



Universidade de Aveiro Departamento de Química  
Ano 2013

**Nuno Filipe Cravo dos  
Santos**

**ESTUDO DA FOTO-OXIDAÇÃO DE  
FOSFATIDILETANOLAMINAS**



**Nuno Filipe Cravo dos  
Santos**

## **ESTUDO DA FOTO-OXIDAÇÃO DE FOSFATIDILETANOLAMINAS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Este trabalho foi financiado pela FCT, União Europeia, QREN, FEDER e COMPETE (PEst-C/QUI/UI0062/2013)



Dedico este trabalho aos meus pais e irmã pelo incansável apoio.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**

professora auxiliar convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Manuel Silva Oliveira**

professora auxiliar da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

**Prof. Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues**

professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida**

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Gostaria de agradecer em primeiro lugar às minhas orientadoras Professora Rosário Domingues e Professora Adelaide Almeida pelos seus ensinamentos, orientação, disponibilidade, incansável ajuda, motivação, confiança depositada, apoio ao longo da realização deste trabalho e acima de tudo por terem acreditado em mim e nas minhas capacidades.

Às minhas colegas de mestrado e aos colegas de laboratório pelo incentivo, permanente disponibilidade, ajuda constante no laboratório e, sobretudo, por todos os momentos de convívio e descontração.

Às meninas de doutoramento, em especial à Tânia e à Eliana pela orientação e ajuda, assim como a todo o grupo de espetrometria de massa que me recebeu da melhor forma.

A todos os amigos, à Cristiana e à minha família por me terem apoiado, ajudado, aguentado e por terem acreditado em mim

Agradeço também o apoio financeiro da FCT (PEst-C/QUI/UI0062/2013)

## palavras-chave

Fosfatidiletanolamina, foto-oxidação, terapia fotodinâmica, *Escherichia coli*, porfirina tricatiônica, eletrospray, espectrometria de massa tandem.

## resumo

A foto-oxidação é um dos processos utilizados em diversas áreas com destaque para a terapia fotodinâmica. Além de ser aplicada no tratamento de alguns tipos de cancro, a terapia fotodinâmica pode ainda ser utilizada na inativação de bactérias com a vantagem de não criação de resistência por parte das mesmas, ao contrário do tratamento com antibióticos. Os estudos realizados até ao momento têm tido como objetivos principais encontrar um fotossensibilizador eficaz ou verificar se as bactérias adquirem resistência a esta terapia. No entanto, pouco se sabe ainda sobre o efeito a nível molecular provocado pela foto-inativação de bactérias, ou seja, qual o efeito nos lípidos, proteínas e DNA bacteriano. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da fotossensibilização em fosfolípidos bacterianos. Para tal, foram realizados estudos de foto-inativação de *Escherichia coli* e avaliado o seu impacto nos fosfolípidos desta bactéria Gram negativa. Por outro lado, realizaram-se testes de fotossensibilização com padrões de fosfatidiletanolamina (PE), uma vez que esta é a classe de fosfolípidos mais abundante nas membranas da *E. coli*. Os padrões utilizados foram o 2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) e 2-linoleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (PLPE), de modo a compreender o tipo de oxidação que a fotossensibilização provoca. Nos testes com os padrões foram utilizadas como fotossensibilizadores uma porfirina tri-catiônica 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl) porphyrin tri-iodide (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) e uma porfirina tetra catiônica 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrine tetra-iodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me). No entanto, nos testes com a estirpe bacteriana só se utilizou a porfirina tricatiônica Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, uma vez que esta mostrou ser mais eficaz que a porfirina tetracatiônica Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. A espectrometria de massa de ionização de eletrospray (ESI-MS) e espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS) permitiram identificar os derivados hidroperóxidos como o principal produto de oxidação formado. A análise por ESI-MS e ESI-MS/MS das fosfatidiletanolaminas da *E. coli* permitiu identificar dois hidroperóxidos ( $m/z$  746.5 e 774.4) como principais produtos de oxidação. A quantidade relativa dos ácidos gordos insaturados decresceu em comparação com as células de *E. coli* irradiadas sem fotossensibilizador, o que indica que houve oxidação lipídica. Este trabalho mostra que os fosfolípidos da membrana da *E. coli* são um dos alvos da foto-oxidação induzida pela porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF. A diminuição da quantidade relativa dos ácidos gordos insaturados e a peroxidação dos fosfolípidos podem estar na origem dos danos causados nas membranas bacterianas pela terapia fotodinâmica.

**keywords**

Phosphatidylethanolamine, photo-oxidation, photodynamic therapy, *Escherichia coli*, tricationic porphyrin, electrospray, tandem mass spectrometry

**abstract**

Photo-oxidation is one of the procedures used to promote oxidation, which is used in photodynamic therapy. In addition to being applied in the treatment of some types of cancer, photodynamic therapy may also be used in bacterial inactivation, given that this therapy does not allow bacteria to develop resistance, unlike the treatment with antibiotics. The studies conducted so far aimed to find an effective photosensitizer or determine whether bacteria can create resistance to this type of treatment. However, little is known about the effect at the molecular level, namely, what is the effect on lipids, proteins and bacterial DNA. This study aimed to evaluate the effect of photosensitization in bacterial phospholipids. To fulfill our goals studies were carried out to evaluate the impact of on bacterial phospholipids during photo inactivation of *Escherichia coli*. On the other hand, photosensitization tests were conducted with standards of phosphatidylethanolamine (PE), since this is the most abundant phospholipid in *E. coli* membranes. The standards used were 2-oleoil-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine (POPE) and 2-linoleoil-1-palmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine (PLPE). As photosensitizers, in standard tests, were used a tricationic porphyrin 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl) porphyrin tri-iodide (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) and a tetracationic porphyrin 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrine tetra-iodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me). However the test with the bacteria was carried out with the tricationic porphyrin Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, since it was more effective than the tetracationic porphyrin Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. The electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and the tandem mass spectrometry (ESI-MSMS) have identified the hydroperoxides derived as the main oxidation product. The analysis by ESI-MS and ESI-MSMS of phosphatidylethanolamines (PE) of *E. coli* has identified two oxidation products derived from hydroperoxides ( $m/z$  746.5 and 774.4). The relative amount of unsaturated fatty acids decreased compared to *E. coli* cells irradiated without photosensitizer, which indicates that occurred oxidation. This study shows that the phospholipids of the membrane of *E. coli* are one of the targets of photo-oxidation induced by porphyrin Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF. The decrease in the relative amount of unsaturated fatty acids and peroxidation of phospholipids can be one of the causes of the damage caused to the bacterial membranes by photodynamic therapy.

## Índice

Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	vi
Abreviaturas.....	viii
I. Introdução.....	1
1. Fosfolípidos e a sua estrutura.....	3
1.1. Oxidação de fosfolípidos.....	5
1.1.1. Oxidação de fosfatidiletanolaminas .....	6
2. Terapia fotodinâmica .....	8
2.1. Terapia fotodinâmica bacteriana .....	9
2.1.1. Fotossensibilizadores .....	9
2.1.2. Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica.....	11
2.1.3. Alvos de ação da terapia fotodinâmica .....	12
2.1.4. Foto-inativação de bactérias.....	13
3. Métodos utilizados na análise de fosfolípidos .....	14
3.1. Técnicas cromatográficas.....	15
3.1.1. Cromatografia em camada fina .....	15
3.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance .....	17
3.2. Espectrometria de Massa.....	20
3.2.1. Ionização por Eletrospray (ESI).....	21
3.2.2. Espectrometria de massa tandem (MS/MS) .....	24
4. Objetivo da dissertação .....	26
II. Material e Métodos.....	27
1. Reagentes .....	29
2. Bactéria e as condições de crescimento .....	29



3.	Fotossensibilizador .....	29
4.	Condições de irradiação na foto-oxidação.....	30
5.	Extração lipídica .....	31
6.	Quantificação de fosfolípidos pelo ensaio de fosfato .....	31
7.	Separação das classes de fosfolípidos por cromatografia de camada fina (TLC) .....	32
8.	Quantificação de hidroperóxidos lipídicos pelo ensaio de FOX2 .....	33
9.	Análise por espectrometria de massa (MS) .....	33
10.	Análise de ácidos gordos por Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (GC-FID) .....	34
11.	Análise estatística .....	34
III.	Resultados e Discussão .....	35
1.	Estudo do perfil lipídico da <i>E. coli</i> .....	37
2.	Estudo da foto-oxidação de fosfatidiletanolaminas num sistema modelo.	44
3.	Estudo do efeito da foto-oxidação na <i>E. coli</i> .....	51
IV.	Conclusão.....	57
IV.	Bibliografia .....	61

## Lista de figuras

Figura 1 - Estrutura geral dos glicerofosfolípidos aos quais se encontram ligados os ácidos gordos esterificados nas posições sn-1 (R1) e na posição sn-2 (R2). PA - Ácido fosfatídico, PC - Fosfatidilcolina, PG - Fosfatidilglicerol, PE - Fosfatidiletanolamina, PI - Fosfatidilinositol, PS - Fosfatidilserina. .... 4

Figura 2 - Subclasses dos glicerofosfolípidos consoante o tipo de ligação do ácido gordo na posição *sn-1*. (A) fosfatidil, (B) plasmanil e (C) plasmenil. R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> representam os ácidos gordos esterificados no glicerol e o X representa o grupo polar. .... 4

Figura 3 - Diferentes mecanismos para a oxidação lipídica. Cyt *c*\* - citocromo C, 12/15LOX – família das lipoxigenases, MPO – mielperoxidase, NOS – óxido nítrico sintase, XO – xantine oxidase, NOX – NADPH oxidase, ROS – espécies reativas de oxigénio, RNS – espécies reativas de azoto (adaptado de (12)). .... 6

Figura 4 - Estrutura química básica de fenotiazina (I), porfirinas (II), e ftalocianina (III) e os fotossensibilizadores típicos substituintes periféricos (R) conferindo um carácter catiónico ao fotossensibilizador (adaptado de (64)). .... 10

Figura 5 – Esquema representativo dos mecanismos tipo I e tipo II. Depois da luz excitar o fotossensibilizador no estado fundamental (<sup>1</sup>FS), este passa ao estado excitado singuleto (<sup>1</sup>FS\*), o qual pode regressar ao estado fundamental ou pode passar para o estado excitado tripleto (<sup>3</sup>FS\*). Por sua vez, o <sup>3</sup>FS\* pode regressar ao estado fundamental, ou então reagir com um substrato e/ou oxigénio molecular (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>). Se o <sup>3</sup>FS\* reagir com um substrato pode originar radicais livres que podem reagir com o oxigénio e produzir radicais livres, o qual se denomina por mecanismo tipo I. Se o <sup>3</sup>FS\* reagir com o <sup>3</sup>O<sub>2</sub>, origina o oxigénio singuleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) o qual se denomina por mecanismo tipo II. (adaptado de (56)) .. 12

Figura 6 - Representação esquemática da parede celular e da membrana citoplasmática nas bactérias Gram (-) e nas bactérias Gram (+) (adaptado de (69))..... 14

Figura 7 - Componentes principais de um sistema de HPLC são a bomba, o injetor, a coluna de HPLC e o detetor. Os dados são tratados por computador, o qual se encontra ligado ao sistema HPLC. (Adaptado de [http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/Waters\\_HPLC\\_MS\\_TitlePg.html](http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/Waters_HPLC_MS_TitlePg.html)) ..... 18

Figura 8 - Os componentes principais de um espectrómetro de massa são a fonte de ionização, analisador e detetor. Os sinais emitidos pelo detetor são depois enviados para um computador o qual gera os espectros de massa. (adaptado de (86))..... 20

Figura 9 - Processo de ionização por eletrospray. Formação de uma nuvem composta por gotículas contendo moléculas de solvente e iões do analito resultante da alta voltagem aplicada na extremidade do capilar. O fluxo coaxial de um gás nebulizador provoca a evaporação das moléculas de solvente, favorecendo a formação dos iões na fase gasosa, os quais são analisados no analisador de massa (adaptado de (83))...... 23

Figura 10 - Espectrómetro de massa triplo quadrupolo. Q1 e Q3 estão a operar como analisadores e Q2 como célula de colisões. Durante este processo, o ião precursor é selecionado em Q1 o qual passa para a célula de colisões (Q2). O ião precursor é então fragmentado por dissociação induzida por colisão (CID) e os fragmentos são depois analisados por  $m/z$  em Q3 (adaptado de (10)). ..... 24

Figura 11 - Estrutura da porfirina *5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl) porphyrin tri-iodide* (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) (**A**) e da porfirina *5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrine tetra-iodide* (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) (**B**). ..... 30

Figura 12 – (**A**) Cromatografia de camada fina do extratos lipídicos totais da *E. coli*. As linhas 1 e 4 correspondem aos padrões de fosfolípidos puros: fosfatidilglicerol (PG, linha 1), fosfatidiletanolamina (PE, linha 4) e cardiolipina (CL, as linhas 1 e 4). A linha 2 representa as diferentes frações das células irradiadas na ausência do fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (controlo) e a linha 3 representa as diferentes frações das células irradiadas na presença do fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (amostra). (**B**) Percentagem relativa das diferentes classes de fosfolípidos separados por TLC do controlo e da amostra. As barras de erro representam o desvio padrão de três experiências independentes ( $p > 0,001$ ). (**C**) Percentagem relativa dos ácidos gordos mais abundantes na *E. coli* analisados por GC-FID, Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão, \*\*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ . ..... 38

Figura 13 - Espectros ESI-MS das PEs, PGs, e CLs da *E. coli* (**A1**, **B1** e **C1** respetivamente). Espetros ESI-MS/MS do ião  $[M-H]^-$  da espécie molecular mais abundante da PE, PG e CL (**A2**, **B2** e **C2** respetivamente). Todos os espectros de MS/MS são obtidos dos respetivos iões  $[M-H]^-$  excepto o espectro CL que é de carga dupla  $[M-2H]^{2-}$ . As combinações de ácidos gordos de cada espécie molecular estão identificadas ao lados dos espectros ESI-MS/MS. .... 40

Figura 14 - Estruturas da POPE (**A**) e PLPE (**B**). ..... 44

Figura 15 - Espectros ESI-MS da POPE ( <b>A</b> ) e PLPE ( <b>B</b> ) irradiadas na ausência de porfirinas ( <b>A1</b> e <b>B1</b> ), na presença da porfirina Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF ( <b>A2</b> e <b>B2</b> ) e na presença da porfirina Tetra-Py <sup>+</sup> -Me ( <b>A3</b> e <b>B3</b> ).....	46
Figura 16 - Espectros ESI-MS/MS da POPE irradiada na ausência de porfirina ( <b>A</b> ) e os espectros ESI-MS/MS dos produtos derivados ceto, hidroxilo e hidroperóxido ( <b>B</b> , <b>C</b> e <b>D</b> respectivamente) formados após irradiação da PE na presença da porfirina Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF. Também se encontram representadas as estruturas propostas para estes produtos de oxidação.....	47
Figura 17 - Espectros de ESI-MS/MS dos iões [M-H] <sup>-</sup> de m/z 731.5 e 747.4 da POPE oxidada (A e B respectivamente).....	49
Figura 18 - Quantificação de hidroperóxidos lipídicos nos padrões de POPE e PLPE irradiados com a porfirina Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF e com a porfirina Tetra-Py <sup>+</sup> -Me utilizando o método de FOX2. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão, e *** a diferença significativas (p<0,0001). ....	50
Figura 19 - Comparação dos espectros ESI-MS de fosfatidiletanolamina (PE) ( <b>A</b> ), fosfatidilglicerol (PG) ( <b>B</b> ) e cardiolipina (CL) ( <b>C</b> e <b>D</b> ), extraído a partir de extratos de <i>E. coli</i> irradiados sem fotossensibilizador (controlo) ( <b>A1</b> , <b>B1</b> , <b>C1</b> e <b>D1</b> , respectivamente) e irradiados na presença de fotossensibilizador Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF (amostra) ( <b>A2</b> , <b>B2</b> , <b>C2</b> e <b>D2</b> , respectivamente).....	52
Figura 20 - Espectro ESI-MS/MS do ião de m/z 774.4 (PE 742 + 2O) ( <b>A</b> ) e estruturas propostas para os derivados de hidroperóxidos de PE 18:1/18:1 + 2O ( <b>B</b> ), PE 16:1 + 2O/20:1 ( <b>C</b> ) e PE 18:1 + O/18:1 + O ( <b>D</b> ).....	54
Figura 21 - Espectro ESI-MS/MS do ião m/z 746.6 (PE 714 + 2O) ( <b>A</b> ) e estruturas propostas para os derivados de hidroperóxidos PE 16:0/18:2 + 2O ( <b>B</b> ), PE 16:1 + 2O/18:1 ( <b>C</b> ) and PE 16:1/18:1 + 2O ( <b>D</b> ). ....	55
Figura 22 - Quantificação de hidroperóxidos lipídicos nos extratos lípidos totais de <i>E. coli</i> irradiados durante 90min na ausência do fotossensibilizador Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF (controlo) e na presença do fotossensibilizador Tri-Py <sup>+</sup> -Me-PF (amostra) pelo método de FOX2. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão, e ** a diferença significativas para o controlo (o<0,05).....	56

## Lista de tabelas

Tabela 1 - Espécies moleculares maioritárias de fosfatidiletanolaminas identificadas no extrato lipídico da *E. coli*. Os iões [M-H]<sup>-</sup> presentes na tabela foram identificados no espectro ESI-MS das fosfatidiletanolaminas. Recorrendo à espetrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), foi possível identificar quais as espécies de ácidos gordos que compunham cada um dos iões identificados no espectro ESI-MS. Os números entre parêntesis (C:N) indicam o número de átomos de carbono (C) e ligações duplas (N) nas cadeias laterais de ácidos gordos, e cy indica que o ácido gordo possui uma porção cíclica na cadeia carbonada. Os pares de ácidos gordos que possuem \* já foram identificados por Kol, M.A., *et al.*, 2004 (99), e os que possuem \*\* foram identificados por Oursel, D., *et al.*, 2008 (92).  
 ..... 41

Tabela 2 - Espécies moleculares maioritárias de fosfatidilglicerol identificadas no extrato lipídico da *E. coli*. Os iões [M-H]<sup>-</sup> presentes na tabela foram identificados no espectro ESI-MS de fosfatidilglicerol. Recorrendo à espetrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), foi possível identificar quais as espécies de ácidos gordos que compunham cada um dos iões identificados no espectro ESI-MS. Os números entre parêntesis (C:N) indicam o número de átomos de carbono (C) e ligações duplas (N) nas cadeias laterais de ácidos gordos, e cy indica que o ácido gordo possui uma porção cíclica na cadeia carbonada. Os pares de ácidos gordos que possuem \*\* foram identificados por Oursel, D., *et al.*, 2008 (92).  
 ..... 42

Tabela 3 - Espécies moleculares maioritárias de cardiolipinas identificadas no extrato lipídico da *E. coli*. Os iões [M-H]<sup>-</sup> presentes na tabela foram identificados no espectro ESI-MS da cardiolipina. Recorrendo à espetrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), foi possível identificar quais as espécies de ácidos gordos que compunham cada um dos iões identificados no espectro ESI-MS. Os números entre parêntesis (C:N) indicam o número de átomos de carbono (C) e ligações duplas (N) nas cadeias laterais de ácidos gordos, e cy indica que o ácido gordo possui uma porção cíclica na cadeia carbonada. Os pares de ácidos gordos que possuem \*\*\* foram identificados por Hsu, F.F. and J. Turk, 2006 (100).  
 ..... 43

Tabela 4 - Produtos de oxidação observados nos espectros ESI-MS de cada padrão de PE (POPE e PLPE), com a identificação do tipo de modificação e valor m/z correspondente. .... 45

Tabela 5 - Produtos de oxidação da POPE e PLPE com modificações na cabeça polar formadas por desaminação da cabeça polar da etanolamina. A tabela mostra os valores dos iões m/z, a sua mais provável identificação quanto às modificações nos ácidos gordos e na cabeça..... 49

## Abreviaturas

<b>BHT</b> - 2,6-di- <i>terc</i> -butil- <i>p</i> -hidroxitolueno	<b>PS</b> - fosfatidilserina
<b>CID</b> - dissociação induzida por colisão	<b>PUFA</b> - ácido gordo polinsaturado
<b>CL</b> - cardiolipina	<b>Q-TOF</b> - quadrupolo-tempo de voo
<b>EDTA</b> - ácido etilenodiaminotetra-acético	<b>ROS</b> - espécies reativas de oxigénio
<b>ESI</b> - ionização por eletrospray	<b>RP-HPLC</b> - cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
<b>FAB</b> - bombardeamento por átomos rápidos	<b>TOF</b> - tempo de voo
<b>FID</b> - detetor de ionização de chama	<b>Tetra-Py<sup>+</sup>-Me</b> - 5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrine tetra-iodide
<b>FOX</b> - <i>ferrous oxidation-xylene orange</i>	<b>Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF</b> - 5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl) porphyrin tri-iodide
<b>GC</b> - cromatografia gasosa	<b>TSB</b> - caldo de soja trípica
<b>HPLC</b> - cromatografia líquida de alta eficiência	<b>UFC</b> - unidade formadora de colónias
<b>LC</b> - cromatografia líquida	<b>UV</b> - ultravioleta
<b>m/z</b> - razão massa/carga	
<b>MALDI</b> - ionização por dessorção por laser assistida por matriz	
<b>MS</b> - espetrometria de massa	
<b>MS/MS</b> - espetrometria de massa tandem	
<b>PA</b> - ácido fosfatídico	
<b>PAPE</b> - 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina	
<b>PBS</b> - tampão fosfato-salino	
<b>PC</b> - fosfatidilcolina	
<b>PDPE</b> - 2-docoheaxenoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina	
<b>PE</b> - fosfatidiletanolamina	
<b>PG</b> - fosfatidilglicerol	
<b>PI</b> - fosfatidilinositol	
<b>PLPE</b> - 1-palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina	
<b>POPE</b> - 2-oleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	

# **I. Introdução**





## 1. Fosfolípidos e a sua estrutura

Os fosfolípidos são os principais constituintes de todas as membranas celulares, criando uma barreira semipermeável a água e solutos, bem como uma interface de comunicação entre células (1-6). Para além disso, são biomoléculas com a capacidade de mediar importantes funções regulatórias nas células, graças à possibilidade de serem convertidas em mensageiros lipídicos. A passagem de fosfolípidos do folheto interno da membrana celular para o folheto externo está associada a mecanismos de reconhecimento pelos fagócitos de células apoptóticas (3). Alguns fosfolípidos têm ainda a capacidade de servir como âncora a algumas glicoproteínas, quando presentes no folheto externo da membrana plasmática (5).

Os lípidos mais abundantes das células são os glicerofosfolípidos. Os glicerofosfolípidos são compostos por uma molécula de glicerol, ao qual se ligam dois ácidos gordos nas posições *sn-1* e *sn-2* e um grupo fosfato na posição *sn-3*. Ao grupo fosfato podem ligar-se diferentes grupos polares dando origem a diversas classes de fosfolípidos, com estruturas e funções biológicas distintas. O grupo fosfato pode assim estar ligado a uma colina, uma etanolamina, um glicerol, uma serina ou um inositol, dando origem às classes fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS) e fosfatidilinositol (PI) respetivamente, ou ainda ao ácido fosfático caso não se ligue nenhum grupo carbonado ao grupo fosfato (1, 2, 5-9). A estrutura geral dos glicerofosfolípidos e os diferentes grupos polares que podem ligar-se ao grupo fosfato estão representados na Figura 1. A ligação entre o glicerol, na posição *sn-1*, e ácido gordo pode ocorrer por uma ligação éster, denominando-se por fosfatidil; por uma ligação éter-alquílica, denominando-se plasmanil ou ainda por uma ligação éter-vinílica que se designa por plasménil, conforme se pode verificar na Figura 2 (10, 11).

