente sanguínea. Devido à promessa de benefícios para a saúde divulgadas pelas mídias de comunicação existe uma tendência de ingestão crescente pela população, superior à ingestão a partir do seu uso como corante alimentar, acreditamos ser de interesse estudar em modelo com ratos a absorção, distribuição e metabolização destes componentes da Chl-Cu. Assim, este projeto tem por objetivo e desafio obter informações sobre a cinética de absorção e distribuição das principais clorinas isoladas que compõe a clorofila cúprica, em estudo com ratos Wistar. Será dada ênfase à velocidade e taxa de absorção da Cu(II)clorina e4, bem como ao destino da Cu(II)clorina e6 que aparentemente não é absorvida pelo organismo animal.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (1);

Integrantes: Luciana Tedesco Yoshime; Ursula Maria Lanfer Marquez (Responsável); Tathiana Cristina

Tumolo Ribeiro; Rosa Maria Cerdeira Barros; Maurício da Silva Baptista

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- PADILHA, G. F. S., YOSHIME, L. T., TUMOLO-RIBEIRO, T. C., LANFER-MARQUEZ, U. M. Identificação dos componentes da clorofila cúprica de sódio comercial por HPLC e avaliação de sua lipofilicidade em função do pH In: 19o Simpósio Internacional de Iniciação Científica (SIICUSP), 2011, Ribeirão Preto. **19o Simpósio Internacional de Iniciação Científica (SIICUSP)**, 2011.
- PADILHA, G. F. S., YOSHIME, L. T., TUMOLO-RIBEIRO, T. C., LANFER-MARQUEZ, U. M. Incorporation of sodium copper chlorophyllin in liposomes and the partition coefficient of its main constituent in function of pH In: XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2011, São Paulo. **XVI Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo (Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences)**, 2011. v.47. p.41 - 41
- YOSHIME, L. T., TUMOLO-RIBEIRO, T. C., BARROS, R. M. C., LANFER-MARQUEZ, U. M. Chemical characterization of sodium copper chlorophyllin In: XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2010, São Paulo. **XV Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo**, 2010. v.46. p.38 - 38
- TUMOLO-RIBEIRO, T. C., YOSHIME, L. T., LANFER-MARQUEZ, U. M. Clorofila cúprica: um corante alimentar com propriedades bioativas? In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Salvador. **XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2010. p.400 - 400
- TUMOLO-RIBEIRO, T. C., YOSHIME, L. T., JUNQUEIRA, H. C., BAPTISTA, M. S., LANFER-MARQUEZ, U. M. Protective role of sodium copper chlorophyllin against photodamage on cell membranes using liposomes as a mimetic model In: XLV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2010, São Paulo. **XV Science and Pharmaceutical Technology Meeting of the Pharmaceutical Sciences Faculty of the University of São Paulo**, 2010. v.46. p.40 - 40
- YOSHIME, L. T., CARVALHO, O. T., PENTEADO, M. V. C.

Análise da Composição Centesimal do Mangarito (*Xanthosoma mafaffa* Schott) In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.
Anais., 2006.

7. YOSHIME, L. T., CARVALHO, O. T., PENTEADO, M. V. C.
Análise da Composição Centesimal do Mangarito (*Xanthosoma mafaffa* Scott) In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2006, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas., 2006. v.42. p.13 - 13
8. BORRMANN, D., YOSHIME, L. T., CARVALHO, O. T., BEHRNES, L. H.
Avaliação Sensorial de Bebidas à Base de Extrato Hidrossolúvel de Soja In: XI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2006, São Paulo.
Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas., 2006. v.42. p.6 - 6
9. BORRMANN, D., YOSHIME, L. T., CARVALHO, O. T., BEHRNES, L. H.
Avaliação Sensorial de Bebidas à Base de Extrato Hidrossolúvel de Soja In: XX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006, Curitiba.
Anais., 2006.
10. CARVALHO, O. T., YOSHIME, L. T., PENTEADO, M. V. C.
Carotenoids and centesimal composition of canned peas (*Pisum sativum* L.) In: VI Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (VI BMCFB), 2006, São José do Rio Preto.
Anais., 2006.
11. CARVALHO, O. T., YOSHIME, L. T., PENTEADO, M. V. C.
Carotenóides de Composição Centesimal de Ervilhas Tortas (*Pisum Sativum* L.) comercializadas pela CEAGESP In: Simpósio Latino-americano de Ciência de Alimentos, 2005, Campinas.
Livro de Resumos., 2005.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. LANFER-MARQUEZ, U. M., TUMOLO-RIBEIRO, T. C., YOSHIME, L. T., JUNQUEIRA, H. C., BARROS, R. M. C., BAPTISTA, M. S.
Chemical characterization of sodium copper chlorophyllin and its protective role against oxidative damage of membranes using liposomes as a mimetic model In: 6th International Congress on Pigments in Food, 2010, Budapeste.
Pigments In Food: Chemical, Biological and Technological Aspects., 2010. p.107 - 109

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 10/10/2012 às 08:43:12.