Os ácidos gordos presentes na maioria das células, são ácidos carboxílicos que possuem uma cadeia hidrocarbonada linear que varia entre 14 e 22 átomos de carbono e podem ser saturados ou insaturados, podendo apresentar até 6 ligações duplas. Geralmente, os ácidos gordos ligados na posição *sn-1* são saturados, e na posição *sn-2* ligam-se os insaturados (1, 2, 4-6). Os ácidos gordos presentes nos fosfolípidos das membranas bacterianas raramente são polinsaturados, sendo por norma ramificados e/ou hidroxilados, podendo ainda conter anéis de ciclopropano (4, 6).

A presença de ácidos gordos insaturados nos fosfolípidos que compõem as membranas celulares, predominantemente na conformação *cis*, é responsável pelo aumento da fluidez da membrana celular, comparativamente com as membranas compostas apenas por fosfolípidos com ácidos gordos saturados (2, 6).

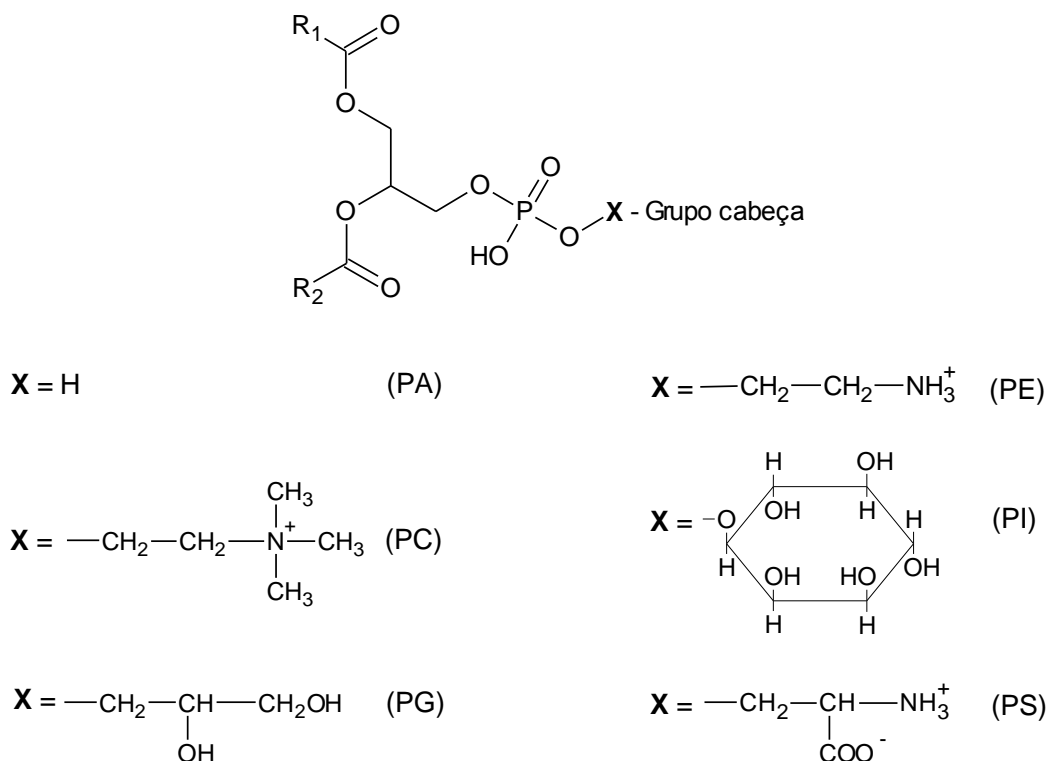


Figura 1 - Estrutura geral dos glicerofosfolípidos aos quais se encontram ligados os ácidos gordos esterificados nas posições sn-1 (R1) e na posição sn-2 (R2). PA - Ácido fosfatídico, PC - Fosfatidilcolina, PG - Fosfatidilglicerol, PE - Fosfatidiletanolamina, PI - Fosfatidilinositol, PS - Fosfatidilserina.

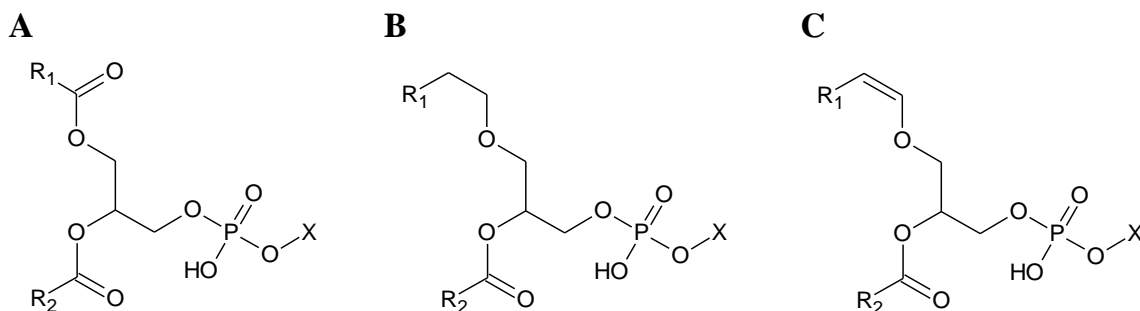


Figura 2 - Subclasses dos glicerofosfolípidos consoante o tipo de ligação do ácido graxo na posição *sn-1*. (A) fosfatidil, (B) plasmanil e (C) plasmenil. R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> representam os ácidos gordos esterificados no glicerol e o X representa o grupo polar.

## 1.1. Oxidação de fosfolípidos

Os fosfolípidos são moléculas suscetíveis de sofrer oxidação, originando um vasto número de espécies estruturalmente diferentes que podem apresentar diferentes atividades biológicas (12-14). A oxidação dos fosfolípidos pode resultar de reações químicas radicalares e enzimáticas (13), e está também associada a processos fisiopatológicos resultantes de doenças associadas à idade ou doenças crônicas, aterosclerose, inflamação, apoptose e resposta imune (13-17). Os fosfolípidos oxidados têm sido associados ao stresse oxidativo (16) e à doença de Alzheimer (18), entre outras doenças. A oxidação de fosfolípidos pode ocorrer através da via enzimática, por exemplo pela ação das lipoxigenases, ciclo-oxigenases e citocromo P450 (19), ou então por via radicalar através de espécies reativas de oxigénio (ROS) (19, 20). Os ROS podem resultar de uma ação enzimática, por exemplo a mieloperoxidase (19) ou ainda de fatores externos, como a radiação ultravioleta (UV) e poluição do ar (Figura 3) (12). O principal alvo de oxidação num fosfolípido é a cadeia de ácido gordo insaturada (16, 21). Das reações de oxidação de fosfolípidos resultam uma grande diversidade de compostos que podem ser classificados de acordo com o tipo de modificações resultantes: (i) produtos de cadeia longa, nos quais o esqueleto do fosfolípido foi preservado; (ii) produtos de cadeia curta, provenientes da quebra dos ácidos gordos devido a clivagens oxidativas; (iii) adutos, resultantes da reação entre os produtos de oxidação dos fosfolípidos com grupos carbonilo e grupos amino de biomoléculas que se encontrem na vizinhança, tais como péptidos, proteínas e fosfatidiletanolaminas (16, 21-25).

Os fosfolípidos oxidados podem desempenhar: (i) ações biológicas pro-inflamatórias tais como a agregação plaquetária, adesão de monócitos ou ainda a sinalização inflamatória, (ii) ações biológicas anti-inflamatórias (26-32). A presença de fosfolípidos oxidados nas membranas celulares pode provocar um desequilíbrio na permeabilidade da bicamada fosfolipídica devido à alteração da fluidez desta e ao empacotamento dos fosfolípidos (33-36). Estas alterações podem ter impacto na integridade da membrana induzindo a apoptose (13, 37). Os avanços realizados na área do conhecimento das vias de sinalização e das implicações que os fosfolípidos oxidados provocam a nível patológico podem vir a desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico e de novas estratégias terapêuticas (38).

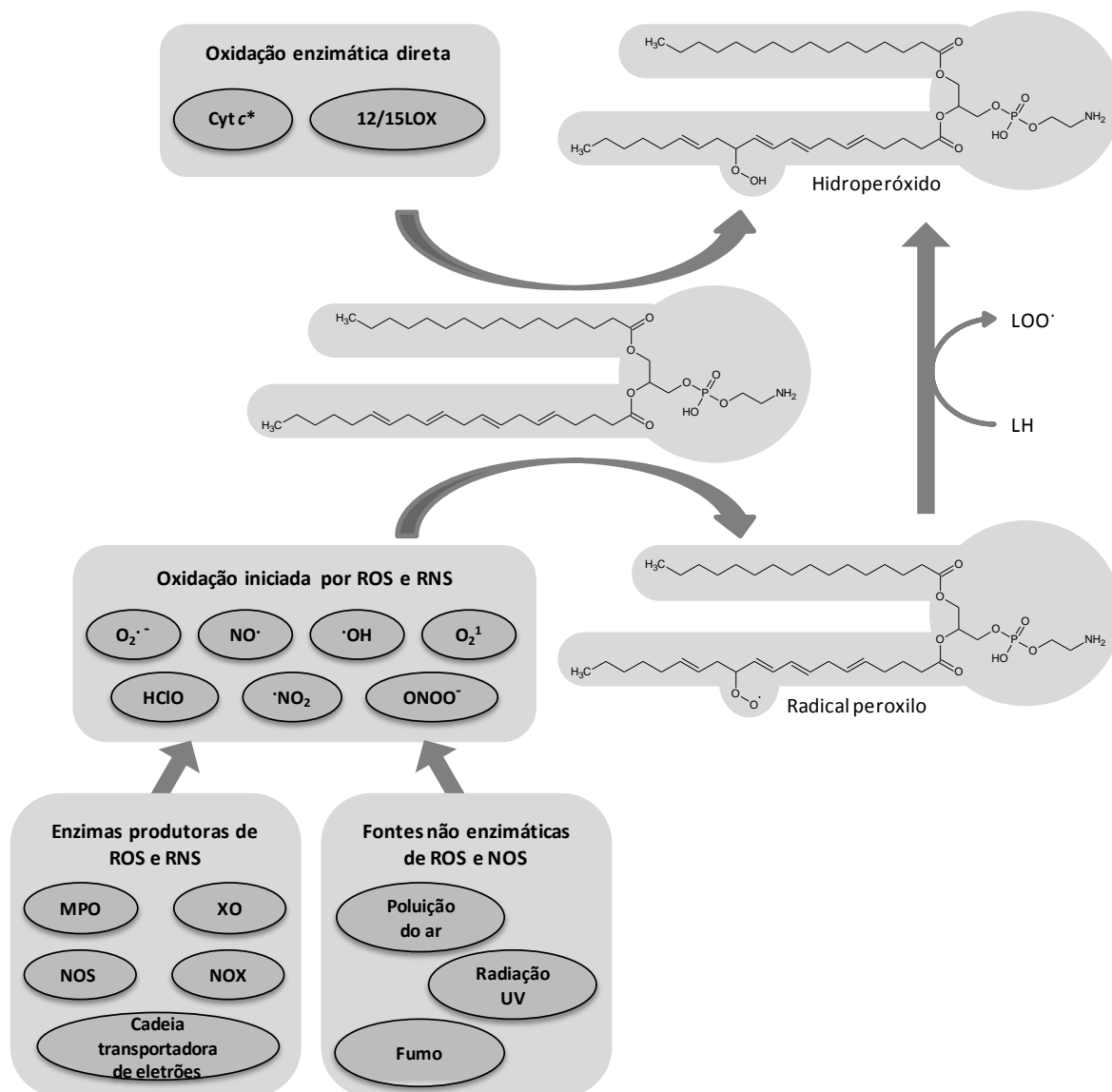


Figura 3 - Diferentes mecanismos para a oxidação lipídica. Cyt c\* - citocromo C, 12/15LOX – família das lipoxigenases, MPO – mielperoxidase, NOS – óxido nítrico sintase, XO – xantine oxidase, NOX – NADPH oxidase, ROS – espécies reativas de oxigênio, RNS – espécies reativas de azoto (adaptado de (12)).

### 1.1.1. Oxidação de fosfatidiletanolaminas

Das diferentes classes de glicerofosfolípidos, a fosfatidiletanolamina (PE) e a fosfatidilcolina (PC) são os mais abundantes nas membranas celulares eucarióticas (3, 39). No entanto, nas bactérias Gram negativo [Gram (-)] a PE é a mais abundante nas membranas celulares (40), sendo que na *E. coli* a PE apresenta cerca de 75% do total de fosfolípidos (41). Existem inúmeros estudos sobre a oxidação de PCs utilizando a espectrometria de massa. O mesmo não acontece em relação ao estudo das PEs.

Gugiu e colaboradores (2006) identificaram produtos de cadeia curta de fosfatidiletanolaminas presentes na retina utilizando a mieloperoxidase, radiação ultravioleta e ainda oxidação na presença de cobre (Cu II). Neste estudo foram utilizados como fosfolípidos de partida o 1-palmitoil-2-docoheanoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (PDPE), 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (PAPE) e 2-linoleoil-1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (PLPE). Após oxidação, os autores identificaram diversos produtos de oxidação de cadeia curta com terminal carboxílico e aldeído, tendo verificado que nas condições utilizadas na PDPE os produtos predominantes eram em C4, na PAPE eram em C5 e na PLPE eram em C9. Gugiu et al. (2006) observaram ainda que existe uma maior diversidade de produtos resultantes da oxidação da PLPE em comparação com os produtos obtidos da oxidação da PAPE e da PDPE. Esta observação tem particular importância uma vez que a PLPE não é dos fosfolípidos com mais insaturações no ácido gordo ligado a *sn-2* nem dos mais abundantes na membrana da retina (42).

Domingues et al. (2009) aplicou a espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS) na detecção de produtos de oxidação da fosfatidiletanolamina, escolhendo a PLPE como fosfolípido de partida e usando a reação de Fenton como via de oxidação. Neste trabalho foram identificados produtos de oxidação de cadeia longa, que resultaram da inserção de entre um a quatro átomos de oxigênio no ácido gordo *sn-2*, podendo estes estar na forma de grupo ceto, ceto-hidroxi, hidroxi, poli-hidroxi, peroxi e hidro-peroxi. Através dos resultados obtidos por cromatografia líquida-espectrometria de massa tandem (LC-MS/MS), foi possível determinar os carbonos C9, C12 e C13 como as posições predominantemente substituídas nos produtos de oxidação de cadeia longa. No entanto, foram também encontrados produtos de oxidação de cadeia curta, nomeadamente com ácidos gordos curtos com terminal na forma de grupos aldeídos, hidroxi-aldeídos e derivados carboxílicos com 7, 8, 9, 11 e 12 carbonos, sendo que o produto de cadeia curta com uma maior abundância relativa é o que tem 9 carbonos (39).

Uma vez que a PE apresenta um grupo amina livre (Figura 1), pode reagir com compostos com um grupo carbonilo terminal, por exemplo aldeídos, dando origem a bases de Schiff ou aductos de Michael. Existem já vários artigos que descrevem a formação destas estruturas, como. Bacot e colaboradores (2007) que descreveram a formação de aductos de Michael-PE, fazendo reagir com as PE diferentes moléculas da família dos

hidroxi-alcenais, resultantes da degradação de hidroperóxidos de ácidos gordos, como por exemplo 4-hidroxi-2(*E*)-nonenal. Este grupo de investigação conseguiu então identificar a formação de aductos Michael-PE, em plaquetas de sangue humano e na retina de ratos diabéticos, utilizando a cromatografia gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (GS-MS). Os dados obtidos levaram Bacot e colaboradores a afirmar que estes aductos podem ser usados como marcadores específicos em estados fisiopatológicos associados ao stresse oxidativo (22).

O estudo das alterações estruturais dos fosfolípidos induzidas por foto-oxidação está ainda a dar os seus primeiros passos, existindo alguns trabalhos de foto-oxidação de cardiolipinas (CL) (43, 44). Neste contexto, a foto-oxidação das PEs surge agora como um novo tema na área da investigação. É crucial estudar e compreender as modificações estruturais e respetivas implicações bioquímicas da foto-oxidação de PEs uma vez que a sua compreensão permitirá a utilização deste processo em novas terapias clínicas. A foto-oxidação é já usada na terapia fotodinâmica uma vez que leva à inativação de bactérias.

## **2. Terapia fotodinâmica**

A primeira abordagem fotoquimioterapêutica na medicina foi usada por Albert von Jesionek e Hermann Tappeiner em 1903 no tratamento de lesões malignas da pele de pacientes (45). Atualmente, a terapia fotodinâmica tem sido utilizada com sucesso no tratamento de tumores localizados, tais como o cancro da pele, cancro esofágico e cancro da bexiga (45). Esta terapia requer a utilização de: (i) radiação, normalmente luz visível ou laser dirigida através de fibra óptica; (ii) oxigénio molecular; (iii) um fotossensibilizador não tóxico, administrado na corrente sanguínea, por via tópica ou diretamente no órgão, o qual é capaz de absorver e transferir a energia da luz para o oxigénio molecular, produzindo espécies reativas de oxigénio (46). Estas espécies são capazes de alterar irreversivelmente alguns constituintes vitais das células, resultando num dano letal da célula alvo (47, 48).

Para além de ser utilizada no tratamento de alguns tipos de cancro, a terapia fotodinâmica também é eficaz na inativação de bactérias, vírus, endósporos bacterianos e protozoários (47, 49-52). Porém, com a exceção da hematoporfirina e do ácido aminolevulínico usados no tratamento do acne, de infeções superficiais por papilomavírus e de leishmaniose cutânea, atualmente a terapia fotodinâmica não é usada na clínica para

tratar infecções. A terapia fotodinâmica, em alguns países, tem sido utilizada na desinfecção de sangue ou produtos sanguíneos (47, 53, 54), estando atualmente autorizado o uso de azul de metileno e de psoraleno como fotossensibilizadores para a inativação de bactérias (55).

## **2.1. Terapia fotodinâmica bacteriana**

A terapia fotodinâmica bacteriana tem recebido especial atenção nos últimos tempos (45) devido ao aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos. Esta resistência resulta em grande parte da prescrição inadequada de antibióticos por parte dos clínicos e também à interrupção antecipada da terapia por parte dos pacientes (56). Como na terapia fotodinâmica os principais alvos são a membrana citoplasmática e a parede celular, o fotossensibilizador não precisa de penetrar nas células. Estando adsorvidos à superfície, estes são ativados pela luz e induzem a destruição no interior das células alvo. Não são, por isso, desenvolvidos mecanismos de resistência que envolvem a diminuição de absorção do fotossensibilizador. Por outro lado, a terapia fotodinâmica é um processo multialvo o que dificulta o desenvolvimento de resistências. De facto, os estudos realizados até agora com vista a avaliar o potencial desenvolvimento de resistência pelas bactérias à terapia fotodinâmica não mostraram desenvolvimento de resistência (57-59).

A terapia fotodinâmica pode ser usada para inativar bactérias de importância clínica e também bactérias patogénicas que crescem no meio ambiente, por exemplo, no tratamento de águas residuais (45, 48-50, 60).

### **2.1.1. Fotossensibilizadores**

Um fotossensibilizador é um composto de origem natural ou sintética (45), capaz de receber energia e usá-la para excitar o oxigénio molecular, produzindo ROS (45, 48). Para um composto ser considerado um fotossensibilizador deve apresentar algumas propriedades, tais como: (i) elevado coeficiente de absorção na região do espectro correspondente à fonte de radiação, (ii) elevada capacidade de produção de ROS e (iii) elevada foto-estabilidade (48, 61). Os fotossensibilizadores mais usados na terapia fotodinâmica pertencem a diferentes famílias de compostos, tais como corantes orgânicos



(por exemplo azul de metileno e eosina), macrociclos tetrapirrólicos (por exemplo porfirinas e ftalocianinas) e psolarenos (45).

As porfirinas e os seus análogos têm sido os compostos mais utilizados em fotoquimioterapia e com melhores resultados (45). A eficiência das porfirinas na foto-inativação de microrganismos depende de vários fatores, nomeadamente da presença ou ausência de carga, da distribuição de carga na molécula (49) e das características dos grupos substituintes periféricos (45). A estrutura base da porfirina é essencialmente hidrofóbica, no entanto os substituintes periféricos podem ser usados para adicionar cargas à molécula, podendo assim controlar a solubilidade na água e a afinidade para as células-alvo (Figura 4) (48). As porfirinas podem desempenhar o seu papel tanto no interior como no exterior das bactérias (59, 62). Idealmente devem ser de natureza anfipática de maneira a que se difundam pela bicamada lipídica da membrana bacteriana sem a necessidade de um transporte ativo (45, 50). Vários estudos têm mostrado que as porfirinas catiónicas (61, 63), em especial as tetra- e tri-catiónicas são as mais eficazes na foto-inativação de microrganismos (49, 50, 56, 60).

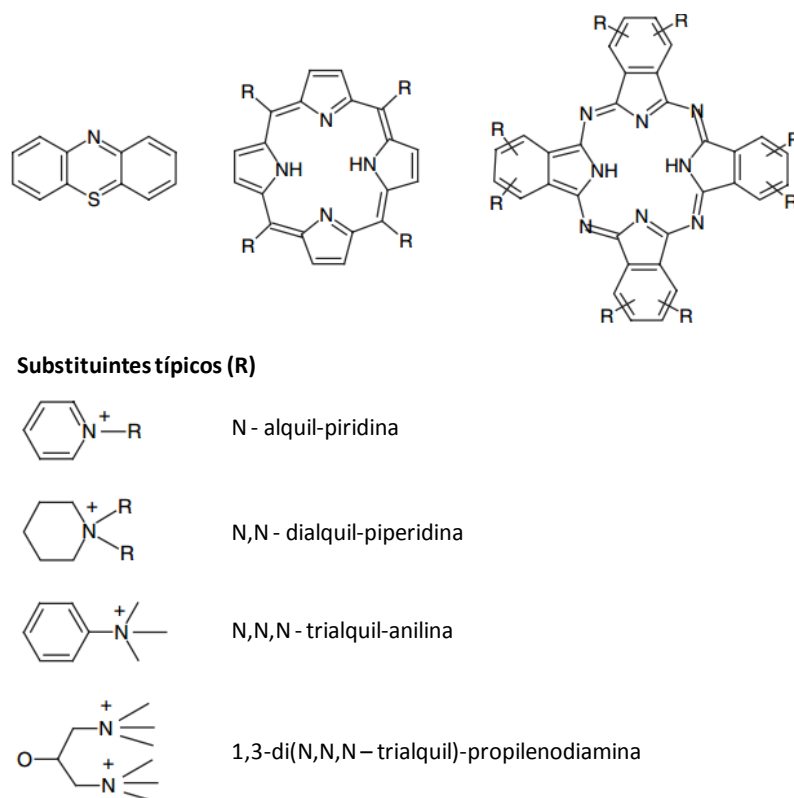


Figura 4 - Estrutura química básica de fenotiazina (I), porfirinas (II), e ftalocianina (III) e os fotossensibilizadores típicos substituintes periféricos (R) conferindo um carácter catiónico ao fotossensibilizador (adaptado de (64)).

### **2.1.2. Mecanismos de ação da terapia fotodinâmica**

Os fotossensibilizadores são geralmente moléculas que absorvem energia quando irradiadas, podendo passar para um estado excitado singuleto. Dependendo da sua estrutura molecular e do ambiente, a molécula pode perder a sua energia através de processos físicos ou eletrónicos, voltando assim para o estado fundamental, ou pode sofrer uma transição para o estado excitado tripleto, o qual pode também perder a sua energia por processos físicos ou eletrónicos e regressar ao estado fundamental. Quando o fotossensibilizador se encontra no estado excitado tripleto, pode reagir por uma ou por duas vias conhecidas como mecanismo tipo I e mecanismo tipo II (47, 65).

O mecanismo tipo I envolve uma reação de captação ou abstração de um átomo de hidrogénio ou a transferência de eletrões entre um fotossensibilizador no estado excitado tripleto e um substrato, produzindo radicais livres, os quais podem reagir com o oxigénio e originar ROS, como por exemplo o anião superóxido, radical hidroxilo ou ainda o peróxido de hidrogénio (48, 56). O mecanismo tipo II envolve a formação do oxigénio singuleto através de um processo de transferência de energia durante uma colisão entre o fotossensibilizador no estado excitado tripleto e o oxigénio molecular (Figura 5) (48, 56, 59, 62, 66).

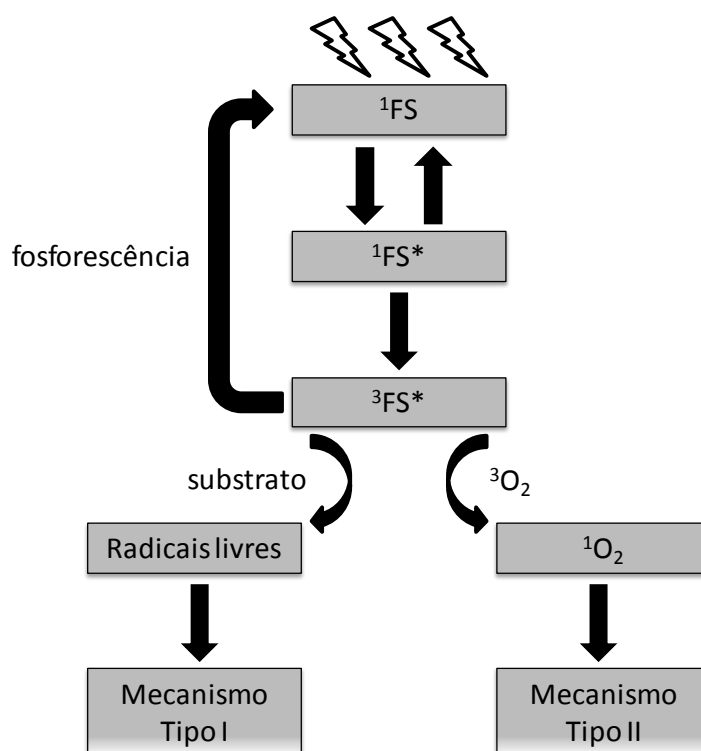


Figura 5 – Esquema representativo dos mecanismos tipo I e tipo II. Depois da luz excitar o fotossensibilizador no estado fundamental ( $^1\text{FS}$ ), este passa ao estado excitado singuleto ( $^1\text{FS}^*$ ), o qual pode regressar ao estado fundamental ou pode passar para o estado excitado tripleto ( $^3\text{FS}^*$ ). Por sua vez, o  $^3\text{FS}^*$  pode regressar ao estado fundamental, ou então reagir com um substrato e/ou oxigénio molecular ( $^3\text{O}_2$ ). Se o  $^3\text{FS}^*$  reagir com um substrato pode originar radicais livres que podem reagir com o oxigénio e produzir radicais livres, o qual se denomina por mecanismo tipo I. Se o  $^3\text{FS}^*$  reagir com o  $^3\text{O}_2$ , origina o oxigénio singuleto ( $^1\text{O}_2$ ) o qual se denomina por mecanismo tipo II. (adaptado de (56))

Não existe um consenso no que diz respeito ao mecanismo mais importante na inativação de bactérias, mas é geralmente aceite que ambos os mecanismos são importantes (46, 47, 65). A maior parte dos estudos indica que o mecanismo tipo II é o mais importante na inativação das bactérias por porfirinas (47, 56, 67).

### 2.1.3. Alvos de ação da terapia fotodinâmica

A foto-inativação das bactérias pode estar associada a (i) danos na membrana citoplasmática e parede celular, permitindo o vazamento do conteúdo celular, alteração de enzimas e de sistemas de transporte, e (ii) danos a nível do DNA (59, 65, 67).

Os radicais livres e o oxigénio singuleto provocam oxidação nos fosfolípidos, péptidos e esteróis, os quais são componentes importantes na estrutura da parede e da membrana bacteriana (47). Provocam também alguns danos a nível do DNA, os quais podem ser reparados pelos sistemas de reparação de DNA bacteriano. No entanto, a

bactéria *Deinococcus radiodurans* é conhecida por possuir um sistema de reparação de DNA muito eficiente e é facilmente inativada, o que sugere que as bactérias são inativadas principalmente devido a danos causados na membrana celular, ainda que também ocorram alguns danos ao nível do DNA bacteriano (68).

#### **2.1.4. Foto-inativação de bactérias**

Os fotossensibilizadores aniônicos e neutros inativam eficientemente bactérias Gram positivo [Gram (+)] não inativando, no entanto, bactérias Gram negativo [Gram (-)]. Isto deve-se ao facto das bactérias Gram (+) e das bactérias Gram (-) diferirem na constituição da parede celular (Figura 6). As bactérias Gram (+) possuem uma parede externa composta essencialmente por peptidoglicano, cerca de 40-80 nm, e pouca quantidade de lípidos e proteínas, o que não representa uma barreira à permeabilidade uma vez que é relativamente poroso (69). Deste modo, os fotossensibilizadores conseguem atravessar a parede celular e chegarem à membrana citoplasmática, local onde provocam mais danos. Em relação às bactérias Gram (-), estas possuem uma parede celular muito mais fina, composta por uma camada fina de peptidoglicano, e por uma membrana externa assimétrica, composta por lipopolissacarídeos fortemente carregados negativamente, lipoproteínas, fosfolípidos e proteínas com função de porinas (69). Esta membrana externa atua como uma barreira de permeabilidade muito eficaz, impedindo que o fotossensibilizador se difunda e atinja a membrana citoplasmática. A eficiência da terapia fotodinâmica nas bactérias Gram (-) com fotossensibilizadores neutros pode ser, contudo, melhorada através da adição de compostos (por exemplo ácido etilenodiaminotetra-acético - EDTA) que alteram a estrutura da membrana externa, aumentando a sua permeabilidade, o que facilita a penetração do fotossensibilizador (69).

Os fotossensibilizadores catiónicos, ao contrário dos neutros, inativam eficientemente os dois tipos de bactérias, Gram (+) e Gram (-). Os fotossensibilizadores catiónicos alteram a permeabilidade da membrana externa das bactérias Gram (-) atingindo a membrana citoplasmática (64, 70, 71).

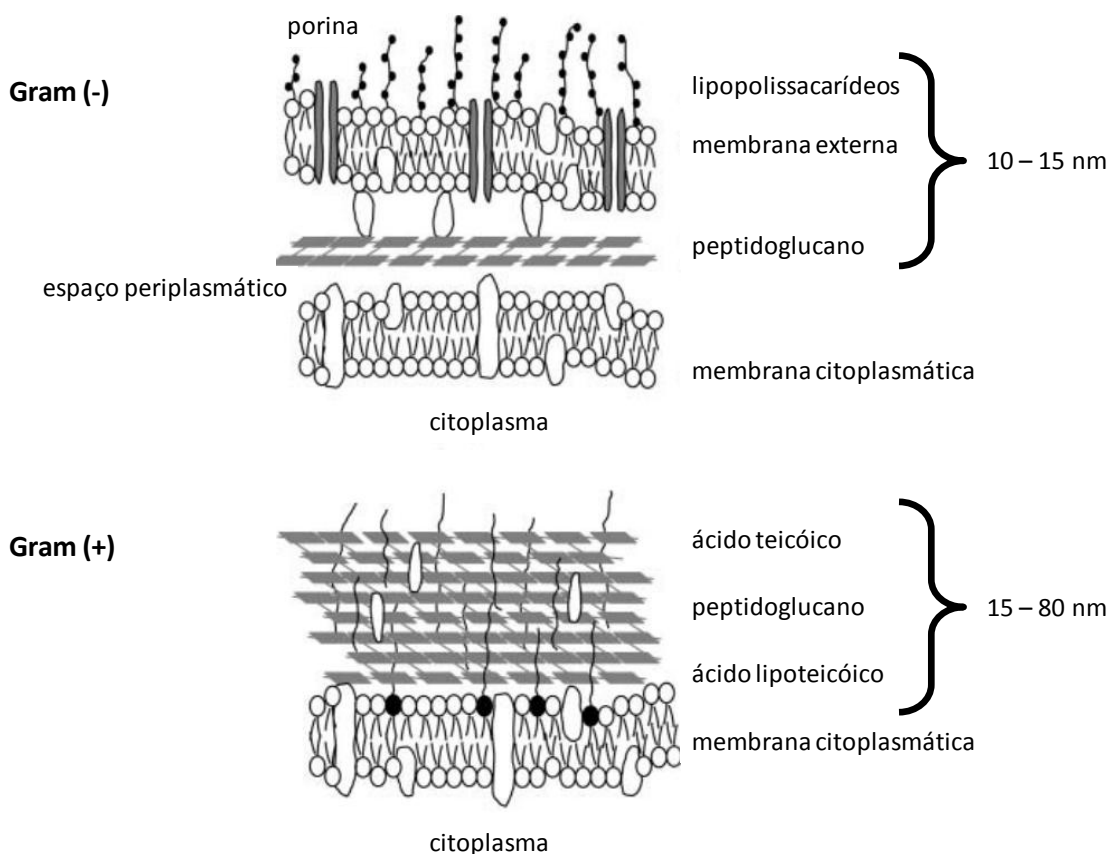


Figura 6 - Representação esquemática da parede celular e da membrana citoplasmática nas bactérias Gram (-) e nas bactérias Gram (+) (adaptado de (69)).

### 3. Métodos utilizados na análise de fosfolípidos

Para compreender o efeito da fotossensibilização na parede celular e na membrana citoplasmática da *E. coli*, é importante fazer uma análise dos fosfolípidos, uma vez que estes são os principais constituintes da parede celular e da membrana citoplasmática e são suscetíveis a sofrerem oxidação.

A análise dos fosfolípidos requer alguns passos prévios, tais como a extração dos fosfolípidos, separação e consequente análise. Este processo denomina-se por lipidómica que pode ser definida como o estudo da estrutura, função e interações entre lípidos e outras moléculas, e ainda o estudo das alterações lipídicas devido, por exemplo, a reacções de oxidação. Existem diferentes técnicas para a análise de lípidos, no entanto estas devem ser escolhidas tendo em conta o tipo de molécula que se pretende analisar, assim como o tipo de análise e informação que se quer obter. Para a análise de lípidos, estes são inicialmente extraídos recorrendo a processos de extracção líquido-líquido, tirando partido da sua solubilidade em solventes orgânicos. Os métodos de extração de lípidos mais utilizados são

o método de Folch (72) e o método de Bligh and Dyer (73). Para separação de lípidos, a cromatografia em camada fina (TLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são as técnicas mais utilizadas. No que diz respeito à identificação de espécies moleculares de lípidos, a técnica mais utilizada é a espectrometria de massa (MS) (10).

### **3.1. Técnicas cromatográficas**

A cromatografia é um método de separação física que permite a separação de componentes de uma amostra (74). A amostra é colocada numa fase estacionária, pode ser sólida ou líquida, pela qual se faz passar uma fase móvel, pode ser um líquido ou um gás, separando assim os componentes da amostra com base nas diferentes propriedades físicas e químicas (11). Os componentes de uma amostra são separados quando estes interagem de forma diferente com a fase móvel e a fase estacionária, o que origina diferentes migrações que são posteriormente detetadas (74). O conhecimento das características dos diferentes compostos da amostra que se pretende separar, permite manipular as propriedades da fase estacionária e da fase móvel de maneira a que se obtenha uma boa separação dos diferentes componentes (74). Um sistema cromatográfico consiste em quatro componentes: (i) dispositivo para introdução da amostra, (ii) fase estacionária, (iii) fase móvel e (iv) detetor (74). As diferentes técnicas cromatográficas existentes diferem na forma dos componentes e na sua importância relativa (74).

A cromatografia em camada fina (TLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) são as técnicas cromatográficas mais utilizadas aplicadas no estudo de fosfolípidos. A TLC foi o primeiro método cromatográfico usado e ainda é utilizado muito frequentemente, mas é o HPLC o mais popular para a separação das diferentes classes de fosfolípidos (11).

#### **3.1.1. Cromatografia em camada fina**

A cromatografia em camada fina (TLC) é um método simples utilizado na análise, separação ou identificação de componentes presentes numa mistura, o qual pode ser realizado sem a utilização de equipamento sofisticado e caro. No entanto, os resultados obtidos por HPLC são mais precisos que os resultados obtidos por TLC. A TLC é uma técnica de adsorção na qual é utilizada uma fase móvel (eluente) e uma fase estacionária. A

amostra é adicionada com a ajuda de uma seringa à fase estacionária, pela qual é feita passar a fase móvel, a qual vai arrastar os componentes menos adsorvidos separando-os dos componentes mais adsorvidos. Estas diferenças de afinidade por parte dos diferentes componentes da amostra estão associadas à polaridade. Por sua vez, a polaridade vai influenciar a distância percorrida pelos diferentes componentes da amostra, de acordo com a sua composição e características (11, 40, 75, 76).

Existem dois tipos de TLC: (i) TLC de fase normal e (i) TLC de fase reversa. Na TLC fase normal, a fase estacionária é polar e a fase móvel menos polar, o que origina uma maior adsorção por parte dos componentes polares da amostra à fase estacionária, permitindo assim que os componentes apolares sejam eluídos em primeiro lugar. Na TLC de fase reversa, a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, permitindo que os componentes polares da amostra sejam eluídos em primeiro lugar uma vez que os componentes apolares se encontram adsorvidos na fase estacionária (11, 40, 75, 76).

De modo a permitir a identificação visual da localização dos diferentes componentes da amostra separados na placa de TLC é necessário recorrer a técnicas de revelação. Existem diferentes técnicas de revelação, tais como a revelação com vapores de iodo, ninidrina ou primulina. Tanto na revelação com vapores de iodo quer por ninidrina, a sua visualização pode ser feita a olho nú, enquanto que na revelação por primulina só se consegue visualizar os resultados por fluorescência, uma vez que a primulina é fluorescente. A ninidrina reage com aminas primárias ou secundárias, sendo por isso utilizada na revelação de proteínas, peptídeos e aminoácidos por causa do terminal amina, ou ainda na revelação de fosfolípidos que contenham grupo amina primário ou secundário, como por exemplo a fosfatidiletanolamina e a fosfatidilserina. A revelação de lípidos é feita de uma forma não específica por spray de primulina, um corante não destrutivo que se liga não covalentemente aos lípidos e é capaz de se aguentar durante alguns dias, permitindo uma análise posterior (11, 40, 75-77). White e colaboradores (77) utilizaram em 1997 um método de quantificação de fosfolípidos utilizando TLC e primulina para a sua revelação, no qual utilizaram o sistema de microscopia de super-resolução STORM (do inglês *Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), o qual permite quantificar os lípidos com base em curvas padrão. A sensibilidade deste método de quantificação está na gama de concentração picomolar e não é necessário a utilização de corantes destrutivos (77).

Apesar de não ser uma técnica automatizada, existem algumas vantagens na utilização da TLC que a mantêm como uma das técnicas cromatográficas mais utilizadas na atualidade. Em comparação com outras técnicas cromatográficas, a TLC é uma técnica na qual se gasta menor quantidade de solventes, e o material necessário para realizar a TLC é barato, o que torna esta técnica mais económica. Outra vantagem é não se observarem contribuições de componentes analisados anteriormente como pode vir a verificar-se no HPLC, uma vez que as placas de TLC são utilizadas apenas uma vez.

No entanto, a TLC também apresenta desvantagens, por exemplo uma menor reprodutibilidade, uma vez que a temperatura e a humidade influenciam a separação dos componentes e apresenta menor sensibilidade e baixa resolução em comparação com o HPLC ou cromatografia gasosa (GC) (11). Esta técnica pode ainda alterar a estrutura dos compostos, nomeadamente fosfolípidos, por oxidação ou hidrólise uma vez que estes se encontram expostos à atmosfera (78, 79).

### **3.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Performance**

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) surgiu nos anos 60 devido aos avanços obtidos na década anterior na cromatografia gasosa, nomeadamente a possibilidade de colocar a fase móvel sobre pressão e controlar a taxa de fluxo, o que permitiu implementá-los na cromatografia em coluna que se realizava naquela época (80). Atualmente, o HPLC é muito utilizado na separação de classes de lípidos, mas foi Jungalwala *et al.* (1975) o primeiro a utilizar a HPLC na separação de fosfolípidos (81).

Os sistemas de HPLC são constituídos por quatro componentes principais: (i) uma bomba, (ii) um injetor, (iii) uma coluna e (iv) um detetor (Figura 7) (74). Os resultados obtidos são analisados por um computador.



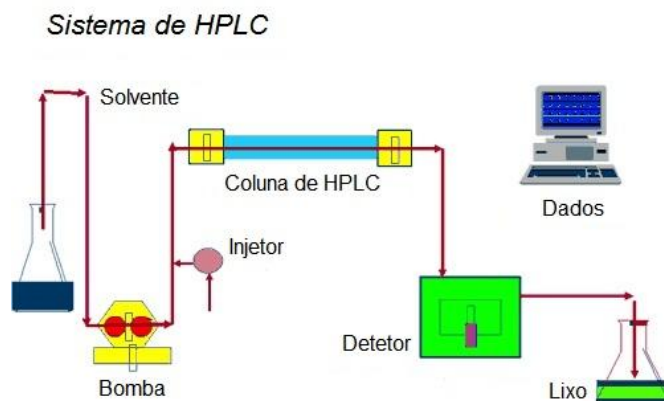


Figura 7 - Componentes principais de um sistema de HPLC são a bomba, o injetor, a coluna de HPLC e o detector. Os dados são tratados por computador, o qual se encontra ligado ao sistema HPLC. (Adaptado de [http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/Waters\\_HPLC\\_MS\\_TitlePg.html](http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/Waters_HPLC_MS_TitlePg.html))

A separação dos diferentes compostos de uma amostra utilizando a técnica HPLC ocorre devido à diferente interação que estes compostos apresentam com a fase móvel e a fase estacionária, o que origina diferentes tempos de retenção (74). Em relação à fase estacionária, podemos optar por um sistema HPLC de fase normal ou de fase reversa (RP-HPLC) (11, 74).

Na HPLC de fase normal, a fase estacionária é polar e a fase móvel menos polar (11, 82). Este é um dos métodos utilizado na separação de fosfolípidos, onde normalmente se utiliza uma coluna de sílica que pode variar no comprimento e no diâmetro interno, sendo que as colunas com maior comprimento oferecem uma maior resolução. Os fosfolípidos são separados consoante a polaridade do grupo cabeça, sendo que os fosfolípidos apolares são eluídos antes dos polares (11).

Na RP-HPLC a fase móvel é mais polar que a fase estacionária (11, 74, 82). A RP-HPLC é normalmente usada para separar diferentes fosfolípidos de uma mesma classe, ou seja, que possuam diferentes comprimentos e diferentes insaturações nos ácidos gordos que os constituem (11, 82). Os fosfolípidos compostos por ácidos gordos mais curtos apresentam maior tempo de retenção. Contudo, devido à grande variedade de comprimentos e insaturações dos ácidos gordos, a RP-HPLC é mais demorada e apresenta uma menor resolução (11). No entanto, se utilizarmos colunas octadecilsilano (C18) ou octilsilano (C8) consegue-se separar fosfolípidos oxidados dos fosfolípidos não oxidados, uma vez que os fosfolípidos oxidados são mais polares que os fosfolípidos não oxidados (82).

Em relação à fase móvel, nem sempre se consegue obter uma boa separação de analitos utilizando apenas um solvente como eluente, pelo que se utiliza frequentemente uma mistura de solventes (74). No entanto, quando os analitos da amostra possuem grandes diferenças de polaridades, uma mistura de solventes pode ainda não conseguir uma separação adequada de todos os analitos. De modo a contornar este problema, faz-se variar de uma forma controlada a composição da fase móvel ao longo da análise (74). Os processos de separação em que o composto da fase móvel se mantém constante são denominados por eluição isocrática, enquanto que aqueles cuja composição da fase móvel varia de forma controlada durante a separação são denominados por gradiente de eluição (74). O gradiente de eluição é o mais utilizado para a separação de fosfolípidos, uma vez que estes possuem uma ampla gama de polaridades. Nestes casos, começa-se por utilizar um solvente pouco polar e termina-se com uma mistura de solventes muito polar (11).

O detetor deve ser escolhido tendo em conta as características dos analitos e o tipo de análise que se pretende realizar (74). Em HPLC podem ser utilizados detetores de ultravioleta (UV), fluorescência, eletroquímicos, condutividade e índice de refração (RI) (74). O detetor UV possui uma elevada sensibilidade, e pode ser utilizado no estudo de fosfolípidos, uma vez que estes absorvem na região UV entre 190 e 210 nm devido às ligações duplas C=C e aos grupos carbonilo. Deste modo, os fosfolípidos saturados podem não ser detetados, pelo que se opta por derivatizar a amostra. Outra desvantagem deste detetor é o facto de não se poder utilizar o clorofórmio, acetona e éter etílico na fase móvel, uma vez que estes solventes são absorvidos na região do UV (11). O detetor de fluorescência também possui uma elevada sensibilidade na deteção de fosfolípidos, mas raramente é utilizado em HPLC porque os fosfolípidos não contêm fluoróforos e por isso precisam de ser derivatizados, para se poderem observar (11). O detetor de índice de refração requer uma eluição isocrática, que, como já foi referido anteriormente, não é a mais adequada para a separação de fosfolípidos. Apresenta ainda uma baixa sensibilidade e reprodutibilidade por ser muito sensível a pequenas variações de temperatura, pressão, fluxo e de solventes. Deste modo, não é o detetor mais eficaz no estudo de fosfolípidos (11).

Por último, a HPLC pode ser acoplado a um espectrómetro de massa. O espectrómetro de massa acoplado a HPLC possui, geralmente, uma fonte de electrospray

(ESI), uma vez que a mistura de solventes aquosos e orgânicos resultantes do HPLC é facilmente pulverizada na fonte de ionização do ESI-MS. A vantagem da utilização de um espectrómetro de massa como detetor é permitir a diferenciação de analitos com tempos de retenção semelhantes. Pode ainda permitir a identificação e/ou quantificação de analitos que são parcialmente separados ou até mesmo os que não são separados por HPLC (74).

### 3.2. Espectrometria de Massa

A espectrometria de massa começou a ser desenvolvida por J. J. Thomson e o seu aluno F. W. Aston nos princípios do século XX, sendo hoje uma das técnicas mais sensíveis na caracterização estrutural de inúmeras biomoléculas, tais como lípidos e proteínas (83, 84).

Um espectrómetro de massa é constituído por 3 componentes: (i) uma fonte de ionização, (ii) os analisadores e (iii) o detetor (Figura 8) (10, 85, 86). A amostra é introduzida na fonte de ionização, na qual ocorre a ionização das moléculas da amostra, que em seguida são conduzidas até ao analisador onde são separadas segundo a razão massa/carga ( $m/z$ ), e posteriormente detectadas no detetor (85, 87, 88). Os resultados aparecem sobre a forma de um espectro, no qual o valor  $m/z$  dos iões aparece no eixo das abcissas e a abundância relativa (apresentada sob a forma de intensidade relativa) no eixo das ordenadas, depois de uma normalização na qual se apresenta como 100% o ião mais abundante (10, 87, 88). Os dados obtidos por espectrometria de massa estão directamente dependentes do método de introdução da amostra e do método de ionização utilizados (10).

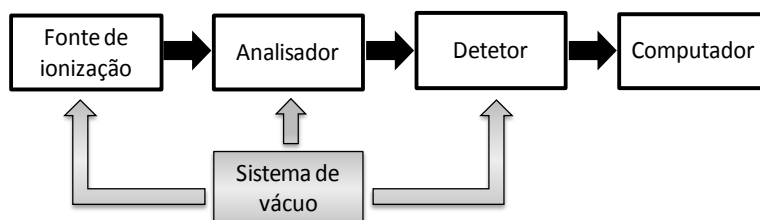


Figura 8 - Os componentes principais de um espectrómetro de massa são a fonte de ionização, analisador e detetor. Os sinais emitidos pelo detetor são depois enviados para um computador o qual gera os espectros de massa. (adaptado de (86)).

Os primeiros espectrómetros de massa permitiam apenas obter espectros de varrimento, sendo a análise útil apenas para uma gama restrita de compostos, nomeadamente compostos de baixo peso molecular e voláteis. Por outro lado, devido à

energia transferida, ocorria a fragmentação do ião molecular na fonte. Perante esta limitação, mais tarde surgiram as técnicas de ionização suave, as quais já permitiam a análise de compostos de maior peso molecular, de compostos não voláteis e ainda a análise de misturas (84). Como técnicas de ionização suave temos o bombardeamento por átomos rápidos (FAB), ionização por electrospray (ESI) e ionização por dessorção por laser assistida por matriz (MALDI). Sendo estas técnicas de ionização suave, apenas promovem a protonação, desprotonação de espécies ou a formação de aductos, o que limita em muito a caracterização estrutural dos compostos, uma vez que apenas dá informação sobre o peso molecular dos compostos. De modo a colmatar esta lacuna, surgiu a espectrometria de massa tandem, a qual se veio a revelar essencial na análise estrutural de uma grande variedade de compostos biológicos tais como proteínas, péptidos, ácidos nucleicos (84) e fosfolípidos (10).

As técnicas de ionização mais utilizadas hoje em dia para a análise de compostos não voláteis e compostos de elevado peso molecular são o ESI e o MALDI (89). O MALDI é muito utilizado no estudo da proteómica mas é pouco utilizado na análise de fosfolípidos com vista à obtenção de informações estruturais. Isto deve-se ao facto de existir uma grande afinidade lipídica para iões de sódio e potássio, o que origina iões e aductos de cada espécie molecular, tornando difícil a interpretação de espectros de uma única classe de fosfolípidos (10). Por este motivo, neste trabalho é feito apenas uma breve referência ao ESI, uma vez que é o método de ionização mais utilizado na análise de fosfolípidos, e o qual será utilizado no parte experimental deste trabalho.

### **3.2.1. Ionização por Eletrospray (ESI)**

A década de 1980 foi particularmente importante no desenvolvimento da espectrometria de massa, uma vez que foi nesta década que John Fenn apresentou a ionização por eletrospray (ESI) e Koichi Tanaka desenvolveu a ionização por dessorção por laser assistida por matriz (MALDI) como fontes de ionização suave de um espectrómetro de massa, o que em 2002 lhes valeu o prémio Nobel da Química (86). A ionização por eletrospray tem vindo a ser utilizada na análise de uma série de compostos, nomeadamente proteínas e péptidos, açúcares, drogas e fosfolípidos (87). Moléculas com diferentes grupos funcionais e diferentes pesos moleculares, podem ionizar de diferentes maneiras. As moléculas pequenas têm tendência a originar iões monoprotonados ( $[M+H]^+$ )

ou monodesprotonados ( $[M-H]^-$ ), enquanto que as moléculas de maior peso molecular ( $> 2000$  Da) têm tendência a originar iões multiprotonados ou multidesprotonados (83). Esta característica é uma vantagem na análise de moléculas de elevado peso molecular, uma vez que os valores  $m/z$  serão mais baixos e podem ser detetados mesmo em espectrómetros de massa com limites de deteção  $m/z$  baixos (74).

A ionização por eletrospray (Figura 9) ocorre em diferentes fases que incluem: (i) formação de um spray com gotas carregadas a partir da solução que contém o analito e (ii) vaporização do solvente de forma a obter os iões na fase gasosa (88). A solução que contém o analito é introduzida num capilar, no qual é aplicada uma voltagem elevada. A voltagem pode ser negativa ou positiva, consoante o tipo de análise pretendida (ESI em modo positivo ou ESI em modo negativo) (74), a qual vai gerar um gradiente de campo elétrico necessário para produzir a separação das cargas à superfície do líquido, o que resulta na projeção do líquido para fora da extremidade do capilar, a qual é designada por *cone de Taylor* (85). A formação de gotas carregadas resulta da combinação da elevada voltagem aplicada à extremidade do capilar e do fluxo coaxial de um gás nebulizador (azoto). Este gás nebulizador faz com que o solvente seja evaporado, o que favorece a formação dos iões na fase gasosa, os quais são posteriormente analisados no analisador em função da sua  $m/z$  (74). A um espectrómetro podem ser acoplados diferentes analisadores, como por exemplo analisadores do tipo magnético, quadrupolo, tempo de voo ou trapa de iões (87).

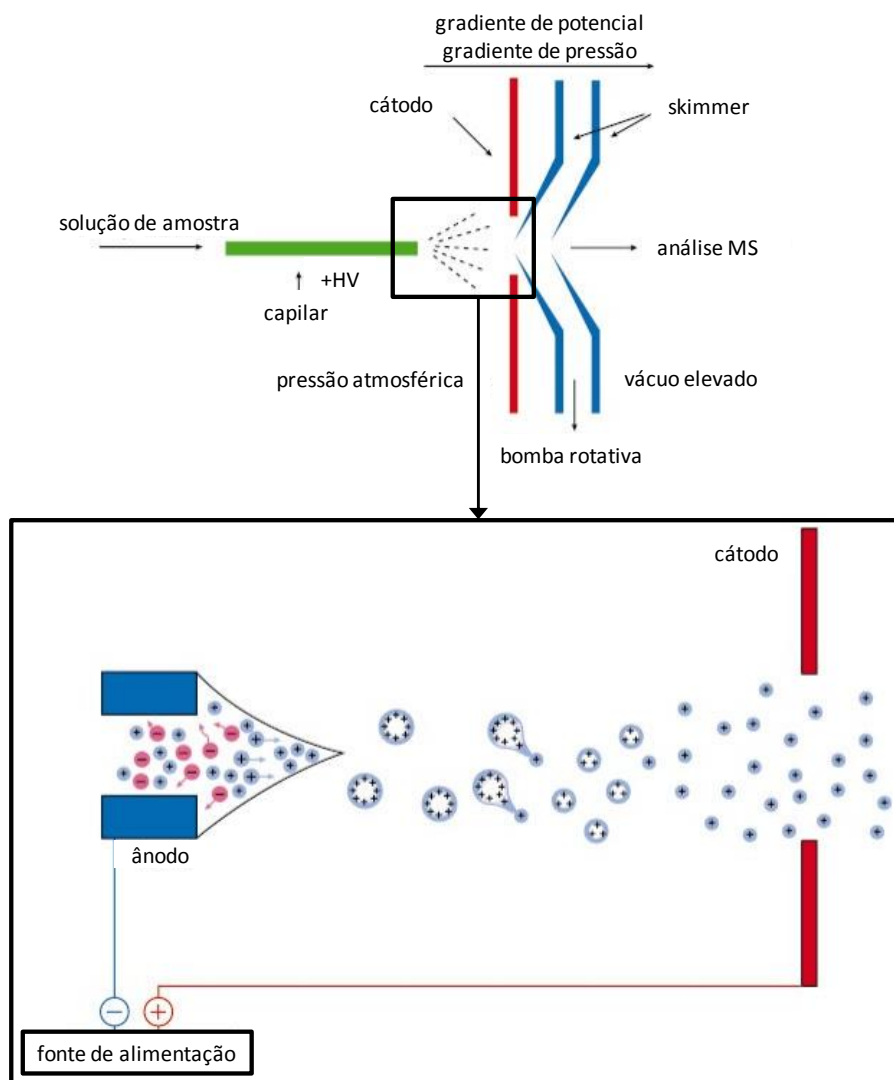


Figura 9 - Processo de ionização por eletrospray. Formação de uma nuvem composta por gotículas contendo moléculas de solvente e íões do analito resultante da alta voltagem aplicada na extremidade do capilar. O fluxo coaxial de um gás nebulizador provoca a evaporação das moléculas de solvente, favorecendo a formação dos íões na fase gasosa, os quais são analisados no analisador de massa (adaptado de (83)).

A passagem dos íões que se formam na fonte de ionização, a qual se encontra à pressão atmosférica, para o analisador que se encontra sob vácuo é efetuada através de uma série de câmaras com gradiente de pressão e gradiente de potencial. É este gradiente de potencial que quando aplicado às lentes vai direcionar o feixe de íões para o analisador (87).

### 3.2.2. Espectrometria de massa tandem (MS/MS)

A espectrometria de massa tandem surgiu da necessidade de colmatar a falta de informação estrutural sobre os compostos. Inicialmente tinha por base o acoplamento de dois ou mais analisadores, com o objetivo de obter uma informação estrutural dos compostos a analisar (87, 88). Na análise por espectrometria de massa tandem, é selecionado o ião precursor no primeiro analisador (Q1), o qual vai sofrer fragmentação por colisão com um gás inerte na célula de colisões (Q2), e posteriormente são analisados os fragmentos produzidos em Q2 no segundo analisador (Q3), tal como se pode observar na Figura 10 (10, 83, 86). Esta análise deverá ser denominada por MS/MS. Aquando das colisões entre o ião precursor e os átomos do gás inerte, parte da energia translacional do ião precursor pode ser convertida em energia interna, provocando um estado de excitação nos iões, os quais são então decompostos em fragmentos por um processo denominado Dissociação Induzida por Colisão (CID) (10, 83, 84, 86).

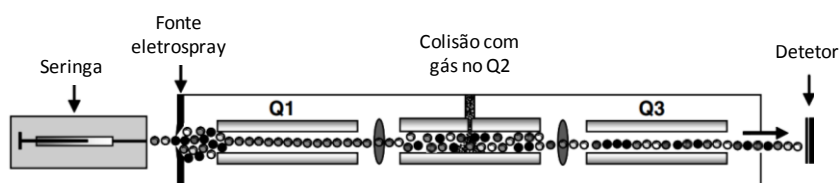


Figura 10 - Espectrómetro de massa triplo quadrupolo. Q1 e Q3 estão a operar como analisadores e Q2 como célula de colisões. Durante este processo, o ião precursor é selecionado em Q1 o qual passa para a célula de colisões (Q2). O ião precursor é então fragmentado por dissociação induzida por colisão (CID) e os fragmentos são depois analisados por  $m/z$  em Q3 (adaptado de (10)).

Os equipamentos mais utilizados hoje em dia e que permitem efetuar uma análise por espectrometria de massa tandem incluem analisadores híbridos quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), analisadores triplo quadrupolo e analisador de trapa de iões (83). Os analisadores de trapa de iões surgiram mais recentemente e possibilitam realizar a análise MS/MS com apenas um analisador. Isto verifica-se porque o analisador de trapa de iões tem capacidade de reter os iões selecionados na trapa, fazê-los colidir com um gás de maneira a provocar a sua dissociação, tudo na mesma câmara, para posteriormente proceder à sua deteção. Para além disso, ainda é possível manter qualquer um dos iões fragmento na trapa e repetir novamente o processo de colisão para provocar nova dissociação deste novo ião precursor. Esta análise deverá ser denominada por MS/MS/MS ( $MS^3$ ). Ou seja, os iões fragmentos resultantes do ião precursor podem ser sequencialmente

fragmentados e então podemos obter espectros de  $MS^n$ , os quais permitem obter uma informação sequencial dos fragmentos (86, 88).

A utilização da espectrometria de massa tandem permite obter uma informação estrutural mais detalhada dos compostos que se pretendem analisar, através da análise dos iões fragmento formados a partir do ião precursor previamente selecionado no primeiro analisador. Por este motivo, a análise MS/MS pode ser utilizada na elucidação estrutural de amostras desconhecidas (87).

A espectrometria de massa é hoje em dia uma técnica fundamental para a análise de lípidos e fosfolípidos de diversos tipos de células e tecidos, e também para a identificação das modificações de lípidos, nomeadamente por oxidação.

Antes dos avanços da espectrometria de massa era comum recorrer ao TLC para separar e identificar as diferentes classes dos fosfolípidos recorrendo a técnicas de deteção relativamente inespecíficas, nomeadamente a visualização do fósforo por reagentes de pulverização. Porém, era necessário recorrer à hidrólise do grupo acilo dos ácidos gordos presentes no fosfolípido e posterior derivatização de maneira a poder ser analisado por cromatografia gasosa ou mais tarde por cromatografia gasosa combinada com espectrometria de massa (GC-MS). No entanto, a análise por GC ou GC-MS tem a desvantagem de destruir a estrutura do fosfolípido, tornando difícil a análise de frações de membranas altamente purificadas e comprometendo assim o estudo de detalhes estruturais dos fosfolípidos (78). Com o aparecimento das técnicas de ionização suave, é possível analisar diretamente o fosfolípido como molécula intacta, preservando assim a informação inerente à sua estrutura química (78). Uma outra vantagem destas técnicas de ionização é o facto de se poderem acoplar com outras técnicas, por exemplo HPLC, permitindo assim separar os diferentes tipos de fosfolípidos e identificá-los logo de seguida (20, 78). Deste modo, a espectrometria de massa, nomeadamente as técnicas de ionização suave, é a técnica de eleição na análise de fosfolípidos (20, 78, 90) uma vez que combina sensibilidade, especificidade, seletividade e velocidade na obtenção de resultados (10). A espectrometria de massa combinada com técnicas cromatográficas, TLC e HPLC, é hoje em dia muito utilizada na análise do perfil de lípidos em diversos contextos biológicos.



#### **4. Objetivo da dissertação**

O objetivo desta dissertação foi avaliar o efeito da terapia fotodinâmica nos fosfolípidos da *Escherichia coli*, de maneira a perceber se a terapia fotodinâmica afecta a camada lipídica da parede bacteriana e quais as alterações estruturais que este tipo de fotossensibilização provoca nos fosfolípidos da membrana bacteriana, usando uma abordagem lipidómica. Para melhor compreender o tipo de oxidação que a terapia fotodinâmica provoca, estudou-se paralelamente a foto-oxidação de POPE e PLPE como padrões de fosfatidiletanolamina, utilizando espectrometria de massa uma vez que esta é a classe de fosfolípidos mais abundante na *E. coli*.

## **II. Material e Métodos**



## 1. Reagentes

Os padrões de fosfolípidos PG, CL e 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidiletanolamina (POPE) foram adquiridos na *Avanti<sup>®</sup> Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, USA)*. O clorofórmio e o metanol, ambos de qualidade indicada para análise em HPLC, foram adquiridos na *Fischer Scientific Ltd. (Leicestershire, UK)*. O peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (30%, m/v), a trietilamina e as placas TLC *silica gel 60 (20 x 20 cm)* com zona de concentração foram adquiridas na *Merck (Darmstadt, Alemanha)*. Também foi usada água *Milli-Q (Synergy<sup>®</sup>, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)*.

## 2. Bactéria e as condições de crescimento

Uma colónia de *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>TM</sup> (VA, USA) foi inoculada em TSB (*tryptic soy broth*) (*Merck*) e incubada durante a noite em condições aeróbias a 37°C. Uma alíquota de 100 µL de cultura foi transferida para um novo meio TSB e incubada nas mesmas condições até atingir a fase estacionária de crescimento (densidade ótica a 600 nm ≈1.6), correspondente a ≈10<sup>9</sup> unidades formadoras de colónias (CFU) ml<sup>-1</sup>. As células foram colhidas por centrifugação (13000 x g, 10 min, 4°C) (*Avanti<sup>®</sup> J-25, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA*), lavadas três vezes com solução tampão fosfato-salino (PBS: 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por litro e com pH 7,4) e ressuspendidas em PBS de forma a atingir uma concentração final de 10<sup>8</sup> UFC ml<sup>-1</sup>.

## 3. Fotossensibilizador

Como fotossensibilizadores foram usadas as porfirinas *5,10,15-tris(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl) porphyrin tri-iodide* (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) e *5,10,15,20-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrine tetra-iodide* (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me), preparadas de acordo com a literatura (91). A pureza das porfirinas foi confirmada por TLC e por espectrometria de ressonância magnética nuclear de protão. As soluções-mãe foram preparadas em sulfóxido de dimetilo (concentração 500 µM) e sonicadas à temperatura ambiente durante 30 minutos antes de usar.

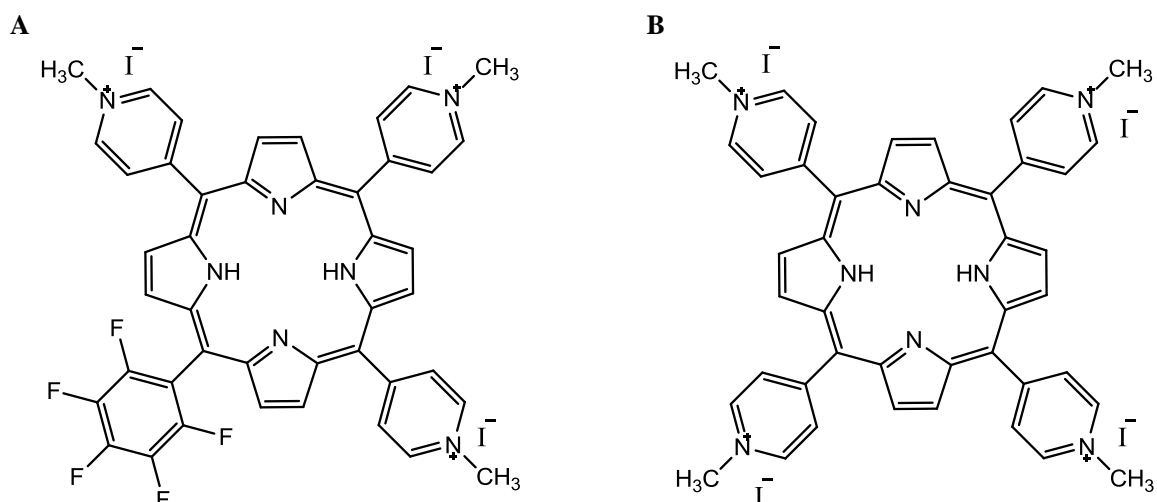


Figura 11 - Estrutura da porfirina 5,10,15-*tris*(1-methylpyridinium-4-yl)-20-(pentafluorophenyl) porphyrin tri-iodide (Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF) (A) e da porfirina 5,10,15,20-*tetrakis*(1-methylpyridinium-4-yl) porphyrine tetra-iodide (Tetra-Py<sup>+</sup>-Me) (B).

#### 4. Condições de irradiação na foto-oxidação

Às células ressuspendidas em PBS (49,5 mL num copo de vidro de 600 mL esterilizado) foram adicionados 500  $\mu$ L de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF a 500  $\mu$ M (concentração final 5,0  $\mu$ M). Foi preparado um controlo nas mesmas condições mas sem porfirina. A amostra e o controlo foram incubados no escuro durante 10 min, sob agitação (100 rpm) a 25°C, com o objetivo de promover a ligação da porfirina às células. Em seguida a amostra e o controlo foram irradiados com agitação 100 rpm, durante 90 min (dose de luz total 21,6 J cm<sup>-2</sup>), com luz branca artificial (radiação PAR, 380-700 nm, 13 OSRAM com 21 lâmpadas com 18 W cada) com uma radiância de 4 mW cm<sup>-2</sup> medida com um radiómetro LI-250 (*Li-Cor Inc., Lincoln, NE, USA*). Após irradiação, as células foram centrifugadas (10 min, 13000 x g, 4°C), lavadas três vezes com água *Milli-Q* a 4°C, e o precipitado foi mantido em gelo até à extração dos lípidos.

Para o ensaio com o padrão POPE, foi preparada uma amostra com 250  $\mu$ g de padrão POPE num copo de vidro de 50 mL esterilizado, ao qual foram adicionados 1980  $\mu$ L de tampão hidrogenocarbonato de amónia (5 mM, pH 7,4) e 20  $\mu$ L do fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (POPE amostra). No controlo, a solução da porfirina foi substituída pelo tampão hidrogenocarbonato de amónia (POPE controlo). Este foi sujeito às mesmas condições de irradiação descritas para POPE amostra. Após a irradiação, as soluções foram mantidas no gelo até à extração dos lípidos.

## 5. Extração lipídica

Os lípidos totais da bactéria foram extraídos seguindo o método *Bligh and Dyer* (92) modificado. As células bacterianas, obtidas por centrifugação, foram ressuspensas em 2 mL de água *Milli-Q*, transferidas para tubos de centrífuga de vidro *PIREX*<sup>®</sup>, aos quais foram adicionados 7,5 mL de clorofórmio:metanol (2:1, v/v). A mistura foi bem homogeneizada por uma inversão vigorosa dos tubos, e incubou-se em gelo durante 210 min. As amostras foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 min, (*Mixtasel, JP Selecta S.A.*, Barcelona, Espanha) à temperatura ambiente, de modo a separar a fase aquosa, que se situa em cima, da fase orgânica, que se situa em baixo. Depois de recolher para um tubo novo a fase orgânica, na qual se encontram os lípidos, a extração foi repetida mais duas vezes. Os extratos foram secos numa corrente de azoto, dissolvidos em 300 µL de clorofórmio e armazenados a -20°C em frascos de vidro escuros de 2 mL.

A extração dos fosfolípidos do ensaio com o padrão POPE foi realizada também em tubos de vidro *PIREX*<sup>®</sup>, ao qual se adicionaram os 2 mL da solução irradiada e uma mistura de clorofórmio:metanol:água *Milli-Q* (8:4:1 v/v/v). A mistura foi bem homogeneizada no vortex, em seguida foi centrifugada à temperatura ambiente durante 10 min a 2000 rpm e recolheu-se a fase orgânica para um tubo novo. Depois de secos numa corrente de azoto, os extratos foram ressuspensos em 300 µL de clorofórmio e armazenados a -20°C em frascos de vidro escuros de 2 mL.

## 6. Quantificação de fosfolípidos pelo ensaio de fosfato

A quantificação de fosfolípidos no extrato total e nas manchas separadas por TLC foi realizada de acordo com Bartlett e Lewis (93). Adicionou-se ácido perclórico concentrado (0,5 mL, 70% m/v) às amostras em tubos de vidro lavados previamente em ácido, e a mistura foi incubada durante 60 min a 180°C num bloco de aquecimento (*Block Heater SBH200D/3, Stuart*<sup>®</sup>, *Bibby Scientific Ltd., Stone, UK*). Após a incubação foram adicionados 3,3 mL de água *Milli-Q*, 0,5 mL molibdato de amónio (2,5%) e 0,5 mL ácido ascórbico (10%). A mistura foi bem homogeneizada num vortex após cada adição, e incubou-se durante 10 min a 100°C num banho de água (*Precistern, JP Selecta S.A.*). Preparam-se padrões de fosfato com concentrações entre 0,1 e 2 µg a partir da solução-mãe de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O (100 µg mL<sup>-1</sup> de fosfato), os quais foram submetidos ao mesmo tratamento que as amostras. A absorvância dos padrões e das amostras foi medida à

temperatura ambiente, a 800 nm, num espectrofotômetro de UV-Vis de microplacas (*Multiskan GO, Thermo Scientific, Hudson, NH, USA*). A quantidade de fósforo presente em cada amostra foi calculada por regressão linear resultante do gráfico que relaciona a quantidade de fósforo presente nos padrões (eixo do X) e de absorvância obtidos a partir de duplicados de várias concentrações (eixo do Y). A quantidade de fosfolípido foi diretamente calculada multiplicando a quantidade de fósforo por 25. A percentagem de cada classe de fosfolípidos refere-se ao teor total de fósforo presente nos fosfolípidos recuperados a partir de TLC, e foi calculada comparando a quantidade de fósforo em cada mancha com a quantidade total de fósforo da amostra, dando, assim, a abundância relativa de cada classe de fosfolípido.

## **7. Separação das classes de fosfolípidos por cromatografia de camada fina (TLC)**

Os fosfolípidos do extrato total de lípidos foram separados por TLC usando placas de sílica gel. Antes da separação, as placas foram lavadas com uma mistura de clorofórmio:metanol (1:1,v/v), deixadas a secar na hote e em seguida foram à estufa durante 15 min a 100°C. Depois de arrefecerem, 20 µL da solução de fosfolípidos em clorofórmio (com uma concentração de 150 µg de fosfolípidos por 100 µL de clorofórmio) foram aplicados em diferentes pontos na zona de concentração da placa. Em alguns pontos da placa de TLC também foram uma mistura de padrões de fosfatidiletanolaminas, fosfatidilglicerol e cardiolipinas para posterior comparação com as bandas das amostras. Depois de secar as placas na corrente de azoto, estas foram colocadas numa câmara cromatográfica contendo como eluente uma mistura de clorofórmio:etanol:água:triethylamina (30:35:7:35, v/v/v/v). Após a eluição, as placas foram deixadas na hote para que o eluente evaporasse. Para revelar as manchas dos fosfolípidos, pulverizou-se as placas com uma solução de primulina (50 µg/100 mL de acetona:água, 80:20, v/v) e deixou-se secar na hote. Em seguida, as manchas foram visualizadas com luz UV ( $\lambda = 254$  nm) (*Camag, Berlin, Germany*) (94). Por comparação com as manchas dos padrões de fosfolípidos também adicionados nas placas, foi possível identificar as manchas de fosfolípidos das amostras, as quais foram raspadas das placas para tubos de vidro. As diferentes classes de fosfolípidos foram quantificadas pelo ensaio de fósforo acima

descrito, ou foram extraídos da sílica com uma solução de clorofórmio:metanol (2:1) e posteriormente analisados por espectrometria de massa.

## 8. Quantificação de hidroperóxidos lipídicos pelo ensaio de FOX2

O ensaio FOX2 (*ferrous oxidation-xylene orange*) foi realizado de acordo com Wolff (95). Os hidroperóxidos lipídicos foram quantificados nos dos extratos lipídicos totais dos controlos e das amostras da *E. coli* (após irradiação). Para este ensaio foram adicionadas alíquotas (50 µL) de extrato lipídico total do controlo e da amostra ao reagente de FOX2 (950 µL) em microtubos, homogeneizou-se num vortex e deixou-se a reagir no escuro, durante 30 min à temperatura ambiente. Foram feitos padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com concentrações entre os 0 e 4 mM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 mM, reagente de FOX2 e água). Após a incubação, a absorvância das amostras foi lida a 560 nm contra os padrões de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

O reagente de FOX2 (100 mL) foi preparado da seguinte maneira: 250 µM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>).6H<sub>2</sub>O (9,8 mg) e 25 mM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (139 µL) foram dissolvidos em 5 ml de água, misturados com 4 mM de 2,6-di-*terc*-butil-*p*-hidroxitolueno (BHT) (88,2 mg), com 100 µM de laranja de xilenol (7,2 mg) e 45 mL de metanol; em seguida foram adicionados mais 45 mL de metanol e 5 mL de água.

## 9. Análise por espectrometria de massa (MS)

A análise de fosfolípidos foi realizada por espectrometria de massa com ionização por eletrospray (ESI-MS) e análise por espectrometria de massa tandem (MS/MS) no modo negativo num espectrómetro de massa *LXQ linear ion trap* (ThermoFischer, Finnigan<sup>TM</sup>, San Jose, CA, USA). As condições da fonte de eletrospray foram as seguintes: voltagem do electropray de 4,7 kV; temperatura do capilar de 275°C e fluxo de gás de 25 unidades. A variação de massas permitida foi de 0,5 Da e foi usado um tempo de ativação de 30ms para as experiências de MS/MS. Os espectros de MS e MS/MS foram adquiridos com um tempo máximo de ionização de 50 ms e 200 ms, respetivamente. A energia de colisão utilizada variou entre 17 e 20 (unidades arbitrárias) para as experiências de MS/MS. Para a aquisição e visualização dos dados utilizou-se o programa *Xcalibur data system* (V2.0).



## 10. Análise de ácidos gordos por Cromatografia Gasosa com Detetor de Ionização de Chama (GC-FID)

Os ácidos gordos totais foram determinados por GC após transesterificação dos extratos lipídicos bacterianos (aproximadamente 30 µg de fosfolípidos), tendo como base o trabalho de Aued-Pimentel *et al.* (96). Os ésteres metílicos foram preparados utilizando uma solução de hidróxido de potássio (200 µL, 2,0 M) em metanol, ao qual se adicionou hexano (1 mL) e se homogeneizou muito bem. Em seguida, para formar duas fases de extração adicionou-se uma solução saturada de NaCl (2 mL), seguindo-se uma centrifugação a 2000 rpm durante 5 min. Recolheu-se a fase orgânica para um novo tubo e secou-se na corrente de azoto. Ao tubo seco adicionou-se hexano (20 µL) para ressuspender os ésteres metílicos e desta solução foram injetados 2 µL no GC.

O cromatógrafo de gás (*Clarus 400, PerkinElmer, Inc., MA, USA*) foi equipado com uma coluna DB-1 com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme (*J&W Scientific, Agilent Technologies, Folsom, CA, USA*) e um detetor de ionização de chama. O injetor do GC foi programado a 250°C e o detetor a 270°C. A temperatura do forno foi variada em três rampas: inicialmente ficou 3min a 50°C, aumentou para 180°C (25°C min<sup>-1</sup>), depois de 6 min voltou a aumentar até 260°C (40°C min<sup>-1</sup>) no qual se manteve por 3 min, perfazendo um total de 19 min. O gás transportador era hidrogénio com um caudal de 1,7 mL min<sup>-1</sup>. As concentrações relativas dos ácidos gordos foram calculadas pelo método da área percentual com normalização adequada, considerando a soma de todas as áreas dos ácidos gordos identificados. Para a aquisição e tratamento dos dados utilizou-se o programa *TotalChrom Navigator Software*.

## 11. Análise estatística

A quantificação de fosfolípido e a quantificação de hidroperóxidos foram realizados de forma independente, em triplicado ( $n=3$ ), tanto para o controlo como para a amostra. Os resultados foram analisados utilizando um método de variância simples (*one-way ANOVA*) com o teste *post-hoc* Bonferroni (para a quantificação de fosfolípidos), e o teste t de Student (para a quantificação de hidroperóxidos) e são apresentados como médias ± desvio padrão. A estatística foi realizada utilizando o *PRISM*® *GraphPad Software, Inc.* (*La Jolla, CA, USA*). Um valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **III. Resultados e Discussão**



Este trabalho teve como objetivo estudar possíveis modificações em fosfolípidos da *E. coli* resultantes da foto-oxidação na presença de fotossensibilizadores porfirínicos. A bactéria escolhida foi a *E. coli*, uma das bactérias Gram (-) mais estudadas, e que apresenta as PEs como componentes principais das membranas lipídicas. A estirpa *E. coli* estudada foi a estirpe ATCC 25922 que foi, recentemente, alvo de vários estudos de terapia fotodinâmica (97). A porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF foi reconhecida em estudos anteriores por ser um fotossensibilizador muito eficiente na foto-inativação de fagos (49, 51), bactérias (61, 91, 98) e esporos bacterianos (52, 60), sendo, por isso, o fotossensibilizador escolhido para os testes com a *E. coli*. Nos testes com os padrões de PE, para além da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, foi ainda testada a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Apesar de se ter verificado que é menos eficaz que a Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, também já foi utilizada com sucesso na foto-inativação de bactérias (98). Estes estudos indicam que os microrganismos não são afetados pelas condições de radiação na ausência da porfirina e que a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF não apresenta toxicidade na ausência de luz, logo as alterações observadas em microrganismos resultam da combinação da porfirina com a radiação. Um estudo recente relata uma redução de cerca 6 log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> de *E. coli* ATCC 25922, quando o fotossensibilizador foi usado a 5 µM após 90 min de irradiação de 4mW cm<sup>-2</sup> (21,6 J cm<sup>-2</sup>) e uma concentração inicial de bactérias 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>(97). Estas condições foram utilizadas neste trabalho.

## 1. Estudo do perfil lipídico da *E. coli*

O perfil lipídico da *E. coli* foi inicialmente estudado recorrendo a uma abordagem lipidómica. A análise e quantificação dos fosfolípidos da *E. coli* foram realizadas após a separação por TLC das diferentes classes de fosfolípidos presentes nos extratos lipídicos totais da *E. coli* no controlo e na amostra. A separação cromatográfica mostrou três manchas diferentes tanto para as células irradiadas na ausência do fotossensibilizador (controlo), como para as células irradiadas na presença do fotossensibilizador (Figura 12A, linhas 2 e 3 respetivamente). As três manchas foram identificadas como PEs, PGs e CLs, tendo sido identificadas por comparação com os padrões de fosfolípidos (PE, PG e CL) adicionados nas linhas 1 e 4 da Figura 12 e ainda pela análise do extracto obtido de cada mancha por ESI-MS e MS/MS. A quantidade de fosfolípidos em cada mancha foi

determinada pelo ensaio de fosfato, sendo que as percentagens relativas de cada classe no extrato do controlo foram aproximadamente de 53% PE, 40% PG e 7% CL (Figura 12B).

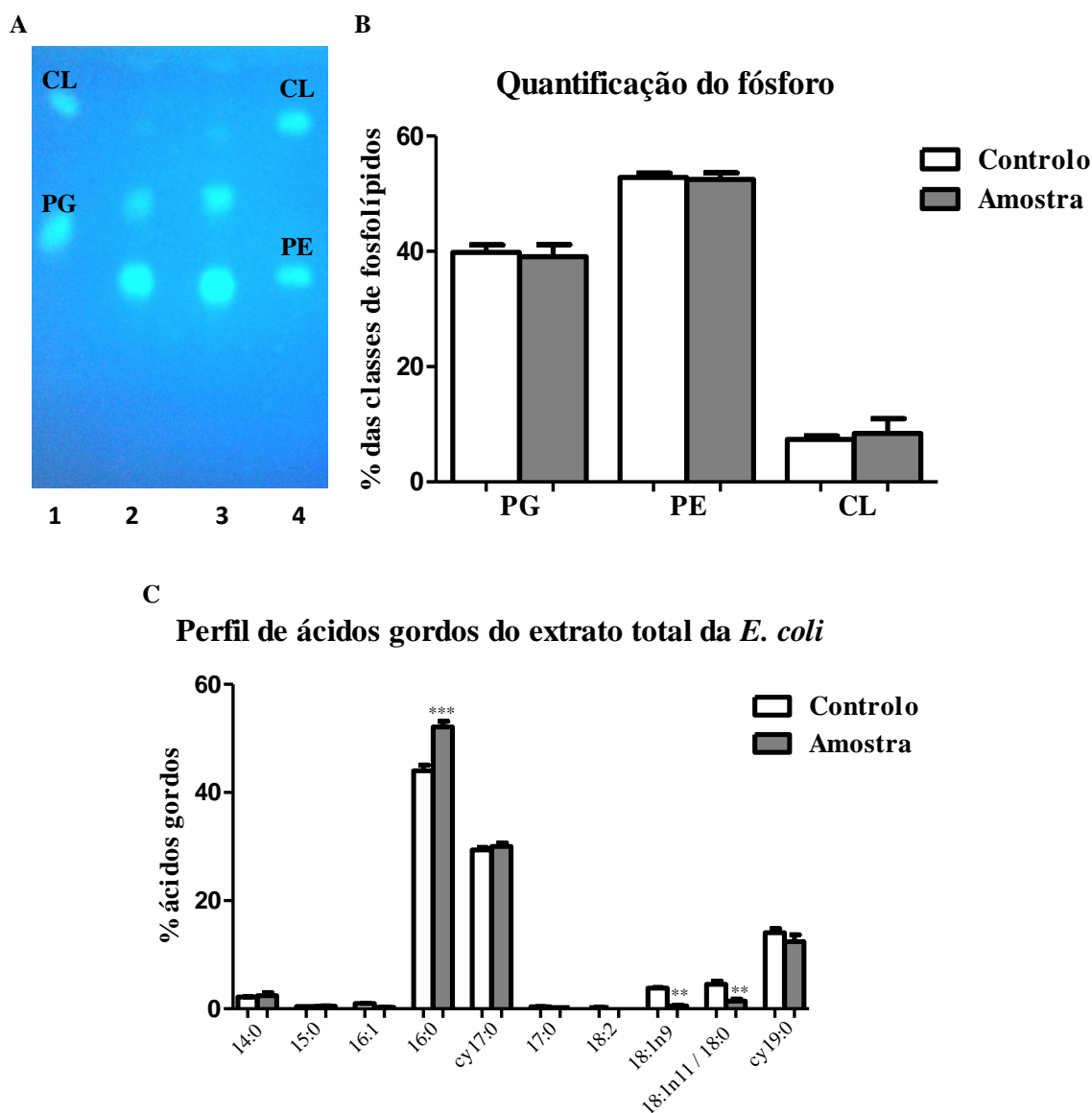


Figura 12 – (A) Cromatografia de camada fina do extratos lipídicos totais da *E. coli*. As linhas 1 e 4 correspondem aos padrões de fosfolípidos puros: fosfatidilglicerol (PG, linha 1), fosfatidiletanolamina (PE, linha 4) e cardiolipina (CL, as linhas 1 e 4). A linha 2 representa as diferentes frações das células irradiadas na ausência do fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (controlo) e a linha 3 representa as diferentes frações das células irradiadas na presença do fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (amostra). (B) Percentagem relativa das diferentes classes de fosfolípidos separados por TLC do controlo e da amostra. As barras de erro representam o desvio padrão de três experiências independentes ( $p > 0,001$ ). (C) Percentagem relativa dos ácidos gordos mais abundantes na *E. coli* analisados por GC-FID, Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão, \*\*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

Os resultados da quantificação das classes são concordantes com os dados publicados na literatura, em que as PEs são a classe mais abundante (70-75%) seguindo-se

as PGs (20-25%) e por último as CLs (5-10%) (41), ainda que parâmetros como a estirpe, meio de crescimento, temperatura e o tempo de incubação das bactérias possam influenciar os resultados. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre a abundância relativa de cada classe de fosfolípidos no extrato do controlo e no extrato da amostra, após fotoxidação.

A quantificação relativa de ácidos gordos dos extratos lipídicos totais do controlo e da amostra após tratamento fotodinâmico foram analisados por GC-FID (Figura 12C). Através da análise por GC-FID foi possível identificar os ácidos gordos C14:0, C15:0, C16:0, C16:1, cyC17:0, C17:0, C18:0, C18:1 (C18:1n9 e C18:1n11), cyC19:0, todos estes já identificados na literatura (92, 99, 100), e ainda o ácido gordo C18:2. Curiosamente, apesar do ácido linoleico não ser considerado um dos principais ácidos gordos presentes na *E. coli*, este já foi identificado por GC-MS num extracto de *E. coli* (101). No entanto, não foi possível separar os ácidos C18:1n11 e o C18:0 através da análise por GC-FID com uma coluna DB-1, mas sabe-se que estes dois ácidos gordos estão presentes na *E. coli* e já foram detetados por GC-MS (101). Após a irradiação, e por comparação com o controlo, é possível observar algumas diferenças significativas na quantidade relativa de alguns ácidos gordos. Houve um aumento significativo no teor relativo do C16:0 ( $p < 0,001$ ) e uma redução no teor relativo das espécies mono-insaturadas C16:1, C18:1n9 e no C18:1n11/C18:0, sendo que as diferenças significativas para a diminuição dos ácidos gordos insaturados são só observadas para os ácidos gordos com 18 carbonos ( $p < 0,05$ ). A diminuição dos ácidos gordos monoinsaturados deve-se, provavelmente, a modificações provocadas por oxidação destes ácidos gordos, após fotossensibilização. O facto dos ácidos gordos insaturados diminuírem, por sofrerem oxidação e estes não serem quantificados pelo GC-FID, faz com que a quantidade relativa de alguns dos ácidos gordos saturados aumente, uma vez que estamos a trabalhar com uma quantificação relativa.

Para identificar as espécies moleculares de cada classe de fosfolípidos e a sua composição em ácidos gordos, extraíram-se da sílica as classes de fosfolípidos do extrato controlo previamente separadas por TLC e os extractos de cada classe de fosfolípido foram posteriormente analisados por ESI-MS (Figura 13A1, B1 e C1) e ESI-MS/MS (Figura 13A2, B2 e C2).

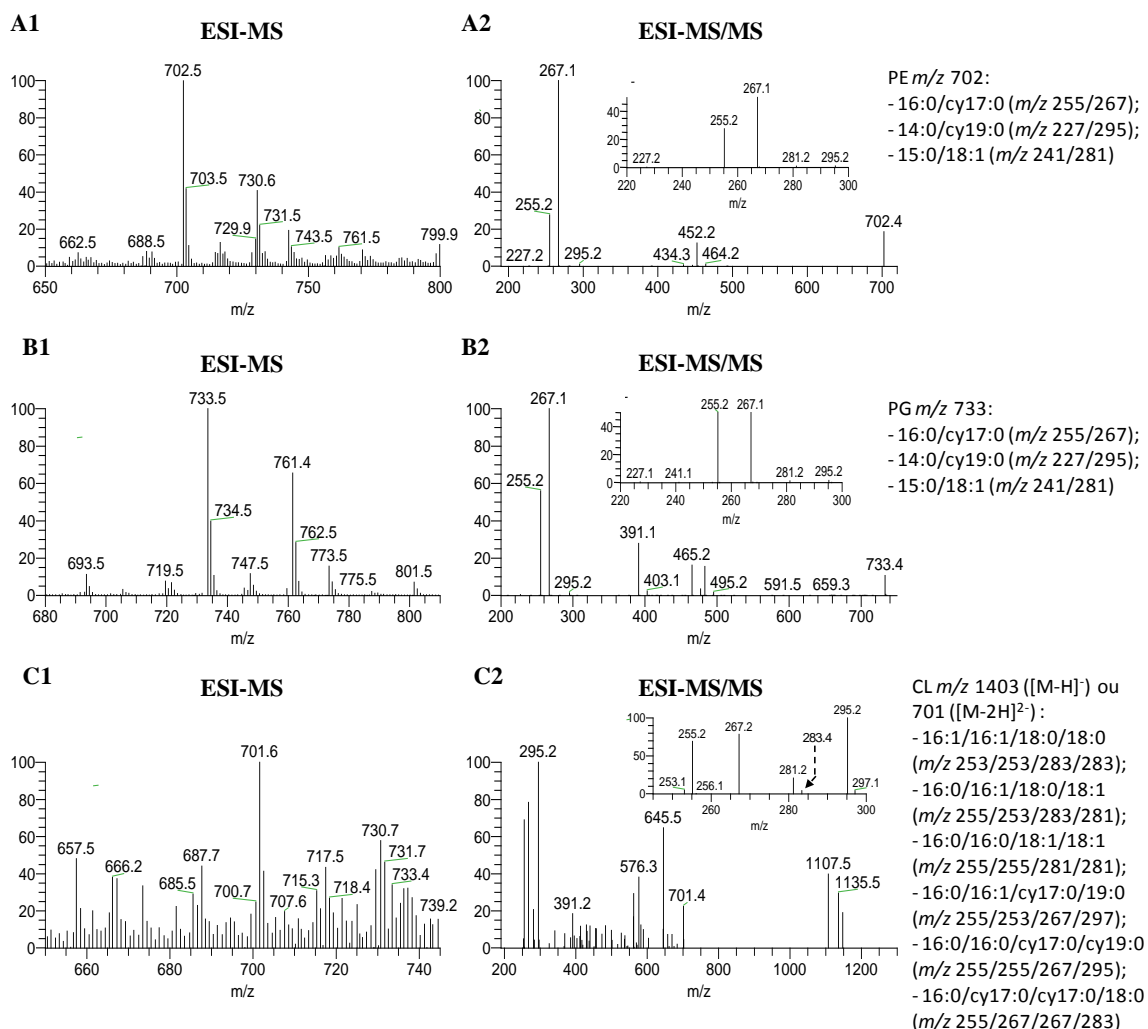


Figura 13 - Espectros ESI-MS das PEs, PGs, e CLs da *E. coli* (A1, B1 e C1 respetivamente). Espectros ESI-MS/MS do ião  $[M-H]^+$  da espécie molecular mais abundante da PE, PG e CL (A2, B2 e C2 respetivamente). Todos os espectros de MS/MS são obtidos dos respetivos iões  $[M-H]^+$  excepto o espectro CL que é de carga dupla  $[M-2H]^{2+}$ . As combinações de ácidos gordos de cada espécie molecular estão identificadas ao lados dos espectros ESI-MS/MS.

Para cada espécie molecular identificada por ESI-MS, podem corresponder mais que uma combinação de ácidos gordos. Ao analisar os espectros na zona de valores de  $m/z$  entre 200-350, é possível identificar diferentes combinações de ácidos gordos para cada espécie molecular PE. A mesma análise foi feita para as classes PGs. Em relação às CL, foi necessário recorrer ao ESI-MS/MS dos valores  $m/z$  de carga dupla uma vez que o limite mínimo do espectro corresponde a dois terços do valor  $m/z$  do ião que queremos fragmentar, sendo que não seria possível observar os iões  $m/z$  entre 200-350 nos espectros de carga unitária. A caracterização do conteúdo em ácidos gordos de cada espécie de PE, PG e CL está descrito nas tabelas 1-3 respetivamente.

Tabela 1 - Espécies moleculares maioritárias de fosfatidiletanolaminas identificadas no extrato lipídico da *E. coli*. Os íões  $[M-H]^-$  presentes na tabela foram identificados no espectro ESI-MS das fosfatidiletanolaminas. Recorrendo à espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), foi possível identificar quais as espécies de ácidos gordos que compunham cada um dos íões identificados no espectro ESI-MS. Os números entre parêntesis (C:N) indicam o número de átomos de carbono (C) e ligações duplas (N) nas cadeias laterais de ácidos gordos, e cy indica que o ácido gordo possui uma porção cíclica na cadeia carbonada. Os pares de ácidos gordos que possuem \* já foram identificados por Kol, M.A., *et al.*, 2004 (99), e os que possuem \*\* foram identificados por Oursel, D., *et al.*, 2008 (92).

$m/z$ $[M-H]^-$ (C:N)	Cadeias de ácidos gordos Controlo
662.5 (30:0)	14:0/16:0*
688.5 (32:1)	16:0/16:1***; 14:0/18:1
688.5 (32:0 cy)	15:0/cy17:0**
690.5 (32:0)	16:0/16:0***; 14:0/18:0
702.5 (33:0 cy)	16:0/cy17:0***; 14:0/cy19:0; 15:0/18:1
714.6 (34:2)	16:1/18:1***; 16:0/18:2
714.6 (34:0 cy/cy)	cy17:0/cy17:0***
716.5 (34:1)	16:0/18:1***; 16:1/18:0
716.5 (34:0 cy)	17:0/cy17:0; 15:0/cy19:0
728.5 (35:1 cy)	cy17:0/18:1; 16:1/cy19:0
730.6 (35:1)	17:0/18:1***; 16:1/19:0
730.6 (35:0 cy)	16:0/cy19:0**; cy17:0/18:0***
742.5 (36:2)	18:1/18:1***; 16:1/20:1; 16:0/20:2
742.5 (36:0 cy/cy)	cy17:0/cy19:0**
744.5 (36:1)	16:0/20:1; 18:0/18:1*; 16:1/20:0; 14:0/22:1
744.5 (36:0 cy)	cy17:0/19:0; 17:0/cy19:0
758.5 (37:1)	16:0/21:1; 18:1/19:0; 17:0/20:1
758.5 (37:0 cy)	18:0/cy19:0; cy17:0/20:0
760.7 (37:0)	18:0/19:0; 16:0/21:0
770.5 (38:2)	18:1/20:1; 16:0/22:2
770.5 (38:1 cy)	cy17:0/21:1
770.5 (38:0 cy/cy)	cy19:0/cy19:0
772.5(38:1)	16:0/22:1; 18:1/20:0; 18:0/20:1; 17:0/21:1; 16:1/22:0
772.5 (38:0 cy)	19:0/cy19:0; cy17:0/21:0
774.5 (38:0)	19:0/19:0; 16:0/22:0



Tabela 2 - Espécies moleculares maioritárias de fosfatidilglicerol identificadas no extrato lipídico da *E. coli*. Os iões  $[M-H]^-$  presentes na tabela foram identificados no espectro ESI-MS de fosfatidilglicerol. Recorrendo à espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), foi possível identificar quais as espécies de ácidos gordos que compunham cada um dos iões identificados no espectro ESI-MS. Os números entre parêntesis (C:N) indicam o número de átomos de carbono (C) e ligações duplas (N) nas cadeias laterais de ácidos gordos, e cy indica que o ácido gordo possui uma porção cíclica na cadeia carbonada. Os pares de ácidos gordos que possuem \*\* foram identificados por Oursel, D., *et al.*, 2008 (92).

$m/z$ $[M-H]^-$	Cadeias de ácidos gordos
(C:N)	Controlo
691.5 (30:1)	14:1/16:0; 14:0/16:1
693.5 (30:0)	14:0/16:0**
705.6 (31:1)	15:0/16:1**
705.6 (31:0 cy)	14:0/cy17:0
719.5 (32:1)	16:0/16:1**; 14:0/18:1**
719.5 (32:0 cy)	15:0/cy17:0**
721.5 (32:0)	16:0/16:0**; 14:0/18:0
733.5 (33:1)	15:0/18:1
733.5 (33:0 cy)	16:0/cy17:0**; 14:0/cy19:0
747.5 (34:1)	16:0/18:1**; 18:0/16:1
747.5 (34:0 cy)	17:0/cy17:0; 15:0/cy19:0
761.5 (35:1)	17:0/18:1
761.5 (35:0 cy)	16:0/cy19:0**; 18:0/cy17:0
773.5 (36:2)	18:1/18:1
773.5 (36:0 cy/cy)	cy17:0/cy19:0
787.5 (37:1 cy)	18:1/cy19:0; cy17:0/20:1
801.5 (38:0 cy/cy)	cy19:0/cy19:0

Tabela 3 - Espécies moleculares maioritárias de cardiolipinas identificadas no extrato lipídico da *E. coli*. Os íons  $[M-H]^-$  presentes na tabela foram identificados no espectro ESI-MS da cardiolipina. Recorrendo à espectrometria de massa tandem (ESI-MS/MS), foi possível identificar quais as espécies de ácidos gordos que compunham cada um dos íons identificados no espectro ESI-MS. Os números entre parêntesis (C:N) indicam o número de átomos de carbono (C) e ligações duplas (N) nas cadeias laterais de ácidos gordos, e cy indica que o ácido gordo possui uma porção cíclica na cadeia carbonada. Os pares de ácidos gordos que possuem \*\*\* foram identificados por Hsu, F.F. and J. Turk, 2006 (100).

$m/z$ $[M-H]^-$ (C:N)	Cadeias de ácidos gordos Controlo
1363.6 (65:0 cy)	14:0/14:0/18:0/cy19:0
1363.6 (65:0 cy)	14:0/16:0/cy17:0/18:0
1363.6 (65:0 cy)	14:0/16:0/16:0/cy19:0
1375.7 (66:2)	14:0/16:0/18:1/18:1
1375.7 (66:2)	16:0/16:0/16:1/18:1***
1375.7 (66:0 cy/cy)	14:0/16:0/cy17:0/cy19:0
1375.7 (66:0 cy/cy)	16:0/16:0/cy17:0/cy17:0***
1375.7 (66:0 cy/cy)	14:0/14:0/cy19:0/cy19:0***
1389.6 (67:1 cy)	16:0/16:0/cy17:0/18:1***
1389.6 (67:1 cy)	14:0/16:0/18:1/cy19:0
1391.6 (67:1)	16:0/16:1/17:0/18:0
1391.6 (67:1)	14:0/17:0/18:0/18:1
1391.6 (67:1)	16:0/16:0/17:0/18:1
1391.6 (67:0 cy)	14:0/14:0/cy19:0/20:0
1391.6 (67:0 cy)	14:0/16:0/cy17:0/20:0
1391.6 (67:0 cy)	14:0/cy17:0/18:0/18:0
1391.6 (67:0 cy)	14:0/16:0/18:0/cy19:0
1391.6 (67:0 cy)	14:0/17:0/17:0/cy19:0
1391.6 (67:0 cy)	16:0/16:0/16:0/cy19:0
1403.6 (68:2)	16:1/16:1/18:0/18:0
1403.6 (68:2)	16:0/16:1/18:0/18:1
1403.6 (68:2)	16:0/16:0/18:1/18:1***
1403.6 (68:1 cy)	16:0/16:1/cy17:0/19:0
1403.6 (68:0 cy/cy)	16:0/16:0/cy17:0/cy19:0
1403.6 (68:0 cy/cy)	16:0/cy17:0/cy17:0/18:0
1415.6 (69:2 cy)	16:0/cy17:0/18:1/18:1
1415.6 (69:2 cy)	18:1/16:1/16:0/cy19:0***
1431.6 (70:0 cy/cy)	16:0/16:0/cy19:0/cy19:0

A composição em ácidos gordos das espécies moleculares dos fosfolípidos analisados por ESI-MS/MS (Tabela 1-3) está de acordo com o perfil de ácidos gordos identificados por GC-FID (Figura 12C). O perfil em ácidos gordos identificados por GC-FID para a estirpe da *E. coli* estudada está de acordo com a literatura (92, 99-101), e correspondem aos ácidos gordos presentes nas espécies moleculares dos fosfolípidos

identificados, apesar de alguns ácidos gordos identificados por ESI-MS/MS em espécies moleculares minoritárias, por estarem em pouca quantidade, não terem sido detetados no GC-FID.

A análise de ácidos gordos por GC-FID (Figura 12C) revela que a maioria dos ácidos gordos são saturados (C16:0) e cíclicos (cyC17:0 e cyC19:0). A caracterização das espécies moleculares da classe das PEs (Tabela 1) mostra algumas espécies moleculares com uma e até com duas insaturações, o que é importante uma vez que é a classe de fosfolípidos mais abundante na *E. coli*. Em relação à classe das PGs, elas são menos abundantes que as PEs, as espécies moleculares identificadas contêm majoritariamente ácidos gordos saturados e há menos espécies moleculares com ácidos gordos insaturados (Tabela 2). Apesar de as CLs serem compostas por quatro ácidos gordos, metade das espécies moleculares identificadas é composta por ácidos gordos cíclicos e saturados (Tabela 3). A outra metade das espécies moleculares de CLs tem apenas um ou dois ácidos gordos saturados.

## 2. Estudo da foto-oxidação de fosfatidiletanolaminas num sistema modelo

Uma vez que o objetivo deste trabalho era estudar o efeito da foto-oxidação no perfil lipídico da *E. coli* e as PEs são a classe de fosfolípidos mais abundante na membrana bacteriana desta estirpe, foram utilizados padrões de PE para compreender melhor o tipo de oxidação que ocorre nos fosfolípidos. Uma vez que apenas os ácidos gordos insaturados podem sofrer oxidação, e pela análise do perfil de ácidos gordos da *E. coli* encontramos uma grande quantidade de ácidos gordos monoinsaturados e alguns polinsaturados, utilizamos como modelos para a foto-oxidação os padrões 2-oleoil-1-palmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) e 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidiletanolamina (PLPE).

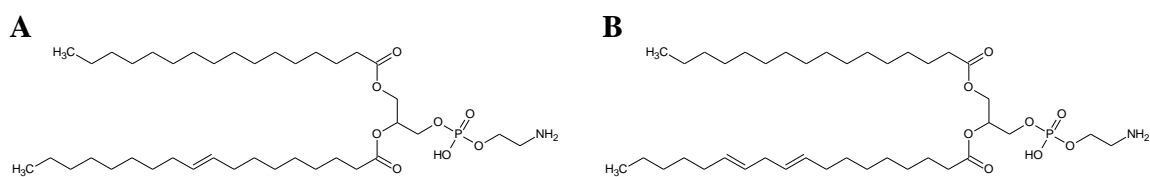
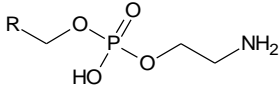


Figura 14 - Estruturas da POPE (A) e PLPE (B).

A comparação dos espectros ESI-MS dos padrões depois da irradiação na ausência e na presença de ambas as porfirinas utilizadas como fotosensibilizador (Figura 11), permitiu a identificação de novos iões de valores  $m/z$  mais elevados do que os iões  $[M-H]^-$  dos padrões de PE não modificados, nos espectros de POPE e PLPE oxidados. Estes novos iões foram identificados como produtos de oxidação de cadeia longa com derivados ceto, hidroxilo e hidroperóxido. Foram identificados produtos de oxidação da POPE com inserção entre 1 a 4 oxigénios, e produtos de oxidação da PLPE com inserção entre 1 a 6 oxigénios (Tabela 4).

Tabela 4 - Produtos de oxidação observados nos espetros ESI-MS de cada padrão de PE (POPE e PLPE), com a identificação do tipo de modificação e valor  $m/z$  correspondente.

Modificação	$m/z [M-H]^-$		Cabeça Polar
	POPE	PLPE	
---	716.4	714.4	
+14 (+O-2Da)	730.5	728.5	
+16 (+O)	732.5	730.4	
+28 (+O-4Da)	744.5	742.4	
+30 (+2O-2Da)	746.5	744.5	
+32 (+2O)	748.4	746.4	
+46 (+3O-2Da)	762.3	760.3	
+48 (+3O)	764.5	762.3	
+60 (+4O-4Da)	776.4	774.5	
+62 (+4O-2Da)	778.5	776.5	
+64 (+4O)	780.4	778.2	
+78 (+5O-2Da)		792.5	
+80 (+5O)		794.5	
+92 (+6O-4Da)		806.2	
+94 (+6O-2Da)		808.5	
+96 (+6O)		810.2	

Os produtos de oxidação a  $m/z$  748.4 e 780.4 observados no espetro ESI-MS da POPE oxidada e  $m/z$  746.4 e 778.2 observados no espetro ESI-MS da PLPE oxidada são os principais produtos de oxidação observados durante a fotossensibilização das PEs (Figura 15). Estes produtos foram identificados como hidroperóxidos (aumento de massa de 32 Da da PE não modificada) e di-hidroperóxidos (aumento de massa de 64 Da na PE não modificada) das PEs. Estes resultados estão de acordo com o que se encontra descrito na foto-oxidação de cardiolipinas na presença de uma ftalocianina (Pc 4) que identificou

hidroperóxidos e di-hidroperóxidos de cardiolipina como os principais produtos resultantes da foto-oxidação (43).

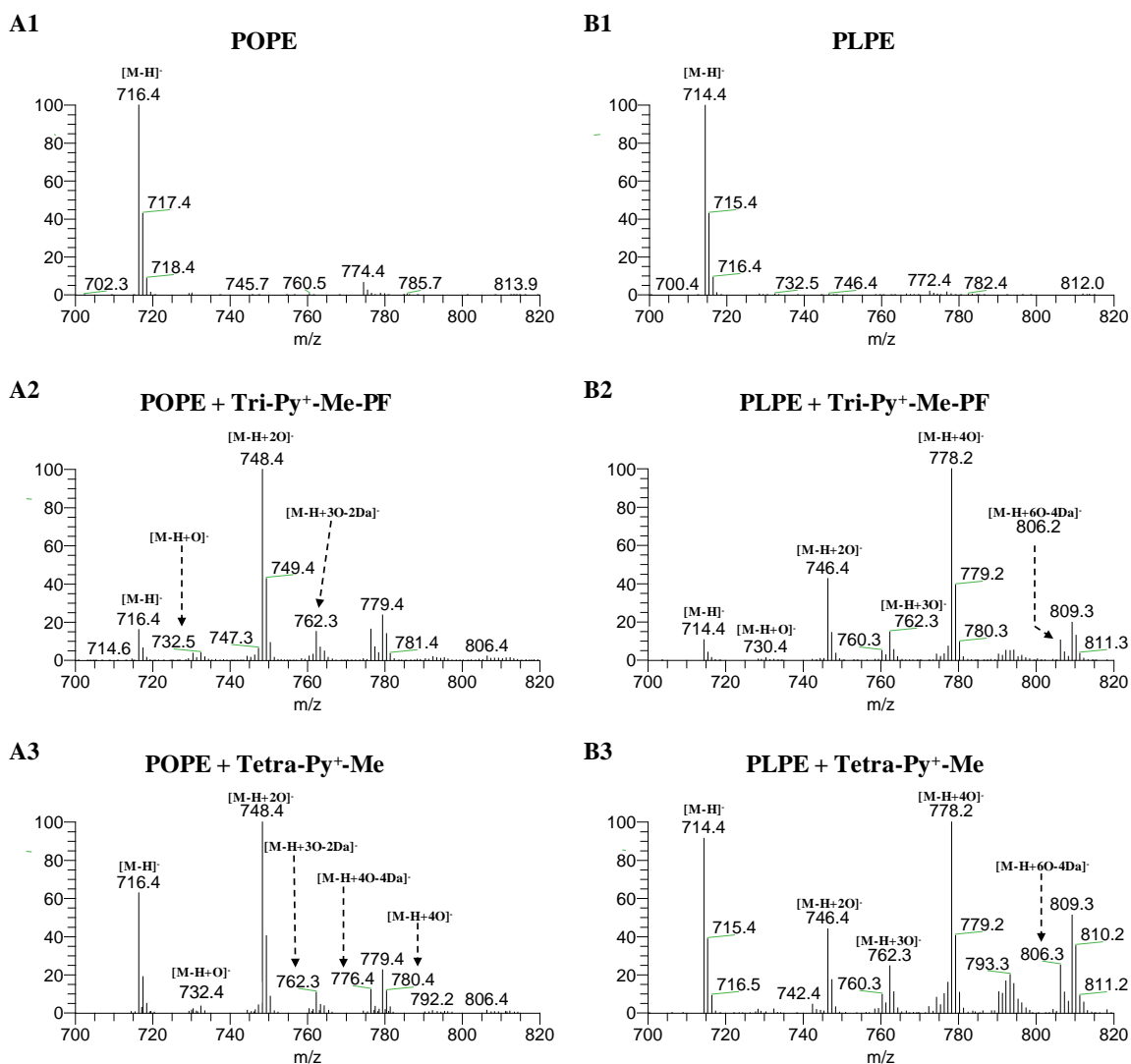


Figura 15 - Espectros ESI-MS da POPE (A) e PLPE (B) irradiadas na ausência de porfirinas (A1 e B1), na presença da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (A2 e B2) e na presença da porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (A3 e B3).

Curiosamente, neste trabalho não foram encontrados produtos de oxidação de cadeia curta formados pela clivagem do ácido gordo da posição *sn*-2 depois da foto-oxidação. Este tipo de produtos já foi detetado em PEs oxidadas pelo método de Fenton (39, 102), mas também não foram encontrados na foto-oxidação com radiação UV-A de PEs glicadas e PEs não glicadas (103). Por outro lado, foram identificados derivados de ácido fosfatídico com a foto-oxidação por radiação UV-A (103), e não foram encontrados com a oxidação pelo método de Fenton (39, 102), nem neste trabalho.

Para confirmar as estruturas dos novos produtos que se formaram, os novos iões identificados nos padrões modificados foram analisados por ESI-MS/MS. Na análise dos espectros ESI-MS/MS dos iões  $[M-H]^-$  não modificados é possível identificar os iões carboxilatos correspondentes aos ácidos gordos não modificados ( $R_1COO^-/R_2COO^-$ ), enquanto que nos espectros dos padrões modificados após irradiação com as porfirinas é possível identificar os iões carboxilato correspondentes aos ácidos gordos oxidados ( $R'_2COO^-$ ). Os espectros ESI-MS/MS apresentados na Figura 16 mostram como exemplo os espectros de ESI-MS/MS obtidos para os produtos de foto-oxidação do padrão POPE irradiado com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, uma vez que a fragmentação é semelhante à dos produtos de oxidação obtidos no caso da irradiação presente com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. A fragmentação dos iões dos produtos de oxidação da PLPE por inserção de um e dois átomos de oxigénio não serão apresentados pois a fragmentação é semelhante à POPE.

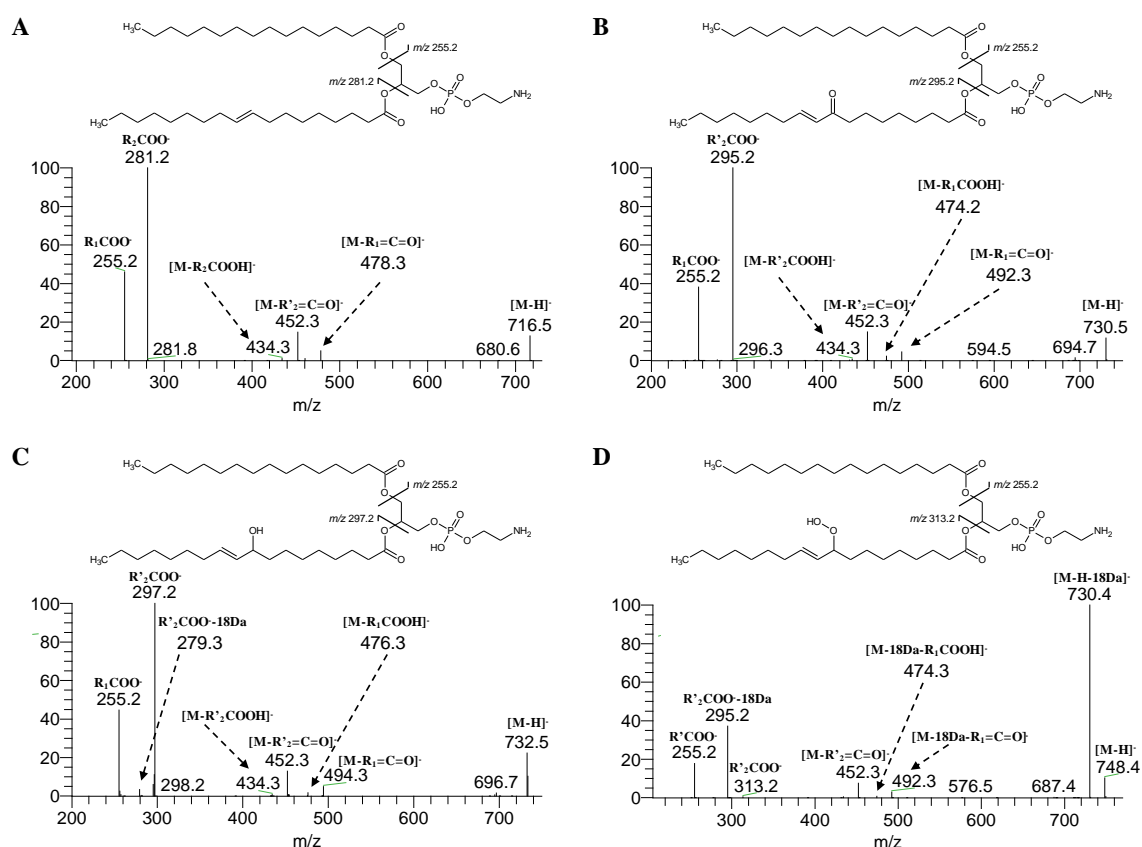


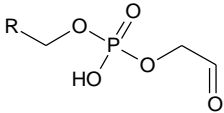
Figura 16 - Espectros ESI-MS/MS da POPE irradiada na ausência de porfirina (A) e os espectros ESI-MS/MS dos produtos derivados ceto, hidroxilo e hidroperóxido (B, C e D respetivamente) formados após irradiação da PE na presença da porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF. Também se encontram representadas as estruturas propostas para estes produtos de oxidação.

No espectro ESI-MS/MS da POPE não modificada cujo ião  $[M-H]^-$  tem  $m/z$  716.5 (Figura 16A), é possível observar os iões correspondentes à perda do ácido gordo da posição *sn-2* na forma de ácido  $[M-R_2COOH]^-$  ( $m/z$  434.4) e na forma de ceto  $[M-R_2=C=O]^-$  ( $m/z$  452.3). O ião resultante da perda do ácido gordo da posição *sn-1* na forma de ceto  $[M-R_1=C=O]^-$  também se observa a  $m/z$  478.3. Os iões carboxilatos correspondentes aos ácidos gordos das posições *sn-1* e *sn-2* aparecem a um valor 255.2 e 281.2 respetivamente. Na Figura 16B e C estão os espectros ESI-MS/MS dos produtos de oxidação da POPE com grupo ceto ( $m/z$  730.5) e grupo hidroxilo ( $m/z$  732.5) respetivamente. Em ambos os espectros observam-se os iões resultantes da perda do ácido gordo modificado da posição *sn-2* sob a forma de ácido ( $m/z$  434.3) e na forma de ceto ( $m/z$  452.3), e ainda os fragmentos correspondentes aos iões carboxilatos da posição *sn-2* modificados a um valor de  $m/z$  295.2 (281 + 14Da) e  $m/z$  297.2 (281+16Da) respetivamente, o que nos confirma que ocorreu oxidação no ácido oleico.

O espectro ESI-MS/MS do ião  $m/z$  748.5 (Figura 16D) corresponde ao derivado hidroperóxido da POPE (+32Da), apresenta o ião fragmento correspondente ao ião carboxilato com hidroperóxido a um  $m/z$  313.2 (281+32Da) e o fragmento resultante da perda água deste mesmo ião, dando origem ao ião  $m/z$  295.2 (281+32-18Da). Um aspeto curioso observado nos espectros ESI-MS/MS do produto de oxidação PE com um derivado ceto (Figura 16B) e o produto de oxidação de PE com um derivado hidroxilo (Figura 16C) é que os iões mais abundantes são os fragmentos modificados  $R'_2COO^-$  enquanto que o ião mais abundante do produto derivado do hidroperóxido (Figura 16D) é o ião correspondente à perda de água do ácido gordo modificado  $R'_2COO^-$ -18Da. Estas mesmas alterações foram também verificadas para o padrão PLPE, e com ambas as porfirinas.

Nos espectros ESI-MS do padrão POPE e PLPE irradiados com porfirina, observam-se novos iões com valores ímpares e valores de  $m/z$  mais elevados que a PE não modificada, quando comparados com os espectros irradiados sem porfirina. Estes iões foram propostos como produtos de oxidação de PEs com modificações na cabeça polar, formado por desaminação da cabeça polar da etanolamina com perda do grupo amino, seguida da formação de um terminal aldeído (Figura 15, Figura 17 e Tabela 5).

Tabela 5 - Produtos de oxidação da POPE e PLPE com modificações na cabeça polar formadas por desaminação da cabeça polar da etanolamina. A tabela mostra os valores dos iões  $m/z$ , a sua mais provável identificação quanto às modificações nos ácidos gordos e na cabeça.

Modificação	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>		Cabeça Polar
	POPE	PLPE	
+16 (+O)	731.5	729.5	
+32 (+2O)	747.5	745.5	
+48 (+3O)	763.7	761.5	
+64 (+4O)	779.4	777.5	
+80 (+5O)		793.3	
+96 (+6O)		809.3	

Estes produtos de oxidação modificados na cabeça têm também oxidação no ácido gordo como se pode observar nos espectros de ESI-MS/MS apresentados na Figura 17. Modificações na cabeça polar de PEs também já foram descritas num estudo no qual se recorreu ao método de oxidação de Fenton em PLPE glicada (102), mas não foram encontradas quando submetidas a irradiação UV-A como método foto-oxidação (103).

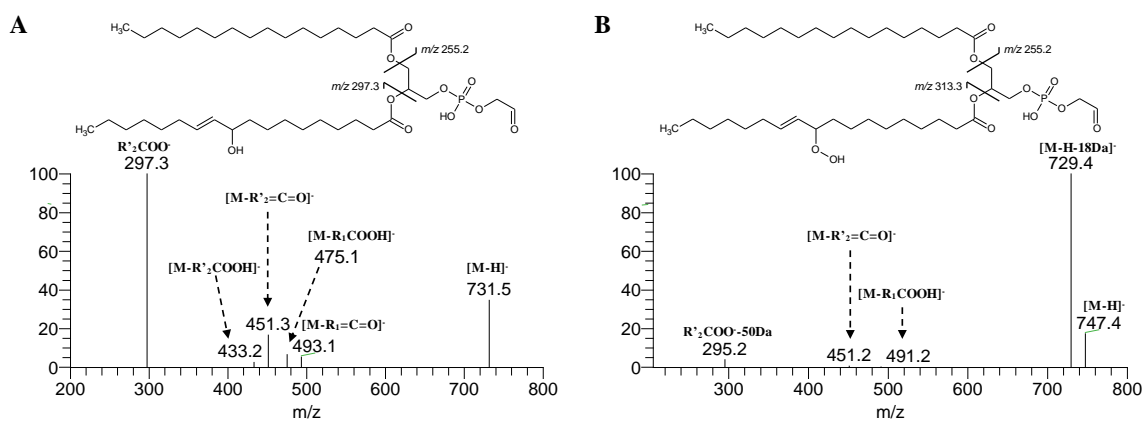


Figura 17 - Espectros de ESI-MS/MS dos iões [M-H]<sup>-</sup> de  $m/z$  731.5 e 747.4 da POPE oxidada (A e B respetivamente).

Ao contrário do que aconteceu com outros trabalhos, neste trabalho não se conseguiu identificar os produtos de oxidação com modificações estruturais apenas na cabeça polar. As modificações na cabeça polar foram observadas apenas quando o ácido gordo insaturado também tinha sofrido oxidação, e são pouco abundantes. Isto sugere que, provavelmente, a oxidação das cadeias de ácidos gordos, principalmente com a formação de derivados hidroperóxidos, ocorre antes da oxidação na cabeça polar.



Os derivados hidroperóxidos são os principais produtos formados durante a foto-oxidação de PEs, os quais já foram relatados como principais produtos da foto-oxidação de CLs com uma ftalocianina (43). A quantidade de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) gerados a partir da oxidação de PEs após a irradiação com duas porfirinas diferentes, foi avaliada utilizando o ensaio de FOX2 (Figura 18) com o objetivo de avaliar a eficácia das duas porfirinas. A quantificação foi realizada para ambos os padrões POPE e PLPE e para ambas as porfirinas, e os resultados foram comparados.

#### Quantificação de hidroperóxidos lipídicos

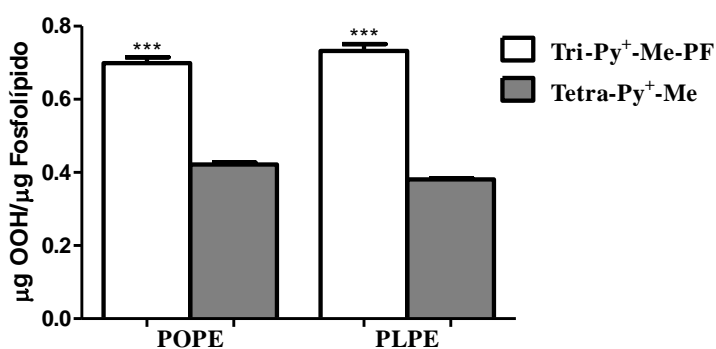


Figura 18 - Quantificação de hidroperóxidos lipídicos nos padrões de POPE e PLPE irradiados com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me utilizando o método de FOX2. Os valores apresentados são a média ± desvio padrão, e \*\*\* a diferença significativas ( $p < 0,0001$ ).

A Figura 18 mostra a quantidade de LOOH medido nas amostras irradiadas na presença de Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (barra branca) e na presença de Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (barra cinzenta). As maiores quantidades de LOOH foram obtidas no ensaio realizado com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF. Estes resultados estão de acordo com a literatura, no qual já tinham identificado a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF como sendo mais eficaz na inativação de bactérias quando comparada com a porfirina Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (98). Para além disso, também estão de acordo com os resultados observados nos espectros ESI-MS dos padrões de PE irradiados (Figura 15), uma vez que apesar do produto de oxidação mais abundante ser o derivado hidroperóxido, é possível ver que a abundância relativa do ião não modificado é superior nos espectros ESI-MS da POPE+Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (Figura 15A3) e PLPE Tetra-Py<sup>+</sup>-Me (Figura 15B3), comparando com o ião não modificado dos espectros POPE+Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (Figura 15A2) e PLPE+Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (Figura 15B2).

### 3. Estudo do efeito da foto-oxidação na *E. coli*

Depois de sabermos que os hidroperóxidos eram o principal produto de oxidação da foto-oxidação com as duas porfirinas testadas, e termos concluído que a porfirina tricatiónea Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF era a mais eficaz, realizámos o estudo da variação do perfil lipídico após a foto-oxidação da *E. coli* ATCC 25922. Depois de separadas as classes de fosfolípidos por TLC, estas foram analisadas por ESI-MS e comparadas com os extratos irradiados na ausência de porfirina, na tentativa de observar algumas diferenças.

A comparação dos espectros de ESI-MS do controlo e da amostra evidencia algumas alterações no perfil lípido das PEs (Figura 19A). No espectro ESI-MS da amostra (Figura 19A2) é possível observar um aumento na abundância relativa dos iões  $m/z$  746.5, 758.5 e 774.5, o que sugere que as espécies moleculares de PEs sofreram oxidação devido à fotossensibilização. O produto de oxidação com  $m/z$  746.5 foi identificado como um derivado de hidroperóxido da espécie  $m/z$  714.6 ( $m/z$  714.6 + 32 Da) com as combinações de ácidos gordos 16:1/18:1 e 16:0/18:2. Os produtos de oxidação  $m/z$  758.5 ( $m/z$  742.5 + 16 Da) e 774.5 ( $m/z$  742.5 + 32 Da) foram identificados como um derivado hidroxilo e hidroperóxido da espécie molecular  $m/z$  742.5 respetivamente, com as combinações de ácidos gordos 18:1/18:1 e 16:1/20:1. Os produtos de oxidação identificados tiveram origem em espécies moleculares de PEs não modificadas com duas insaturações (PE 714.6 (34:2) e PE 742.5 (36:2)), as quais tinham maior probabilidade de sofrerem oxidação. No entanto, não foi possível identificar produtos de oxidação da outra espécie molecular de PE não modificada que também contem duas insaturações (PE 770.5 (38:2)), embora a sua formação em muito baixa abundância não possa ser excluída. De acordo com a análise por MS/MS das espécies moleculares de PE da *E. coli* (Tabela 1), grande parte é composta por ácidos gordos saturados e ácidos gordos cíclicos, os quais não são propensos a sofrer oxidação. Para as outras espécies moleculares que possuem pelo menos um ácido gordo insaturado não foi possível identificar qualquer espécie oxidada, embora possam ser formados em baixa quantidade e não serem detetados por espetrometria de massa.

Na análise do efeito fotodinâmico na classe PG não foram observados produtos de oxidação (Figura 19B), no entanto, não se pode excluir a hipótese de eles se terem formado numa baixa abundância relativa. A análise MS/MS das espécies moleculares das PGs evidencia uma grande quantidade de ácidos gordos saturados e ácidos gordos cíclicos o que justifica o facto de não se observarem espécies oxidadas. Em relação às CLs (Figura

19D) verifica-se uma situação semelhante, ou seja, não foram identificados quaisquer produtos de oxidação, embora a sua formação em muito baixa abundância não possa ser excluída.

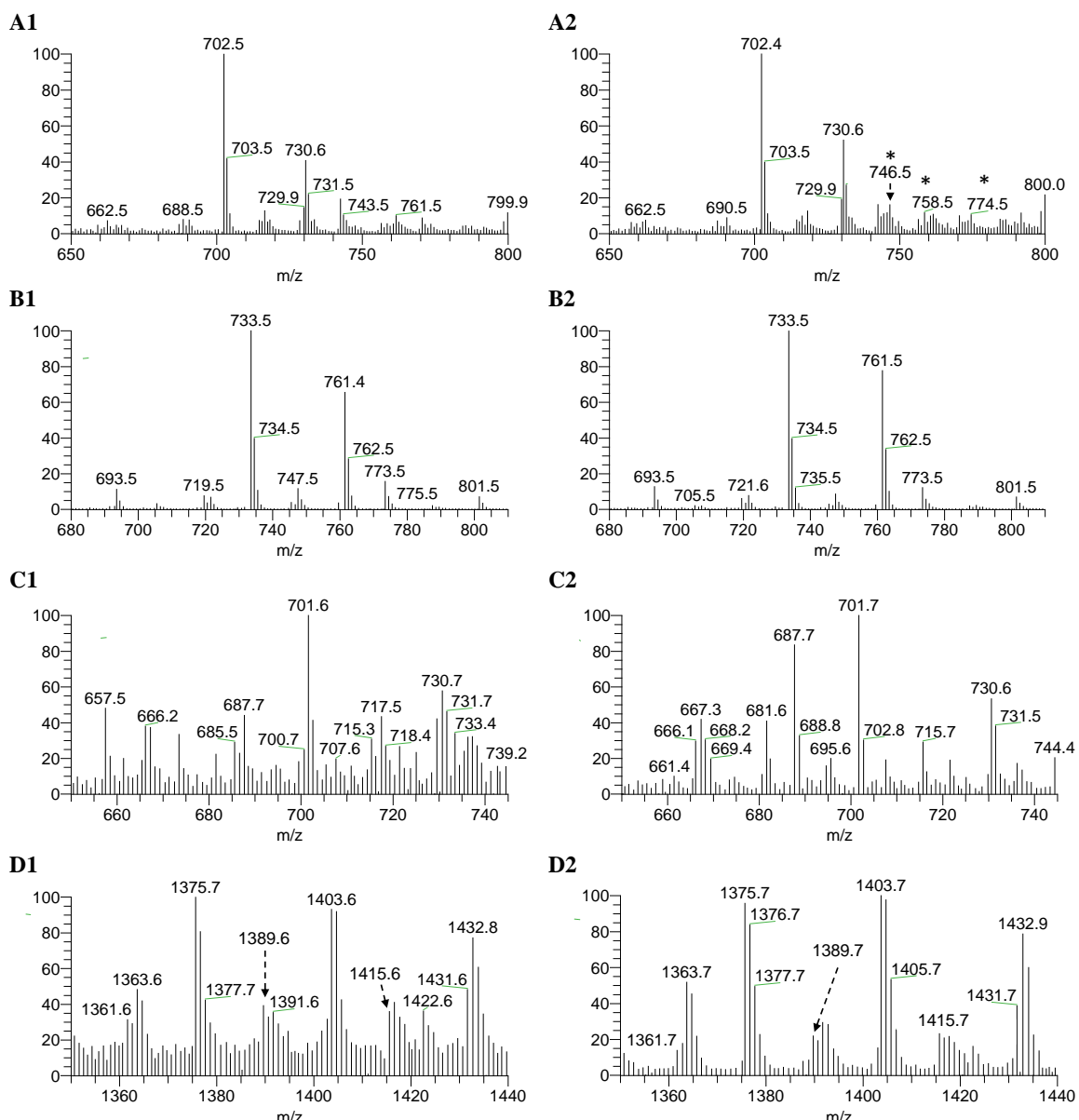


Figura 19 - Comparação dos espectros ESI-MS de fosfatidiletanolamina (PE) (A), fosfatidilglicerol (PG) (B) e cardiolipina (CL) (C e D), extraído a partir de extratos de *E. coli* irradiados sem fotossensibilizador (controlo) (A1, B1, C1 e D1, respetivamente) e irradiados na presença de fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (amostra) (A2, B2, C2 e D2, respetivamente).

Os iões a  $m/z$  774.5 e 746.5 foram identificados na *E. coli* (Figura 19A2) como derivados hidroperóxidos de PE. A análise destes iões por ESI-MS/MS permitiu confirmar esta mesma identificação (Figura 20 e Figura 21). No entanto, a análise por ESI-MS/MS do

ião  $m/z$  758.5 não permitiu confirmar que este ião era um derivado hidroxilo ( $m/z$  742.5 + 16 Da) devido à sobreposição da espécie molecular não modificada PE  $m/z$  758.5.

O produto de oxidação a  $m/z$  774.4 também foi identificado como um derivado de hidroperóxido da PE  $m/z$  742. No espectro ESI-MS/MS do ião  $m/z$  774.4 (Figura 20A) o pico mais abundante a  $m/z$  295.3 foi atribuído ao ião carboxilato do ácido gordo C18:1 com um hidroperóxido [RCOO (C18:1) + 2O - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup> e um ião  $m/z$  281.2 correspondente ao ião carboxilato do ácido gordo C18:1 [RCOO (C18:1)]<sup>-</sup>. Este isómero foi identificado como a PE (18:1/18:1 + 2O) representado na Figura 20B. Um outro isómero apresenta o hidroperóxido ligado no ácido gordo C16:1, confirmado pela presença do pico  $m/z$  267.2, atribuído ao ião [RCOO (C16:1) + 2O - H<sub>2</sub>O]<sup>-</sup>, formado pela perda de água do ião carboxilato C16:1 + 2O. Este isómero foi identificado como a PE (16:1 + 2O/ 20:1) representado na Figura 20C. Por último, foi identificado um outro isómero, correspondente a um derivado di-hidroxilado, com um grupo hidroxilo em cada um dos ácidos gordos C18:1, confirmado pela presença do ião de  $m/z$  297.3 atribuído ao ião [RCOO (C18:1) + O]<sup>-</sup>, o qual foi identificado como PE (18:1 + O/18:1 + O) representado na Figura 20D.

As estruturas apresentadas são apenas propostas de estruturas para cada molécula, uma vez que os grupos hidroperóxidos e hidroxilos encontram-se em posições prováveis, não podendo ser excluídas outros locais de ligação para estes grupos.

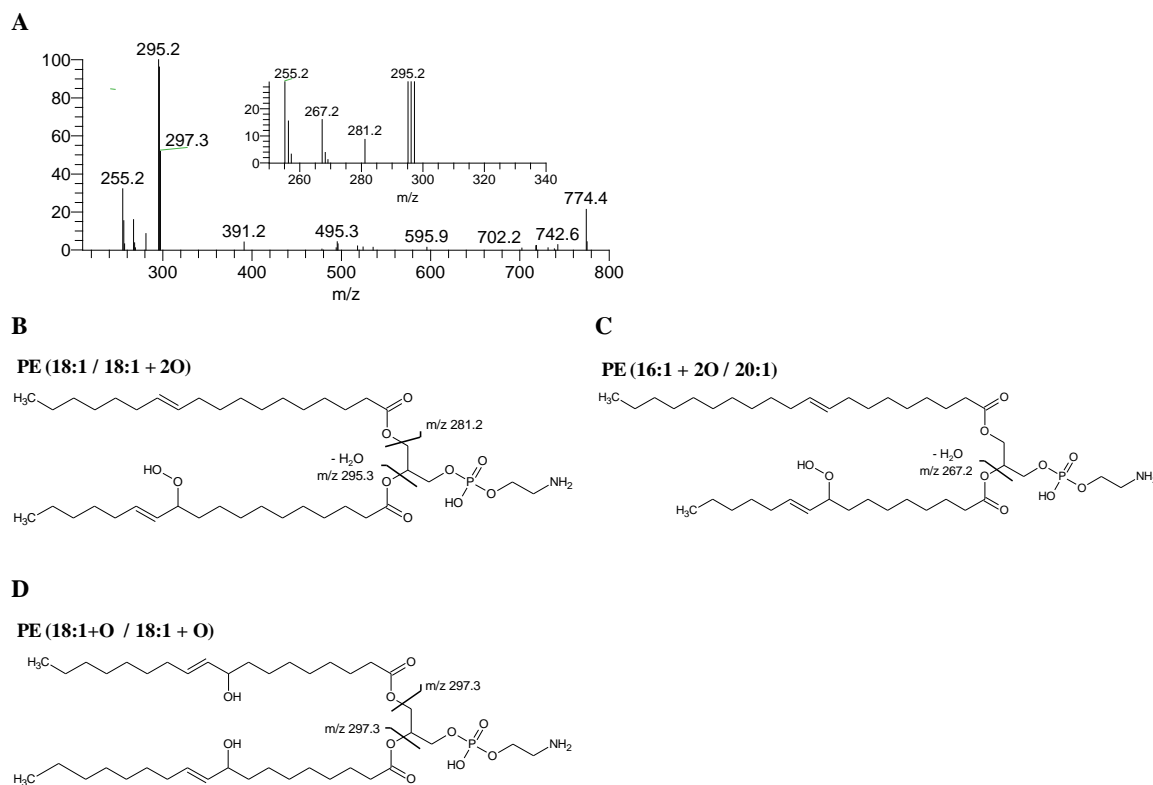


Figura 20 - Espectro ESI-MS/MS do ião de  $m/z$  774.4 (PE 742 + 2O) (A) e estruturas propostas para os derivados de hidroperóxidos de PE 18:1/18:1 + 2O (B), PE 16:1 + 2O/20:1 (C) e PE 18:1 + O/18:1 + O (D).

No espectro ESI-MS/MS do ião  $m/z$  746.5 (Figura 21A), o ião mais abundante a  $m/z$  267.2 foi atribuído ao ião  $[\text{RCOO} (\text{C16:1}) + 2\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^-$ , formado pela perda de água do ião carboxilato C16:1 + 2O. Também é possível observar um ião com menor abundância relativa a  $m/z$  281.2, o qual corresponde ao ião carboxilato  $[\text{RCOO} (\text{C18:1})]^-$ . O ião a  $m/z$  267.2 evidencia a oxidação do ácido gordo C16:1, permitindo a identificação desta espécie oxidada como PE (16:1 + 2O/18:1), representado na Figura 21C. No mesmo espectro ESI-MS/MS é possível observar um ião com menor abundância relativa a  $m/z$  311.3, o qual foi identificado como ião carboxilato do derivado hidroperóxido do ácido gordo C18:2  $[\text{RCOO} (\text{C18:2}) + 2\text{O}]^-$  e um ião  $m/z$  255.2 correspondente ao ião carboxilato do ácido gordo C16:0  $[\text{RCOO} (\text{C16:0})]^-$ . Estes dois iões confirmam a presença da PE oxidada (16:0/18:2 + 2O) representada na Figura 21B. Existe ainda a formação de um outro isômero com o hidroperóxido ligado no ácido gordo C18:1, confirmado pela presença do ião de  $m/z$  295.3, identificado como ião carboxilato do ácido gordo C18:1 com um hidroperóxido  $[\text{RCOO} (\text{C18:1}) + 2\text{O}]^-$  e um outro ião  $m/z$  253.4 identificado como ião

carboxilato do ácido gordo C16:1 [RCOO (C16:1)]<sup>-</sup>. Este isómero foi identificado como a PE (16:1/18:1 + 2O) representado na Figura 21D.

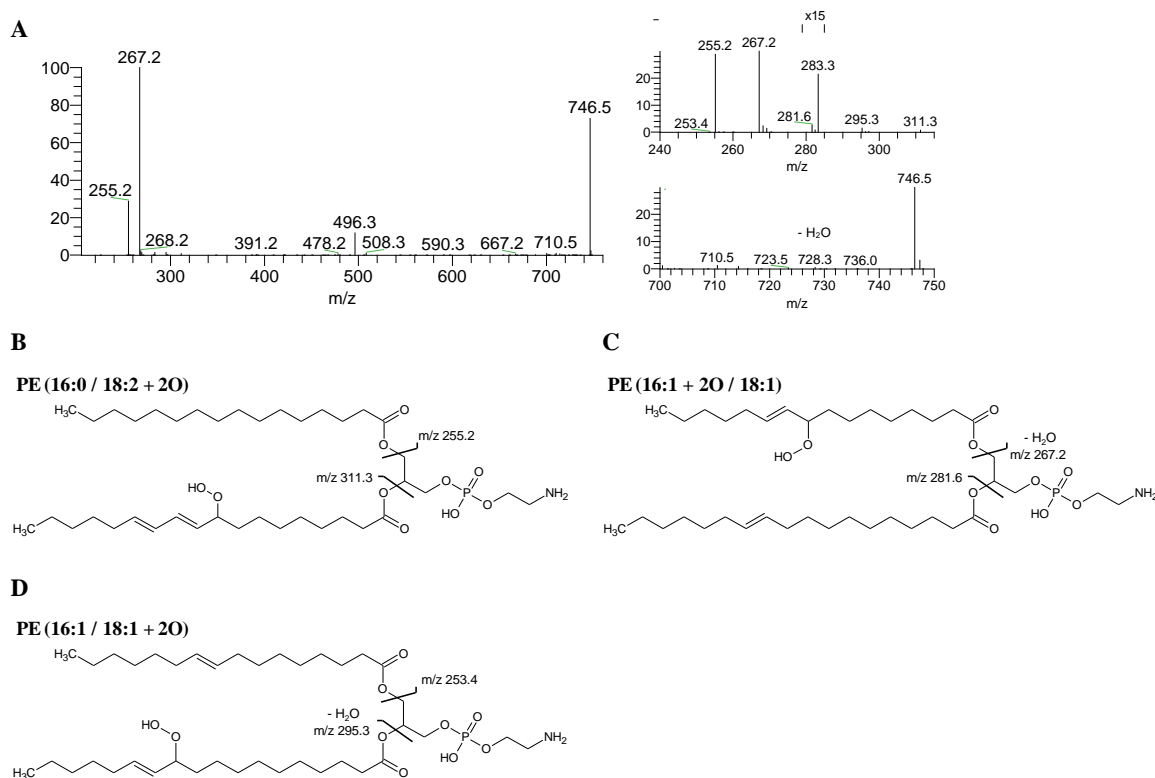


Figura 21 - Espectro ESI-MS/MS do ião  $m/z$  746.6 (PE 714 + 2O) (A) e estruturas propostas para os derivados de hidroperóxidos PE 16:0/18:2 + 2O (B), PE 16:1 + 2O/18:1 (C) and PE 16:1/18:1 + 2O (D).

Os hidroperóxidos são um dos produtos primários resultantes da peroxidação lipídica, os quais se podem decompor dando origem aos derivados hidroxilo, o que justifica as estruturas propostas para as PEs oxidadas identificadas na *E. coli* após foto-oxidação (104). Já foram observados derivados hidroperóxidos em CLs depois de sofrerem foto-oxidação na presença de um fotossensibilizador (43, 44).

A quantificação de hidroperóxidos lipídicos de *E. coli* gerados após o tratamento fotodinâmico foi realizada pelo ensaio de FOX2 nos extratos lipídicos totais tanto do controlo como da amostra (Figura 22). Verifica-se um aumento significativo na concentração de hidroperóxidos lípidos na amostra ( $0,06317 \pm 0,01167 \mu\text{g OOH} / \mu\text{g}$  de fosfolípidos), 93,6% superior à concentração hidroperóxidos lipídicos encontrados no controlo ( $0,004036 \pm 0,0003248 \mu\text{g OOH} / \mu\text{g}$  de fosfolípidos) (teste t de Student,  $p < 0,05$ ).

### Quantificação de hidroperóxidos lipídicos

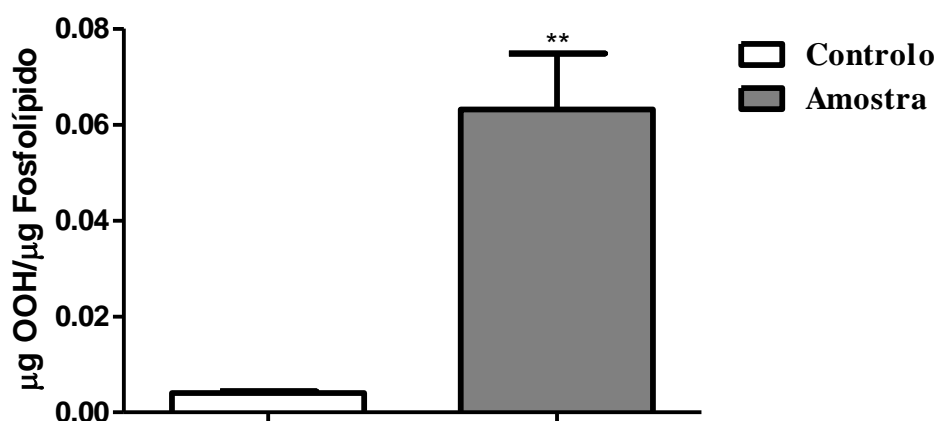


Figura 22 - Quantificação de hidroperóxidos lipídicos nos extratos lípidos totais de *E. coli* irradiados durante 90min na ausência do fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (controlo) e na presença do fotossensibilizador Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF (amostra) pelo método de FOX2. Os valores apresentados são a média  $\pm$  desvio padrão, e \*\* a diferença significativas para o controlo ( $\alpha < 0,05$ ).

Estes resultados vão de encontro aos resultados do ESI-MS/MS das PEs oxidadas  $m/z$  714 + 2O e  $m/z$  742+2O (Figura 20 e Figura 21), e de encontro ao ensaio modelo com os padrões de POPE e PLPE (Figura 16D), confirmando a formação de hidroperóxidos lipídicos após a foto-oxidação da *E coli*.

## **IV. Conclusão**





Este trabalho teve como objetivo estudar as modificações estruturais das PEs resultantes da foto-oxidação na presença de um fotossensibilizador em sistemas modelo, utilizando padrões de PE puros, e uma bactéria Gram negativa. A análise por ESI-MS e ESI-MS/MS dos padrões POPE e PLPE após foto-oxidação permitiu identificar os derivados de hidroperóxidos como os produtos de oxidação mais abundantes resultantes da foto-oxidação na presença das porfirinas Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF e Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. Do teste com os padrões PE foi ainda possível verificar que a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF é mais eficaz que a Tetra-Py<sup>+</sup>-Me. A *E. coli* ATCC 25922 na fase estacionária foi utilizada como modelo biológico e foi sujeita a condições de foto-oxidação semelhantes às utilizadas nos estudos dos fosfolípidos padrão, mas utilizando como fotossensibilizador apenas a porfirina que mostrou melhor eficiência de oxidação, porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF. Após irradiação procedeu-se à extração dos lípidos totais, verificando-se um aumento de 93,6% na quantidade de hidroperóxidos nos extratos lipídicos da *E. coli* irradiados com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF, em comparação com os extratos lipídicos da *E. coli* irradiadas sem a porfirina. A análise por ESI-MS e ESI-MS/MS das PEs da *E. coli* irradiada com a porfirina Tri-Py<sup>+</sup>-Me-PF permitiu identificar dois produtos de oxidação ( $m/z$  746.5 e 774.4) resultantes da inserção de dois oxigénios nas cadeias de ácidos gordos, grupo hidroperóxido ou grupo hidroxilo. Os dados do GC-FID confirmam que os ácidos gordos insaturados sofrem oxidação e, por isso, diminuindo desta forma a sua abundância relativa.

Este trabalho permite concluir que a diminuição da quantidade relativa dos ácidos gordos insaturados e a peroxidação lipídica podem estar na origem dos danos letais que as membranas bacterianas sofrem quando submetidas à terapia fotodinâmica.



## **IV. Bibliografia**



1. David L. Nelson, M. M. C. (2005) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed.
2. Stryer, L. (1995) *Biochemistry*, 4th ed., W. H. Freeman and Company.
3. Vance, J. E. (2008) Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: Two metabolically related aminophospholipids, *Journal of Lipid Research* 49, 1377-1387.
4. Mathews, C. K., and Van Holde, K. E. (1996) *Biochemistry*, Benjamin/Cummings Publishing Company, Incorporated.
5. Devlin, M. T. (1997) *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.
6. Voet, D., and Voet, J. G. (1990) *Biochemistry*, Wiley.
7. Fahy, E., Cotter, D., Sud, M., and Subramaniam, S. (2011) Lipid classification, structures and tools, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1811, 637-647.
8. Fahy, E., Subramaniam, S., Brown, H. A., Glass, C. K., Merrill, A. H., Murphy, R. C., Raetz, C. R. H., Russell, D. W., Seyama, Y., Shaw, W., Shimizu, T., Spener, F., van Meer, G., VanNieuwenhze, M. S., White, S. H., Witztum, J. L., and Dennis, E. A. (2005) A comprehensive classification system for lipids, *Journal of Lipid Research* 46, 839-862.
9. Zubay, G., Parson, W. W., and Vance, D. E. (1995) *Principles of Biochemistry*, McGraw-Hill Education.
10. Milne, S., Ivanova, P., Forrester, J., and Alex Brown, H. (2006) Lipidomics: An analysis of cellular lipids by ESI-MS, *Methods* 39, 92-103.
11. Peterson, B. L., and Cummings, B. S. (2006) A review of chromatographic methods for the assessment of phospholipids in biological samples, *Biomedical Chromatography* 20, 227-243.
12. Bochkov, V. N., Oskolkova, O. V., Birukov, K. G., Levonen, A. L., Binder, C. J., and Stöckl, J. (2010) Generation and biological activities of oxidized phospholipids, *Antioxidants and Redox Signaling* 12, 1009-1059.
13. Fruhwirth, G. O., Loidl, A., and Hermetter, A. (2007) Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1772, 718-736.
14. Spickett, C. M., and Dever, G. (2005) Studies of phospholipid oxidation by electrospray mass spectrometry: From analysis in cells to biological effects, *BioFactors* 24, 17-31.
15. Leitinger, N. (2005) Oxidized phospholipids as triggers of inflammation in atherosclerosis, *Molecular Nutrition & Food Research* 49, 1063-1071.
16. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., and Noguchi, N. (2005) Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 668-676.
17. Subbanagounder, G., Deng, Y., Borromeo, C., Dooley, A. N., Berliner, J. A., and Salomon, R. G. (2002) Hydroxy alkenal phospholipids regulate inflammatory functions of endothelial cells, *Vascular Pharmacology* 38, 201-209.
18. Sonnen, J. A., Breitner, J. C., Lovell, M. A., Markesbery, W. R., Quinn, J. F., and Montine, T. J. (2008) Free radical-mediated damage to brain in Alzheimer's disease and its transgenic mouse models, *Free Radical Biology and Medicine* 45, 219-230.
19. O'Donnell, V. B. (2011) Mass spectrometry analysis of oxidized phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, *Biochimica et biophysica acta* 1811, 818-826.

20. Domingues, M. R. M., Reis, A., and Domingues, P. (2008) Mass spectrometry analysis of oxidized phospholipids, *Chemistry and Physics of Lipids* 156, 1-12.
21. Spiteller, G. (2006) Peroxyl radicals: Inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products, *Free Radical Biology and Medicine* 41, 362-387.
22. Bacot, S., Bernoud-Hubac, N., Chantegrel, B., Deshayes, C., Doutheau, A., Ponsin, G., Lagarde, M., and Guichardant, M. (2007) Evidence for in situ ethanolamine phospholipid adducts with hydroxy-alkenals, *Journal of Lipid Research* 48, 816-825.
23. Hoff, H. F., O'Neil, J., Wu, Z., Hoppe, G., and Salomon, R. L. (2003) Phospholipid hydroxyalkenals: biological and chemical properties of specific oxidized lipids present in atherosclerotic lesions, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 275-282.
24. Reis, A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. V., and Domingues, M. R. (2006) Peptide-phospholipid cross-linking reactions: Identification of leucine enkephalin-alka(e)nal-glycerophosphatidylcholine adducts by tandem mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17, 657-660.
25. Zamora, R., and Hidalgo, F. J. (2003) Phosphatidylethanolamine Modification by Oxidative Stress Product 4,5(E)-Epoxy-2(E)-heptenal, *Chemical Research in Toxicology* 16, 1632-1641.
26. Cole, A. L., Subbanagounder, G., Mukhopadhyay, S., Berliner, J. A., and Vora, D. K. (2003) Oxidized Phospholipid-Induced Endothelial Cell/Monocyte Interaction Is Mediated by a cAMP-Dependent R-Ras/PI3-Kinase Pathway, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 23, 1384-1390.
27. Androulakis, N., Durand, H., Ninio, E., and Tsoukatos, D. C. (2005) Molecular and mechanistic characterization of platelet-activating factor-like bioactivity produced upon LDL oxidation, *Journal of Lipid Research* 46, 1923-1932.
28. Leitinger, N., Tyner, T. R., Oslund, L., Rizza, C., Subbanagounder, G., Lee, H., Shih, P. T., Mackman, N., Tigyi, G., Territo, M. C., Berliner, J. A., and Vora, D. K. (1999) Structurally similar oxidized phospholipids differentially regulate endothelial binding of monocytes and neutrophils, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 12010-12015.
29. Pégorier, S., Stengel, D., Durand, H., Croset, M., and Ninio, E. (2006) Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages: Implications in atherosclerosis, *Atherosclerosis* 188, 433-443.
30. Subbanagounder, G., Leitinger, N., Shih, P. T., Faull, K. F., and Berliner, J. A. (1999) Evidence That Phospholipid Oxidation Products and/or Platelet-Activating Factor Play an Important Role in Early Atherogenesis: In Vitro and In Vivo Inhibition by WEB 2086, *Circulation Research* 85, 311-318.
31. Subbanagounder, G., Wong, J. W., Lee, H., Faull, K. F., Miller, E., Witztum, J. L., and Berliner, J. A. (2002) Epoxyisoprostane and Epoxycyclopentenone Phospholipids Regulate Monocyte Chemotactic Protein-1 and Interleukin-8 Synthesis: Formation of these Oxidized Phospholipids in Response to Interleukin-1 $\beta$ , *Journal of Biological Chemistry* 277, 7271-7281.
32. Zhang, W., and Salomon, R. G. (2005) Oxidized phospholipids, isolevuglandins, and atherosclerosis, *Molecular Nutrition & Food Research* 49, 1050-1062.

33. Borst, J. W., Visser, N. V., Kouptsova, O., and Visser, A. J. W. G. (2000) Oxidation of unsaturated phospholipids in membrane bilayer mixtures is accompanied by membrane fluidity changes, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1487, 61-73.
34. Megli, F. M., Russo, L., and Sabatini, K. (2005) Oxidized phospholipids induce phase separation in lipid vesicles, *FEBS Letters* 579, 4577-4584.
35. Megli, F. M., and Sabatini, K. (2004) Mitochondrial phospholipid bilayer structure is ruined after liver oxidative injury in vivo, *FEBS Letters* 573, 68-72.
36. Sabatini, K., Mattila, J.-P., Megli, F. M., and Kinnunen, P. K. J. (2006) Characterization of Two Oxidatively Modified Phospholipids in Mixed Monolayers with DPPC, *Biophysical Journal* 90, 4488-4499.
37. Megli, F. M., and Russo, L. (2008) Different oxidized phospholipid molecules unequally affect bilayer packing, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778, 143-152.
38. Deigner, H. P., and Hermetter, A. (2008) Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology, *Current Opinion in Lipidology* 19, 289-294.
39. Domingues, M. R. M., Simoes, C., da Costa, J. P., Reis, A., and Domingues, P. (2009) Identification of 1-palmitoyl-2-linoleoyl-phosphatidylethanolamine modifications under oxidative stress conditions by LC-MS/MS, *Biomedical Chromatography* 23, 588-601.
40. Christie, W. The Lipid Library.
41. Cronan, J. E. (2003) Bacterial membrane lipids: Where do we stand?, *Annual Review of Microbiology* 57, 203-224.
42. Gugiu, B. G., Mesaros, C. A., Sun, M. J., Gu, X. R., Crabb, J. W., and Salomon, R. G. (2006) Identification of oxidatively truncated ethanolamine phospholipids in retina and their generation from polyunsaturated phosphatidylethanolamines, *Chemical Research in Toxicology* 19, 262-271.
43. Kim, J., Rodriguez, M. E., Oleinick, N. L., and Anderson, V. E. (2010) Photo-oxidation of cardiolipin and cytochrome c with bilayer-embedded Pc 4, *Free Radical Biology and Medicine* 49, 718-725.
44. Rodriguez, M. E., Kim, J., Delos Santos, G. B., Azizuddin, K., Berlin, J., Anderson, V. E., Kenney, M. E., and Oleinick, N. L. (2010) Binding to and photo-oxidation of cardiolipin by the phthalocyanine photosensitizer Pc 4, *Journal of Biomedical Optics* 15.
45. Almeida, A., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Alves, E., Costa, L., and Faustino, M. A. F. (2009) Phage Therapy and Photodynamic Therapy: Low Environmental Impact Approaches to Inactivate Microorganisms in Fish Farming Plants, *Marine Drugs* 7, 268-313.
46. Shackley, D. C., Whitehurst, C., Clarke, N. W., Betts, C., and Moore, J. V. (1999) Photodynamic therapy, *Journal of the Royal Society of Medicine* 92, 562-565.
47. Wainwright, M. (1998) Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT), *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 42, 13-28.
48. DeRosa, M. C., and Crutchley, R. J. (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews* 233, 351-371.
49. Costa, L., Alves, E., Carvalho, C. M. B., Tome, J. P. C., Faustino, M. A. F., Neves, M., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., and Almeida, A. (2008) Sewage bacteriophage photoinactivation by cationic porphyrins: a study of charge effect, *Photochemical & Photobiological Sciences* 7, 415-422.



50. Alves, E., Carvalho, C. M. B., Tome, J. P. C., Faustino, M. A. F., Neves, M., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Mendo, S., and Almeida, A. (2008) Photodynamic inactivation of recombinant bioluminescent *Escherichia coli* by cationic porphyrins under artificial and solar irradiation, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 35, 1447-1454.
51. Costa, L., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tome, J. P. C., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., and Almeida, A. (2010) Sewage bacteriophage inactivation by cationic porphyrins: influence of light parameters, *Photochemical & Photobiological Sciences* 9, 1126-1133.
52. da Silva, R. N., Tomé, A. C., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Faustino, M. A. F., Cavaleiro, J. A. S., Oliveira, A., Almeida, A., and Cunha, Â. (2012) Photo-inactivation of *Bacillus* endospores: inter-specific variability of inactivation efficiency, *Microbiology and Immunology* 56, 692-699.
53. Bonnett, R. (2000) *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*, Gordon and Breach Science Publishers.
54. Wainwright, M. (2000) Methylene blue derivatives — suitable photoantimicrobials for blood product disinfection?, *International Journal of Antimicrobial Agents* 16, 381-394.
55. Almeida, A., Cunha, A., Faustino, M. A. F., Tome, A. C., and Neves, M. G. P. M. S. (2011) Chapter 5 Porphyrins as Antimicrobial Photosensitizing Agents, in *Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications*, pp 83-160, The Royal Society of Chemistry.
56. Tavares, A., Dias, S. R. S., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A. F., Tome, J. P. C., Neves, M., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Alves, E., and Almeida, A. (2011) Mechanisms of photodynamic inactivation of a Gram-negative recombinant bioluminescent bacterium by cationic porphyrins, *Photochemical & Photobiological Sciences* 10, 1659-1669.
57. Lauro, F. M., Pretto, P., Covolo, L., Jori, G., and Bertoloni, G. (2002) Photoinactivation of bacterial strains involved in periodontal diseases sensitized by porphycene-polylysine conjugates, *Photochemical & Photobiological Sciences* 1, 468-470.
58. Pedigo, L. A., Gibbs, A. J., Scott, R. J., and Street, C. N. (2009) Absence of bacterial resistance following repeat exposure to photodynamic therapy, 73803H-73803H.
59. Tavares, A., Carvalho, C. M. B., Faustino, M. A., Neves, M., Tome, J. P. C., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Gomes, N. C. M., Alves, E., and Almeida, A. (2010) Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment, *Marine Drugs* 8, 91-105.
60. Oliveira, A., Almeida, A., Carvalho, C. M. B., Tome, J. P. C., Faustino, M. A. F., Neves, M., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., and Cunha, A. (2009) Porphyrin derivatives as photosensitizers for the inactivation of *Bacillus cereus* endospores, *Journal of Applied Microbiology* 106, 1986-1995.
61. Alves, E., Faustino, M. A. F., Tome, J. P. C., Neves, M., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., Gomes, N. C. M., and Almeida, A. (2011) Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy in Aquaculture: Photoinactivation Studies of *Vibrio fischeri*, *Plos One* 6.

62. Costa, L., Tome, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tome, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Faustino, M. A. F., Cunha, A., Gomes, N. C. M., and Almeida, A. (2011) Evaluation of resistance development and viability recovery by a non-enveloped virus after repeated cycles of aPDT, *Antiviral Research* 91, 278-282.
63. Merchat, M., Spikes, J. D., Bertoloni, G., and Jori, G. (1996) Studies on the mechanism of bacteria photosensitization by meso-substituted cationic porphyrins, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 35, 149-157.
64. Jori, G., Fabris, C., Soncin, M., Ferro, S., Coppellotti, O., Dei, D., Fantetti, L., Chiti, G., and Roncucci, G. (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications, *Lasers in Surgery and Medicine* 38, 468-481.
65. Hamblin, M. R., and Hasan, T. (2004) Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?, *Photochemical & Photobiological Sciences* 3, 436-450.
66. Girotti, A. W. (2001) Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 63, 103-113.
67. Fiel, R. J., Datta-Gupta, N., Mark, E. H., and Howard, J. C. (1981) Induction of DNA Damage by Porphyrin Photosensitizers, *Cancer Research* 41, 3543-3545.
68. Schäfer, M., Schmitz, C., and Horneck, G. (1998) High sensitivity of *Deinococcus radiodurans* to photodynamically-produced singlet oxygen, *International Journal of Radiation Biology* 74, 249-253.
69. Maisch, T., Szeimies, R.-M., Jori, G., and Abels, C. (2004) Antibacterial photodynamic therapy in dermatology, *Photochemical & Photobiological Sciences* 3, 907-917.
70. Merchat, M., Bertolini, G., Giacomini, P., Villaneuva, A., and Jori, G. (1996) Meso-substituted cationic porphyrins as efficient photosensitizers of gram-positive and gram-negative bacteria, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 32, 153-157.
71. Jori, G., and Brown, S. B. (2004) Photosensitized inactivation of microorganisms, *Photochemical & Photobiological Sciences* 3, 403-405.
72. Folch, J., Ascoli, I., Lees, M., Meath, J. A., and LeBaron, F. N. (1951) PREPARATION OF LIPIDE EXTRACTS FROM BRAIN TISSUE, *Journal of Biological Chemistry* 191, 833-841.
73. Bligh, E. G., and Dyer, W. J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.
74. Ardrey, R. E. (2003) *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, J. Wiley.
75. Fried, B. S., J (1994) *Thin-layer chromatography : techniques and applications*, 3rd edition ed., New York.
76. Simões, V. S. (2008) Glicoxidação: Estudo da oxidação de fosfatidiletanolaminas glicosiladas, Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.
77. White, T., Bursten, S., Federighi, D., Lewis, R. A., and Nudelman, E. (1998) High-Resolution Separation and Quantification of Neutral Lipid and Phospholipid Species in Mammalian Cells and Sera by Multi-One-Dimensional Thin-Layer Chromatography, *Analytical Biochemistry* 258, 109-117.
78. Pulfer, M., and Murphy, R. C. (2003) Electrospray mass spectrometry of phospholipids, *Mass Spectrometry Reviews* 22, 332-364.

79. Fuchs, B., Bresler, K., and Schiller, J. (2011) Oxidative changes of lipids monitored by MALDI MS, *Chemistry and Physics of Lipids* 164, 782-795.
80. Guiochon, G. (2007) Monolithic columns in high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A* 1168, 101-168.
81. Jungalwala, F. B., Turel, R. J., Evans, J. E., and McCluer, R. H. (1975) Sensitive analysis of ethanolamine and serine containing phosphoglycerides by high performance liquid chromatography, *Biochemical Journal* 145, 517-526.
82. Spickett, C. M., Reis, A., and Pitt, A. R. (2011) Identification of oxidized phospholipids by electrospray ionization mass spectrometry and LC-MS using a QQLIT instrument, *Free Radical Biology and Medicine* 51, 2133-2149.
83. Griffiths, W. J., Jonsson, A. P., Liu, S., Rai, D. K., and Wang, Y. (2001) Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry, *Biochemical Journal* 355, 545-561.
84. Sleno, L., and Volmer, D. A. (2004) Ion activation methods for tandem mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 39, 1091-1112.
85. Kicman, A. T., Parkin, M. C., and Iles, R. K. (2007) An introduction to mass spectrometry based proteomics—Detection and characterization of gonadotropins and related molecules, *Molecular and Cellular Endocrinology* 260–262, 212-227.
86. Finehout, E. J., and Lee, K. H. (2004) An introduction to mass spectrometry applications in biological research, *Biochemistry and Molecular Biology Education* 32, 93-100.
87. Ashcroft, A. E., and Barnett, N. W. (1997) *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*, Royal Society of Chemistry.
88. Johnstone, R. A. W., and Rose, M. E. (1996) *Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*, Cambridge University Press.
89. Zenobi, R., and Knochenmuss, R. (1998) Ion formation in maldi mass spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews* 17, 337-366.
90. Yin, H., Cox, B. E., Liu, W., Porter, N. A., Morrow, J. D., and Milne, G. L. (2009) Identification of intact oxidation products of glycerophospholipids in vitro and in vivo using negative ion electrospray iontrap mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 44, 672-680.
91. Carvalho, C. M. B., Gomes, A. T. P. C., Fernandes, S. C. D., Prata, A. C. B., Almeida, M. A., Cunha, M. A., Tomé, J. P. C., Faustino, M. A. F., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Lin, Z., Rainho, J. P., and Rocha, J. (2007) Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial  $\beta$ -galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 88, 112-118.
92. Oursel, D., Loutelier-Bourhis, C., Orange, N., Chevalier, S., Norris, V., and Lange, C. M. (2008) Lipid composition of membranes of Escherichia coli by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using negative electrospray ionisation (Rapid Communications in Mass Spectrometry (2007) 21, (1721-1728) DOI: 10.1002/rcm3013), *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 3338.
93. Bartlett, E. M., and Lewis, D. H. (1970) Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate, *Analytical Biochemistry* 36, 159-167.
94. Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., and Schiller, J. (2011) Lipid analysis by thin-layer chromatography—A review of the current state, *Journal of Chromatography A* 1218, 2754-2774.

95. Wolff, S. P. (1994) Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides, *Methods in Enzymology* 233, 182-189.
96. Aued-Pimentel, S., Lago, J. H. G., Chaves, M. H., and Kumagai, E. E. (2004) Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropenoids fatty acids from *Sterculia striata* St. Hil. Et Nauds seed oil, *Journal of Chromatography A* 1054, 235-239.
97. Alves, E., Faustino, M. A. F., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, Â., Gomes, N. C. M., and Almeida, A. (2013) Nucleic acid changes during photodynamic inactivation of bacteria by cationic porphyrins, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21, 4311-4318.
98. Alves, E., Costa, L., Carvalho, C., Tome, J., Faustino, M., Neves, M., Tome, A., Cavaleiro, J., Cunha, A., and Almeida, A. (2009) Charge effect on the photoinactivation of Gram-negative and Gram-positive bacteria by cationic meso-substituted porphyrins, *BMC Microbiology* 9, 70.
99. Kol, M. A., Kuster, D. W. D., Boumann, H. A., de Cock, H., Heck, A. J. R., de Kruijff, B., and de Kroon, A. I. P. M. (2004) Uptake and remodeling of exogenous phosphatidylethanolamine in *E. coli*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1636, 205-212.
100. Hsu, F. F., and Turk, J. (2006) Characterization of cardiolipin from *Escherichia coli* by electrospray ionization with multiple stage quadrupole ion-trap mass spectrometric analysis of  $[M - 2H + Na]^-$  ions, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17, 420-429.
101. Oursel, D., Loutelier-Bourhis, C., Orange, N., Chevalier, S., Norris, V., and Lange, C. M. (2007) Identification and relative quantification of fatty acids in *Escherichia coli* membranes by gas chromatography/mass spectrometry, *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 21, 3229-3233.
102. Simões, C., Simões, V., Reis, A., Domingues, P., and Domingues, M. R. (2010) Oxidation of glycated phosphatidylethanolamines: evidence of oxidation in glycated polar head identified by LC-MS/MS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 2417-2427.
103. Melo, T., Silva, E. M. P., Simões, C., Domingues, P., and Domingues, M. R. M. (2013) Photooxidation of glycated and non-glycated phosphatidylethanolamines monitored by mass spectrometry, *Journal of Mass Spectrometry* 48, 68-78.
104. Reis, A., and Spickett, C. M. (2012) Chemistry of phospholipid oxidation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1818, 2374-2387.